

A prediabétesz és a non-obez 2-es típusú diabétesz mellitusz szívhatásainak vizsgálata kísérletes állatmodellekben

A Ph.D. disszertáció tézisei

Sója Andrea

Témavezető: Dr. Csont Tamás Ph.D.

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Biokémiai Intézet

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem



Szeged

2021

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- I. Sárközy M, Szűcs G, Fekete V, Pipicz M, Éder K, Gáspár R, **Sója A**, Pipis J, Ferdinandy P, Csonka C, Csont T.
Transcriptomic alterations in the heart of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats
Cardiovascular Diabetology (2016) 15:110
IF: 4.752

 - II. Szűcs G¹, **Sója A**¹, Péter M¹, Sárközy M, Bruszel B, Siska A, Földesi I, Szabó Z, Janáky T, Víggh L, Balogh G, Csont T.
Prediabetes Induced by Fructose-Enriched Diet Influences Cardiac Lipidome and Proteome and Leads to Deterioration of Cardiac Function prior to the Development of Excessive Oxidative Stress and Cell Damage
Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019:3218275
¹ Egyenlő közreműködők
IF: 4.868
- Kumulatív impakt faktor: 9.62

A disszertációhoz kapcsolódó konferencia előadás

- I. **Andrea, Sója**; Gergő, Szűcs; Márta, Sárközy; Flóra, Diána Gausz; Alexandra, Fejes; Tamás, Csont
Effect of fructose-enriched diet on cardiac function in rats
CARDIOLOGIA HUNGARICA 49: Supplementum B pp. B33-B33. (2019)

1. BEVEZETÉS

Manapság sajnos az emberek jelentős része fogyaszt túl sok, különösen szénhidrátban gazdag ételt és italt és/vagy fordít túl kevés időt testedzésre. Ezek sok egyéb faktoral együtt elhízáshoz és diabétesz mellituszhoz (DM) vezethetnek. A DM anyagcsere-betegségek egy olyan csoportja, melyeknek közös eleme a hiperglikémia. A DM esetek nagy többsége két kategóriába esik: egyes típusú és kettes típusú DM (T1DM és T2DM). A T1DM háttérében az inzulinszekréció teljes hiánya áll. Ezek a betegek általában fiatalok és soványak. A sokkal gyakoribb T2DM kiváltó oka az inzulin hatásával szembeni rezisztencia és ebből adódóan a csökkent inzulin válasz. A DM e típusában szenvedő betegek elsősorban felnőttek és elhíztak. A DM két fő típusán kívül a prediabétesz jelentőségét is ki kell hangsúlyozni, hiszen ez a diabéteszt megelőző kóros, enyhén hiperglikémiás állapot szoros összefüggésben állhat a szívbetegségek fokozott kockázatával.

A T2DM a diabétesz leggyakoribb formája - az összes DM eset 90-95%-át teszi ki, és egyik legjelentősebb szövődménye a szívelégtelenség. Bár a kutatók sok adatot közöltek a DM-ről és annak a szív-és érrendszerre gyakorolt hatásairól, továbbra is számos bizonytalan és hiányos információ van, így további kutatásokra van szükség a betegség háttérében álló kóros folyamatok jobb megértéséhez. A bevezetés következő bekezdéseiben röviden bemutatásra kerül a prediabétesz, valamint a T2DM egy kevésbé ismert, de jelentős formája, mely nem jár elhízással - úgynevezett non-obez T2DM -, különös tekintettel a szívbetegségekkel való kapcsolataikra. Ezen kívül sor kerül az említett kóros állapotok vizsgálatára használt preklinikai modellek ismertetésére is.

1.1. A prediabétesz jellemzése: epidemiológia, patomechanizmus, szívhatások

A prediabétesz egy olyan anyagcsere-állapot, ahol az éhomi plazma glükóz szintje 5,6-7 mmol/l, vagy egy orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) során, annak második órájában mért glükózszint 7,8-11,1 mmol/l vagy a hemoglobin A1c (HbA1c) szintje 5,7-6,5%. A prediabétesz a népesség kb. 35%-át érinti és sajnos éveken át tünetmentes maradhat. Fontos hangsúlyozni, hogy már az említett enyhén emelkedett, de nem diabetikus vércukorszint és károsodott glükóz tolerancia is ok-okozati összefüggésben állhat a kardiovaszkuláris betegségekkel (KVB).

Bár csak korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésünkre a prediabétesz szívre gyakorolt hatásairól, az ismert, hogy főbb makrovaszkuláris szövődményei a koszorúér-betegség és a kompenzált szívelégtelenség (heart failure with preserved ejection fraction, HfpEF) diasztolés diszfunkcióval. Bár a prediabéteszben és DM-ban megfigyelhető diasztolés diszfunkció háttérében lévő pontos molekuláris mechanizmusok nem ismertek, néhány folyamat feltételezhető, mint például a szív mitokondriális rendellenességei, lipidek

felhalmozódása a szívben, valamint csökkent szarkoplazmás retikulum kalcium ATPáz 2a (SERCA2a) aktivitás.

Kimutatták, hogy a szívben a megfelelő lipidösszetétel szoros összefüggésben áll a szívműködéssel, és ebben nagy szerepe van a megfelelő kardiolipin (KL) tartalomnak és a KL fajtaprofilnak. A KL egy fontos mitokondriális foszfolipid (FL), amely olyan létfontosságú folyamatokban vesz részt, mint a légzés vagy az energiaátalakítás. Mivel a szív tele van mitokondriumokkal és az összes membrán lipid körülbelül 15%-a KL, a KL tartalomban és/vagy fajtaprofilban bekövetkező változások mitokondriális diszfunkciót okozhatnak, amely szívbetegségekhez vezethet, beleértve a prediabéteszt és a diabéteszt. A lipidösszetétel megváltozását eredményezheti például a de novo lipogenezis (DNL) indukálása azáltal, hogy képes módosítani a keringő nem észterezett zsírsavprofil. A magas fruktóztartalmú étrendet gyakran használják prediabétesz kiváltására patkányokban, és mivel a fruktóz metabolizmusa emelkedett DNL-t okoz a májban, ez a modell alkalmas lehet a módosult lipidkészlet szívre gyakorolt hatásainak vizsgálatára is prediabéteszben.

1.2. A DM jellemzése: típusok, epidemiológia, patomechanizmus, szívhatások

A DM egy heterogén krónikus anyagcserebetegség, melyben hiperglikémia alakul ki a károsodott inzulinszekréció, inzulinrezisztencia, vagy mindkettő miatt. A betegségre jellemző, hogy az éhomi plazma glükóz szintje több mint 7 mmol/l, vagy egy OGTT során, annak második órájában mért glükózsztint több mint 11,1 mmol/l vagy a HbA1c szintje több mint 6,5%. A Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation, IDF) információi szerint 2019-ben körülbelül 463 millió ember szenvedett DM-ban, és ezt az óriási számot 2045-re 700 millióra becsülik.

A DM-t a következőképpen csoportosíthatjuk etiológia és patológia szerint: T1DM, T2DM és terhességi DM. A terhességi DM a terhes nők körülbelül 5%-át érinti és leggyakrabban a T2DM egy korai formájának tekinthető. A T1DM az összes diabéteszes beteg 5-10%-át teszi ki – ez a típus elsősorban az immunrendszer genetikai betegsége. A többi diabéteszes beteg, körülbelül 90% T2DM-ban szenved. A T2DM prevalenciája világszerte nő – a betegség szoros kapcsolatban áll az elhízással és az inzulinrezisztenciával.

A DM szövődményeinek patofiziológiája három részre osztható: makrovaszkuláris, mikrovaszkuláris és neurológiai. Ezen szövődmények közös eleme a megemelkedett vércukorszint. Becslések szerint a neuropátia 60-70%-át érinti a diabéteszes betegeknek attól függően, mennyi idősek, mióta diabéteszesek, van-e fájdalmuk, és hogy a neuropátia más okai ki vannak-e zárva. A mikrovaszkuláris szövődmények miatt testszerte károsodnak a kapillárisok, de főleg a szem és a vese érintett. A makrovaszkuláris szövődmények esetén főleg

a szív, az agy és a lábak nagy erei érintettek. Leggyakoribb megnyilvánulása a koszorúerek elmeszesedése, amely a legfőbb oka a DM miatti elhalálozásoknak. Közismert, hogy az érlemeszesedésen kívül a diabéteszes betegekben emelkedett kockázata van a diabéteszes kardiomiopátia (DKM) kialakulásának is.

A T2DM betegek általában elhízottak, azonban a betegségben szenvedők körülbelül 20%-a Európában és Ázsiában nem elhízott. A non-obez T2DM háttérében hangsúlyosabb az inzulinszekréció csökkenése és kevésbé súlyos az inzulinrezisztencia az obez fenotípushoz képest. Hasonlóan az obez T2DM betegekhez, a non-obez betegekben is magasabb a KVB rizikója, mint például a bal kamrai (left ventricular, LV) hipertrófia, fibrózis, valamint a diasztolés és/vagy szisztolés diszfunkció. Mindazonáltal, hogy pontosan milyen molekuláris mechanizmusok vezetnek ezekhez a kóros elváltozásokhoz, nem tudjuk pontosan. Egy lehetséges módja, hogy bővítsük tudásunkat a témában, a szív génexpressziós profiljának vizsgálata, mivel bizonyos gének fel- vagy leszabályozása kóros folyamatok kiváltásán keresztül a szívműködés romlásához vezethet. A transzkriptom analízise gyakran alkalmazott módszer a különböző DM modellekben, azonban a non-obez T2DM esetén csak nagyon kevés az így nyert információ.

1.3. A DM és a prediabétesz kísérletes állatmodelljei

A különféle állatmodellek szerepe kiemelkedően fontos a kutatásban és a betegségek patofiziológiájának jellemzésében. Alapvetően az állatmodellek következő típusait különböztetjük el: [i] genetikai – vagy spontán beteg – modellek, [ii] genetikailag módosított modellek, [iii] speciális etetéssel kiváltott modellek, [iv] műtéttel létrehozott modellek és [v] kémiai indukált modellek. A DM modellezésére leggyakrabban a kémiai indukált és a genetikai modelleket használják. Előbbi esetében a két leginkább alkalmazott szer a streptozotocin (STZ) és az alloxan, utóbbi esetén pedig – elsősorban a T2DM modellezésére – az úgynevezett Zucker Diabetic Fatty (ZDF) és a Goto-Kakizaki (GK) patkányokat, valamint a db/db egereket használják előszeretettel.

A non-obez T2DM szívhatásainak vizsgálatára egy genetikai modellállatot, a GK patkányt használtuk, amely az örökletes T2DM széleskörűen ismert modellje. Ennek a különleges törzsnek a létrehozásához olyan hagyományos Wistar patkányokat tenyésztettek tovább szelektíven, amelyeknek OGTT elvégzését követően a legmagasabb normál vércukorszintjük volt. 4-5 hetes korukra a GK patkányok non-obez és enyhén hiperglikémiás fenotípussal jellemezhetőek, valamint glükóz intolerancia és perifériás inzulinrezisztencia is kialakul bennük, mely a kor előrehaladtával hiperglikémiás, inzulinhiányos állapotba fordul át.

A GK patkányok több olyan értékes tulajdonsággal rendelkeznek, melyek többé-kevésbé gyakoriak és funkcionálisan jelen vannak cukorbeteg emberekben is. Azonban, a hiperglikémia és a glükóz intolerancia ezekben az állatokban nem kapcsolódik elhízás és magas vérnyomás kialakulásához. A GK patkányok további jellegzetességei között említhetjük a glükózválaszra adott károsodott inzulinszekréciót, az emelkedett HbA1c értéket, a szív-és testsúlyváltozást, valamint különféle késői szövődményeket, beleértve a kardiovaszkuláris rendellenességeket. Mivel e kardiovaszkuláris szövődmények közé tartozik a hipertrófia, a fibrózis és a szisztolés és/vagy diasztolés diszfunkció, amelyek tulajdonképpen a DKM jellemzői, így ennek kialakulása igen valószínű ezekben az állatokban. Mivel felnőtt GK patkányokban számos kardiovaszkuláris szövődmény kialakulását írták le, és a humán T2DM patogenezise jól látszik ezekben a rágcsálókban, kijelenthetjük, hogy a GK patkány alkalmas a non-obez T2DM kardiális szövődményeinek tanulmányozására.

A genetikai és kémiai modelleken kívül gyakran alkalmaznak magas szénhidrát-tartalmú étrend által létrehozott modelleket is a kísérletes diabétesz vagy prediabétesz vizsgálatára. Mivel az emberek manapság egyre több szénhidrátban gazdag ételt fogyasztanak, a krónikusan alkalmazott, magas cukortartalmú táppal való etetés által kialakított modellek felhasználása megfelelő módja lehet a létrehozott prediabéteszes vagy diabéteszes állapot vizsgálatának. Cukorforrásként az ilyen kísérleti állatok tápjába és/vagy ivóvizébe leggyakrabban fruktózt, szacharózt vagy glükózt adnak. Kísérletünk során mi fruktózgazdag tápot használtunk, hiszen ez egy gyakori módja a prediabétesz kiváltásának patkányokban. Mivel a fruktóz metabolizmusa során emelkedett DNL figyelhető meg a májban, a fruktózos etetés alkalmas lehet arra, hogy a módosult lipidkészlet hatását megvizsgáljuk a szívben is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Fő célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a prediabétesz és a non-obez T2DM szívre gyakorolt hatásait. A prediabétesz kialakításához krónikus, fruktózgazdag táppal való etetést alkalmaztunk patkányokban. A DM-szal ellentétben tudásunk igen csekély a prediabéteszben kifejlődött diasztolés diszfunkció háttérében álló molekuláris mechanizmusokról. Az azonban közismert, hogy a fruktóz metabolizmusa DNL-hez vezet a májban. Ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e a megváltozott lipidomnak olyan káros hatása a szívre, amely hozzájárulhat a funkciózavar kialakulásához. Továbbá, mivel a szív működés zavarához gyakran hozzájárul a megnövekedett apoptózis és oxidatív stressz, célunk volt feltárni a prediabétesz potenciális hatásait az apoptózisra és az oxidatív stresszre a szívben.

A non-obez T2DM szívhatásainak megfigyelésére a jól ismert genetikai modellállatot, a GK patkányt választottuk. A non-obez T2DM kardiális szövődményeinek háttérében húzódó

molekuláris mechanizmusokat nem ismerjük pontosan. Bár e mechanizmusokról van néhány irodalmi adat, azonban a GK patkányok szívében végbemenő változásokat a transzkriptom szintjén még soha nem vizsgálták. Így további fő célunk volt a kardiális transzkriptom analízise GK patkányokban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Módosított étrenddel kialakított prediabétesz modell

3.1.1. Kísérleti protokoll

Hím Wistar patkányokat szabályozott hőmérsékleten tartottunk 12/12 órás világos/sötét ciklusokkal. Az állatokat 2 csoportra osztottuk és a következő tápokkal etettük 24 héten keresztül: a kontroll csoport hagyományos rágcsálótápot, a fruktózos csoport pedig 60% (w/w) fruktózt tartalmazó tápot kapott. Az éhomi plazma glükózt minden 4. héten megmértük, míg a 12., 16., 20. és 24. héten OGTT-et végeztünk. A 20. és a 24. héten vért vettünk az állatoktól a szérum inzulin, triglicerid (TG) és koleszterinszintjének, valamint a szív-és májkárosodás és az oxidatív stressz markereinek meghatározása céljából. Az etetési protokoll végén *in vivo* szívultrahang és *ex vivo* izolált dolgozó szívperfúzió segítségével vizsgáltuk a szívfunkciót. Ezt követően az állatok szívét izoláltuk későbbi biokémiai vizsgálatok céljából.

3.1.2. Vércukorszint mérés és OGTT

Vért vettünk a *vena saphena*-ból és Accu-Chek vércukormérő készülék segítségével meghatároztuk a vércukorszintet. Az OGTT-hez először megmértük a kiindulási vérglükóz koncentrációt, majd gavage tű segítségével 1,5 g/testsúly kg glükózt adtunk az állatoknak és 30, 60, illetve 120 perccel később ismét megmértük a vércukorszintet.

3.1.3. Inzulinmérés szérum- és pancreas mintákból

Az inzulinszintek meghatározását a gyártó utasításai szerint enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technikával végeztük mind a szérum, mind a homogenizált pancreas mintákból.

3.1.4. Inzulinrezisztencia becslése HOMA-IR index számolással

HOMA-IR (Homeostatic model assessment for insulin resistance) = (éhomi szérum inzulinszint ($\mu\text{U/ml}$) * éhomi szérum glükózsztint (mmol/l)) / 22.5.

3.1.5. Lipid szintek meghatározása szérumból

A szérum összkoleszterin, TG, LDL és HDL (low-and high density, azaz kis-és nagy sűrűségű lipoprotein) koleszterinszintek mérése a 24. héten történt triplikátumokban, kolorimetriás, enzimreakción alapuló méréssel, 96-lyukú lemezekre adaptálva.

3.1.6. Máj-és szívkárosodás markerek mérése szérumból

Az alanin-és aszpartát aminotranszferáz (ALAT, ASAT), kreatin-kináz (CK) és laktát-dehidrogenáz (LDH) enzimek aktivitását UV-teszttel mértük, míg a CK-MB izoforma aktivitásának mérése immunológiai UV-teszttel történt.

3.1.7. Transztorakális echokardiográfia

Ezt a technikát a szív morfológiájának és működésének tanulmányozására használtuk a 24. héten. A patkányokat elaltattuk nátrium-pentobarbitállal, majd Vivid IQ ultrahang készülékkel 2-dimenziós, M-mód és Doppler vizsgálatokat végeztünk az Amerikai Echokardiográfiai Társaság kritériumai szerint. Három egymást követő szív ciklus adatainak kiértékelésére került sor a módszerben járatos egyik munkatársunk által, vakon.

3.1.8. Dolgozó szívperfúzió

A módszert a szív teljesítményének becslésére használtuk. A patkányok altatást követően intravénás heparint kaptak, majd a szíveket izoláltuk és az aortát kanuláltuk és először Langendorff módban, Krebs-Henseleit pufferrel perfundáltuk. Ezt követően a perfúziós rendszert Neely-szerinti dolgozó módra átkapcsoltuk és a szívet recirkuláló pufferrel perfundáltuk. A következő funkcionális paraméterek mérésére került sor: pulzusszám, koronária átáramlás (CF), aorta átáramlás, perctérfogat, LV kifejlődött nyomás (LVDP) és annak első deriváltjai (dp/dt max és dp/dt min), valamint LV végdiasztolés nyomás (LVEDP).

3.1.9. mRNS expresszió vizsgálata qRT-PCR-rel

Kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR), génspecifikus primerek használatával történt az mRNS expresszió vizsgálata. A DNL becslésére a májban a következő gének mRNS expresszióját mértük: szterol szabályozó elem-kötő transzkripció faktor 1 (*Srebf1*), sztearoil-KoA deszaturáz 1 (*Scd1*), zsírsav-szintáz (*Fasn*), acetil-KoA-karboxiláz 1 (*Acaca*), szénhidrát-érzékeny elem-kötő fehérje (*Mlxipl*), nagyon hosszú szénláncú zsírsavak meggyulladásáért felelős 6-os fehérje (*Elovl6*) és zsírsav deszaturáz 1 és 2 (*Fads1*, *Fads2*). A szív hipertrófiájának becslésére pedig a miozin nehézlánc α és β izoformáit (*Myh6* és *Myh7*) mértük. Az RNS izolálását Qiagen Rneasy Fibrous Tissue Mini Kittel végeztük. Eredményeink normalizálásához a hipoxantin-foszforiboziltranszferázt (*Hprt1*) használtuk kontrollként.

3.1.10. Lipidomika

Körülbelül 20 mg elporított LV mintát közvetlenül extraháltunk metanolt tartalmazó butilezett hidrox-toluollal és di20:0 foszfatidilkolinnal. Ultrahangos kezelést követően a keveréket felráztuk és lecentrifugáltuk, majd a felülúszót elraktuk és -20°C -on tároltuk a tömegspektrometriai (MS) analízisig, melyet LTQ-Orbitrap Elite műszerrel végeztünk.

3.1.11. Az oxidatív stressz meghatározása: MDA és 3-NT mérés

A szisztémás és kardiális lipid peroxidáció szintjének meghatározásához megmértük a szérumban és a szívszövetben lévő malondialdehidet (MDA) a következő módon. A szérummintákat összekevertük 1,2 térfogatú törzsoldattal, amely triklór-ecetsavat, tiobarbitursavat és sósavat tartalmazott, és 30 percig 95°C-on melegítettük. Hűtés és centrifugálás után a felülúszót butanollal extraháltuk és spektrofotometriával vizsgáltuk.

A 3-nitrotirozin (3-NT) méréséhez double-antibody sandwich ELISA kitet használtunk. A LV mintákat homogenizáltuk, centrifugáltuk, majd a gyártó utasításainak megfelelően megmértük az optikai denzitás értékeket 450 nm-en.

3.1.12. Western blot

E technika alkalmazásával a B-sejt limfóma 2 (BCL-2), Bcl-2-asszociált x (BAX), B-sejt limfóma - extra nagy (BCL-XL) és a kaszpáz-3 és 7 apoptotikus fehérjék változását vizsgáltuk a szívben, aktin vagy tubulin háztartási fehérjéket használva kontrollként. A LV mintákat homogenizáltuk, lecentrifugáltuk, majd a felülúszók fehérje koncentrációjának meghatározása után mintánként 25 μ g fehérjét választottunk el nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis segítségével. Az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, és a membránokat blokkolást követően elsődleges antitestben inkubáltuk egy éjszakán át. Ezután következett a másodlagos antitestben inkubálás, végül a fluoreszcens jelek detektálása Odyssey CLx készülékkel.

3.1.13. Statisztikai analízis

A lipidomikai adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg, a statisztikai szignifikanciát pedig $p < 0,05$ esetén fogadtuk el. A főkomponens analízis (Principal Component Analysis, PCA) MetaboAnalyst használatával valósult meg. Az összes többi paraméter esetén is az átlag \pm SEM formát használtuk, a csoportok közötti szignifikanciát pedig kétmintás t-próbával vagy Mann-Whitney teszttel határoztuk meg.

3.2. A T2DM non-obez, genetikai modellje

3.2.1. Kísérleti protokoll

A 6 hetes hím GK patkányokat és a velük egy idős hím Wistar kontrollokat a Charles River Laboratories-tól szereztük be és 22 ± 2 °C-on helyeztük el őket 12/12 órás világos/sötét ciklusokkal. Az állatok standard patkánytápot és csapvizet kaptak *ad libitum* beérkezésüktől számítva 9 héten keresztül. 7, 11 és 15 hetes korban megmértük a testtömeget, a szérum glükóz, inzulin és koleszterinszintjét, valamint meghatároztuk a HOMA-IR-t, továbbá 15 hetes korban OGTT-t is végeztünk. 15 hetesen elaltattuk az állatokat, izoláltuk a szíveket és a pancreasokat, majd a szíveket Langendorff szerint perfundáltuk a 3.1.8. pontban leírtak szerint. 5 perc

perfundálást követően a szívkamrákat lefagyasztottuk és -80°C -on tároltuk a génexpressziós analízis elvégzéséig.

3.2.2. Inszulin meghatározás szérumból

A módszer megegyezik a 3.1.3. pontban leírtakkal a következő különbséggel: az OGTT során a 0., 30. és 120. percnél vért vettünk az állatoktól szérum inzulinszint meghatározás céljából.

3.2.3. RNS előkészítés és DNS microarray analízis

A szív minták össz-RNS-ének kinyerését Qiagen miRNeasy Mini Kit segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. Az „oszlopos” DNáz-emésztést Rnáz-mentes DNáz szettel végeztük. Az RNS koncentráció méréséhez NanoDrop 1000 Spektrofotométert, az RNS integritás meghatározásához pedig Agilent 2100 Bioanalyzer System-et használtunk. A 8-nál nagyobb RNS integritási számmal rendelkező mintákat használtuk fel a további analízishez.

Az össz-RNS-t QuickAmp Labelling Kittel jelöltük és amplifikáltuk, majd a jelölt RNS-t tisztítottuk és Agilent Whole Rat Genome $4 \times 44 \text{ K}$ „array slide-okkal” hibridizáltattuk. Mosást követően alapértelmezett „array scanning” -et és „feature extraction” -t végeztünk Agilent DNS Microarray Scanner és Feature Extraction Software 9.5. segítségével.

3.2.4. mRNS expresszió vizsgálata qRT-PCR-ral

A DNS microarray technikával nyert génexpressziós változások validálására qRT-PCR-t végeztünk génspecifikus primerekkel, az össz-RNS reverz transzkripcióját követően. A relatív expressziós arányokat a patkány gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*Gapdh*), *Hprt* és riboszómális fehérje S18 (*Rps18*) háztartási gének normalizált arányaként számítottuk ki.

3.2.5. Génontológiai (GO) analízis

A módszert GO útvonalelemzéssel, DAVID bioinformatikai rendszerrel és adatbázissal végeztük. A különféleképpen expresszáldott géneket DAVID elemzésnek vetettük alá, hogy feltárjuk a szignifikánsan feldúsult biológiai funkciókat/útvonalakat.

3.2.6. Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez a Sigmaplot 12.0 programot használtuk. Minden értéket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg. A non obese T2DM hatását az éhomi glükóz szintre, a szérum inzulin -és koleszterinszintjére, valamint az OGTT során alakuló glükóz értékekre ismételt mérések kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg. Az ANOVA-t követően több tartományú teszteként páronkénti többszörös összehasonlítási eljárásokat végeztünk Holm-Šidák *post hoc* tesztekkel. A T2DM hatását az OGTT AUC-re (area under the curve, görbe alatti terület), a pancreas inzulin koncentrációjára, a test-és szívtömegre, a szív-és testtömeg arányára (heart weight/body weight, HW/BW) és a CF-re kétmintás t-próbával határoztuk meg.

Stasztikailag szignifikáns különbségként a $p < 0,05$ értéket fogadtuk el. A microarray és a qRT-PCR során is kétmintás t-próbát használtunk. Azokat a génexpressziós arányokat, melyek p -értéke $< 0,05$ és \log_2 aránya < -1 , a génaktivitás repressziójának, ahol pedig \log_2 aránya > 1 (~kétszeres), a génaktivitás túlzott expressziójának tekintettük.

4. EREDMÉNYEINK

4.1. Módosított étrenddel kialakított prediabétesz modell

4.1.1. Az állatmodell jellemzése

Munkánk során magas fruktóztartalmú táppal etettünk Wistar patkányokat 24 héten keresztül. A kontroll csoporttal összehasonlítva ebben a csoportban az éhomi plazma glükóz értékek enyhén, de szignifikánsan magasabbak voltak a 12., 16., 20. és 24. héten, valamint az OGTT AUC értékek is szignifikánsan magasabbak voltak a 16., 20. és 24. héten. Bár a HOMA-IR értéke szignifikánsan magasabb volt a fruktózos csoportban a 20. héten, a szérum inzulin szintek között nem volt különbség. A pancreasból mért inzulinszint azonban szignifikánsan magasabb volt a fruktózos állatokban.

Bár mindkét csoportban növekedett az állatok súlya a kísérlet során, az etetés végére a fruktózos patkányok súlya szignifikánsan kisebb lett a kontrollokéhoz képest. A súlygyarapodás szignifikánsan lecsökkent a fruktózos csoportban a kísérlet folyamán. A szervek izolálása során a fruktózzal etetett állatok máján a zsíros degeneráció makroszkopikus jeleit figyeltük meg. E karakteres elváltozás ellenére sem a vizsgált májkárosodás markerek, sem a szérum lipid paraméterek szintje nem nőtt meg ebben a csoportban.

A fruktózos állatok májában zajló anyagcsere változások további vizsgálata érdekében qRT-PCR-t végeztünk. Célunk a DNL-sel kapcsolatos gének vizsgálata volt, melyek közül az *Acaca* és az *Elovló* esetén találtunk szignifikáns emelkedést, valamint a *Fasn* expressziójában tendenciózus növekedést tapasztaltunk.

4.1.2. Szívműködés és morfológia

A fruktóz hatására nem történt szignifikáns változás a mért falvastagságokban és kamrai átmérőkben, kivéve az elülső falvastagságot. Habár a pulzusszámban, ejekciós frakcióban és frakcionális rövidülésben nem volt különbség a csoportok között, az E/A arány szignifikánsan kisebb volt a fruktózos csoportban. Ezen kívül az LVEDP szignifikánsan megnőtt, míg a szív teljesítménye lecsökkent a fruktózos etetés hatására. A két csoport között a max és min dp/dt, LVDP és az aorta szisztolés és diasztolés nyomásértékeiben nem volt különbség.

Mivel a szívultrahang szignifikánsan megnőtt elülső falvastagságot mutatott szisztolében a fruktózos állatok esetén, viszont a szívtömeg és a HW/BW arány nem változott, megvizsgáltuk, potenciálisan kialakulhatott-e szívhipertrofia a fruktózos állatokban. Ennek

érdekében megmértük a *Myh6* és *Myh7* mRNS expresszióját és azt találtuk, hogy a *Myh6* mRNS szintje szignifikánsan megemelkedett, azonban a *Myh6/Myh7* arány nem változott. Továbbá, a vizsgált szívkárosodást jelző enzimek (CK, CK-MB, LDH) sem mutattak szignifikáns változást a csoportok között.

4.1.3. Lipidomikai eredmények

Körülbelül 200 lipid molekulafajtát azonosítottunk és számszerűsítettünk, melyek 20 lipidosztályt foglalnak magukban. A minták egyértelmű szétválása két nem átfedő klaszterre a teljes lipidom komplex átrendeződését jelzi krónikus fruktózetetés hatására. A változások részletesebb vizsgálata és a molekulafajták mintázatának összehasonlítása a két csoport között 100 statisztikailag szignifikáns különbséget tárt fel. Az egyik legfigyelemreméltóbb változás a KL remodeling rendszerhez köthető. Az érett KL szintje szignifikánsan lecsökkent, míg a monolizokardiolipin (MLKL) szintje szignifikánsan megnőtt, és ebből adódóan arányuk (MLKL/KL) markánsan megemelkedett a membránban. Továbbá, a molekuláris fajták szintjén a legbősegebb homoszimmetrikus tetra18:2 KL fajta (72:8) igen nagyfokú csökkenését mutattuk ki. Ez volt a legkiemelkedőbb változás nem csak a membránösszetétel, hanem az abszolút értékek szempontjából is. A KL (72:8) csökkenésével párhuzamosan gyakorlatilag az összes többi aszimmetrikus fajta megemelkedett a fruktóz hatására, a lánchossztól és telítettségétől függetlenül. Ez összességében a szimmetrikus/aszimmetrikus fajok arányaként számolt KL „szimmetria” faktor drámai eséséhez vezetett. Fontos megemlíteni, hogy nem tudtunk kimutatni oxidált lipidfajtákat sem a KL, sem pedig más oxidációra hajlamos lipidosztályok esetében. Azonban, az MLKL fajtaprofilban már detektálni tudtunk „aszimmetria” hibákat.

Egy másik fontos változás a lipidomban az összesen 1 db kettős kötést (DB) tartalmazó lipid fajták általános megnövekedése a fruktózos csoportban. A DB=1 fajták emelkedésével párhuzamosan szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a DB=2 fajtákban.

Továbbá, habár a szív össz-TG tartalma nem változott szignifikánsan fruktózetetés hatására, érdemes megemlíteni a TG készlet kiemelkedő fajtaprofil módosulását. A telített és egyszeresen telítetlen zsírsavakat (ZSS) tartalmazó fajták robusztus relatív emelkedése párhuzamosan a telítetlenebb fajták szignifikáns csökkenésével, együttesen a DB index csökkenését, vagyis a telítettség növekedését eredményezte a szív TG állományában.

A komplex lipidom átrendeződés utolsó érdekes aspektusa a szfingolipid (SZL) készlet, a ceramid (Cer) és a szfingomielin (SZM) átalakulása volt. Az kardiális össz-Cer-ban kicsi, de szignifikáns emelkedést mértünk membrán lipidösszetétel szintjén. Emellett, az össz-SZM szint csak növekvő tendenciát mutatott a membránban, fajtaösszetétele viszont teljesen megváltozott.

4.1.4. Oxidatív stressz

Fruktóz hatására szignifikáns különbség sem a szérumban vagy szívszövet MDA szintjében, sem a szív 3-NT szintjében nem volt megfigyelhető a kontroll csoportéhoz viszonyítva.

4.1.5. Apoptózis

A prediabetes nem befolyásolta a proapoptotikus kaszpáz-7 és BAX expresszióját, viszont az antiapoptotikus BCL-2 szabályozódott, és ezáltal a BAX/BCL-2 arány szignifikánsan megnőtt.

4.2. A T2DM non-obez, genetikai modellje

4.2.1. A GK patkányok metabolikus jellemzése

A GK patkányokban minden mérési időpontban szignifikánsan magasabb éhomi plazma glükóz szintet mértünk, mint a kontrollokban. A 11. és 15. héten mért vércukor értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a 7. héten. A szérumban az inzulinszintje szignifikánsan megemelkedett a GK állatokban a 7. és 11. héten, a 15. héten viszont nem volt különbség a csoportok között. A HOMA-IR értéke is csak az első két mérési időpontban nőtt meg szignifikánsan a GK patkányokban, a 15. héten az emelkedés nem volt statisztikailag szignifikáns. A szérumban a koleszterinszintje a kísérlet során végig szignifikánsan magasabb volt a GK állatokban a kontroll csoportéhoz képest.

Az OGTT közben mért vércukorszint minden mérési alkalommal markánsan megemelkedett a GK csoportban, és az OGTT AUC is mindig szignifikánsan magasabb volt. Továbbá, az OGTT során mért szérumban az inzulin szint 30 perccel a glükóz oldat beadása után szignifikánsan alacsonyabb volt, 120 perccel a beadás után pedig markánsan megemelkedett a GK csoportban. Érdekes módon a pancreas inzulin szintje alacsonyabb volt a GK patkányokban a kontrollokhoz képest, azonban az értékek nem különböztek szignifikánsan a két csoport között.

4.2.2. Test-és szívtömeg, CF

A 15. héten a GK patkányok testtömege szignifikánsan kisebb volt, míg a szívtömeg és a HW/BW arány szignifikánsan magasabb volt. Különös módon a 15. héten a GK állatok szívéből mért CF szignifikánsan magasabb volt a kontrollok CF-jéhez viszonyítva.

4.2.3. A szív génextpressziós profilja és qRT-PCR eredmények non-obez T2DM-ben

A 41012 vizsgált gén közül 507 olyat találtunk a GK patkányok szívében, melyek több mint kétszeresen voltak fel- vagy leszabályozva a kontroll szívekhez képest és expressziójuk szignifikáns változást mutatott. Az 507 gén közül 204 mutatott felszabályozódást, 303 pedig leszabályozódást. Ezenfelül 138 gén esetében több mint háromszoros expresszióbeli változást láttunk a GK patkányok szívében. Ezen 138 gén közül 50 szignifikánsan felszabályozódott, 88

pedig szignifikánsan leszabályozódott. 28 általunk kiválasztott gén expressziós változását qRT-PCR-ral validáltuk; a változásokat 19 gén esetén tudtuk megerősíteni.

4.2.4. GO analízis

A non obese T2DM hatására szignifikánsan megváltozott expressziót mutató 507 gén közül 277 ismert funkciójú gént vetettünk alá GO analízisnek és 115-öt osztottunk be különböző kategóriákba. A maradék vagy ismeretlen expresszált szekvencia „tag” (címke) volt, vagy pedig nem volt felismerhető a GO analízis adatbázisa számára. A 115 analizált gén a következő 5 fő kategóriába került besorolásra: (1) biológiai szabályozás, (2) anyagcsere folyamat, (3) immunfolyamat, (4) biológiai adhézió és (5) ritmikus folyamat.

5. EREDMÉNYEINK MEGBESZÉLÉSE

5.1. Módosított étrenddel kialakított prediabétesz modell

Munkánk során magas fruktóztartalmú táppal etettünk hím Wistar patkányokat 24 héten keresztül annak érdekében, hogy létrehozzunk egy prediabetikus állapotot és tanulmányozzuk ezen kóros állapot szívre gyakorolt hatásait. Mint korábban említettem, az éhomi plazma glükóz szint enyhén, de szignifikánsan megemelkedett a fruktózos csoportban a kontroll csoporttal összehasonlítva, és a 16. héttől az OGTT AUC értékek is szignifikánsan megemelkedtek. Ezen eredményeink igazolják a prediabétesz kialakulását károsodott glükóztolerancia kíséretében. A fruktózos csoportban a szignifikánsan megemelkedett HOMA-IR és pancreas inzulinszint, valamint a változatlan szérum inzulinszint enyhe inzulinrezisztencia kialakulását mutatja.

A fruktózzal etetett csoportban a 24 hetes etetés végére kialakult szignifikánsan kisebb testtömeg, és ennek megfelelően a csökkent súlygyarapodás, illetve a máj elzsírosodásának jelei a következőképpen kapcsolódnak és értelmezhetőek. Eredményeink azt jelzik, hogy a máj elzsírosodásának oka a fruktóz metabolizmusa által előidézett emelkedett DNL lehet. A fruktóz azáltal aktiválhatja a DNL-t, hogy gyorsan piruváttá alakulva megkerüli a glikolízis szabályozó lépését. A fruktózgazdag étrend metabolikus stresszen keresztül befolyásolhatja a vázizom anyagcseréjét. Kimutatták például, hogy a túlzott fruktózbevitel megnöveli a metilglioxál termelődését a májban, oxidatív stresszt előidézve így az izomban. Az aktivált DNL endoplazmás retikulum stresszhez és hepatokinek termelődéséhez vezethet, melyekről közismert, hogy negatívan befolyásolják az izom energia metabolizmusát és inzulin érzékenységét. Ezek az eredmények magyarázhatják a fruktózos állatok esetén tapasztalt testtömegnövekedés csökkenését. A májban lévő zsíros degeneráció makroszkopikus jelei ellenére nem változtak sem a szérum lipid paraméterek, sem pedig a májenzimek, ami a májkárosodás korai szakaszára utal a fruktózzal etetett patkányokban.

A fruktózos állatok májában lévő anyagcsereváltozások további vizsgálatához qRT-PCR-t végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy a ZSS szintézis sebességmeghatározó lépéséért felelős *Acaca* expressziója megnőtt. Emellett, a palmitinsav-szintézis hátralévő lépéseit katalizáló *Fasn* expressziója tendenciózus növekedést mutatott. Ezen eredmények összhangban vannak korábbi megállapításokkal és megnövekedett DNL-t jeleznek a fruktózos csoportban. Az *Elovl6* a hosszúláncú ZSS meghosszabbítási ciklus első és sebességmeghatározó reakcióját katalizálja. Az irodalomból ismert, hogy ennek az enzimnek fontos szerepe van a nem alkoholos zsírmáj és a szteatohepatitisz kialakulásában is.

A prediabetes hatásainak nyomonkövetésére munkánkat a szív vizsgálatával folytattuk. A szívultrahang során szignifikánsan megnövekedett anterior falvastagságot láttunk szisztolében, illetve szignifikánsan kisebb E/A arányt észleltünk a fruktózos állatok szívében. Ezek a változások nagyon korai jelei lehetnek egy enyhe hipertrófiának, illetve diasztolés diszfunkciónak. Az állatok szívtömege és a HW/BW arány azonban nem mutatott szignifikáns eltérést a csoportok között. Ezért a szívhipertrófia molekuláris szintű becslése céljából megmértük a *Myh6* és *Myh7* mRNS expresszióját. Azt találtuk, hogy a *Myh6* mRNS szintje megemelkedett, a *Myh6/Myh7* arány azonban változatlan maradt, és ez az irodalom szerint a hipertrófia hiányát jelzi. A dolgozó szívperfúzió során az LVEDP szignifikáns emelkedését, valamint a szívteljesítmény szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, melyek enyhe diasztolés diszfunkciót jeleznek a prediabeteses állatokban. Széles körben ismert, hogy a LV hipertrófia gyakoribb diabeteses betegekben, és hogy a T1DM vagy T2DM betegek 40-75%-ában jelen van diasztolés diszfunkció. Azonban a mi eredményeink szerint a prediabetesnek ebben a korai szakaszában bár még nem fejlődött ki hipertrófia a szívben, a diasztolés funkció romlása viszont sokkal korábban megjelenik, mint a diabetes kialakulása. Ezen kívül, a fruktózos csoportban a szívizom károsodás klinikai laboratóriumi markerei nem változtak szignifikánsan a kontroll csoporthoz viszonyítva, azt jelezve ezáltal, hogy a szív működés zavara korábban megjelenik, mint a súlyos szerkezeti/sejtes károsodás.

Mivel feltehetőleg a fruktózos táppal etetett patkányok májában aktivált DNL jelent meg, kíváncsiak voltunk, vajon a szívben is jelen volt-e a folyamat. Ennek vizsgálata céljából lipidomikai analízist végeztünk szív mintákból. Az egyik legszembetűnőbb változás a KL remodeling rendszerhez köthető. Elismert tény, hogy normál körülmények között a lizofoszfolipidek szintje alacsony, és a KL remodeling csak nyomokban igényel MLKL-t. Így tehát a szignifikánsan lecsökkent érett KL-szint a szignifikánsan emelkedett MLKL-szinttel párhuzamosan egyértelműen egy rendellenes remodeling folyamatról árulkodik. Egy másik jelentős változás a molekulafajta szintjén a legnagyobb mennyiségben előforduló

homoszimmetrikus tetra18:2 KL fajta (72:8) nagyarányú csökkenése volt. A KL (72:8) csökkenése a többi aszimmetrikus fajta növekedésével járt, és ezek a változások együttesen a KL „szimmetria” faktor markáns csökkenéséhez vezettek a prediabéteszes csoportban.

A lipidom változásainak egy másik nevezetessége a fruktózos állatokban az egy DB-t tartalmazó lipidfajták általános emelkedése volt, míg a két DB-t tartalmazó FL fajták szignifikáns csökkenést mutattak. Az utóbbi lipidek többnyire egy telített ZSS-at tartalmaztak a glicerinváz sn1-, és egy linoleoil-csoportot (18:2) az sn2-helyzetében; ezek potenciális acildonorként szolgálhatnak a tetra 18:2 KL képződéséhez a tafazzin enzim által katalizált transzacilezési reakcióban. A többszörösen telítetlen acilláncokat tartalmazó FL molekulafajtákat illetően számos szignifikáns változást mutattunk ki. A Barth-szindróma egy egérmódelijében is leírták, hogy a tafazzin aktivitás csökkenése komplex változásokat okozott a többszörösen telítetlen FL fajtákban. Így azt gondoljuk, hogy a többszörösen telítetlen FL fajták egyensúlyának felborulása következtében módosulnak a membrán biofizikai és szignalizációs tulajdonságai a szívben.

Mint korábban említettem, a krónikus fruktózos etetés hatására nem történt szignifikáns változás a szív össz-TG tartalmában, azonban a TG készlet fajtaprofiljában nagyfokú változások történtek, mégpedig a telített és egyszeresen telítetlen ZSS-akat tartalmazó fajták mennyiségének növekedése és a telítetlenebb fajták csökkenése. E változások következtében megnőtt a TG-telítettség a szívben, és ez a membrán FL-ek monoén-emelkedésével és 18:2 csökkenésével együtt a DNL aktiválódását jelzi.

A komplex lipidomátrendeződés utolsó fontos aspektusaként meg kell említenünk a Cer és SZM átalakulásait. A Cer a SZL anyagcsere központi molekulájaként az eukarióta stresszválasz közvetítésében játszik szerepet. Funkciója főleg a növekedésgátlással kapcsolatos, leginkább mint proapoptotikus molekula vizsgálják. Munkánk során kicsi, de szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a szív össz-Cer tartalmában a membrán lipidösszetétel szintjén, főleg a nagyon hosszú-láncú Cer-24 fajta emelkedése miatt. Kimutatták, hogy a Cer-24 fajta konfluens Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) sejtekben a sejtciklus leállítását befolyásolták, de az apoptózist nem. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy modellünkben a Cer változásai a membrán biofizikai tulajdonságainak módosításán keresztül vezettek a szív működés zavarához, nem pedig apoptózis kiváltásával. A SZM-t a legfőbb strukturális emlős SZL-ként tartják számon, mely mikrodoménekben felhalmozódva fordul elő. Össz-szintje a prediabéteszes állatok szívében csak egy növekvő tendenciát mutatott, fajtaösszetétele viszont teljesen megváltozott. Ezek alapján úgy gondoljuk, a krónikus fruktózetetés

következtében átszerveződtek a mikrodomének és ezért megváltozott a membrán fizikai állapota és szignalizációs tulajdonságai.

Munkánkat az oxidatív stressz vizsgálatával folytattuk, hiszen ez a folyamat többek között a szív működés károsodásához is köthető. Sem a MDA, sem a 3-NT szintjében nem találtunk szignifikáns emelkedést a kontroll csoporthoz képest, és egyetlen oxidált lipidfajtát sem tudtunk detektálni. Fontos kihangsúlyozni, hogy modellünkben számos szignifikáns változást tapasztaltunk a szív lipidomjában, még mielőtt az oxidatív stressz markerek bármilyen változása kialakult volna.

Az utolsó általunk vizsgált faktor, amely összefüggésben állhat a szív működési zavarokkal, az apoptózis. Western blot eredményeinket tekintve a prediabetes nem volt hatással a proapoptotikus kaspáz-7 és BAX fehérjék expressziójára, míg az antiapoptotikus BCL-2-t le szabályozta. Ezek az eredmények az antiapoptotikus fehérjék korai szabályozási zavarára utalnak prediabetikus állapotban. Mindazonáltal, ezek a változások nem elég jelentősek ahhoz, hogy az apoptózist egy esszenciális faktornak tekintsük a prediabetes kialakulásában.

5.2. A T2DM non-obez, genetikai modellje

Disszertációm diszkussziójának második részében a non-obez T2DM hatását taglalom a szív génextpressziós mintázatára. Erre a célra a spontán diabéteszes GK patkányt választottuk, mely a patomechanizmust illetően nagyon hasonlít a humánban ismert formára. Az irodalomból ismert, hogy GK patkányokban a rendellenes glükóz szabályozás tökéletlen inzulinszekrécióval és inzulinrezisztenciával kapcsolatosan alakul ki. A vércukorszint minden mérési időpontban szignifikánsan magasabb volt a GK állatokban, ráadásul a különböző időpontokban mért glükózszintek között is szignifikáns különbség volt. A 11. és 15. héten a vércukorszint szignifikánsan alacsonyabb volt a GK állatokban, mint a 7. héten. Továbbá, a szérum inzulinszintje szignifikánsan magasabb lett a 11. hétre a 7. héthez képest. A szérum inzulinszint és a HOMA-IR értéke szignifikánsan magasabb volt az első két mérési időpontban a kontroll csoporthoz képest, ami növekvő inzulinrezisztenciát és kompenzatív hiperinzulinémiát jelez. A 15. héten a GK patkányok pancreas inzulinszintje mérsékelten lecsökkent, a β -sejtek kimerülésére utalva. Meg kell jegyezni, hogy ezek az eredmények a szakirodalommal összhangban azt demonstrálják, hogy a β -sejtek száma és az inzulintermelés folyamatosan csökken születéstől felnőttkorig a GK állatokban.

A 15. héten szignifikánsan alacsonyabb testtömeget mértünk a GK patkányokban, bizonyítva ezzel a T2DM non-obez fenotípusát. Ezenfelül, a szívtömeg és a HW/BW arány szignifikánsan magasabb volt a kontrollokhoz viszonyítva, a szív hipertrófiájára utalva. A szív megnagyobbodásának további megerősítésének tekinthetjük a szignifikánsan nagyobb CF

értéket a GK csoportban. Ezek a szívhipertrófia jelenlétét igazoló eredmények DKM kialakulását sejtetik a GK patkányokban.

Meglepő módon csak néhány olyan tanulmány van, ahol qPCR segítségével vizsgálták GK patkányokban azokat a génexpressziós változásokat, amelyek szerepet játszhatnak a szívben a károsodott funkció/morfológia kialakításában. Ezért kijelenthetjük, hogy kutatócsoportunk elsőként vizsgálta hím GK patkányok szívében a transzkriptom-szintű átfogó változásokat. A szignifikánsan megváltozott expressziójú géneket olyan csoportokba soroltuk, mint metabolizmus, jelátvitel, membrán-és struktúrfehérjék, stb. Emellett számos ismeretlen funkciójú kardiális gén expressziója is módosult a DM hatására. A következő bekezdésekben néhány olyan, **DKM**-val összefüggésbe hozható, az előző specifikus klaszterek közül válogatott gén kerül bemutatásra, melyek expressziója szignifikáns változást mutatott.

Az egyik ilyen kategória a szívizom szerkezetének kialakításában szereplő gének csoportja, melyek összefüggésben állhatnak a DKM-val a GO analízis eredményei szerint. Ide tartozik például a csökkent expressziót mutató 5-ös típusú kollagén, alfa 3 (*Col5a3*) és a miozin könnyűlánc 7 (*Myl7*). Az 5-ös típusú kollagén a kollagén rostok geometriáját és erősségét szabályozza, különösen a pancreasban és a vázizomban. Egy tanulmányban leírták, hogy *Col5a3*^{-/-} egerek vázizmában inzulin hatására tökéletlenül ment végbe a glükóz felvétele és az intracelluláris GLUT-4 glükóz transzporter kihelyeződése a membránba, amely glükóz intoleranciát, inzulinrezisztenciát és hiperglikémiát eredményezett. Továbbá, a kontraktilitásban szerepet játszó gének, mint a *Myh7* csökkent expressziója szarkomer diszfunkcióhoz és DKM-hez vezethet.

A gének egy másik csoportja, amely megváltozott expressziót mutatott a T2DM hatására, receptorként és ioncsatornaként funkcionál. Ide sorolhatjuk az adrenoceptor alfa 1d-t (*Adra1d*) és a szarkolipint (*Sln*), melyek expressziója lecsökkent. Az *Adra1d* leszabályozódását a szívben kutatócsoportunk korábban már leírta hipertrófiában és STZ-indukált DM-ban. A *Sln* a SERCA központi szabályozója. Rendellenes működése következtében megnő a SERCA aktivitása, amely abnormális intracelluláris Ca²⁺ kezelést és pitvari remodelinget okoz diszfunkcióval.

A szívben a non-obez T2DM által indukált, szignifikánsan megváltozott expressziójú gének további fő csoportja a jelátvitelhez, a transzkripció szabályozásához és biológiai folyamatokhoz kapcsolódott. Ilyen gén a jelátalakító és transzkripció aktivátor 3 (akut-fázis válasz-faktor) (*Stat3*), mely leszabályozódott, és a Jun D protoonkogén (*JunD*), mely felszabályozódott. A *Stat3* olyan élettani folyamatokban vesz részt, mint a proliferáció, apoptózis és a szív túlélése, különösen a miokardiális iszkémia/reperfúziós károsodás során, habár szerepe ezen folyamatokban ellentmondásos. Számos tanulmány számolt be arról, hogy

DM-ban csökkent a *Stat3* expressziója, amely potenciálisan szív működési zavarhoz vezetett. Más források arról tudósítanak, hogy DM-ban emelkedett a *Stat3* expresszió a szívben, hipertrófiát indukálva. Munkánk során mi azt tapasztaltuk, hogy a microarray analízis szerint lecsökkent a *Stat3* szintje, azonban qRT-PCR-val ezt nem sikerült megerősíteni. Elképzelhető, hogy a *Stat3* expressziója a DM fennállásának időtartamától és a DKM stádiumától függ. A *JunD* az antioxidáns védekező mechanizmusokban szereplő gének szabályozásáért felelős, másik fő funkciója pedig az inzulin/inzulinszerű növekedési faktor 1 jelátvitel és élettartam modulációja.

A DKM-val kapcsolatos gének tárgyalása után egy másik csoportot is fontos megemlíteni, ahol szintén szignifikáns génexpresszióbeli változásokat tapasztaltunk a non obese T2DM hatására. Ezek a gének az immun-és antimikrobiális válaszokért felelősek a szívben: például a komplement komponens 3 (*C3*), mely leszabályozódott, illetve a kemokin (C-X-C motívum) receptor 6 (*Cxcr6*), mely felszabályozódott. Ezen gének módosult expressziója összhangban van a diabéteszben jól ismert, fertőzésekre való fokozott fogékonysággal.

Végül meg kell említeni azokat a géneket is, amelyek módosult expresszióját a szívben eddig nem hozták összefüggésbe DM-szal: ilyen például a mezotelin (*Msln*) csökkent expressziója, valamint a kallikrein 1-hez kapcsolódó peptidáz C3 (*Klk1c3*) emelkedett expressziója. Voltak továbbá olyan, diabéteszben esetleg fontos szerepet játszó, megváltozott expressziójú gének is, amelyeket nem kategorizáltunk speciális funkcionális csoportokba, vagy még nem jellemzett, prediktált gének-és fragmentumokként hivatkoztunk rájuk.

5.3. Összefoglalás

Összegezve elmondható, hogy a prediabétesz és a non-obez T2DM által előidézett szívelváltozások általunk tervezett átfogó elemzését sikeresen elvégeztük. A krónikusan, magas fruktóztartalmú diétán tartott patkányokban a prediabétesz korai stádiuma alakult ki, melynek következtében károsodott a szív működés és teljesen átalakult a szívizom lipidomja, különösen a KL készlet. Nagyon fontos kihangsúlyozni, hogy a szív lipidkészletében létrejövő változatos módosulások megelőzték a jelentős hipertrófia, apoptózis és oxidatív stressz kialakulását.

Másik kísérletünkben elsőként mutattuk be, hogy a non-obez T2DM hatására milyen nagyfokú és változatos módosulások jönnek létre GK patkányok szívének transzkriptomjában, amely a betegséggel kapcsolatba hozható számos gén fel-és leszabályozódásában nyilvánult meg. Mindazonáltal további kutatásokra van szükség, hogy megvizsgáljuk ezeknek a specifikus géneknek a pontos szerepét a non obese T2DM kardiális szövődményeinek, azaz a DKM-nak a kialakításában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatócsoportunk két ismertett munkáját a GINOP 2.3.2-15-2016-00006, EFOP 3.6.2-16-2017-00006, OTKA-NKFIH (K115990) és a 20391-3/2018/FEKUSTRAT támogatta. További támogatóink: Jedlik Ányos program (MED_FOOD TECH_08-A1-2008-0275), Baross Gábor program (DA_TECH_07-METABBET).

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Prof. Dr. Dux Lászlónak, a SZTE Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra, hogy tudományos munkámat a SZTE SZAOK Biokémiai Intézetében végezhessem.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, a Biokémiai Intézet vezetőjének, Dr. Csont Tamásnak a munkám során tanúsított segítőkészségét, támogatását, lelkesedését, türelmét és kedvességét.

Köszönettel tartozom minden kedves kollégámnak a segítségükért, ötleteikért, támogatásukért és bátorításukért, amit a Biokémiai Intézetben közösen eltöltött éveink alatt nyújtottak számomra.

Külön köszönettel tartozom kutatócsoportunkban dolgozó kollégáimnak, Dr. Szűcs Gergőnek és Dr. Sárközy Mártának. Gergőnek a rengeteg segítségért, tanácsért, illetve, hogy mindig számíthattam rá és sokat tanulhattam tőle. Mártának pedig a lehetőségért, hogy társszerzőként részt vehettem a disszertációm alapját képező egyik publikáció elkészülésében, valamint segítségéért az echokardiográfiás vizsgálat elvégzésében.

Szeretnék köszönetet mondani kooperációs partnereinknek, Dr. Péter Máriának, Dr. Balogh Gábornak és Dr. Vígh Lászlónak a lipidomikai mérésekért és a lipidomikai adatok elemzéséért, valamint Siska Andreának és Földesi Imrének a különböző szérumparaméterek mérésében nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni szerelmemnek, Apjok Gábornak, hogy a Biokémiai Intézetben eltöltött éveim alatt is folyamatosan támogatott, bátorított, és hálás vagyok azért a rengeteg szeretetért, figyelmért és segítségért, amit kaptam tőle.

Végül, de nem utolsósorban szeretném kifejezni hálámat szerető családomnak és barátaimnak.

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

- 3-NT:** 3-nitrotirozin
Acaca: acetil-KoA-karboxiláz 1
Adra1d: adrenoceptor alfa 1d
AUC: görbe alatti terület
BAX: Bcl-2-asszociált x
BCL-2: B-sejt limfóma 2
BCL-XL: B-sejt limfóma - extra nagy
C3: komplement komponens 3
Cer: ceramid
CF: koronária átáramlás
CK: kreatin-kináz
Col5a3: 5-ös típusú kollagén, alfa 3
Cxcr6: kemokin (C-X-C motívum) receptor 6
DB: kettős kötés
DKM: diabéteszes kardiomiopátia
DM: diabétesz mellitusz
DNL: de novo lipogenezis
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
Elovl6: nagyon hosszú szénláncú zsírsavak megnyúlásáért felelős 6-os fehérje
Fads1: zsírsav deszaturáz 1
Fads2: zsírsav deszaturáz 2
Fasn: zsírsav-szintáz
FL: foszfolipid
Gapdh: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GK: Goto-Kakizaki
GO: génontológiai analízis
HbA1c: hemoglobin A1c
HOMA-IR: homeostatic model assessment for insulin resistance
Hprt1: hipoxantin-foszforiboziltranszferáz
HW/BW: heart weight/body weight
JunD: Jun D protoonkogén
KL: kardiolipin
Klk1c3: kallikrein 1-hez kapcsolódó peptidáz C3
KVB: kardiovaszkuláris betegségek
LDH: laktát-dehidrogenáz
LV: left ventricular, bal kamrai
LVDP: bal kamrában kifejlődött nyomás
LVEDP: bal kamrai végdiasztolés nyomás
MDA: malondialdehid
MLKL: monolizokardiolipin
Mlxipl: szénhidrát-érzékeny elem-kötő fehérje
Msln: mezotelin
Myh6: miozin nehézlánc α izoforma
Myh7: miozin nehézlánc β izoforma
Myl7: miozin könnyűlánc 7
OGTT: orális glükóz tolerancia teszt
PCA: főkomponens analízis
qRT-PCR: kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció
Rps18: riboszómális fehérje S18
Scd1: sztearoil-KoA deszaturáz 1
SERCA2a: szarkoplazmás retikulum kalcium ATPáz 2a
Sln: szarkolipin
Srebf1: szterol szabályozó elem-kötő transzkripció faktor 1
Stat3: jelátalakító és transzkripció aktivátor 3
STZ: streptozotocin
SZL: szfingolipid
SZM: szfingomielin
T1DM: egyes típusú diabétesz mellitusz
T2DM: kettes típusú diabétesz mellitusz
TG: triglicerid
ZSS: zsírsav