

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

**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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2. oldal
1. Bevezetés	3. oldal
1.1. A kardiomiociták struktúrája, a kontrakció mechanizmusa.....	3. oldal
1.2. A szívizom kontraktilis fehérjéinek funkcionális struktúrája.....	6. oldal
1.3. A nyugalmi rosthosszúság és a kontrakciós erő.....	9. oldal
1.4. β -adrenerg receptor rendszer, miofibrilláris fehérjék és a szívelégtelenség.....	10. oldal
2. Célkitűzések	13. oldal
3. Metodika és felhasznált anyagok	14. oldal
3.1. Kísérleti állatok, szövetminták.....	14. oldal
3.2. Erőmérés permeabilizált szívizomsejt preparátumokban.....	15. oldal
3.3. Endogén PKA aktivitás mérése.....	19. oldal
3.4. Troponin I utófoszforiláció.....	20. oldal
3.5. MHC izoformák szétválasztása.....	21. oldal
3.6. Statisztika, adatelemzés.....	21. oldal
4. Eredmények	22. oldal
4.1. A szarkomerhossz változtatásának hatása a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységre és az aktin-miozin ciklus sebességére különböző speciosekben	22. oldal
4.2. A miofibrilláris kontraktilis funkció változása a dilatatívkardiomiopátia progressziójának függvényében állatmodellen(Tg α q*44 egértörzs).....	32. oldal
5. Megbeszélés	46. oldal
5.1. A szarkomerhossz változtatásának hatása a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységre és az aktin-miozin ciklus sebességére különböző speciosekben.....	46. oldal
5.2. A miofibrilláris kontraktilis funkció változása a dilatatív kardiomiopátia progressziójának függvényében állatmodellen (Tg α q*44 egértörzs).....	49. oldal
6. Összefoglalás	53. oldal
7. A tudományos eredmények hasznosíthatósága	54. oldal
8. Hivatkozások jegyzéke	55. oldal
9. Saját publikációk jegyzéke	64. oldal
10. Köszönetnyilvánítás	66. oldal
11. Bekötött publikációk	67. oldal

Rövidítések jegyzéke

ANOVA=variancia analízis

ADP és ATP =adenozin difoszfát és trifoszfát

BSA=bovin szérum albumin

[Ca²⁺]=Ca²⁺-koncentráció

cAMP=ciklikus adenzin monofoszfát

DCM=dilatatív kardiomiopátia

EGTA=etilén-glikol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacetát

F_{passive}=a permeabilizált kardiomiocita preparátum által kifejtett passzív erő

F_{total}=a permeabilizált kardiomiocita preparátum által kifejtett maximális erő

FVB=normál kontrollkét használt (vad típusú) egértörzs

F₀=maximális Ca²⁺ aktivált erő

G_{αq}= G proteinek családjába tartozó fehérje

I_{TO}=transziens kifelé irányuló (4-aminopiridin-érzékeny) kálium áram

k_{tr}= az erő újraképződés (aktin-miozin ciklus) sebességének sebességi állandója

LC₁=miozin esszenciális könnyű lánc

LC₂=miozin regulatorikus könnyű lánc

MHC=miozin nehéz lánc

MO=Missouri Állam

NJ=New Jersey Állam

O₂=oxigén

pCa=Ca²⁺ koncentráció 10-es alapú negatív logaritmus

P_i=anorganikus foszfát

PKA=proteinkináz A

PKC=proteinkináz C

SDS=nátrium dodecilszulfát

SEM=a mintaközép hibája

SERCA2= szarkoplazmatikus retikuláris Ca²⁺-ATPáz

SL=szarkomerhossz

SR= szarkoplazmatikus retikulum

Tgαq*44=transzgénikus a Gαq fehérjét túlsúlyban expresszáló egér állatmodell

USA=Amerikai Egyesült Államok

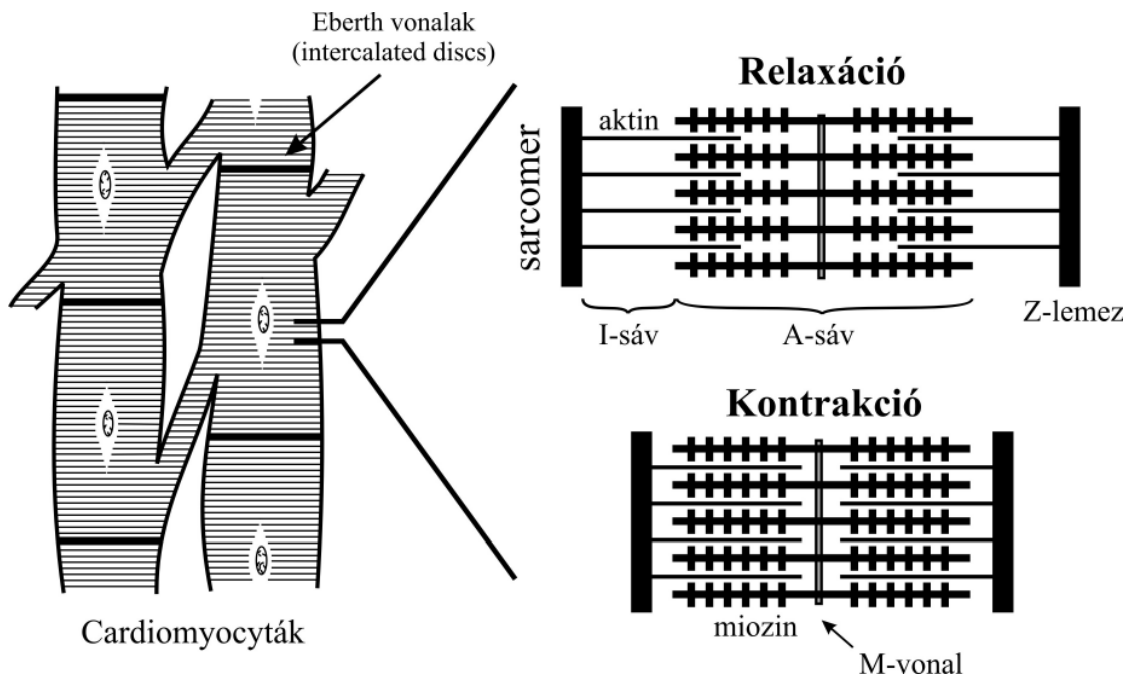
V_{max}=kontrakció sebessége

1. Bevezetés

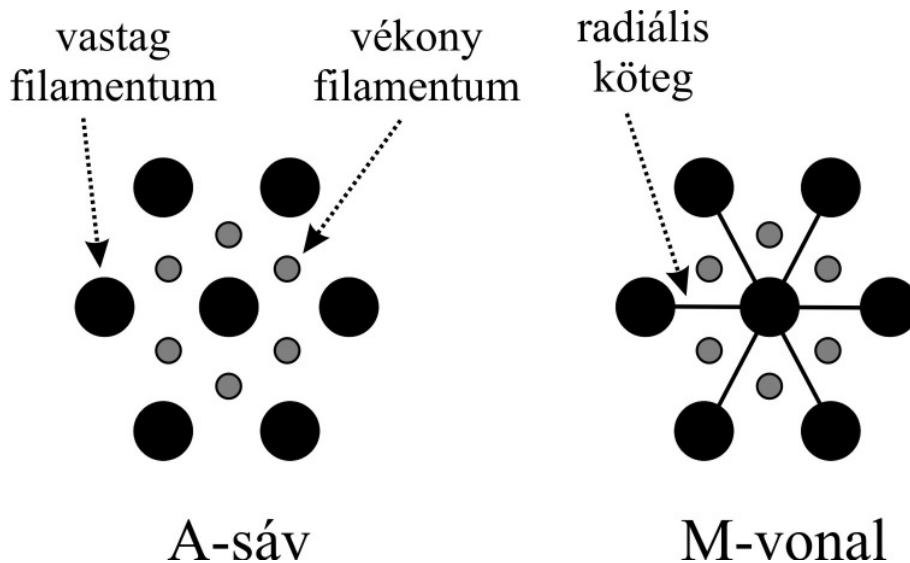
1.1. A kardiomiociták struktúrája, a kontrakció mechanizmusa

A szív munkaizomzata szövettanilag hálózatos, parallel lefutású rostokat tartalmaz. A kardiomiocitákra jellemző, hogy külön sejtmagjuk van, amely a sejt közepén helyezkedik el. Az egyes sejteket egy, a rostokra merőleges lefutású, sötétre festődő, hálózatos membránlemez rendszer (Eberth-féle vonalak) választja el egymástól (angol nomenklatúra szerint „intercalated discs”). Ez a membránlemez anatómiai szempontból valójában egy sejt-sejt junkció-nak felel meg. Funkcionális szempontból azonban ez a membránelválasztás csak virtuális, mivel a szívizom közismerten a minden vagy semmi törvény alapján válaszol az ingerekre és a depolarizációs hullám az izomzaton közvetlenül tovaterjed (funkcionális syncytium). A szívizomban a miofibrillumok a vázizmokhoz hasonlóan keresztcsíkolatot mutatnak. Ez a tulajdonságuk abból adódik, hogy a szabályos struktúrákba rendeződött kontraktilis fehérjék a szövettani vizsgálatok kapcsán eltérően törnek a polarizált fényt. A miofilamentum alapvető egysége a szarkomer, amelyet két Z-lemez határol (1. ábra). A vastag filamentumok által alkotott szegmensben (A-sáv) főleg miozin és C-protein, a vékonyfilamentumok által alkotott szegmensben (I-sáv) pedig aktin, tropomiozin és troponin (troponin C, I és T) található. A troponinokat regulatorikus miofibrilláris fehérjéknek is nevezik, mivel a miokardium Ca^{2+} ionokra adott válaszát szabályozzák. A vékonyfilamentumok alapját egy aktin alegységekből felépülő kettős spirál képezi. A Z-lemez, ami a szarkomerek határát jelzi, tulajdonképpen a szomszédos szarkomerek vékony filamentumainak összekapcsolódásából alakul ki. Keresztmetszeti képeken jellegzetes a vékony- és vastag filamentumok elrendeződése (2. ábra). Az egyes vastagfilamentumok hexagonális elrendeződésűek és minden vastag filamentumot vékonyfilamentumok vesznek körül, amelyek ugyancsak hexagonális elrendeződésűek (1,2). Az A-sáv közepén egy erősebb festődésű vonal (M-vonal) található. Az M-vonal magasságában elvégzett harántmetszet igen hasonló az A-sáv harántmetszetéhez, az egyetlen különbség, hogy az M-harántmetszetben a hexagonális elrendeződésű vastagfilamentumokat vékony radiális kötegek tartják össze (2. ábra).

A szívizom kontrakció magyarázatául évtizedek óta a klasszikus „sliding” hipotézis szolgált. Ennek lényege, hogy a kontrakció kapcsán a vékony filamentumok becsúsznak a vastag filamentumok közé, a szarkomer közepének (M-vonal) irányába és ezáltal az I-sáv szélessége csökken. A sliding hipotézisnek, mind biokémiai, mind ultrastrukturális bizonyítékai vannak és általánosan elfogadottá vált. A sliding során keresztvidak alakulnak ki az aktin és miozin fehérjék (vékony-, illetve vastag filamentum) között és a miozin fejének evezőszerű mozgásával a vékonyfilamentumok becsúsznak a vastag filamentumok közé (1. ábra). Az egész kontrakciós ciklus egyszerűsített sémáját a következőképpen képzelik (1,2): 1) a depolarizációs hullám eléri a munkaizomzatot; 2) megnyílik először a feszültségfüggő Ca^{2+} csatorna, majd a szarkoplazmatikus retikulum ryanodine csatornája és meredeken emelkedik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció; 3) a Ca^{2+} kapcsolódik a troponin C-hez (a miofibrilláris Ca^{2+} receptorhoz) és a vékonyfilamentum fehérjéinek konformációváltozása miatt lehetővé válik a keresztvidések kialakulása az aktin és a miozin között; 4) a miozin feje szorosan kapcsolódik egy aktin alegységhez (aktívált állapot); 5) létrejön az evezőszerű mozgás (erőátadás) a miozin fej részéről és az aktinszál kissé beljebb csúszik a vastagfilamentumok közé (munkavégzés); 6) ATP kötődik a miozin fejhez és a fej elválik az aktintól (relaxált állapot); 7) az ATP hidrolizál és a felszabadult energia mintegy „feltölti” a miozin fejet, amely így képes egy következő aktin alegységhez kötődni; 8) az egész ciklus (a 4-7 pontok) többször addig ismétlődik, amíg a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció alacsony szintre le nem csökken. Ekkor a troponin C-ről disszociálódik a Ca^{2+} és a vékonyfilamentumok struktúrája átrendeződik. Így minimálisra csökken annak a lehetősége, hogy keresztvid kapcsolat alakuljon ki a vékony és vastag filamentumok között. Ezzel kezdetét veszi a relaxáció.



1. ábra. A kardiomiociták felépítése és a szarkomer szerkezete.



2. ábra. A miofibrillumok keresztmetszeti képe. Jól látszik a kettős hexagonális elrendeződés. Mind a vékony, mind a vastag filamentumokat 6 ellentétes filamentum vesz körül. Az M vonal magasságában a vastag filamentumokat radiális kötegek fixálják. Jól értelmezhető a nyugalmi rosthosszúság növelésének hatása is, mivel ilyenkor csökken a harántátmérő és a vékony, illetve vastag filamentumok közelebb kerülnek egymáshoz (növekedhet a keresztkötések valószínűsége).

1.2. A szívizom kontraktilis fehérjének funkcionális struktúrája

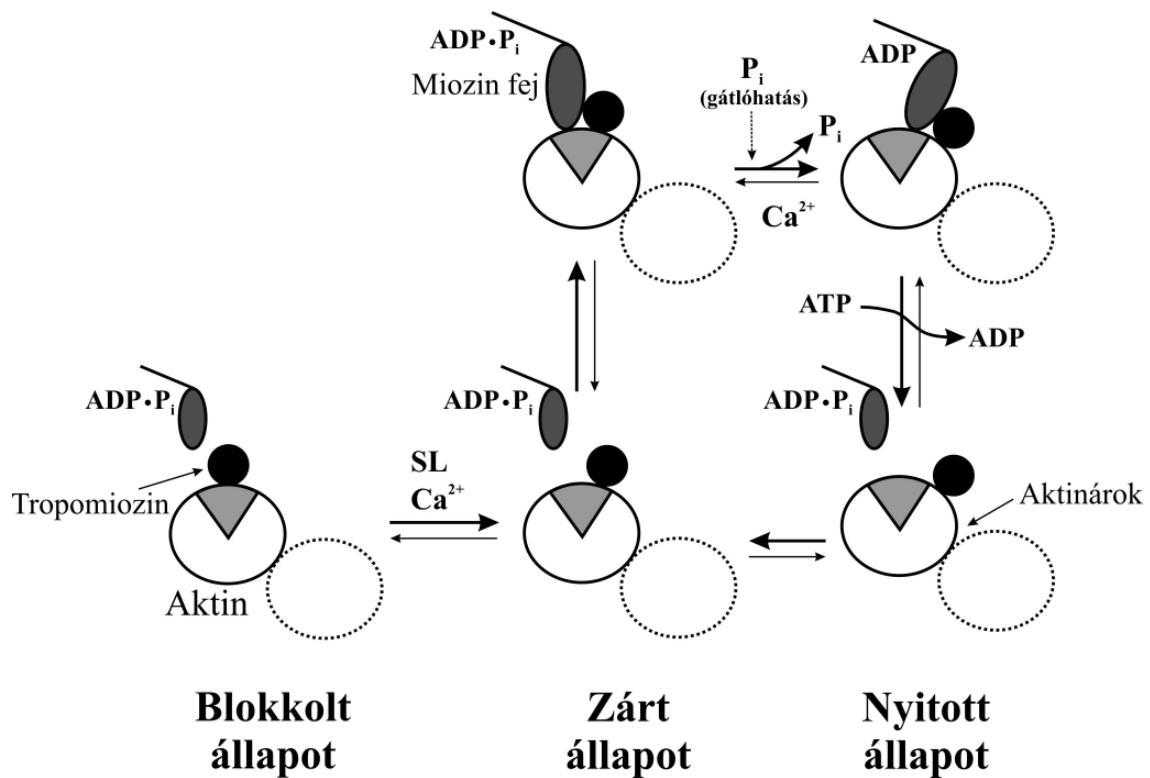
A miozin a vastag filamentumok fő miofibrilláris fehérje komponense. A miozin molekulát 2 nehéz lánc (MHC), 2 esszenciális könnyű lánc (LC_1) és 2 regulatorikus könnyű lánc (LC_2) építi fel. A miozin három régióra tagolható: fejrégió, nyakrégió és a fark. Két MHC alkot egy funkcionális egységet, ahol a farkrégió egy kettős spirálba csavarodik. A nyakrégiónál megszűnik a kettős spirál és szétválik a két MHC. A fejrégión található a két funkcionálisan lényeges kötőhely: a nukleotida (ATP) kötőhely és az aktin kötőhely. A miozinnak saját ATPáz aktivitása van, amelynek segítségével hasítja az ATP-t és hasznosítja a felszabadult energiát a „sliding” során. A könnyű láncok a nyakrégiónál kapcsolódnak az MHC-hez és pontos funkciójuk még csak részben tekinthető tisztázottnak.

Egy szarkomerén belül a vastag filamentumot kb. 300 individuális miozin molekula építi fel. A miozin molekulák fele az M-vonaltól a szarkomer egyik végének irányába, másik fele a szarkomer másik vége felé orientálódik. A vastag filamentum úgy épül fel, hogy a miozin farkrészek összeadódnak egy vastagabb fonallá és erről a központi fonalról emelkednek ki a miozin fejek, meghatározott távolságokban (1-2). A vastag filamentumot egy speciális elasztikus fehérje a titin rögzíti lazán a Z-lemezhez (3-4). A titin elsősorban a vastag filamentumok orientációját biztosítja a szarkomerén belül, másrészt, rugalmasan segíti a relaxáció kialakulását. A titin proteinek lényeges szerepet tulajdonítanak keresztmetszeti átmérő meghatározásában és így a Frank-Starling-mechanizmus szabályozásában is (5-6). A vastag filamentumok még egy miofibrilláris fehérjét a C proteint tartalmazzák. Ennek a fehérjének a szerepe csak részben tisztázott, valószínűleg támasztó funkciót (a miozin nyaki régiójánál segíti a fejmozgásokat) biztosít.

Az aktin egy globuláris fehérje, amely hosszú fibrilláris jellegű kettős spirállá polimerizálódik a vékony filamentumban. Ez a kettős spirál egy megcsavarodott gyöngy nyaklánchoz hasonlítható. A kettős spirálhoz további szálként két tropomiozin fonal csatlakozik (az „aktinárok” két oldalán) és így végeredményben egy komplex négyes spirál alakul ki. A tropomiozin egy hosszúka „pálca” alakú fehérje, amely vég- a véghez történő kapcsolódással egy fonallá áll össze. A tropomiozin fonalhoz kapcsolódik meghatározott távolságokban (400 Å) a troponin komplex. A troponinok regulatorikus jellegű miofibrilláris fehérjék, amelyek közül a troponin C a Ca^{2+} receptor, a troponin I egy gátló jellegű alegység (az aktinhoz

kapcsolódva gátolja az aktin-miozin interakciót), végül a troponin T a troponin-tropomiozin kapcsolatot biztosító alegység.

A kontrakció kapcsán a miofibrilláris történéseket egy dinamikus és ciklikus folyamatként lehet értelmezni (7). Ennek egyik megközelítése az ún. három-szintű modell (3. ábra). 1) Nyugalmi állapotban (alacsony Ca^{2+} koncentráció mellett) a tropomiozin bakkolja az aktin felszínén a keresztkötésekhez szükséges „aktív” felületet (blokkolt állapot – 3. ábra). 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 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 (3. ábra), 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 (3. ábra), 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. 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.



3. ábra. A kontrakció kialakulásának három-szintű 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 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 tropomiozin 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.

A β -adrenerg stimulálás hatására egy fehérje foszforilációs kaszkád zajlik le a szívdobozban (8). 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 luzitrop 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 (9-11). A C protein foszforilációjának kontrakcióra gyakorolt hatása intenzív kutatás tárgyát képezi, ennek ellenére jelenleg csak szerény és bizonytalan eredmények ismeretesek.

1.3. A nyugalmi rosthosszúság és a kontrakciós erő

Frank és Starling munkássága óta ismert a nyugalmi rosthosszúság (végdiasztolés volumen) és a megfelelő szívüregben kialakult nyomás közötti összefüggés. A hossz-feszülés diagram csúcspontja mind vázizom, mind a szívizom esetében olyan nyugalmi izomhosszúságnál van, ahol a szarkomerek hossza 2,3 μm körüli. Eddig a hosszúságig tart a Frank-Starling-görbe felszálló szakasza, majd egy mérsékelt csökkenő leszálló szakasz következik. Az optimális szarkomerhossz (2,3 μm) mellett maximális a miozin és aktin között kialakult keresztidák 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 μm) a vékonyfilamentumok átcsúsznak a szarkomer 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 csúcán működik. A szívizom masszív kötőszöveti rendszere (kollagén, titin, stb.) megakadályozza a miofilamentumok túlzott megnyúlását.

A nyugalmi szarkomerhossz és a kontrakciós erő közötti összefüggés magyarázatául régebben sokáig az optimális aktin-miozin közötti átfedést (optimális lehetőség a keresztidák kialakítására) tartották. A mai tudásunk szerint a szarkomerhossz nyújtására ébredő erőtöbblet csak kis mértékben vezethető vissza erre a mechanisztikus modellre. Jelentősebbnek tűnik az, hogy a nyújtás hatására egyrészt fokozódik a troponin C Ca^{2+} -érzékenysége másrészt hatékonyabbá válik a

miofilamentumok közti kooperatív interakció hatékonysága. Következésképpen az optimális szarkomerhossz eléréséig fokozódik a troponin C Ca^{2+} -telítettsége és a kontrakciós erő. A szarkomer belüli hosszfüggést biztosító fehérjerendszer működése azonban ma még nem kellően ismert. Valószínű, hogy annak működésében kitüntetett szerepet kap a vastag filamentumokat a szarkomer központi helyére rögzítő titin fehérje, és a vastag és vékony filamentumok közti oldalirányú tér („lattice spacing”) nyújtás hatására bekövetkező csökkenése. Eldöntetlen az is, hogy az aktin-miozin kereszthidak számának és/vagy az aktin-miozin ciklus egyes átmeneteinek kinetikai változásai adnak-e jobb magyarázatot a szarkomer nyújtásra észlelt fokozott izomerőre. Továbbá az sem ismert, hogy az eltérő expressziós fehérjemintázatokat tükröző szívizomzatokban, melyek létrejöhetnek a humán krónikus szívelégtelenség progressziója kapcsán, de különböző emlős speciosekben egészséges állapotban is megfigyelhető, hogyan érvényesül a Ca^{2+} -aktivált erő Ca^{2+} -érzékenységének szarkomerhosszfüggése.

Dacára a korábbi erőfeszítéseknek a Frank-Starling-mechanizmus molekuláris szintű megértéséhez tehát még további részletes vizsgálatok szükségesek.

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

A szívelégtelenség kapcsán kialakuló kóros pumpafunkció és makroszkópikus szívátépülés háttérében kiterjedt celluláris és molekuláris változások húzódnak meg. A jelenségek okainak és következményeinek megfelelő értelmezését nagymértékben hátráltatja az, hogy a szívelégtelenség számos jelentősen különböző etiológiájú kórfolyamat végeredménye, melyben a kóreredet okozta elsődleges elváltozások és a kialakult szívelégtelenség, mint „végső közös út” kapcsán megjelenő eltérések igen változékony celluláris megjelenést eredményeznek. A napjainkban kiterjedten alkalmazott állatkísérletes megközelítésekre sajnos ugyanezek a megfontolások érvényesek. Az állatkísérletes adatok humán szívelégtelenségre való közvetlen vonatkoztatását a faji különbségekből származó eltérések is nehezítik.

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 (12).

A krónikus túlterhelés okozta kardialis dekompenzáció és pumpafunkció károsodás kapcsán több patológiás eltérést írtak le a β -adrenerg rendszer (β -adrenerg receptor, G-proteinek, adenil cikláz enzim) működésében (13). 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 szérum katekolamin szint miatt bekövetkező deszenzibilizálódás (downreguláció) 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 izoenzim típus helyett fokozódik a lassú (β) MHC expressziója (14). 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 főtális troponin T és a pitvari miozin könnyű lánc bal kamrai izomzatban történő expressziója is hozzájárulhat a fentebb leírt eltérésekhez (15-17). Ugyanakkor a krónikus szívelégtelenség során kialakuló miofibrilláris fehérje eltérések csak részben tekinthetők tisztázottnak.

A krónikus szívelégtelenség kialakulása során alapvető változások következnek be a kardiomiociták intracelluláris Ca^{2+} anyagcseréjében. Szinte valamennyi kísérletes állatmodellben leírták az I_{TO} kálium csatornák (tranzien kifelé irányuló K^+ áram) csökkent előfordulását (18). Következésképpen az akciós potenciálok időtartama szívelégtelenségben jelentősen fokozódik. Az akciós potenciálok megnyúlása miatt nő az extracelluláris Ca^{2+} belépés és fokozódik az izomerő, az O_2 igény és az aritmia hajlam. A tartósan fennálló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés növekedési faktorként is hat, ami szerepet kaphat további gén-expressziós változások indukálásában. Érdekes, hogy az előrehaladott szívelégtelenségben a megnövekedett Ca^{2+} beáramlás ellenére a Ca^{2+} tranzien amplitúdója csökken és a tranzien leszálló szárának megnyúlását írták le. Ezeket az eltéréseket a szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+} -ATPáz (SERCA2) pumpának a lelassult működésével magyarázzák, ami az enzim fehérjeszintjének és/vagy funkciójának csökkenésével lehet összefüggésben (8). Humán szívizomból származó mintákban pozitív korrelációt találtak a SERCA2 fehérje mennyisége és bal kamra kontraktilitását jellemző funkcionális paraméterek között. Feltételezik, hogy az SERCA2 csökkent működése miatt diasztolében növekszik az intracelluláris Ca^{2+} szint, ami inkomplett relaxációhoz, majd súlyos kontraktilitászavarhoz vezet. A Ca^{2+} anyagcsere szabályozásának felborulása (a diasztolés citoplazmatikus Ca^{2+} szint növekedése) kompenzatorikus változásokat hoz létre az egyéb membránpumpák és receptorok működésében. Ezen kompenzatorikus változások közül talán a legfontosabb a Na^+ , Ca^{2+} ioncserélő fehérje mennyiségének (és aktivitásának) növekedése (19). Szívelégtelenségben a Ca^{2+} pumpa mellett többen vizsgálták a SERCA2 funkcióját szabályozó fehérjének, a foszfolambannak a miokardiális szintjét és bazális foszforiláltságát. A vizsgálati eredmények alapján a krónikus túlterhelés hatására mérsékelten csökken a foszfolamban szöveti szintje, ami valószínűleg szintén kompenzatorikus jelenségként fogható fel (20).

A krónikus szívelégtelenségben tehát komplex mechanikai funkciózavar, miofibrilláris fehérje eltérések, receptor szignalizációs változások és Ca^{2+} anyagcserezavar alakul ki.

2. Célkitűzések

1. A Frank-Starling-mechanizmus magyarázatára született elképzelések (csökkenő harántátmérő, Ca^{2+} -érzékenyítés – lásd a bevezetést) bár plasztikusnak tűnnek és több szempontból jól értelmezhetőek, a molekuláris összefüggések vonatkozásában hiányosak és nem adnak magyarázatot több problémára. Részletesen nem vizsgálták a szarkomerhossz Ca^{2+} -érzékenységet szabályozó hatását: 1) összehasonlító jelleggel eltérő miofibrilláris felépítésű (eltérő MHC összetételű) emlős szíveken (kis- vs. nagytestű emlősök), 2) változó ionkörnyezetben (pl. hipoxia kapcsán növekvő foszfát koncentráció mellett), 3) különböző hőmérsékleteken, 4) patológiás 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 jellemezhető transzgenikus krónikus szívelégtelenség állatmodell ($\text{Tg}\alpha\text{q}^{*44}$) segítségével a betegség progressziójának függvényében megvizsgáljuk és kövessük: 1) a kardiomiociták mechanikai tulajdonságait (izometriás erő és annak Ca^{2+} -érzékenysége, 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 változását.

3. Metodika és felhasznált anyagok

3.1. Kísérleti állatok, szövetminták

Vizsgálatainkhoz felnőtt humán, egér és sertés bal kamrai szívizommintákat 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). A donorok nem mutattak semmiféle kardiális abnormalitást és, nem részesültek semmiféle gyógyszeres kezelésben (rövidtávú adreanalint, dobutamint és furosemidet kivéve). A halál oka cerebrális kontúzió és vérzés valamint szubarachnoideális vérzés volt, baleset illetve stroke következtében.

Humán kísérleteink eleget tettek a Helsinki Deklarációnak és kísérleteinkhez a Magyar Egészségügyi Minisztérium is hozzájárult (323-8/2005-1018EKU). Minden szövetmintát kardioplégias oldatban szállítottunk (pH 7,4; mM-ban kifejezve: NaCl 110, KCl 16, MgCl₂ 1,6, CaCl₂ 1,2 és NaHCO₃ 5) és $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk ~6-8 órán keresztül, mielőtt folyékony nitrogénben lefagyasztásra és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on raktározásra kerültek.

A fiatal sertéseket Olaszországban tenyésztették. Vizsgálataink során az állatokat isoflurane anesztéziát követően áldozták fel telített KCl oldat i.v. injektálásával. A mellüreget ezután gyorsan felnyitották, ahonnan traszmurális bal kamrai mintákat vettek, melyeket ezután azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztották. A sertések kísérletes felhasználása az olasz törvényeknek megfelelően (DL-116, Jan. 27, 1992) és az Olasz Egészségügyi Minisztérium engedélyével történt.

Az aktivált Gαq proteint túlsúlyban expresszáló (overexpression) dilatatív kardiomiopátiás (DCM) transzgenikus egértörzs (Tgαq*44) kialakítását korábban részletesen leírták (21). Szaporodóképes homozigóta Tgαq*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. Az egereket 12 órás világos - 12 órás sötét ciklusban működő, légkondicionált ($22,5\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\pm 5\%$ páratartalom) termekben tartották, ahol az állatok korlátlan mennyiségben hozzáfértek mind a táphoz, mind a vízhez.

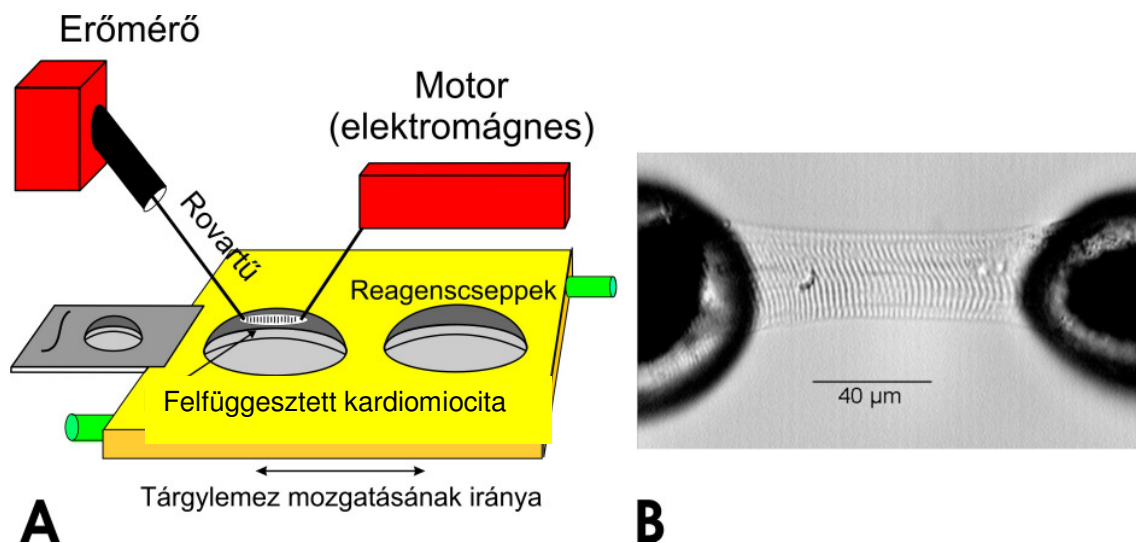
Kísérleteinkben a homozigóta Tgαq*44 és FVB egereket (mint vad típusú kontroll állatot) használtunk. A nőstény Tgαq*44 egereket és az azonos korú FVB állatokat (4, 10, 14 és 18 hónap) 1000 IU fraxiparin alkalmazását követően, thiopentál anesztéziában (100 mg/kg i.p.), nyaki diszlokációval áldoztuk fel. Az állatok szívét gyorsan kimetszettük és hideg, 4 °C-os fiziológiás sóoldatban átmostuk. Ezt követően néhány szívet kiszárítottunk és megmértük a száraz szöveti súlyokat. A pitvarok és a jobb kamra eltávolítása után a bal kamrát is lemértük, majd folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk. Az egér balkamrai mintákat -80 °C-on tároltuk, majd ezeket a szöveteket használtuk szívizomsejt (kardiomiocita) preparátumok elkészítésére és különböző biokémiai mérésekhez. A jobb tüdő alsó lebenyének tömegét is mértük, majd 48 órás szárítást követően megállapítottuk a nedves/száraz tömegarányt. A transzgénikus egerekkel kapcsolatos vizsgálatok a Jagelló 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

Minden felhasznált kísérleti vegyszer a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől származott, hacsak nem jeleztük másképp (lásd lejjebb). A kardiomiocita preparátum izolációját és elkészítését korábban részletesen leírtuk (22). Az erőmérés során felhasznált relaxáló és aktiváló oldatok összetétele már szintén leírásra került (22). 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, foszfokreatin 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 pH 7,2 beállítását KOH alkalmazásával végeztük. A relaxáló oldat összetétele annyiban különbözött az aktiváló oldat összetételétől, hogy Ca-EGTA helyett 7mM EGTA került az oldatba. Mindkét oldatot kiegészítettük proteáz inhibitorokkal 40 μM leupeptin (Sigma, St. Louis, MO, USA) és 10 μM E-64 (Sigma, St. Louis, MO, USA). A magas foszfát

koncentráció (10 mM) jelenlétében történt vizsgálataink kapcsán az aktiváló és relaxáló oldatok 10 mM-os végkoncentrációban KH_2PO_4 -t tartalmaztak.

Protokoljaink egy részében megvizsgáltuk a proteinkináz A (PKA) katalitikus alegységének (Sigma, St. Louis, MO, USA) hatását kísérleti preparátumainkra. A PKA oldását a következő módon végeztük: 1 mg liofilizált PKA-hoz 60 μl 100 mM-os DTT-t (dithiotreitol) adtunk, majd a keveréket 1 ml-re hígítottuk Ca^{2+} -mentes relaxáló oldattal (relatív foszforilációs kapacitás: ~ 10 unit/ μg). A feloldott PKA oldatot legfeljebb 5 napig 4°C-on tároltuk. Ezen kísérleteinkben különböző életkorú Tgαq*44 és FVB egerek kardiomiocitáit használtunk. Először a Ca^{2+} - erő összefüggést a PKA kezelés előtt határoztuk meg, majd a szívizomsejteket 2,3 μm -es szarkomerhosszon (SL) 40 percig 20 °C-on inkubáltuk PKA jelenlétében és végül az izometriás erő valamint az aktin-miozin ciklus sebességének Ca^{2+} -függését ismételten megmértük.



4. ábra. Kardiomiocita erőmérő rendszer (A). Két rovartű közé felragasztott, membránrendszerétől megfeszített szívizomsejt (B). Jól látható a kardiomiocita harántcsíkolata (nagyított felvétel).

A szívizomsejt preparátum erőmérési technikája részleteiben már leírásra került (23). Röviden, egy szívizomsejt nagyságú preparátumot inverz mikroszkóp alatt szilikon ragasztó segítségével (100% silicone, Dow Corning, Aquarium sealent, Midland USA), két vékony rozsdamentes acél rovartűhöz erősítettünk (4. ábra). Az egyik tűt egy nagy érzékenységű erőmérőhöz (Sensonor, Horten, Norvégia), a

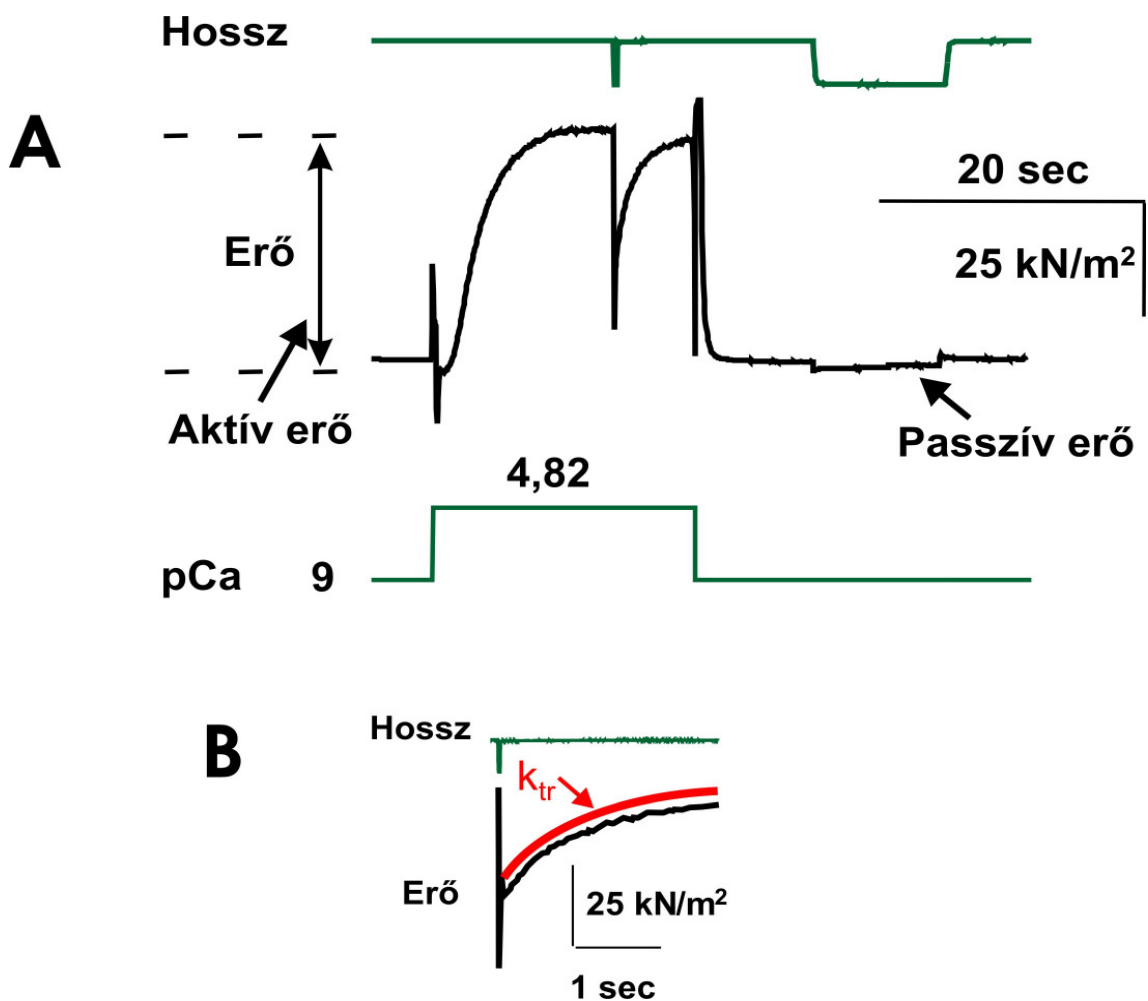
másik tűt pedig egy elektromágneses motorhoz (Aurora Scientific Inc., Aurora, Kanada) kapcsoltuk. Mindkét tűt „joystick”-el kezelhető irányító rendszerhez rögzítettük. A rögzített sejtpreparátum egy nagyobb szegmensének optikai elemzése révén állítottuk be a szarkomerhosszat (SL). Az elemzés során a kiválasztott sejtseggens harántcsíkolatán térbeli Fourier transzformációs analízist végeztünk (relaxáló oldatban). A preparátumok átmérőjét mikroszkópos technikával mértük, két egymásra merőleges irányból. A preparátum vastagságának megállapítása a mikroszkóp objektívjének elmozgatásával történt, a sejt felső és alsó határvonala között. A manővert követően megvizsgáltuk az objektív elmozdulás nagyságát és μm -ben fejeztük ki az elmozdulás mértékét, amit egyenlőnek tekintettünk a sejt vastagságával. A keresztmetszeti kép felszínének számítása során elliptikus keresztmetszetet feltételeztünk.

Az izometriás erőmérést többszörös aktivációs/relaxációs ciklusokban $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végeztük (5. ábra), először $1,9\ \mu\text{m}$, majd $2,3\ \mu\text{m}$ SL-on. Egyes kísérleti protokolljainkban $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra emeltük a kísérleti közeg hőmérsékletét. A kontrakciót és relaxációt a rögzített szívizomsejt relaxáló oldat cseppből, aktiváló oldat cseppbe történő egymást követő áthelyezésével váltottuk ki, a mikroszkóp tárgyasztal laterális mozgása révén. Mindkét csepp kísérleteinkben $50\ \mu\text{l}$ -es volumenű volt. Amikor a preparátum elérte a maximális összehúzóerőt, a szívizomsejt hosszát – az elektromágnesre illesztett tű segítségével – $1\ \text{msec}$ alatt 20% -al csökkentettük és $20\ \text{msec}$ múltán visszaállítottuk eredeti hosszára (ú.n. 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 újrendeződésével 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”). Körülbelül 6 másodperccel ezen manőver után, a sejtet visszahelyeztük a relaxáló oldatba, ahol a fent leírt release-restretch manőver egy hosszabb ($8\ \text{sec}$) változatát hajtottuk végre. Ezzel a technikával tudtuk megmérni és kiszámítani a sejt által kifejtett passzív erőt ($F_{\text{passzív}}$). Az aktív (Ca^{2+} -aktivált) izometriás erő az F_{total} és $F_{\text{passzív}}$ 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 (5. ábra):

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

ahol a $F(t)$ az erő, bármely t időpontban a release-retch manőver után, bármely Ca^{2+} koncentráción. Az F_i és F_a jellemzik a kezdeti erő értéket a release-retch manőver után, valamint a Ca^{2+} aktivált erő újraképződés amplitúdóját. A k_{tr} pontos meghatározásához minden esetben az erő újraképződés teljes időtartamát (F_i és F_{total} közötti idő) figyelembe vettük. Ugyanakkor alacsony Ca^{2+} koncentrációk esetén a k_{tr} pontos kiértékelését megakadályozta az alacsony jel/zaj arány.



5. ábra. Az erőmérés technikája (A). A mérés során rövid időn belül (néhány msec) módosítottuk a Ca^{2+} koncentrációt (pCa) vagy a preparátum hosszát (zöld színnel jelölve). Az aktív és passzív erő meghatározását lásd részleteiben a szövegben. A k_{tr} meghatározása – release-retch manőver (B). A hirtelen hosszváltozást (20%-os rövidülés, majd az eredeti hosszra történő visszaállítás) követően regisztráltuk az erő újraképződését, amire exponenciális függvényt illesztettünk (piros színnel jelölve). A k_{tr} az erő újraképződés sebességi állandója (lásd az [1] egyenletet a szövegben).

Az erő és hosszúsági adatokat egy analóg tintaíró készülékkel regisztráltuk, és analog-digiális konverziót követően személyi számítógépen tároltuk. 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 ún. „rundown”-jának, azaz mérés közbeni „elhasználódásának” meghatározását. Ezekhez a mérésekhez a maximális Ca^{2+} aktivált erőt hasonlítottuk össze (F_0). 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. A különböző SL (1,9, illetve 2,3 μm) alkalmazása nem befolyásolta az egyes preparátumok run-down értékét. Ellenőriztük, azt is, hogy a run-down hatással van-e a mért k_{tr} értékekre. Kísérleteink kapcsán - a maximális erő méréséhez hasonlóan - elvetettük azon k_{tr} meghatározásokat, ahol az utolsó kontroll aktiváció során a preparátum nem produkálta az első mérés legalább 80%-át.

3.3. Endogén PKA aktivitás mérése

A különböző életkorú egerek fagyasztott balkamrai mintáit használtuk a meghatározáshoz (csoportonként 3-7 állat). 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 jégen történő rázás (5 perc), majd centrifugálás segítségével történt (300 g, 1 min, felülúszó: membrán fehérjék, pellet: kontraktilis fehérjéket tartalmazó permeábilis kardiomiociták). Az elkészült preparátumok minőségét fénymikroszkóp alatt kontrolláltuk. Ezt követően a szétválasztott frakciók fehérje koncentrációját BSA módszerrel határoztuk meg (Sigma, St. Louis, MO, USA). A szétválasztott citoszól, membrán és kontraktilis fehérje frakciók koncentrációját módosított izolációs pufferrel 3,0 mg/ml, 0,3 mg/ml és 0,5 mg/ml-re hígítottuk. Az endogén PKA mérés szobahőmérsékleten történt, γ - ^{32}P jelölt ATP

segítségével (specifikus aktivitás: 750 cpm/pmol). Szubsztrátként 1 µl kemptidet (1 mg/ml, GenScript, Piscataway, NJ, USA) használtunk. A reakció elindítását követően a 0. és 17. percben 10 µl keveréket cseppentettünk foszfocellulóz papírra (GE Healthcare, München, Németország). A papírokat 30 percig szárítottuk, majd 0,5%-os foszforsavval (Sigma, St. Louis, MO, USA) háromszor átmostuk. Ezt követően még egy végső acetonos mosást is végeztünk. A foszfocellulóz papíron maradó radioaktivitás mérésére liquid szcintillációs számlálót használtunk (TriCarb szcintillációs számláló, PerkinElmer Life Science, USA). A különböző sejtfrakciók közül csak a citoszólban találtunk endogén PKA aktivitást. Megkíséreltük a PKC/Cam Kináz II aktivitásának mérését is specifikus Syntide-2 szubsztráttal (Sigma, St. Louis, MO, USA), de nem találtunk értékelhető foszforilációt.

3.4. Troponin I utófoszforiláció

A permeabilizált szívizomsejtek troponin I bazális foszforilációs szintjének meghatározására utófoszforilációs vizsgálatokat végeztünk. A miofibrilláris fehérjét 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 -³²P 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 (Sigma, St. Louis, MO, USA) állítottuk le, majd a mintákat 5 percig forraltuk. Ezt követően a forralt mintát (30 µl) 10%-os poliakrilamid gélen elektroforézis segítségével szétválasztottuk, a szeparált fehérjét nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Az autoradiográfiához kék érzékeny filmet (Primax, Berlin, Németország) használtunk. Az autoradiográfiás felvételeket denzitometriával elemeztük és a kiértékelést (foszfát beépülést), Image J programmal (freeware www.nih.gov) végeztük. Az optikai denzitást önkényes egységekben (arbitrary unit) fejeztük ki.

3.5. MHC izoformák szétválasztása

Az MHC izoformák (α és β) szétválasztása elektroforézis segítségével (Bio-Rad készülék) történt (gél nagysága 26x21 cm, 1,5 mm vastagság). A jó szétválasztás érdekében az elektroforézishez egyénileg összeállított gélkeveréket használtunk: 8% akrilamid-bis-acrilamid (27,5:1), 380 mM Tris-HCl, 0,1% sodium dodecilszulfát (SDS), 5 mM TEMED, 2mM AMPER. A futtató pufferelegy összetétele: 25 mM Tris-HCl, 200 mM glicin, 0,7% SDS, 11,5 mM β -merkaptoetanol volt. A fehérjesávok festése Coomassie festékkel történt (0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250, 10% metanol, 50% acetát). Minden vegyszert a Sigma szállított (St. Louis, MO, USA). A géleket az Image J programmal értékeltük.

3.6. Statisztika, adatelemzés

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

$$[2] \quad F = F_0 [Ca^{2+}]^{n_{Hill}} / (Ca_{50}^{n_{Hill}} + [Ca^{2+}]^{n_{Hill}}),$$

Ahol az F a steady-state erő adott Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]$) mellett, az F_0 , a maximális Ca^{2+} -aktivált erő telítő $[Ca^{2+}]$ 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 \pm SEM (átlag \pm mintaközép hibája) értékekben fejeztük ki. A szignifikancia határát $P < 0,05$ -ben határoztuk meg.

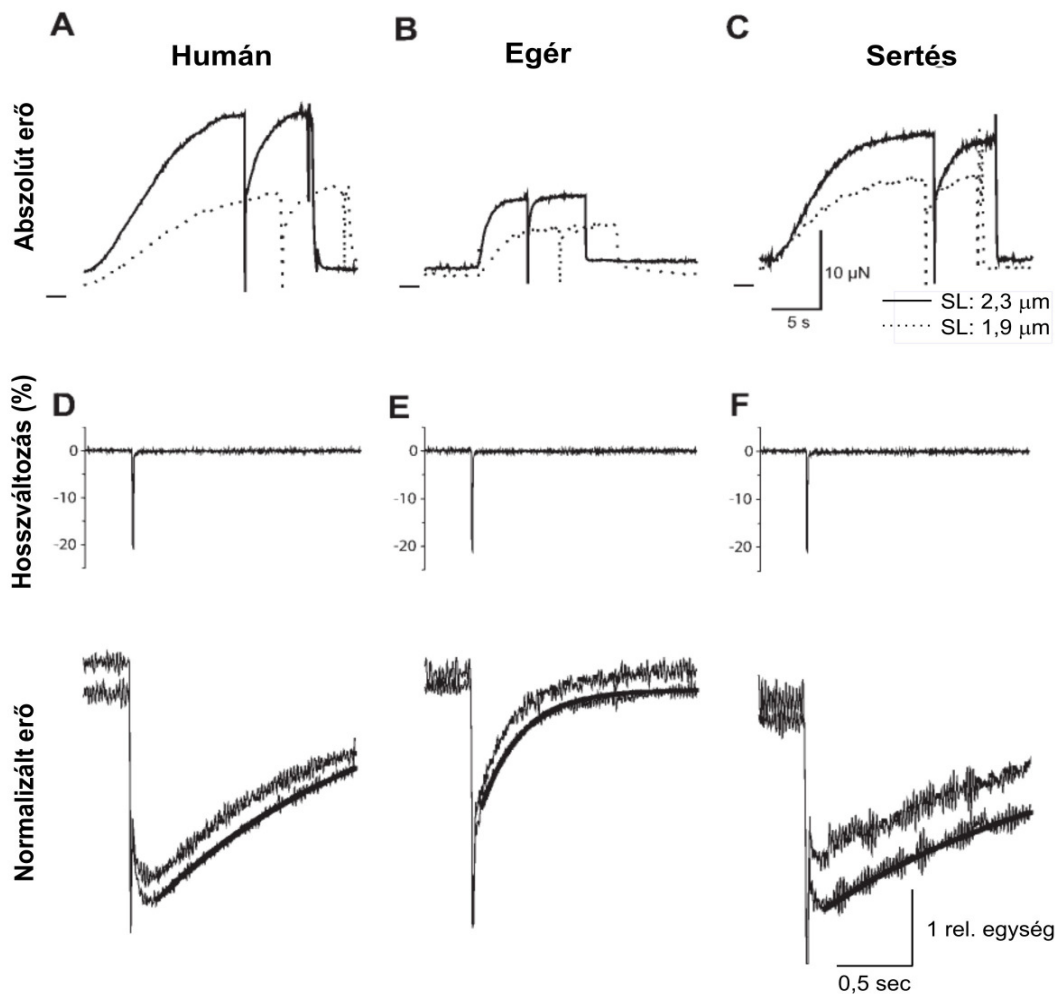
4. Eredmények

4.1. A szarkomerhossz változtatásának hatása a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységére és az aktin-miozin ciklus sebességére különböző speciosekben

A Frank-Starling-mechanizmus magyarázata, amint azt a bevezetésben részleteztük, csak részben tekinthető tisztázottnak. Ezért célkitűzéseink között szerepelt ennek a mechanizmusnak részletes tanulmányozása, permeabilis kardiomiocita preparátumokon. A membránrendszerétől és citoplazmatikus fehérjéitől megfosztott kardiomiocita egy olyan egyszerű rendszernek tekinthető, amelynek segítségével mindenfajta strukturális zavaró tényező (kötőszöveti sejtek, elemek, membránszabályozás stb.) nélkül tanulmányozható a miofibrillumok kontraktilis funkciója. A metodikai fejezetben részletezett kardiomiocita „set-up” berendezésünkkel különböző emlősökben nagy pontossággal és komplex módon vizsgálni tudtuk a kontraktilis funkciót (aktív izometriás erő, passzív erő, az erő újraképződés sebessége stb.), mind normál állapotban, mind patológiás körülmények között. Ezen kísérleteinkhez humán, sertés és egér kardiomiocitákat használtunk, mivel jól ismert a kis testtömegű emlősök (egér) szívének, illetve a nagy tömegű emlősök (ember, sertés) miokardiumának eltérő miofibrilláris fehérje összetétele (lásd bevezetést) és funkciója.

A 6. ábrán a humán, egér és sertés permeabilizált szívizomsejtekre jellemző relaxációs/kontrakciós ciklusokat mutatjuk be, amely jelen esetben a kb. fél-maximális (50%-os) összehúzódást kiváltó $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál keletkezett, rövid 1,9 μm -es és hosszú 2,3 μm -es SL esetén (pCa 6,0 humán és sertés minták esetén és pCa 6,2 egér mintáknál). A 6. ábra A-C része az SL növekedés hatására (1,9 μm -ről 2,3 μm -re) létrejövő erőnövekedést mutatja, ami humán mintákban 57%, egerekben 59% sertésekben pedig 48% volt (Ca^{2+} -érzékenyítés). Ezek az erőnövekedések magyarázzák a Frank-Starling-mechanizmust. Ugyanezen ábra D-F része a sejt relatív hosszát és a megfelelő időpontban létrehozott sejtrövidítési manővert, az ú.n. „release-restretch manőver”, valamint az erő újraképződést szemlélteti mindhárom emlősfaj esetében. A release-restretch manővert követő erő újraképződés regisztrátuma mindhárom faj esetén ugyanannyi ideig tart, hogy könnyebben szemléltethessük az erő újraképződés sebességében (aktin-miozin ciklus kinetikájában) észlelt különbségeket. Eredményeink azt mutatják, hogy bár az

egérnél látható erő újraképződés kinetikája jelentősen meghaladja a humán vagy a sertés minták hasonló paraméterét, az SL változtatása (1,9 μm és 2,3 μm) egyik emlősfajban sem okozott különbséget az erő újraképződés (aktin-miozin ciklus) sebességében. Az 1. táblázat az átlag értékeket tartalmazza a három emlősfaj Ca^{2+} aktivált, aktív erőre és a Ca^{2+} független passzív erőre vonatkozóan, rövid és hosszú SL-nél (1,9 μm és 2,3 μm). Az egérnél 2,3 μm -es SL-nél mért passzív Ca^{2+} -független erő szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a humán vagy sertés minták esetén, ahogyan ezt már korábban megfigyelték (24).

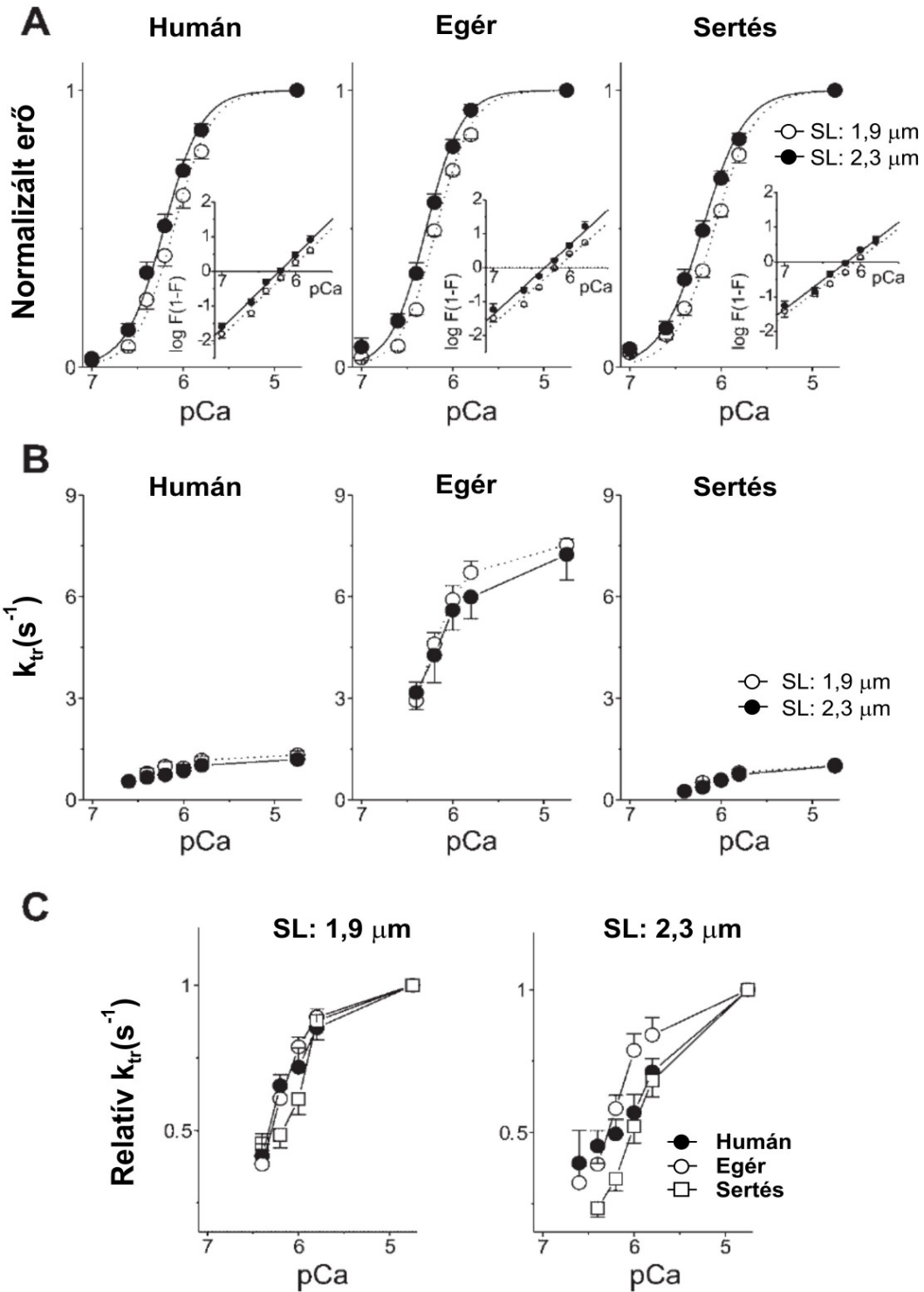


6. ábra. Izometriás összehúzódás során fellépő erőviszonyok permeabilizált humán (A és D), egér (B és E) valamint sertés (C és F) szívizomsejtekben 1,9 μm és 2,3 μm szarkomerhosszak (SL) esetén. Az alkalmazott Ca^{2+} mennyisége [Ca^{2+}] a maximális erő feléhez tartozó koncentráció volt (1,9 μm SL, $p\text{Ca}$ 6,0 az A és C ábrákon és 6,2 a B ábrán). Az A-C ábrán a lassú mintavételezés során felvett SL függő Ca^{2+} kontratúra látható, mind 1,9 mind 2,3 μm SL esetében. A D-F ábrák bemutatják a gyors mintavételezés kapcsán létrejövő erő újraképződést a 80%-ra rövidített, majd visszaállított manőver kapcsán (release-retch manőver - a k_{tr} kiszámításához). A D-F ábrákon minden esetben a felső görbe az 1,9 az alsó pedig a 2,3 μm -os szarkomerhossz mellett mért erő újraképződésnek felel meg. Az A-C ábrán látható rövid vízszintes vonal jelzi a nulla erőt.

1. Táblázat. A pCa-erő és a pCa- k_{tr} összefüggések paraméterei humán, egér és sertés kardiomiocitákban (foszfát [Pi] hiányában és jelenlétében)

	Humán		Egér		Sertés	
0 mM Pi						
F_o , (kN/m ²)	1,9 μ m 28,6 \pm 3,3	2,3 μ m 49,5 \pm 3,7	1,9 μ m 27,2 \pm 3,9	2,3 μ m 56,6 \pm 3,9	1,9 μ m 30,3 \pm 3,0	2,3 μ m 51,8 \pm 6,9
$F_{passzív}$, (kN/m ²)	2,5 \pm 0,4	5,7 \pm 0,7	3,8 \pm 0,8	10,5 \pm 0,6*	3,8 \pm 0,6	6,9 \pm 0,7
pCa ₅₀	6,10 \pm 0,04	6,21 \pm 0,03	6,18 \pm 0,01	6,29 \pm 0,03	6,07 \pm 0,02	6,21 \pm 0,03
Δ pCa ₅₀	0,11 \pm 0,01		0,11 \pm 0,01		0,14 \pm 0,01	
nHill	2,11 \pm 0,09	2,08 \pm 0,12	2,20 \pm 0,11	2,23 \pm 0,11	1,96 \pm 0,12	2,08 \pm 0,12
$k_{tr,max}$ (s ⁻¹)	1,33 \pm 0,11	1,19 \pm 0,07	7,44 \pm 0,15*	6,95 \pm 0,31*	1,02 \pm 0,05	0,99 \pm 0,08
10 mM Pi						
pCa ₅₀	6,07 \pm 0,02	6,16 \pm 0,02†	6,02 \pm 0,01†	6,12 \pm 0,02†	5,91 \pm 0,01†	6,02 \pm 0,02†
Δ pCa ₅₀	0,09 \pm 0,01		0,1 \pm 0,01		0,11 \pm 0,01	
nHill	2,33 \pm 0,12	2,37 \pm 0,13	2,28 \pm 0,11	2,68 \pm 0,14	2,34 \pm 0,17	2,41 \pm 0,19
$k_{tr,max}$ (s ⁻¹)	2,08 \pm 0,09†	1,89 \pm 0,11†	22,81 \pm 0,76*†	20,40 \pm 0,53*†	1,92 \pm 0,15†	1,60 \pm 0,09†

Átlag \pm SEM, $n \geq 6$ valamennyi csoportban. A nyugalmi rosthosszúságot (SL) 1,9 μ m és 2,3 μ m-ra állítottuk. F_o =maximális Ca^{2+} aktivált erő, $F_{passzív}$ =passzív erő, nHill=Hill koefficiens, $k_{tr,max}$ =az erő újraképződés maximális sebessége. * $P < 0,05$ a humán vagy sertés szívizomsejtekkel szemben; † $P < 0,05$ a Pi hiányában mért értékhez képest (ugyanazon species és SL).



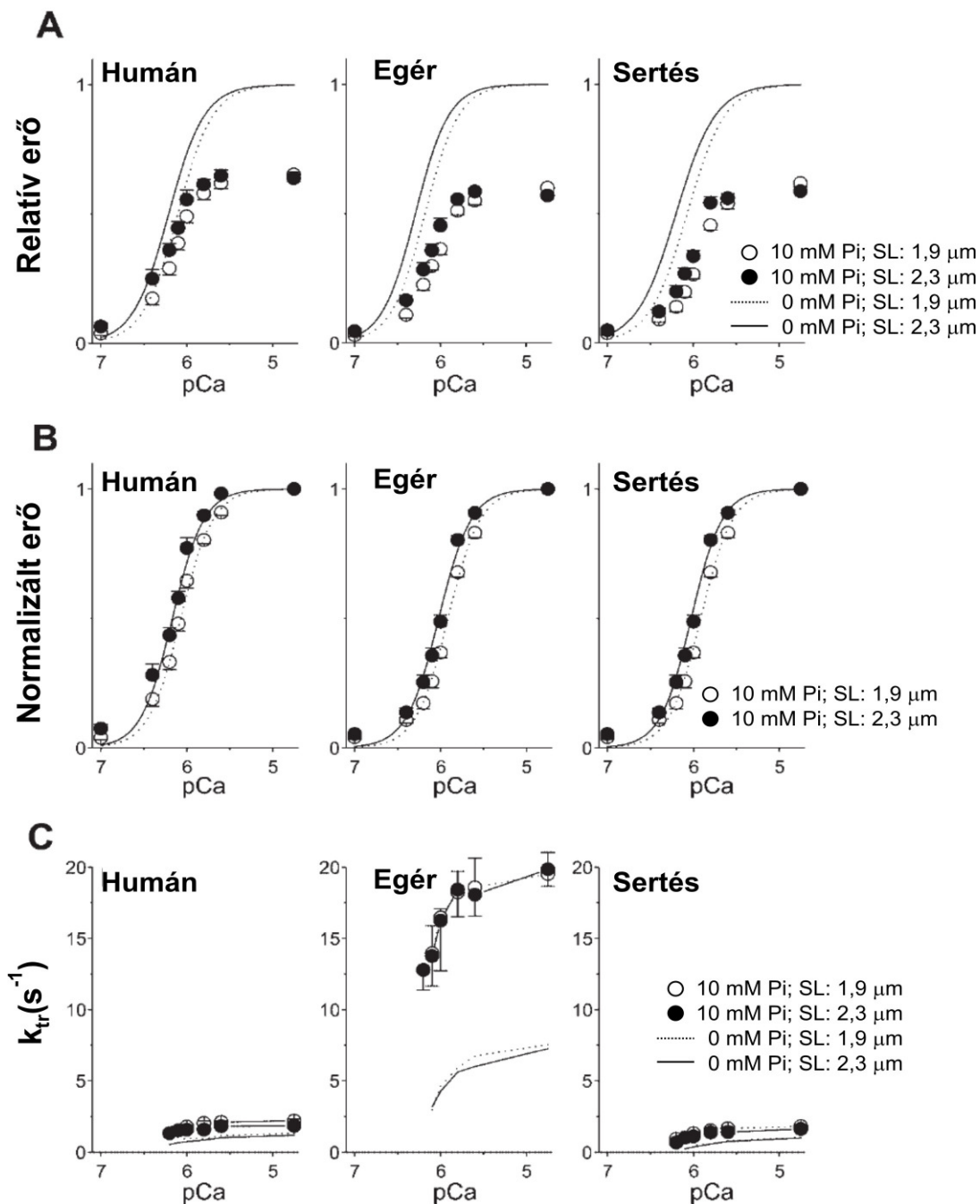
7. ábra. pCa -erő (A) és pCa - k_{tr} (B és C) összefüggések humán, egér és sertés kardiomiocitákban, 1,9 és 2,3 μm -es SL esetén. Az A panelen a szubmaximális erő értékeket normalizáltuk a maximális erőértékekre, hogy bemutassuk a hasonlóságokat az SL-függő Ca^{2+} -érzékenységben. A betétek ugyanezt a viszonyt mutatják az erőértékek linearizálását követően. A B panelen a k_{tr} értékek abszolút számokban láthatók a faj, illetve az SL függés bemutatására. Az ábra C részén a relatív (fajonként saját maximumukra normalizálva) k_{tr} Ca^{2+} függése látható. Az SL változtatása nem befolyásolta a k_{tr} értékeket egyik faj esetében sem. Mintaszámok: humán $n=16$ sejt, egér $n=8$ sejt és sertés $n=6$ sejt.

A Ca^{2+} -érzékenység SL-függő növekedésének vizsgálatára a három vizsgált faj normalizált pCa-erő görbéit azonos kísérleti körülmények között vizsgáltuk (7A. ábra). A 7. ábra jól illusztrálja a preparátumok Ca^{2+} -erő összefüggését, valamint jól észlelhető az SL hossz növekedés hatására létrejövő pCa₅₀ érték balra tolódása (Ca^{2+} -érzékenyítés), amely mindhárom vizsgált fajnál meglepő egyenlőséget mutat (~0,11 pCa érték). Nem találtunk szignifikáns statisztikai különbséget a három emlős faj n_H értékei között sem (1. táblázat). Kiszámítottuk az n_H értékét az erő értékek linearizálása után, de így sem találtunk különbséget a vizsgált fajok között (7A. ábra, ábrabetétek). 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 (7B. ábra). Más szavakkal fogalmazva: az SL változtatása nem befolyásolta az erő újraképződés (aktin-miozin ciklus) kinetikáját. A k_{tr} paraméter Ca^{2+} -függő változásainak részletes vizsgálatára minden faj esetében normalizáltuk a k_{tr} értékeket (a fajra jellemző maximumra) (7C. ábra). Ez a fajta adatelemzés azt mutatja, hogy a k_{tr} Ca^{2+} függése mindhárom fajban nagyon hasonló.

Annak vizsgálatára, hogy a lefagyasztás-felengedés ciklus mennyiben befolyásolta a preparátumaink mechanikai integritását és ezzel eredményeinket, nyolc frissen izolált egér preparátumot (3 egérszívből) hasonlítottuk össze fagyasztott mintákkal. Ezen kiegészítő kísérleteinkben mért aktív és passzív erők a következők voltak: 1,9 μm SL esetén $28,5 \pm 2,3$ és $3,0 \pm 0,3$ kN/m^2 ; 2,3 μm SL esetén $59,6 \pm 5,9$ és $8,9 \pm 0,4$ kN/m^2 . Ezen sejtek $k_{tr,max}$ értékeit $8,50 \pm 0,45$, illetve $7,83 \pm 0,34$ s^{-1} -nek számítottuk 1,9 és 2,3 μm -es SL esetén. Ezen értékek egyike sem tért el szignifikánsan a fagyasztott minták hasonló paramétereitől. Továbbá sem a Hill egyenlet illesztése kapcsán, sem a submaximális Ca^{2+} értékeknél mért k_{tr} esetében nem találtunk szignifikáns különbségeket a fagyasztás után felengedett, illetve frissen izolált preparátumok között.

Az anorganikus foszfát (P_i) közismerten csökkenti a miofibrillumok által kifejtett maximális Ca^{2+} aktivált erőt, mivel az interferál az erőképző keresztkötések kialakulásával (3. ábra) (25-28). Többek között ezzel a tömeghatás elvén

magyarázott összefüggéssel is magyarázzák az akut iszkémiás miokardium kontraktilitáscsökkenését.



8. ábra. Relatív pCa-erő (A), normalizált pCa-erő (B) és pCa- k_{tr} összefüggések humán, egér és sertés miocitákban 1,9 és 2,3 μ m SL esetén, illetve 10 mM anorganikus foszfát (P_i) jelenlétében. A P_i hatására jól látható a maximális erőhatás (F_o) csökkenése mindhárom fajban (A). A submaximális erőket a saját maximumukkal normalizálva, megtartottak találtuk a pCa-erő görbét mindkét SL esetén a hozzáadott P_i ellenére (B). A k_{tr} értékeket abszolút számokban fejeztük ki az ábra C panelén, hogy bemutassuk a P_i k_{tr} értékeire gyakorolt gyorsító hatását. A pontokkal és egybefüggő vonallal jelölt görbék (A és C panel) az eredeti P_i hatás nélkül mért értékeket szemléltetik. Az SL változtatása P_i jelenlétében sem befolyásolta a k_{tr} értékeket egyik fajban sem. Mintaszámok: humán $n=8$ sejt, egér $n=12$ sejt és sertés $n=12$ sejt.

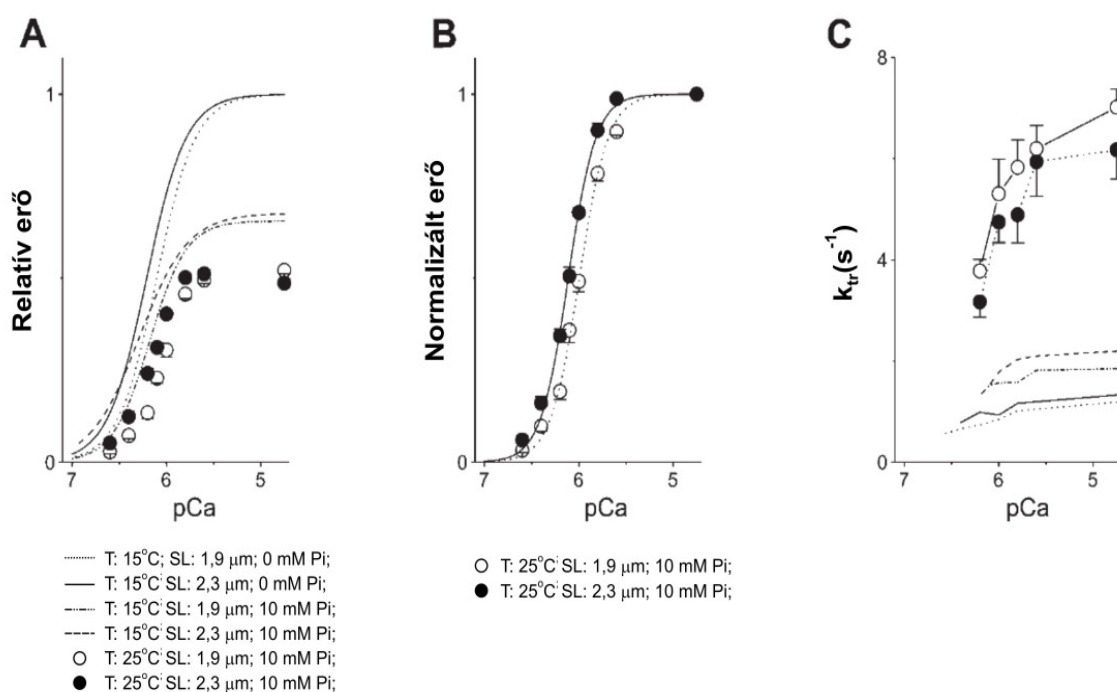
Mindezek miatt megvizsgáltuk, hogy kísérleti preparátumainkon a 10 mM P_i hogyan befolyásolja a Ca^{2+} aktivált erőt és a k_{tr} értéket. A 8/A ábrán látható, hogy a 10 mM P_i valamennyi Ca^{2+} koncentrációnál szignifikánsan csökkentette a kialakult izometriás erőt. A maximális Ca^{2+} aktivált erő (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 μ m-es SL). A P_i hatására hasonló mértékben csökkent a maximális Ca^{2+} aktivált erő (F_o) a magasabb nyugalmi rosthosszúság (2,3 μ m) 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 (8B. ábra). Az analízis azt mutatta, hogy a nyugalmi rosthosszúság növelése (1,9-ről 2,3 μ m-re) által kiváltott Ca^{2+} -érzékenyítést egyik fajban sem befolyásolta a P_i jelenléte (1. táblázat és 8B. ábra). 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 (lásd az 1. táblázatot). 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} -t, de ez a gyorsulás függetlennek bizonyult az SL értékétől.

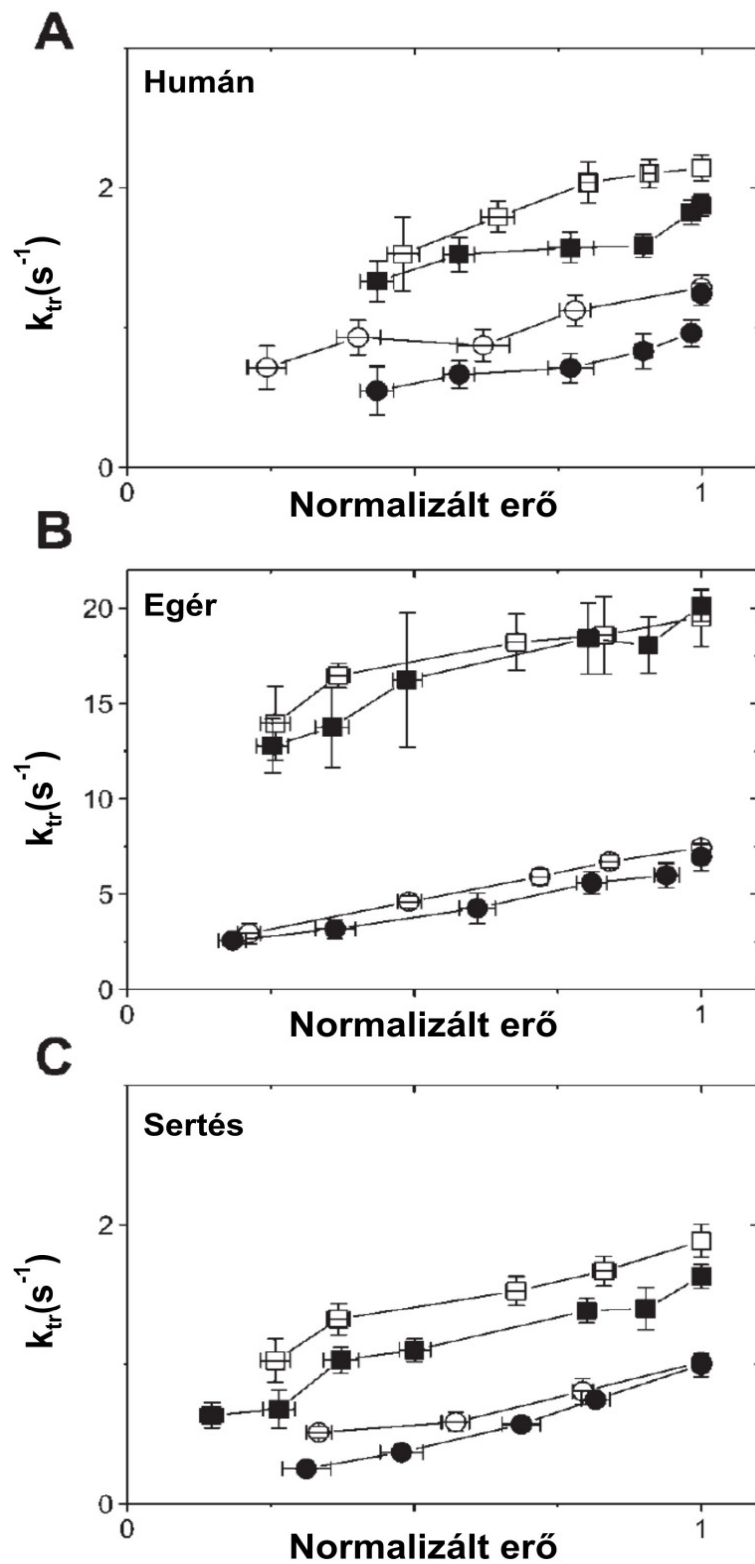
Korábbi vizsgálatok során a kísérleti hőmérséklet emelése potenciálta a P_i indukálta hatásokat az aktin-miozin keresztkötési kinetikára nyúl vázizom miofibrillumokban (28), illetve egér kardiális miofibrillumokban (29). Ezért megvizsgáltuk, hogy saját kísérleti rendszerünkben a kísérleti hőmérséklet 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 (9. ábra). Eredményeink szerint 1,9 μ m-es SL esetén 25 °C-on a maximális Ca^{2+} aktivált erő $35,2\pm 4,2$ kN/m² volt (n=10 humán szívizomsejt), míg 10 mM P_i hozzáadása után ezen érték $17,4\pm 2,4$ kN/m²-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+} aktivált erőt (F_o), mint 15 °C-on.

A magasabb hőmérsékleten elvégzett kísérleteink adatait normalizálva, kifejeztük a Ca^{2+} -érzékenység SL függését (9B. ábra). Az előző tendenciához hasonlóan a pCa_{50} értékváltozás továbbra is $0,10 \pm 0,02$ volt ($P < 0,05$), annak ellenére, hogy a hőmérsékletemelést 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 rost hosszúság), továbbra sem találtunk szignifikáns különbséget a k_{tr} értékekben a két csoport között (9C. ábra).



9. ábra. Relatív pCa-erő (A), normalizált pCa-erő (B) és pCa- k_{tr} összefüggések humán szívizomsejt preparátumokban, 1,9 és 2,3 μm SL esetén, 10 mM P_i jelenlétében és 25 °C kísérleti hőmérséklet mellett. Az ábra A panelén a submaximális aktivációkat a maximális erőértékekhez normalizáltuk, hogy bemutassuk a hőmérsékletemelést potenciózó hatását a P_i által mediált F_o csökkentésre. A submaximális erőket a saját maximumukkal normalizálva, 25 °C-on és P_i jelenlétében is megtartottuk találtuk a pCa-erő görbéket mindkét SL esetében (B). Az ábra C panelén a k_{tr} értékeket abszolút értékekben fejeztük ki, és bemutattuk a magasabb kísérleti hőmérséklet P_i potenciózó hatását az aktin-miozin ciklus sebességére. A pontokkal és egybefüggő vonallal jelölt görbék (A és C panel) az eredeti (P_i hatás nélkül mért) értékeket szemlélteti. Az SL változtatása a magasabb hőmérsékleten (P_i jelenlétében) sem befolyásolta a k_{tr} értékeket egyik fajtában sem. Mintaszám, $n=12$.



10. ábra. A k_{tr} -normalizált erőviszonyok SL függése humán (A), egér (B) és sertés (C) miociták esetében. (Az adatok a 7. és 8. ábrából származnak.) Az adatok mindig hozzátartozó SL F_o értékre normalizálva kerültek feltüntetésre. Az üres jelek a rövidebb $1,9 \mu\text{m}$ SL esetén mért adatokat, a fekete jelek a nagyobb $2,3 \mu\text{m}$ SL mellett mért adatokat mutatják. A karikák a 10 mM anorganikus foszfát (P_i) hiányában regisztrált paraméterek a négyzetek a P_i -tal kezelt kísérleti preparátumok adatai.

Annak érdekében, hogy részleteiben megismerhessük a k_{tr} értékének faj-, illetve P_i -függését olyan ábrát szerkesztettünk, amelyben a k_{tr} -t az F_o -ra normalizált erő függvényében ábráztuk (15 °C, mindhárom speciesben, 10. ábra).

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) valamelyest tendenciájában nagyobb értéket adott (10. ábra). Korábban hasonló megfigyeléseket tettek patkány trabekulák vizsgálata kapcsán is (30). Ez a submaximális erőviszonyokban tapasztalt k_{tr} növekedés vélhetően 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 (fél-maximális 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.

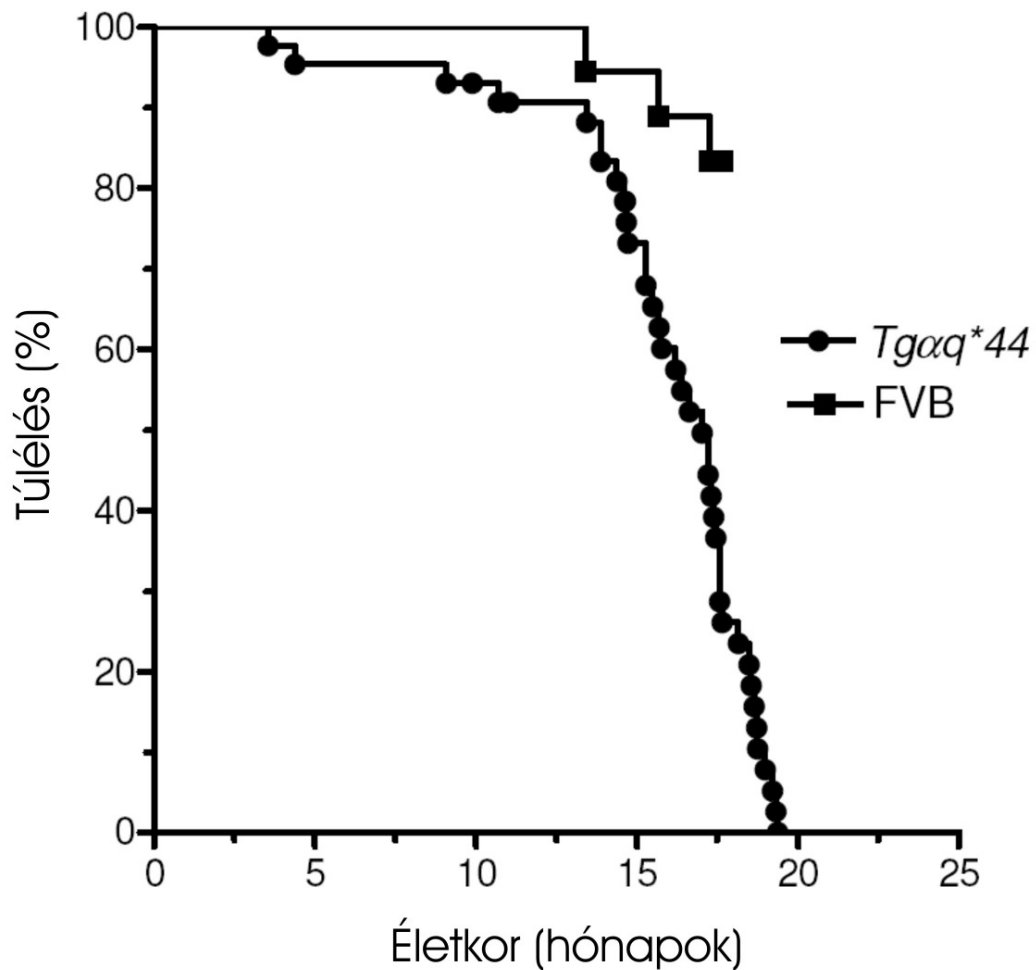
4.2. A miofibrilláris kontraktilis funkció változása az idő függvényében dilatatív kardiomiopátiás állatmodellen (Tg α q*44)

A G α q a G proteinek családjába tartozó fehérje, amelynek krónikus aktivációja a szívizomban patológiás folyamatokat indít el. A G α q a szívizomban a foszfolipáz C β aktivációhoz kötött, mely reakció során inozitol triszfoszfát és diacilglicerol keletkezik. A diacilglicerol, mint másodlagos intracelluláris hírvivő, a protein kináz C (PKC) legfontosabb fiziológiás aktivátora. A PKC fehérje család aktivációja mediálja a miokardiumban azokat a szignálokat (endotelin, angiotenzin II, noradrenalin és egyéb α -adrenerg agonisták), amelyek hosszútávon bal kamra hipertrófiához, majd szívelégtelenséghez vezetnek (1, 2). Mindezek alapján a krónikus aktiváció a szívizomban intracelluláris fehérje foszforilációs és expressziós folyamatokat indít el, amelyek hozzájárulnak a hipertrófia és a szívelégtelenség kialakulásához. A hipertrófia kapcsán kialakuló, a miofibrilláris fehérjék szerkezetét és funkcióját érintő strukturális változásokról viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. Különösen szegényes a bal kamra remodelláció, a hipertrófia és a szívelégtelenség időbeli kialakulásának a jellemzése.

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 (31-33). 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. Az állattörzssel kapcsolatos egyéb adatokat és az alkalmazott technikát (mechanikai funkció mérése, biokémiai vizsgálatok) a metodikai részben részletesen ismertettük.

A 2. táblázat a vad típusú FVB és a Tg α q*44 transzgén állatok kardiális morfológiai paramétereit mutatja az idő függvényében (4, 10, 14 és 28 hónap). Jól látható a DCM kialakulása - a szív súly, bal kamra súly, a szív súly/testsúly és a bal kamra súly/testsúly hányadosok növekedése - a Tg α q*44 egerekben a 14. hónapot követően. Az FVB egerekben ugyanezen időszakban nem történt szignifikáns változás a morfológiai kardiológiai paraméterekben. A DCM kialakulása növelte a

Tgαq*44 egerek mortalitását és a túlélési görbe a 13-14. hónaptól jellegzetesen elvált az FVB törzs értékeitől (11. ábra).



11. ábra. Az FVB és a Tgαq*44 egértörzsek kumulatív túlélési adatai. Az adatok a két törzs százalékos túlélését mutatják 20 hónapos életkorig. A két görbe erősen szignifikánsan ($P < 0,001$; log-rank teszt) eltér egymástól

2. Táblázat. DCM kialakulása a Tgαq*44 egerekben

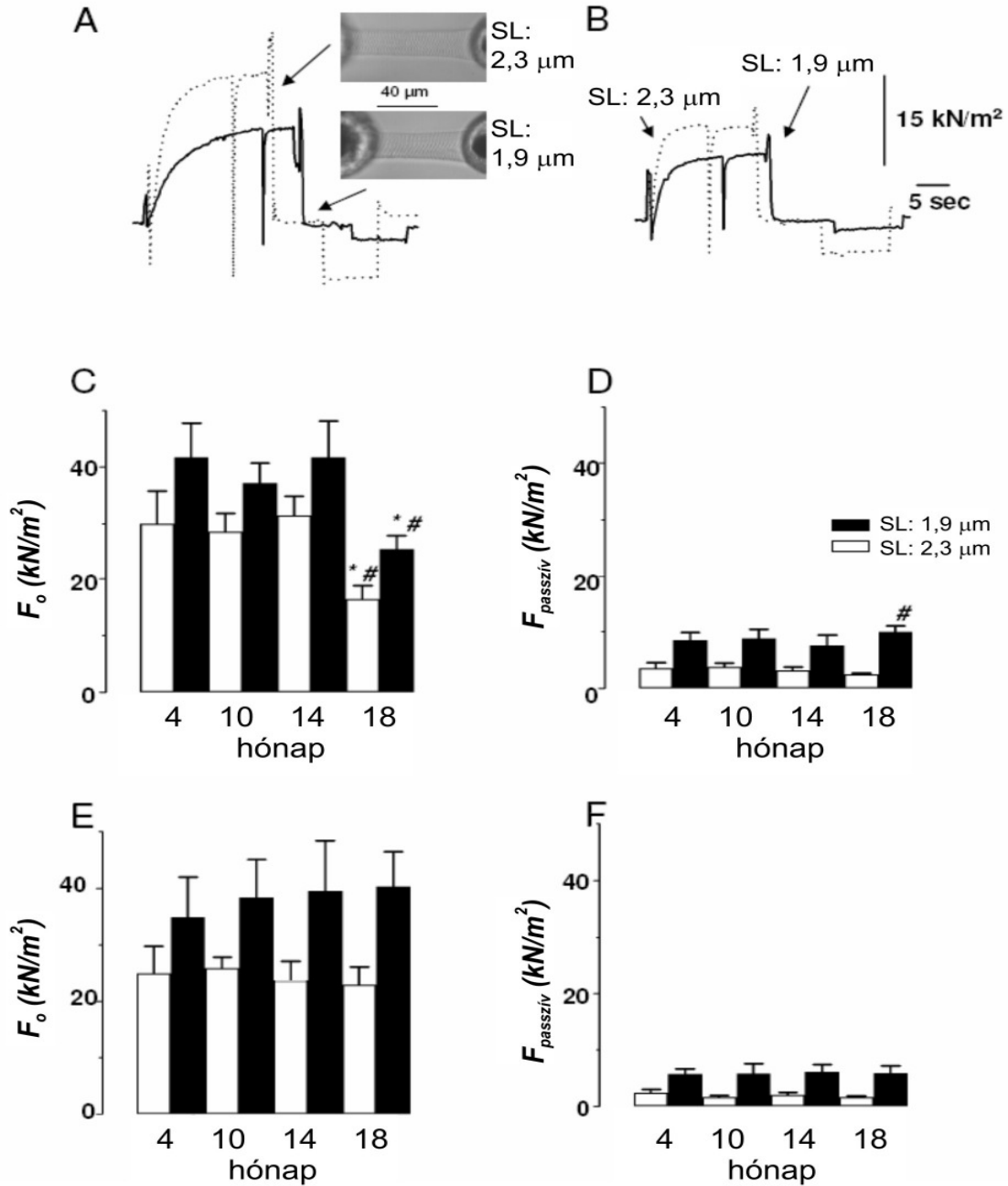
	FVB (n=19)	FVB (n=16)	FVB (n=14)	FVB (n=5)	Tgαq*44 n=19	Tgαq*44 (n=14)	Tgαq*44 (n=19)	Tgαq*44 (n=6)
Életkor (hónap)	4	10	14	18	4	10	14	18
Testsúly (g)	25,2±0,8	28,9±0,8	29,8±1,0	32,3±1,3	25,6±0,5	28,3±0,8	29,0±0,9	26,9±0,9 [†]
Szív súly (mg)	109,8±2,3	121,4±2,3	124,2±2,5	122,1±2,6	115,7±1,9	131,5±6,3	168,6±4,7 [#]	190,5±6,4 [†]
Bal kamrasúly (mg)	98,2±1,9	107,1±2,2	111,3±2,1	107,8±1,1	102,2±1,9	102,3±3,5	124,7±4,7 [#]	126,3±4,6 [†]
Szív súly/testsúly (mg/g)	4,4±0,1	4,2±0,1	3,8±0,4	3,8±0,1	4,2±0,3	4,7±0,2 [*]	5,4±0,3 [#]	7,1±0,4 [†]
Bal kamra/testsúly (mg/g)	3,9±0,1	3,7±0,1	3,6±0,1	3,4±0,1	3,6±0,3	3,6±0,1	3,9±0,3	4,7±0,3 [†]

Átlag±SEM. *P<0,05 a 10 hónapos FVB értékéhez képest. #P<0,05 a 14 hónapos FVB értékeihez képest. †P<0,05 a 18 hónapos FVB értékeihez képest.

3. Táblázat. Normál kontroll állatok (FVB) és a transzgén modell (Tgαq*44) kardiomiocita mechanikájának változása az idő függvényében, 2,3 μm-os nyugalmi SL mellett

	FVB n=6-9	FVB n=6-8	FVB n=8-9	FVB n=10	Tgαq*44 n=7-10	Tgαq*44 n=8-10	Tgαq*44 n=7-9	Tgαq*44 n=11
Életkor (hónap)	4	10	14	18	4	10	14	18
Fo (kN/m ²)	34,9±7,1	38,4±6,8	39,5±8,9	40,3±6,2	41,7±6,1	37,2±3,5	41,7±6,4	25,5±2,5 [#]
Fpassive (kN/m ²)	5,7±0,9	5,8±1,7	6,1±1,2	5,9±1,3	8,5±1,4	8,8±1,6	7,6±1,8	9,9±1,1 [#]
pCa50	6,29±0,02	6,30±0,02	6,27±0,01	6,25±0,02	6,33±0,02	6,34±0,02	6,42±0,02*	6,39±0,01 [#]
nHill	1,94±0,14	1,69±0,07	2,25±0,11	1,87±0,07	1,58±0,17	1,54±0,07	1,73±0,10*	1,72±0,12
k _{tr,max} (1/s)	7,5±0,5	7,3±0,5	7,2±0,6	9,1±0,3	7,8±0,3	6,2±0,6	6,6±0,2	5,4±0,2 [#]

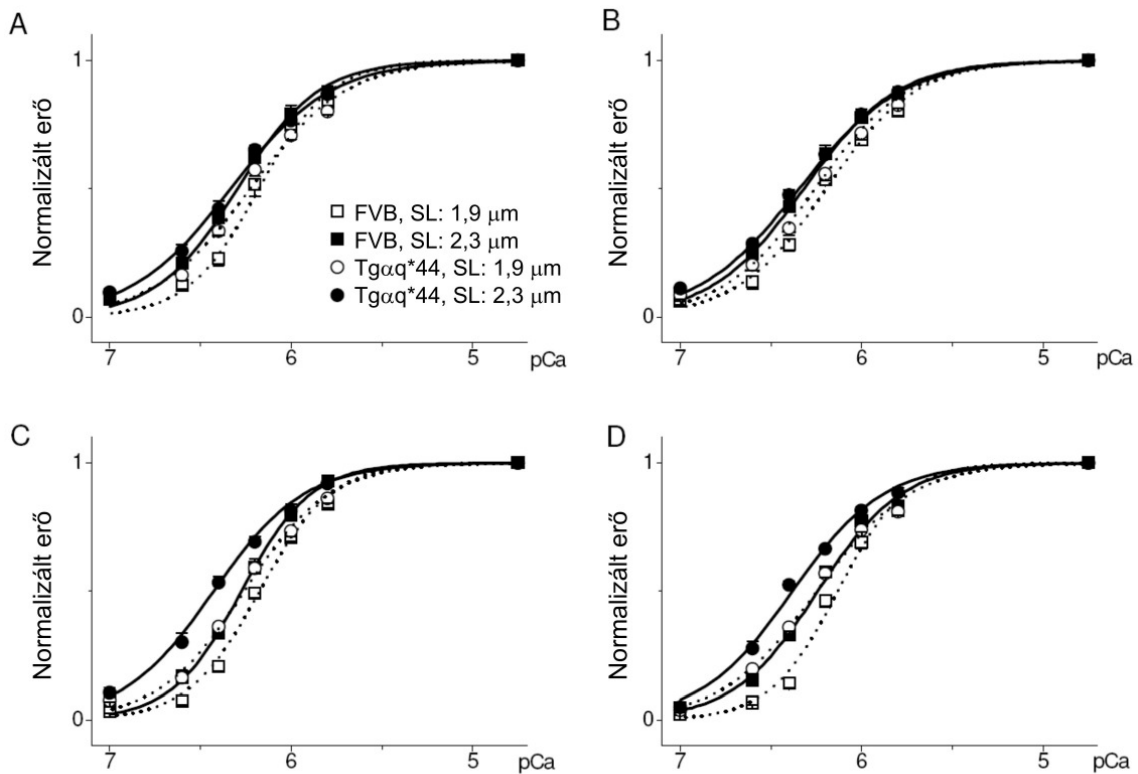
Átlag±SEM. *P<0,05 a 14 hónapos FVB értékeihez képest. [#]P<0,05 a 18 hónapos FVB értékeihez képest.



12. ábra. A maximális Ca^{2+} aktivált erő (F_o) és a passzív erő ($F_{\text{passzív}}$) változása a két állattörzsben (FVB és $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$) az életkor függvényében. Az ábra felső része a 18 hónapos FVB (A) és a 18 hónapos $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ (B) állatokból származó kardiomiociták reprezentatív erő választ illusztrálja. A szaggatott vonal a 2,3 μm nyugalmi rost hosszúság mellett, a folyamatos vonal pedig az 1,9 μm nyugalmi rost hosszúság mellett kapott választ mutatja. A fényképek a kardiomiocitákat illusztrálják a két különböző szarkomerhosszon (1,9 μm és 2,3 μm). A nyitott és fekete oszlopok az F_o és $F_{\text{passzív}}$ változását mutatják az idő függvényében a $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ (C és D), illetve az FVB (E és F) állatokban. Az FVB törzs adataiban (F_o és $F_{\text{passzív}}$) az idő függvényében nem észleltünk szignifikáns változást. * $P < 0,05$ a 14 hónapos $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ adataihoz képest. # $P < 0,05$ a 18 hónapos FVB egerek értékéhez képest.

Permeabilizált, izolált kardiomiocitákon (FVB és $Tg\alpha q^{*44}$) - az idő függvényében és különböző nyugalmi rost hosszúság mellett (1,9 μm és 2,3 μm) - részletesen megvizsgáltuk a maximális Ca^{2+} aktivált erőt (F_o), a passzív erőt ($F_{\text{passzív}}$) és az erő újraképződés maximális sebességét ($k_{\text{tr,max}}$), ami jól jellemzi az aktin-miozin ciklus sebességét (3. táblázat, 12. ábra). A Frank-Starlin-törvénynek és saját korábbi vizsgálatainknak (34) megfelelően a nyugalmi rost hosszúság növelése (1,9 μm -ról 2,3 μm -re) szignifikánsan növelte az F_o és $F_{\text{passzív}}$ erőket mindkét állattörzsben. A $Tg\alpha q^{*44}$ transzgenikus állatokban az F_o a 14 hónapos kor után hirtelen csökkent (mind az 1,9 μm -es, mind a 2,3 μm -es nyugalmi SL-nál) és a 18. hónapos csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt (~60%-os csökkenés), mint az FVB állatok bármely korcsoportja, vagy a $Tg\alpha q^{*44}$ állatok 4, 10 és 14 hónapos csoportjainak a középértéke. Az $F_{\text{passzív}}$ értéke a 18 hónapos $Tg\alpha q^{*44}$ egerekben szintén jellegzetesen megváltozott. Mért 2,3 μm -es SL mellett, egy erőteljes szignifikáns növekedést észleltünk, a korábbi időpontokhoz értékéhez vagy az FVB állatok bármely időpontjának értékéhez képest (3. táblázat, 12. ábra).

A miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységének vizsgálatához mindkét állattörzs kardiomiocitáit a rövid és hosszú SL-nál (1,9 μm és 2,3 μm) különböző Ca^{2+} koncentrációkkal aktiváltuk. Az adatokat minden esetben a hozzátartozó F_o értékre normalizáltuk, majd ábrázoltuk a pCa-erő összefüggéseket. A 13. ábrán jól látható, hogy a hosszabb SL (2,3 μm) alkalmazása minden időpontban balra tolta a pCa-erő összefüggéseket, mind az FVB, mind a $Tg\alpha q^{*44}$ állatokban (azaz növekedett a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége). A $p\text{Ca}_{50}$ balratolódásának mértéke mindkét állatcsoportban ~0,11 pCa egység volt. A 4, illetve a 10 hetes FVB és $Tg\alpha q^{*44}$ állatokból származó kardiomiociták esetében a $p\text{Ca}_{50}$ értékek (hasonló nyugalmi rost hosszúság mellett) nem különböztek szignifikánsan egymástól. Ugyanakkor a 14 hónapos, illetve 18 hónapos életkorban mindkét SL (1,9 μm és 2,3 μm) alkalmazása mellett, a $Tg\alpha q^{*44}$ állatok pCa-erő görbéi szignifikánsan balra tolódtak az FVB görbékhez képest (13. ábra). Más szavakkal a DCM kialakulásával összhangban a $Tg\alpha q^{*44}$ állatokban fokozódott a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége a kontroll (FVB) állatok értékeihez képest. A 18 hónapos állatok kardiomiocitáinak a pCa értékei a következők voltak: FVB SL 2,3 μm -nél $6,25 \pm 0,01$; $Tg\alpha q^{*44}$ SL 2,3 μm -nél $6,38 \pm 0,01$; illetve FVB SL 1,9 μm -nél $6,13 \pm 0,02$; $Tg\alpha q^{*44}$ SL 1,9 μm -nél $6,24 \pm 0,01$.

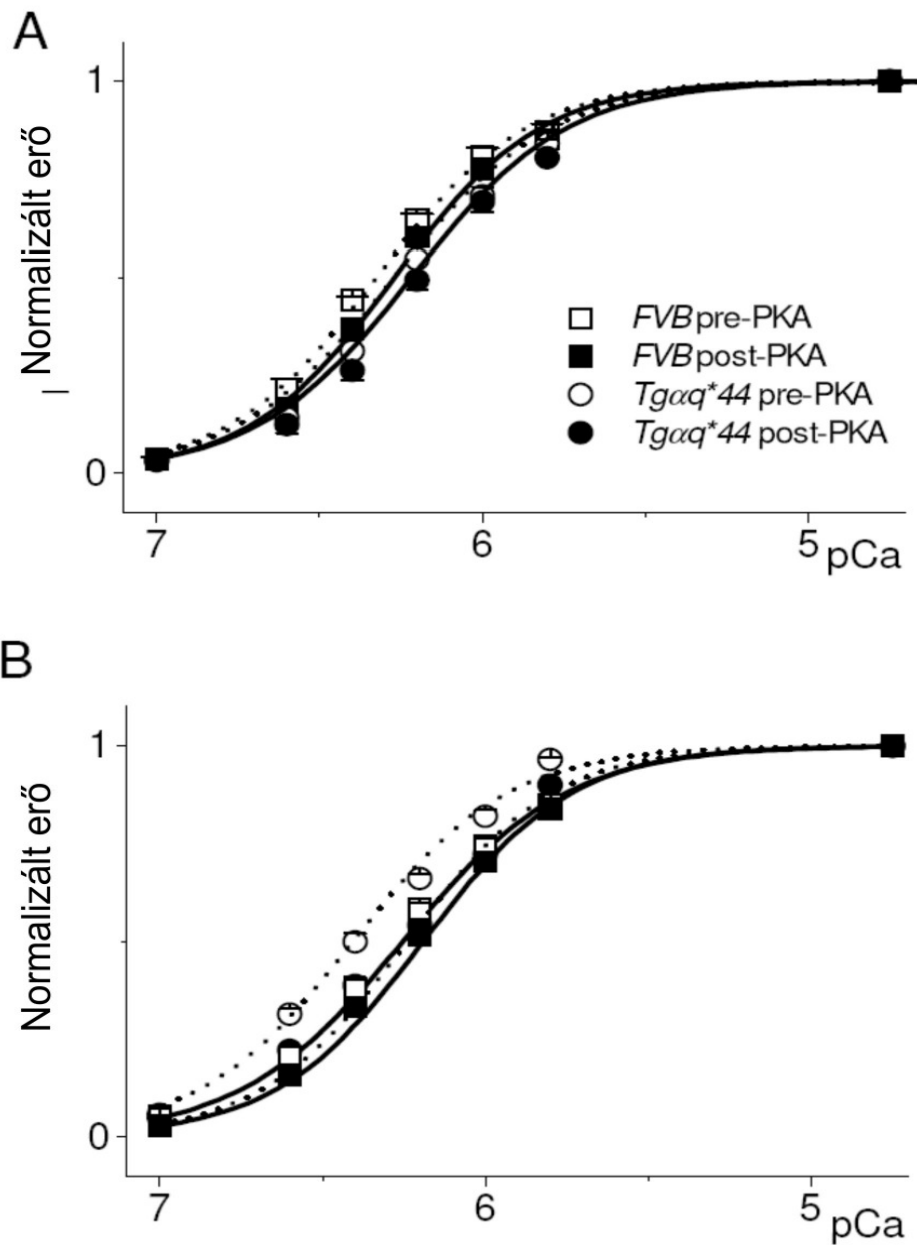


13. ábra. A különböző életkorú FVB és Tgαq*44 állatok kardiomiocitáinak pCa-erő összefüggései (különböző SL értékek mellett). Az A, B, C és D panelek mindkét áltattörzs 4, 10, 14 és 18 hónapos értékeit mutatják. A szubmaximális Ca²⁺ mellett mért erőket normalizáltuk a megfelelő F₀ értékkel. Valamennyi életkorban és állattörzsben jól látható a magasabb SL értéken (2,3 μm) a görbe balra tolódása. A 4 és 10 hónapos életkorban (A és B) nem volt szignifikáns különbség az FVB és Tgαq*44 állatok kardiomiocitáinak pCa-erő összefüggései között. Ugyanakkor 14 és 18 hónapos korban (C és D) a Tgαq*44 állatok kardiomiocitáinak pCa-erő összefüggései mindkét SL hossz (1,9 μm és 2,3 μm) mellett szignifikánsan balra tolódtak (magasabb Ca²⁺-érzékenységet mutattak). A szimbólumok az átlag±SEM értékeket mutatják.

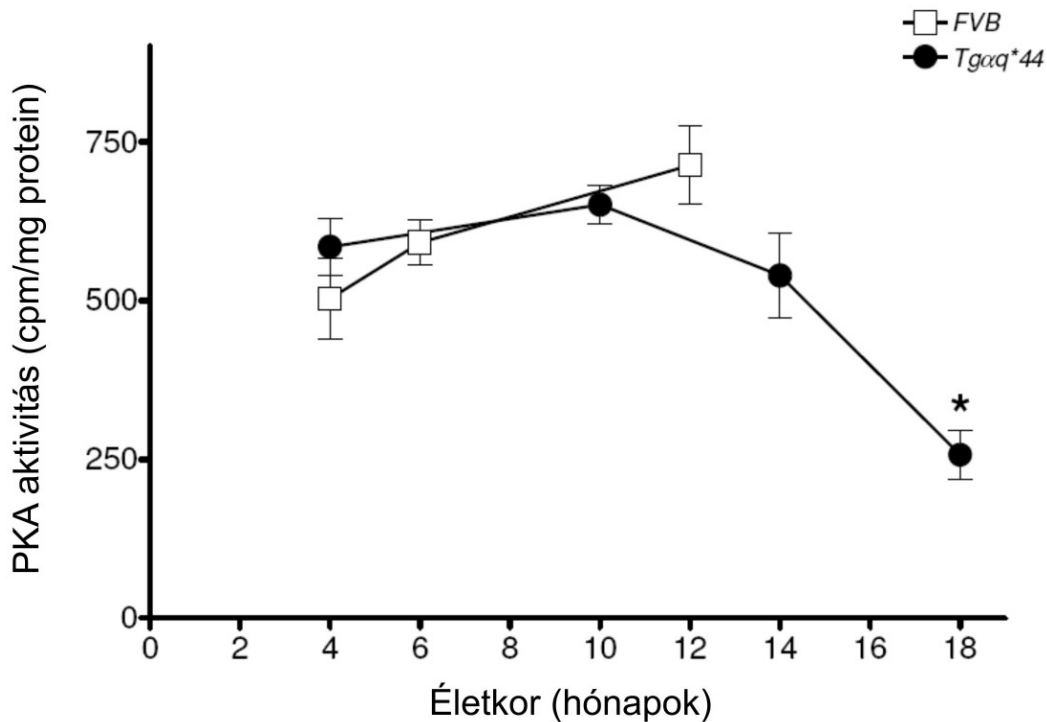
A miofilamentumok Ca²⁺-érzékenységét elsősorban a miofibrilláris fehérjék (troponin I) foszforiláltsága szabályozza. β-adrenerg stimulálás (izoproterenol) hatására a troponin I gyors foszforilációját követően egyértelműen jobbra tolódik a szívizom pCa-erő görbéje (csökken a Ca²⁺-érzékenység) (1, 2), ami gyorsítja a relaxáció sebességét (pozitív luzitróp hatás). Ugyanakkor patológiás körülmények között ennek a folyamatnak a fordítottját is leírták. Krónikus szívelégtelenségben,

valószínűleg kompenzatorikus módon, fokozódik a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége, amit elsősorban a troponin I bazális foszforilációjának a csökkenése okoz (35). Mindezen adatok alapján, kísérleti rendszerünkben megvizsgáltuk, hogy a $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ állatok kardiomiocitáinak megnövekedett Ca^{2+} -érzékenységét nem a troponin I PKA-függő bazális foszforiláltsági állapotának a változása okozza-e. Ebben a kísérleti sorozatunkban a kardiomiocitákat ATP jelenlétében 40 percig inkubáltuk nagy aktivitású PKA katalitikus alegységgel (lásd metodikai részt). Eredményeink szerint (14. ábra) 10 hónapos korban a PKA katalitikus alegységgel való inkubálás nem befolyásolta szignifikánsan sem FVB, sem $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ állatokból származó kardiomiociták Ca^{2+} -érzékenységét (nem változott szignifikánsan a pCa-erő görbék lefutása). Ugyanakkor a 14 hónapos korban a $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ állatokból származó kardiomiociták pCa-erő görbéje már szignifikáns balra tolódást mutatott az FVB állatok görbéjéhez képest (13. ábra). A 14 hónapos $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ állatok kardiomiocitáinak ezen növekedett Ca^{2+} -érzékenységét szüntette meg a katalitikus alegységgel történő inkubálás (szignifikánsan $\sim 0,15$ pCa értékkel jobbra tolódott a pCa-erő összefüggés). A katalitikus alegységgel történt inkubálást követően már nem volt szignifikáns eltérés az FVB és a $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ állatok kardiomiocitáinak Ca^{2+} -érzékenysége között (14. ábra).

Érdekes módon a PKA katalitikus alegységgel történő inkubálás hatékonysága (megszüntette a $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ állatok kardiomiocitáinak fokozott Ca^{2+} -érzékenységét) felvetette a β -adrenerg-PKA rendszer szerepének jelentőségét a $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ egerek szívelégtelenségének kialakulásában. Ez azért meglepő, mivel a transzgénikus állatokban a $\text{G}\alpha\text{q}$ alegység feleslegben történő szintetizálása (overexpresszió) elsősorban a PKC család krónikus aktivációját okozza, tehát inkább erről az oldalról vártuk a foszforilációs változások kialakulását. 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 $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$, mind az FVB állatok miokardiumában (15. és 16. ábrák)



14. ábra. A 10 (A) és 14 (B) hónapos FVB és Tgαq*44 állatok kardiomiocitáinak pCa-erő összefüggései 2,3 μm-es SL érték mellett, a PKA katalitikus alegységgel történő inkubálás előtt és után. A szubmaximális Ca²⁺ mellett mért erőket normalizáltuk a megfelelő F_o értékkel. A 10 hónapos életkorban (A) még nem volt szignifikáns különbség az FVB és Tgαq*44 állatok kardiomiocitáinak pCa-erő összefüggései között. Ugyanakkor 14 hónapos korban (B) a katalitikus alegységgel történő inkubálás előtt a Tgαq*44 állatok kardiomiocitáinak pCa-erő összefüggése szignifikánsan balra tolódott (magasabb Ca²⁺-érzékenységet mutatott). A katalitikus alegységgel történő inkubálás hatására a Tgαq*44 állatok pCa-erő összefüggése jobbra tolódott és már nem különbözött szignifikánsan az FVB csoport görbájátől. Más szavakkal a katalitikus alegység alkalmazása megszüntette a szignifikáns különbséget a két állatcsoport kardiomiocitáinak Ca²⁺-érzékenysége között. A szimbólumok az átlag±SEM értékeket mutatják.

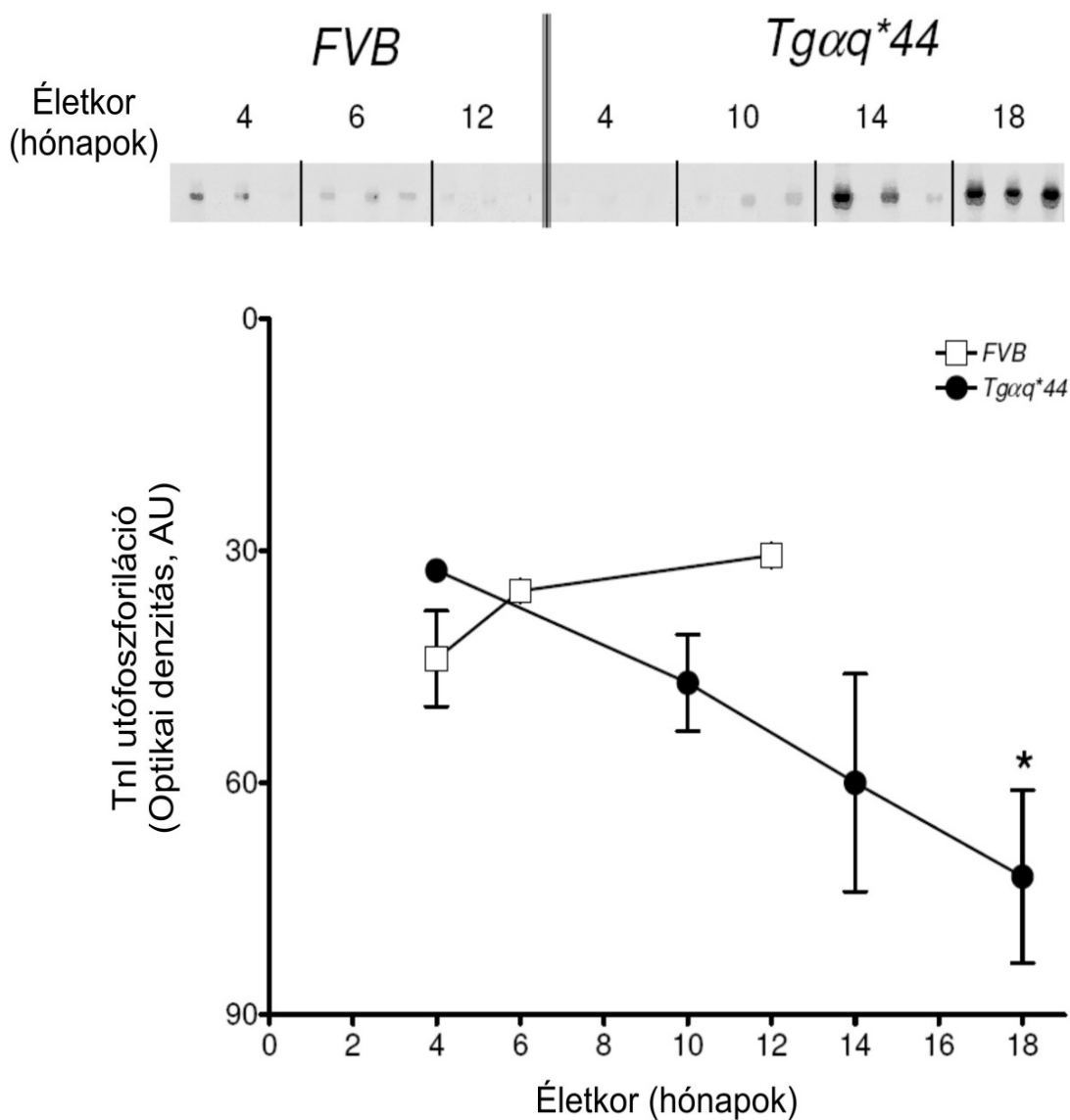


15. ábra. Az endogén PKA aktivitás változása az FVB és Tgαq*44 állatok miokardiumának citoszól frakciójában az idő függvényében. A Tgαq*44 állatokban jól látható a PKA aktivitás csökkenése, ami időben egybeesik a miofilamentumok Ca²⁺-érzékenységének a növekedésével. A szimbólumok az átlag±SEM értékeket mutatják. *P<0,05 az FVB értékeihez, vagy a Tgαq*44 törzs 4, 10 és 14 hónapos értékeihez képest.

A miokardiális PKA aktivitások vizsgálata során csak a citoszól frakcióban kaptunk érdemleges aktivitást (lásd metodikai fejezet). A citoszól aktivitás a Tgαq*44 állatokban fokozatosan csökkent az idő függvényében. A 18 hónapos állatokban a csökkenés már szignifikánsnak bizonyult a Tgαq*44 állatok korábbi (4, 10, 14 hónap) időpontjaihoz, vagy az FVB állatok értékeihez képest. Az PKA aktivitás csökkenése tehát összhangban állt a Tgαq*44 állatok kardiomiocita Ca²⁺-érzékenység növekedésével.

A troponin I PKA-függő utófoszforilációjának eredményeit a 16. ábra szemlélteti. Jól látható, hogy a Tgαq*44 állatokban, az idő függvényében erősen szignifikánsan növekedett (4 hónapos állat 33±1, 18 hónapos állat 72±11 AU) a troponin I utófoszforilációja. Az utófoszforiláció növekedése azt jelzi, hogy a bazális troponin I foszforiláció szignifikánsan csökkent a DCM kialakulása során (18 hónapos Tgαq*44 állatok), ami összhangban van: 1) a PKA aktivitásmérésekkel, és

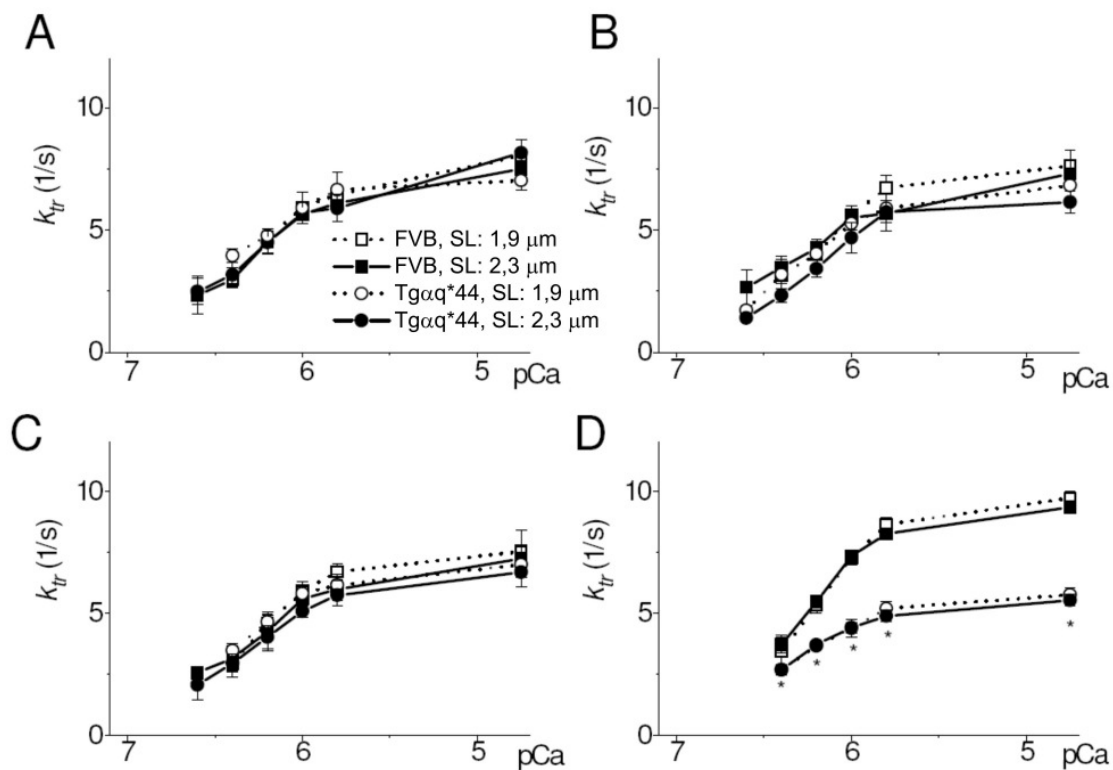
2) a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységének a növekedésével. Az FVB állatokban az idő függvényében nem változott szignifikánsan a troponin I utófoszforiláció (16. ábra).



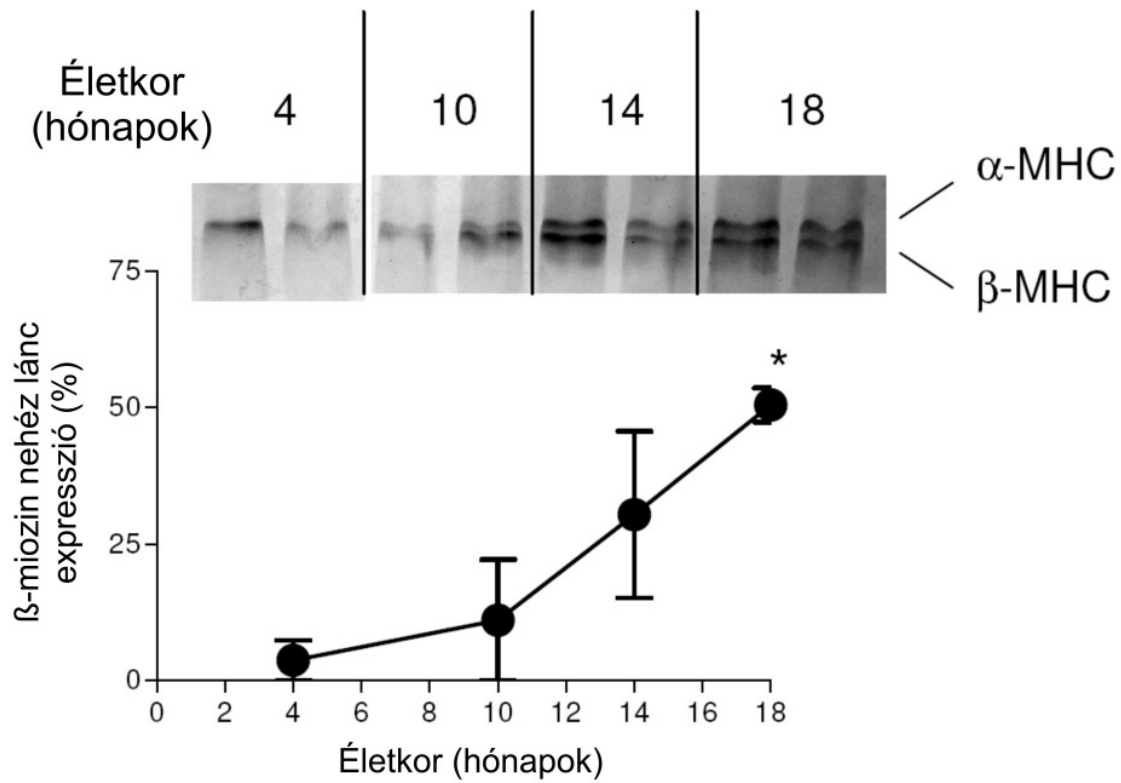
16. ábra. A PKA-függő troponin I utófoszforiláció alakulása az FVB és Tgαq*44 állatokból preparált permeabilizált kardiomiocitákban (miofibrillum) az idő függvényében. Az ábra felső részén a fényképek az utófoszforiláció alakulását illusztrálják időpontként 3-3 FVB és Tgαq*44 állat preparátumát használva. Az eredmények optikai denzitás egységekben (arbitrary unit – AU) kerültek bemutatásra. A szimbólumok az átlag±SEM értékeket mutatják. *P<0,05 az FVB értékeihez, vagy a Tgαq*44 törzs 4 és 10 hónapos értékeihez képest.

Kardiomiocita preparátumaink lehetővé tették annak vizsgálatát, hogy a DCM kifejlődése során a Tg α q*44 állatokban észlelt változások (Ca^{2+} aktivált erő csökkenése, Ca^{2+} -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 Ca^{2+} aktivált erő újraképződésének sebességét (k_{tr} – lásd a metodikai fejezetet), ami jól jellemzi az aktin-miozin ciklus sebességét (17. ábra). 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 (34) hasonlóan a k_{tr} értékét a nyugalmi SL nem befolyásolta (függetlenül a Ca^{2+} koncentrációtól, életkortól, egértörzstől 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 (17. ábra). 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 szívizmában az idő függvényében megvizsgáltuk a MHC (α és β) expresszióját (18. ábra). 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 (18. ábra). A növekedés a 18. hónapban elérte a $51 \pm 3\%$ -ot és szignifikánsnak bizonyult a 4 és 10 hónapos értékekhez képest.



17. ábra. pCa- k_{tr} összefüggések FVB és Tg α q*44 állatokból preparált permeabilizált kardiomiocitákban (különböző SL értékek mellett) az idő függvényében. A méréseket mind 4 (A), 10 (B), 14 (C) és 18 hónapos (D) korban elvégeztük. A k_{tr} értékeket a nyugalmi rost hosszúság nem befolyásolta (függetlenül a Ca^{2+} koncentrációtól, életkortól, egértörzstől és a DCM kialakulásától). A 14 hónapos korig (A, B és C ábrák) nem különböztek egymástól az FVB és Tg α q*44 állatok pCa- k_{tr} összefüggései. Ugyanakkor a 18 hónapos állatok esetében a Tg α q*44 csoport szignifikánsan alacsonyabb k_{tr} értéket mutatott valamennyi mért Ca^{2+} koncentráció esetében az FVB értékeihez képest (lefelé csúszott a pCa- k_{tr} összefüggés). A szimbólumok az átlag \pm SEM értékeket mutatják. * $P < 0,05$ az FVB hasonló értékeihez képest.



18. ábra. Az MHC izoformák expressziója a $Tg\alpha\alpha^*44$ állatok miofibrillumában az idő függvényében. Az ábra felső részén a fényképek az α és β MHC expresszióját illusztrálják, időpontként 2 $Tg\alpha\alpha^*44$ állat preparátumát használva. A szimbólumok az $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ értékeket mutatják ($n=3-5$). * $P < 0,05$ a 4 hónapos és a 10 hónapos értékekhez képest.

5. Megbeszélés

5.1. A szarkomerhossz változtatásának hatása a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységre és az aktin-miozin ciklus sebességére különböző speciosekben

Eredményeink szerint az aktin-miozin ciklus sebessége (k_{tr}) szorosan összefügg a vizsgált fajjal, a hőmérséklettel (humán szívizomsejtek), 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 SL függvényében, tendenciájában hasonló módon változik a Ca^{2+} -aktivált erőképződés, a Ca^{2+} -érzékenység fokozódása, 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 (36) 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. Ezért a krónikus szívelégtelenség kapcsán kialakuló relatív β -MHC izoforma túlsúlytól (14) nem várható az SL függő Ca^{2+} -érzékenyítés változása. Továbbá, eredményeink azt sugallják, hogy emlős szívekben a kontraktilis proteinek fajfüggő eltérései sem modulálják az SL függő Ca^{2+} -érzékenyítést.

A P_i csökkenti a MgATP hidrolíziséhez szükséges szabad energiát (a tömeghatás elve alapján lassítja a P_i hidrolízisét a miozin fejről) és ezáltal csökkenti az erőgeneráló fázisban résztvevő keresztkötések számát (lásd 3. ábra) (27, 28, 37). P_i jelenlétében az F_o és pCa_{50} értékek változásai is valószínűleg a megváltozott aktin-miozin ciklusnak (csökken a nyitott állapotban lévő keresztkötések száma) tudhatók be (26, 38). Adataink azt mutatják, hogy a P_i fajtól és SL-től függetlenül csökkentette a preparátumok által generált erőt, és mérsékelten jobbra tolta a pCa-erő összefüggéseket. A P_i minden vizsgált fajban hasonló módon befolyásolta a

keresztkötési kinetikát, ezért hatása az aktin-miozin ciklusra konzervatívnak mondható. A P_i hatására észlelt aktin-miozin ciklussebesség (k_{tr}) növekedése összhangban van az ismert irodalmi adatokkal (28, 29). 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 $[Ca^{2+}]$ -nál, és P_i -nél a k_{tr} értéke egyik vizsgált fajban sem függött a nyugalmi szarkomerhosszúságtól. Nyúl soleus és psoas miofibrillumok vizsgálata során azt találták, hogy a magasabb hőmérséklet csökkentette a P_i F_o értékét befolyásoló hatását (28). Saját humán adataink ennek az ellenkezőjét mutatták, mivel a kísérleti hőmérséklet potenciózta a P_i F_o -ra gyakorolt hatását. Egér szívizomsejtek vizsgálata során más szerzők is hasonló következtetésekre jutottak (29).

Az SL-függő Ca^{2+} -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 (30, 39-41), és 2) növeli a troponin C affinitását a Ca^{2+} irányában (42, 43). 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 (44), míg a troponin C-hez kötött Ca^{2+} növekedése gyorsítaná ugyanezt a paramétert (41, 45, 46). Eredményeink azt mutatták, hogy adott $[Ca^{2+}]$ esetén a k_{tr} állandó maradt az SL változás hatására létrejött erőnövekedés ellenére. Más szavakkal fogalmazva mindhárom vizsgált fajban a $[Ca^{2+}]$, 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 Ca^{2+} 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 $[Ca^{2+}]$ (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 Ca^{2+} affinitása nem szabályozza közvetlenül azokat a keresztkötési lépéseket, amelyek a k_{tr} szempontjából meghatározóak (30). Adataink és

eredményeink a vékony filamentum aktiváció három-fázisú modelljét támogatják (3. ábra). Ezen modell szerint Ca^{2+} jelenlétében SL-függő módon kialakulhat a zárt állapot (gyenge keresztkötések). Magasabb nyugalmi rosthosszúság 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 valószínűleg nincs hatása. Eredményeink jól korrelálnak a három-fázisú elméleti modellel (47, 48), mert az helyt ad a kontraktilis erő SL-függő növekedésére a keresztkötési kinetika látható változtatása nélkül.

A tanulmányunk limitációi: vizsgálataink során a keresztmetszetre normalizált abszolút erőmeghatározást nehezíti az a tény, hogy preparátumaink függőleges átmérőjét a preparátumok alsó és felső felszínére való fókuszálással határoztuk meg. A vizsgálati berendezésünk azóta kiegészült egy újabb, a már meglévő optikai eszközökre merőleges szöget bezáró tükörrendszerrel, ami a jövőben a preparátum vastagság pontos mérését teszi lehetővé. Továbbá a miokardiumon belüli regionális illetve egy-egy sejtre vonatkozó különbségek is befolyásolhatták kapott eredményeinket (24, 49). A humán és sertés szívekben mért k_{tr} eredményeink összecsengenek a korábbi irodalmi adatokkal (9, 17, 23). Az egérben mért k_{tr} értékeink is hasonlóak a más szerzők által izolált szívizomsejtekben (50), izolált egér miofibrillumokban (29) és patkány kardiomiocitákban (51) mért értékekhez. Ugyanakkor a szöveti (többsejtes) preparátumokban a k_{tr} értéke hozzávetőlegesen duplája (23, 52, 53, 38, 36) a kardiomiocitákban vagy miofibrillumokban (50, 29, 51) mérhető értéknek. Valószínű, hogy részben a kísérleti hőmérséklet eltérése okozhatta ezen eltéréseket, mivel $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a többsejtes preparátumokban is a $k_{tr,max}$ értékei 9 s^{-1} (40, 46) és 12 s^{-1} (30) között változtak. Még ha elfogadjuk, hogy preparátumaink (az alkalmazott technika és a hőmérséklet miatt) kissé alacsonyabb k_{tr} értékeket mutathattak, akkor is - mivel valamennyi kardiomiocitát hasonló körülmények között vizsgáltunk - az esetleges eltérések nem befolyásolnák fő konklúzióinkat, miszerint a k_{tr} érték független az SL-től.

Az alapvető megfigyelésünk, hogy a k_{tr} független az SL-től patkány szívekben már részben leírásra került (30). 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+} -érzékenyítésnek. Ezért a Frank-Starling-mechanizmus kialakulásának molekuláris magyarázatául sokkal inkább szolgálhatnak azon modellek, melyek az aktin-miozin keresztkötések számának modulációjával változatlan keresztkötési ciklus-kinetika mellett számolnak.

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_o), 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_o 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 transzgénikus állatmodell előnye a többi DCM-es állatmodellel szemben, hogy a miokardium funkciójának csökkenése ebben a modellben csak lassan, az idősebb korban alakul ki és így lehetőség nyílik a megelőző patológiás folyamatok részletes tanulmányozására. A Tg α q*44 modell tanulmányozása kapcsán korábban igazolták (54), 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 hipofoszforilációja 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) defoszforilációja. A β -MHC fokozott expressziója elsősorban az aktin-miozin ciklus (k_{tr}) csökkenéséhez vezet (36) és befolyásolhatja a kialakult Ca $^{2+}$ aktivált maximális erőt (F_o) is (55, 56). A troponin I hipofoszforilációja pedig a miofilamentumok fokozott Ca $^{2+}$ -érzékenységét okozza (57). Ugyanakkor ezen fontos miofibrilláris eltérések mellett nem lehet kizárni egyéb tényezők szerepét (főtalán troponin C, pitvari könnyű lánc megjelenése) (15-17), de ezen miofibrilláris proteinek expresszióját részleteiben nem tanulmányoztuk.

A miofibrilláris fehérjék bazális foszforilációs 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 (32, 33, 58). Az állatmodell (Tg α q*44) részletes tanulmányozása során kiderült, hogy a PKC család izoenzimeit 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 (54). A miofibrillumok PKC ϵ enzimmel történő foszforilációja nem (vagy alig) befolyásolja a miofilamentumok Ca $^{2+}$ -érzékenységét (59-61). A PKC α és a PKC δ fokozott aktivitása pedig a miofibrilláris fehérjék hiperfoszforilációjához (és nem a bazális foszforiláció csökkenéséhez) vezet, ami csökkenti a Ca $^{2+}$ érzékenységet (62, 63).

Korábbi vizsgálatok alapján igazolták, hogy a humán DCM kialakulása során csökken a troponin I PKA-függő bazális foszforilációja (35). Az eredmények szerint a bi- és monofoszforilált troponin I foszfoproteinek jelenléte eltolódott a defoszforilált forma irányába. Továbbá, szignifikáns korrelációt észleltek a defoszforilált troponin I jelenléte és a miofibrillumok Ca^{2+} -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 Ca^{2+} -érzékenység növekedéséhez). Ezért az idő függvényében részletesen megvizsgáltuk állatmodellünkön a PKA aktivitás változását, a troponin I bazális foszforilációs állapotát és a PKA katalitikus alegységgel történő kezelés (inkubálás) hatását a miofibrillumok Ca^{2+} -érzékenységre. A permeábilis kardiomiociták katalitikus alegységgel történő inkubálása, a korábbi irodalmi adatokkal (11, 64) megegyezően a 18 hónapos Tg α q*44 állatokból származó kardiomiocitákban is csökkentette a miofibrillumok Ca^{2+} -érzékenységet és a pCa-erő görbe jobbra csúszott a kontroll állatok (FVB) görbéjének irányába (14. ábra). 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 Ca^{2+} -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 (15, 16. ábrák).

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 (65, 66) 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 részleteit az Tg α q*44 állatmodellben nem tanulmányoztuk.

Lényegesen egyszerűbbnek tűnik a 18 hónapos Tg α *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 (17, 18. ábrák). Hasonló változásokat írtak le egyéb, magas PKC aktivitással jellemzett (PKC expressziós) állatmodellekben is (61). A Frank-Starling-törvény (nyugalmi rosthosszúságtól függő Ca^{2+} -érzékenyítés) a DCM kifejlődése során is működött. Ugyanakkor - hasonlóan a normál egér szívekhez (34) - 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, melyekben a SL-függő Ca^{2+} -érzékenyítés mértéke az eltérő kontraktilis fehérjeösszetétel ellenére is egyöntetűen közel azonos volt. 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 (azaz a SL-függő Ca^{2+} -érzékenyítésének).

Transzgénikus DCM egérmodellen ($Tg\alpha q^*44$) igazoltuk, hogy a krónikus PKC aktiváció ellenére, a miofibrillumokban bekövetkező patológiás eltérések (megnövekedett 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 korábbi 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 szívízomra is.

3. A szívízom kontraktilitásának szabályozása egy fontos élettani funkció a szívízom 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 első közleményünk (34).

8. Hivatkozások jegyzéke

1. **Katz, A. M.** Physiology of the heart. *Lippincott/Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006.*
2. **Opie L.H.** Heart physiology, from cell to circulation. *Lippincott- Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004.*
3. **Granzier H and Labeit S.** Cardiac titin: an adjustable multifunctional spring. *J Physiol 2002;541: 335-342.*
4. **Tskhovrebova L, Trinick J.** Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:679-689.*
5. **Cazorla O, Vassort G, Garnier D, LeGuennec J-Y.** Length modulation of active force in rat cardiac myocytes: is titin the sensor?. *J Mol Cell Cardiol 1999;31:1215-1227.*
6. **Fuchs F, Martyn DA.** Length-dependent Ca^{2+} activation in cardiac muscle:some remaining questions. *J Muscle Res Cell Motil 2005;26:199–212.*
7. **McKillop DF, Geeves MA.** Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys J 1993;65:693–701.*
8. **Edes I., Kranias E.G.** Ca^{2+} -ATPases. Cell Physiology, Source Book. *Ed.: Sperelakis, N., Academic Press, New York, USA, 2001;271-282.*
9. **van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PM, Hasenfuss G, Stienen GJ.** The effect of myosin light chain₂ dephosphorylation on Ca^{2+} -sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc Res 2003;57:505–514.*

10. **Edes IF, Toth A, Csanyi G, Lomnicka M, Chłopicki S, Edes I, Papp Z.** Late-stage alterations alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy(Tgaq*44). *J Mol Cell Cardiol* 2008; *in press*.
11. **van der Velden J, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Stienen GJ.** Effect of protein kinase A on calcium sensitivity of force and its sarcomere length dependence in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2000;46:487-495.
12. **Braunwald E.** Heart disease, a textbook of cardiovascular medicine. *Elsevier, Philadelphia, 2007*.
13. **Fowler MB, Laser JA, Hopkins GL, Minobe W, Bristow MR.** Assessment of the β -adrenergic receptor pathway on the intact failing human heart: progressive receptor down regulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation*. 1986;74:1291–1301.
14. **Mercadier JJ, Lompre AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K.** Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1981;49:525–532.
15. **Anderson PA, Malouf NN, Oakeley AE, Pagani ED, Allen PD.** Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ Res* 1991;69:1226-1233.
16. **Mesnard-Rouiller L, Mercadier JJ, Butler-Browne G, Heimbürger M, Logeart D, Allen PD et al.** Troponin T mRNA and protein isoforms in the human left ventricle: pattern of expression in failing and control hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:3043-3055.
17. **Morano I, Osterman A, Arner A.** Rate of active tension development from rigor in skinned atrial and ventricular cardiac fibres from swine following photolytic release of ATP from caged ATP. *Acta Physiol Scand* 1995;154:343–353.

18. **Näbauer M, Kääh S.** Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37:324-334.
19. **Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H.** Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation.* 1999;99:641-648.
20. **Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G, et al.** Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1995;92:778-784.
21. **Mende U, Kagen A, Meister M, Neer EJ.** Signal transduction in atria and ventricles of mice with transient cardiac expression of activated G protein alpha(q). *Circ Res* 1999;85:1085-1091.
22. **Papp Z, Szabo A, Barends JP, Stienen GJ.** The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 2002;543:177-189.
23. **Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, Paulus WJ, van der Velden J, Stienen GJM, Papp Z.** Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res* 2005;67:225-233.
24. **Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitas K, Labeit S, Granzier H.** Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 2000;86: 59-67.
25. **Kentish JC, Stienen GJM.** Differential effects of length on maximum force production and myofibrillar ATPase activity in rat skinned cardiac muscle. *J Physiol* 1994;475:175-184.

26. **Pate E, Cooke R.** A model of crossbridge action: the effects of ATP, ADP and Pi. *J Muscle Res Cell Motil* 1989;10:181–196.
27. **Regnier M, Morris C, Homsher E.** Regulation of the cross-bridge transition from a weakly to strongly bound state in skinned rabbit muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995;269: C1532–C1539.
28. **Tesi C, Colomo F, Nencini S, Piroddi N, Poggesi C.** The effect of inorganic phosphate on force generation in single myofibrils from rabbit skeletal muscle. *Biophys J* 2000;78:3081–3092.
29. **Piroddi N, Belus A, Eiras S, Tesi C, van der Velden J, Poggesi C, Stienen GJ.** No direct effect of creatine phosphate on the cross-bridge cycle in cardiac myofibrils. *Pflügers Arch* 2006;452:3–6.
30. **Adhikari BB, Regnier M, Rivera AJ, Kreutziger KL, Martyn DA.** Cardiac length dependence of force and force redevelopment kinetics with altered cross-bridge cycling. *Biophys J* 2004;87:1784–1794.
31. **de Jonge HW, Dekkers DH, Houtsmuller AB, Sharma HS, Lamers JM.** Differential Signaling and Hypertrophic Responses in Cyclically Stretched vs Endothelin-1 Stimulated Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Cell Biochem Biophys* 2007;47:21-32.
32. **Huang L, Wolska BM, Montgomery DE, Burkart EM, Buttrick PM, Solaro RJ.** Increased contractility and altered Ca(2+) transients of mouse heart myocytes conditionally expressing PKCbeta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1114-C1120.
33. **Takeishi Y, Chu G, Kirkpatrick DM, Li Z, Wakasaki H, Kranias EG et al.** In vivophosphorylation of cardiac troponin I by protein kinase Cbeta2 decreases cardiomyocyte calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts. *J Clin Invest* 1998;102:72-78

34. **Edes IF, Czuriga D, Csanyi G, Chlopicki S, Recchia FA, Borbely A, Edes I, Velden JV, Stienen GJ, Papp Z.** 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.
35. **Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA.** Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 1997;96:1495-1500.
36. **Rundell VL, Manaves V, Martin AF, De Tombe PP.** Impact of β -myosin heavy chain isoform expression on cross-bridge cycling kinetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H896-H903.
37. **Kentish JC.** Combined inhibitory actions of acidosis and phosphate on maximum force production in rat skinned cardiac muscle. *Pflügers Arch* 1991;419:310-318.
38. **Palmer S, Kentish JC.** Roles of Ca^{2+} and crossbridge kinetics in determining the maximum rates of Ca^{2+} activation and relaxation in rat and guinea pig skinned trabeculae. *Circ Res* 1998;83:179-186.
39. **Fitzsimons DP, Moss RL.** Strong binding of myosin modulates lengthdependent Ca^{2+} activation of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1998;83:602-607.
40. **Fitzsimons DP, Patel JR, Moss RL.** Cross-bridge interaction kinetics in rat myocardium are accelerated by strong binding of myosin to the thin filament. *J Physiol* 2001;530:263-272.
41. **Fukuda N, Kajiwara H, Ishiwata S, Kurihara S.** Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. *Circ Res* 2000;86:E1-E6.
42. **Hofmann PA, Fuchs F.** Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C. *Am J Physiol Cell Physiol* 1987;253:C541-C546.

43. **Hofmann PA, Fuchs F.** Bound calcium and force development in skinned cardiac muscle bundles: effect of sarcomere length. *J Mol Cell Cardiol* 1988;20:667–677.
44. **Campbell K.** Rate constant of muscle force redevelopment reflects cooperative activation as well as cross-bridge kinetics. *Biophys J* 1997;72: 254–262.
45. **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.
46. **Wolff MR, McDonald KS, Moss RL.** Rate of tension development in cardiac muscle varies with level of activator calcium. *Circ Res* 1995;76:154–160.
47. **Martyn DA, Adhikari BB, Regnier M, Gu J, Xu S, Yu LC.** Response of equatorial x-ray reflections and stiffness to altered sarcomere length and myofilament lattice spacing in relaxed skinned cardiac muscle. *Biophys J* 2004;86:1002–1011.
48. **Smith SH, Fuchs F.** Effect of ionic strength on length-dependent Ca^{2+} activation in skinned cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:2115–2125.
49. **Cazorla O, Le Guennec JY, White E.** Length-tension relationships of sub-epicardial and sub-endocardial single ventricular myocytes from rat and ferret hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:735–744.
50. **Korte FS, McDonald KS, Harris SP, Moss RL.** Loaded shortening, power output, and rate of force redevelopment are increased with knockout of cardiac myosin binding protein-C. *Circ Res* 2003;93:752–758.
51. **Vannier C, Chevassus H, Vassort G.** Ca-dependence of isometric force kinetics in single skinned ventricular cardiomyocytes from rats. *Cardiovasc Res* 1996;32:580–586.

52. **Stelzer JE, Patel JR, Olsson MC, Fitzsimons DP, Leinwand LA, Moss RL.** Expression of cardiac troponin T with COOH-terminal truncation accelerates cross-bridge interaction kinetics in mouse myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1756–H1761.
53. **Baker AJ, Figueredo VM, Keung EC, Camacho SA.** Ca²⁺ regulates the kinetics of tension development in intact cardiac muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;275:H744–H750.
54. **Mende U, Semsarian C, Martins DC, Kagen A, Duffy C, Schoen FJ 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.
55. **van der Velden J, V, Moorman AF, Stienen GJ.** Age-dependent changes in myosin composition correlate with enhanced economy of contraction in guinea-pig hearts. *J Physiol* 1998;507:497-510.
56. **Metzger JM, Wahr PA, Michele DE, Albayya F, Westfall MV.** Effects of myosin heavy chain isoform switching on Ca²⁺-activated tension development in single adult cardiac myocytes. *Circ Res* 1999;84:1310-1317.
57. **van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ et al.** Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 2003; 57:37-47.
58. **Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H et al.** Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:265-272.

59. **Takeishi Y, Ping P, Bolli R, Kirkpatrick DL, Hoit BD, Walsh RA.** Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2000;86:1218-1223.
60. **Goldspink PH, Montgomery DE, Walker LA, Urboniene D, McKinney RD, Geenen DL et al.** Protein kinase C epsilon overexpression alters myofilament properties and composition during the progression of heart failure. *Circ Res* 2004;95:424-432.
61. **Montgomery DE, Rundell VL, Goldspink PH, Urboniene D, Geenen DL, de Tombe PP et al.** Protein kinase C epsilon induces systolic cardiac failure marked by exhausted inotropic reserve and intact Frank-Starling mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1881-H1888.
62. **Jideama NM, Noland TA, Jr., Raynor RL, Blobe GC, Fabbro D, Kazanietz MG et al.** Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *J Biol Chem* 1996;271:23277-23283.
63. **Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ et al.** Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res* 2007;101:195-204.
64. **Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM.** Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J Clin Invest* 1996;8:167-176.
65. **Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R et al.** PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 2004; 10:248-254.

66. **Hahn HS, Marreez Y, Odley A, Sterbling A, Yussman MG, Hilty KC et al.**
Protein kinase C alpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circ Res* 2003;93:1111-1119.

9. 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. *Orvostudományok 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 sarcomere 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.*

Facskó 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, **Édes 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.*

10. Köszönetnyilvánítás

Megtisztelő kötelességem e helyen köszönetet mondani elsősorban Dr. Papp Zoltánnak a DEOEC Kardiológiai Intézet Klinikai Fiziológiai Tanszék vezetőjének, témavezetőmnek. Köszönöm, hogy az értekezésem elkészítését lehetővé tevő kísérletes munkában és a disszertáció elkészítésében támogatott. Ugyancsak köszönöm Dr. Tóth Attila adjunktusnak és Mányiné Siket Ivetta laboratóriumi asszisztensnek a biokémiai jellegű kísérletek elvégzésében, lebonyolításában és értékelésében nyújtott szakszerű segítséget.

Köszönettel tartozom minden egyes jelenlegi és volt munkatársamnak, akik a vizsgálatokban, az értekezés elkészítésében önzetlen segítséget nyújtottak. Külön köszönetemet szeretném kifejezni a Klinikai Fiziológiai Tanszék valamennyi dolgozójának, akik folyamatosan segítettek tudományos munkámat.

Külön köszönettel tartozom családomnak, édesanyámnak és édesapámnak, akik a tudományos szárnypróbálgatásaim során példát mutattak.

11. Bekötött publikációk