

Általános beszámoló

68502 számú 'F' típusú posztdoktori OTKA-pályázatomban, melynek címe „**A szöveti renin-angiotenzin rendszer szerepe az intracelluláris kalcium-homeosztázis zavarainak kialakulásában diabéteszes kardiomiopátiában**” 2007-ben nyert támogatást. A szerződés szerint a 3 éves futamidejű támogatási periódus 2007. július 1-én indult. 2008. nyarán megszületett harmadik gyermekem, ezért kérelmeztem a kutatási támogatás és tevékenység 2008. július 1. és 2009. június 30. közötti egy évre, majd 2009. július 1. és 2009. december 31. közötti 6 hónapra történő felfüggesztését. Kérelmemet az OTKA elnöke méltányolta, ezért a kutatás befejezési határideje 2011. december 31-re módosult.

A támogatási periódus aktív időszakában a célkitűzéseknek megfelelő kísérleteket a munkatervben vállalt ütemben elvégeztük. Fontos metodikai fejlesztésként a projekt első évében beállításra került a rágcsálókon végzett echokardiográfiás mérés laboratóriumunkban. Ezt a tevékenységet magam végeztem, és ezzel vizsgálataink egy fontos in vivo módszerrel egészültek ki.

A pályázati anyagban szerepelt tervként még egy metodikai fejlesztés, ami frissen izolált kardiomiociták elektrofiziológiai vizsgálatát célozta. Ez a módszer azonban anyagi okokból egyelőre nem valósult meg intézetünkben, így ilyen irányú vizsgálatokat nem tudtunk végezni.

A gördülékeny munka egy további technikai akadályát képezte, hogy intézetünkben már nem végeznek rutinszerűen Western blot vizsgálatot, laboratóriumunk pedig nem rendelkezik szöveti fehérje expresszió meghatározására alkalmas technikai eszközökkel. Következtetéseink viszont csak ilyen eredmények birtokában tekinthetők megalapozottnak. Így a fehérjeszintek meghatározásához a Western blot méréseket kooperációs partnerek bevonásával végezzük el.

Laborkísérleteink eredményeképpen a projekt kapcsán négy önmagában helytálló, folyóiratban történő publikációra alkalmas tanulmány született. Közülük kettőhöz dr. Bíró Tamás munkacsoportja a Debreceni Egyetem Élettani Intézetében el is végezte a szükséges Western blot méréseket. A két munka egyikének kéziratát az Acta Physiologica 2012. január 23-án közlésre elfogadta. A másik tanulmány közlés alatt áll.

A további két vizsgálathoz a szükséges Western blot mérések elvégzését Molnár Viktor biológus kolléga vállalta el, de sajnos csak a kutatási periódust túllépő 2011. december-2012. február közötti időszakban. Ezeknek a kísérletsorozatoknak az eredményei

konferenciákon kerültek bemutatásra, folyóiratban történő közlésük értelemszerűen csak a hiányzó eredmények birtokában történhet meg.

Ezek mellett a pályázat forrásai segítették 3, a laboratóriumban párhuzamosan futó projekt megvalósulását, aminek eredményeképpen született egy folyóiratcikk [*Kemecsei P, Miklós Zs, Bíró T, Marincsak R, Tóth BI, Komlódi-Pásztor E, Barnucz E, Mirk É, Van der Vusse GJ, Ligeti L, Ivanics T. Hearts of surviving MLP-KO mice show transient changes of intracellular calcium handling. Molecular and Cellular Biochemistry 342:251-260, 2010. (IF:2,168)*], és 2 kongresszusi előadás [*Miklos Zs, Kemecsei P, Koller A, Ivanics T. Cardiac reactive hyperemia is impaired in a rat model of hyperhomocysteinemia (HHcy). FASEB Journal 22:1152.6, 2008.*; valamint *Paragi P., Sára L., Dunay G., Vakaliosz A., Rozsits A., Ács N., Ivanics T., Miklós Zs.: Depressed calcium cycling contributes to lower ischemia tolerance in hearts of ovariectomised rats, Acta Physiologica, 202(Suppl. 684): 92-P66, 2011*]. Ezekben a publikációkban is feltüntettük az OTKA támogatás tényét.

Összefoglalva, a támogatási időszak alatt 2 folyóiratcikk, és 6 konferencia kiadvány született. Mivel azonban a korábban említett technikai nehézségek miatt egyes kiegészítő mérések jelenleg is folyamatban vannak, a közlési folyamat is szükségszerűen meg fogja haladni a projekt befejezésének dátumát. Ennek megfelelően szeretnék élni az OTKA által biztosított lehetőséggel, és kérni, hogy a projekt minősítését az OTKA szakmai testületei ezeknek a közleményeknek a birtokában, később véglegesítsék.

Részletes szakmai beszámoló

A diabéteszes betegekben a szívizomsejt komplex anyagcserezavara, és a társuló érszövődmények következtében a szívfunkció hanyatlása, diabéteszes kardiomiopátia alakul ki. Általánosan elfogadott, hogy a diabéteszes szívben károsodnak az intracelluláris kalcium (Ca^{2+}_i) háztartását szabályozó folyamatok, és végső soron megváltozik a Ca^{2+}_i tranzienst dinamikája. Ez alapvető etiopatológiai tényezője a kardiális diszfunkciónak. Az azonban kevésbé tisztázott, hogy milyen folyamatok vezetnek a Ca^{2+}_i homeosztázis zavarok kifejlődéséhez a diabéteszes szívben. Kísérletes adatok sora támasztja alá, hogy a diabétesz során több szervben, így a szívben is aktiválódik a szöveti renin-angiotenzin rendszer (RAS), és az is ismert, hogy ACE-gátlók alkalmazásával késleltethető a diabéteszes szívszövődmények kialakulása. Ezek alapján hipotézisünk az volt, hogy a kardiális szöveti

RAS és a Ca^{2+}_i szabályozás között kapcsolat áll fenn. Célunk az volt, hogy rávilágítsunk erre a kapcsolatra, és bizonyítsuk szerepét a szívfunkció hanyatlásában.

Kísérleteinket 1-es és 2-es típusú diabéteszes patkánymodellrel is elvégeztük. Előbbi modellt a Langerhans szigetek béta-sejtejeinek streptozotocinnal történő elölésével, utóbbit fruktóz gazdag diétával hoztuk létre. A RAS szerepének tisztázására a beteg állatokat krónikusan kezeltük ACE-gátló enalaprillal és angiotenzin 1-es receptor blokkoló losartannal. A kísérletek fő vázát izolált szív méréseink adták, ahol állandó perfúziós nyomás mellett Langendorff rendszerben párhuzamosan regisztráltuk a szív hemodinamikai teljesítményét jellemző paramétereket (bal kamrai nyomás, koronária-áramlás) és Indo-1 felszíni fluorometriával a Ca^{2+}_i tranzienseket. Ezeket kiegészítettük in vivo echokardiográfiás mérésekkel, szövettani elemzésekkel, szöveti fehérjeszint meghatározással, illetve egyéb specifikus vizsgálatokkal, elemzésekkel, amelyek az egyes vizsgálatoknál kerülnek külön említésre.

I. 2-es típusú diabéteszes, hipertóniás állatmodell leírása

A kutatási terv célkitűzéseinek megválaszolásához használt két állatmodell közül az 1-es típusú diabéteszes patkánymodell már korábban beállításra került laboratóriumunkban. A másik modellt, egy hipertóniás 2-es típusú diabéteszes (metabolikus szindrómás) patkánymodellrel azonban korábban nem alkalmaztuk, így első lépésként ennek módszereinkkel történő leírását tűztük ki célul. A modell validálásán túl eredményeink sok új elemmel gazdagították a diabéteszes szív és kardiális Ca^{2+}_i háztartás kapcsolatára vonatkozó ismereteinket.

a. 6 hétig tartó fruktóz gazdag étrend hatásai a szívfunkcióra és a Ca^{2+}_i tranziensekre

Ismert, hogy a fruktóz gazdag étrend patkányokban egy a humán metabolikus szindrómát modellező, inzulinrezisztenciával, dyslipidaemiával, hipertóniával jellemezhető komplex anyagcserezavart hoz létre. Bár ismert, hogy a metabolikus szindróma résztüneteinek mindegyike negatívan befolyásolja a szív intracelluláris kalcium (Ca^{2+}_i) háztartását szabályozó folyamatokat, alig van adat arra vonatkozóan, hogy ezek konstellációja miként hat rájuk. Emellett arról is keveset tudunk, hogy a Ca^{2+}_i tranziensek korai elváltozásai

hogyan viszonyulnak a kardiális diszfunkció megjelenéséhez. Első vizsgálatunk arra irányult, hogy ezeket a hiányosságokat pótolja, célkitűzésünk a metabolikus szindróma kardiális Ca^{2+}_i tranziensre, és szívfunkcióra gyakorolt korai hatásainak részletes leírása volt.

Hím Sprague-Dawley patkányokat 6 hétig olyan táppal etettünk, amiben a tápérték 67%-át fruktóz tette ki. A 6 hetes periódus végén vérnyomásmérést, orális glükóz tolerancia tesztet és echokardiográfiás vizsgálatot követően a szíveket izoláltuk és Langendorff szerint perfundáltuk. Az izolált szíveken Indo-1 felszíni fluorometriával a bal kamrai nyomásgörbével és a koronária-áramlás változásaival párhuzamosan Ca^{2+}_i -tranzienseket regisztráltunk. A szarkoendoplazmás retikulum Ca^{2+} ATPáz (SERCA2a) pumpafunkció sérülékenységének tisztázására SERCA inhibitor ciklopiazonsavat (CPS - $5\mu M$) infundáltunk a kísérlet során. A Ca^{2+}_i tranziensek morfológiájának és dinamikájának elemzése mellett egy a laboratóriumunkban kifejlesztett matematikai modell segítségével megbecsültük a Ca^{2+} mozgásokért felelős fő transzporterek (így a SERCA2a és a rianodin receptor - RyR2) egyes funkcionális paramétereit. Western blot analízissel meghatároztuk Ca^{2+}_i tranziens kialakításában alapvető szerepet játszó transzporterek és szabályozó fehérjék expresszióját.

Az eredmények igazolták az inzulin rezisztencia és a hipertónia meglétét. Az in vivo echokardiográfiás vizsgálatok hipertrófia jeleit mutatták, de a funkcionális vizsgálatok, és az izolált szív hemodinamikai paramétereit megtartott pumpafunkciót tükröztek. A Ca^{2+}_i tranziens elemzése során a Ca^{2+} szekvesztráció ütemének csökkenése, a modell analízissel a SERCA2a csökkent Ca^{2+} affinitása volt megfigyelhető. A CPS infúzióra a fruktóz diétán tartott állatok szívei érzékenyebben reagáltak. Western blot analízissel a fruktóz diétát követően fokozott SERCA2a, és foszforilált foszfolambán expresszió volt mérhető a szívekben.

Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a metabolikus szindróma korai stádiumában a SERCA2a funkcionális sérülése következik be. Az ebből adódó zavart a SERCA2a és a foszfolambán foszforilációját szabályozó folyamatok upregulációja kiküszöböli, így a szívfunkció megtartott marad. Ez az egyensúly azonban sérülékeny, hisz a szívfunkció érzékenyen reagál a SERCA2a funkció hirtelen csökkenésére.

A vizsgálatból született közlemény:

Zsuzsanna Miklós, Péter Kemecei, Tamás Bíró, Rita Marincsák, Balázs I. Tóth, Jorn op den Buijs, Éva Benis, András Drozgyik, Tamás Ivanics. Early cardiac dysfunction is rescued by upregulation of SERCA2a pump activity in a rat model of metabolic syndrome. 2012 Acta Physiol. **Közlésre elfogadva. (IF: 3,138)**

b. 10 hétig tartó fruktóz gazdag étrend hatásai

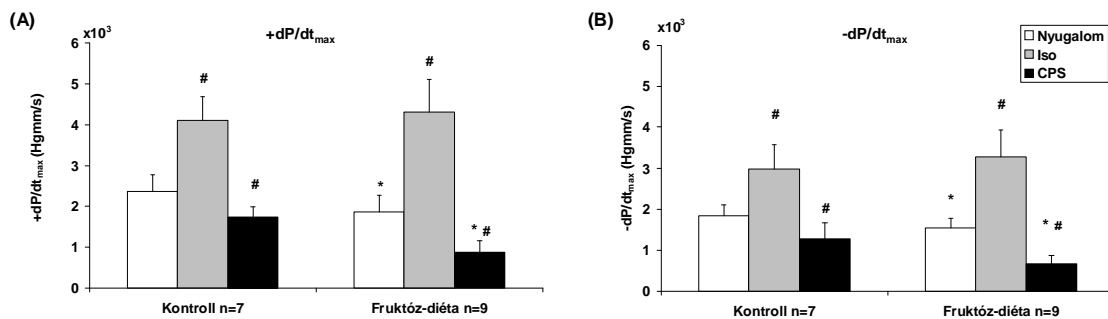
Fenti eredményeink egyértelműen kijelölték a következő lépést, és egy újabb kísérletsorozat célkitűzése a metabolikus szindróma során kialakuló kontraktilis funkcionális eltérések és miokardiális Ca^{2+}_i homeosztázis zavarok elemzése volt a kórfolyamat egy olyan stádiumában, ahol már egyértelműek a kardiális dekompenzáció jelei. Mivel jól ismert, hogy metabolikus szindrómában a szív különböző stressz helyzetekkel szembeni tűrőképessége korlátozott mértékű, és ebben a Ca^{2+}_i homeosztázis sérülése alapvető szerepet játszhat, megvizsgáltuk azt is, hogy a Ca^{2+}_i -tranziens jellemző paraméterei hogyan változnak a szívben hipoxia hatására.

Ebben a vizsgálatban 10 hétig tartottuk fruktóz dús étrenden a patkányokat. Az izolált, perfundált szív kísérleteket kiegészítettük in vivo echokardiográfiás vizsgálatokkal, orális glukóz terheléssel (oGTT) és a Ca^{2+}_i homeosztázis kulcsfehérjéinek Western blot analízisével. A SERCA2a működés részletesebb elemzése érdekében az izolált szíveken megvizsgáltuk a hemodinamikai funkciót és a Ca^{2+}_i tranzienseket béta-agonista isoproterenol (ISO-5 nM), és SERCA2a gátló ciklopiazonsav (CPS-5 μ M) infúziós alkalmazásával. A hypoxiás kísérletekben a Ca^{2+}_i tranziens és a hemodinamikai állapot nyugalmi értékeinek rögzítése után a szíveket 95% N_2 + 5% CO_2 gázkeverékkel equilibráltatott Krebs-Henseleit oldattal perfundáltuk. A 10 perces hipoxiás inzultust 20 perces poszthipoxiás perfúzió követte.

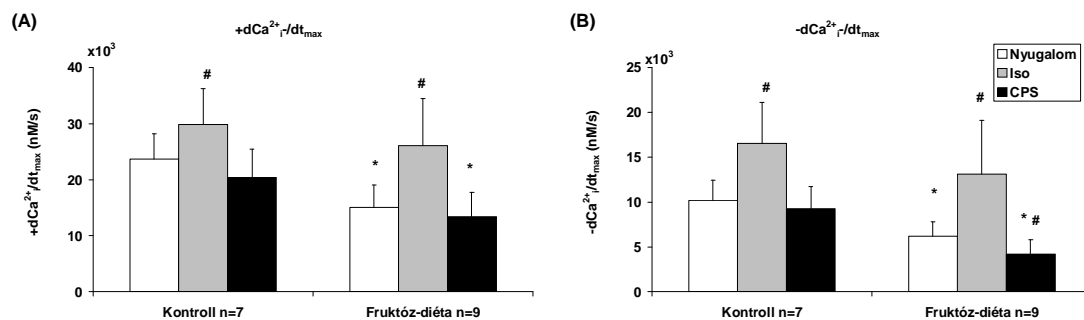
A 10 hétig tartó fruktóz diétát követően a manifeszt metabolikus szindróma mellett a korábban megfigyelt eltéréseken kívül már egyértelművé váltak echokardiográfiával a csökkent pumpafunkció jelei [ejekciós frakció - EF (%): kontroll - K: $78,2 \pm 5,4$ vs fruktóz - F: $54,6 \pm 8,2^*$, *: $p < 0,01$ K vs. F], illetve izolált szívben bazális körülmények között is kimutatható volt az inotróp ($+dP/dt_{max}$) és luzitróp ($-dP/dt_{max}$) zavar (**1. ábra**). A Ca^{2+}_i tranziens elemzése során a hemodinamikai zavarokkal párhuzamosan lassult Ca^{2+} -felszabadulás és -szekvesztráció volt megfigyelhető (**2. ábra**). Isoproterenol hatására a diabéteszes szívek fokozott béta-adrenerg választ adtak a $+/-dP/dt_{max}$ paraméterek tekintetében (**1. ábra**), de a szívfrekvencia-fokozódás mértéke megegyezett a kontrolléval. CPS hatására a fruktóz-diétás állatok szíveiben a Ca^{2+} -szekvesztráció sebességének ($-dCa/dt_{max}$) fokozott csökkenése volt megfigyelhető (**2. ábra**). A szívek SERCA2a gátló iránti fokozott érzékenysége a SERCA2a funkció sérülésére utal (**1., 2. ábra**).

Hipoxia hatására a fruktóz-diétán tartott patkányok szíveiben a bal kamrai végdiasztolés nyomás szignifikánsan jobban megemelkedett (**3A. ábra**). A nyugalomban is tapasztalható

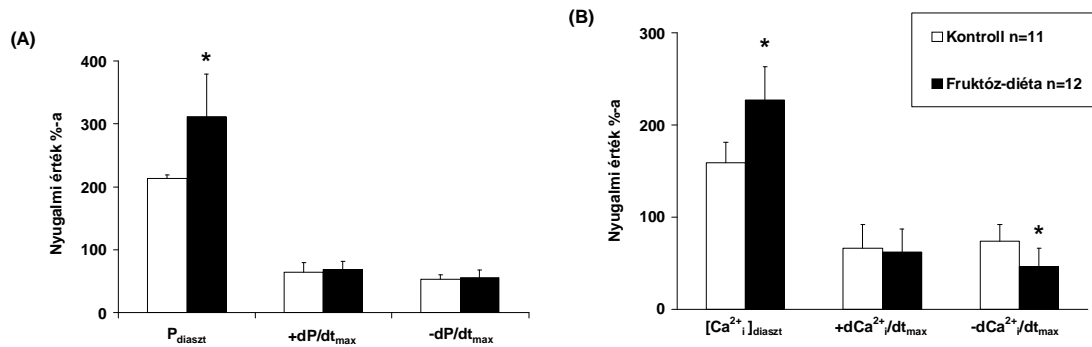
csökkent inotrópia és luzitropia hipoxia alatt is megfigyelhető volt, de mindkét paraméter hasonlóan változott hipoxia hatására a kontroll és metabolikus szindrómás csoportban is (**3A. ábra**). A fruktózzal táplált állatok szíveiben a Ca^{2+}_i szekvesztráció csökkenésének mértéke kifejezettebb volt a hipoxia során (**3B. ábra**). A végdiasztolés nyomás diabéteszes szívekben tapasztalt emelkedésének hátterében tehát a hipoxia hatására fokozottan lassuló Ca^{2+}_i szekvesztráció és ennek következtében kialakuló magasabb végdiasztolés Ca^{2+}_i szint áll. A Ca^{2+}_i -tranzien kialakításáért felelős kulcsfehérjék expresszióját elemezve azt tapasztaltuk, hogy 10 hét fruktóz-diétát követően nőtt a foszforilált-PLB és a SERCA2a szintje a kontroll szívekhez képest.



1. ábra Kontroll és fruktóz dús diétán tartott diabéteszes patkányszívek bal kamrai nyomásgörbéinek $+dP/dt_{max}$ (A) és $-dP/dt_{max}$ (B) adatai nyugalmi körülmények között (fehér); 5 nM béta-agonista izoproterenol (szürke, Iso); illetve 5mikroM SERCA gátló ciklopiazonsav (fekete, CPS) infúzió alatt. *: $p < 0,05$ kontroll vs. fruktóz; #: $p < 0,05$ Iso vagy CPS vs. nyugalmi érték (ANOVA és Student-Neumann-Keuls *post hoc* teszt, átlag \pm SD)



2. ábra Kontroll és fruktóz dús diétán tartott diabéteszes patkányszívek Ca^{2+}_i -tranzienéseinek $+dCa^{2+}_i/dt_{max}$ (A) és $-dCa^{2+}_i/dt_{max}$ (B) adatai nyugalmi körülmények között (fehér); 5 nM béta-agonista izoproterenol (szürke, Iso); illetve 5mikroM SERCA gátló ciklopiazonsav (fekete, CPS) infúzió alatt. *: $p < 0,05$ kontroll vs. fruktóz; #: $p < 0,05$ Iso vagy CPS vs. nyugalmi érték (ANOVA és Student-Neumann-Keuls *post hoc* teszt, átlag \pm SD)



3. ábra Kontroll (fehér) és fruktóz dús diétán tartott diabéteszes patkányszívek (fekete) hemodinamikai (A) és Ca^{2+} -tranzien (B) paramétereinek hypoxia során mért adatai a prehypoxiás értékek százalékában. *: $p < 0,05$ kontroll vs. fruktóz (kétmintás T-próba, átlag \pm SD)

Eredményeink szerint a metabolikus szindróma során kifejlődő kardiális dekompenzáció hátterében egyértelműen kimutatható a SERCA2a funkció sérülése, melynek oka lehet a SERCA2a poszttranszlációs modifikációja vagy a membránkörnyezet kedvezőtlen változása. A SERCA2a diszfunkció miatt csökkent Ca^{2+} szekvesztráció hipoxiára fokozottan érzékeny, amely oxigénhiányos állapotokban kifejezettebb szívfunkció romlást és a Ca^{2+} szint túlzott mértékű emelkedését okozhatja. A sérült szívfunkció kompenzálására a SERCA2a upregulációja jön létre, valamint fokozott béta-adrenerg válaszkészség alakul ki, ami elsősorban a SERCA2a működésének serkentésén keresztül érvényesül.

A vizsgálatból született konferencia kivonatok:

1. Drozgyik A, Benis É, Kemecsei P, **Miklós Zs**, Ivanics T. Cardiac SERCA2a function is impaired in type 2 diabetes. *Acta Physiologica Hungarica* 97(1): 99, 2010.
2. Drozgyik A, Benis É, Kemecsei P, Ivanics T, **Miklós Zs**. SERCA2a dysfunction enhances the susceptibility of the diabetic heart to hypoxia. *Acta Physiologica Hungarica* 97(4): 436, 2010.

II. A renin-angiotenzin rendszer (RAS) aktiváció és kardiális Ca^{2+} homeosztázis vizsgálata 1-es típusú diabéteszes állatmodellen

A projekt specifikus kérdéseit először 1-es típusú krónikus diabéteszes állatmodellen tanulmányoztuk. Így vizsgáltuk egyrészt azt, hogy a RAS milyen módon befolyásolja a kialakuló kardiális diszfunkciót és a Ca^{2+} szabályozásbeli zavarokat, másrészt pedig azt, hogy

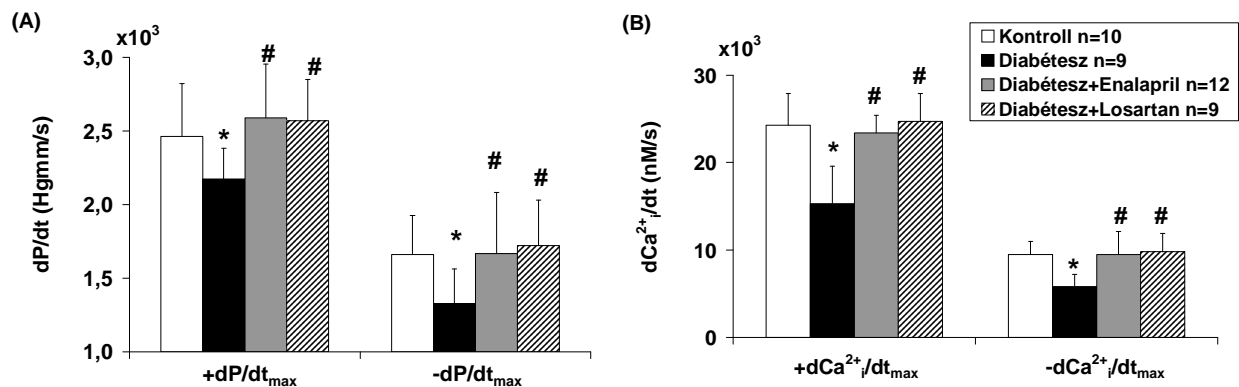
a klasszikus angiotenzin 1-es receptor (AT_1) mediált útvonal felelős-e a RAS-aktiváció hatásainak közvetítéséért.

A vizsgálat során hím Sprague-Dawley patkányokban béta-sejt ablációval (70 mg/ttkg egyszeri iv. streptozotocinnal) 1-es típusú diabéteszt hoztunk létre. Ezt követően a diabéteszes patkányok egy része 25 mg/ttkg/nap dózisban ACE-gátló enalapril kapott az ivóvízben a RAS működésének kiiktatására, más csoportja pedig 25 mg/ttkg/nap dózisban AT_1 blokkoló losartant az AT_1 -receptor mediált útvonal gátlására. 6 hét kezelés után a szívfunkció és a bal kamrai dimenziók in vivo megítélésére echokardiográfiás vizsgálatot végeztünk, majd vérnyomás és vércukorszint mérést követően a keringő angiotenzin 2 (ANG II) szint meghatározására vérmintákat fagyasztottunk. Ezt követően végeztük el izolált szív kísérleteinket, melyek során a szokásos módon bal kamrai nyomásgörbét, koronária-áramlást és Ca^{2+}_i tranzienseket regisztráltunk. A kardiális fibrózis mértékét szövettani metszeteken vizsgáltuk kötőszöveti festést követően. Külön csoportokban vizsgáltuk azt is, hogy kontroll állatokra hogyan hatnak az alkalmazott terápiák, de nem volt számottevő hatás kimutatható.

Eredményeink szerint a vérnyomást sem a diabétesz, sem az alkalmazott ACE-gátló és AT_1 -receptor blokkoló kezelés nem befolyásolta jelentősen. A diabétesz által okozott növekedési elmaradást, melyet az alacsonyabb testtömeg és szívtömeg jelzett, mindkét alkalmazott kezelés mérsékelte, de a diabétesz meglétét igazoló magas vércukorszintre egyik sem volt hatással. A keringő ANG II szint nem mutatott számottevő eltérést a diabéteszes és a kontroll csoport között. Echokardiográfiával a diabéteszes állatokban csökkent ejekciós frakciót mértünk, ami mind ACE-gátló, mind AT_1 -receptor blokkoló kezelés hatására javult [ejekciós frakció(%): Kontroll (K n=10):78,9±6,4; Diabétesz (D n=9):54,5±11,2*; Diabétesz+Enalapril (D+Ena n=12):65,2±10,4*[#]; Diabétesz+Losartan (D+Los n=9):68,6±9,5*[#]] (*:p<0,05 Diabéteszes csoportok vs. Kontroll; #:p<0,05 D vs. D+Ena vagy D+Los (ANOVA+Fisher post hoc; átlag±SD). Az izolált diabéteszes szíveket csökkent szívfrekvencia, valamint inotróp (csökkent $+dP/dt_{max}$) és luzitrop zavar (csökkent $-dP/dt_{max}$) jellemezte (4A. ábra). Ezek háttérében a Ca^{2+}_i -tranziensek elemzése a Ca^{2+} -felszabadulás ($+dCa^{2+}/dt_{max}$) és -szekvesztráció ($-dCa^{2+}/dt_{max}$) sebességének csökkenését mutatta (4B. ábra). Az enalapril és losartan kezelés egyike sem befolyásolta a szívfrekvenciát [pulzusszám (ütés/perc): K: 292±21; D: 243±23*; D+Ena: 237±29*; D+Los: 241±38*; (*:p<0,05 Diabéteszes csoportok vs. K)], ellenben teljes mértékben normalizálta az inotróp és luzitrop diszfunkciót, valamint a $+dCa^{2+}/dt_{max}$ és $-dCa^{2+}/dt_{max}$ paramétereket (4. ábra). A

hisztológiai vizsgálat során nem volt sem perivaszkuláris, sem intersticiális fibrózis kimutatható a diabéteszes szívekben.

Kapott eredményeink alapján megállapítható, hogy 1-es típusú kísérletes diabéteszben az ACE-gátló és AT₁ receptor blokkoló kezelés hatékonyan gátolja a kardiális diszfunkció és a Ca²⁺_i-tranziens elváltozásainak kifejlődését. Mivel a keringő ANG II szint nem tér el a diabéteszes és kontroll állatok között, ez a hatás feltehetően a szívizomban lokálisan képződő ANG II hatásainak kivédésén keresztül érvényesül. A kardiális szöveti RAS aktivációja tehát alapvetően hozzájárul a szív Ca²⁺_i-szabályozó mechanizmusainak sérüléséhez, hatását javarészt az AT₁-receptor mediált jelátviteli útvonal közvetíti, az alternatív szignál transzdukciós folyamatok szerepe elhanyagolható. A szöveti RAS aktiváció feltehetően a Ca²⁺_i-transzportenzimek, és szabályozó fehérjék expressziós mintázatát befolyásolja. Ennek igazolását a Ca²⁺_i-transzporter/szabályozó fehérjék szintjének Western blottal történő meghatározása adja, mely jelenleg folyamatban van. A hiányzó adatok birtokában a munka a közeljövőben publikálásra kerül.



4. ábra Diabéteszes (fekete), illetve ACE gátló enalaprillal (szürke) és AT₁ antagonistá losartannal (csíkos) kezelt diabéteszes, valamint azonos korú kontroll (fehér) patkányokból izolált szívek bal kamrai nyomásgörbéinek +/-dP/dt_{max} (A) és Ca²⁺_i-tranzienseinek +/-dCa²⁺_i/dt_{max} (B) adatai. *:p<0,05 Diabéteszes csoportok vs. Kontroll; #:p<0,05 Diabétesz vs. Diabétesz+Enalapril vagy Diabétesz+Losartan (ANOVA+Fisher post hoc; átlag±SD)

A vizsgálatból született konferencia kivonatok:

1. **Miklós Zs.**, Dunay G, Kemecsei P, Tőkés AM, Ivanics T. Enalapril treatment prevents the development of disturbed cardiac intracellular calcium handling in experimental diabetes. *Acta Physiologica Hungarica* 97(4): 459, 2010.
2. **Miklós Zs.**, Dunay G, Kemecsei P, Tőkés AM, Ivanics T. Activation of renin angiotensin system contributes to the impairment of intracellular calcium handling via angiotensin receptor 1 signaling pathways in the diabetic heart. *Acta Physiologica* 202(Suppl. 684): 78-P58, 2011.

III. A renin-angiotenzin rendszer (RAS) aktiváció és kardiális Ca^{2+}_i homeosztázis vizsgálata hipertóniás 2-es típusú diabéteszes (metabolikus szindrómás) állatmodellen

Az 1-es típusú diabéteszben szenvedő betegek a teljes diabéteszes populáció csupán 5%-át teszik ki. A klinikailag jelentősebb 2-es típusú diabéteszhez a betegek jelentős hányadában hipertónia társul. A hipertóniával társult diabéteszben manifesztálódó szívelváltozások kialakulásában is egyértelmű szerepe van RAS-nak. A RAS aktiváció azonban itt összetett, hiszen a kardiális szöveti RAS diabétesz következtében fellépő aktivációját a hipertónia miatti fokozott szívterhelés is elősegíti. Ezért fontos klinikai jelentőséggel bír, hogy az 1-es típusú diabéteszben fent megfigyelt összefüggést hipertóniás diabéteszes modellben is megvizsgáljuk, és megállapítsuk, hogy a kialakult elváltozásokért a hipertónia, vagy az attól független kardiális anyagcsere folyamatok felelősek-e elsősorban.

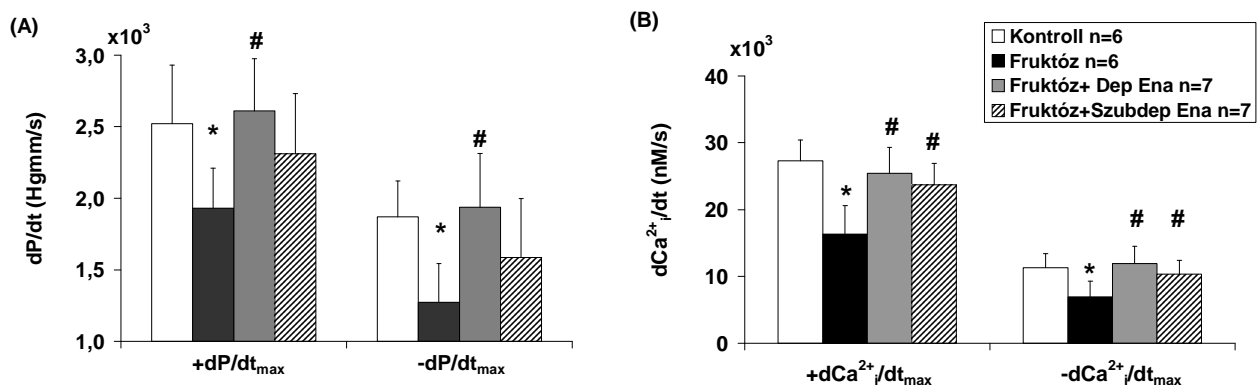
Kérdésünk megválaszolására a fent részletezett fruktóz-diéta által indukált hipertóniás, 2-es típusú diabéteszes patkánymodellt használtuk. 10 hetes diétás periódust választottunk, hogy egyértelmű kardiális eltéréseket lássunk. A diéta 3. hetétől az állatok egy része 8 héten át depresszor dózisú 20 mg/ttkg/nap ACE-gátló enalapril kezelésben részesült bőr alá ültetett biodegradációs pellet formájában (Enalapril with biodegradable carrier-binder, Innovative Research of America), más részüknek szubkután Alzet ozmotikus minimumpák segítségével szubdepresszor dózisban (1,5 mg/ttkg/nap) adagoltuk a szert ugyanennyi ideig.

A kezelési periódus végén echokardiográfiás vizsgálatot, vérnyomásmérést, orális glükóz tolerancia tesztet végeztünk, a keringő ANG II meghatározása céljából vérmintát vettünk. Izolált szív készítményen bal kamrai nyomást, Ca^{2+}_i tranzienseket regisztráltunk. A fibrózis mértékének megítélésére szövettani vizsgálatot végeztünk, majd a szíveket a Ca^{2+}_i -transzportenzimek, és szabályozó fehérjék szintjének meghatározása céljából lefagyasztottuk.

A fruktóz dús diétát követően kialakuló csökkent glükóz-toleranciát egyik alkalmazott terápia sem befolyásolta. A hipertóniát a depresszor dózisú enalapril kezelés korrigálta, a szubdepresszor dózisú terápia nem volt rá hatással. A szövettani metszeteken nem volt fibrózis kimutatható. Fruktóz gazdag diéta mellett szívizom hipertrófia alakult ki, amit a depresszor enalapril terápia kivédett. Metabolikus szindrómában echokardiográfiával csökkent pumpafunkció volt megfigyelhető, amit a depresszor dózisú kezelés korrigált, a szubdepresszor ACE-gátló terápia pedig jelentősen javított [ejekciós frakció - EF (%): *Kontroll (K n=8): 73,4±7,7, Fruktóz (F n=6):51,5±6,3*, Fruktóz+Depresszor enalapril*

($F+DEP$ $n=7$): $61,7\pm 8,2^{*\#}$; *Fruktóz+Szubdepresszor enalapril* ($F+SZUBDEP$ $n=6$):
 $75,6\pm 7,5^{\#}$] ($^* : p < 0,05$ *Fruktóz csoportok vs. Kontroll*; $^{\#} : p < 0,05$ F vs. $F+DEP$ vagy
 $F+SZUBDEP$ (ANOVA+Fisher post hoc; $\bar{x} \pm SD$)). A fruktóz gazdag diétán tartott állatok
 izolált szívein megfigyelt inotróp és luzitróp zavart a depresszor dózisú ACE-gátló terápia
 helyreállította, a szubdepresszor dózisú kezelés javította (**5A. ábra**). A lassult Ca^{2+}_i
 felszabadulást, és szekvesztrációt az enalapril mindkét dózisban normalizálta (**5B. ábra**).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a hipertóniával szövődött 2-es típusú
 diabéteszben kifejlődő kardiális diszfunkció a vizsgált modellben a vérnyomás korrekciójára
 alkalmas ACE-gátló kezeléssel teljes mértékben normalizálható, de már szubdepresszor
 dózisú ACE-gátló terápiával is hatékonyan javítható. Kísérleteinkben a kardiális Ca^{2+}_i
 tranziensek kedvezőtlen elváltozásait már az alacsony dózisú enalapril alkalmazása is kivédte.
 Ezek alapján megállapítható, hogy a szívben a diabéteszes elváltozások következtében szöveti
 szinten képződő ANG II játszik fontos szerepet a Ca^{2+}_i háztartás zavarainak kialakulásában.
 Feltételezhetően befolyásolja a Ca^{2+} transzportrendszerek expresszióját, de ez a feltételezés
 csak a folyamatban lévő Western blot vizsgálatok eredményeinek tükrében nyerhet
 megállapítást. A vizsgálat 2011. második félévében zajlott le, így még nem került közlésre.



5. ábra Fruktóz gazdag diétán tartott metabolikus szindrómás (fekete), illetve depresszor dózisú (20mg/ttkg/nap) (szürke) vagy szubdepresszor dózisú (1,5mg/ttkg/nap) (csíkos) ACE gátló enalaprillal kezelt metabolikus szindrómás, valamint azonos korú kontroll (fehér) patkányokból izolált szívek bal kamrai nyomásgörbéinek +/-dP/dt_{max} (A) és Ca^{2+}_i -tranzienseinek +/-dCa²⁺/dt_{max} (B) adatai. $^* : p < 0,05$ *Fruktóz vs. Kontroll*; $^{\#} : p < 0,05$ *Fruktóz vs. Fruktóz + Dep Ena* vagy *Fruktóz + Szubdep Ena* (ANOVA+Fisher post hoc; $\bar{x} \pm SD$)

Véggövetkeztetés

A projekt vizsgálatainak eredményei alapján megerősítést nyert a hipotézis mely szerint a diabéteszben megfigyelhető kardiális RAS aktiváció és a kardiomiociták Ca^{2+}_i háztartásának zavara között ok-okozati kapcsolat áll fenn. Az ACE-gátlók és AT_1 antagonisták alkalmazása kedvezően befolyásolja a Ca^{2+}_i tranziens elváltozásait, ami pozitívan hat a szívfunkció alakulására is. Eredményeink újabb tényekkel támasztják alá a RAS gátlásának terápiás indikációját 1-es és 2-es típusú diabéteszben is, és támogatják normotóniás diabéteszes betegekben is a szubdepresszor dózisú ACE-gátló kezelés alkalmazását a szívsvövdmények kialakulásának megelőzésére.