

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

**A SZARKOMER DINAMIKA (FRANK-STARLING-MECHANIZMUS)
MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ EMLŐS FAJOKBAN
FIZIOLÓGIÁS ÉS PATOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT**

Dr. Édes István Ferenc

Témavezető: Dr. Papp Zoltán



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
KARDIOLÓGIAI INTÉZET, KLINIKAI FIZIOLÓGIAI TANSZÉK**

DEBRECEN, 2008

1. Bevezetés

1.1. A szívizom kontrakciójának mechanizmusa

A kontrakció kapcsán a miofibrilláris történéseket egy dinamikus és ciklikus folyamatként lehet értelmezni. Ennek egyik megközelítése az ún. három-szintű modell (ábra). 1) Nyugalmi állapotban (alacsony Ca^{2+} koncentráció mellett) a tropomiozin bokkolja az aktin felszínén a keresztkötésekhez szükséges „aktív” felületet (blokkolt állapot). 2) A depolarizációt követően emelkedik a szabad citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció és Ca^{2+} kötődik a troponin C-hez. 3) A Ca^{2+} kötődése konformációváltozást indukál a troponin C harmadlagos szerkezetében, ami miatt egyrészt csökken a troponin I, aktinra gyakorolt gátlóhatása (aktinhoz való kötődése), másrészt a tropomiozin fonál kissé elmozdul az aktin környezetében (az aktinárok felé húzódik) és részben szabaddá válik az aktin felszínén a miozinnal való keresztkötésekhez szükséges „aktív” felület (zárt állapot). 4) Az ún. zárt állapotban már gyenge keresztkötések alakulnak ki a miozin fej és az aktin szabaddá váló „aktív” felszíne között, amely folyamat gyenge erőátadást (erőgenerálást) is eredményez. A feltételezések szerint a nyugalmi rosthosszúság növekedésével közelebb kerülnek a vékony és vastag filamentumok (csökken a keresztmetszet - „lattice spacing”), ami kedvez a zárt állapot és a gyenge keresztkötések kialakulásának. 5) Ca^{2+} jelenlétében (magas kooperációval) kialakul az ún. nyitott állapot, amikor a tropomiozin fonál tovább csúszik az aktinárok irányába, és teljesen szabaddá válik az aktin „aktív” felszíne. Mindezek a folyamatok kedveznek az erős keresztkötések kialakulásának és az erőgenerálásnak (ábra). 6) A relaxáció kapcsán fordított folyamatok zajlanak: disszociál a Ca^{2+} a troponin C-ről (mivel a Ca^{2+} nagy sebességgel a szarkoplazmatikus retikulum raktárakba pumpálódik), visszaáll a troponin C eredeti konformációja és ismét blokkolódik az aktin felszínén az „aktív” felület

(visszacsúszik a tropomiozin szál az eredeti, nyugalmi pozíciójába), ami a keresztkötésekhez szükséges.

A β -adrenerg stimulálás hatására egy fehérje foszforilációs kaszkád zajlik le a szívizomban. A miofibrilláris fehérjék közül a troponin I és a C protein foszforilálódik β -adrenerg agonista alkalmazását követően. A troponin I foszforiláció funkcionális hatása egyre inkább érthetővé válik az új kísérleti adatok tükrében. A jelenlegi elképzelések szerint a foszforiláció csökkenti a miofibrillumok Ca^{2+} érzékenységét (jobbra tolódnak a kamrafunkció- és a miozin ATPáz aktivitásának Ca^{2+} függését reprezentáló görbék). Mindezek alapján a troponin I foszforiláció hatására könnyebben disszociál le a Ca^{2+} a troponin C-ről és ez hozzájárulhat a β -adrenerg stimulálás során bekövetkező pozitív luzitróp hatásokhoz. Ugyanakkor ez a folyamat fordított irányban is működik. Patológias körülmények között (szívelégtelenség), a β_1 -adrenerg receptorszám csökkenése és szétkapcsolódása miatt csökken a troponin I bazális foszforiláltsága, ami - valószínűleg kompenzatorikus folyamatként - növeli a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységét. A C protein foszforilációjának kontrakcióra gyakorolt hatása intenzív kutatás tárgyát képezi, ennek ellenére jelenleg csak szerény és bizonytalan eredmények ismeretesek.

1.2. A nyugalmi rosthosszúság és a kontrakciós erő

Frank és Starling munkássága óta ismert a nyugalmi rosthosszúság (végdiasztolés volumen) és a megfelelő szízüregben kialakult nyomás közötti összefüggés. A Frank-Starling-görbe csúcspontja mind vázizom, mind a szívizom esetében olyan nyugalmi rosthosszúságnál van, ahol a szarkomerek hossza 2,3 μm körül van. Eddig a rosthosszúságig tart a Frank-Starling-görbe felszálló szakasza, majd egy mérsékelten csökkenő leszálló szakasz következik. Az optimális szarkomer hossz (2,3 μm) mellett maximális a miozin és aktin között kialakult kereszthidak száma. Ezen érték felett (>2,3 μm) a vékony filamentumok kezdenek kicsúszni a vastag filamentumok közül (csökken a

keresztkötések száma), ugyanakkor alacsony szarkomer hossz esetében ($<2.3 \mu\text{m}$) a vékonyfilamentumok átcsúsznak a sarcomer másik oldalára és részlegesen fedésbe kerülnek egymással. Ez szintén csökkenti a keresztkötések kialakulásának lehetőségét. A szívizom esetében – még nagyfokú dilatáció mellett is – a szarkomerhossz ritkán haladja meg a $2.2\text{-}2.4 \mu\text{m}$ értéket, tehát még a dekompenzált miokardium is a Frank-Starling-görbe csúcsán működik. A szívizom masszív kötőszöveti rendszere (kollagén, titin stb.) megakadályozza a miofilamentumok túlzott megnyúlását.

A nyugalmi rosthosszúság és a kontrakciós erő közötti összefüggés magyarázatául régebben sokáig az optimális aktin-miozin közötti átfedést (optimális lehetőség a kereszthidak kialakítására) tartották. Újabban egyértelműen igazolták, hogy az optimális szarkomer elrendeződés mellett egyéb tényezőknek is meghatározó szerepük van. Ezek közül a következőket tartják lényegesnek: 1) A nyugalmi rosthosszúság növekedésével csökken a szívizomrostok harántátmérője (a megnyúlt rostok keskenyebbek – csökken a „lattice spacing”), így lecsökken a távolság a vastag és vékony filamentumok között (miozin és aktin). Mindez kedvez az aktin-miozin kölcsönhatások, a gyenge keresztkötések kialakításának, ezért bizonyos korlátok között a rosthosszúság és kontrakciós erő között pozitív korreláció van. 2) A rosthosszúság növekedésével érzékenyebbé válik a Ca^{2+} receptor (troponin C) a Ca^{2+} iránt, tehát azonos Ca^{2+} tranziens mellett a nyugalmi rosthosszúság növekedésével változik a kontrakciós erő.

A Frank-Starling-törvény pontos hatásmechanizmusának megértéséhez ugyanakkor még további részletes vizsgálatok szükségesek.

1.3. β -adrenerg receptor rendszer, miofibrilláris fehérjék és a szívelégtelenség

A szívelégtelenség progressziója során egyértelműen bekövetkezik a szimpatikus idegrendszer aktiválódása, de ennek konkrét időpontja és kiváltó

oka kevésbé ismert. Súlyos szívelégtelenségben szignifikánsan növekszik a plazma noradrenalin szintje. A fokozott szimpatikus aktivitást részben a szívelégtelenség talaján létrejövő relatív hipotenzió és következményes baroreceptor aktiváció magyarázhatja. A krónikusan fokozott szimpatikus tónus káros szívhatásokhoz vezethet. Ezen szívhatások patomechanizmusában a katekolaminok direkt toxikus szerepe régen feltételezett, erre vonatkozó konkrét bizonyítékkal azonban ma még nem rendelkezünk. Ugyanakkor a krónikusan magas katekolamin szintekkel hozzák kapcsolatba a szarkolemmális permeabilitás növekedését, a kalcium overload- és az arrhythmia-hajlam fokozódását, valamint a szívizom megemelt O_2 igényét.

A krónikus túlterhelés okozta kardialis dekompenzáció és pumpafunkció károsodás kapcsán több patológias eltérést írtak le a β -adrenerg rendszer (β -adrenerg receptor, G-proteinek, adenil cikláz enzim) működésében. Ezeknek az eltéréseknek a lényege, hogy csökken a β -adrenerg rendszer aktiválhatósága, illetve párhuzamosan ezzel együtt csökken a stimulálás során keletkező ciklikus AMP (cAMP) mennyisége is. Ez a kóros szignálátvezetés elsősorban magának a β_1 -adrenerg receptorszámnak (sűrűségnek) a csökkenésével magyarázható, amit a magas szérumban katekolamin szint miatt bekövetkező deszenzibilizálódás (downregulation) magyaráz. A β_1 receptorrendszer aktivitásának csökkenése miatt a háttérbe kerülnek a cAMP függő intracelluláris fehérje foszforilációs folyamatok. Mindezek miatt csökken a troponin I cAMP függő bazális foszforilációja, ami növeli a miokardium Ca^{2+} érzékenységét (balra tolódik a pCa-erő görbe).

A miofibrilláris fehérjék szívelégtelenség kapcsán kialakuló változásai régóta intenzív kutatás tárgyát képezik. Ismert, hogy előrehaladott szívelégtelenségben a kontraktilis apparátus miozin ATPáz aktivitása csökken. Kis állatokban (egér, patkány) és a humán pitvarban a gyors (α) miozin nehéz lánc (MHC) izoenzim típus helyett fokozódik a lassú (β) MHC expressziója. Következésképpen a kontraktilis filamentumok működése ugyan

gazdaságosabbá válik, ennek azonban az az ára, hogy csökken a kontrakció sebessége (V_{max}). A kis emlősöknél leírt miozin izoenzim váltás (switch) humán szívizomban valószínűleg csak kisebb mértékben kap szerepet (az eleve meglévő β MHC dominancia miatt). A miokardium ökonomikusabb „üzemmódra” való beállása azonban a humán szívre is jellemző. Valószínűsítik, hogy itt a főtalis troponin T és a pitvari miozin könnyű lánc bal kamrai izomzatban történő expressziója is hozzájárulhat a fentebb leírt eltérésekhez. Ugyanakkor a krónikus szívelégtelenség során kialakuló miofibrilláris fehérje eltérések csak részben tekinthetők tisztázottnak.

2. Célkitűzések

1. A Frank-Starling-mechanizmus magyarázatára született elképzelések (csökkenő harántátmérő, Ca^{2+} érzékenyítés) - bár plasztikusnak tűnnek és jól értelmezhetőek - hiányosak és nem adnak magyarázatot több problémára. Részletesen nem vizsgálták a változó nyugalmi rost hosszúság szabályozó hatását: 1) az eltérő miofibrilláris felépítésű (eltérő MHC összetételű) emlős szíveken (kis- vs. nagytestű emlősök), 2) változó ionkörnyezetben (pl. hipoxia kapcsán növekvő foszfát koncentráció mellett), 3) különböző hőmérsékleten, 4) patológias körülmények között (krónikus szívelégtelenség), és 5) az aktin-miozin keresztkötési ciklus sebességére. Ezért célul tűztük ki ezen kérdéscsoportok részletes vizsgálatát.
2. A szívelégtelenség kialakulása során bekövetkező mechanikai (miofibrilláris fehérjék összehúzódásának kinetikája) és biokémiai (miofibrilláris fehérjék összetétele, bazális foszforilációja, adrenerg jelátvitel) változások ellentmondásosak és sok kérdés még nem tekinthető tisztázottnak. Ezért célul tűztük ki, hogy egy jól jellemzett transzgenikus krónikus szívelégtelenség állatmodell ($Tg\alpha q^{*44}$) segítségével a betegség progressziójának

függvényében megvizsgáljuk és kövessük: 1) a kardiomiociták mechanikáját (izometriás kontrakció, passzív erő, aktin-miozin keresztkötési ciklus kinetikája) és 2) a miofibrilláris fehérjékben bekövetkező változásokat (MHC expresszió, bazális foszforiláció változása). Mindezek alapján vizsgálni kívántuk azokat a patológiás folyamatokat, amelyek elindítják/kiváltják a miofibrilláris funkció (kontraktilitás) változását.

3. Metodika és felhasznált anyagok

3.1. Kísérleti állatok, szövetminták

Vizsgálatainkhoz felnőtt humán, egér és sertés bal kamrai mintákat használtunk fel. Kísérleteinket megelőzően a mintákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Sertés mintáinkat olasz partnereinktől, egér mintáinkat lengyel kutatótársainktól kaptuk. Egészséges humán szíveket három általános donortól nyertünk, akik explantált szívét technikai okok miatt nem használták fel transzplantáció céljára (46 és 53 éves nőbeteg és 41 éves férfibeteg). Humán kísérleteink eleget tettek a Helsinki Deklarációnak és kísérleteinkhez a Magyar Egészségügyi Minisztérium is hozzájárult (323-8/2005-1018EKU). A fiatal sertéseket Olaszországban tenyésztették. A sertések kísérletes felhasználása az olasz törvényeknek megfelelően (DL-116, Jan. 27, 1992) és az Olasz Egészségügyi Minisztérium engedélyével történt.

Az aktivált $G\alpha_q$ proteint túlsúlyban expresszáló (overexpression) dilatív kardiomiopátiás (DCM) transzgenikus egértörzs ($Tg\alpha_q^{*44}$) kialakítását korábban részletesen leírták. Szaporódóképes homozigóta $Tg\alpha_q^{*44}$ egérpárokat és vad típusú (FVB) egereket Prof. Eva J. Neer (Brighami Női Klinika, Kardiovaszkuláris Divízió, Harvard Egyetem) közreműködésével kaptunk. Ezeket a transzgenikus és vad típusú egereket a Lengyel Tudományos Egészségügyi Kutató Akadémia állatházában tenyésztették. Kísérleteinkben a homozigóta $Tg\alpha_q^{*44}$ és FVB egereket (4, 10, 14 és 18 hónap) használtunk fel. Valamennyi szövetmintát $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, majd ezeket a szöveteket

használtuk szívizomsejt (kardiomiocita) preparátumok elkészítésére és különböző biokémiai mérésekhez. A transzgenikus egerekkel kapcsolatos vizsgálatok a Jagellói Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történtek (no. 1/OP/203). Valamennyi vizsgálatunk kapcsán (egér, sertés) eleget tettünk a laboratóriumi állatok kísérletes felhasználásával kapcsolatos nemzetközi protokolloknak (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

3.2. Erőmérés permeabilizált szívizomsejt preparátumokban

A kardiomiocita preparátum izolációját és elkészítését korábban részletesen leírtuk (1). A relaxáló és aktiváló oldatok pCa értéke, azaz a $-\log[\text{Ca}^{2+}]$ 9,0 és 4,75 volt, pH 7,2 mellett. Az erőmérést az aktiváló és relaxáló oldatok felhasználásával hajtottuk végre. Az aktiváló oldat összetétele (mM egységben kifejezve) a következő volt: szabad Mg^{2+} 1, MgATP 5, foszfo kreatin 15, kalcium etilén-glikol-bis(2-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacetát (Ca-EGTA) 7 és N-N-bis[2-hidroxi-etil]-2-amino-etánszulfonát 100. Az ionekvivalenciát 150 mM-ra állítottuk be KCl segítségével (186 mM-os ionerősség mellett). A relaxáló oldat összetétele annyiban különbözött az aktiváló oldat összetételétől, hogy Ca-EGTA helyett 7 mM EGTA került az oldatba.

Protokoljaink egy részében megvizsgáltuk a proteinkináz A (PKA) katalitikus alegységének hatását kísérleti preparátumainkra (relatív foszforilációs kapacitás: ~ 10 unit/ μg). Miután felvettük a Ca^{2+} - erő összefüggéseket, a sejteket 2,3 μm -es szarkomerhosszon (SL) 40 percig 20 °C-on inkubáltuk PKA jelenlétében és újra felvettük az izometriás erőviszonyokat, valamint megmértük az aktin-miozin ciklus sebességét.

A szívizomsejt preparátum erőmérési technikája részleteiben már leírásra került (1, 2). Röviden, egy szívizomsejt nagyságú preparátumot inverz mikroszkóp alatt szilikon ragasztó segítségével, két vékony rozsdamentes acél rovartühöz erősítettünk. Az egyik tűt egy nagy érzékenységu erőmérőhöz, a másik tűt pedig egy elektromágneses motorhoz kapcsoltuk. Mindkét tűt

„joystick”-el kezelhető irányító rendszerhez rögzítettük. A felragasztott sejtpreparátum egy nagyobb szegmensének kiválasztását követően Fourier transzformációs analízis segítségével állítottuk be a szarkomerhosszat (SL). A preparátumok átmérőjét mikroszkópos technikával pontosan megmértük, két egymásra merőleges irányból. A keresztmetszeti kép felszínének számítása során elliptikus keresztmetszetet feltételeztünk. Az izometriás erőmérést többszörös aktivációs/relaxációs ciklusokban 15 °C-on végeztük, először 1,9 µm, majd 2,3 µm SL-an. Egyes kísérleti protokolljainkban 25 °C-ra emeltük a kísérleti közeg hőmérsékletét.

Amikor a preparátum elérte a maximális összehúzóerőt, a szívizomsejt hosszát – az elektromágnesre illesztett tű segítségével – 1 msec alatt 20%-al csökkentettük és 20 msec múltán visszaállítottuk eredeti hosszára (ún. release-restretch manőver). A manőver kapcsán a sejt által kifejtett maximális erő nullára csökkent (a hirtelen rövidülés miatt), ami lehetővé tette a maximális sejt által kifejtett erő (F_{total}) regisztrálását és kiszámítását. Az eredeti hossz visszaállítását követően az aktin-miozin kapcsolatok újraprendezésével az izomsejt rövid időn belül újra a rövidítést megelőző maximális kontrakciós erőt volt képes létrehozni. Ez a folyamat igen gyorsan, néhány másodperc alatt zajlott le (erő újraképződés – „tension redevelopment”). Ezzel a technikával tudtuk megmérni és kiszámítani a sejt által kifejtett passzív erőt ($F_{passive}$). Az aktív izometriás erő az F_{total} és $F_{passive}$ különbségével jellemezhető. Az erő újraképződés a release-restretch manőver után jellemző görbét adott, amire exponenciális függvényt illesztettünk, annak érdekében, hogy kiszámoljuk az erő újraképződés (aktin-miozin ciklus) sebességét (k_{tr}) különböző Ca^{2+} koncentrációk esetén:

$$[1] \quad F(t) = F_i + F_a(1 - e^{-k_{tr}t})$$

ahol a $F(t)$ az erő, bármely t időpontban a release-restretch manőver után, bármely Ca^{2+} koncentráción. Az F_i és F_a jellemzik a kezdeti erő értéket a release-restretch manőver után, valamint a Ca^{2+} aktiválta erő újraképződés

amplitúdóját. A k_{tr} pontos meghatározásához minden esetben az erő újraképződés teljes időtartamát (F_i és F_{total} közötti idő) figyelembe vettük. A mintavétel általában 20 Hz-en történt, azonban a k_{tr} mérésekor ez az érték 1 kHz volt.

Minden kísérleti protokoll egy szaturáló Ca^{2+} koncentráción (pCa 4,75) elvégzett kontroll aktivációval kezdődött és végződött. Ez lehetővé tette a mért erők normalizálását és a preparátum ú.n. „rundown”-jának, azaz mérés közbeni „elhasználódásának” meghatározását. Ezekhez a mérésekhez a maximális Ca^{2+} aktivált erőköt hasonlítottuk össze (F_o). Minden kísérleti mérés végén összehasonlítottuk a sejt által létrehozott maximális erőt a kísérlet első hasonló értékével. Amennyiben a kísérlet végén a sejt az eredeti érték 80%-a alatt teljesített, úgy azon mérést elvetettük.

3.3. Biokémiai mérések

A különböző életkorú egerek fagyasztott balkamrai mintáit használtuk a PKA aktivitás meghatározáshoz. A szuszpendálást és homogenizálást módosított izolációs oldatban (mM-ban: KCl 100, EGTA 2, $MgCl_2$ 1, ATP 0,1, imidazole 100, pH 7,0) végeztük. A citoszólt centrifugálással távolítottuk el, (300g, 1 min, felülúszó: citoszól), majd az üledéket 0,3%-os Triton-X 100-at tartalmazó izolációs oldatban ismételten homogenizáltuk. A detergens oldékony membránfehérjék extrahálása centrifugálás segítségével történt (felülúszó: membrán fehérjék, pellet: kontraktilis fehérjéket tartalmazó permeábilis kardiomiociták). A szétválasztott frakciók fehérje koncentrációját BSA módszerrel határoztuk meg. Az endogén PKA mérés szobahőmérsékleten történt, γ - ^{32}P jelölt ATP segítségével (specifikus aktivitás: 750 cpm/pmol). Szubsztrátként 1 μ l kemptidet (1 mg/ml) használtunk. A reakció elindítását követően a 0. és 17. percben 10 μ l keveréket cseppentettünk foszfocellulóz papírra. A papírokat 30 percig szárítottuk, majd 0,5%-os foszforsavval

háromszor átmostuk. A foszfocellulóz papíron maradó radioaktivitás mérésére liquid szcintillációs számlálót használtunk.

A permeabilizált szívizomsejtek troponin I bazális foszforilációs szintjének meghatározására utófoszforilációs vizsgálatokat végeztünk. A miofibrilláris fehérjéket tartalmazó frakciót az endogén PKA meghatározása során ismertetett módon izoláltuk. A reakciós elegy 40 µl izolált miofibrilláris fehérje frakciót (fehérje koncentrációja 0,5 mg/ml módosított izolációs oldatban), 10 µl módosított izolációs oldatot, γ - ^{32}P ATP-t (specifikus aktivitás: 1500 cpm/pmol) és 1 µl PKA-t (4000 U/ml) tartalmazott. Az inkubálást szobahőmérsékleten 15 percig végeztük. Az inkubálást követően a reakciót 50 µl SDS pufferrel állítottuk le. Ezt követően a forralt mintát 10%-os poliakrilamid gélen elektroforézis segítségével választottuk szét és a szeparált fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Az autoradiográfiás felvételeket denzitometriával elemeztük és a kiértékelést (foszfát beépülést), Image J programmal végeztük. Az optikai denzitást önkényes egységekben (arbitrary unit) fejeztük ki.

Az MHC izoformák (α és β) szétválasztása elektroforézis segítségével történt: 8% akrilamid-bis-acrilamid (27,5:1), 380 mM Tris-HCl, 0,1% sodium dodecilszulfát (SDS), 5 mM TEMED, 2mM AMPER. A géleket az Image J programmal értékeltük, 0,1%-os Coomassie festést követően.

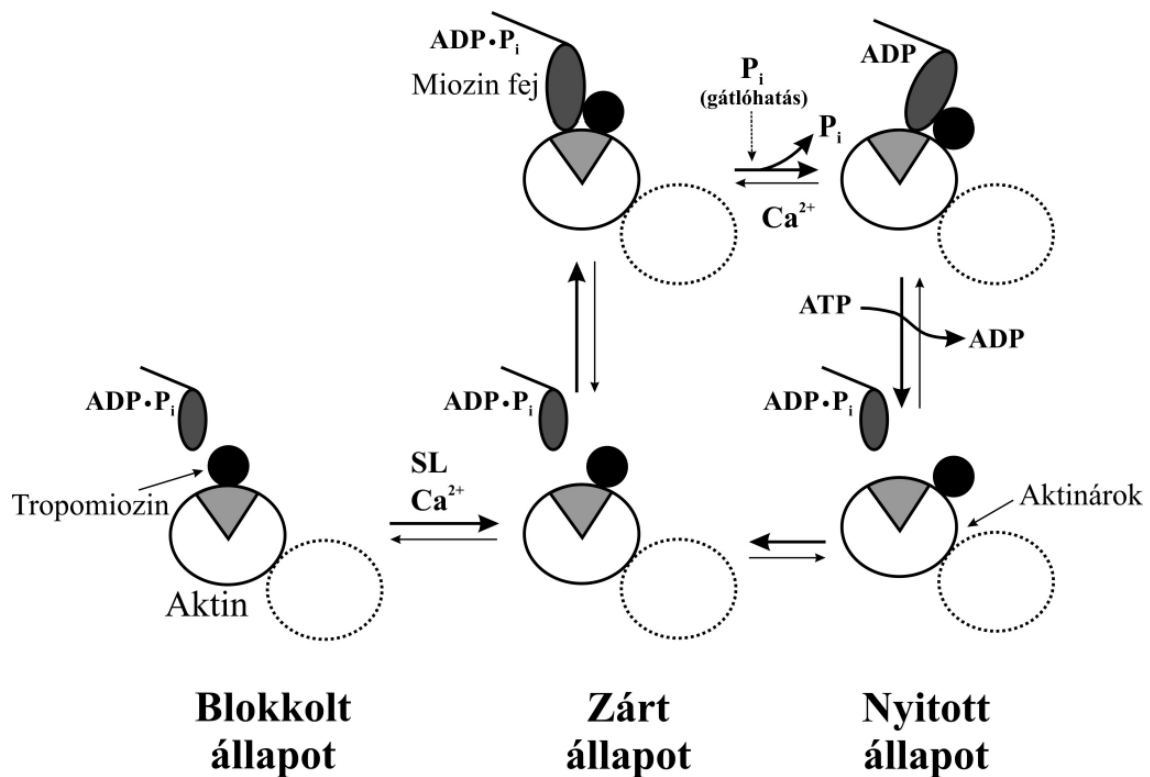
3.4. Statisztika, adatelemzés

A Ca^{2+} - erő viszonyokat a módosított Hill-egyenletre illesztettük:

$$[2] \quad F = F_o [\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}} / (\text{Ca}_{50}^{n_{\text{Hill}}} + [\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}}),$$

ahol az F a steady-state erő adott $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett, az F_o , a maximális Ca^{2+} -aktiválta erő maximális $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett, n_{Hill} a meredekséget, Ca_{50} (vagy pCa_{50}) az 50%-os erő kifejtéséhez szükséges Ca^{2+} koncentráció, szigmoid illesztést követően. Minden kísérleti preparátum egyenként került illesztésre, az egyes eredményeket összegeztük és az átlagok kerültek bemutatásra.

A statisztikai szignifikancia vizsgálatokat variancia analízissel (ANOVA, ismételt mérések) és ahol lehetséges volt Student féle t-próbával végeztük. Az eredményeket átlag±SEM (standard error of the mean) értékekben fejeztük ki. A szignifikancia határát $P < 0,05$ -ben határoztuk meg.



Ábra. A kontrakció kialakulásának három-szintű modellje. Blokkolt állapotban a tropomiozín fonalak gátolják (blokkolják) az aktin „aktív” felszínét (sötétszürke körszelet), amihez a miozin fejek kötődnek. Ca^{2+} jelenlétében aktiválódik a troponin C és a tropomiozín fonál a kettős aktinspirálon az ún. „aktinárok” irányába mozdul el, és lehetővé válik a gyenge keresztkötések kialakulása (zárt állapot) a miozin fej és az aktin „aktív” felszíne között. A Ca^{2+} magas kooperációval stimulálja a nyitott állapot kialakulását, amikor a tropomiozín fonál már az aktinárok mélyére csúszik, és teljesen szabaddá válik az „aktív” felszín. Így kialakulhatnak az erős keresztkötések. A nyugalmi rosthosszúság növelése csökkenti a rostok harántátmérőjét, így közelebb kerülnek egymáshoz a vékony és vastag filamentumok, ami növeli a zárt állapot kialakulásának valószínűségét. Az anorganikus foszfát (P_i) gátolja a nyitott állapot kialakulását. SL=szarkomer hossz; ATP=adenozin trifoszfát; ADP=adenozin difoszfát.

4. Eredmények

4.1. A változó nyugalmi rosthosszúság hatása a kontraktilis erőre és az aktin-miozin ciklus sebességére különböző speciesekben

Ezen kísérleteinkhez különböző emlős sejteket (humán, sertés és egér kardiomiocita) használtunk, mivel jól ismert a kis testtömegű emlősök (egér) szívének, illetve a nagy tömegű emlősök (ember, sertés) miokardiumának eltérő miofibrilláris fehérje összetétele és funkciója. A három emlősfaj (egér, humán és sertés) esetében igen hasonlóan bizonyult a Ca^{2+} aktiválta maximális aktív erő (1,9 μm -nél: $27,2 \pm 3,9$, $28,6 \pm 3,3$ és $30,3 \pm 3,0$ kN/m^2 ; 2,3 μm -nél $56,6 \pm 3,9$, $49,5 \pm 3,7$ és $51,8 \pm 6,9$ kN/m^2). A Ca^{2+} független passzív erők vizsgálata során igen hasonló értékeket kaptunk a humán és sertés szív esetében. Ugyanakkor az egér kardiomiocitákban a Ca^{2+} független passzív erők a hosszú SL-nél (2,3 μm) szignifikánsan magasabb értéket adtak (egér $10,5 \pm 0,6$, humán $5,7 \pm 0,7$, sertés $6,9 \pm 0,7$ kN/m^2).

Az izometriás erő SL függő növekedésének vizsgálatára a három vizsgált faj normalizált pCa-erő görbéit azonos kísérleti körülmények között vizsgáltuk. Jól észlelhető volt az SL hossz növekedés hatására létrejövő pCa₅₀ érték balra tolódása (Ca^{2+} érzékenyítés), amely mindhárom vizsgált fajnál meglepő egyenlőséget mutat ($\sim 0,11$ pCa érték). Ugyanakkor, minden vizsgált Ca^{2+} koncentrációnál jelentős eltérést észleltünk az egér k_{tr} értékeiben a humán, illetve a sertés értékeihez viszonyítva. Amíg a sertés és a humán minták mindkét SL-nél igen hasonló $k_{tr,max}$ értéket adtak (pCa 4,75), addig az egér minták szignifikánsan magasabb $k_{tr,max}$ értéket mutattak (a különbség 6-7-szeresnek bizonyult – ennyivel gyorsabb az egér szívekben az aktin-miozin ciklus kinetikája). Ugyanakkor az SL változtatása nem befolyásolta az egyes fajok esetében a k_{tr} paraméterek pCa függését. Mért 1,9 μm -es SL hosszánál a $k_{tr,max}$ értékei a következők voltak: egér $7,44 \pm 0,15$, humán $1,33 \pm 0,11$, sertés $1,02 \pm 0,05$ s^{-1} . Ugyanezen értékek 2,3 μm -es SL hosszánál a következőképpen

alakultak: $6,95 \pm 0,31$, $1,19 \pm 0,07$ és $0,99 \pm 0,08$ s^{-1} . A k_{tr} paraméter Ca^{2+} -függő változásainak részletes vizsgálatára minden faj esetében normalizáltuk a k_{tr} értékeket (a fajra jellemző maximumra). Ez a fajta adatelemzés azt mutatja, hogy a k_{tr} Ca^{2+} függése mindhárom fajban nagyon hasonló.

Az anorganikus foszfát (P_i) közismerten csökkenti a miofibrillumok által kifejtett maximális Ca^{2+} aktiválta erőt, mivel interferál az erőképző keresztkötések kialakulásával. Többek között ezzel a tömeghatás elvén magyarázott összefüggéssel is magyarázzák az akut iszkémiás miokardium kontraktilitás-csökkenését. Mindezek miatt megvizsgáltuk, hogy kísérleti preparátumainkon a 10 mM P_i hogyan befolyásolja a Ca^{2+} aktiválta erőt és a k_{tr} értéket. Az alkalmazott P_i (10 mM) valamennyi Ca^{2+} koncentrációnál szignifikánsan csökkentette a kialakult izometriás erőt. A maximális Ca^{2+} aktiválta erő (F_o) a P_i hatására mindhárom vizsgált fajban ~60-65%-al csökkent (humán mintákban $65 \pm 5\%$, egerekben: $60 \pm 1\%$ és sertésekben $61 \pm 1\%$; $P > 0,05$; 1,9 μm -es SL). A P_i hatására hasonló mértékben csökkent a maximális Ca^{2+} aktiválta erő (F_o) a magasabb nyugalmi rosthosszúság (2,3 μm) alkalmazása mellett is.

Megvizsgáltuk továbbá a Ca^{2+} érzékenység SL függését a P_i hatása alatt (minden mért értéket a megfelelő maximummal normalizáltuk) és a kapott adatokat illesztettük a Hill egyenletbe. Az analízis azt mutatta, hogy a nyugalmi rosthosszúság növelése (1,9-ről 2,3 μM -re) által kiváltott Ca^{2+} érzékenyítést egyik fajban sem befolyásolta a P_i jelenléte. A kapott változás a P_i jelenlétében is ~0,1 pCa érték volt. Ugyanakkor a 10 mM P_i alkalmazása drámai gyorsulást okozott mindhárom faj esetében az aktin-miozin keresztkötési kinetikában (k_{tr}). A 10 mM P_i -t tartalmazó humán és sertés minták esetében a $k_{tr,max}$ növekedése ~1,6-szor haladta meg a P_i nélküli kísérleti körülmények között mért értéket. Egér preparátumok esetén ez az érték elérte a ~3-at. A keresztkötési kinetika gyorsulása mindkét SL-nél észlelhető volt és az SL módosítása nem befolyásolta szignifikánsan a k_{tr} értékeket (bármely Ca^{2+} koncentrációnál vizsgálva). Más

szavakkal: a 10 mM P_i alkalmazása mindhárom emlősben szignifikánsan gyorsította a k_{tr} értékeket, de ez a gyorsulás függetlennek bizonyult az SL értéktől.

Korábbi vizsgálatok során a kísérleti hőmérséklet emelése potenciálta a P_i indukálta hatásokat az aktin-miozin keresztkötési kinetikára nyúl vázizom miofibrillumokban, illetve egér kardiális miofibrillumokban. Ezért megvizsgáltuk, hogy saját kísérleti rendszerünkben a kísérleti hőmérséklet növelése - a fiziológiásabb tartomány irányába - mennyiben befolyásolja a humán preparátumok kontraktilitási paramétereit. Ezért 25 °C-on 10 mM P_i jelenlétében is elvégeztük kísérleti protokollunkat. Eredményeink szerint 1,9 μm -es SL esetén 25 °C-on a maximális Ca^{2+} aktiválta erő $35,2 \pm 4,2 \text{ kN/m}^2$ volt ($n=10$ humán szívizomsejt), míg 10 mM P_i hozzáadása után ezen érték $17,4 \pm 2,4 \text{ kN/m}^2$ -re csökkent. Ezen kísérleteink azt mutatták, hogy - az irodalmi adatokkal megegyezően - a hőmérséklet növelésének hatására a 10 mM P_i erőteljesebben csökkentette a maximális Ca^{2+} aktiválta erőt (F_o), mint 15 °C-on.

A magasabb hőmérsékleten elvégzett kísérleteink adatait normalizálva, kifejeztük a Ca^{2+} érzékenység SL függését. Az előző tendenciához hasonlóan a $p\text{Ca}_{50}$ értékváltozás továbbra is $0,10 \pm 0,02$ volt ($P < 0,05$), annak ellenére hogy a hőmérsékletemelés növelte a mért k_{tr} értékeket. A k_{tr} értékének növekedése ~5,2-szeres volt a P_i nélküli 15 °C-on elvégzett mérések adataihoz képest. A humán preparátumokon 25 °C-on 10 mM P_i jelenlétében mért $k_{tr,max}$ érték $7,03 \pm 0,32 \text{ s}^{-1}$ -nak bizonyult. Ezen körülmények között (25 °C, 10 mM P_i) megvizsgálva a k_{tr} esetleges SL függését (1,9 és 2,3 μm -es nyugalmi rosthosszúság), továbbra sem találtunk szignifikáns különbséget a k_{tr} értékekben a két csoport között.

Annak érdekében, hogy részleteiben megismerhessük a k_{tr} értékének faj-, illetve P_i -függését, megvizsgáltuk a k_{tr} és az F_o -ra normalizált erő függvényeket (15 °C, minden kísérleti körülmény között). A k_{tr} minden fajban nem-lineáris módon növekedett az erő függvényében, az F_o -nál mért maximumig. Rövidebb

SL (1,9 μm) mellett, a k_{tr} a submaximális Ca^{2+} koncentrációk alkalmazása esetén (minden kísérleti körülmény között) tendenciájában valamelyest nagyobb értéket adott. Ez a submaximális erőviszonyokban tapasztalt k_{tr} növekedés annak tudható be, hogy a rövidebb SL (1,9 μm) esetében nagyobb koncentrációjú Ca^{2+} -ra van szükség ahhoz, hogy ugyanazt az erőszintet elérjük. Normál körülmények között (P_i hiányában), 2,3 μm SL mellett, az erő megduplázásához (félmaximális erőtől az F_o -ig) a k_{tr} értéknek emberben $\sim 1,7$ -szeresre, egérben $\sim 2,2$ -szeresre, sertésben $\sim 2,4$ -szeresre kellett növekednie. A 10 mM P_i alkalmazása feljebb tolta a k_{tr} -erő összefüggéseket, de nem változtatta meg a görbék jellemző lefutását.

4.2. A miofibrilláris kontraktilis funkció változása az idő függvényében dilatatív kardiomiopátiás állatmodellen (Tg α_q *44)

A Tg α_q *44 transzgénikus egértörzs jellegzetessége a G_{α_q} fehérje folyamatos fölöslegben történő szintézise (overexpressziója). Ennek megfelelően a transzgénikus állatokban, idősebb korokban dilatatív kardiomiopátia (DCM) fejlődik ki, melynek talaján az egerek súlyos kongesztív szívelégtelenséget kapnak. A betegség progressziója lassú, ami lehetővé teszi a különböző szignalizációs folyamatokban és a miofibrilláris kontraktilis struktúrában/funkcióban bekövetkező változások időbeli követését. Vizsgálataink során elsősorban a mechanikus funkcióra és az ezzel kapcsolatos miofibrilláris strukturális eltérésekre fókuszáltunk.

A Tg α_q *44 transzgén állatokban, az idő függvényében (4, 10, 14 és 28 hónap), jellegzetesen megváltoztak a kardiális morfológiai paraméterek a vad típusú FVB állatok paramétereikhez képest. A Tg α_q *44 egerekben a 14. hónapot követően jól észlelhető a DCM kialakulása (a szív súly/testsúly hányados a következőképpen alakult: 14. hónap: $5,4 \pm 0,3$; 18. hónap: $7,1 \pm 0,4$ mg/g). Az FVB egerekben ugyanezen időszakban nem történt szignifikáns változás a

morfológiai kardiológiai paraméterekben. A DCM kialakulása szignifikánsan növelte a Tg α q*44 egerek mortalitását.

Permeabilis, izolált kardiomiocitákon (FVB és Tg α q*44) - az idő függvényében és különböző nyugalmi rosthosszúság mellett (1,9 μ m és 2,3 μ m) - részletesen megvizsgáltuk a Ca²⁺ aktiválta maximális erőt (F_o), a passzív erőt (F_{passzív}) és a k_{tr,max} változásait. A Frank-Starling-törvénynek és saját korábbi vizsgálatainknak (1) megfelelően a nyugalmi rosthosszúság növelése (1,9 μ m-ről 2,3 μ m-re) szignifikánsan növelte az F_o és F_{passzív} erőket mindkét állattörzsben. A Tg α q*44 transzgenikus állatokban az F_o a 14 hónapos kor után hirtelen csökkent (mind az 1,9 μ m-es, mind a 2,3 μ m-es nyugalmi rosthosszúságnál) és a 18. hónapos csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt (~60%-os csökkenés), mint az FVB állatok bármely korcsoportja, vagy a Tg α q*44 állatok 4, 10 és 14 hónapos csoportjainak a középértéke. Az F_{passzív} értéke szintén jellegzetesen megváltozott a 18 hónapos Tg α q*44 egerekben. 2,3 μ m-es SL mellett, egy erőteljes szignifikáns növekedést (~60%-os) észleltünk az FVB állatok bármely időpontjának értékéhez képest.

A miofilamentumok Ca²⁺ érzékenységének vizsgálatához mindkét állattörzs kardiomiocitáit különböző SL értékeken (1,9 μ m és 2,3 μ m) submaximális Ca²⁺ koncentrációkkal stimuláltuk. Az adatokat minden esetben a hozzátartozó F_o értékre normalizáltuk, majd ábráztuk a pCa-erő összefüggéseket. A hosszabb SL (2,3 μ m) alkalmazása minden időpontban balra tolt a pCa-erő összefüggéseket, mind az FVB, mind a Tg α q*44 állatokban (azaz növekedett a miofilamentumok Ca²⁺ érzékenysége). A pCa₅₀ balratolódásának mértéke mindkét állatcsoportban ~0,11 pCa egység volt. A 4, illetve a 10 hetes FVB és Tg α q*44 állatokból származó kardiomiociták esetében a pCa₅₀ értékek (hasonló nyugalmi rosthosszúság mellett) nem különböztek szignifikánsan egymástól. Ugyanakkor a 14 hónapos, illetve 18 hónapos életkorban mindkét SL (1,9 μ m és 2,3 μ m) alkalmazása mellett, a Tg α q*44

állatok pCa-erő görbéi szignifikánsan balra tolódtak az FVB görbékhez képest. Más szavakkal a DCM kialakulásával összhangban a Tg α q*44 állatokban fokozódott a miofilamentumok Ca²⁺ érzékenysége a kontroll (FVB) állatok értékeihez képest. A 18 hónapos állatok kardiomiocitáinak a pCa értékei a következők voltak: FVB SL 2,3 μ m-nél 6,25 \pm 0,01; Tg α q*44 SL 2,3 μ m-nél 6,38 \pm 0,01; illetve FVB SL 1,9 μ m-nél 6,13 \pm 0,02; Tg α q*44 SL 1,9 μ m-nél 6,24 \pm 0,01.

A miofilamentumok Ca²⁺ érzékenységét elsősorban a miofibrilláris fehérjék (troponin I) foszforiláltsága szabályozza. β -adrenerg stimulálás (izoproterenol) hatására a troponin I gyors foszforilációját követően egyértelműen jobbra tolódik a szívizom pCa-erő görbéje (csökken a Ca²⁺ érzékenység), ami gyorsítja a relaxáció sebességét (pozitív luzitrop hatás). Ugyanakkor patológiás körülmények között ennek a folyamatnak a fordítottját is leírták. Krónikus szívelégtelenségben, valószínűleg kompenzatorikus módon, fokozódik a miofilamentumok Ca²⁺ érzékenysége, amit elsősorban a troponin I bazális foszforilációjának a csökkenése okoz. Mindezen adatok alapján, kísérleti rendszerünkben megvizsgáltuk, hogy a Tg α q*44 állatok kardiomiocitáinak megnövekedett Ca²⁺ érzékenységét nem a troponin I PKA-függő bazális foszforiláltsági állapotának a változása okozza-e. Eredményeink szerint 10 hónapos korban a PKA katalitikus alegységgel való inkubálás nem befolyásolta szignifikánsan sem FVB, sem Tg α q*44 állatokból származó kardiomiociták Ca²⁺ érzékenységét (nem változott szignifikánsan a pCa-erő görbék lefutása). Ugyanakkor a 14 hónapos korban a Tg α q*44 állatokból származó kardiomiociták pCa-erő görbéje már szignifikáns balra tolódást mutatott az FVB állatok görbéjéhez képest. A 14 hónapos Tg α q*44 állatok kardiomiocitáinak ezen növekedett Ca²⁺ érzékenységét szüntette meg a katalitikus alegységgel történő inkubálás (szignifikánsan ~0,15 pCa értékkel jobbra tolódott a pCa-erő összefüggés). A katalitikus alegységgel történt inkubálást követően már nem

volt szignifikáns eltérés az FVB és a Tg α q*44 állatok kardiomiocitáinak Ca²⁺ érzékenysége között.

Érdekes módon a PKA katalitikus alegységgel történő inkubálás hatékonysága felvetette a β -adrenerg-PKA rendszer szerepének jelentőségét a Tg α q*44 egerek szívelégtelenségének kialakulásában. Ahhoz hogy a transzgénikus állatmodellben további adatokat kapjunk a β -adrenerg, PKA rendszer szerepéről, megvizsgáltuk: 1) a PKA aktivitásának, és 2) a troponin I PKA-függő bazális foszforiláltságának életkorfüggését mind Tg α q*44, mind az FVB állatok miokardiumában. A miokardiális PKA aktivitások vizsgálata során csak a citoszól frakcióban kaptunk érdelemleges aktivitást. A citoszól PKA aktivitása a Tg α q*44 állatokban fokozatosan csökkent az idő függvényében. A 18 hónapos állatokban a csökkenés már szignifikánsnak bizonyult a Tg α q*44 állatok korábbi értékeihez képest, vagy az FVB állatok értékeihez képest. A csökkenő PKA aktivitással összhangban, az idő függvényében szignifikánsan növekedett a troponin I PKA-függő utófoszforilációja a Tg α q*44 állatokban (4 hónapos állat 33 \pm 1, 18 hónapos állat 72 \pm 11 AU). Az utófoszforiláció növekedése azt jelzi, hogy a bazális troponin I foszforiláció szignifikánsan csökkent a DCM kialakulása során, ami összhangban van: 1) a PKA aktivitásmérésekkel, és 2) a miofilamentumok Ca²⁺ érzékenységének a növekedésével. Ugyanakkor az FVB állatokban az idő függvényében nem változott szignifikánsan a troponin I utófoszforiláció.

Kardiomiocitá preparátumaink lehetővé tették annak vizsgálatát, hogy a DCM kifejlődése során a Tg α q*44 állatokban észlelt változások (Ca²⁺ aktiválta erő csökkenése, Ca²⁺ érzékenység növekedése) összefüggésben vannak-e az aktin-miozin ciklus esetleges változásával. Ennek a kérdésnek a tanulmányozására különböző nyugalmi rosthosszúság mellett, mindkét állattörzsben az idő függvényében megvizsgáltuk a Ca²⁺ aktiválta erő újraképződésének sebességét (k_{tr}), ami jól jellemzi az aktin-miozin ciklus

sebességét. Eredményeink alapján, mindkét állattörzsben egyértelműen igazolni lehetett a k_{tr} Ca^{2+} függését, azaz magasabb Ca^{2+} koncentráció mellett a k_{tr} magasabb értéket adott. Ugyanakkor, a normál humán, sertés és egér szíveken korábban elvégzett vizsgálatainkhoz hasonlóan a k_{tr} értékét a nyugalmi rosthosszúság nem befolyásolta (függetlenül a Ca^{2+} koncentrációtól, életkortól, egéttörzstől és a DCM kialakulásától).

A k_{tr} abszolút értékek vizsgálata során a 4, 10 és 14 hónapos életkorban nem találtunk szignifikáns különbséget a két egércsoport (FVB és Tg α q*44) között. Ugyanakkor 18 hónapos életkorban a Tg α q*44 csoportból származó kardiomiociták $k_{tr,max}$ értéke (pCa 4,75-nél mérve) szignifikánsan alacsonyabb volt ($5,39 \pm 0,19$ 1/sec), mint a 18 hónapos FVB érték ($9,14 \pm 0,27$ 1/sec). Feltételeztük, hogy ebben az életkorban (18 hónap) a DCM kifejlődésével párhuzamosan a miozin izoenzimek (α - és β -MHC) expressziójában kialakuló különbségek lehetnek a felelősek az eltérő aktin-miozin sebességért. Ezért mind az FVB, mind a Tg α q*44 állatok miofibrillumában az idő függvényében megvizsgáltuk a MHC (α és β) expresszióját. Várakozásainknak megfelelően az FVB állatban nem változott az expressziós profil, a gyors α -MHC abszolút dominanciája a teljes 18 hónapos utánkövetés során bizonyítható volt. Ugyanakkor a Tg α q*44 állatok miofibrillumában az életkor előrehaladásával fokozatosan növekedett a lassú β -MHC részaránya. A növekedés a 18. hónapban elérte a $51 \pm 3\%$ -ot és szignifikánsnak bizonyult a 4 és 10 hónapos értékekhez képest.

5. Megbeszélés

5.1. A változó nyugalmi rosthosszúság hatása a kontraktilis erőre és az aktin-miozin ciklus sebességére

Eredményeink szerint az aktin-miozin ciklus sebessége (k_{tr}) szorosan összefügg a vizsgált fajjal, a hőmérséklettel (humán szívműködés), az

alkalmazott Ca^{2+} [Ca^{2+}] és foszfát koncentrációval [P_i], de függetlennek bizonyult az SL-től. Eredményeink igazolták továbbá, hogy valamennyi faj (humán, egér és sertés) kardiomiocitáiban a nyugalmi rosthosszúság függvényében, tendenciájában hasonló módon változik a Ca^{2+} -aktiválta erőképződés, a háttérben működő más-más aktin-miozin cikluskinetika (k_{tr}) ellenére. Ugyanakkor a relatív k_{tr} értékek Ca^{2+} függősége is tendenciájában hasonlóan bizonyult mindhárom faj esetében. Mindent egybevéve, adataink azt sugallják, hogy emlős szívekben hasonló karakterisztikák jellemzőek a pCa-erő és pCa- k_{tr} összefüggésekre, azonban az SL változását nem kíséri a k_{tr} érték modulációja.

Korábbi vizsgálatok eredményei szerint kis emlősökben (egér, patkány) a kardiomiociták gyors aktin-miozin kinetikáját elsősorban a fajspecifikus MHC összetétele (a gyors α -MHC izoforma nagyobb expressziója a lassú β -MHC-vel szemben) szabja meg. Nagyobb testű emlősök (sertés, ember) esetében, a β -MHC túlsúly lassúbb kinetikát (k_{tr}) eredményez. Ugyanakkor adataink szerint az MHC expresszió (α - vagy β) tendenciájában nem befolyásolta az SL-függő Ca^{2+} érzékenyítést. Eredményeink azt sugallják, hogy emlős szívekben a kontraktilis proteinek fajfüggő eltérései nem modulálják az SL függő Ca^{2+} érzékenyítést.

P_i jelenlétében az F_o és pCa₅₀ értékek változásai is valószínűleg a megváltozott aktin-miozin ciklusnak (csökken a nyitott állapotban lévő keresztkötések száma) tudhatók be. Adataink azt mutatják, hogy a P_i fajtól és SL-től függetlenül csökkentette a preparátumok által generált erőt, és mérsékelten jobbra tolja a pCa-erő összefüggéseket. A P_i minden vizsgált fajban hasonló módon befolyásolta a keresztkötési kinetikát, ezért hatása az aktin-miozin ciklusra konzervatívnak mondható. Egerekben P_i hatására a k_{tr} nagyobb fokú növekedését tapasztaltuk, mint sertés vagy humán minták esetében. Humán miocitákban a mért k_{tr} értékek tovább emelkedtek, amikor a P_i -t tartalmazó rendszer hőmérsékletét 25 °C-ra emeltük. Mindennek ellenére bármely adott

[Ca²⁺]-nál, és P_i-nél a k_{tr} értéke egyik vizsgált fajban sem függött a nyugalmi rost hosszúságtól (SL).

Az SL-függő Ca²⁺ érzékenyítés molekuláris mechanizmusa még nem tekinthető tisztázottnak, de valószínűsíthető hogy a következő tényezőknek van kiemelt szerepük: 1) az SL megnyújtása, növeli az erőgeneráló keresztkötések számát, és 2) növeli a troponin C affinitását a Ca²⁺ irányában. Az, hogy a két mechanizmus koordinációja hogyan történik, és melyik folyamat milyen mértékben befolyásolja az aktin-miozin ciklust, jelenleg nagyrészt még ismeretlen. Elméleti megfontolások arra utalnak, hogy az erőgeneráló keresztkötések kooperatív erősödése lassítaná az aktin-miozin ciklus sebességet, míg a troponin C-hez kötött Ca²⁺ növekedése gyorsítaná ugyanezt a paramétert. Eredményeink azt mutatták, hogy adott [Ca²⁺] esetén a k_{tr} állandó maradt az SL változás hatására létrejött erőnövekedés ellenére. Más szavakkal fogalmazva mindhárom vizsgált fajban a [Ca²⁺], a P_i (humán minták esetén a hőmérséklet) változtatása ellenére sem sikerült elkülöníteni egymástól a két lehetséges elméleti állapot (SL-függő módon nem gyorsult és nem is lassult a k_{tr}). Elméletileg lehetséges, hogy a két folyamat (a kooperatív erők lassítanak, a Ca²⁺ affinitás növekedése gyorsítaná a k_{tr}-t) minden kísérleti körülmény között pontosan kiegyenlíti egymást (ezért nem változik). Összességében ugyanakkor a nagyszámú kísérleti feltételekből kiindulva, ez a lehetőség eléggé valószínűtlen. Sokkal valószínűbb, hogy a [Ca²⁺] (és nem a SL) a fő meghatározója emlős szívekben a k_{tr} értékének. Eredményeink is inkább azt az elképzelést támogatják, amely szerint a troponin C Ca²⁺ affinitása nem szabályozza közvetlenül azokat a keresztkötési lépéseket, amelyek a k_{tr} szempontjából meghatározóak. Adataink és eredményeink a vékony filamentum aktiváció három-fázisú modelljét támogatják (ábra). Ezen modell szerint Ca²⁺ jelenlétében SL-függő módon kialakulhat a zárt állapot (gyenge keresztkötések). Magasabb nyugalmi rost hosszúság mellett közelebb kerülnek egymáshoz a vékony és vastag filamentumok és konstans sebesség mellett, növekszik a gyenge keresztkötések

kialakulásának valószínűsége (azaz növekszik a Ca^{2+} érzékenység). Az erőgenerálásra (nyitott állapotba történő átmenetre) az SL-nek nincs hatása. Eredményeink jól korrelálnak a három-fázisú elméleti modellel, mivel az helyt ad a kontraktilis erő SL függő növekedésére a keresztkötési kinetika látható változtatása nélkül.

Az alapvető megfigyelésünk, hogy a k_{tr} független az SL-től patkány szívekben már részben leírásra került. Mi kiterjesztettük ezt a megfigyelést humán, egér és sertés miokardiumra. Kísérleti eredményeink, miszerint a $[\text{P}_i]$, a $[\text{Ca}^{2+}]$, a hőmérséklet és a faji adottságok szabályozzák a k_{tr} értéket (míg az SL változtatása nem), azt igazolják, hogy az aktin-miozin kinetikai változása nem előfeltétele a szívizomban a hossz-függő Ca^{2+} érzékenyítésének.

5.2. A miofibrilláris kontraktilis funkció változása az idő függvényében dilatatív kardiomiopátiás állatmodellen (Tg α q*44)

Eredményeink szerint a Tg α q*44 transzgénikus állatokban a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységének növekedése (14. hónap) megelőzte a maximális Ca^{2+} -aktivált erő csökkenését (F_0), ami csak a 18. hónapban alakult ki. A DCM kialakulása során a 14. hónapban, a balra tolt pCa-erő összefüggésen kívül még nem lehetett egyéb, a kontraktilis funkciót jellemző patológiás eltérést (változások a k_{tr} és F_0 értékekben) észlelni. Tehát a miofilamentumok csökkent kontraktilis funkcióját megelőzte a Ca^{2+} érzékenység fokozódásának kialakulása, amit eredményeink szerint elsősorban a PKA aktivitás és a troponin I bazális foszforilációjának a csökkenése okozott (csökkent β -adrenerg válasz). Az egérmodellek eltérő hemodinamikai működése, az eltérő miofibrilláris fehérje összetétel, a miofibrilláris fehérjék eltérő bazális foszforilációja és a különböző receptor rendszerek részben eltérő szabályozása megnehezítik a modellünkből származó konklúziók direkt adaptálását a humán szívre. Ugyanakkor DCM-es betegekből származó humán miokardium mintákon egyértelműen igazolni

lehetett a β -adrenerg rendszer csökkent működését (deszenzitizálódás és downreguláció).

A Tg α q*44 modell tanulmányozása kapcsán korábban igazolták, hogy a foszfolipáz C β kórosan növekedett aktivitása (és az ebből következő PKC aktiváció) már az állatok életének korai szakában kimutatható (6. hónap), jóval megelőzve a miofibrilláris fehérjék működésének patológiás eltéréseit (14. hónap) vagy a DCM kialakulását (18. hónap). Mindezekből a tényekből két következtetés vonható le: 1) nem a miofibrilláris fehérjék eltérő expressziója vagy hipofoszforylációja indította el a DCM-hez vezető patológiás folyamatokat (az eltérések valószínűleg másodlagosak); 2) nem valószínű, hogy egyedül a foszfolipáz C β /PKC rendszer kórosan növekedett aktivitása indította el a miofibrilláris funkció csökkenéséhez vezető patológiás folyamatokat (túl nagy az időkülönbség a kóros aktiváció megjelenése és a miofibrilláris fehérjék funkciójának károsodása között). A legvalószínűbb magyarázat, hogy egyéb intracelluláris szignalizációs rendszerek, receptorrendszerek (β -adrenerg rendszer) patológiás működése is társul a DCM megjelenéséhez.

A Tg α q*44 modellben a patológiás kontraktilis funkciót, eredményeink szerint valószínűleg két – a miofibrilláris kompartmentet érintő – eltérés okozhatta: 1) a lassú β -HCM megjelenése és 2) a miofibrilláris fehérjék (troponin I) defoszforylációja. A β -MHC fokozott expressziója elsősorban az aktin-miozin ciklus (k_{tr}) csökkenéséhez vezet és befolyásolhatja a kialakult Ca^{2+} aktiválta maximális erőt (F_o) is. A troponin I hipofoszforylációja pedig a miofilamentumok fokozott Ca^{2+} érzékenységet okozza. Ugyanakkor ezen fontos miofibrilláris eltérések mellett nem lehet kizárni egyéb tényezők szerepét (fötalis troponin C, pitvari könnyű lánc megjelenése), de ezen miofibrilláris proteinek expresszióját részleteiben nem tanulmányoztuk.

A miofibrilláris fehérjék bazális foszforylációs szintjét több protein kináz és foszfatáz együttes működése szabályozza. Kézenfekvőnek tűnik, hogy a Tg α q*44 modellben a PKC család krónikusan növekedett aktivitása

befolyásolhatta a miofibrilláris fehérjék bazális foszforilációját. Ugyanakkor a hasonló szubsztrát proteinek és a szignalizációs rendszerek egymásra hatása (crosstalk) miatt nehéz külön-külön, izoláltan vizsgálni az egyes PKC izoenzimek relatív hozzájárulását a foszforilációs változásokhoz. A Tg α q*44 állatmodell részletes tanulmányozása során kiderült, hogy a PKC család enzimei közül az idő függvényében csak a PKC α és a PKC δ izoenzim típus expressziója emelkedett, a PKC β változatlan maradt, a PKC ϵ pedig paradox módon csökkent. Az irodalmi adatok szerint a miofibrillum PKC ϵ enzimmel történő foszforilációja nem (vagy alig) befolyásolta a miofilamentumok Ca²⁺ érzékenységét. A PKC α és a PKC δ fokozott aktivitása pedig a miofibrilláris fehérjék hiperfoszforilációjához (és nem a bazális foszforiláció csökkenéséhez) vezet, ami csökkenti a Ca²⁺ érzékenységet.

Korábbi vizsgálatok alapján igazolták, hogy a humán DCM kialakulása során csökken a troponin I PKA-függő bazális foszforilációja. Az eredmények szerint a bi- és monofoszforilált troponin I foszoproteinek jelenléte eltolódott a defoszforilált forma irányába. Továbbá, szignifikáns korrelációt észleltek a defoszforilált troponin I jelenléte és a miofibrillumok Ca²⁺ érzékenysége között. Mindezen megfigyelések alapján logikusnak tűnt, hogy a β -adrenerg-PKA rendszer aktivitásának csökkenése hozzájárulhat a Tg α q*44 állatmodellben észlelt miofibrilláris eltérésekhez (a Ca²⁺ érzékenység növekedéséhez). A permeábilis kardiomiociták katalitikus alegységgel történő inkubálása, a korábbi irodalmi adatokkal megegyezően a 18 hónapos Tg α q*44 állatokból származó kardiomiocitákban is csökkentette a miofibrillumok Ca²⁺ érzékenységét és a pCa-erő görbe jobbra csúszott a kontroll állatok (FVB) görbéjének irányába. Más szavakkal, a katalitikus alegység alkalmazása megszüntette a szignifikáns különbséget a DCM-ben szenvedő 18 hónapos Tg α q*44 és a hasonló korú kontroll (FVB) állatcsoport kardiomiocitáinak Ca²⁺ érzékenysége között. Ezt a megfigyelésünket jól kiegészítette az a tény, hogy a Tg α q*44 állatokban, időben

egybeesett (18 hónap) a morfológiai eltérések (DCM) kialakulása és a PKA aktivitás, illetve a troponin I bazális foszforilációjának csökkenése.

Mindezen tények alapján valószínűsíthető, hogy a Tg α q*44 állatokban a 14 hónaptól csökken a β -adrenerg-PKA rendszer aktivitása (a humán DCM megfigyelésekhez hasonlóan) és elsősorban a PKA-függő troponin I hipofoszforiláció okozza a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységének a növekedését. Hogyan csökkenhet a PKA rendszer aktivitása egy alapjaiban PKC stimulált DCM-es állatmodellben? Feltételezéseink szerint a PKC aktiváció (elsősorban a PKC α), az állatmodellben a 14. hónapos kortól fokozatosan gátolja a β -adrenerg folyamatokat. A két intracelluláris szignalizációs rendszer (PKC és a PKA) antagonistá módon gátolja egymást és a Tg α q*44 állatokban a folyamatos PKC stimulálás miatt a háttérbe kerülnek a PKA által mediált intracelluláris protein foszforilációs folyamatok. Ugyanakkor a szignalizációs rendszerek egymásra hatásának (crosstalk) a részleteit a Tg α q*44 állatmodellben nem tanulmányoztuk.

Lényegesen egyszerűbbnek tűnik a 18 hónapos Tg α q*44 állatok aktin-miozin kinetikában (k_{tr}) bekövetkezett változások értelmezése. Az aktin-miozin ciklus sebességét elsősorban az MHC izoenzimek összetétele szabályozza és a β -MHC felszaporodásával a keresztkötési kinetika lelassul. Kísérleteinkben időben is egybeesett a k_{tr} értékek változása és az β -MHC expresszió növekedése. A Frank-Starling-törvény (nyugalmi rosthosszúságtól függő Ca^{2+} érzékenyítés) a DCM kifejlődése során is működött. Ugyanakkor - hasonlóan a normál egér szívekhez - az aktin-miozin ciklus sebessége (k_{tr}) patológiás körülmények között (DCM) is függetlennek bizonyult az SL értékétől.

6. Összefoglalás

A Frank-Starling-szabályozással kapcsolatos alapvető megfigyelésünk, hogy a k_{tr} független az SL értékétől. Ez a megfigyelés igaznak bizonyult mind a humán, mind az egér, mind a sertés miokardiumra. Kísérleti eredményeink

szerint a k_{tr} értéket alapvetően a $[P_i]$, a $[Ca^{2+}]$, a hőmérséklet, és a faji adottságok (MHC megoszlása) szabályozzák, míg az SL változtatásának a k_{tr} értékére mindezen változó körülmények között nincs hatása. Ezek a tudományos megfigyelések azt igazolták, hogy, az aktin-miozin kinetikai (k_{tr}) változása - semmilyen körülmény között - nem előfeltétele a szívizomban a Frank-Starling-szabályozásnak (az SL-függő Ca^{2+} érzékenyítésének).

Transzgénikus DCM egérmodellen ($Tg\alpha q^{*44}$) igazoltuk, hogy a krónikus PKC aktiváció ellenére, a miofibrillumokban bekövetkező patológiás eltérések (magnövekedett Ca^{2+} érzékenység és csökkent kontraktilitás) egyik fontos kiváltó tényezője a csökkent PKA aktivitás. A Frank-Starling-törvény (nyugalmi rosthosszúságtól függő Ca^{2+} érzékenyítés), méréseink szerint a DCM kifejlődése során is megtartott. Az aktin-miozin ciklus sebessége (k_{tr}) patológiás körülmények között (DCM) is függetlennek bizonyult az SL értékétől.

A modellben észlelt biokémiai eltérések (csökkenő β -adrenerg aktiváció) a speciális genetikus kiváltó tényező ellenére ($G\alpha q$ túlsúlyban történő expresszálása) jól korrelálnak a humán megfigyelésekkel.

7. A tudományos eredmények hasznosíthatósága

1. A szívelégtelenség relatív gyakorisága miatt sok embert érintő malignus betegség (a betegség prevalenciája 1-2%). Ezért fontos kutatási feladat a miokardium kontraktilitását befolyásoló miofibrilláris és intracelluláris hatásmechanizmusok tisztázása, mert további adatokat nyújthat a betegség jobb megértésére és az újabb terápiás lehetőségek kialakítására.

2. Vizsgálatainknak különleges jelentőségét az adta, hogy kísérleteinket részben humán preparátumokon (kardiomiocitákon) végeztük. Így az általunk észlelt

mechanikai és biokémiai eltérések direkt módon adaptálhatók a humán szívizomra is.

3. A szívizom kontraktilitásának szabályozása egy fontos élettani funkció a szívizom működése szempontjából. Az élettani szabályozás pontos megértése elengedhetetlen a patológiás történések követéséhez. Többek között, ezen szempontok miatt írt pályázatot (call for papers) az American Journal of Physiology, amelyben a miokardium kontraktilitásának szabályozása pályázati címszó alatt jelent meg közleményünk.

8. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

Edes IF, Czuriga D, Csanyi G, Chlopicki S, Recchia FA, Borbely A, Edes I, Velden JV, Stienen GJ, Papp Z. The rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine and porcine cardiomyocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R20-9. (IF: 3,661)

Edes IF, Toth A, Csanyi G, Lomnicka M, Chlopicki S, Edes I, Papp Z.: Late-stage alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 (in press) doi:10.1016/j.yjmcc.2008.07.001 (IF: 5,246)

További *in extenso* közlemények és könyvfejezet:

Szuk T, Gyongyosi M, Homorodi N, Kristof E, Kiraly C, **Edes IF**, Facsko A, Pavo N, Sodeck G, Strehblow C, Farhan S, Maurer G, Glogar D, Domanovits H, Huber K, Edes I. Effect of timing of clopidogrel administration on 30-day clinical outcomes: 300-mg loading dose immediately after coronary stenting versus pretreatment 6 to 24 hours before stenting in a large unselected patient cohort. *Am Heart J.* 2007;153:289-95. (IF: 3,552)

Édes I, **Édes IF**: A krónikus szívelégtelenség kialakulásának patomechanizmusa. *Orvosképzés 2008 in-press.*

Édes I. **Édes IF**, Nánási P: A szív működés szabályozása. In: A belgyógyászat alapjai. *Medicina, Budapest, 2. kiadás, in press.*

Idézhető absztraktok és konferencia kiadványok:

Édes IF, Tapolyai M: Very Severe Office Hypertension Is Rarely Very Severe. *XVth Scientific Meeting of the Inter-American Society of Hypertension, Abstract Book, 2003;61:P3.*

Édes IF, Czuriga D, Csányi G, Chlopicki S, Recchia FA, Borbély A, Galajda Z, Édes I, van der Velden J, Stienen GJM, Papp Z. The rate of tension redevelopment is not modulated by sarcoemre length in permeabilized human, murine and porcine cardiomyocytes. *New Frontiers in Basic*

Cardiovascular Research, 7th Meeting, című rendezvény kongresszusi kiadványa, 2006;p45.

Édes IF, Csányi G, Chlopicki S, Édes I, Papp Z. Late stage alterations in myofibrillar contractile function in the TG(ALPHA)Q*44 model of heart failure. *Cardiol. Hung. 2006;36:A16.*

Édes IF, Czuriga D, Galajda Z, Borbély A, Édes I, Csányi G, Papp Z. The Frank-Starling law of the heart does not affect the actin-myosin turnover rate. *Cardiol. Hung. 2007;37:A14.*

Édes IF, Czuriga D, Papp Z, Borbely A, Csanyi , Chlopicki S, Edes I, Recchia FA, van der Velden J, Stienen GJM. Alterations in the turnover rate of the actin-myosin cycle are not responsible for the Frank-Starling law of the heart. *Eur Heart J 2007;28(S):872.*

Facszó A, Steiber Z, **Édes IF**, Tóth A, Édes I. Intramuscular accumulation of connective tissue substance in strabismus. *Szemészet 2007;144(S I.):37.*

Édes IF, Csányi G, Chlopicki S, Merkely B, Édes I, Papp Z. Progressively deteriorating myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy (TGalphaQ*44). *Cardiol. Hung. 2008;38:B12.*

Czuriga D, Balogh Á, Pasztor ET, Recchia FA, Lionetti V, Czuriga I, **Edes IF**, Edes I, Chlopicki S, Papp Z. Myofibrillar alterations in animal models of heart failure. *New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 8th Meeting, című rendezvény kongresszusi kiadványa, 2008;p67-68.*