

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A SZÍVIZOM FUNKCIÓ ÉS A KONTRAKTILIS FEHÉRJÉK
VÁLTOZÁSAI HUMÁN SZÍVELÉGTELENSÉGBEN**

Dr. Borbély Attila



**Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék**

Debrecen

2005

EGETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A szívizom funkció és a kontraktilis fehérjék változásai humán
szívelégtelenségben**

Dr. Borbély Attila

Témavezetők:

Dr. Papp Zoltán, egyetemi docens

Dr. Jolanda van der Velden, egyetemi docens

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék

Debrecen

2005

BEVEZETÉS

A nyomás- (magasvérnyomás betegség) és térfogat-túlterhelés (mitrális billentyű elégtelenség), az iszkémia-reperfúziós károsodás, a miokardiális infarktus, valamint az öröklött vagy szerzett cardiomyopathiák következtében kialakuló szívelégtelenség napjainkban az egyik vezető haláloki tényező. A szívelégtelenség a kórházi felvételek egyik leggyakoribb okaként világszerte jelentős egészségügyi problémát okoz. A betegség előfordulási gyakorisága a népesség öregedésével párhuzamosan folyamatosan növekszik (a népesség 1%-a a nyugati országokban). A szívelégtelenség kezelésében elért jelentős eredmények ellenére a betegség prognózisa továbbra is kedvezőtlen.

A szívelégtelenség definíciója, tünetei és pathomechanizmusa

A szívelégtelenség számos definíciója látott napvilágot az elmúlt években, azonban ezek egyike sem írja le megfelelően a kórképet. Ennek egyik oka a betegség komplexitása, mely a csökkent perctérfogattal, fokozott vénás visszaáramlással és számos, a szívizomban végbemenő, az elégtelen szív progresszív degenerálódásával járó molekuláris változással jellemezhető.

A szívelégtelenség tünetei a pulmonális pangás (terhelésre jelentkező nehézlégzés, orthopnoe, rohamokban jelentkező éjszakai nehézlégzés), a szisztémás vénás pangás (perifériás ödéma, ascites, hasi fájdalom, hányinger) és az alacsony perctérfogat (csökkent fizikai terhelhetőség, a mentális állapot változása, zavartság) következtében alakulnak ki. A betegség súlyosságának megítélésére a New York Heart Association (NYHA) által ajánlott osztályozást széles körben használják.

A szívelégtelenségnek számos kiváltó oka van, melyek megoszlása és gyakorisága jelentősen változott az elmúlt évtizedekben. Jelenleg a fő kiváltó tényező a koszorúsér betegség, mely a Framingham tanulmány szerint az esetek 67%-ban áll a betegség hátterében. Ezen betegek 57%-ában magasvérnyomás betegség is kimutatható volt. A szívbillentyűk elváltozásai a betegek 10%-ban, a cardiomyopathiák (elsősorban a dilatatív cardiomyopáthia) pedig mintegy 20%-ban tehető felelőssé a szívelégtelenség kialakulásáért.

A kiváltó októl függetlenül az előrehaladott szívelégtelenség egy olyan komplex kórképet jelöl, melyet romló szívizomfunkció, a szívizom kóros átépülése, megváltozott hemodinamika, a neurohumoralis rendszer aktivációja, citokinek fokozott termelődése és az endothel kóros működése jellemez.

A miokardiális fehérjék szerkezeti és funkcionális változásai szívelégtelenségben

A szívelégtelenség során a szívizomzatban jellegzetes funkcionális, biokémiai és molekuláris változások mennek végbe. A szívizomzat csökkent kontraktilitásának hátterében a kalciumionok (Ca^{2+}) ritmikus felszabadulásáért és visszavételéért felelős molekulák szerkezeti és funkcionális változásai, a kontraktilis rendszer megváltozott Ca^{2+} -érzékenysége vagy az aktin-miozin keresztkötési ciklus kóros működése állhat. A myofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységre vonatkozó adatok ellentmondásosak, változatlan, csökkent és/vagy növekedett Ca^{2+} -érzékenységről számolnak be szívelégtelenségben.

A myofilamentáris fehérjék sérülése a szívizom iszkémia-reperfúziós károsodását, valamint egyes gyulladásos citokinek kóros mértékű felszabadulását követően is bekövetkezhet. A végstádiumú szívelégtelenség során számos, a kontraktilis fehérjék expresszióját és foszforilációs állapotát érintő változásokról is számos adat áll rendelkezésünkre. Mindezen változások hozzájárulhatnak a szisztolés és diasztolés funkció szívelégtelenség során megfigyelhető romlásáért.

Peroxinitrit és szívelégtelenség

Irodalmi adatok alapján a congestív szívelégtelenség kialakulásában szerepet játszhat a nitrogén-monoxidból és szuperoxid anionból fiziológiás körülmények között is képződő reaktív nitrogén gyök, a peroxinitrit megnövekedett termelődése. Állatkísérletes modellekben a miokardiális fehérjék peroxinitrit-indukált károsodása (nitrotirozin oldalláncok képződése), valamint a szív pumpafunkciójának romlása között szoros összefüggés mutattak ki. Peroxinitrittel vagy citokinekkal kezelt patkány „dolgozó szív” preparátumokon csökkent a szívizomzat ATP felhasználása, mely alapján a peroxinitrit kontraktilis funkcióra kifejtett közvetlen hatása feltételezhető. A miofibrilláris kreatin kináz 40 kDa molekulatömegű izoformájának nitrálódását igazolták doxorubicin-kezelt egérszívekben és peroxinitrit-kezelt patkányszív trabekulákban. Az eddigi kísérletes eredmények alapján megállapítható, hogy a peroxinitrit-indukált nitrotirozin-oldallánc képződés nemcsak egyetlen célfehérje károsodását jelenti sem állatokból származó, sem humán szívpreparátumokban. A peroxinitrit-indukált szerkezeti és funkcionális változások a miokardiális fehérjékben létrejövő nitrotirozin oldalláncok mennyiségével mutatnak összefüggést. Azon mechanizmusok azonban, melyek a fehérjékben létrejövő nitrotirozin oldalláncok képződésén keresztül a csökkent szívfunkcióhoz vezetnek – különösképpen a humán szívben- ismeretlenek.

Diasztolés diszfunkció, diasztolés szívelégtelenség

A kardiovaszkuláris betegségek (magasvérnyomás betegség, koszorúsér betegség, cardiomyopáthiák) gyakran vezetnek szisztolés és diasztolés kamrai diszfunkcióhoz. Közel minden szisztolés diszfunkcióban szenvedő betegben kismértékű, a kamraizomzat kóros relaxációjában, illetve tágulékonyságának csökkenésében megnyilvánuló diasztolés funkciózavar is megfigyelhető. A megőrzött bal kamrai ejekciós frakcióval (LVEF) rendelkező betegek is mutathatnak jelentős romlást a diasztolés szívfunkcióikban (*izolált diasztolés diszfunkció*). Nagy populációkra kiterjedő tanulmányok alapján ezen állapot megközelítőleg ötször gyakrabban kerül felismerésre, mint a bal kamrai szisztolés diszfunkció.

A bal kamrai diasztolés diszfunkcióval ellentétben a *diasztolés szívelégtelenség* egy klinikai szindrómát jelöl. A csökkent LVEF-el társuló szívelégtelenséggel szemben a megőrzött LVEF mellett kialakuló szívelégtelenséget diasztolés szívelégtelenségnek nevezzük. Diasztolés szívelégtelenségről akkor beszélünk, ha a bal kamra – relaxációs zavar vagy emelkedett kamrai falfeszülés miatt - képtelenné válik megfelelő térfogatú vér befogadására a kielégítő perctérfogat fenntartásához, vagy erre csak kórosan emelkedett kamrai nyomás mellett képes.

A diasztolés szívelégtelenség napjainkban a szívelégtelenségben szenvedő betegek mintegy 49%-ban diagnosztizálható. A diagnózis felállítása három, egyidejűleg fennálló kritériumon alapszik: 1. a congestív szívelégtelenségre utaló jelek vagy tünetek megléte 2. megőrzött LVEF 3. kóros bal kamrai relaxációra, telődésre, tágulékonyságra utaló echocardiographiás adatok.

A diasztolés szívelégtelenség és az izolált diasztolés bal kamrai diszfunkció egyre növekvő felismerésének ellenére a háttérükben álló folyamatokról kevés adat áll rendelkezésünkre. Nem tisztázott, hogy diasztolés funkciózavar vagy enyhe fokú szisztolés diszfunkció eredményezi-e a diasztolés szívelégtelenséget. Fontos kérdés, hogy magyarázható-e a diasztolés bal kamrai diszfunkció a szívizomsejtek kontraktilis tulajdonságainak változásaival vagy az extracelluláris tér fibrotikus átépülésével. A diasztolés szívelégtelenség patofiziológiájával kapcsolatos kérdések megválaszolása nagyrészt a rendelkezésre álló nekropsziás és biopsziás anyag hiánya miatt nehézségekbe ütközik. Ilyen minták vizsgálata lehetővé tenné a betegekben mért hemodinamikai paraméterek, valamint a sejt- és molekulák szintjén megfigyelt változások összehasonlítását.

Ca²⁺-érzékenyítők szívelégtelenségben

A Ca²⁺-érzékenyítők a pozitív inotróp szerek egy új generációját képviselik. A szívizom teljesítményét az intracelluláris Ca²⁺-terhelés növelése nélkül, közvetlenül a kontraktilis fehérjékre hatva érik el. Ennek köszönhetően nem hozzák létre az emelkedett intracelluláris Ca²⁺ koncentráció következtében kialakuló nem kívánatos hatásokat. A Ca²⁺-érzékenyítők a szív kontraktilitását az oxigénfogyasztás emelése és súlyos aritmiák kiváltása nélkül fokozzák. A szerek terápiás alkalmazásának következményei azonban még nem teljesen ismertek.

Az izometriás erőt és annak Ca²⁺-érzékenységét a vékony filamentumokon elhelyezkedő Ca²⁺-szabályozó fehérjék, valamint a vastag filamentumok között kialakuló keresztkötések határozzák meg. A miofilamentáris rendszer erőgenerálására és Ca²⁺-érzékenységére jelentős hatással vannak az iszkémia alatt felszaporodó intracelluláris metabolitok. (pl. H⁺ és anorganikus foszfát (P_i)), melyek egyúttal befolyásolhatják a Ca²⁺-érzékenyítők terápiás hatását is.

Az EMD 57033, a 5-[1-(3,4-dimethoxybenzoyl)-1,2,3,4-tetrahydro-6-quinolyl]-6-methyl-3,6-dihydro-2H-1,3,4-thiadiazin-2-one) pozitív enantiomer formája, az EMD 53998, az aktin-miozin keresztkötési ciklust befolyásolja és antagonizálja a P_i hatását. Humán szívpreparátumokon az EMD 57033 pozitív inotróp hatását egy kifejezett negatív luzitróp hatás kísérte. Ezen negatív luzitróp hatáshoz egy Ca²⁺ hiányában kifejlődő erőkomponens társult sertés nyúzott szívtrabekulákon, melynek megjelenését humán szívpreparátumokon is megfigyelték.

Az OR-1896, az N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)phenyl] acetamide negatív enantiomere, a jelenleg is klinikai használatban lévő levosimendan aktív metabolitja kismértékű Ca²⁺-érzékenyítő hatást fejt ki intakt nyúl papilláris izmokon, permeabilizált tengerimalac szívizomsejteken és intakt kutya kamrai trabekulákon. Feltételezik, hogy az OR-1896 - levosimendanhhoz hasonló szerkezete révén - a troponin C (TnC) Ca²⁺-kötött állapotát stabilizálja. Az OR-1896 humán preparátumokra kifejtett Ca²⁺-érzékenyítő hatásával kapcsolatban azonban kevés adat áll rendelkezésünkre.

CÉLKITŰZÉSEK

Jelen tanulmányunkban a humán szívizom kontraktilis rendszerében fiziológiás és kóros körülmények között bekövetkező funkcionális és strukturális változásokat vizsgáltuk. A *Bevezetésben* bemutatott kísérletes eredmények alapján a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

I. *Peroxinitrit és szívelégtelenség*

- a peroxinitrit-mediált miofibrilláris fehérjekárosodás hátterében álló folyamatok feltárása humán szívizomsejteken
- az *in vitro* peroxinitrit kezelés Ca^{2+} -aktivált erőgenerálásra, a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységére és az aktin-miozin keresztkötési kinetikára kifejtett hatásait tanulmányozása
- a peroxinitrit-mediált kontraktilis diszfunkcióért felelős célfehérjék azonosítása

II. *Diasztolés diszfunkció, diasztolés szívelégtelenség*

- a szívizomsejt funkció, a kollagén tartalom és a miokardiális fehérje összetétel *in vivo* diasztolés funkcióhoz való viszonyának vizsgálata diasztolés szívelégtelenségben szenvedő betegekből diagnosztikus szívkatóterezés során nyert bal és jobb kamrai endomyocardialis biopsziák felhasználásával
- összefüggés keresése az *in vitro* mért szívizomsejt funkció és az *in vivo* meghatározott bal kamrai hemodinamikai paraméterek között

III. *Ca^{2+} -érzékenyítők szívelégtelenségben*

- Donor és szívelégtelenségben (NYHA IV) szenvedő betegekből származó szívizomsejteken két Ca^{2+} -érzékenyítő vegyület (OR-1896 és EMD 53998) hatásainak összehasonlítása kontroll és modell iszkémiás körülmények között.

ANYAGOK és MÓDSZEREK

2.1. Erőmérés permeabilizált izolált humán szívizomsejteken

2.1.1. Szívizomsejt izolálás

A szívizomsejteket a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt humán szívizomminták felolvasztása után mechanikus úton izoláltuk. A membránjaitól megfosztott szívizomsejtet szilikon ragasztó segítségével rögzítettük a mechanikai mérőrendszeren.

2.1.2. Mérőoldatok

Az erőmérések során használt kalciummentes relaxáló oldat (pCa 9) és a Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatok (pCa 7-4,5) összetételét Fabiato szerint (1979) számítottuk.

2.1.3. Kísérleti protokoll

Az izometriás kontraktilis erőt a szívizomsejt relaxáló oldatból Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatba történő átvitelét követően mértük. Az izometriás csúcserő (F_{total}) kifejlődése után meghatároztuk az aktin-miozin ciklus sebességére jellemző kinetikai paramétert (k_{tr}). Az un. passzív erőkomponenst (F_{passive}) a Ca^{2+} kontraktúrák után relaxáló oldatban mértük. A Ca^{2+} -aktivált izometriás erőt (F_{active}) a következő képlet szerint számoltuk: $F_{\text{active}} = F_{\text{total}} - F_{\text{passive}}$. A kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének (pCa_{50}) meghatározására a szubmaximális Ca^{2+} koncentrációknál mért erőértékeket a maximális aktivációnál kapott erőértékekre (F_{max}) normalizáltuk.

2.1.4. Ca^{2+} -érzékenyítő, peroxinitrit vagy enzim-kezelés

A Ca^{2+} -érzékenyítő EMD 53998-at és OR-1896-ot a finn Orion Pharma cég bocsátotta rendelkezésünkre. Az alacsony hidrogén peroxid tartalmú peroxinitritet a Calbiochem-től, protein kináz A enzim katalitikus alegységét a Sigmától rendeltük.

2.2. Biokémiai módszerek

2.2.1. Western immunoblot

A peroxinitritkezelés ($1\text{--}1000\text{ }\mu\text{M}$) hatására a miofibrilláris fehérjékben létrejövő nitro tirozin oldalláncok képződését és az α -aktinint SDS-poliacrylamid gélelektroforézist (6-18% grádiens gélek) követően Western immunoblottal vizsgáltuk. A fehérjéket biotinált

másodlagos antitestek és kemilumineszcens technika segítségével tettük láthatóvá. Néhány esetben ezt a módszert a már kötődött antitestek eltávolítása után megismételtük (stripping).

2.2.2. Dot blot

A 0-500 μM koncentrációjú peroxinitrittel kezelt sejthomogenizátumot nitrocellulóz membránra vittük fel. A jelintezítást hagyományos, kereskedelmi forgalomban elérhető program segítségével mértük.

2.2.3. Immunprecipitáció

Az immunprecipitációs protokoll alkalmazása előtt a humán permeabilizált kamrai szívizomsejteket azonos koncentrációjú (500 μM) aktív és inaktív peroxinitrittel kezeltük, majd relaxáló oldatban homogenizáltuk.

2.2.4. Az endomiokardiális szívizombiopsziák vizsgálata

Az endomiokardiális szívizombiopsziák kollagéntartalmát elastica von Gieson festett szívizommetszeteken határoztuk meg és kollagén térfogat arányában (collagen volume fraction-CVF) fejeztük ki. A betegeket szívizommintáik növekvő CVF értékeinek megfelelően alacsony (CVF 0-5% között-Class I), közepes (CVF 5-10% között-Class II) és magas (CVF-10-15% között-Class III) kollagéntartalmú csoportokba soroltuk.

A minták miozin nehéz lánc, dezmin, aktin, troponin T (TnT), tropomiozin, troponin I (TnI), miozin könnyű lánc 1 és 2 (MLC-1 és MLC-2) tartalmát és ezen fehérjék degradációját egydimenziós SDS poliacrylamid gél elektroforézis segítségével vizsgáltuk.

2.2.5. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

A TnI foszforilációs állapotának meghatározására a teljes hosszúságú, valamint kizárólag a defoszforilált TnI-re specifikus monoklonális antitesteket és ELISA módszert használtunk. A defoszforilált TnI-re kapott jel intenzitását a teljes molekula által adott jel erősségéhez viszonyítottuk.

2.3. Adatfeldolgozás, statisztika

A Ca^{2+} -erő összefüggéseket az alábbi módosított Hill egyenlettel illesztettük:

$$F_{\text{total}} = F_{\text{max}} \times [\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}} / (\text{Ca}_{50}^{n_{\text{Hill}}} + [\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}}) + F_{\text{passive}}$$

, ahol F_{total} az adott Ca-koncentrációnál $[\text{Ca}^{2+}]$ elért steady-state erőérték; F_{max} a maximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál kifejlődő Ca^{2+} -aktivált erő, F_{passive} pedig a Ca^{2+} -mentes oldatban mért izometriás

erőérték. Ca_{50} (vagy pCa_{50}) a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységét jellemző $[Ca^{2+}]$, melynél $F_{total} - F_{passive} = F_{max}/2$. A Hill koefficiens (n_{Hill}), a szigmoid Ca^{2+} -erő összefüggés meredekségét jellemző állandó.

A körkörös bal kamrai (LV) végdiasztolés falfeszülést (σ) az LV ellipszoid modelljét alapul véve a következő képlettel számítottuk:

$$\sigma = PD/2h \times [1 - (h/D) - (D^2/2L^2)]$$

, ahol P az LV végdiasztolés nyomást, h az LV szívtultrahang segítségével meghatározott LV falvastagságát, D és L pedig az LV haránt és hosszátmérőjét jelölik.

A radiális miokardiális stiffness modulust (E) az alábbi formula szerint számoltuk:

$$E = \Delta\sigma_R / \Delta\varepsilon_R = \Delta P / (\Delta h / h) = -\Delta P / \Delta \ln h$$

a radiális feszülés ($\Delta\sigma_R$) kialakulását a ΔP -hez viszonyítva egyenlő nagyságúnak, de ellenkező előjelűnek, valamint a radiális terhelést ($\Delta\varepsilon_R$) a pillanatnyi falvastagsághoz viszonyított relatív falvastagodással (Δh) megegyezőnek feltételeztük. Mivel $\Delta h / h = \Delta \ln h$, E a $P - \ln h$ összefüggés meredekségével egyenlő.

Az adatokat átlag $\pm$ SEM (vagy SD) formájában adtuk meg. A statisztikai szignifikancia határának a $P < 0.05$ -öt tekintettük. A különböző csoportokat ANOVA teszttel hasonlítottuk össze, az egyszerű összehasonlításra páros vagy páratlan Student-féle t-próbát használtunk. Az egy és többváltozós lineáris regressziós analíziseket az SPSS program segítségével végeztük.

A PEROXINITRIT-MEDIÁLT FEHÉRJE-NITRÁLÓDÁS HATÁSA A HUMÁN SZÍVIZOMSEJTEK KONTRAKTILITÁSÁRA

EREDMÉNYEK

A peroxinitrit koncentráció-függő módon csökkentette a permeabilizált humán szívizomsejtek maximális Ca^{2+} -aktivált erejét (pCa 4,75-nél mért $F_{\max}$). Ugyanakkor a lebomlott, biológiailag inaktív peroxinitrit nem volt hatással az izometriás erőre. Az erőmérésekkel párhuzamosan nitro tirozin specifikus mono- és poliklonális antitestek felhasználásával végzett dot blot analízis a peroxinitrit koncentráció növelésével emelkedő fehérje-nitrálódást igazolt az izolált szívizomsejtekben. A peroxinitrit kezelés a Ca^{2+} -aktivált izometriás erőt ($F_{\max}$: $28 \pm 2 \text{ kN/m}^2$) a fehérjenitrálódás nagymértékű növekedésével párhuzamosan nullára csökkentette (IC_{50} : $55 \pm 4 \mu\text{M}$).

A peroxinitrit hatására létrejövő kontraktilis változások hátterében álló folyamatok feltárására meghatároztuk az izometriás erő Ca^{2+} koncentráció függését és az aktin-miozin keresztkötési ciklus sebességére jellemző sebességi állandót (k_{tr}) $50 \mu\text{M}$ peroxinitrittel való kezelés előtt és után. $50 \mu\text{M}$ peroxinitrit az általunk mért valamennyi Ca^{2+} koncentrációnál csökkentette a Ca^{2+} -aktivált erőt. A kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenysége (pCa_{50}) és a Ca^{2+} -erő összefüggés meredekségére jellemző paraméter (nHill) nem változott szignifikánsan a kezelést követően (pCa_{50} : $5,89 \pm 0,02$ vs. $5,86 \pm 0,04$; nHill: $2,22 \pm 0,11$ vs. $2,42 \pm 0,25$; $50 \mu\text{M}$ peroxinitrit előtt és után ($P > 0,05$)). A maximális (pCa 4,75) és szubmaximális Ca koncentrációknál mért, az aktin-miozin keresztkötési ciklus sebességére jellemző sebességi állandókban (k_{tr}) sem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kezelést követően ($k_{tr, \max}$: $1,14 \pm 0,03 \text{ 1/s}$ and $1,05 \pm 0,07 \text{ 1/s}$ $50 \mu\text{M}$ peroxinitrit előtt és után). Ugyanakkor $50 \mu\text{M}$ peroxinitrit a szívizomsejtek harántcsíkolatának nagymértékű elmosódását okozta, melyet a passzív erőkomponens (F_{passive}) növekedése kísért ($2,1 \pm 0,1 \text{ kN/m}^2$ vs. $2,5 \pm 0,2 \text{ kN/m}^2$ $n=57$ sejt; $P < 0,05$). Kontroll erőmérésekkel igazoltuk, hogy a megfigyelt kontraktilis változások a peroxinitrit kezelés következtében alakultak ki, és nem a peroxinitritben minimális mennyiségben jelenlévő hidrogén peroxid, valamint a peroxinitrit bomlástermékeinek (nitrit és nitrát) tulajdoníthatók.

A következőkben azon nitro tirozinálódott fehérjék azonosítására tettünk kísérletet, melyek felelőssé tehetők a szívizomsejtekben mért kontraktilis változásokért.

A nitro tirozinalódott fehérjéket molekulatömegük alapján SDS-poliacrylamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd nitro tirozin specifikus antitesttel Western

immunoblottot végeztünk. A peroxinitrit alacsonyabb koncentrációkban (25-100 μM) egy kb. 100 kDa molekulatömegű fehérjében okozott nitrotirozin képződést. A peroxinitrit magasabb koncentrációinak (250-500 μM) hatására számos, 100 kDa alatti és feletti fehérjében is nitrotirozin képződést detektáltunk.

A 100 kDa-os fehérje molekulatömege az α -aktininéval mutatott hasonlóságot. Annak igazolására, hogy a kérdéses fehérje valóban az α -aktinin, immunprecipitációt végeztünk. A szívizom homogenizátumokat először 500 μM aktív és lebomlott, inaktív peroxinitrittel kezeltük. A mintákat ezt követően a két részre osztottuk: a minták egyik részéhez α -aktinin specifikus antitestet, a másik részéhez azonos fajból származó immunglobulint (IgG) adtunk. Az immunprecipitáció hatékonyságát α -aktininre szelektív antitesttel ellenőriztük. A kontroll mintával ellentétben az α -aktinin magasságában a fehérje jól elkülönült a többi miofibrilláris fehérjétől mind a kezelt és kezeletlen mintákban. A kötődött immunkomplexek eltávolítása után (stripping) ugyanezeket a nitrocellulóz membránokat nitrotirozin specifikus antitestekkel is előhívtuk. A módszer nagy biztonsággal azonosította az α -aktinint, mint a peroxinitrit-kezelés hatására nitrálódó miofibrilláris fehérjét.

MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az α -aktinin nitrálódásának mértéke és a humán szívizomsejtek Ca^{2+} -aktivált erőgenerálása között fordított arányosság van. Eredményeink felvetik az α -aktinin nitrálódásának szerepét megnövekedett peroxinitrit termeléssel járó patológiás körülmények között, mint a humán szív csökkent kontraktilitásáért felelős egyik lehetséges tényezőt.

A peroxinitrit inkább strukturális, mint regulatórikus változásokat okoz a kontraktilis rendszerben, hiszen 50 μM ($\sim\text{IC}_{50}$ érték) peroxinitrit sem az erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenységre (pCa_{50} és n_{Hill}), sem az aktin-miozin ciklus sebességére (k_{tr}) nem volt szignifikáns hatással. Továbbá a maximális erő csökkenésével párhuzamosan a szívizomsejtek harántcsíkolatának nagymértékű elmosódását, valamint a passzív erőkomponens növekedését tapasztaltuk peroxinitrit kezelést követően. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a peroxinitrit-indukált kontraktilis változások az aktív erőgeneráló keresztkötések számának csökkenésével magyarázhatók. A humán α -aktinin molekula viszonylag tirozinban gazdag (2,9%) struktúrfehérje, mely a Z-vonal és a szarkomer integritásának fenntartásában tölt be fontos szerepet. Ezért elképzelhető, hogy a peroxinitrit-indukált nitrálódás következtében a fehérje szerkezetében létrejövő változások tehetők felelőssé a humán szívizomsejtekben megfigyelt funkcionális leromlásért.

A vizsgálatban alkalmazott peroxinitrit koncentráció valószínűleg magasabb, mint a patológiás körülmények között előforduló. Alacsonyabb peroxinitrit koncentráció hosszabb ideig történő alkalmazása valószínűleg jobban utánozná az *in vivo* állapotokat. Ennek a kezelési módnak azonban a peroxinitrit fiziológiás pH-n mért rövid féléletideje szab határt. Az *in vitro* peroxinitrit kezelés eredményeit a benne kis koncentrációban megtalálható hidrogén peroxid és a peroxinitrit bomlástermékei befolyásolhatják. Ezen nem specifikus hatások lehetséges szerepét hidrogén peroxiddal, nitrittel és nitráttal végzett kontroll kísérletekkel zártuk ki.

A szívizomfehérjék peroxinitrit-indukált nitrálódását, a miofibrillumok elvékonyodását és a harántcsíkot szabálytalanná válását doxorubicinnel kezelt egerekben és peroxinitrit expozíciónak kitett patkány trabekulákban is leírták. Eredményeinkhez hasonlóan a peroxinitrit kezelés a Ca^{2+} -érzékenység megváltoztatása nélkül csökkentette a maximális Ca^{2+} -aktivált erőt permeabilizált patkányszív trabekulákon. Számos miofibrilláris fehérje nitrálódását leírták az előbbi állatkísérletes modellekben: több kutatócsoport a 40 kDa molekulatömegű miofibrilláris kreatin kináz nitrálódását tette felelőssé a Ca^{2+} -aktivált erőben bekövetkezett változásokért. Humán szívizomsejteken mért funkcionális és biokémiai eredményeink egy új, az állatkísérletekből származó adatoktól eltérő mechanizmus lehetséges szerepére utalnak. Az izometriás kontraktilis erőt csökkentő peroxinitrit koncentrációk alkalmazáskor csak az α -aktinin nitrálódása volt megfigyelhető. Másokhoz hasonlóan, magas peroxinitrit koncentrációk (250-500 μM) használatkor azonban számos más fehérjékben (feltehetően miozin nehéz lánc, miofibrilláris kreatin kináz) is detektáltunk nitrotirozin-oldallánc képződést. Eredményeink alapján azonban az IC_{50} körüli peroxinitrit koncentráció alkalmazásakor a kreatin kináz nitrálódása nem valószínűsíthető: az enzim gátlása a MgADP MgATP -vé történő regenerációjának zavarán keresztül a keresztkötési ciklus sebességének csökkenéséhez vezetne. 50 μM peroxinitrit alkalmazása után azonban nem találtunk különbséget a k_{tr} paraméterben és annak Ca^{2+} -érzékenységében. Ezen peroxinitrit koncentráció hatására létrejövő kontraktilis diszfunkció legnagyobb valószínűséggel szerkezeti változásoknak, feltehetőleg az α -aktinin nitrálódásának következtében alakulhat ki.

A peroxinitrit-indukált fehérje nitrálódás mértéke és bizonyos miokardirdiális fehérjék expressziója, valamint tirozin-tartalma között összefüggést találtak patkányszív trabekulákban. Természetesen a fehérjék térbeli szerkezete és mikrokörnyezete befolyásolhatja a tirozin oldalláncok hozzáférhetőségét a nem enzimátikus nitrálódási reakció számára. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a miofibrilláris rendszer komplex felépítése miatt

az α -actinin nitrálódása más fehérjékhez képest nagyobb valószínűséggel következik be az emberi szívben, mint állatszívekben.

Munkákban a miofibrilláris rendszer peroxinitrit-indukált funkcionális károsodásának háttérében álló folyamatokat vizsgáltuk humán szívműködéseken. A szívműködés peroxinitrit-indukált károsodását azonban számos más, a szívműködés Ca^{2+} -transzportjában, anyagcseréjében résztvevő fehérje károsodása és a miofilamentumok foszforilációs állapotának megváltozása is befolyásolhatja. Ezen folyamatokat érintő változások vizsgálata további kutatás tárgyát képezhetik.

EMELKEDETT SZÍVIZOMSEJT PASSZÍV FESZÜLÉS DIASZTOLÉS SZÍVELÉGTELENSÉGBEN

EREDMÉNYEK

Betegcsoportok

A diasztolés szívelégtelenségben (DSZE) szenvedő betegek restriktív kardiomiopáthia (n=7) és allograft kilökődés (n=5) klinikai gyanúja miatt kerültek szívkatéterezésre és ezek át biopszia vételi procedúrán. Valamennyi beteg a szívelégtelenség tüneteinek rosszabodása miatt került kórházi felvételre. A restriktív kardiomiopáthia gyanúja miatt felvett betegekben bal kamrai, a transzplantáción átesett betegekben jobb kamrai biopsziavétel történt. Szövettani vizsgálat egyik betegben sem mutatott ki infiltratív szívizombetegségekre vagy allograft kilökődésre utaló szövettani elváltozást. Az elvégzett szívkatéteres vizsgálat egyik betegben sem igazolt szignifikáns koszorúsér szűkületet, vagy graft vasculopáthiát. Minden beteg megfelelt a DSZE European Study Group által javasolt diagnosztikus kritériumoknak: mutatták a kongesztív szívelégtelenség jelei és tüneteit, és DSZE-re jellemző hemodinamikai paraméterekkel rendelkezett (LVEF>45% és LVEDP>16 Hgmm). Valamennyi betegnek volt legalább egy diasztolés LV diszfunkcióra hajlamosító rizikófaktora. Az LV tömegindex ($119\pm 16 \text{ g/m}^2$) a normálistól nagyobbak adódott ($92\pm 10 \text{ g/m}^2$; $P<0,05$) és 5 betegben szignifikáns LV hipertrófiát ($>125 \text{ g/m}^2$) találtunk.

A kontroll csoportba hat, az éves rutin szívkatéteres vizsgálatra és biopszia vételre érkező és két, myocarditis klinikai gyanújával vizsgálatra kerülő beteget soroltunk. Szövettani vizsgálat egyik betegben sem mutatott ki rejekcióra vagy szívizomgyulladásra utaló szövettani elváltozást. Egyik betegnek sem volt szívelégtelenségre jellemző jele és tünete, és normál hemodinamikai paraméterekkel rendelkezett (LVEF $\geq$ 50%, LVEDP $\leq$ 16 mmHg).

A DSZE betegek hemodinamikai paraméterei

A kontroll és a DSZE betegek szívfrekvencia, a LVEF, LV végdiasztolés térfogat index (LVEDVI) és a szívindex értékei hasonlóak voltak egymáshoz. Az LV csúcs szisztolés nyomás, az LV vég diasztolés nyomás (LVEDP), körkörös LV végdiasztolés falfeszülés (σ) és radiális miokardiális stiffness modulus (E) szignifikánsan magasabb volt. Az emelkedett LVEDP és σ hasonló LVEDVI mellett az LV csökkent diasztolés tágulékonyságára, a magasabb E az LV megnövekedett falfeszülésére utal.

Erőmérés izolált szívizomsejteken

A pCa 4,5-nél mért maximális totál izometriás erőértékek (F_{total}) nem különböztek szignifikánsan a DSZE ($20,3\pm 7,5 \text{ kN/m}^2$, szívizomsejtek száma: n=23) és a kontroll

betegcsoport ($24,2 \pm 12,4$ kN/m², n=15) között. A Ca²⁺-mentes oldatban mért passzív erőértékek (F_{passive}) azonban szignifikánsan magasabbak voltak a DSZE betegekben ($6,6 \pm 3,0$ kN/m²), mint a kontroll csoportban ($3,5 \pm 1,7$ kN/m²; $P < 0,001$). Emelkedett F_{passive} értékeket mértünk mind a szívtranszplantáción átesett ($5,4 \pm 1,1$ kN/m²; $P < 0,05$), mind a másik alcsoportba tartozó DSZE betegekben ($7,2 \pm 2,9$ kN/m²; $P < 0,01$). A kontroll csoportban mért F_{passive} értékek összevethetők voltak a munkacsoportunkban korábban donor és szívelégtelen szívekből izolált szívizomsejtek erőértékeivel.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a kontraktilis rendszer Ca²⁺-érzékenységében (pCa_{50}) és a Ca-erő összefüggés meredekségét jellemző paraméterben (nHill) a két betegcsoport között.

A szívizomszövet jellemzői

A DSZE betegekből származó szívizommintákat szignifikánsan magasabb kollagén térfogat arány (collagen volume fraction-CVF) jellemezte, mint a kontroll betegeket ($7,5 \pm 4,0\%$ vs. $3,8 \pm 2,0\%$; $P < 0,05$). A transzplantáción átesett DSZE betegek CVF értéke ($7,5 \pm 3,0\%$) megegyezett a nem transzplantált DSZE betegekével ($7,5 \pm 3,0\%$). A DSZE betegek egyenlő arányban oszlottak meg a három CVF osztály között, így egyharmadukban alacsony intersticiális fibrózist találtunk. Az utóbbi betegek magasabb LVEDP, σ és E értékei a kontrollokéhoz viszonyítva arra utalnak, hogy a diasztolés LV diszfunkció mértékét a CVF mellett más tényezők is befolyásolják.

A miozin nehéz lánc, dezmin, aktin, TnT, tropomiozin, TnI, MLC-1 és MLC-2 expressziós szintjében nem találtunk lényeges különbséget. Western immunoblot analízissel nem mutatott dezmin, TnT, TnI, MLC-1 és MLC-2 degradációs termékeket. Továbbá az MLC-1/MLC-2 arány sem különbözött a DSZE ($0,39 \pm 0,15$) és a kontroll betegek ($0,44 \pm 0,11$) 7 DSZE és 7 kontroll betegből származó endomiokardiális biopsziából meghatároztuk a TnI foszforilációs állapotát. A defoszforilált/totál TnI arány hasonlóan adódott a két betegcsoportban ($0,58 \pm 0,17$ vs. $0,53 \pm 0,17$) és nem mutatott szignifikáns korrelációt az F_{passive} -al.

Összefüggés az *in vivo* hemodinamikai adatok és az *in vitro* erőértékek között

A szívkatéterezés során nyert hemodinamikai paraméterek birtokában lehetőségünk nyílt arra, hogy összefüggést keressünk ezen *in vivo* paraméterek és a szívizomsejteken *in vitro* mért erőértékek között. Egyváltozós lineáris regressziós analízissel szignifikáns korrelációt találtunk a szívizomsejtekben mért F_{passive} és a szívkatéteres vizsgálat alatt mért LVEDP, σ és E között. Egyváltozós lineáris regressziós analízis szignifikáns korrelációt igazolt

továbbá a CVF és LVEDP ($R=0,63$; $P=0,009$) vagy σ ($R=0,68$; $P=0,004$) között. Kétváltozós lineáris regressziós analízisben az F_{passive} és a CVF kombinációja meggyőzőbb korrelációt mutatott az LVEDP-el ($R=0,80$; $P=0,001$) vagy σ -val ($R=0,78$; $P=0,002$), mint azok önmagukban egyváltozós analízisben. Ugyanakkor az F_{passive} és a CVF között nem találtunk szignifikáns korrelációt ($P=0,26$).

PKA hatása a szívizomsejtek erőgenerálására

Négy kontroll betegből származó 11, valamint hét DSZE betegből nyert 16 szívizomsejten proteinkináz A (PKA) kezelés után is meghatároztuk a Ca-erő összefüggést. A pCa 4,5-nél mért F_{total} mindkét betegcsoportban hasonló volt a PKA kezelés előtt és után. Szubmaximális pCa értékeknél (pl. pCa 5,8) az F_{total} csökkenése következett be a miofilamentáris rendszer PKA-indukált deszenzitizációjának következtében, melyre a kontroll és DSZE betegek pCa₅₀ értékeinek csökkenése is utalt. A PKA kezelés hatására a DSZE betegekben mért emelkedett F_{passive} a kontroll betegekre jellemző értékre csökkent, továbbá lineáris összefüggést találtunk a PKA indukált F_{passive} csökkenése és a kiindulási F_{passive} érték között.

MEGBESZÉLÉS

Jelen tanulmányban DSZE-ben szenvedő betegek endomiokardiális biopsziáit elemeztük és eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük: 1) A biopsziákból mechanikusan izolált szívizomsejtek állandó szarkomerhossz mellett mért maximális Ca^{2+} -aktivált F_{total} erőértékei hasonlóak, de a Ca^{2+} mentes közegben meghatározott F_{passive} értékei kétszer nagyobbak, mint a kontroll betegeké; 2) A PKA kezelés az emelkedett F_{passive} erőértéket a kontroll csoportban megfigyelt értékre csökkentette; 3) A diasztolés LV funkció *in vivo* hemodinamikai paraméterei (LVEDP, σ és E) szignifikáns összefüggést mutattak az *in vitro* mért F_{passive} erőértékkel és CVF-el.

Emelkedett F_{passive}

A mechanikai izolálás során a szívizomsejteket körülvevő kollagént eltávolítottuk, ezért a DSZE betegekben mért emelkedett F_{passive} erőkomponens hátterében a szívizomsejtek diasztolés feszülésének megváltozása állhat. Az szívizomsejtek membránrendszerit (sejtmembrán és SR membrán) Triton X-100 kezeléssel tettük átjárhatóvá, melynek aktív erőgenerálása így az alkalmazott oldatok Ca^{2+} koncentrációjától függött. Ezen kísérletes körülmények között az SR Ca^{2+} -ATPáz, a phospholamban, a sejtmembránban található Ca^{2+} csatornák, valamint a $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ pumpa szerkezeti és funkcionális változásai nem tehetők felelőssé az emelkedett F_{passive} kialakulásáért.

Jelen tanulmányban a kontroll és a DSZE betegek között nem találtunk jelentős különbséget a szarkomerfehérjék (miozin nehéz lánc, aktin, TnT, TnI, dezmin and tropomiozin) expressziós szintjében. A fehérje-összetétel azonban az emelkedett fehérjelebomlás következtében is változhat. Ismert a TnI emelkedett LVEDP hatására bekövetkező kalpain-mediált proteolízise. Western immunoblot analízis segítségével számos kontraktilis fehérjében (pl. TnI, TnT, MLC1,-2) kizártuk a degradációt mindkét betegcsoportban. Ezen adatok alapján nem valószínű, hogy a fehérje-összetétel változása vagy a fehérjelebomlás tehető felelőssé a DSZE betegek szívizomsejtjeiben mért emelkedett F_{passive} -ért.

Az emelkedett F_{passive} PKA-indukált csökkenése arra utal, hogy az enzim egyik szarkomerikus célfehérjéjének, a TnI-nek, a miozin-kötő C fehérjének és/vagy a titinnek a csökkent foszforilációja állhat ezen erőkomponens megnövekedésének hátterében. A PKA kezelés hatására azonban sem a kontroll betegcsoport szívizomsejtjeinek F_{passive} értékeiben, sem a betegcsoportok maximális (pCa 4,5) F_{total} értékeiben nem tapasztaltunk szignifikáns változást. Az F_{passive} izolált csökkenése ezek alapján inkább a PKA miofilamentáris, mint citoskeletális célfehérjéinek szerepét valószínűsíti, hiszen a citoskeletális és miofilamentáris célfehérjék együttes foszforilációja az F_{total} párhuzamos csökkenését eredményezné.

Kísérleteink során meghatároztuk a TnI foszforilációs állapotát és nem találtunk szignifikáns különbséget a defoszforilált/teljes TnI arányban a két betegcsoport között. Állatkísérletes adatok szerint a miozin-kötő C fehérje és a titin foszforilációs állapota befolyásolja a szív diasztolés funkcióját. Az endomiokardiális szívizom biopsziák kis méretük miatt azonban nem tették lehetővé ezen két további célfehérje vizsgálatát.

In vitro versus in vivo

Munkánk során szignifikáns összefüggést találtunk az *in vitro* mért F_{passive} erőértékek és az LV diasztolés funkciót jellemző *in vivo* paraméterek (LVEDP, σ és E) között. Ezek a lineáris korrelációk magas LVEDP, σ és E értékek esetében „laposabbá” válnak, melyet a betegnek a szívkatéteres beavatkozás előtt adott diuretikus kezelés, vagy az intersticiális fibrózis diasztolés LV diszfunkció előrehaladásával párhuzamos növekedése magyarázhat. *In vitro* körülmények között minden szívizomsejt szarkomerhosszát 2,2 μm -re állítottuk be. *In vivo*, különösképpen a tüdőödéma miatti kórházi felvétel és a szívkatéteres beavatkozás között alkalmazott intenzív diuretikus kezelésen átesett DSZE betegekben, az LV előterhelése nem volt kontrollálható. Lehetséges, hogy ezen betegeknek az optimális szarkomerhossz eléréséhez szükséges LV töltőnyomástól alacsonyabb nyomásértékeik voltak. Az emelkedett intersticiális fibrózis szintén magyarázatul szolgálhat arra, hogy az F_{passive} és a diasztolés LV

funkció paraméterei miatt érnek el egy platót az LVEDP, σ és E magasabb értékeinél. A DSZE betegek endomiokardiális biopsziáiban szignifikánsan emelkedett CVF értékeket mértünk, mint a kontroll betegekben. Többváltozós lineáris regressziós analízissel szignifikáns korrelációt mutattunk ki az F_{passive} és a CVF, valamint az LVEDP és σ között.

Irodalmi adatok alapján a nyomás-indukált hipertrófiás papilláris izmokban megfigyelt kollagén degradáció a normál izmokhoz képest nem csökkentette az izmok passzív feszülését. Jelen tanulmányunkban a DSZE betegekben alacsony CVF értékeik ellenére magasabb LVEDP, σ és E értékeket mértünk, mint a kontroll betegekben. Eredményeink arra utalnak, hogy az alacsony kollagén tartalom mellett kialakuló diasztolés LV diszfunkció hátterében a szívizomsejtek emelkedett nyugalmi feszülése állhat. Mivel a DSZE betegek fele diabétesz mellituszban szenvedett, a diasztolés LV funkció romlásáért bennük a glikálódás hatására a kollagénben létrejövő keresztkötések is felelőssé tehetők.

A DSZE betegek harmadában alacsony CVF értéket és magas F_{passive} -ot mértünk, de nem találtunk olyan DSZE beteget, akiben a magas CVF értékéhez alacsony F_{passive} társult volna. Ez arra utalhat, hogy a diasztolés LV diszfunkció egy olyan folyamat eredményeként alakul ki, melyben a szívizomsejtek nyugalmi feszülésének emelkedését az intersticiális fibrózis mértékének növekedése követi. Hasonló folyamatról számoltak be egy mesterségesen létrehozott tachycardia-indukált szívelégtelenség modellben, melyben a diasztolés LV izomfeszülés növekedésének hátterében a rövidebb és rugalmatlanabb N2B titin izoforma arányának megnövekedését mutatták ki. Jelen tanulmány azon eredménye, hogy a DSZE alacsony CVF-el rendelkező betegekben is kialakulhat részben magyarázhatja az intersticiális fibrózist csökkentő angiotenzin II receptor blokkoló és angiotenzin konvertáló enzim gátló kezelés relatív hatástalanságát a DSZE betegek kezelésében.

KÖVETKEZTETÉSEK

A DSZE betegek endomiokardiális biopsziáiból izolált szívizomsejtek passzív feszülése emelkedett, mely - a kollagén tartalommal együtt - hozzájárul az *in vivo* diasztolés LV diszfunkció kialakulásához. A PKA kezelés a DSZE-ben szenvedő betegek szívizomsejtjeinek passzív feszülését a kontroll értékre csökkenti. Mivel a sejt- és szarkoplazmatikus retikulum membránjainak Triton kezeléssel való eltávolítása után sem a szarkomerfehérjék expressziós szintjében, sem a TnI foszforilációs szintjében nem találtunk eltérést, az F_{passive} PKA-indukált csökkenésének hátterében valószínűleg a miozin-kötő C fehérje vagy a titin hipofoszforilációjának korrekciója állhat. Ez az alacsony foszforiláltságú fehérje a DSZE terápiájának egyik miokardiális célfehérjeje lehet.

Ca²⁺-ÉRZÉKENYÍTŐK HATÁSAI DONOR ÉS SZÍVELÉGTELENSÉGBEN SZENVEDŐ BETEGEK PERMEABILIZÁLT SZÍVIZOMSEJTJEINEK ERŐGENERÁLÁSÁRA

EREDMÉNYEK

A donor és a szívelégtelenségben szenvedő betegek szívizomsejtjeinek maximális Ca²⁺-aktivált erőgenerálása ($F_{\max}$, 38 ± 4 kN/m² vs. 36 ± 3 kN/m²), valamint Ca²⁺ hiányában mért passzív erőkomponense (F_{passive} , $1,5 \pm 0,3$ kN/m² vs. $1,2 \pm 0,2$ kN/m²) szignifikánsan nem különbözött egymástól kontroll körülmények között (pH 7,2; 0 mM P_i). Munkacsoportunk korábbi kutatási eredményeivel egybehangzóan a szívelégtelen betegekből izolált szívizomsejtek erőgenerálásának Ca²⁺-érzékenysége szignifikánsan magasabb volt, mint a donor szívekből származó szívizomsejteké ($\Delta pCa_{50}=0,15$). Modell iszkémiás körülmények között (pH 6,5; 10 mM P_i) az $F_{\max}$ a kontroll erőérték $22 \pm 1\%$ -ára csökkent, valamint a Ca²⁺-érzékenység nagymértékű csökkenését ($\Delta pCa_{50} \approx 1,4$) figyeltük meg mindkét csoportban. Iszkémiás metabolitok hatására a [Ca²⁺]-erő összefüggések Ca²⁺-érzékenységében a két csoport között meglévő korábbi különbség eltűnt.

A Ca²⁺-érzékenyítő EMD 53998 (10 μ M) mindkét kísérletes körülmény alkalmazásakor a vizsgált összes [Ca²⁺]-nál jelentősen növelte az izometriás erőt és a [Ca²⁺]-erő összefüggés nagymértékű balra tolódását idézte elő kontroll körülmények között. Ezen eltolódás méréke azonban szignifikánsan kisebb volt a szívelégtelen ($\Delta pCa_{50}=0,24$), mint a donor ($\Delta pCa_{50}=0,48$) szívizomsejtekben. Az EMD 53998 mind az $F_{\max}$ -ot, mind az F_{passive} -ot szignifikánsan megnövelte.

A 10 μ M OR-1896 Ca²⁺-érzékenyítő hatása kisebb volt, mint a 10 μ M EMD 53998-é, de azonos mértékűnek adódott a donor és a szívelégtelen sejtekben ($\Delta pCa_{50} \approx 0,1$). Modell iszkémiás körülmények között az OR-1896 nem rendelkezett Ca²⁺-érzékenyítő hatással és az EMD 53998-tal ellentétben sem a $F_{\max}$ -ot, sem a F_{passive} -ot nem befolyásolta.

MEGBESZÉLÉS

Ebben a tanulmányban két Ca²⁺-érzékenyítő vegyület (az EMD 53998 és az OR-1896) humán szívizomsejtek erőgenerálására kifejtett hatásait hasonlítottuk össze fiziológiás és iszkémiás modell körülmények között. Korábbi, állatkísérletek során kapott eredményekhez hasonlóan az azonos koncentrációban alkalmazott EMD 53998 Ca²⁺-érzékenyítő hatása nagyobb volt,

mint az OR-1896-é. Az OR-1896-al ellentétben azonban az EMD 53998 növelte a Ca²⁺ hiányában kifejlődő erőkomponenst is.

Az EMD 53998 (+) enantiomer formája (EMD 57033) az erőgeneráló keresztkötéseket valószínűleg a TnI és a TnC közötti kölcsönhatásra kifejtett hatásán keresztül befolyásolja és hatását a vékony filamentumok regulatórikus fehérjéi szabályozzák. Számos kísérlet történt az EMD 57033 aktin-miozin ciklusra kifejtett mechanikai hatásainak tisztázására. Ezek ellenére máig sem ismert, hogy a szer a keresztkötési ciklus a kialakulási sebességét (f_{app}) növeli, a keresztkötési ciklus megszűnésének sebességét (g_{app}) csökkenti és/vagy az egy keresztkötés által generált erőt növeli. Az EMD 53998 kontroll körülmények között mind az F_{max} -ot, mind az $F_{passive}$ -ot növelte. Ezek alapján eredményeink arra utalnak, hogy az EMD 53998 - a keresztkötések kooperativitásának növelése mellett - az egyes keresztkötések által generált erőt növeli humán szívizomsejtekben. Az EMD 53998 a pCa₅₀ értéket kisebb mértékben növelte a szívelégtelen, mint az egészséges csoportban.

Jelen és korábbi eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a szívelégtelen betegből származó szívizomsejteknek nagyrészt a TnI csökkent foszforiláltsági állapota miatt magasabb a Ca²⁺-érzékenységük, mint az egészséges donor sejteké. Az MLC-2 csökkent foszforilációja szintén magyarázhatja az EMD 57033 kisebb hatékonyságát a szívelégtelenségben, hiszen az MLC-2 defoszforilációja a miozin fej helyzetének megváltoztatásával a vastag filamentum és a vékony filamentum közötti távolságot növeli, ami az aktin-miozin kölcsönhatás csökkenését eredményezheti.

Az OR-1896 által indukált Ca²⁺-érzékenyítés mértéke hasonló volt a korábban tengerimalac szívizomsejteken levosimendan és OR-1896 kezelés során kapott eredményekhez. Méréseink alapján az OR-1896 Ca²⁺-érzékenyítő hatása az anyamolekulájához, a levosimendanhhoz hasonló hatásmechanizmussal alakul ki a humán szívizomban. Az OR-1896 a [Ca²⁺]-erő összefüggés kismértékű, de mindkét csoportban hasonló nagyságú balra tolódását váltotta ki kontroll körülmények között. A levosimendan egyszeri infúzióban történő adása, a viszonylag hosszú felezési idővel (≈ 80 óra) rendelkező metabolit (OR-1896) következtében, nagymértékben hozzájárulhat a súlyos szívelégtelenségben szenvedő betegek túlélésének javulásához.

Mindkét csoportban a Ca²⁺-érzékenység és a [Ca²⁺]-erő összefüggés meredekségének nagymértékű csökkenését figyeltük meg modell iszkémiás (pH 6,5; P_i 10 mM) körülmények között. A pH csökkenése a TnC Ca²⁺-kötésének nagymértékű gátlásával, a P_i pedig keresztkötési ciklus P_i felszabadulási lépésének antagonizálásával csökkenti az erőgeneráló keresztkötések számát. Az iszkémiás metabolitok szívelégtelen szívizomsejtekre gyakorolt

kifejezettebb hatása a donor és a szívelégtelen szívizomsejtek eltérő miofilamentáris Ca²⁺-szabályozására utal. Az P_i EMD 57033-indukált erőnövelésre kifejtett gátló hatása az EMD 57033 és az erőgeneráló aktin-miozin kölcsönhatás között már korábbiakban is kimutatott szoros kapcsolatra utal. 10 mM P_i jelenlétében és alacsony pH-n (pH 6,5) (de 10 mM P_i jelenlétében és pH 7,2-n is) az EMD 53998-kiváltott Ca²⁺-független nyugalmi erőkomponens eltűnt. Ezzel ellentétben az iszkémiás metabolitok Ca²⁺ jelenlétében nem befolyásolták az EMD 53998 erőfokozó hatását, ami a szer eltérő hatásmechanizmusára utal Ca²⁺ hiányában és jelenlétében. Az EMD 53998-al ellentétben az OR-1896 iszkémiás metabolitok jelenlétében nem fejtett ki Ca²⁺-érzékenyítő hatást.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a szívelégtelenségben szenvedő betegek szívizomsejtjeinek normál körülmények között észlelhető növekedett Ca²⁺-érzékenysége nem nyújt védelmet a további farmakológiai Ca²⁺-érzékenyítéssel szemben. A kontraktilis rendszer Ca²⁺-ra adott válaszát azonban az iszkémiás metabolitok befolyásolják, ami módosíthatja a Ca²⁺-érzékenyítők hatékonyságát iszkémiás körülmények között.

KÖVETKEZTETÉSEK és ÁLTALÁNOS MEGBESZÉLÉS

A szívelégtelenség állatkísérletes modelljeiben a szívizom kontraktilitás csökkenésének hátterében a kontraktilis fehérjékben fellépő számos funkcionális, biokémiai és molekuláris változást írtak le. Ezen változások funkcionális következményei azonban a humán szívelégtelenség kialakulása során nagyrészt ismeretlenek (**1. fejezet**).

Jelen tanulmányban a donor és szívelégtelenségben szenvedő betegekből izolált szívizomsejteket és a szívizom kontraktilis fehérjéit vizsgáltuk (**2. fejezet**). Izolált, membránrendszereiktől megfosztott szívizomsejtek erőgenerálását és az erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenységét mértük kontroll körülmények között és peroxinitrit (3. fejezet), proteinkináz A aktív alegység (4. fejezet), vagy a Ca^{2+} -érzékenyítő OR-1896 és EMD 53998 (5. fejezet) kezelést követően. A funkcionális méréseket a miokardiális fehérjék és a fehérje nitrálódás kimutatására alkalmas biokémiai módszerekkel egészítettük ki, melynek segítségével egy mélyebb betekintést nyerhettünk az emberi szív kontraktilis fehérje-összetétele és mechanikai tulajdonságai között fennálló összefüggésekbe.

A **3. fejezetben** az *in vitro* peroxinitrit kezelés Ca^{2+} -aktivált erőgenerálásra, a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységére, az aktin-miozin keresztkötési kinetikára kifejtett hatásait tanulmányoztuk, valamint a folyamatok hátterében álló molekuláris változások feltárására tettünk kísérletet. A peroxinitrit koncentráció-függő módon csökkentette a permeabilizált humán szívizomsejtek maximális Ca^{2+} -aktivált erejét. A kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységében, a Ca^{2+} -erő összefüggés meredekségére jellemző paraméterben, az aktin-miozin keresztkötési ciklus sebességére jellemző sebességi állandókban nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést 50 μM peroxinitrit kezelést követően. 50 μM peroxinitrit a szívizomsejtek harántcsíkolatának nagymértékű elmosódását okozta, melyet a passzív erőkomponens növekedése kísért. Az erőmérésekkel párhuzamosan végzett dot blot analízis a peroxinitrit koncentráció növelésével emelkedő fehérje-nitrálódást igazolt az izolált szívizomsejtekben. A peroxinitrit alacsonyabb koncentrációkban (25-100 μM) egy kb. 100 kDa molekulatömegű fehérjében okozott szignifikáns nitrotirozin képződést (Western immunoblot). Immunprecipitáció ezen peroxinitrit-kezelés hatására nitrálódó miofibrilláris fehérjét, mint az α -actinint azonosította ezen. Eredményein az α -actinin, mint miokardiális célfehérje szerepét vetik fel peroxinitrit termelődésével járó kóros folyamatokban: a fehérje nitrálódása feltehetően a szomszédos szarkomerek közötti kölcsönhatások módosításával kontraktilis diszfunkcióhoz vezet.

A diasztolés szívelégtelenség napjainkban a szívelégtelenségben szenvedő betegek mintegy 49%-ban diagnosztizálható. A diasztolés szívelégtelenség patofiziológiájával kapcsolatos kérdések megválaszolása azonban nagyrészt a rendelkezésre álló nekropsziás és biopsziás anyag hiánya miatt nehézségekbe ütközik.

A **4. fejezetben** bemutatott tanulmány célja a diasztolés szívelégtelenség során a szívmusclek kontraktilis funkciójában, a szívmuscle kollagén tartalmában, szarkomer-fehérje összetételében fellépő változások feltárása volt diagnosztikus szívkatéterezés útján nyert endomiokardiális biopsziák elemzésével. A diasztolés szívelégtelenségben szenvedő betegcsoportban normális ejekciós frakciót és emelkedett bal kamrai végdiasztolés nyomásértéket mértünk szignifikáns koronária szűkület nélkül. A betegcsoportból származó biopsziák kollagén tartalma szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll betegekből vett biopsziáké, ugyanakkor a szarkomer-fehérje összetételben nem találtunk lényeges különbséget a két csoport között. A kontroll csoporthoz képest a diasztolés szívelégtelenségben szenvedő betegek szívmusclei maximális Ca -koncentráció jelenlétében hasonló teljes izometriás erőt generáltak, de Ca -mentes oldatban mért passzív erejük közel kétszer akkora volt. A passzív erő és kollagén tartalom együtt meggyőzőbb korrelációt mutatott a bal kamrai végdiasztolés nyomással, mint bármelyikük külön-külön. A diasztolés szívelégtelenségben szenvedő betegek szívmusclejainak proteinkináz A enzimmel történő kezelése az emelkedett passzív erőt a kontroll értékre csökkentette. Eredményeink valamely szarkomerfehérje csökkent foszforilációjának szerepére utalnak a diasztolés szívelégtelenség kialakulásában.

Az **5. fejezetben** kísérletet tettünk két Ca^{2+} -érzékenyítő vegyület, az OR-1896 és az EMD 53998 hatásainak összehasonlítására donor és a szívelégtelenségben szenvedő betegek szívmusclejainak Ca^{2+} -aktivált erőgenerálása fiziológiás és modell iszkémiás körülmények között. A donor és a szívelégtelenségben szenvedő betegek szívmusclejainak maximális Ca^{2+} -aktivált erőgenerálása ($F_{\max}$), valamint Ca^{2+} hiányában mért passzív erőkomponense szignifikánsan nem különbözött egymástól kontroll körülmények között ($\text{pH } 7,2$; 0 mM P_i). A szívelégtelen betegekből izolált szívmusclek erőgenerálásának Ca^{2+} -érzékenysége szignifikánsan magasabb volt, mint a donor szívekből származó szívmuscleké. Modell iszkémiás körülmények között ($\text{pH } 6,5$; 10 mM P_i) az $F_{\max}$ a kontroll erőérték $22 \pm 1\%$ -ára csökkent, valamint a Ca^{2+} -érzékenység nagymértékű csökkenését figyeltük meg mindkét csoportban. Iszkémiás metabolitok hatására a $[\text{Ca}^{2+}]$ -erő összefüggések Ca^{2+} -érzékenységében a két csoport között meglévő korábbi különbség eltűnt. Az EMD 53998 mindkét kísérletes körülmény alkalmazásakor a vizsgált összes $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál jelentősen növelte az izometriás erőt

és a $[Ca^{2+}]$ -erő összefüggés nagymértékű balra tolódását idézte elő kontroll körülmények között. Ezen eltolódás mértéke azonban szignifikánsan kisebb volt a szívelégtelen, mint a donor szívműködési sejtekben. Az EMD 53998 mind az F_{max} -ot, mind az $F_{passive}$ -ot szignifikánsan megnövelte. Az OR-1896 Ca^{2+} -érzékenyítő hatása kisebb volt, mint az EMD 53998-é, de azonos mértékűnek adódott a donor és a szívelégtelen sejtekben. Modell iszkémiás körülmények között az OR-1896 nem rendelkezett Ca^{2+} -érzékenyítő hatással és az EMD 53998-tal ellentétben sem a F_{max} -ot, sem a $F_{passive}$ -ot nem befolyásolta. Funkcionális méréseink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a miofibrilláris rendszer Ca^{2+} -aktivált erőgenerálása változik végstádiumú szívelégtelenségben, mely módosíthatja Ca^{2+} -érzékenyítők hatásait mind fiziológiás, mind kontroll, mind iszkémiás körülmények között.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az izolált szívműködési sejteken végzett erőmérés, a szívműködési fehérjéinek vizsgálatára alkalmazott molekuláris biológiai módszerekkel együttesen, megbízható, érzékeny és értékes módszer a szívelégtelenség kialakulása során végbemenő változások követésére.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

1. **Borbély, A.**, Tóth, A., Édes, I., Virág, L., Papp, J.G., Varró, A., Paulus, W.J., van der Velden, J., Stienen, G.J.M., Papp, Z. (2005) Peroxynitrite-induced α -actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells *Cardiovasc. Res.* (nyomtatás alatt) IF: 5,164
2. **Borbély, A.**, van der Velden, J., Papp, Z., Bronzwaer, J.G.F., Édes, I., Stienen, G.J.M., Paulus, W.J. (2005) Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation.* 111, 774-781. IF: 11,164
3. Papp, Z., van der Velden, J., **Borbély, A.**, Édes, I., Stienen, G.J.M. (2004) Effects of Ca^{2+} -sensitisers in permeabilized cardiac myocytes from donor and end-stage failing human hearts. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 25, 219-224. IF: 1,297

Egyéb *in extenso* tudományos közlemények:

1. Szilágyi, Sz., Pollesello, P., Levojoki, J., Haikala, H., Bak, I., Tótsaki Á., **Borbély, A.**, Édes, I., Papp, Z. (2005) Two positive inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (nyomtatás alatt) IF: 1,905
2. van der Velden, J., Narolska, N.A., Boontje, N.M., **Borbély, A.**, Zaremba, R., Bronzwaer, J.G.F., Papp, Z., Jaquet, K., Paulus, W.J., Stienen G.J.M. (2005) Positive effect of PKC-mediated phosphorylation at the myofilament level for contractile function in human myocardium. (közlésre benyújtva)
3. Kaheinen, P., Pollesello, P., Hertelendi, Z., **Borbély, A.**, Édes, I., Levijoki, J., Haikala, H., Papp, Z. (2005) The positive inotropic effect of levosimendan is correlated to its stereoselective Ca^{2+} -sensitizing effect but not to stereoselective phosphodiesterase inhibition. (közlésre benyújtva)
4. Papp, Z., van der Velden, J., **Borbély, A.**, Édes, I., Stienen, G.J.M. Altered myocardial force generation in end-stage human heart failure. (előkészületben)

Idézhető absztraktok:

1. Papp, Z., van der Velden, J., de Jong, J.W., Vaszily, M., **Borbély, A.**, Édes, I., Stienen, G.J.M. (2002) Specific alterations of the actin-myosin cycle during heart failure. *Cardiol. Hung. Suppl.* 1., 89. IF: 0
2. Papp, Z., van der Velden, J., de Jong, J.W., **Borbély, A.**, Édes, I., Stienen, G.J.M. (2002) Altered P_i -release step of the actin-myosin cycle during human heart failure *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, A49. IF: 4,091
3. Papp, Z., van der Velden, J., de Jong, J.W., **Borbély, A.**, Édes, I., Stienen, G.J.M. (2002) Heart failure specific alterations in the Ca^{2+} -dependencies of force generation and actin-myosin turnover rate in isolated human myocardial cells *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23, 32. IF: 1,318

4. **Borbély, A.**, Barta, J., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Varró, A., Papp, Z. (2003) Peroxynitrite induced functional alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiol. Hung.* 33, A64. IF: 0
5. **Borbély, A.**, Barta, J., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Varró, A., Papp, Z. (2003) Peroxynitrite induced mechanical alteration of the actin-myosin interaction in isolated human myocardial cells. *Eur. J. Heart Failure Suppl.* 2/1, A132. IF: 2,134
6. **Borbély, A.**, Barta, J., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Varró, A., Papp, Z. (2003) Peroxynitrite induced mechanical alterations of the actin-myosin interaction in isolated human myocardial cells. *Exp. Clin. Cardiol.* 8: A7. IF: 0
7. **Borbély, A.**, Tóth, A., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Papp, J.Gy., Varró, A., Papp, Z. (2004) Peroxynitrite induced α -actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 260. IF: 1,297
8. **Borbély, A.**, van der Velden, J., Papp, Z., Bronzwaer, J.G.F., Stienen, G.J.M., Paulus, W.J. (2004) Cardiomyocyte stiffening in diastolic heart failure. *Circulation Suppl.* III, Vol 110, No 17, 636. IF: 11,164
9. **Borbély, A.**, van der Velden, J., Papp, Z., Bronzwaer, J.G.F., Stienen, G.J.M., Paulus, W.J. (2004) Protein kinase A corrects high resting tension of cardiomyocytes from patients with diastolic heart failure. *Circulation Suppl.* III, Vol 110, No 17, 445. IF: 11,164
10. **Borbély, A.**, van der Velden, J., Papp, Z., Édes, I., Bronzwaer, J.G.F., Stienen, G.J.M., Paulus, W.J. (2005) Increased cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Cardiol. Hung.* 35, A16. IF: 0

Előadások:

1. **Borbély, A.**, Barta, J., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Varró, A., Papp, Z. (2003) Peroxynitrite induced functional alterations in isolated human myocardial cells. Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred.
2. **Borbély, A.**, Barta, J., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Varró, A., Papp, Z. (2003) Peroxynitrite impairs Ca^{2+} -regulated force production in isolated human myocardial cells. 11th Alpe Adria Cardiology Meeting, Balatonfüred
3. **Borbély, A.**, Barta, J., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Varró, A., Papp, Z. (2003) Peroxynitrite induced functional alterations in isolated human myocardial cells. IV. International Symposium of Myocardial Cytoprotection, Pécs.
4. **Borbély, A.**, Tóth, A., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Papp, J. Gy., Varró, A. and Papp, Z. (2004) Peroxynitrite induced α -actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. XXXIII. European Muscle Conference, Isola d'Elba.
5. **Borbély, A.**, Tóth, A., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Papp, J. Gy., Varró, A. and Papp, Z. (2004) Peroxynitrite induced α -actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. 6th Meeting France-New CEE members, La Grande-Motte, France.
6. **Borbély, A.**, van der Velden, J., Papp, Z., Bronzwaer, J.G.F., Stienen, G.J.M., Paulus, W.J. (2004) Cardiomyocyte stiffening in diastolic heart failure. American Heart Association, Scientific Sessions, New Orleans, USA.
7. **Borbély, A.**, van der Velden, J., Papp, Z., Bronzwaer, J.G.F., Stienen, G.J.M., Paulus, W.J. (2005) Increased cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred.

Poszterek:

1. **Borbély, A.**, Barta, J., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Varró, A., Papp, Z.(2003) Peroxynitrite induced mechanical alterations of the actin-myosin interaction in isolated human myocardial cells. Heart Failure 2003/ISHR-ES, Strasbourg, France.
2. **Borbély, A.**, Tóth, A., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Papp, J.Gy., Varró, A., Papp Z. (2004) Peroxynitrite induced α -actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. XXXIII. European Muscle Conference, Isola d'Elba.
3. **Borbély, A.**, Tóth, A., Édes, I., Vaszily, M., Virág, L., Papp, J.Gy., Varró, A., Papp Z. (2004) Peroxynitrite induced α -actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. 6th Meeting France-New CEE members, La Grande-Motte, France.
4. **Borbély, A.**, van der Velden, J., Papp, Z., Bronzwaer, J.G.F., Stienen, G.J.M., Paulus, W.J. (2004) Protein kinase A corrects high resting tension of cardiomyocytes from patients with diastolic heart failure. American Heart Association, Scientific Sessions, New Orleans, USA.