

A Frank–Starling-mechanizmus (szarkomerdinamika) vizsgálata egérben élettani körülmények között és szívelégtelenségben

*Édes István Ferenc,
Papp Zoltán,
Édes István

*Semmelweis Egyetem,
Kardiológiai Központ, Budapest
DEOEC, Kardiológiai Intézet,
Debrecen

Levelezési cím:
Dr. Édes István
4032 Debrecen, Móricz Zs. krt. 22.
E-mail: edesi@dote.hu

Kulcsszavak:

egér, szarkomerhossz,
 Ca^{2+} érzékenyítés, aktin-miozin
keresztköti ciklus

Keywords:

mouse, sarcomere length,
 Ca^{2+} sensitization, actin-myosin
cross-bridge cycling

A szívizomsejtek kontrakciós ereje és szarkomereinek hossza közti pozitív összefüggés a Frank–Starling-mechanizmus sejt szintű alapja. Ma még nem kellően tisztázott, hogy a nagyobb szarkomerhosszakon kialakuló fokozott izomerő az aktin-miozin keresztköti ciklus számának, vagy az aktin-miozin ciklus kinetikájának változásaival áll-e inkább összefüggésben, és az sem, hogy a kórosan átépült szívizomzatban ezek a kapcsolatok hogyan módosulnak. Jelen vizsgálatunkban azt tűztük ki célul, hogy egérmodelleken vizsgáljuk a nyugalmi szarkomerhossz hipotetikus szabályozó hatását a kontraktilis rendszer Ca^{2+} érzékenységre és az aktin-miozin keresztköti ciklus sebességére (k_w) élettani (FVB egértörzs) és patológiás körülmények között (Tgczq*44 egér modell – krónikus szívelégtelenség, DCM). Megfigyeléseink szerint a Frank–Starling-szabályozás az aktin-miozin kinetikájától független. Ez a megfigyelés egyaránt igaznak bizonyult, normál és a fokozott Ca^{2+} -érzékenységgel jellemzett patológiás körülmények között. Ezért valószínűsíthető, hogy a szívelégtelenség során kialakuló miofibrilláris remodelling a Frank–Starling-szabályozás molekuláris hátterét nem érinti, és a szívüregek dilatációja mellett (kongesztív szívelégtelenség) a szarkomerhossz-függő kontrakciós erő fokozódás ilyenkor is biztosítható.

Investigation of the Frank-Starling mechanism (sarcomerodynamics) in mice under physiological conditions and during heart failure. The positive relationship between the lengths of cardiomyocyte sarcomeres and contractile force represents the cellular background of the Frank-Starling mechanism. It is currently not entirely clear, whether the increased force at larger sarcomere lengths depends chiefly on the increased number or on the kinetics of actin-myosin cross-bridges, and whether these relations are altered in the remodeled myocardium. During our investigations we aimed to test a hypothetical sarcomere length dependent link between the Ca^{2+} sensitivity of myofilament force production and actin-myosin cross-bridge turnover rate (k_w) in murine models under physiological (FVB strain) and pathological conditions (Tgczq*44 model of chronic heart failure, DCM). Our results suggested that the Frank-Starling regulation is independent from the actin-myosin kinetics. This observation was valid both under normal and under pathological conditions with increased Ca^{2+} sensitivity of force production. Hence, heart failure related myofibrillar remodeling does not appear to involve the molecular background of the Frank-Starling regulation, and therefore in the presence of increased cardiac volumes (dilated heart failure), the sarcomere length dependent augmentation of the contractile force is possible.

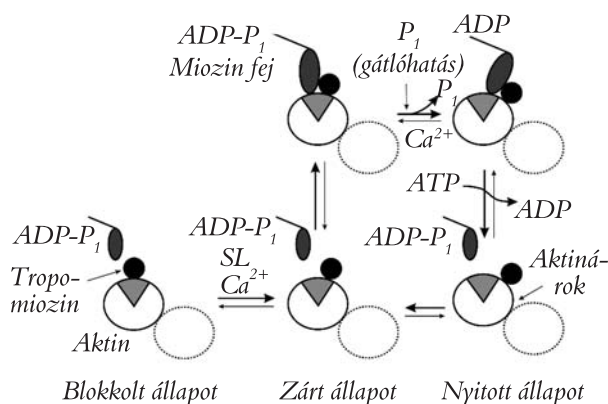
A szívizomsejt összehúzódó-képességéről, az ún. kontraktilitásról napjainkra igen kiterjedt ismeretek halmozódtak fel (1–4). A szívizomsejtek kontrakciós-relaxációs ciklusait a felszíni membránon (szarkomema) szabályos ritmusban jelentkező membránpo-

tenciál változások, az akciós potenciálok szabályozzák. Akciós potenciálok hatására az extracelluláris térből a kalciumionok (Ca^{2+}) szívizomsejtekbe áramlanak és az intracelluláris Ca^{2+} -raktárakból (szarkoplazmatikus retikulum, SR) a Ca^{2+} felszabadul, amelyek együttes ha-

tásként az intracelluláris szabad Ca^{2+} -koncentráció átmenetileg növekszik (Ca^{2+} -tranziens). Ez a Ca^{2+} -tranziens felelős közvetlenül a szisztolés erő fokozódásáért. A szív diasztolés relaxációja során a sejten belüli Ca^{2+} részben a sejten kívüli térbe, részben a sejten belüli raktárba kerül vissza. A szívműködés kontraktilis erejének alakulását végeredményben a Ca^{2+} -tranziens paraméterei (amplitúdó, időbeli lefutás, „ Ca^{2+} -availability”) és a Ca^{2+} -tranziensre reagáló miofilamentumok Ca^{2+} -reaktivitása (Ca^{2+} -érzékenység, „ Ca^{2+} -sensitivity”) együttesen határozzák meg.

A miofilamentumokat a szívműködés összehúzódsáért felelős fehérjék alkotják, amelyeket elektronmikroszkópikus megjelenésük alapján (az aktinból, troponin I-ből, troponin T-ből, troponin C-ből és tropomiozinból álló) vékony és (a főleg miozinból felépülő) vastag filamentumokként különböztetjük el. A sejtek szarkoplazmatikus terének zömét kitöltő miofilamentumok kötegekbe szerveződnek (miofibrillumok). A miofibrillumok hosszirányban ismétlődő egységei a szarkomerek, amelyek a szívműködés funkcionális és morfológiai

1. ábra. A kontrakció kialakulásának háromszintű modellje. Blokkolt állapotban a tropomiozin fonalak gátolják (blokkolják) az aktin „aktív” felszínét (sötétszürke körszelet), amihez a miozin fejek kötődnek. Ca^{2+} jelenlétében aktiválódik a troponin-C és a tropomiozin fonál a kettős aktinspirálion az ún. „aktinárok” irányába csúszdul 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 tropomiozin fonál már az aktinárok mélyére csúszdul, és teljesen szabaddá válik az „aktív” felszín. Így kialakulhatnak az erős keresztkötések. A nyugalmi szarkomerhossz (SL) növelése csökkenti a rostok harántátmérőjét, így közelebb kerülnek egymáshoz a vékony és vastag filamentumok, ami növeli a zárt állapot kialakulásának valószínűségét. Az anorganikus foszfát (Pi) gátolja a nyitott állapot kialakulását. SL: szarkomerhossz; ATP: adenozin trifoszfát; ADP: adenozin difoszfát



alapegységei. A kontrakció kapcsán a miofibrillaris történéseket egy dinamikus és egyben ciklikus folyamatként lehet értelmezni. Ennek egyik megközelítése az ún. háromszintű modell (1. ábra).

1. Nyugalmi állapotban (alacsony Ca^{2+} -koncentráció mellett) a tropomiozin blokkolja az aktin felszínén az aktin-miozin 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 fonal kissé elmozdul az aktin környezetében (az aktin árok 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 rostösszehúzódság 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, amelyek magas Ca^{2+} -koncentráció mellett az aktin-miozin ciklus folytonosságához, végső soron a szívműködés erőgenerálásához vezetnek.
6. A relaxáció kapcsán fordított folyamatok zajlanak: disszociál a Ca^{2+} a troponin C-ről, visszaáll a troponin-C eredeti konformációja és ismét blokkolódik az aktin felszínén az „aktív” felület (visszacsúszik a tropomiozin szál az eredeti, nyugalmi pozíciójába), ami az aktin-miozin keresztkötések létrejöttét gátolja (5).

Frank és Starling munkásságát követően vált ismertté a szívműködés nyugalmi szarkomerhossza (végdiasztolés volumen) és a megfelelő szívüregben kialakult nyomás közötti összefüggés (6, 7). A Frank–Starling-görbe csúcspontja olyan szívműködés megnyúlásánál alakul ki, ahol a szarkomerek hossza $2,3 \mu\text{m}$ körüli. Ezen ún. optimális szarkomerhossz ($2,3 \mu\text{m}$) mellett maximális a miozin és aktin között kialakuló keresztthidak erőki-fejtése. Az optimális szarkomerhossz felett ($>2,3 \mu\text{m}$) a vékony filamentumok kezdenek kicsúszni a vastag filamentumok közül (csökken a keresztkötések száma), ugyanakkor alacsony szarkomerhossz esetében ($<2,3 \mu\text{m}$) a vékony filamentumok átcúsznak a sar-

kömer 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 2,2–2,4 μm értéket, tehát még a dekompenzált miokardium is a Frank–Starling-görbe csúcsán, de a Frank–Starling-mechanizmusban rejlő tartalékok nélkül, működik.

A nyugalmi szarkomerhossz és a kontrakciós erő közötti összefüggés magyarázatául régebben sokáig kizárólag az optimális aktin-miozin közötti átfedést (optimális lehetőség a kereszthidak kialakítására) tartották (6). Újabban egyértelműen igazolták, hogy az optimális szarkomer-elrendeződés mellett egyéb tényezőknek is meghatározó szerepük van. Ezek közül a következőket tartják lényegesnek:

1. A nyugalmi szarkomerhossz 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 szarkomerhossz és a kontrakciós erő között pozitív korreláció van.
2. A szarkomerhossz növekedésével érzékenyebbé válik a Ca^{2+} -receptor (troponin C) a Ca^{2+} iránt, tehát azonos Ca^{2+} -transziens mellett is a szarkomerhossz növekedésével változik a kontrakciós erő (7–14). A Frank–Starling-mechanizmus molekuláris háttere azonban ma még teljességgel nem feltárt. Például az sem világos, hogy a nagyobb szarkomerhosszakon kialakuló fokozott izomerő az aktin-miozin keresztkötések számának, vagy az aktin-miozin ciklus kinetikájának változásaival áll-e inkább összefüggésben.

Jelen vizsgálatunkban azt tűztük ki célul, hogy egérmodelleken vizsgáljuk a nyugalmi szarkomerhossz hipotetikus szabályozó hatását: a kontraktilis rendszer Ca^{2+} érzékenységére és az aktin-miozin keresztkötési ciklus sebességére élettani (FVB egér törzs) és patológiai körülmények között (Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ egér modell a krónikus szívelégtelenség, dilatatív cardiomyopathia). A $G_{\alpha\text{q}}$ a G-proteinek családjába tartozó szignáltovábbító fehérje, amelynek krónikus aktivációja jelenlegi ismereteink szerint a humán miokardiumban is (pl. az endotelin-, angiotenzin-II- és noradrenalin-receptorok aktivációja miatt) balkamra-hipertrofiához, majd szívelégtelenséghez vezet (15). A $G_{\alpha\text{q}}$ közvetlenül a foszfolipáz C β aktivációját váltja ki, amelynek eredményeként inozitoltriszfoszfát és diacilglicerol keletkezik. A diacilglicerol, mint másodlagos intracelluláris hírvívó a proteinkináz C-t (PKC) aktiválja. Feltételezéseink szerint, amennyiben a kontraktilis fehérjék változásai hozzájárulnak a szívelégtelenség kialakulásához úgy azoknak a Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ transzgenikus egértörzsben az aktivált PKC intracelluláris hatásait is tükrözniük kell.

Módszerek

Kísérleti állatok, szövetminták

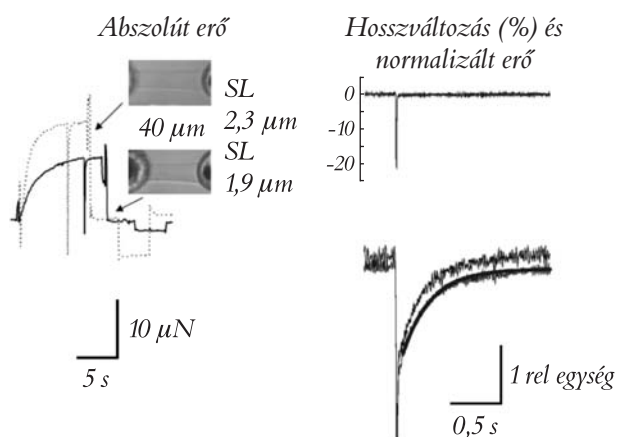
Vizsgálatainkhoz felnőtt egér bal kamrai szívizommin-táit használtuk. Kísérleteinket megelőzően a szövetmintákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az aktivált $G_{\alpha\text{q}}$ -proteint túlsúlyban expresszálo (overexpression) dilatatív cardiomyopathiás (DCM) transzgenikus egértörzs (Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$) kialakítását korábban részletesen leírták (16). Kísérleteinkben 14 és 18 hónapos korú homozigóta Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ és kontroll (FVB) egereket vontunk be. Valamennyi szövetmintát $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, majd ezeket a szöveteket használtuk a szívizomsejt (cardiomyocyt) preparátumok elkészítésére és különböző biokémiai mérésekhez.

Erőmérés permeabilizált szívizomsejt-preparátumokon

A cardiomyocyt preparátum izolációját és elkészítését korábban részletesen leírtuk (17). Az erőméréseket telítő Ca^{2+} -koncentrációjú aktiváló és Ca^{2+} -mentes relaxáló oldatok különböző elegyeinek felhasználásával hajtottuk végre (ismételt Ca^{2+} -kontraktúrák különböző Ca^{2+} -koncentrációk mellett). Az aktiváló oldat összetétele (mM egységben kifejezve) a következő volt: szabad Mg^{2+} 1, MgATP 5, foszfo kreatin 15, kalcium-etilenglikol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacetát (Ca-EGTA) 7 és N-N-bis[2-hidroxiethyl]-2-aminoetánsulfonát 100. A relaxáló oldat összetétele annyiban különbözött az aktiváló oldat összetételétől, hogy Ca-EGTA helyett 7 mM EGTA került az oldatba.

A szívizomsejt-preparátum erőmérési technikája a korábbiakban részleteiben már leírásra került (18). Röviden, egy szívizomsejt nagyságú preparátumot inverz mikroszkóp alatt szilikon ragasztó segítségével, két vékony rozsdamentes acél rovartűhöz erősítettünk. Az egyik tűt egy nagy érzékenységű erőmérőhöz, a másik tűt pedig egy elektromágneses motorhoz kapcsoltuk. Mindkét tűt „joystick”-kel kezelhető manipulátorokkal mozgattuk. Az izometriás erőmérést többszörös aktivációs/relaxációs ciklusokban $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végeztük, először rövid: 1,9 μm -es, majd hosszú 2,3 μm -es szarkomerhosszakon.

Amikor a preparátum elérte a maximális összehúzóerőt, a szívizomsejt hosszát – az elektromágnesre illesztett tű segítségével – 1 msec alatt 20%-kal csökkentettük és 20 msec múltán visszaállítottuk eredeti hosszára (ún. „release-restretch” manőver) (2. ábra). A manőver kapcsán a sejt által kifejtett maximális erő (F_{total}) nullára csökkent (a hirtelen rövidülés miatt), ami lehetővé tette a maximális sejt által kifejtett erő regisztrálását és kiszámítását. Az eredeti hossz visszaállítását követően az aktin-miozin kapcsolatok újrendeződésével az izomsejt rövid időn belül újra a rövidítést megelőző



2. ábra. Izometriás összehúzódás során fellépő erő-viszonyok egyetlen permeabilizált egér (FVB) szív-izomsejtben 1,9 μm és 2,3 μm szarkomerhosszak esetén. Az alkalmazott Ca^{2+} a maximális erő felének kiváltásához szükséges koncentráció volt (SL: 1,9 μm , pCa 6,2). A bal oldali panelen az abszolút erő, a lassú mintavételezés során felvett Ca^{2+} -kontrakúra látható, mind 1,9 (folyamatos vonal), mind 2,3 μm (szaggatott vonal) szarkomerhossz esetében. A jobb oldali panel aktiváció csúcsán végrehajtott gyors hosszváltoztatást (felül) és az ennek hatására bekövetkező gyors erő csökkenést és regenerációt mutatja (alul). Ezzel a manőverrel (80%-ra rövidített, majd visszaállított szarkomerhossz – release-restretch) számítottuk a k_{tr} értékét (folytonos vonallal illusztrált illesztett exponenciális függvény). Az erő regenerációjánál a felső görbe az 1,9 μm -es az alsó pedig a 2,3 μm -es szarkomerhossz mellett mért erő újraképződésnek felel meg

maximális kontrakciós erőt hozta létre. Ez a folyamat igen gyorsan, néhány másodperc alatt zajlott le (erő újraképződés – „tension redevelopment”). Az erő újraképződés a release-restretch manőver után jellemző görbét adott (2. ábra), amire exponenciális függvényt illesztettünk, annak érdekében, hogy az erő újraképződés (aktin-miozin ciklus) sebességét (k_{tr}) különböző Ca^{2+} -koncentrációk esetén kiszámolhassuk:

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

ahol az $F(t)$ az erő, bármely t időpontban a release-restretch manőver után, bármely Ca^{2+} koncentráción. Az F_i a kezdeti erő értéket a release-restretch manőver után jelzi, míg az F_a az újraképződött Ca^{2+} -aktivált erő amplitúdóját jelöli. A mintavétel általában 20 Hz-en történt, azonban a k_{tr} mérésekor ezt az értéket 1 kHz-re növeltük.

Az izometriás csúcserőt (F_{total}) (amely az aktív és passzív komponensek összege, $F_{\text{aktív}}$ és $F_{\text{passzív}}$) a gyors rövidüléssel párhuzamos hirtelen erőcsökkenésből határoztuk meg. A relaxáló oldatban lényegesen hosszabb ideig tartó rövidítés révén a szívizomsejtben ébredt passzív

erőkomponenst ($F_{\text{passzív}}$) az aktivációs ciklust követően mértük.

A kontrakúra amplitúdóját számos, különböző Ca^{2+} -koncentrációjú aktiváló oldatban is meghatároztuk, melyek segítségével a Ca^{2+} -érzékenységi görbe szerkesztésére nyílt lehetőség az egyenlet (2) felhasználásával. A szigmoid lefutású görbe az ún. Hill-egyenlettel illeszthető, amely a kontraktilis rendszer által generált erő Ca^{2+} -függésének legfontosabb kvantitatív értékeit tartalmazza:

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

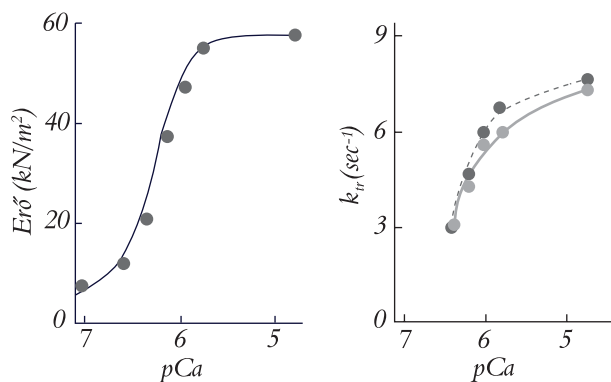
ahol F az adott Ca^{2+} -koncentráció mellett kialakult izomerőt, F_o a maximális Ca^{2+} -telítettség mellett létrejött izomerőt (maximális Ca^{2+} -aktivált erő), $[\text{Ca}^{2+}]$ az adott Ca^{2+} -koncentrációt, $[\text{Ca}_{50}]$ a félmáximális erő kifejlődéséhez szükséges Ca^{2+} -koncentrációt, és végül n_{Hill} az ún. Hill-koefficiens jelöli. A Ca^{2+} -koncentráció kifejezésére a moláris koncentráció tízes alapú negatív logaritmusát alkalmaztuk (pCa). A $[\text{Ca}_{50}]$ (vagy pCa_{50}) a kontraktilis rendszer Ca^{2+} iránti érzékenységét önmagában jellemzi. Értéke nagymértékben függ a troponin C Ca^{2+} iránti affinitásától.

A munkánk során nyert adatok rendszerezését Microsoft EXCEL 2000 program segítségével táblázatos formában valósítottuk meg. A bemutatott adatok többségét átlag $\pm$ a mintaközép hibája (S.E.M.) formában tüntettük fel. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a megfelelően választott statisztikai próba (Student-féle egy- vagy kétmintás t-próba, ANOVA) eredményeként a kapott p-érték kisebb volt 0,05-nél. A mérésekbe bevont szívizomsejtek száma csoportonként 5-10 között változott, amelyeket legalább három különböző állatból nyertünk.

Eredmények

A változó nyugalmi szarkomerhossz hatása a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységére és az aktin-miozin ciklus sebességére

Ezen kísérleteinkhez kontroll (FVB) egér cardiomyocytákat használtunk. Várározásainknak megfelelően a maximális Ca^{2+} -aktivált erő a 1,9 μm -nél mért $27,2 \pm 3,9$ kN/m² átlagos értékről 2,3 μm -nél $56,6 \pm 3,9$ kN/m²-re emelkedett (3. ábra), jelezvén a szívizomsejt-preparátumokban rejlő hosszfüggő tartalékokat. A Ca^{2+} -független passzív erők ($F_{\text{passzív}}$) vizsgálata során a nagyobb feszítés (preload) szintén magasabb erőértékeket eredményezett (1,9 μm -nél: $3,8 \pm 0,8$ kN/m²; 2,3 μm -nél $10,5 \pm 0,6$ kN/m²). Utóbbi arra utal, hogy a végdiasztolés térfogat fokozódásával párhuzamosan emelkedő kamrai nyomáshoz a szívizomsejtek relaxált állapotukban is hozzájárulhatnak.



3. ábra. pCa-erő (bal oldali panel) és pCa- k_{tr} (jobb oldali panel) összefüggések egyetlen kontroll (FVB) egér szívizomsejten. Az erő és k_{tr} -értékeket abszolút számokban adtuk meg. A szarkomerhossz változtatása nem befolyásolta szignifikánsan a k_{tr} -értékeket (jobb oldali ábra). A világosszürke szimbólumok (○) az 1,9 μm -es, a sötétszürke szimbólumok (●) a 2,3 μm -es szarkomerhossz mellett végzett méréseket mutatják

A kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenység szarkomerhossz-függésének vizsgálatára a normalizált pCa-erő összefüggéseket alkalmaztunk. Jól észlelhető volt a szarkomerhossz növekedés hatására létrejövő pCa₅₀-érték balra tolódása (Ca^{2+} -érzékenyítés), amely ~0,11 pCa-érték mellett szignifikánsnak bizonyult (4. ábra).

Egérpreparátumunkban minden vizsgált Ca^{2+} -koncentrációnál a mért k_{tr} -értékek lényegesen magasabbak voltak, mint az egyéb speciésekben (sertés, humán) mért és korábban publikált (19) adatok (a különbség legalább 5-szörös – ennyivel gyorsabb az egér szívekben az aktin-miozin ciklus kinetikája). Ugyanakkor a szarkomerhossz változtatása nem befolyásolta a k_{tr} -paraméterek pCa függését (3. ábra). 1,9 μm -es és 2,3 μm -es szarkomerhosszaknál a $k_{tr,max}$ értékei $7,44 \pm 0,15 \text{ s}^{-1}$, illetve $7,21 \pm 0,56 \text{ s}^{-1}$ voltak ($P > 0,05$) ($k_{tr,max}$ = maximális Ca^{2+} -telítés mellett mért k_{tr}).

A kontraktilis funkció változása dilatatív cardiomyopathiás állatmodellen (Tgαq*44)

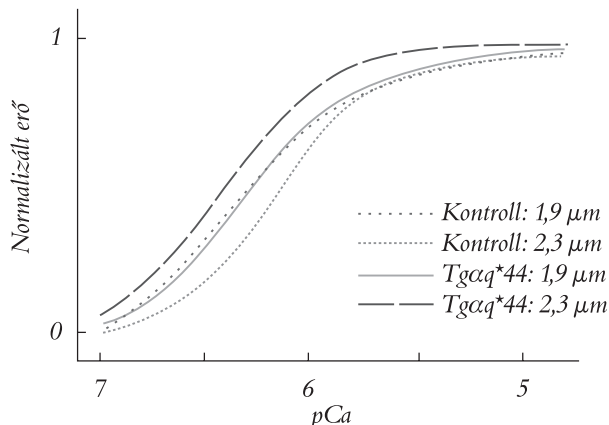
A Tgαq*44 transzgenikus egértörzs jellegzetessége a $G_{\alpha q}$ fehérje folyamatos fölöslegben történő szintézise (overexpressziója). Ennek megfelelően a transzgenikus állatokban, idősebb korokban dilatatív cardiomyopathia (DCM) fejlődik ki, amelynek talaján az egerek súlyos kongesztív szívelégtelenséget kapnak. Vizsgálataink során elsősorban a mechanikus funkcióra és az ezzel kapcsolatos miofibrilláris eltérésekre fókuszáltunk.

A Tgαq*44 transzgen állatok életkorának előrehaladásával (14 és 18 hónapos korban), jellegzetesen megváltoztak a kardiális morfológiai paraméterek a vad típusú kontroll állatok paramétereire képest. A Tgαq*44 egerekben a 14. hónapot követően jól észlelhető a

DCM kialakulása (a szív súly/ testsúly hányados a következőképpen alakult: 14. hónap: $5,3 \pm 0,3 \text{ mg/g}$; 18. hónap: $7,0 \pm 0,4 \text{ mg/g}$). A kontroll egerekben ugyan ezen időszakban nem történt szignifikáns változás a morfológiai kardiológiai paraméterekben (a szív súly/ testsúly hányados a következőképpen alakult: 14. hónap: $3,6 \pm 0,4 \text{ mg/g}$; 18. hónap: $3,9 \pm 0,3 \text{ mg/g}$) ($p < 0,05$ vs. Tgαq*44 mindkét életkorban). A DCM kialakulása szignifikánsan ($P < 0,001$; log-rank-teszt) növelte a Tgαq*44 egerek mortalitását is.

A korábbi fejezetben ismertetettekhez hasonlóan a kontroll és Tgαq*44 állatokból izolált cardiomyocytákon 14 hónapos és 18 hónapos korban és különböző szarkomerhosszak mellett (1,9 μm és 2,3 μm) részletesen vizsgáltuk a maximális Ca^{2+} -aktivált erőt, a passzív erőt és a $k_{tr,max}$ változásait. A Frank–Starling-mechanizmusnak és saját korábbi vizsgálati eredményeinknek (19) megfelelően a szarkomerhossz növelése (1,9 μm -ról 2,3 μm -re) a transzgenikus egérszívekben a kontroll állattörzshez hasonlóan szignifikánsan növelte a maximális aktív és a passzív erőt. A Tgαq*44 állatokban azonban a maximális erő a 18 hónapos korban lényegesen kisebb volt (mind az 1,9 μm -es, mind a 2,3 μm -es nyugalmi rosthosszúságnál, ~60%-os csökkenés), mint a kontrollállatok bármely korcsoportjában. Az $F_{passzív}$ értéke szintén jellegzetesen megváltozott a 18 hónapos Tgαq*44 egerekben. 2,3 μm -es szarkomerhossz mel-

4. ábra. A 18 hónapos kontroll és Tgαq*44 állatok cardiomyocytáinak átlagolt pCa-erő összefüggései (különböző szarkomerhosszak mellett). A szubmaximális Ca^{2+} mellett mért erőket az azonos sejteken mért maximális értékekre normalizáltuk, majd az átlagos erőértékeket a Hill-egyenlet (lásd Módszerek) segítségével illesztettük. Jól látható a magasabb szarkomerhossz mellett (2,3 μm) az FVB és Tgαq*44 állatokból nyert görbék balra tolódása. Ugyanakkor a Tgαq*44 állatok cardiomyocytáinak pCa-erő összefüggései mindkét szarkomerhosszon (1,9 μm és 2,3 μm) az FVB állatokból nyertekhez képest szintén szignifikánsan balra helyezkedtek el (magasabb Ca^{2+} -érzékenységet mutattak)



lett, egy erőteljes szignifikáns növekedést (~60%-os) észleltünk a kontrollállatok bármely korcsoportjához képest.

A miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységének vizsgálatához mindkét állattörzs cardiomyocytáit különböző szarkomerhossz értékeken (1,9 μm és 2,3 μm) maximális és szubmaximális Ca^{2+} -koncentrációkkal aktiváltuk (4. ábra). Az adatokat minden esetben a megfelelő maximum értékekre normalizáltuk, majd a mért átlagos erőértékek illesztésével ábrázoltuk a pCa-erő összefüggéseket. A hosszabb szarkomerhossz (2,3 μm) alkalmazása minden időpontban balra tolta a pCa-erő összefüggéseket, mind a kontroll, mind a Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ állatokban (azaz növekedett a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége). A pCa₅₀ balratolódásának mértéke mindkét állatcsoportban közel 0,10 pCa egység volt ($P>0,05$ Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ vs. FVB). Megfigyelhető volt továbbá, hogy a 14 hónapos, illetve 18 hónapos életkorban mindkét szarkomerhossz (1,9 μm és 2,3 μm) alkalmazása mellett, a Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ állatok pCa-erő görbéi szignifikánsan (~0,13 pCa; $p<0,05$) balra tolódtak a kontroll görbékhez képest. Más szavakkal a DCM kialakulásával összhangban a Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ állatokban fokozódott a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége a kontrollállatok értékeihez képest.

Cardiomyocyta preparátumaink lehetővé tették annak vizsgálatát is, hogy a DCM kifejlődése során a Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ állatokban észlelt változások (Ca^{2+} -aktiválta erő csökkenése, Ca^{2+} -érzékenység növekedése) összefüggésben állnak-e az aktin-miozin ciklus kinetikájának esetleges változásaival. Ennek a kérdésnek a tanulmányozására különböző szarkomerhosszak mellett, a Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ állattörzsben is vizsgáltuk a Ca^{2+} aktivált erő újraképződésének sebességét (k_{tr}), ami jól korrelál az aktin-miozin ciklus sebességével. Eredményeink alapján, az FVB állattörzsben tapasztaltakhoz hasonlóan egyértelműen igazolni lehetett a k_{tr} Ca^{2+} -függését, azaz magasabb Ca^{2+} -koncentráció mellett a k_{tr} magasabb értéket adott (a 3. ábrán bemutatotthoz hasonlóan). A szarkomerhossz változtatása azonban a k_{tr} paraméterek pCa függését a Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ állatokban sem befolyásolta. 1,9 μm -es és 2,3 μm -es szarkomerhosszaknál a $k_{tr,max}$ értékei 14 hónapos korban $6,95\pm0,3\text{ s}^{-1}$, illetve $6,65\pm0,18\text{ s}^{-1}$ voltak ($p>0,05$). Míg 18 hónapos korban a Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$ állatokban mért $k_{tr,max}$ értékek 1,9 μm -es és 2,3 μm -es szarkomerhosszaknál $5,69\pm0,23\text{ s}^{-1}$, illetve $5,39\pm0,19\text{ s}^{-1}$ értékeknek adódott ($P>0,05$). Tehát az aktin-miozin ciklussebességét a szarkomerhossz a DCM kialakulásától függetlenül nem befolyásolta.

Megbeszélés

Eredményeink szerint az aktin-miozin ciklus sebessége (k_{tr}) szorosan összefügg az alkalmazott Ca^{2+} -koncentrációval, de független a kiindulási szívizomsejt hosszától

és nyugalmi szarkomerhossztól. Adataink ezért azt sugallják, hogy egér szívekben hasonlóan egyéb emlős szívekhez (19) egyértelmű összefüggés van a pCa-erő és pCa- k_{tr} -paraméterek között, azonban a nyugalmi szarkomerhossz változása nem játszik szerepet a k_{tr} -szabályozásban.

Korábbi vizsgálatok eredményei szerint kis emlősökben (egér, patkány) a cardiomyocyták gyors aktin-miozin kinetikáját elsősorban a fajspecifikus miozin nehéz lánc (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 (20). Ugyanakkor az MHC expresszió (α - vagy β) tendenciájában nem befolyásolta a nyugalmi szarkomerhosszúságtól függő Ca^{2+} -érzékenyítést (19, 21).

A nyugalmi szarkomerhosszúságtól függő Ca^{2+} -érzékenyítés molekuláris mechanizmusa még nem tekinthető tisztázottnak, de valószínűsíthető hogy a következő tényezőknek van kiemelt szerepük:

1. a szarkomerhossz megnyújtása növeli az erőgeneráló keresztkötések számát, és
2. növeli a troponin-C affinitását a Ca^{2+} irányában (9, 21, 22).

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 ciklussebességet (8), míg a troponin-C-hez kötött Ca^{2+} növekedése gyorsítaná ugyanezt a paramétert (7, 23). Eredményeink azt mutatták, hogy adott Ca^{2+} -koncentráció mellett a k_{tr} állandó maradt a szarkomerhossz változás hatására létrejövő erőnövekedés ellenére. Más szavakkal fogalmazva, egérben a Ca^{2+} -koncentráció változtatása ellenére sem sikerült elkülöníteni egymástól a két lehetséges elméleti állapotot (szarkomerhossz függő módon nem gyorsult és nem is lassult a k_{tr}). Elméletileg lehetséges, hogy a két folyamat (a kooperatív erők lassítanak, a Ca^{2+} -affinitás növekedése gyorsítaná a k_{tr} -t) minden kísérleti körülmény között pontosan kiegyenlíti egymást (ezért nem változik). Összességében ugyanakkor ez a lehetőség eléggé valószínűtlen. Sokkal valószínűbb, hogy a Ca^{2+} -koncentráció (és nem a szarkomerhossz) a fő meghatározója emlős szívekben a k_{tr} -értékének, és ezzel az aktin-miozin ciklussebességnek.

Transzgénikus DCM egérmodellen (Tg $\alpha\text{q}^{\ast}44$) egyrészt igazoltuk, hogy a krónikus foszfolipáz C β és PKC aktiváció hatására szignifikánsan növekedett a myocardium Ca^{2+} -érzékenysége és csökkent a kontraktilitás. Ugyanakkor az aktin-miozin ciklus sebessége (k_{tr}) patológiás körülmények között (DCM) is függetlennek bizonyult az szarkomerhossz értékétől. A Frank–Starling-törvény, méréseink szerint a DCM

kifejlődése során is megtartott maradt, amit elsősorban a nyugalmi szarkomerhosszúságtól függő Ca^{2+} -érzéke-nyítés biztosított.

Adataink a vékony filamentum aktiváció háromfázisú modelljét támogatják (1. ábra). Ezen modell szerint (5, 7, 24, 25) Ca^{2+} jelenlétében szarkomerhossz függő módon kialakulhat a zárt állapot (gyenge keresztkötések). Magasabb nyugalmi szarkomerhosszúság 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) a szarkomerhossznak nincs hatása. Eredményeink jól korrelálnak a háromfázisú elméleti modellel, mivel az helyt ad a kontraktilis erő szarkomerhosszúság függő növekedésére a keresztkötési kinetika látható változtatása nélkül.

Fiziológiás (in vivo) körülmények között a kontraktilitás szabályozása egy bonyolult és komplex folyamat, amit többek között a pillanatnyi hemodinamikai viszonyok, a humorális szabályozás (pozitív inotrop szerek, egyéb vegyületek) és a miokardium általános energetikai állapota is folyamatosan befolyásolnak (2, 3, 26). Eredményeinket, mint alapvető (egyéb tényezőktől független) miofibrilláris szabályozó mechanizmusként kell értelmezni.

Összefoglalva a Frank–Starling-szabályozással kapcsolatos alapvető megfigyelésünk, hogy az aktin-miozin kinetika (k_{tr}) független a nyugalmi szarkomerhosszúságtól. Ez a megfigyelés igaznak bizonyult mind patológiás (DCM), mind normál körülmények között. Kísérleti eredményeink szerint a k_{tr} értékét alapvetően a Ca^{2+} -koncentráció és a faji adottságok (MHC megoszlása) szabályozzák, míg a nyugalmi szarkomerhosszúságnak a k_{tr} értékére nincs hatása. Ezek a tudományos megfigyelések azt igazolták, hogy, az aktin-miozin kinetikai (k_{tr}) változása nem előfeltétele a szívízomban a Frank–Starling szabályozásnak (a szarkomerhossz-függő Ca^{2+} -érzékenyítésének). Mérési eredményeink azt is valószínűsítik, hogy a szívelégtelenség során kialakuló miofibrilláris remodeling a Frank–Starling-szabályozás molekuláris hátterét nem érinti, és a szívéregek megfelelő makroszkópos geometriai viszonyai mellett a szarkomerhossz-függő kontrakciós erő fokozódás ilyenkor is biztosítható.

Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését a TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 számú projekt és az OTKA K68363 számú forrása támogatta. A projekt az Új Magyarország Fejlesztési Terven keresztül az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Irodalom

1. Wolledge RC, et al. Energetic aspects of muscle contraction. Monogr Physiol Soc 1985; 41: 1–357.
2. Édes I. A szív- és simaizom Ca^{2+} -anyagcseréje: elmélet, klinikum. Golden Book; 2000.
3. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2001.
4. Opie LH. Heart physiology, from cell to circulation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
5. McKillop DF, et al. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. Biophys J 1993; 65: 693–701.
6. Allen DG, et al. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. J Mol Cell Cardiol 1985; 17: 821–840.
7. Brenner B. Effect of Ca^{2+} on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 3265–3269.
8. Campbell K. Rate constant of muscle force redevelopment reflects cooperative activation as well as cross-bridge kinetics. Biophys J 1997; 72: 254–262.
9. Fitzsimons DP, et al. Strong binding of myosin modulates length-dependent Ca^{2+} activation of rat ventricular myocytes. Circ Res 1998; 83: 602–607.
10. Fitzsimons DP, et al. Cross-bridge interaction kinetics in rat myocardium are accelerated by strong binding of myosin to the thin filament. J Physiol 2001; 530: 263–272.
11. Fukuda N, et al. Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. Circ Res. 2000; 86: E1–E6.
12. Hofmann PA, et al. Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C. Am J Physiol 1987; 253: C541–C546.
13. Konhilas JP, et al. Length-dependent activation in three striated muscle types of the rat. J Physiol 2002; 544: 225–236.
14. Konhilas JP, et al. Troponin I in the murine myocardium: influence on length-dependent activation and interfilament spacing. J Physiol 2003; 547: 951–961.
15. Goldspink PH, et al. Protein kinase Cepsilon overexpression alters myofibrillar properties and composition during the progression of heart failure. Circ Res 2004; 95: 424–432.
16. Mende U, et al. Dilated cardiomyopathy in two transgenic mouse lines expressing activated G protein alpha(q): lack of correlation between phospholipase C activation and the phenotype. J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 1477–1491.
17. Papp Z, et al. The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. J Physiol 2002; 543: 177–189.
18. Borbely A, et al. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. Cardiovasc Res 2005; 67: 225–233.
19. Edes IF, et al. 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–R29.
20. Rundell VL, et al. Impact of beta-myosin heavy chain isoform expression on cross-bridge cycling kinetics. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288: H896–H903.
21. Adhikari BB, et al. Cardiac length dependence of force and force redevelopment kinetics with altered cross-bridge cycling. Biophys J 2004; 87: 1784–1794.
22. Fuchs F, et al. Length-dependent Ca^{2+} activation in cardiac muscle: some remaining questions. J Muscle Res Cell Motil 2005; 26: 199–212.
23. Wolff MR, et al. Calcium sensitivity of isometric tension is increased in canine experimental heart failure. Circ Res 1995; 76: 781–789.
24. Wannenburg T, et al. The Frank–Starling mechanism is not mediated by changes in rate of cross-bridge detachment. Am J Physiol 1997; 273: H2428–H2435.
25. Wannenburg T, et al. Cross-bridge kinetics in rat myocardium: effect of sarcomere length and calcium activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 279: H779–H790.
26. Szabó B, et al. The role of vitamin-D in the development of cardiac failure. Orv Hetil 2009; 150: 1397–402.