

Az 1-es és 2-es típusú diabéteszes kardiális diszfunkció hátterében álló eltérő miokardiális szövettani és molekuláris jellegzetességek

Mátyás Csaba^{1*}, Sayour Alex Ali^{1*}, Korkmaz-Icöz Sevil², Oláh Attila¹,
Németh Balázs Tamás¹, Páli Szabolcs^{1, 2}, Hirschberg Kristóf², Zubarevich Alina²,
Gwanmesia Patricia Neh², Li Shiliang², Loganathan Sivakkanan²,
Barnucz Enikő^{1, 2}, Merkely Béla¹, Szabó Gábor², Radovits Tamás^{1, 2}

¹Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika, Kísérleti Kutató Laboratórium, Budapest

²Ruprecht-Karls Egyetem, Szívsebészeti Klinika, Kísérleti Kutató Laboratórium, Heidelberg, Németország

Levelezési cím: Dr. Radovits Tamás, 1122 Budapest, Városmajor u. 68. E-mail: radovitstamas@yahoo.com

Célkitűzés: A cukorbetegség (diabetes mellitus, DM) a szívizomzat strukturális és funkcionális elváltozásához vezet. Jelen tanulmányunkban az 1-es és a 2-es típusú DM-ben kialakuló diabéteszes cardiomyopathiához társuló funkcionális és szubcelluláris patológiai változások összehasonlító vizsgálatát végeztük el.

Módszerek: 1-es típusú DM-et streptozotocinnal indukáltunk. 2-es típusú DM modellként Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkányokat használtunk. A kardiális funkció megítélésére bal kamrai nyomás-térfogat analízist végeztünk. Emellett miokardiális nitrotyrosin immunohisztokémiát, TUNEL, hematoxin-eozin, illetve Masson trikróm festést végeztünk. A különböző mRNS és proteinek expresszióját qRT-PCR-rel és Western blot technikákkal vizsgáltuk.

Eredmények: Az 1-es típusú DM-ben megfigyelhető jelentős szisztolés diszfunkció erőteljes oxidatív stresszel, apoptózissal és fibrózissal társult. 2-es típusú DM-ben mindezek az elváltozások kevésbé voltak kifejezettek vagy teljesen hiányoztak, miközben hasonló mértékű cardiomyocita-hipertrofia volt megfigyelhető a diasztolés falmerevség növekedése és megtartott szisztolés funkció mellett. 1-es típusú DM-ben emelkedett a hipertrofia marker c-fos, c-jun és β -MHC és a pro-apoptotikus kaszpáz-12 mRNS expressziója, míg 2-es típusban nem vagy kevésbé változtak. A profibrotikus TGF- β 1 génexpressziója fokozódott 1-es, ugyanakkor csökkent 2-es típusú DM-ben.

Következtetések: Jelen vizsgálatunkban a diabéteszes szív megváltozott patofiziológiai tulajdonságait és azok funkcionális hatását írtuk le 1-es és 2-es típusú DM patkánymodelljeinkben.

Kulcsszavak: diabetes mellitus, T1DM, T2DM, kardiális diszfunkció, diabéteszes cardiomyopathia

An altered pattern of myocardial histopathological and molecular changes underlies the different characteristics of type-1 and type-2 diabetic cardiac dysfunction

Aims: Increasing evidence suggests that both types of diabetes mellitus (DM) lead to cardiac structural and functional changes. In this study we investigated and compared functional characteristics and underlying subcellular pathological features in rat models of type-1 and type-2 diabetic cardiomyopathy.

Methods: Type-1 DM was induced by streptozotocin. For type-2 DM, Zucker-diabetic fatty (ZDF) rats were used. Left ventricular pressure-volume analysis was performed to assess cardiac function. Myocardial nitrotyrosine immunohistochemistry, TUNEL-assay, hematoxylin-eosin and Masson's trichrome staining were performed. mRNA and protein expression were quantified by qRT-PCR and Western blot.

Results: Marked systolic dysfunction in type-1 DM was associated with severe oxidative stress, apoptosis and fibrosis. These pathological features were less pronounced or absent, while cardiomyocyte hypertrophy was comparable in type-2 DM, which was associated with unaltered systolic function and increased diastolic stiffness. mRNA-expression of hypertrophy markers c-fos, c-jun and β -MHC, as well as pro-apoptotic caspase-12 were elevated in type-1, while remained unaltered or only slightly increased in type-2 DM. Expression of the profibrotic TGF- β 1 was upregulated in type-1 and showed a decrease in type-2 DM.

Conclusions: We compared type-1 and type-2 diabetic cardiomyopathy in standard rat models, described an altered pattern of key pathophysiological features in the diabetic heart and corresponding functional consequences.

Keywords: diabetes mellitus, T1DM, T2DM, cardiac function, diabetic cardiomyopathy

*A szerzők a munkához egyenlő mértékben járultak hozzá

Készült Radovits, et al. J Diabetes Res 2015; 2015: 728741. közleményének felhasználásával a Hindawi Publishing Corporation engedélyével

Bevezetés

Patomechanizmustól függően 1-es és 2-es típusú diabetes mellitust (DM) különböztethetünk meg. Jól ismert, hogy 2-es típusú diabéteszre (T2DM) jellemző a hyperinsulinaemia, hyperglykaemia és dyslipidaemia. Ezzel szemben 1-es típusú diabétesz (T1DM), a Langerhans-szigetek béta-sejtjeinek autoimmunitás következtében károsodása miatt csökkent inzulinszinttel és hyperglykaemiával társul. Emellett a T1DM hirtelen kezdetű, míg T2DM esetén a hyperglykaemiás állapotot megelőzi egy euglykaemiás, egyre fokozódó inzulinrezisztenciával, illetve hyperinsulinaemiával járó periódus. Bár a cukorbetegség mortalitását leginkább a szív koszorúerek ateroszklerózisa határozza meg, bizonyítékok szólnak amellett, hogy léteznek DM-indukált, a myocardiumot közvetlenül érintő strukturális és funkcionális elváltozások (1). A diabéteszes cardiomyopathia kialakulása a cukorbetegség mindkét formájában jelen van, amelyet a szívizomzat módosult sejt szintű anyagcseréjének tulajdonítanak, és amely megnöveli a szívelégtelenség kialakulásának kockázatát (2). Évtizedeken keresztül a diabéteszes cardiomyopathiával kapcsolatos kutatásokat a „standardnak” számító és széleskörűen alkalmazott streptozotocin-(STZ) indukálta T1DM állatmodellen végezték. Mindazonáltal a klinikai gyakorlatban a cukorbetegség túlnyomó többsége T2DM-ben szenved ettől eltérő kórélettani háttérrel. Ennek következtében számos T2DM állatmodell jelent meg az utóbbi években (3–5).

Kutatócsoportunk korábban publikálta az 1-es (STZ-indukálta) és 2-es (Zucker Diabetic Fatty [ZDF] patkányok) típusú DM patkánymodelljeinek részletes hemodinamikai jellemzését.

T1DM és T2DM között jelentős különbséget találtunk a kardiális diszfunkció karakterisztikájában.

- T1DM-ben csökkent szisztolés teljesítményt és megnyúlt kamrai relaxációt,
- míg T2DM-ben a bal kamra (BK) megnövekedett fal-merevségét találtuk (6).

A diabéteszes cardiomyopathia kialakulásának kórélettani háttere és szubcelluláris mechanizmusai nem teljesen feltártak. Az anyagcsere abnormalitása, továbbá a reaktív oxigén (ROS) és nitrogén-származékok termelődése számos jelátviteli út kóros aktiválódását válthatja ki így módosítva különböző gének miokardiális expresszióját. A miokardiális nitro-oxidatív stressz, a szívizomzat hipertrófiás és fibrotikus remodellációja az apoptózis fokozódásával együtt mind kritikus szerepet játszik a cardiomyopathia kialakulásában a DM mindkét típusa esetében (7–9).

Fentiek alapján, további vizsgálatok szükségesek a diabéteszes myocardiumra jellegzetes molekuláris, sejt-szintű és funkcionális elváltozások karakterisztikájával kapcsolatban T1DM, illetve T2DM-ben. Jelen kutatásunkban célul tűztük ki a myocardium szövettani és molekuláris változásainak vizsgálatát, amelyek a bal

kamra jellegzetes eltéréseinek hátterében állhatnak T1DM és T2DM állatmodelljeiben (6, 10).

Eszközök és módszerek

Állatok

Vizsgálatainkat a kísérleti állatok tartásáról és felhasználásáról szóló nemzetközi szabályoknak (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Institutes of Health 1996; 85–23.) megfelelően végeztük. Sprague-Dawley (SD) és ZDF patkányainkat (Charles River, Németország) standard laboratóriumi körülmények között tartottuk.

T1DM-et streptozotocinnal (STZ, 60 mg/kg, ip. citrát oldatban oldva) indukáltunk SD-patkányokban (n=8). A kontrollállatok a vivőanyagot kapták (n=10). 72 órával az STZ injekció után meghatároztuk a vércukorszintet. A >15 mmol/l random vércukorszinttel rendelkező állatokat diabéteszesnek tekintettük és bevontuk a tanulmányba. A vizsgálatokat az ezt követő 8. héten hajtottuk végre (6).

A ZDF patkányokban genetikai mutáció és speciális diéta révén alakul ki a cukorbetegség és annak szövődményei. A homozigóta recesszív állatokban (fa/fa) elhízás, magas vércukorszint és T2DM fejlődik ki (ZDF-csoport, n=8). A homozigóta domináns (+/+) és a heterozigóta „lean” genotípusú állatok normoglykaemiásak maradnak (ZDF lean csoport, n=9). A vizsgálatokat az állatok 30–32 hetes korában végeztük el (6).

Vizelet- és vércukorszintek meghatározása

A hemodinamikai mérések előtt a farokvénából vett vérből digitális vércukormérő segítségével határoztuk meg a vércukorszintet, majd a feldolgozás során nyert vizeletmintákból tesztsíkkal mutattuk ki a vizelet glükóztartalmát.

Hemodinamikai mérések

A patkányokat ip. ketamin-xilazin (100; 3 mg/kg) injekcióval elaltattuk, majd tracheotómiát és intubációt követően mesterségesen lélegeztettük, testhőmérsékletüket fűtőpad segítségével 37 °C-on tartottuk. Ezt követően egy 2Fr-es nyomás-konduktancia mikrokatétert vezetünk a BK-ba. Regisztráltuk a BK-i nyomás-térfogat (PV) viszonyokat és változó előterhelés mellett meghatároztuk az ejekciós frakciót (EF) és a végszisztolés PV összefüggés meredekségét (ESPVR), amelyek szisztolés paraméterek. A BK-fal-merevséget a BK-i végdiasztolés nyomás (LVEDP) és a végdiasztolés PV összefüggés meredeksége (EDPVR) alapján számoltuk ki (11).

Szövettan és immunhisztokémia

Paraformaldehid (4%-os oldat) fixációt majd paraffinos beágyazást követően a bal kamrai szívizomszövet metszetek hematoxillin-eozin (HE) és Masson trikróm (MT) festését végeztük. A HE-metszeten fénymikroszkóppal 100 darab BK-i szívizomsejt transzverzális transz-

nukleáris szélességét (cardiomyocytá átmérő, KD) mértük le metszetenként. A miokardiális kollagén szintet az MT-festés szemikvantitatív morfometriai pontozásával határoztuk meg a következők alapján: 0 (hiányos), 1 (enyhe), 2 (közepes), 3 (intenzív). Az átlagértéket a BK 20 véletlenszerűen kiválasztott látómezőjének pontértékéből számoltuk.

Emellett a BK-i metszeteken a nitro-oxidatív stressz-márker 3-nitro-tirozin (NT) immunhisztokémiai festését is elvégeztük (12). A metszeteken a festés intenzitását és eloszlását szemikvantitatív módon értékeltük. Valamennyi metszeten 4 egymás melletti látóteret értékeltünk, amelyet a következőképpen pontoztunk: 0 (immunreaktivitás teljes hiánya); 1 (enyhe területi festődés); 2 (közepes festődés) és 3 (erős festődés). Az NT-pozitív területeket szoftverrel kvantifikáltuk, majd hozzájuk rendeltünk egy területi pontszámot ($1 \leq 10\%$

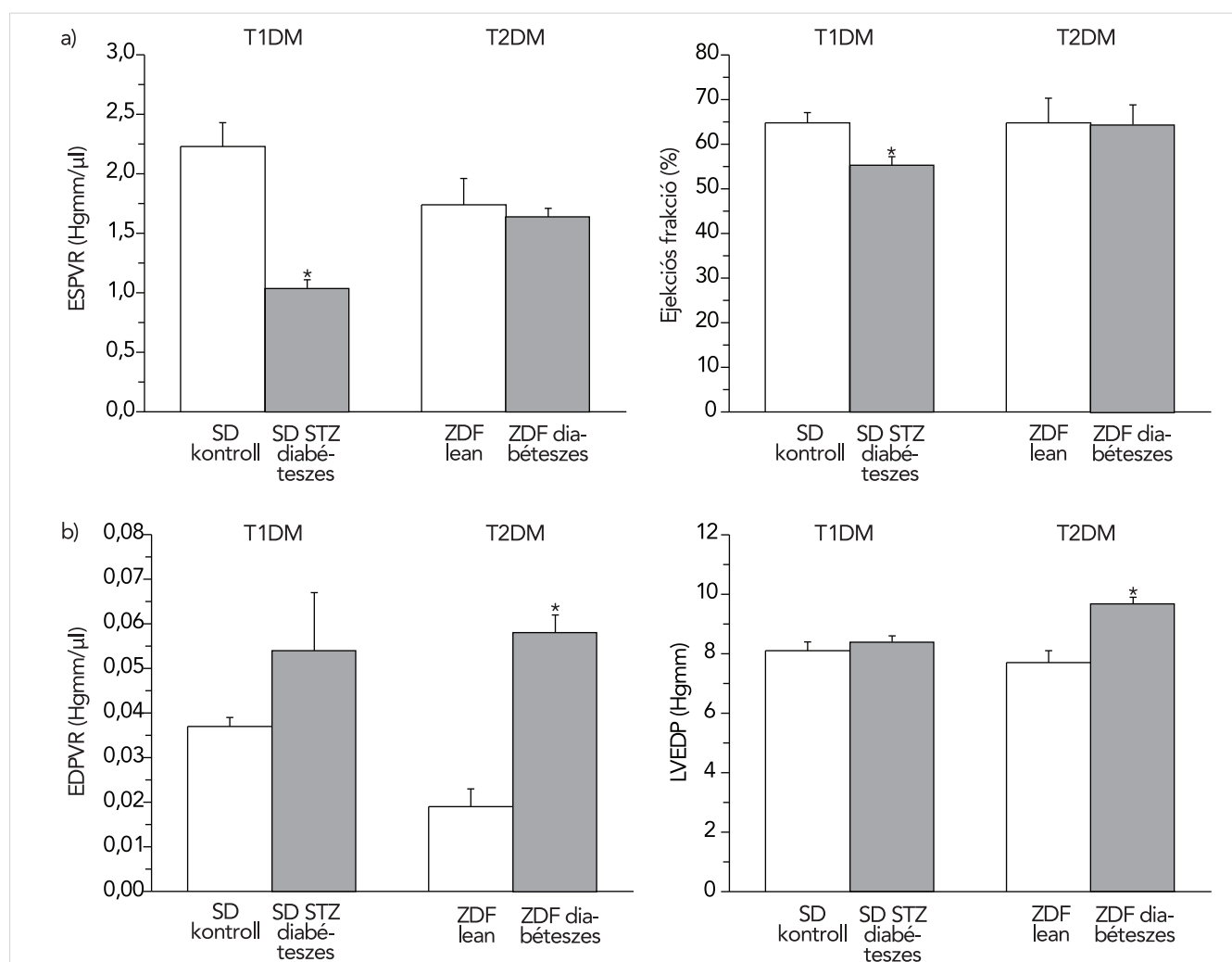
pozitív sejt; 2=11-50%; 3=51-80% és 4 $\geq 80\%$). A teljes metszet átlagos pontszámát a festődés intenzitása és a területi pontszám szorzata adta (0–12).

Terminális dezoxinukleotid-transzferáz-mediált dUTP láncvég jelölés (TUNEL)

A myocardium metszetek TUNEL-festését gyártói protokoll alapján végeztük. Megszámoltuk a TUNEL-pozitív sejtmagokat és az összes sejtmagot (4 vizsgálási területen metszetenként), amelyből egy átlag arányt számoltunk. Az adatokat a megfelelő kontrollcsoportok értékeihez viszonyítottuk.

Génexpressziós vizsgálatok

A myocardium teljes RNS-készletét izoláltuk, majd reverz transzkripciót követően a cDNS-mintákból kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció során különböző



1. ÁBRA. A szív-diszfunkció különböző sajátosságai a T1DM- és T2DM-modellek esetén. Bal kamrai kontraktilitás paraméterek **a**: végszisztolés nyomás-térfogat összefüggés meredeksége (ESPVR) és ejekciós frakció (EF) az SD-kontroll, STZ-indukálta diabétesz SD (SD STZ diabéteszes), ZDF lean és ZDF diabéteszes patkányok csoportjaiban. A bal kamrai fal-merevség paraméterei; **b**: végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés (EDPVR) és végdiasztolés nyomás (LVEDP) az SD-kontroll, STZ-indukálta diabétesz SD (SD STZ diabéteszes), ZDF lean és ZDF diabéteszes patkányok csoportjaiban. A cukorbeteg és a kontrollok közötti százalékos eltérést mindkét diabétesz modell esetén jeleztük. *: $p < 0,05$ vs. a megfelelő nem diabéteszes csoport

gének expresszióját vizsgáltuk: kataláz, glutation-reduktáz (GSR), szuperoxid-diszmutáz 1 és 2 (SOD1, SOD2), tioredoxin, pitvari nátriuretikus faktor (ANF), alfa és béta-miozin nehézlánc kináz (α -MHC, β -MHC), kaszpáz-12, kollagén-1, kollagén-3, c-fos, c-jun, endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS), endothelin-1 (ET-1). Az endogén antioxidánsok esetében adatainkat a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expressziójára, míg a többi vizsgált gén esetén a β -aktin expressziójára normalizáltuk. Eredményeinket a kontrollállatok génexpressziós értékeire vonatkoztattuk.

Western Blot (WB)

Miokardiális proteinek extrakcióját követően WB-technikát alkalmaztunk a fehérjék szétválasztására, amely során a blotokat transzformáló növekedési faktor béta-1 (TGF β 1) specifikus antitestekkel reagáltattuk. A blotot kemilumineszcens módszerrel hívtuk elő. A blot denzitásokat a kontrollcsoportéhoz viszonyítottuk.

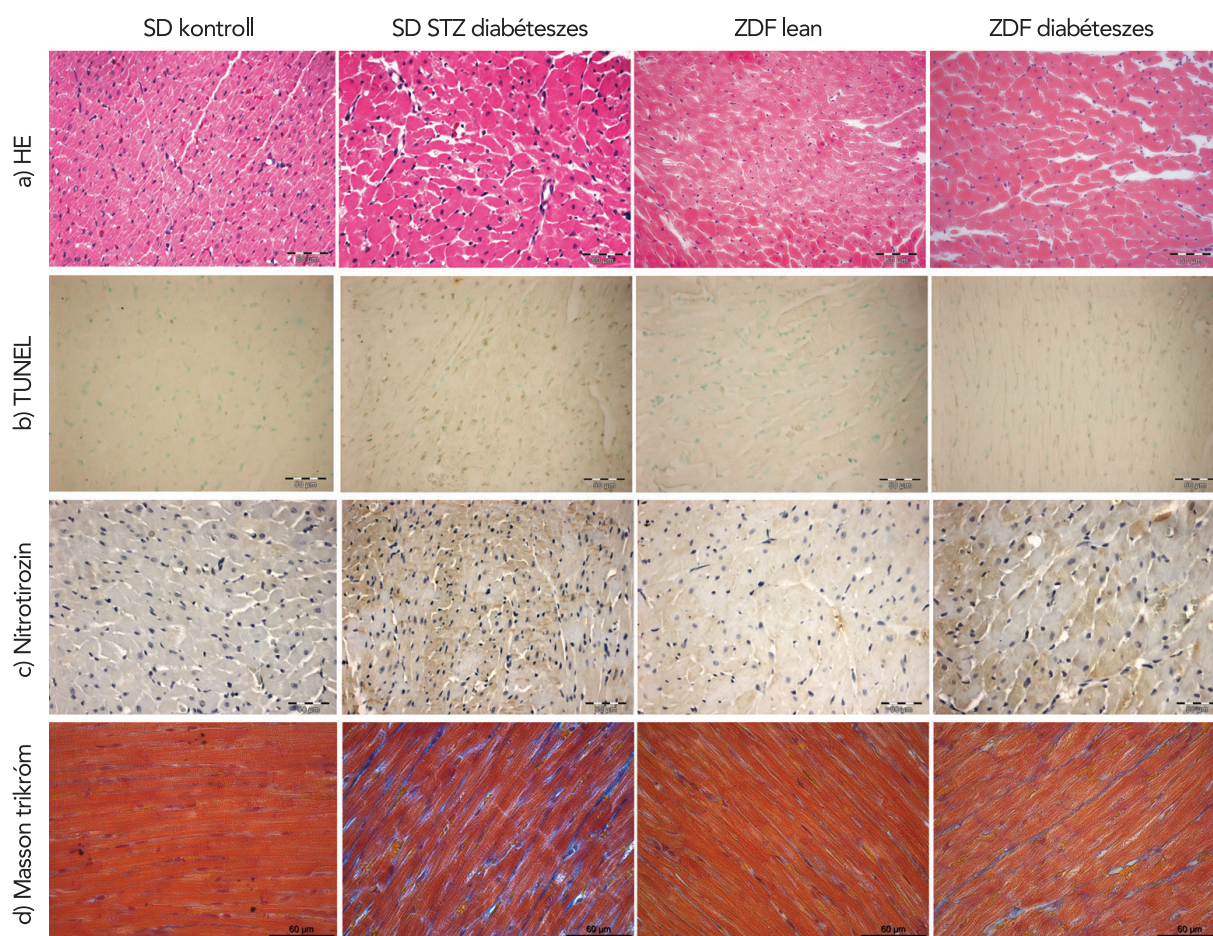
Statisztikai analízis

Minden adatot átlag $\pm$ SEM formájában adtuk meg. Párosítatlan kétoldali t-tesztet használtunk a diabéteszes és kontrollcsoportok összehasonlítására. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

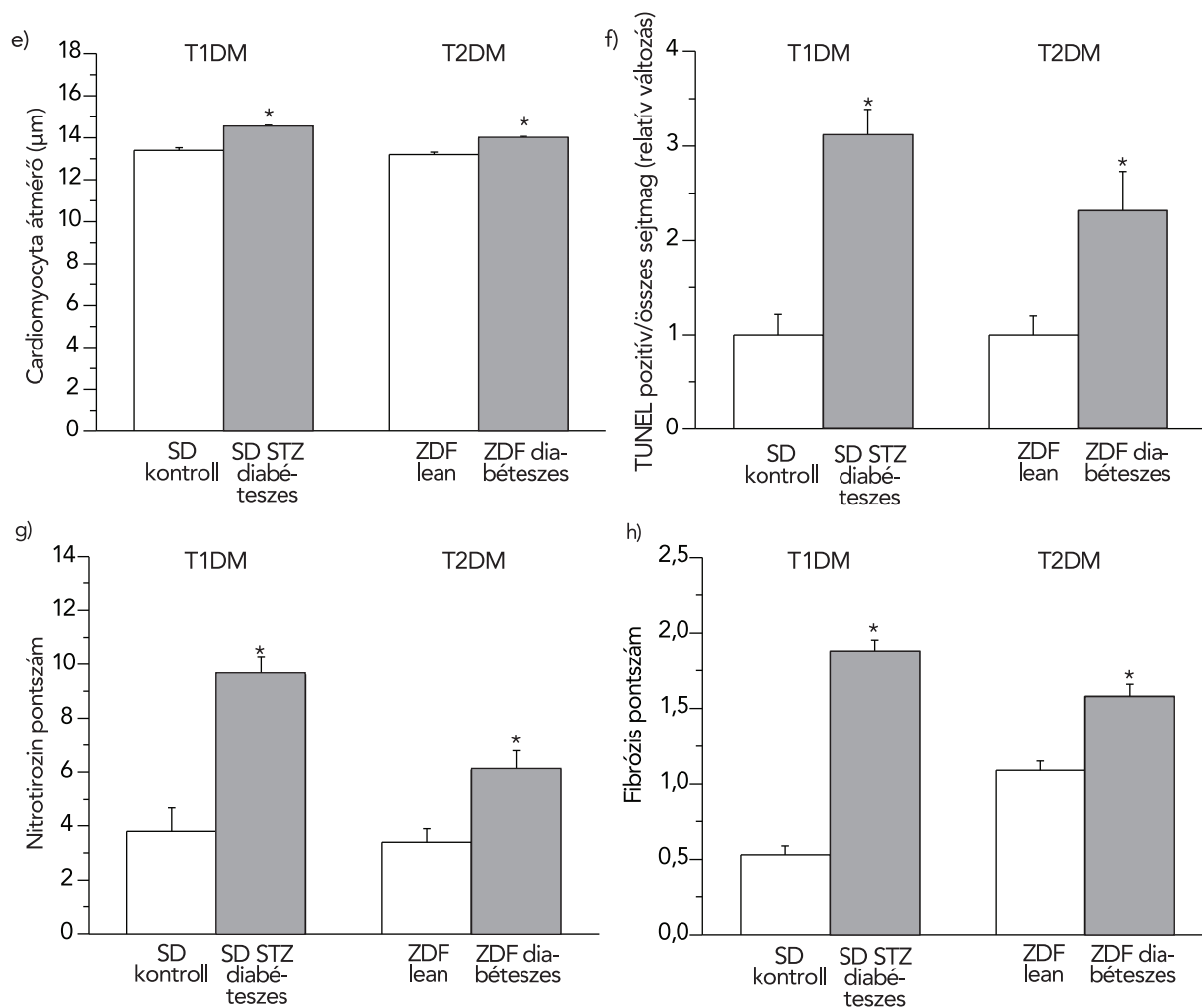
Eredmények

Szívtömeg, testtömeg és vércukorszint

Mindkét modellben magasabb vércukorszintet mérünk a kontrollokhoz képest (T1DM: $26,08 \pm 0,87$ vs. $6,54 \pm 0,16$ mmol/l, $p < 0,05$; T2DM: $25,99 \pm 2,08$ vs. $6,28 \pm 0,29$ mmol/l, $p < 0,05$). A vizelet glükózeszt mindkét cukorbetegségben pozitívnak bizonyult. A szívtömeg-testtömeg (HW/BW; g/kg) arány T2DM esetében tendenciális növekedést mutatott (T2DM: $3,74 \pm 0,23$ vs. $3,46 \pm 0,05$), azonban a statisztikai szignifikancia szintjét csak T1DM-modellben érte el (T1DM: $3,51 \pm 0,14$ vs. $2,92 \pm 0,06$, $p < 0,05$).



2. ÁBRA. A szív karakterisztikus hisztopatológiai változásai a T1DM- és T2DM-modellek esetén. Reprezentatív szövettani képek a csoportok állatainak bal kamrájából. **a:** hematoxinil-eozin (HE) festés; skála: 50 μ m; **b:** TUNEL-festés apoptózis kimutatására (barna sejtmagok, skála: 50 μ m), **c:** a nitro-oxidatív stresszmarker nitro-tirozin immunhisztokémiai festése (barna festődés, skála: 50 μ m) és **d:** Masson trikróm festés a fibrózis detektálására (kék festődés, skála: 60 μ m).



2. ÁBRA. A szív karakterisztikus hisztopatológiai változásai a T1DM- és T2DM-modellek esetén. Reprezentatív szövettani képek a csoportok állatainak bal kamrájából. **e:** Cardiomyocyták átmérő (hipertrofia marker) kvantifikálása, **f:** TUNEL pozitív/összes szívizomsejt arány, **g:** nitrotirozin immunhisztokémia szemikvantitatív hisztomorfológiai elemzésének eredménye, **h:** Masson trikrom fibrózis festés kiértékelése. Csoportok: SD-kontroll, STZ-indukálta diabéteszes SD (SD STZ diabéteszes), ZDF lean és ZDF diabéteszes állatok. A cukorbeteg és a kontrollok közötti százalékos eltérést mindkét diabéteszes modell esetén jeleztük. *: $p < 0,05$ vs. a megfelelő nem diabéteszes csoport

Hemodinamika

A kontraktilitás paraméterei (EF és az ESPVR mereksége) szignifikánsan alacsonyabbak voltak T1DM-ben a kontrollértékekhez viszonyítva, amely szisztolés diszfunkcióra utal. Ezzel szemben T2DM esetén a BK-i kontraktilitás változatlan maradt (1. a ábra).

Az LVEDP és az EDPVR mereksége szignifikánsan magasabb volt a T2DM állatokban, ami a BK falme-revségének fokozódását jelzi. Ezen változások kisebb mértékűek voltak T1DM-ben (1. b ábra).

Szövettan

HE-festéssel kimutathatók voltak a diabéteszes cardiomyopathia jellegzetes elváltozásai a cukorbetegcsoportok BK-i metszeteiben (2. a ábra). Mindkét DM-mo-dell BK-metszetében megfigyelhető volt az izomrostok

rendezetlensége és szétesése, illetve a szívizomzat degenerációja. A KD, amely a szívizom-hipertrofia mar-kere, szignifikánsan magasabbnak bizonyult mindkét DM-mo-dell esetén (2. e ábra).

DNS-lánctörések és nitro-oxidatív stressz

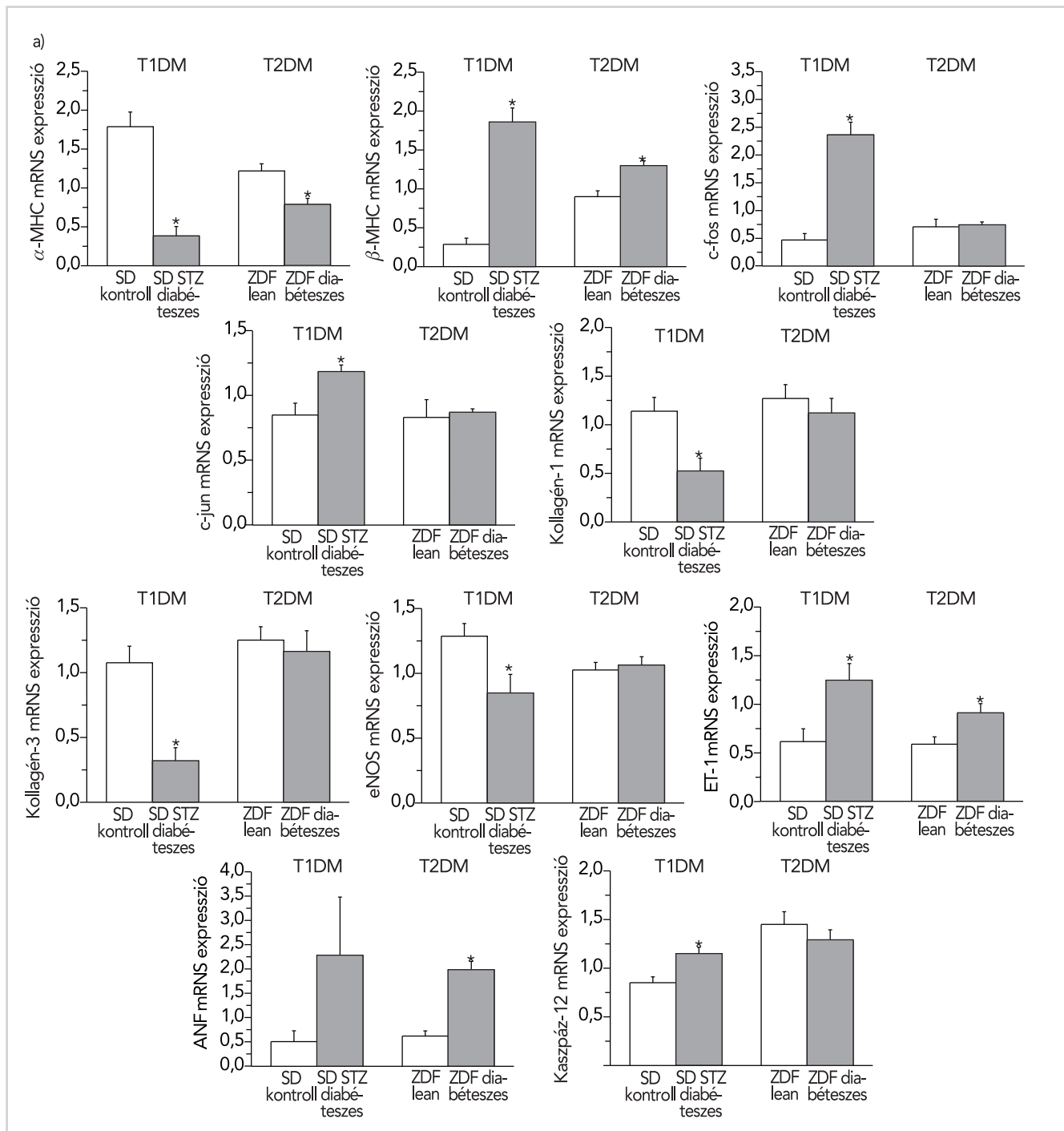
A kontrollokhoz képest a DM-szívekben emelkedett a TUNEL-pozitivitás, amely a DNS fragmentációjára utal (2. b, f ábra) és magasabb volt az NT elleni immunreak-tivitás (2. c, g ábra). A TUNEL-pozitivitás és a nitro-oxi-datív stressz kifejezettebb volt T1DM esetén T2DM-hez viszonyítva (2. f, g ábra). A SOD1, kataláz, GSR és ti-oredoxin génexpressziója emelkedett volt T1DM-ben. Ezen változások kevésbé voltak kifejezettek T2DM esetén. A SOD2 mRNS expressziója nem különbözött a csoportok között (3. b ábra).

Miokardiális fibrózis

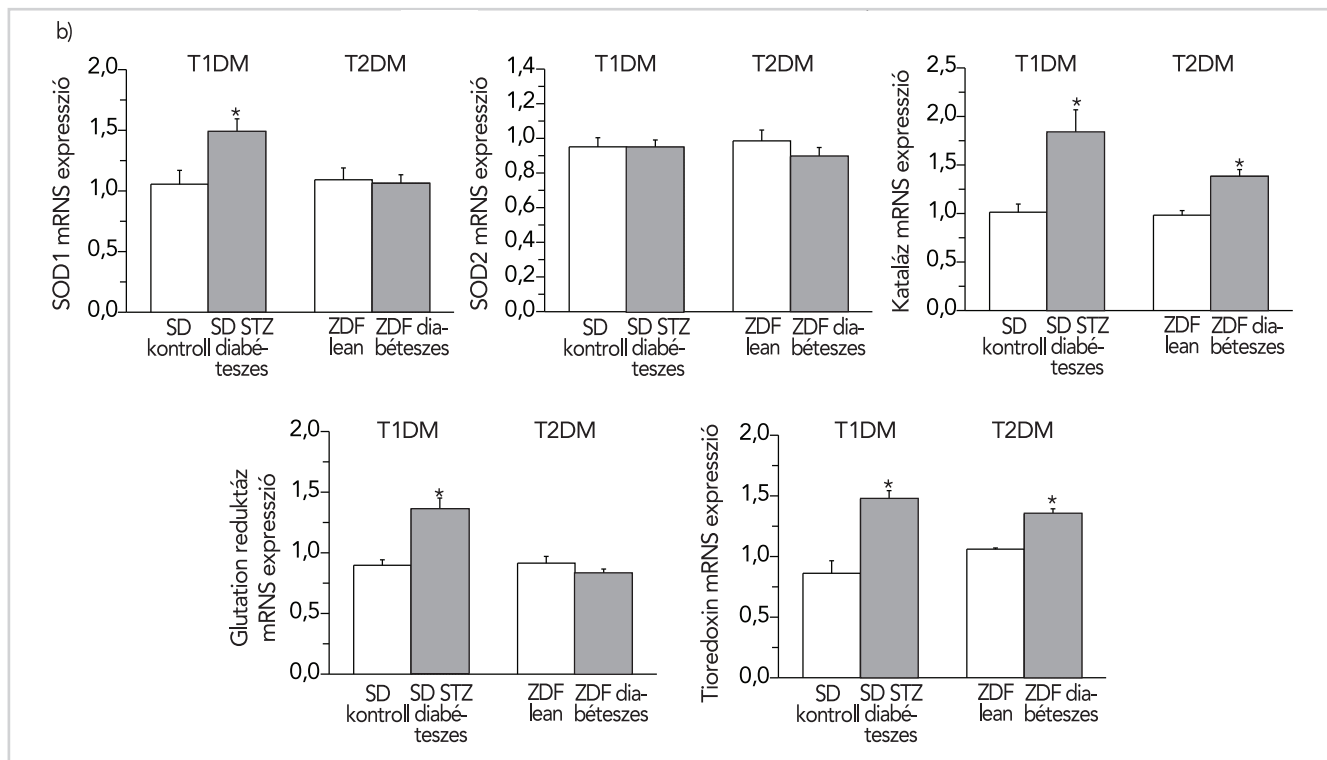
A myocardium fibrotikus remodellációja szignifikánsan kifejezettebb volt T1DM modellben T2DM-hez képest (2. d és h ábra). Az MT-festés szemekvantitatív pontozása jelentős különbségeket mutatott a BK fibrotikus remodellációjában a két DM-modell között (2. h ábra).

Génexpressziós vizsgálatok

Az α -MHC mRNS szintje szignifikánsan kisebb, míg a β -MHC és ET-1 mRNS szintje magasabb volt mindkét DM-csoportban (3. ábra). Míg a c-fos, c-jun és kaszpáz-12 gének expressziója szignifikáns mértékben emelkedett, addig a kollagén-1, kollagén-3 és az endotheliális NOS expressziója csökkent T1DM esetén a



3. ÁBRA. Miokardiális génexpressziós változások. **a:** A hipertrofia marker α -miozin nehéz lánc (MHC), β -MHC, a hipertrofiás transzkripciós program korai génjeinek c-fos és c-jun; az extracelluláris mátrix komponensek kollagén 1 és 3, a vaszkuláris endotheliális marker endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) és az endothelin-1 (ET-1); pitvari nátriuretikus faktor (ANF) és a proapoptikus kaszpáz-12 mRNS expressziója. *: $p < 0,05$ vs. a megfelelő nem diabéteszes csoport

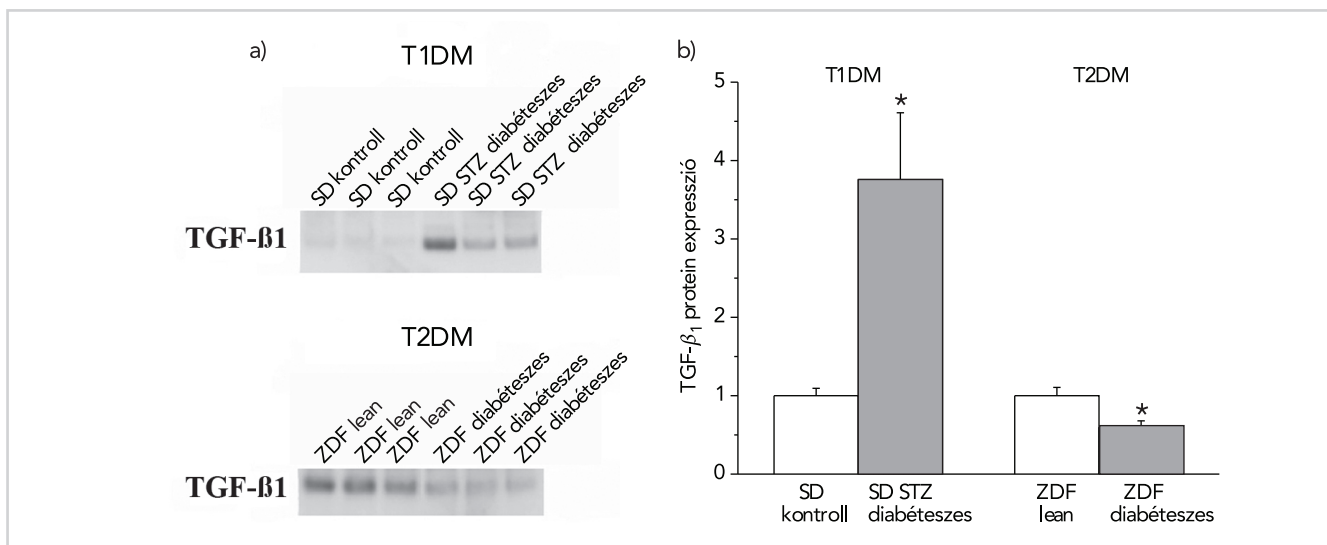


3. ÁBRA. Miokardiális génexpressziós változások. **b:** Az endogén antioxidáns szuperoxid dismutáz 1 (SOD1) és 2 (SOD2), kataláz, glutation reduktáz és tioredoxin génexpressziója. Csoportok: SD kontroll, STZ-indukálta diabétesz SD (SD STZ diabéteszes), ZDF lean és ZDF diabéteszes állatok. A cukorbeteg és a kontrollok közötti százalékos eltérést mindkét diabétesz modell esetén jeleztük. *: $p < 0,05$ vs. a megfelelő nemdiabéteszes csoport.

kontrollokhoz képest (3. ábra). Az ANF szintje mindkét DM-csoportban megnövekedett, amely azonban csak T2DM esetén bizonyult szignifikánsnak (3. ábra). Az említett gének kifejeződése jelentősebb volt T1DM esetén a T2DM-hez képest (3. ábra).

A TGF- β 1 WB analízise

A TGF- β 1 szintje szignifikáns emelkedést mutatott T1DM esetében a kontrollokhoz képest, míg T2DM esetén alacsonyabb volt (4. ábra).



4. ÁBRA. A transzformáló növekedési faktor (TGF)- β 1 miokardiális protein expressziója 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben. **a:** A profibrotikus mediátor TGF- β 1 reprezentatív immunoblotjainak analízise bal kamrai mintából; **b:** Relatív miokardiális TGF- β 1 protein denzitásértékek a vizsgált csoportokban. Csoportok: SD-kontroll, STZ-indukálta diabétesz SD (SD STZ diabéteszes), ZDF lean és ZDF diabéteszes állatok. A cukorbeteg és a kontrollok közötti százalékos eltérést mindkét diabétesz modell esetén. *: $p < 0,05$ vs. a megfelelő nem diabéteszes csoport.

Megbeszélés

Jelen tanulmányunkban az 1-es és a 2-es típusú cukorbetegségben kialakuló diabéteszes cardiomyopathia funkcionális, szövettani és molekuláris eltéréseit hasonlítottuk össze. A két cukorbeteg modell között leírt funkcionális különbségeket megváltozott miokardiális gén- és fehérje-expresszió, továbbá megnövekedett nitro-oxidatív stressz, szívizom-hipertrófia valamint kötőszöveti remodelláció kísérte. A diabéteszes cardiomyopathia kiemelkedő klinikai fontossága ellenére a myocardium strukturális és funkcionális változásainak hátterében álló sejtszintű és molekuláris faktorok szerepe ezidáig nem teljesen tisztázott. Az oxidatív egyensúly megbomlása, a megnövekedett nitro-oxidatív stressz, a szívizomsejtek apoptózisa valamint a miokardiális hipertrófia és fibrotikus remodelláció valószínűsíthetően központi szerepet játszik a DM kardiális szövődményeinek kialakulásában (9).

Az NT immunhisztokémiai festése, amely a nitro-oxidatív stressz egyik markere, a cukorbeteg szívizomban emelkedett immunreaktivitást mutatott mindkét DM-modell esetén, amely megfigyelés összhangban áll korábbi tanulmányok eredményeivel (13, 14). A festés szemikvantitatív analízise alapján T1DM-ben kifejezettebb nitro-oxidatív stressz dokumentálható a T2DM-hez képest. Az endogén antioxidáns rendszerek expressziójának kompenzatorikus megnövekedése (SOD, kataláz, glutation és tioredoxin enzimrendszerek) T1DM-ben további bizonyítéka a jelentősen megnövekedett nitro-oxidatív stressznek. Az emelkedett nitro-oxidatív stressz különféle jelátviteli pályákat indíthat el, amelyek következménye lehet apoptózis, a myocardium hipertrofiája és kötőszöveti átalakulása (9).

Az apoptózis felerősödése számos szív- és érrendszeri betegség patológiai hátterében áll, beleértve a diabéteszes cardiomyopathiát. Egyre növekvő számú klinikai és experimentális megfigyelés számol be arról, hogy a szívizomsejtek számának progresszív csökkenése fontos kóroki szerepet játszik a diabéteszes cardiomyopathia kialakulásában (8, 9, 15). A cardiomyocyta apoptózisa hozzájárul a cukorbeteg szív dekompenzációjához (16), mivel az elhalt szívizomsejtek helyébe extracelluláris mátrix komponensek lépnek, amely kollagén felhalmozódáshoz és miokardiális fibrózishoz vezet (17, 18). TUNEL-módszerrel felmérhető a DNS-törések és fragmentációk jelenléte, így detektálhatók az apoptotikus sejtek (19). Összhangban korábbi irodalmi adatokkal (15, 20), jelen eredményeink fokozott apoptózist mutatnak a cukorbeteg állatok szívizomzatában (megnövekedett a TUNEL-pozitív cardiomyocyta magok száma, valamint a proapoptotikus mediátor kasz-páz-12 miokardiális expressziója), amely T1DM esetében markánsabbnak bizonyult.

Mindkét állatmodellünkben jelentős miokardiális hipertrófia alakult ki (a szívizomsejtek átmérője szignifikánsan emelkedett). T2DM-ben a szívtömeg/testtömeg

arány emelkedő tendenciát mutatott, amely ugyanakkor szignifikáns T1DM-állatok esetén volt. Mindazonáltal szívtömeg/testtömeg arányt nagymértékben befolyásolja a testtömeg ingadozása (amely sokkal kifejezettebb volt a T1DM-modell esetén). Szívizom-hipertrófia során az azonnali-korai gének, úgy, mint a c-jun és c-fos, átmenetileg aktiválódnak, ami különböző patológias molekuláris jelátviteli utak fokozódásához vezet (21, 22). Ezen gének expressziójának emelkedése a T1DM-állatok esetében bizonyult szignifikánsnak. A c-jun és c-fos aktiválják a főtális génprogramot (a β -MHC vagy ANF-gének transzkripciója), amelyek kiemelt szerepet játszanak az adaptív hipertrófiában és a szívizomsejtek maladaptív elváltozásaiban (23). Az α -MHC csökkent, továbbá a főtális típusú β -MHC megnövekedett expressziója, mint a patológias hipertrofia molekuláris markerei, mindkét DM-modellben megfigyelhető volt, azonban változásuk a T1DM-állatokban kifejezettebb volt. A két DM-modellben hasonló volt az ANF-hipertrófia marker expressziójának mértéke. Korábbi kutatási eredményekkel összhangban jelen vizsgálatunkban is igazoltuk, hogy a diabéteszhez társuló szívizom-hipertrófia mindkét DM esetén kialakul (9, 24, 25).

A myocardium kötőszövetes, fibrotikus remodellációja egy másik kulcspontja a diabéteszes cardiomyopathia kórélettanának. A profibrotikus jelátvitel fokozódása és az intersticiális kollagén-lerakódás hátterében a reaktív oxigén- és nitrogéngyökök fokozott termelődése (9), továbbá az apoptotikus szívizomsejt-elhalás állhat. Kifejezettebb nitro-oxidatív stressz és apoptózis, továbbá a profibrotikus mediátor TGF- β 1 miokardiális szintjének markáns emelkedése, valamint szignifikánsan magasabb szövettani fibrózis pontszámok igazolhatók a T1DM-patkányokban (fibrózis +~260%) a T2DM-állatokhoz (fibrózis +~45%) képest. Habár a miokardiális fibrózis kialakulása az STZ-indukálta T1DM-modellben széles körben ismert és dokumentált (9, 25, 26), T2DM esetében mindez vitatott. *Marsh és munkatársai* nem találtak miokardiális kollagén-lerakódást 14 hetes ZDF-állatokban (27); más tanulmányok mindössze perivaszkuláris fibrózist dokumentáltak, az intersticiális kötőszövet felhalmozódása nélkül 19 hetes állatokban (24), míg 45 hetes ZDF-patkányokban a bal kamra intenzív fibrotikus remodellációját dokumentálták (28). Ezen eltérések hátterében az állatok eltérő kora, vagyis a cukorbetegség fennállásának eltérő hossza állhat. Jelen eredményeink, amelyek a miokardiális intersticiális fibrózis pontszám ~45%-os emelkedését mutatják 30-32 hetes ZDF-patkányokban összhangban állnak a szakirodalmi adatokkal. Érdekes módon T1DM-ben, a jelentősen rövidebb diabéteszes időtartam (8 hét) sokkal súlyosabb szívizom-fibrózishoz vezet, mint T2DM esetében (30-32 hetes életkor megfelel 23-25 hetes cukorbeteg időtartamnak). Bár a cukorbetegség súlyossága (hyperglykaemia mértéke) vizsgálatunk során hasonlóan bizonyult, a kórélettani/metabolikus kü-

lönbségek (csökkent inzulinszint vs. hyperinsulinaemia és inzulinrezisztencia az első fázisban) valamint a DM eltérő időtartama a betegség két típusában magyarázhatja ezen jelenséget. Korábbi eredményekkel összhangban (28) a cukorbeteg szívizomzat Masson trikróm-festéssel detektált emelkedett fibrózis pontszám értékei a kollagén 1 és 3 csökkent mRNS expressziójával jártak. Valószínűleg a megfigyelt intersticiális fibrózis hátterében a kollagén lebomlási ütemének módosulása, és nem annak emelkedett szintézise áll.

Fentiek mellett, a diabéteszes cardiomyopathia kialakulásának hátterében a szív mikrovaskulaturájának endotheliumából felszabaduló vazoaktív ágensek, úgy mint az ET-1 és az NO, szintjének változása is kóros szerepet játszik (29). Vizsgálatunkban jelentősen emelkedett ET-1-expressziót detektáltunk mindkét DM-modell szívizomzatában (amely a T1DM esetén kifejezettebb volt), míg az eNOS csökkent expressziója csak T1DM esetén volt megfigyelhető. Eredményeink a szív súlyosabb mikrovaskuláris károsodását mutatják T1DM esetében T2DM-hez viszonyítva. Az ET-1 megemelkedett szintje cukorbetegségben kapcsolatban állhat a myocardium fibrotikus átalakulásával, mivel az ET-1 által indukált endothel-mesenchyma átalakulás fibroblasztok felszaporodásához vezethet (30).

A diabéteszes szívben leírt funkcionális változások szoros kapcsolatban állnak a szívizomsejt-hipertrofia, az apoptózis és a fibrózis molekuláris és szövettani elváltozásaival (9). Ezen három fő komponens hozzájárulása a diasztolés (szívelégtelenség megtartott ejekciós frakcióval [HFpEF]) vagy a szisztolés diszfunkcióhoz valamennyire eltérhet. HFpEF esetében mind a szívizomsejt-hipertrofia, mind a miokardiális fibrózis jelen van, azonban az utóbbi – a szívizomsejtek emelkedett apoptózisával együtt – kifejezettebb szisztolés szívelégtelenség esetében (9, 17, 18). A DM-hez társult HFpEF-fel szemben DM-ben megfigyelhető szisztolés diszfunkció kialakulásában számottevő szerepet játszhat a cardiomyocyták által termelt ROS, cardiomyocytá apoptózis és a következményes extracelluláris mátrix lerakódás és fibrotikus remodeláció (17, 31). Bár jelen kutatásunkban nem vizsgáltuk, további molekuláris mechanizmusok (úgy, mint az előrehaladott glikációs végtermékek [AGE] lerakódása, kollagén keresztkötés, továbbá a szarkomer fehérjék oxidatív módosulásai) is hozzájárulhatnak a diasztolés diszfunkció kialakulásához a cukorbeteg állatokban.

A fent leírt kórélettani változásokkal összhangban, korábbi méréseink (6) és jelen eredményeink az in vivo myocardium funkció (bal kamrai PV-analízis) tekintetében összevethető különbségeket mutatnak az 1-es és 2-es típusú diabéteszes modell kardiális diszfunkciója terén. A bal kamrai kontraktilitás jelentős romlása és a szisztolés diszfunkció (csökkent EF és ESPVR) csak T1DM-ben volt kimutatható, amelyet súlyos nitro-oxidatív stressz, apoptózis és miokardiális fibrózis kísért. A T1DM-moddal szemben ezen patológiás elváltozások

enyhébbek voltak vagy hiányoztak T2DM esetén, míg a cardiomyocytá-hipertrofia mértéke hasonló volt a két DM-típus között. ZDF cukorbeteg patkányokban kifejezett diasztolés falmerevség (megnövekedett LVEDP és EDPVR) és megtartott szisztolés funkció (amely jellemző a HFpEF-re) volt megfigyelhető. Eredményeink alapján a DM két típusa közötti eltérő kórélettani háttér, súlyosság és progresszió lehet a kulcsa a diabéteszes cardiomyopathiában megfigyelt funkcionális illetve molekuláris különbségeknek T1DM és T2DM esetében.

A krónikus szívelégtelenség klinikai ellátása és terápiája során egyre inkább előtérbe kerül a betegek különböző komorbiditásainak (pl. cukorbetegség) ismerete és figyelembe vétele. A vizsgálatunkban alkalmazott állatmodellek hűen reprezentálják az emberekben kialakuló két típusú cukorbetegség patofiziológiáját és kórlefolását. Ugyanakkor, modellrendszerek lévén a belőlük nyert kísérleti adatok korlátozásokkal ültethetőek át a klinikai környezetbe. Mindazonáltal, eredményeink hozzájárulhatnak a klinikai körülmények között cukorbetegben megfigyelhető krónikus szívelégtelenség patomechanizmusának pontosabb megértéséhez és új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez.

Jelen közlemény Tamás Radovits, Sevil Korkmaz, Csaba Mátyás, et al. "An Altered Pattern of Myocardial Histopathological and Molecular Changes Underlies the Different Characteristics of Type-1 and Type-2 Diabetic Cardiac Dysfunction". Journal of Diabetes Research vol. 2015, Article ID 728741, 12 pages, 2015. doi:10.1155/2015/728741 közleményének (32) felhasználásával készült a Hindawi Publishing Corporation engedélye (Creative Commons Attribution License) alapján.

Jelen munkánkat a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (R.T.), az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok PD100245 programja (R.T.) és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal – NKFIH (NVKP-16-1-2016-0017, Nemzeti Szívprogram, M.B.) támogatta.

Irodalom

1. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 2007; 3213–23.
2. An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; H1489–506.
3. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005; 359–70.
4. Guleria RS, Singh AB, Nizamutdinova IT, et al. Activation of retinoid receptor-mediated signaling ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction in Zucker diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 106–18.
5. Mansor LS, Gonzalez ER, Cole MA, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 136.
6. Radovits T, Korkmaz S, Loganathan S, et al. Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat mo-

- dels of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; H125–33.
7. Aragno M, Mastrocola R, Alloatti G, et al. Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. *Endocrinology* 2008; 380–8.
 8. Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol* 2003; 219–28.
 9. Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther* 2014; 375–415.
 10. Radovits T, Bomicke T, Kokeny G, et al. The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil improves cardiovascular dysfunction in experimental diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 2009; 909–19.
 11. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, et al. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 2008; 1422–34.
 12. Liaudet L, Soriano FG, Szabo E, et al. Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 10203–8.
 13. Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, et al. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes* 2001; 1414–24.
 14. Song D, Kuo KH, Yao R, et al. Inducible nitric oxide synthase depresses cardiac contractile function in Zucker diabetic fatty rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 253–9.
 15. Fiordaliso F, Li B, Latini R, et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II-dependent. *Lab Invest* 2000; 513–27.
 16. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000; 1123–32.
 17. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2013; 263–71.
 18. van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 2008; 43–51.
 19. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol* 2011; 3–13.
 20. Ramirez E, Klett-Mingo M, Ares-Carrasco S, et al. Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 172.
 21. Min W, Bin ZW, Quan ZB, et al. The signal transduction pathway of PKC/NF-kappa B/c-fos may be involved in the influence of high glucose on the cardiomyocytes of neonatal rats. *Cardiovasc Diabetol* 2009; 8.
 22. Nadruz W, Jr., Corat MA, Marin TM, et al. Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. *Cardiovasc Res* 2005; 87–97.
 23. Cox EJ, Marsh SA. A systematic review of fetal genes as biomarkers of cardiac hypertrophy in rodent models of diabetes. *PLoS One* 2014; e92903.
 24. Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, et al. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol* 2004; 11–9.
 25. Xia Z, Kuo KH, Nagareddy PR, et al. N-acetylcysteine attenuates PKCbeta2 overexpression and myocardial hypertrophy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Res* 2007; 770–82.
 26. Taye A, Abouzied MM, Mohafez OM. Tempol ameliorates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats: role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2013; 1071–80.
 27. Marsh SA, Powell PC, Agarwal A, et al. Cardiovascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats: role of hydronephrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; H292–8.
 28. Daniels A, Linz D, van Bilsen M, et al. Long-term severe diabetes only leads to mild cardiac diastolic dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. *Eur J Heart Fail* 2012; 193–201.
 29. Farhangkhoei H, Khan ZA, Kaur H, et al. Vascular endothelial dysfunction in diabetic cardiomyopathy: pathogenesis and potential treatment targets. *Pharmacol Ther* 2006; 384–99.
 30. Widyantoro B, Emoto N, Nakayama K, et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation* 2010; 2407–18.
 31. Gonzalez A, Ravassa S, Beaumont J, et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2011; 1833–43.
 32. Radovits T, Korkmaz S, Matyas C, et al. An altered pattern of myocardial histopathological and molecular changes underlies the different characteristics of type-1 and type-2 diabetic cardiac dysfunction. *J Diabetes Res* 2015; 728–741.