

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A kontraktilis fehérjerendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének  
jelentősége szívelégtelenségben**

**Dr. Czuriga Dániel**

**Témavezető: Dr. Papp Zoltán**



**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2012**

## **A kontraktilis fehérjerendszer $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének jelentősége szívelégtelenségben**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Czuriga Dániel okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája  
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus  
tagok: Dr. Baczkó István, Ph.D.  
Dr. Juhász Béla, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. április 24. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Kékesi Violetta, kandidátus  
Dr. Magyar János, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus  
tagok: Dr. Baczkó István, Ph.D.  
Dr. Juhász Béla, Ph.D.  
Dr. Kékesi Violetta, kandidátus  
Dr. Magyar János, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2012. április 24. 13:00

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

# 1. Bevezetés és Irodalmi Áttekintés

## 1.1. A szívelégtelenség definíciója és klinikai vonatkozásai

A szívelégtelenség egy komplex klinikai szindróma, melynek oka lehet bármely olyan strukturális vagy funkcionális kardiális működészavar, amely a bal kamra (BK) szisztolés és/vagy diasztolés funkcióját károsítja.

Napjainkban a szívelégtelenség a vezető halálokok között szerepel szerte a világon. A betegség előfordulási gyakorisága riasztó méreteket ölt, különösen az iparilag fejlett országokban. A szívelégtelenség kezelésében az elmúlt évtizedben bekövetkezett jelentős fejlődés ellenére a betegség mortalitása jelenleg is eléri, vagy meg is haladja a malignus betegségekét. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy sürgető lenne új terápiás lehetőségek keresése és azok minél szélesebb körű alkalmazása. Mind a nagy betegszámú, randomizált, prospektív klinikai vizsgálatok, mind a betegség molekuláris patofiziológiai hátterének részletes feltárását célzó alap kutatások kiemelten fontos szereppel bírnak a betegség elleni küzdelemben.

Krónikus szívelégtelenség során a szívizomzatban kóros remodelláció jön létre, melynek okai részben a szívelégtelenséget kiváltó tényezőkben, részben pedig a neurohumorális kompenzációs mechanizmusokra adott maladaptív miokardiális válaszokban keresendők. Az előnytelen hemodinamikai paraméterek, a miokardiumban fennálló iszkémia, valamint a szívizomkárosodás és/vagy szívizomelhalás mind a szív kóros átépüléséhez vezetnek, amely folyamat romló szívizomfunkcióval, valamint megváltozott szívgeometriával jellemezhető. Ennek következtében csökken az ejekciós frakció és a perctérfogat, melyre a neurohumorális rendszer fokozott aktivitással reagál: a mellékvesékből kiáramló katekolaminok elsősorban a szívre gyakorolt pozitív ino- és kronotróp hatásokkal, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer aktiválódása pedig a fokozott vízvisszatartással és az erekre gyakorolt vazokonstrikciónal igyekszik a normális vérnyomást és perctérfogatot fenntartani.

Napjainkban a hagyományos szívelégtelenség-terápia során az életmódbeli változtatásokon túl a legtöbb esetben indokolt bizonyos gyógyszerek alkalmazása már a betegség korai stádiumában is. Azonban a betegek egy részének a maximális tolerált dózisa felitrált farmakológiai terápia sem csökkenti panaszait, tüneteit, életminőségük és életkilátásuk továbbra is kedvezőtlen marad. A krónikus szívelégtelenségben szenvedő, hagyományos gyógyszeres kezelésre nem reagáló betegek esetében újabban lehetőség nyílik az ún.  $Ca^{2+}$ -érzékenyítő kezelés alkalmazására. A  $Ca^{2+}$ -érzékenyítők a szívglikozidokkal és katekolaminokkal ellentétben a szívizom teljesítményének fokozását nem az intracelluláris

Ca<sup>2+</sup>-koncentráció ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) növelésén keresztül, hanem közvetlenül a kontraktilis fehérjékre hatva érik el. Ezen tulajdonságuk csökkentheti a Ca<sup>2+</sup>-terhelésből adódó nem kívánatos hatásokat, mivel a Ca<sup>2+</sup>-érzékenyítő szerek a szív kontraktilitását elviekben az oxigénfogyasztás emelése és súlyos ritmuszavarok kiváltása nélkül fokozzák.

Tekintettel a szívelégtelenség magas morbiditási és mortalitási adataira, a betegség molekuláris patofiziológiai hátterének jobb megismerése kiemelt fontosságú.

## **1.2. A szívelégtelenség molekuláris háttere**

A szívelégtelenség során létrejövő szívizom-remodelláció molekuláris hátterét jelentős részben a szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek és intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-háztartását szabályzó fehérjéinek megváltozott expressziója, foszforilációs állapota, szerkezeti és funkcionális eltérései adják. A szívelégtelenségben kialakuló molekuláris változásokról az irodalomban eddig összegyűlt adatok több szempontból nyújtottak felvilágosítást, ugyanakkor a mai napig maradtak tisztázatlan és ellentmondásos kérdések. Ezek tisztázásának egyik lehetséges módja olyan állatmodellek létrehozása, melyek nagymértékben utánozzák a humán patológiát, teret biztosítva így a potenciálisan új terápiás próbálkozásoknak is.

A krónikus szívelégtelenségben megfigyelt miokardiális remodelling hátterében álló fehérje módosulások hatással vannak a miokardium struktúrájára, valamint felelősek a sejtfunkciókban bekövetkező zavarokért az intracelluláris jelátviteltől a szívizomsejt kontraktilitáson át a sejtek metabolizmusáig. Humán szívelégtelenséggel kapcsolatos korábbi tanulmányokban azt találták, hogy a csökkenő hatékonyságot mutató β-adrenerg jelátvitel az alacsonyabb proteinkináz A (PKA)-mediált troponin I (TnI) és miozin kötő C fehérje (MyBP-C) foszforiláción keresztül a szívizom megnövekedett Ca<sup>2+</sup>-érzékenységéhez vezet. Tény azonban, hogy ezen összefüggés nem volt egyöntetűen igazolható a szívelégtelenség valamennyi állatmodelljében. Az ellentmondások hátterében a humán patológia komplexitása, a humán szívizommintákhoz való hozzáférés nehézségei, valamint a nagy- és kisállat modellek jelátviteli útvonalai közti lehetséges különbségek egyaránt állhatnak. Ezért a szívelégtelenség megfelelő állatmodelljeiben végzett megfigyelések kiemelt fontossággal és direkt relevanciával bírhatnak a humán szívelégtelenség során létrejövő fehérje módosulások tisztázására nézve.

### 1.3. A kontraktilis erő $\text{Ca}^{2+}$ -függése

A szív miofibrilláris struktúrái által generált erő  $\text{Ca}^{2+}$ -függését intakt szívizomzaton nehéz meghatározni, mert a mioplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) a szív ciklus alatt folyamatosan és igen gyorsan változik. A kontraktilis erő  $[\text{Ca}^{2+}]$ -függésének tanulmányozására leggyakrabban sejtmembránjuktól megfosztott, ún. „nyúzott” (más néven „skinned”) preparátumokat alkalmaznak. Az ilyen preparátumok mioplazmatikus terében a szabad  $[\text{Ca}^{2+}]$  szabályozható, a generált erő pedig kontrollált szarkomerhosszak mellett egyidejűleg mérhető. Amennyiben az erőértékeket a  $[\text{Ca}^{2+}]$  függvényben ábrázoljuk, úgy jellegzetes szigmoid lefutású görbét kapunk. A  $[\text{Ca}^{2+}]$  kifejezésére rendszerint a moláris érték 10-es alapú logaritmusának  $-1$ -szeresét alkalmazzák ( $p\text{Ca}$ ), így  $p\text{Ca}$ -erő összefüggésről is beszélhetünk. A szigmoid lefutású görbe az ún. Hill-egyenlettel illeszthető, mely a kontraktilis rendszer által generált erő  $\text{Ca}^{2+}$ -függésének legfontosabb mennyiségi jellemzőit tartalmazza. A "félmaximális" erő eléréséhez szükséges  $[\text{Ca}^{2+}]$ , a  $[\text{Ca}_{50}]$  (vagy  $p\text{Ca}_{50}$ ), a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$  iránti érzékenységét önmagában jellemző paraméter.

A  $p\text{Ca}_{50}$  növekedése ( $[\text{Ca}_{50}]$  csökkenése) a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés balra tolódásával ( $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység fokozódás, pl. a szarkomerhossz növelése vagy  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő szerek adása révén) jár együtt, a  $p\text{Ca}_{50}$  csökkenése ( $[\text{Ca}_{50}]$  növekedése) ezzel ellentétes hatású ( $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés, pl.  $\beta$ -adrenerg inger hatására). A Hill-koefficiens ( $n_{\text{Hill}}$ ) a szigmoid görbe meredekségére, és egyúttal a kontraktilis rendszeren belüli kooperativitás mértékére jellemző adat.

### 1.4. $\beta$ -adrenerg szignalizáció és szívizomsejt kontraktilitás a normál és a szívelégtelen szívben

A szívizomsejtek kontraktilitásának fokozódása a  $\beta$ -adrenerg stimuláció szimpatikus idegrendszeri aktivációján keresztül valósulhat meg. A  $\beta$ -adrenerg receptorok aktivációja számos membrán- és intracelluláris fehérje PKA-mediált foszforilációjához vezet (pl. L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna, rianodin receptor, foszfolambán). Ezen fehérjék foszforilációja a citoszólikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  fokozódását, valamint a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz (SERCA2) megnövekedett aktivitását eredményezi, amely fokozott szarkoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  felvételhez vezet. A magasabb szisztolés citoszólikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  és szarkoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -töltöttség a szívizomsejtek kontraktilis erejének fokozódását idézi elő. A  $\beta$ -adrenerg rendszer aktiválódása a miofilamentumok szintjén is számos fehérje foszforilációját eredményezi, ami a szívizomsejtek kontraktilitását meghatározó különböző miofilamentáris paramétereket

(maximális erőgeneráló képesség,  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység, passzív feszülés) érintő változásokban nyilvánul meg. A vékony filamentumok TnI fehérjéjének, valamint a vastag filamentumok MyBP-C-jének PKA-mediált foszforilációja csökkenti a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, ami a szívizom relaxációjának diasztole alatti akcelerációját eredményezi (pozitív luzitropia). Számos tanulmány számolt be a szívizomsejtek elasztikus tulajdonságait meghatározó szarkomerikus óriásfehérje, a titin molekula PKA-mediált foszforilációjának a szívizomsejtek passzív feszülésében betöltött szabályozó szerepéről is.

Az egészséges szívben a fokozott  $\beta$ -adrenerg stimulációra bekövetkező kontraktilis erő fokozódás,  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés, és az ezekből adódó pozitív inotróp és luzitróp válaszok előnyös hatásokkal bírnak a szív teljesítőképességére nézve. Szívelégtelenség során a fokozott neurohumorális stimuláció kompenzálni igyekszik a szív csökkent pumpafunkcióját. Bár ez a folyamat a szívizom kontrakciós erejének fenntartását célozza, végső soron hátrányosan érinti a szívizomzatot, mivel az egyes kinázok és foszfatázok közötti egyensúly felborulásához, kóros szívizom átépüléshez, valamint a szabályzó fehérjék olyan foszforilációs változásaihoz vezet, amelyek károsítják a szívizomsejtek funkcióit. Így a krónikus szívelégtelenség során létrejövő fokozott neurohumorális stimuláció következtében a  $\beta$ -adrenerg jelátviteli útvonal deszenzitizálódik, ezzel limitálva a szív válaszadó képességét a fokozott terhelésre. A deszenzitizáció a  $\beta$ -receptorok down-regulációja révén a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban résztvevő-, valamint a miofilamentáris fehérjék csökkent PKA-mediált foszforilációját eredményezi. Ezen csökkent PKA-mediált foszforiláció a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzien্স beszűküléséhez, a miofilamentumok fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységéhez, valamint a szívizomsejtek megnövekedett passzív feszüléséhez vezet.

A szívelégtelenség állatmodelljeiben közelmúltban végzett tanulmányok a humán szívelégtelenségben megfigyeltekhez hasonlóan a szívizomsejtek olyan változásairól számolnak be, amely a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, erőgenerálási képességét, valamint a szívizomsejtek passzív feszülését érintik. Egy poszt-infarktusos sertés modellben az infarktusos területekről nyert szívizomsejtek fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét igazolták, melyet a sejtek *in vitro* PKA oldatban történő inkubálása normalizált. Ezzel ellentétesen patkányokban krónikus nyomásterheléssel, valamint miokardiális infarktus előidézésével kiváltott szívelégtelenség során a kontroll állatokhoz képest csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet, továbbá magasabb TnI foszforilációt találtak. Ezen eltéréseket a fokozott PKC $\alpha$  aktivitással és szignalizációval magyarázták. A maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta erőt ( $F_o$ ) szignifikánsan alacsonyabbnak találták nemcsak a szívelégtelenség fenti poszt-iszkémiás sertés és patkány modelljeiben, de hasonló egér modelltől nyert, remodeláción átesett szívizomsejtekben is

kontrollokhoz képest. A szívizomsejtek passzív feszülésében ( $F_{passzív}$ ) megfigyelt változásokat szintén relevánsnak gondolják a szívizomban létrejövő mechanikai diszfunkció kialakulása kapcsán. Jóllehet, a poszt-iskémiás egér-, valamint sertés modellben a  $F_{passzív}$  nem különbözött jelentős mértékben a szívelégtelen és kontroll szívek között.

### **1.5. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenségben megfigyelt regionális különbségek**

A szívelégtelenség egyik bevált nagyállat modelljét a szív folyamatos, a spontán szívfrekvencia három-négyszeresével történő elektromos ingerlésével hozzák létre legtöbbször kutyákban, sertésekben, birkákban és majmokban. Ezen modellre jellemzőek a funkcionális és molekuláris remodellációban fellelhető regionális különbségek. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség kutya modelljében például regionális különbségeket észleltek az akciós potenciál meghosszabbodásának, valamint a  $Ca^{2+}$ -homeosztázis zavarainak mértékében, továbbá, ezen szívek reszinkronizációs terápiája is eltérő válaszokhoz vezetett. A szívelégtelenség egyik sertés modelljében a tartós elektromos ingerlés indukálta bal kamrai (BK) aszinkronia nagyobb mértékben csökkentette a BK szisztolés falvastagodást és cirkumferenciális rövidülést az anterior/anterolaterális (közvetlenül ingerelt), mint az inferoszeptális régióban (közvetlenül nem ingerelt ellenoldal). Ezen változások a minden régióban egységesen bekövetkező magasabb glükóz felvételtől függetlenül jöttek létre. Ugyanakkor ezek az eltérések jól korreláltak a natriuretikus peptidek aszimmetrikus miokardiális expressziójával.

Kutatásaim során tisztázni kívántam, hogy az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében *in vivo* megfigyelt regionális kontraktilis diszfunkció hátterében felismerhetőek-e a miofibrilláris fehérjék PKA-dependens foszforilációjának változásai.

### **1.6. A $Ca^{2+}$ -érzékenyítők szerepe szívelégtelenségben**

A vékony filamentumokat alkotó troponin komplex központi szerepet tölt be a szív kontraktilis folyamatainak szabályozásában. A troponin komplex egyik alegysége, a TnC molekula a miofibrilláris rendszer  $Ca^{2+}$ -kötő fehérjéjeként szolgál.  $Ca^{2+}$ -szenzor funkciójának köszönhetően molekuláris kapcsolóként funkcionál, amely a szív szisztolés és diasztolés fázisai alatt az intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  függvényében be- és kikapcsolja a kontraktilis apparátus erőgeneráló funkcióját.

A krónikus szívelégtelenségben használt  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítők olyan kardiótóniás hatással bíró ágensek, melyek pozitív inotróp hatásaikat a szívizom excitációs-kontrakciós kapcsolásának befolyásolásával érik el. Ezen anyagok miofilamentáris szinten a TnC fehérjével létrejövő interakción, a vékony filamentumok regulátor helyein, és/vagy a keresztkötési kinetika direkt szabályozásán keresztül javítják a kontraktilis apparátus  $\text{Ca}^{2+}$ -ra adott válaszát. Hatásmechanizmusuk eredményeként a pozitív inotrópia változatlan intracelluláris  $[\text{Ca}^{2+}]$  mellett jön létre, ami csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$ -túlterhelésből adódó ritmuszavarok előfordulásának lehetőségét.

A számos  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő vegyület közül az egyik legrégebb óta kutatott molekula a levosimendan, amely pozitív inotróp hatása mellett egyéb, a szív- és érrendszerre gyakorolt jótékony hatással is bír (vazodilatáció, kardioprotekció, foszfodiészteráz-gátló), melyeket részben aktív metabolitja (OR-1896) révén fejt ki. A szer a TnC fehérjéhez történő  $\text{Ca}^{2+}$ -kötődés modulálásával, lényegében a fehérje  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött állapotának stabilizálásával fejt ki  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzitizáló hatását, a szívizomsejtek maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta erejének befolyásolása nélkül.

Érdekes megfigyelés, hogy közvetlen miofilamentáris hatások olyan vegyületek esetén is kialakulhatnak, melyek fejlesztésénél ezzel a tényezővel közvetlenül nem számoltak. A fantofaron-származék SR33805 pl. egy potens  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló, amely feltehetően a szívizom miofilamentumainak  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét is fokozza. Egy korábbi tanulmányban ugyanis bemutatták, hogy az SR33805 ugyan csökkentette a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzien্স amplitúdóját, de mégis képes volt növelni egészséges patkányok intakt kamrai szívizomsejtjeinek rövidülését. Meglepő volt azonban, hogy az SR33805 a potens  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonizmus ellenére viszonylag elenyésző negatív inotróp effektussal bírt, ahogyan ezt egy nyúl szívizom elektromos stimulációval kiváltott kontrakcióit vizsgáló tanulmány igazolta. Az SR33805 kisebb koncentrációban alkalmazva egészséges patkány szívizomsejtekben növelte a kontraktilis erőt, valamint csökkentette a sejtrövidülés időtartamát a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzien্স jelentősebb befolyásolása nélkül. A szer nagyobb koncentrációkban történő alkalmazásánál egyértelmű  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatást figyeltek meg, mely főként nagyobb szarkomerhosszknál volt nyilvánvaló.

A korábbi preklinikai vizsgálatok alapján nem világos, hogy az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatása megfigyelhető-e szívelégtelen miokardiumban történő alkalmazáskor. Továbbá az sem eldöntött, hogy az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatása összefüggésbe hozható-e a szívizom kontraktilitását szabályzó fehérjék foszforilációs állapotában bekövetkező változásokkal.

## 2. Célkitűzések

Tudományos kutatásaim során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség nagyállat modelljében meg kívántam vizsgálni a miokardiális kontraktilis fehérje foszforiláció feltételezett rendellenességeit, valamint a szívizomsejtek által generált izometriás erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének ezzel összefüggő változásait.
2. Poszt-infarktusos patkány modellben tesztelni kívántam - a kórosan átépült szívizomon még nem vizsgált -  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló SR33805 lehetséges  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatásait.

## 3. Anyagok és Módszerek

### 3.1. Állatkísérletes modellek

#### 3.1.1. Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modellje

10 db hím, felnőtt minidisznót (súly: 35–40 kg) tartósan műszerekkel szereltek fel az olaszországi Pisa kollaborációs partnerlaboratóriumában. A szívelégtelenséget a BK anterior falának három héten át tartó 180/min frekvenciával történő elektromos ingerlésével idézték elő. A szívelégtelenség (HF) indukciója akkor volt eredményes, ha a BK végdiasztolés nyomás meghaladta a 20 Hgmm-t, valamint az ejekciós frakció kisebb volt, mint 40%. Kontrollként kezeletlen egészséges állatok szolgáltak. Az állatokban *in vivo* hemodinamikai méréseket, MRI és PET vizsgálatokat végeztek, amelyekkel regionális falmozgászavart detektáltak az ingerelt területeken. Az állatok szívét ezt követően eltávolították, alacsony hőmérsékleten kisebb darabokra vágták, majd a BK anterolaterális (ingerelt), valamint az inferoszeptális régiót (ellenoldal) különválasztva a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztották (az egyszerűsítés végett a kontroll állatoknál is ingerelt, illetve ellenoldali területként utalunk az adott szívizom régiókra, jóllehet, ezen állatok szívét egyáltalán nem ingerelték).

#### 3.1.2. Poszt-infarktusos patkánymodell

A miokardiális infarktust (MI) 5 hetes hím Wistar patkányok bal anterior leszálló koszorúérének (LAD) proximális szegmensébe helyezett permanens ligatúrával idézték elő a franciaországi Montpellier egyetemi kutatólaboratóriumában. Kontrollként sham-operált,

ligatúrától mentes állatok szolgáltak. Az állatokon az infarktust követő 18. héten *in vivo* kivitelezett echokardiográfiás, valamint szöveti Doppler mérések történtek a szív kontraktilitásának megítélése céljából, intraperitoneálisan alkalmazott bolus SR33805 (20 mg/kg) adása előtt és után. Ezt követően az állatok szívét eltávolítottuk, és azokat mechanikai, valamint biokémiai mérésekre használtuk fel.

### **3.2. Immunhisztokémia**

A sertés szívizommintákat cryomatrix gyantába történő ágyazást követően cryostat mikrotómmal -20 °C-on 10 µm vastagságú szeletekre metszettük. Minden további lépés szobahőmérsékleten zajlott. Elsődleges antitestként monoklonális egér anti-TnI-t használtunk a foszforilációtól független (össz) TnI mennyiség, és poliklonális nyúl anti-TnI antitestet (foszfo S22 + S23) a PKA-mediált TnI foszforiláció (P-TnI) meghatározásához. Ezt egy éjszakán át tartó inkubáció követte +4 °C-on, majd 30 perces inkubáció szobahőmérsékleten anti-egér-Cy3 (piros), valamint anti-nyúl-Cy2 (zöld) másodlagos antitestek jelenlétében. A szövetmetszetekről készült mikroszkópikus felvételeket NIKON Eclipse 80i Fluorescein mikroszkóppal, valamint Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal rögzítettük.

### **3.3. TnI back-foszforiláció**

A permeabilizált sertés szívizomsejtekből nyert fehérje homogenizátumok TnI foszforilációs szintjeinek meghatározására back-foszforilációs esszét végeztünk. A szívizomszövetből mechanikai izolálással és Triton-permeabilizálással membránfosztott szívizomsejteket nyertünk. A reakció oldatokhoz hozzáadtuk az izolált szívizomsejt frakciót, a foszfor 32-es tömegszámú izotópjával (<sup>32</sup>P) jelölt ATP-t (végső specifikus aktivitás: 1500 cpm/pmol), valamint PKA-t. A reakció szobahőmérsékleten ment végbe 15 percen keresztül. A reakcióoldathoz legvégül nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapuffert adtunk, és a mintákat 5 percen keresztül főztük. A poliakrilamid gél elektroforézist (PAGE) követően a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A foszfátcsoport TnI fehérjébe való beépülését autoradiográfiával detektáltuk. Az egyes csíkok intenzitásértékeit (melyek a foszfát beépülését tükrözték) Image J szoftverrel történő denzitometrállással határoztuk meg.

### **3.4. Western immunoblot**

A sertés és patkány szívek BK szövetmintáit "radioimmun precipitációs esszé", valamint urea pufferben homogenizáltuk. A homogenizátumok koncentrációinak beállítása után, a mintákat 10 percig főztük. PAGE-t követően a mintákat nitrocellulóz membránokra transzferáltunk. A

sertés szívmizomfehérje mintákat tartalmazó membránokat TnI ellenes antitesttel jelöltük, és a jelet peroxidázzal konjugált anti-nyúl IgG-specifikus antitesttel detektáltuk. A patkány szívmizomfehérje minták össz TnI fehérjemennyiségeit szintén TnI ellenes antitesttel, míg annak PKA által foszforilált formáját foszfo-specifikus antitesttel azonosítottuk. A patkány szívekből származó MLC2 izoformákat specifikus kardiális MLC2 ellenes antitesttel detektáltuk. A sávokat enhanced kemilumineszcencia (ECL) segítségével jelenítettük meg, a kiértékelés Image J szoftverben zajlott.

### **3.5. PKA aktivitás mérés**

A fagyasztott patkány BK szövetmintákat felolvasztást követően mechanikailag izoláltuk. A citoszól frakciót centrifugálással szeparáltuk. Az endogén PKA aktivitást szobahőmérsékleten vizsgáltuk a citoszól frakciót, <sup>32</sup>P-al jelölt ATP-t (végső specifikus aktivitás: 2500 cpm/pmol), valamint a PKA inhibitor H-89-t vagy az SR33805-t egyaránt tartalmazó reakcióelegyben. A reakciókat a citoszól frakció hozzáadásával indítottuk el, majd a reakció oldatokból 10 µl-t foszfo-cellulóz papírra pipettáztunk 0 és 15 perces időpontokban. A papírok radioaktivitását szcintillációs eljárással detektáltuk. Az SR33805 hatásait a rekombináns módon előállított PKA molekula aktivitására nézve is megvizsgáltuk. A PKA aktivitásokat a maximális aktivitásra (az inhibitor távollétében mért aktivitás) normalizált %-os értékekben fejeztük ki, és "baseline"-ra (a PKA távollétében mért baseline aktivitás) korrigáltuk.

### **3.6. Áramlási citometria**

A BK sertés szívmizommintákat (~0,04 g nedves tömeg) mechanikailag izoláltuk, valamint permeabilizáltuk. Ezt követően a szívmizomsejteket kettősen jelöltük. Elsődleges antitestként monoklonális egér anti-TnI, valamint a foszforilációra érzékeny poliklonális nyúl anti-TnI (foszfo S22 + S23) antitesteket használtunk. Ezt követően a TnI és P-TnI jelintenzitások megjelenítésének céljából 30 perces inkubációkat végeztünk jégen anti-egér-Cy3 és anti-nyúl-Cy5 antitestekkel. A sejtszuspenziókat finoman szonikáltuk, majd azokat egy 50 µm-es sejtszűrőn filtráltuk keresztül. Az áramlási citometriai méréseket FACSArray áramlási citométer segítségével végeztük. Az egyes partikulumok fluoreszcencia intenzitásértékeit csoportonként 6 állatban határoztuk meg. Állatonként átlagosan 6,000-10,000 partikulumot vizsgáltunk meg.

### 3.7. Erőmérések permeabilizált szívizomsejteken

A sertés- és patkányszívekből nyert szívizomsejtek mechanikai funkciójának mérésére azonos módszereket alkalmaztunk. Méréseink során a miofibrilláris funkció megítélésének céljából meghatároztuk a maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta aktív erőt ( $F_o$ ), a passzív erőkomponenst ( $F_{passzív}$ ), a szívizomsejtekben ébredő izometriás erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét ( $pCa_{50}$ ), a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés meredekségét jellemző paramétert ( $nHill$ ), valamint az erő regenerálódás sebességi állandóját maximális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál ( $k_{tr,max}$  - az aktin-miozin keresztkötési ciklus maximális sebességére jellemző paraméter). Az erőmérések során használt relaxáló és aktiváló oldatok pCa ( $-\log[\text{Ca}^{2+}]$ ) értékei 10, valamint 4,75 voltak.

Az egyedi, szívizomsejt méretű preparátumot 15 °C-os hőmérsékleten a mechanikai mérőrendszerhez rögzítettük. A szarkomerhossz 2,3  $\mu\text{m}$ -re történő precíz beállítását követően ismételt aktivációs-relaxációs ciklusokban izometriás  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúrákat váltottunk ki, melyek során a szívizomsejtet a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes relaxáló oldatból egymás után csökkenő  $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú aktiváló oldatokba mozgattuk. Az izometriás csúcs erőértékeket a maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta aktív erőre normalizáltuk, az így kapott  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggéseket ábrázoltuk, majd egy módosított Hill függvény szerint illesztettük. Az egyedi  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúrák során a maximális erőérték elérése után, egy gyors "release-restretch" manővert végeztünk, hogy meghatározzuk az erő regenerálódás sebességi állandóját ( $k_{tr,max}$ ). Ennek a beavatkozásnak az eredményeként először az erő a maximális értékről nullára esett, lehetővé téve ezzel a totál erő meghatározását ( $F_{totál}$ ), majd ismét elkezdett növekedni. A szívizomsejtet ezután ismét relaxáló oldatba helyeztük, ahol eredeti hosszának 80%-ára rövidítettük, hogy meghatározhassuk a sejt passzív erejét ( $F_{passzív}$ ). Az izometriás aktív erőt ( $F_o$ ) a totál és a passzív erőértékek különbségéből nyertük. A sertés szívekből izolált szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggéseit *in vitro* PKA kezelés előtt és után is meghatároztuk. A PKA hatás kialakulásához a szívizomsejteket 20 percig inkubáltuk. A patkány szívekből nyert szívizomsejtek mechanikai paramétereit *in vitro* SR33805 kezelés (10  $\mu\text{M}$ , 10 perc, szobahőmérséklet) előtt és azt követően vizsgáltuk.

### 3.8. Adatelemzés, statisztikai analízis

A  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggéseket módosított Hill egyenlettel illesztettük:

$$F = F_o [\text{Ca}^{2+}]^{nHill} / (C_{a50}^{nHill} + [\text{Ca}^{2+}]^{nHill})$$

ahol  $F$  egy adott  $[Ca^{2+}]$ -hoz tartozó "steady-state" erőt, míg  $F_o$ ,  $nHill$  és  $Ca_{50}$  (vagy  $pCa_{50}$ ) a maximális  $[Ca^{2+}]$ -hoz tartozó aktív erőt, valamint szemilogaritmikus ábrázolásban a szigmoidális összefüggés meredekségét és középpontját jelölik.

A "release-restretch" manővert követő erő regenerálódást egyváltozós exponenciális függvénnyel illesztettük, megbecsülve annak sebességi állandóját ( $k_{tr,max}$ ) a maximális  $[Ca^{2+}]$ -nál:

$$F(t) = F_i + F_a(1 - e^{-k_{tr,max}t})$$

ahol  $F(t)$  a "restretch" utáni bármely időpillanatban ( $t$ ) a maximális  $[Ca^{2+}]$ -nál mért erőt,  $F_i$  és  $F_a$  pedig a "restretch" utáni kezdeti erőt, valamint a  $Ca^{2+}$ -aktiválta erő regenerálódásának amplitúdóját jelölik. A kísérleti preparátumokból kapott adatsorokat egyedileg illesztettük, az illesztett paramétereket összevontuk, és azok átlagait mutatjuk be.

A biokémiai és mechanikai mérések statisztikai analízisét egy-utas ANOVA-val végeztük, az egyes csoportok közötti többszörös összehasonlításokra Bonferroni poszt-tesztet használtunk. Két folyamatos változó között lineáris regressziós analízissel határoztuk meg az összefüggést. A mechanikai mérések során az *in vitro* kezelések hatására bekövetkező változásokat Student-féle páros t-próbával elemeztük. Az eredményeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a P érték kisebb volt, mint 0,05. Az áramlási citometriai mérések során nyert több ezer egyedi adatpont analízisének kivitelezésére az ún. "maximum likelihood mixed effects" többszintű modellezést alkalmaztuk csoportok és területek közötti interakciókkal. Az ingerlés hatását az átlagos log relatív jelintenzitásból  $[\log(P-TnI/TnI)]$  határoztuk meg a foszforiláció mértékére nézve, az interkvartilis tartományokból (IQR) pedig a foszforiláció heterogenitására vonatkozóan. Az adatok logaritmikus transzformációja elősegítette a változók eloszlásának normalizálását.

## 4. Eredmények

### 4.1. A troponin I fehérje foszforilációját érintő változások az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében

A PKA-mediált miofilamentum fehérje foszforiláció homogenitásának vizsgálata céljából szívelégtelen, valamint kontroll sertések szívének BK anterior/anterolaterális (ingerelt), valamint inferoseptális (ellenoldal) régióiból származó szívizomszövet mintáiban határoztuk meg a TnI foszforiláció mértékét immunhisztokémiai eljárással. Általánosságban elmondható, hogy bármely minta bármely területén homogén festődést kaptunk, ha a szív mintákat TnI foszforilációra nem érzékeny antitesttel jelöltük. Ehhez hasonlóan a kontroll szívek bármely

területén, valamint a szívelégtelen állatok nem ingerelt (ún. ellenoldali) területeiről származó mintákban a P-TnI-re specifikus szövetjelölés homogén festési intenzitást eredményezett. Ezzel szemben a szívelégtelen ingerelt oldalon variábilis P-TnI intenzitásokat figyeltünk meg. Az eltérő jelintenzitással festődő területeket olyan szívizomsejt csoportosulások alkották, melyek a szívelégtelen állatok ingerelt területein belül a környezetükhöz képest egyöntetűen csökkent P-TnI szinttel rendelkeztek.

A miofilamentáris fehérjék foszforilációjának átlagos szintjét back-foszforilációs esszé segítségével is becsültük. A permeabilizált szívizomsejtekből nyert fehérje homogenizátumok átlagos foszfo-specifikus TnI jelintenzitásai jelentősen nagyobbak adódtak a szívelégtelen állatok szívének ingerelt területein ( $58 \pm 14,49$  AU) a kontroll állatok ugyanazon területeihez képest ( $5,41 \pm 1,34$  AU;  $P < 0,05$ ), ami a szívelégtelen ingerelt területek PKA-dependens TnI foszforilációjának *in vivo* bekövetkező csökkenésére utalt. A szívelégtelen állatok szíveinek ingerelt, valamint ellenoldali területein mért átlagos TnI foszforiláció egymástól nem tért el szignifikánsan ( $P > 0,05$ ) (HF ellenoldal:  $40,3 \pm 9,86$  AU).

Az áramlási citometriai mérések lehetővé tették nagyszámú permeabilizált szívizomsejtet tartalmazó szuszpenziók vizsgálatát, és a TnI foszforilációjának szintjében bekövetkező regionális különbségek kvantitatív kiértékelését. A logaritmikusan transzformált, relatív jelintenzitások [ $\log(P\text{-TnI}/TnI)$ ] eloszlás hisztogramjait a szívelégtelen, valamint a kontroll állatok szíveinek mindkét szóban forgó régiójára nézve meghatároztuk. A kontroll állatok ingerelt oldalainak megfelelő területekről képzett eloszlás hisztogram a Gauss-eloszláshoz hasonló megjelenést mutatott, szemben a szívelégtelen állatok ingerelt területeinek hisztogramjával, amely egy aszimmetrikus formát öltött a relatíve alacsonyabb  $\log(P\text{-TnI}/TnI)$  értékeknél detektált szívizomsejt szám növekedés miatt. A back-foszforilációs esszé eredményeivel összhangban a szívelégtelen állatok szívének ingerelt területéhez tartozó  $\log(P\text{-TnI}/TnI)$  átlagérték szignifikánsan alacsonyabbnak adódott, mint a kontroll állatok ugyanazon területein ( $-0,41$  vs.  $-0,28$  a HF ingerelt és a kontroll ingerelt területeken;  $P = 0,0071$ ), így mindkét esszé a P-TnI relatív csökkenését igazolta a szívelégtelen állatok ingerelt területeire nézve. Ezen túlmenően a szívelégtelen ingerelt csoportban szignifikánsan szélesebb interkvartilis tartományt (IQR) figyeltünk meg a kontroll ingerelt, valamint a szívelégtelen ellenoldali területekhez képest ( $0,53$  vs.  $0,36$  vagy  $0,42$  a HF ingerelt, kontroll ingerelt és HF ellenoldali területeken;  $P = 0,0093$  vs. kontroll ingerelt oldalhoz képest;  $P = 0,0047$  vs. HF ellenoldalhoz képest). A szívelégtelen csoport ingerelt területein megfigyelt IQR kiszélesedés az ezen területekről származó szívizomsejtek közötti relatív TnI foszforilációban létrejövő nagyobb szórást tükrözte.

Az átlagos  $\log(P\text{-TnI/TnI})$  intenzitásértékeket az egyes állatok ingerelt és ellenoldali területére lebontva is ábrázoltuk. Általánosságban elmondható, hogy a kontroll szívek  $\log(P\text{-TnI/TnI})$  értékei egy keskenyebb sávot öleltek fel a szívelégtelen állatokéhoz képest. Továbbá, a kontroll állatok átlagos  $\log(P\text{-TnI/TnI})$  értékei véletlenszerűen magasabbnak vagy alacsonyabbnak adódtak az ingerelt vagy ellenoldali szívizomterületeken, és a két oldal közötti különbség általában kismértékű volt. Ezzel szemben a szívelégtelen állatok ingerelt szívizomterületeihez tartozó átlagos  $\log(P\text{-TnI/TnI})$  értékek a legtöbb esetben rendre alacsonyabbnak adódtak az ellenoldalon mértékhez képest, valamint a két oldal közti különbség az egyes szívelégtelen szívekben kb. kétszerese volt a kontrolloknál megfigyelt átlagos különbséghez képest.

A kontroll, valamint a szívelégtelen állatok szívműködéséből származó egyedi, permeabilizált szívizomsejtek mechanikai paramétereiben létrejövő lehetséges különbségeket direkt erőméréssel tanulmányoztuk. A kontroll szívek ingerelt területeihez tartozó átlagos  $pCa_{50}$  értékek nem különböztek szignifikánsan sem a kontroll, sem a szívelégtelen szívek ellenoldali területein kapott értékektől PKA kezelést megelőzően (a  $pCa_{50}$  értékek rendre  $5,77\pm 0,01$ ,  $5,75\pm 0,01$  és  $5,73\pm 0,03$  voltak a kontroll ingerelt, kontroll ellenoldali és HF ellenoldali területeken). Ugyanakkor a szívelégtelen állatok szívműködésének ingerelt területein mért átlagos  $pCa_{50}$  érték (és ebből kifolyólag az izometriás erő  $Ca^{2+}$ -érzékenysége) szignifikánsan magasabbnak adódott ( $5,86\pm 0,03$ ) mindhárom csoporthoz képest. Mindemellett a PKA expozíció ennél a csoportnál csökkentette legnagyobb mértékben a  $pCa_{50}$  értéket, eltüntetve ezzel a négy csoport közti,  $Ca^{2+}$ -érzékenységekben megfigyelt különbséget. Továbbá, a  $pCa_{50}$  értékek eloszlásai az áramlási citometriai mérések során kapott eloszlás hisztogramok jellegzetességeit tükrözték, így ezen mérések összhangban álltak a biokémiai és hisztokémiai eredményekkel is. Ezen túlmenően az *in vitro* PKA kezelés  $Ca^{2+}$ -érzékenységre gyakorolt hatása a szívelégtelen ingerelt oldalon minden más csoporthoz képest szélesebb tartományt felölelő csökkenést eredményezett a  $pCa_{50}$  értékekből képzett eloszlásokban. A szívelégtelen ingerelt oldalon mért  $F_{passzív}$  szignifikánsan magasabbnak adódott a szívelégtelen ellenoldalhoz képest, de nem találtunk különbséget a csoportok között a  $F_o$  és  $k_{tr,max}$  értékek tekintetében.

#### 4.2. Az SR33805 szívizomsejtek $Ca^{2+}$ -érzékenységére és endogén proteinkináz A aktivitására gyakorolt hatásai poszt-infarktusos patkánymodellben

Az intakt, előfeszítetlen,  $Ca^{2+}$ -fluoreszcencia indikátor festékkel feltöltött izolált szívizomsejtek elektromos stimulációja lehetőséget biztosít a sejtek rövidülésében, valamint azzal egyidejűleg azok  $Ca^{2+}$ -tranziensében bekövetkező változások vizsgálatára. Az izolált, permeabilizált szívizomsejt preparátumok pedig lehetővé teszik a kontraktilis apparátus tulajdonságainak, valamint a miofilamentumok  $Ca^{2+}$ -ra adott válaszainak vizsgálatát a szarkoplazmatikus retikulumból felszabaduló  $Ca^{2+}$  tartalomtól függetlenül. Kollaborációs partnereink az infarktusos állatokból származó intakt, izolált szívizomsejtek vizsgálatával azok csökkent mértékű rövidülésének normalizálódását igazolták SR33805 kezelés hatására, a  $Ca^{2+}$ -tranziens amplitúdójának változása nélkül. Egészséges kontroll, valamint infarktuson átesett patkányok (MI) izolált, permeabilizált szívizomsejteiben történő direkt erőmérésekkel megvizsgáltuk a kontraktilis rendszer jellemzőit, továbbá teszteltük az *in vitro* SR33805 kezelés hatásait az infarktuson átesett állatok szívizomsejtjeinek (MI-SR) kontraktilis paramétereire nézve. A miofilamentumok rövidebb szarkomerhosszon mért  $Ca^{2+}$ -érzékenysége nem különbözött a MI csoportban kontrollhoz képest, ugyanakkor *in vitro* SR33805 kezelést követően az jelentősen nagyobbak adódtak (~0,07 pCa egységgel). A sejtek 2,3  $\mu$ m-re történő nyújtása a  $Ca^{2+}$ -erő görbék balra tolódását eredményezte mind a kontroll, mind a MI csoportban, amit a  $pCa_{50}$  értékek emelkedése jelzett. Ugyanakkor a MI csoportban megfigyelt  $Ca^{2+}$ -erő összefüggés nyújtást követő balra tolódása kisebb mértékű volt kontrollhoz képest. Az SR33805 kezelés a nagyobb szarkomerhosszon jelentős mértékben fokozta a  $Ca^{2+}$ -érzékenységet a MI csoportban (~0,18 pCa egységgel). A két szarkomerhosszon mért  $pCa_{50}$  érték közötti különbséget [ami a kontraktilis rendszer hosszfüggő aktivációjának indexeként szolgált ( $\Delta pCa_{50}$ )] az SR33805-ben történő inkubáció teljes mértékben helyreállította a MI csoportban a szer nagyobb szarkomerhosszon kifejtett erősebb hatása révén. A szívizomsejtek egyéb kontraktilis paraméterei ( $F_{passzív}$ ,  $F_o$ ) hasonlóan adódtak minden csoportban mindkét szarkomerhosszon.

Annak megítélésére, hogy vajon az SR33805 szívizomsejtekre gyakorolt hatásának háttérben felfedezhető-e a kontraktilis erőgenerációt szabályzó fehérjék foszforilációs állapotának módosulása, az állatokból származó permeabilizált, megnyújtott izom preparátumokból nyert mintákban meghatároztuk a TnI és MLC2 fehérjék foszforilációs szintjeit Western blot analízissel. A MI ~33%-kal csökkentette az MLC2 fehérje foszforilációját. Az SR33805 kis mértékben ugyan, de szignifikánsan növelte az MLC2

foszforilációt a MI csoportban, jóllehet, az 22%-al továbbra is elmaradt a kontroll állatokban mértéktől. A TnI fehérje foszforilációjának megítélésére egy, a Ser23/24 helyekre (a fő cAMP-dependens PKA foszforilációs hely) specifikus foszforilációt felismerő antitestet használtunk. A TnI foszforiláció magasabbnak adódott a MI csoportban, amit az SR33805-tel történő inkubáció jelentős mértékben csökkentett az MI (~30%), valamint a kontroll sejtekhez (~20%) képest.

Ezen TnI foszforilációban bekövetkező SR33805 indukálta redukció emelkedett foszfatáz, vagy csökkent PKA aktivitásra engedett következtetni. Ennek eldöntésére az SR33805 PKA aktivitásra gyakorolt hatásait radioaktív aktivitási esszével vizsgáltuk meg. Elsőként rekombináns PKA-t használtunk, hogy megvizsgáljuk a szer esetleges direkt, a kinázzal létrejövő interakcióját. A rekombináns PKA aktivitást a 10  $\mu$ M-os SR33805 kezelés egy standard PKA inhibitor (H-89) által előidézett redukcióhoz hasonló mértékben csökkentette. Ezen megfigyelés arra engedett következtetni, hogy az SR33805 képes közvetlenül gátolni a PKA-t *in vitro*. A szer inhibitorikus hatását a kontroll patkány szívek endogén PKA aktivitásán is teszteltük, és hasonló eredményt kaptunk, mint a rekombináns PKA esetében.

Összefoglalva elmondható, hogy az SR33805 csökkentette a TnI fehérje Ser23/24 helyének foszforilációját a PKA aktivitás gátlásán keresztül, ami a miofilamentumok  $Ca^{2+}$ -érzékenységének fokozódásához vezetett.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Celluláris inhomogenitás a regionális kontraktilis diszfunkció hátterében az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség során

Elvégzett kísérleteink az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében létrejövő PKA-dependens TnI foszforiláció heterogén csökkenését tárták fel. Érdekes módon a P-TnI szint sejtről-sejtre kialakuló variabilitása nagyobb mértéket öltött az ingerlő elektróda közelében a nem ingerelt BK területekhez képest. Ebből adódóan azt feltételezzük, hogy az inhomogén PKA-dependens kontraktilis fehérje hipofoszforiláció hozzájárul a miokardiális remodelláció regionális mechanikai diszfunkciójához ebben a nagyállat modellben.

A kamrai kontraktilis válaszokban létrejövő diszszinkroniát a BK remodelláció kapcsán fellépő mechanikai diszfunkció egyik fontos tényezőjeként tartják számon, így az elektromos reszinkronizáció előnyt nyújthat a szignifikáns QRS megnyúlással rendelkező szívelégtelen betegek számára. Az elektromos stimulálás hatására kialakuló szívelégtelenség különböző modelljeiben számos alkalommal írtak le miokardiumot érintő regionális különbségeket.

Mindezek ellenére jelenleg még nem teljesen tisztázott, hogy mely jelátviteli útvonalak érintettek elsősorban a regionális mechanikai változások létrejöttében, és hogy ezek hogyan kapcsolódnak a miofilamentumok  $Ca^{2+}$ -ra adott válaszához és/vagy a szívizomsejtek  $Ca^{2+}$ -homeosztázisához.

Tekintettel a  $\beta$ -adrenerg kaszkád miokardiális kontraktilitás szabályzásban betöltött központi szerepére, számos korábbi tanulmány feltételezte annak részvételét az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenségben megfigyelhető regionális jellegzetességek kialakulásában. Az efferens szimpatikus funkciók és a  $\beta$ -adrenerg válaszok csökkentek az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelen kutyamodellben, még hozzá régió-specifikus funkcionális változások mellett, jóllehet, a  $\beta$ -adrenerg jelátvitel biokémiai és celluláris paraméterei nem mutattak egyértelműen regionális jellegzetességeket. A miofilamentumok szintjén a bazális  $\beta$ -adrenerg jelátvitelben bekövetkező csökkenés a miofibrilláris erőgenerálás  $Ca^{2+}$ -érzékenységének fokozódását feltételeznék, ami egy olyan változás, amit gyakran hoznak összefüggésbe a TnI és MyBP-C fehérjék összehangolt hipofoszforylációjával.

Kísérleteink során az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében létrejövő, - a  $\beta$ -adrenerg deszenzitizáció miatti - feltételezhetően kisebb PKA-mediált TnI foszforylációnak nemcsak regionális, hanem intraregionális aspektusait is meg kívántuk vizsgálni. A kísérleti állatokban végzett MRI vizsgálatok regionális kontraktilis diszfunkciót detektáltak, amely nagyobb mértékben csökkentette a BK szisztolés falvastagodást és cirkumferenciális rövidülést az ingerelt, mint az ellenoldali területeken (~7% vs. ~31% és ~-5% vs. ~-7% az ingerelt és ellenoldali területeken). Azt feltételeztük, hogy a mechanikai funkcióban létrejövő regionális különbségek összefügghetnek a  $\beta$ -adrenerg rendszer vezérelte TnI foszforylációban bekövetkező szöveti szintű változásokkal.

Back-foszforylációs esszé segítségével jelentősen csökkent TnI foszforylációt tártunk fel a szívelégtelen állatok ingerelt területein a kontroll állatokhoz képest, egybehangzóan azon feltételezéssel, miszerint az ingerelt oldalon a  $\beta$ -adrenerg rendszer down-regulációja jön létre. Ezen megfigyelésünk a miofibrilláris erőgeneráció  $Ca^{2+}$ -érzékenységének ( $pCa_{50}$ ) növekedését vonhatja maga után. Ezzel összhangban az átlagos  $pCa_{50}$  értékek jelentősen magasabbnak adódtak a szívelégtelen szívek ingerelt területein, mint azok ellenoldali vagy a kontroll szívek bármely területén, és ezen különbségeket az *in vitro* PKA kezelés eltüntette. Emellett az immunhisztokémiai, az áramlási citometriai és a direkt erőmérések eredményei a relatív P-TnI szintek jelentősen magasabb, sejtről-sejtre kialakuló nagymértékű variabilitására mutattak rá a szívelégtelen állatok ingerelt területein.

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a szívelégtelen ingerelt oldalon mért  $pCa_{50}$  értékek tükrözik a szívizomsejtek miofilamentáris funkciójában végbemenő változásokat, és ez a paraméter összefüggésbe hozható a PKA-dependens TnI és MyBP-C foszforilációval. Emiatt azt feltételezzük, hogy a PKA-dependens kontraktilis fehérje foszforiláció zavara hozzájárul az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében megfigyelt regionális kontraktilis diszfunkcióhoz. Ezen kívül az sem zárható ki, hogy egyéb miofilamentáris fehérjék (pl. titin) PKA-dependens hipofoszforilációja az ingerelt oldalon hozzájárul a magasabb  $F_{passzív}$  kialakulásához, és ezzel az ezen szívekben megfigyelt BK végdiasztolés nyomásemelkedés létrejöttéhez (~6 Hgmm-ről ~20 Hgmm-re). Mindazonáltal jelen vizsgálataink alapján nem egyértelmű, hogy a miofilamentáris fehérje foszforilációban létrejövő regionális eltérések milyen mértékben működnek közre a funkcionális hemodinamikai változásokban (pl. az ejekciós frakció ~76%-ról ~35%-ra való csökkenésében).

Legjobb tudomásunk szerint elsőként tanulmányoztuk a szívizomsejtek TnI foszforilációjának szöveti szintű inhomogenitását nem iszkémiás eredetű szívelégtelenségben néhány érzékeny módszer kombinációjával (fehérje biokémia, hisztokémia, direkt erőmérések, valamint áramlási citometria). Adataink arra mutattak rá, hogy a TnI foszforiláció szintje szélesebb tartományt ölelhet fel az ingerlő elektróda környezetében, mint máshol, valamint az jelentősen eltérő lehet az egyes egymáshoz közelálló szívizomsejt csoportosulások között az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség létrejötte során. Jelenleg nem tudunk magyarázattal szolgálni a P-TnI jelintenzitás ezen eloszlási mintázatára vonatkozóan; azt feltételezzük, hogy annak létrejötte a stimuláló elektromos áram miokardiumra gyakorolt közvetlen fizikai hatásaival összefügghet.

Összefoglalva a BK nagy frekvenciájú ingerlése a sertés szívek remodellációjához, és következményesen szívelégtelenséghez vezetett, amit az elektromos stimulációhoz közeli területeken a PKA-mediált TnI foszforiláció átlagos csökkenésével lehetett jellemezni. A PKA-dependens TnI foszforiláció szintje a BK ingerelt területeken nagyobb mértékű, sejtről-sejtre kialakuló változékonyságot mutatott a távolabbi vagy a kontroll szívek bármely területéhez képest. Ezen  $\beta$ -adrenerg-dependens változóban bekövetkező intraregionális inhomogenitás hatással van a miofibrilláris erőgenerálás  $Ca^{2+}$ -érzékenységére, így ennek következtében hozzájárulhat a diszszinkron, és emiatt csökkent BK kontrakcióhoz az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében.

## 5.2. Az SR33805 kontraktilis rendszerre gyakorolt jótékony hatásai poszt-infarktusos patkánymodellben

Kísérleteink során poszt-infarktusos patkány modellben vizsgáltuk az SR33805 hatásait a szívizom kontraktilis tulajdonságaira nézve. Az állatokon végzett echokardiográfiás és szöveti Doppler mérések során az SR33805 kontraktilitás-fokozó hatását figyelték meg *in vivo*, melyet részben az intakt, infarktusos szívizomsejtekben *in vitro* végzett vizsgálatok eredményei is visszatükröztek. Ezek során az infarktusos sejtek csökkent mértékű rövidülésének SR33805 kezelés hatására bekövetkező normalizálódását figyelték meg, amely nem volt magyarázható a  $Ca^{2+}$ -tranziens amplitúdójának változásával. Az SR33805 pozitív inotróp hatásait permeabilizált szívizomsejt preparátumokon történő direkt erőmérésekkel is megerősítettük, melyek során a szer fokozta a miofilamentumok  $Ca^{2+}$ -érzékenységét. Ennek hátterében az MLC2 fehérje foszforilációjának SR33805 kezelés hatására bekövetkező kismértékű növekedése, valamint a TnI fehérje foszforiláció jelentős mértékű csökkenése állhatott, mely PKA aktivitás méréseink eredményei alapján az SR33805 PKA-gátló szerepével függhetett össze.

Korábban megfigyelték, hogy miokardiális infarktust követően a szívizom kontraktilitás fokozása növelheti a szívizom károsodás mértékét, valamint tovább ronthatja a csökkent pumpafunkciót. Jóllehet, a kontraktilitás fokozódást az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák  $\beta 2$  alegységének overexpressziójával, és az ebből adódó  $Ca^{2+}$  felszabadulás fokozásával érték el, ami a klinikumban használt terápiával ellentétes stratégia. A jelenlegi klinikai irányelvek szerint miokardiális infarktusból a  $\beta$ -adrenerg rendszer katekolaminok által történő stimulálása csak akut szívelégtelenség esetén indokolt, akkor is csak rövid ideig, a keringés támogatására. Hosszútávon pumpafunkció rezerv létrehozása, valamint a  $Ca^{2+}$ -terhelésből adódó aritmiák csökkentése a cél, ami  $\beta$ -blokkoló terápiával érhető el. Krónikus szívelégtelenségben a kontraktilis diszfunkció javítására a miofilamentumokon közvetlenül ható  $Ca^{2+}$ -érzékenyítő szerek azonban elviekben használhatóak. Legjobb tudomásunk szerint először tanulmányoztuk a  $Ca^{2+}$ -érzékenyítő tulajdonsággal is rendelkező  $Ca^{2+}$ -csatorna blokkoló SR33805 hatásait kórosan átépült szívizmon.

Az *in vivo* végzett echokardiográfiás kísérletek arra mutattak rá, hogy az SR33805 fokozza a BK kontraktilitást patkány szívből. Ezen eredmények összhangban állnak altatott, nyitott mellkasú kutyákon végzett vizsgálatokkal, ahol az intravénásan alkalmazott SR33805 jelentősen fokozta a szegmentális rövidülést. Jóllehet, ezen megfigyeléseket nem magyarázták az SR33805-tel kapcsolatban általában leírt vazorelaxáns, illetve  $Ca^{2+}$ -csatorna blokkoló

hatások, így további vizsgálatok voltak szükségesek annak eldöntésére, hogy az SR33805 miokardiumra gyakorolt jótékony hatásai milyen egyéb lehetséges mechanizmusok útján valósulhatnak meg. Érdekes módon az SR33805 - kontroll szívizomsejtekkel ellentétben - nem befolyásolta a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienst szívelégtelen szívizomsejtekben. Ennek egyik lehetséges magyarázata az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -blokkoló hatásának membrápotenciáltól való függése, hiszen korábban mind a vaszkuláris, mind a szívizom mintákon végzett kísérletekben azt találták, hogy a szer  $\text{Ca}^{2+}$ -blokkoló hatása alacsonyabb volt depolarizált preparátumok esetében. Hasonló effektus okozhatja az SR33805 szívelégtelen szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienének amplitúdójára gyakorolt hatástalanságát is. Egy másik magyarázatként a szívizomsejtek intracelluláris metabolikus környezetének szívelégtelenség során bekövetkező megváltozása szolgálhat.

Mai napig vitatott kérdés, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítők alkalmazásánál potenciális veszélyt jelent-e a diasztolés diszfunkció felerősítése, melyet az intracelluláris  $[\text{Ca}^{2+}]$  diasztolés szintjére adott fokozott érzékenység indukálhat. Az egyetlen  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő szer, amely eljutott a klinikai vizsgálatok szintjére, a levosimendan, nem befolyásolta kedvezőtlenül a relaxáció idejét, sőt, némi luzitrop hatást is mutatott egészséges és szívelégtelen kutyákban. Hasonlóképp, az SR33805 *in vivo* hatásait célzó vizsgálatok során sem volt felfedezhető a szer relaxációs időt prolongáló hatása, csakúgy, mint az intakt szívizomsejteken történt mérések alatt, ahol is az SR33805 kezelés hatására gyorsabb  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzien lecsengés, valamint relaxáció volt megfigyelhető, mely a  $\text{Ca}^{2+}$  fokozott szarkoplazmatikus felvételére engedett következtetni. Az SR33805 kezelés ezen jótékony hatásai mellett a permeabilizált szívizomsejteken végzett mérések során sem találtunk a passzív feszülésben bekövetkező növekedést, ami arra utal, hogy a szer a diasztolés funkció passzív komponensére sincs kedvezőtlen hatással. Az intakt szívizomsejtek vizsgálatából kiderült, hogy az SR33805 kezelés normalizálta az infarktuszos szívizomsejtek károsodott kontrakciós és relaxációs sebességét. Hasonló, kontrakciót érintő változásokat figyeltek meg MLC-kinázt overexpresszáló szívizomsejtekben, melyekben az MLC2 foszforilációs szintje magasabbnak adódott. Ez arra enged következtetni, hogy a miofilamentumok foszforilációs állapota képes lehet a sejtrövidülést, illetve a sejtek relaxációját befolyásolni. Ezek alapján az általunk megfigyelt, SR33805 hatására létrejövő magasabb MLC2 foszforiláció, ugyan kismértékű volt, de hozzájárulhatott a sejtek gyorsabb aktivációjának és relaxációjának létrejöttéhez. Az SR33805 indukálta  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzien gyorsabb lecsengésének pontos mechanizmusa egyelőre még tisztázatlan. Felmerül, hogy a szer ezen hatása az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizáció befolyásolásán, azaz a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis szabályozásában részt vevő fehérjék funkciójának

megváltozásán keresztül jön létre. Ebből adódóan az SR33805  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban betöltött szerepének tisztázására további kísérletek szükségesek.

Az SR33805 egyik érdekes jellemzője a szer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységre gyakorolt hatásaiban megfigyelt hossz-függő sajátosság. Míg alacsony szarkomerhosszon egy kismértékű, de szignifikáns, magasabb szarkomerhosszon egy sokkal kifejezettebb  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység fokozó hatást lehetett felfedezni. Ez az infarktusos szívizomsejtek kontrollokhoz képesti csökkent hosszfüggő aktivációjának ( $\Delta pCa_{50}$ ) normalizálódását eredményezte. A szer hasonló hatását figyelték meg egy korábbi tanulmányban kontroll szívizomsejteken. Érdekes módon más  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő tulajdonságú vegyületek esetében (pl. EMD 57033, CGP-48506, kalmidazolium) épp ellenkező hatásról, a permeabilizált szívizomsejtek hosszfüggő aktivációjának csökkenéséről számoltak be. A szívizomsejtek hosszfüggő aktivációja képezi a Frank-Starling mechanizmus celluláris alapját, ami alapfeltétele a normál szív működésnek. A hosszfüggő aktiváció - és értelemszerűen a Frank-Starling mechanizmus - molekuláris alapja, valamint az SR33805 erre gyakorolt hatása egyelőre még tisztázatlan. Valószínűsíthető azonban, hogy az MLC2 fehérje foszforilációjának fokozása szerepet játszik az infarktusos szívizomsejtek hosszfüggő aktivációjának helyreállításában, noha a kísérleteink során ezen paraméterben megfigyelt kismértékű változás felveti más mechanizmusok szerepét is.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő tulajdonsággal bíró vegyületek pozitív inotróp hatásaikat a troponin komplex direkt befolyásolásán, vagy a keresztkötési kinetika facilitálásán keresztül fejtik ki. Kísérleteink alapján nem zárható ki az SR33805 troponin fehérjékre gyakorolt direkt hatása, azt azonban további kísérletekkel szükséges igazolni. Biokémiai kísérleteink a troponin I fehérje PKA-specifikus foszforilációjának növekedését támasztották alá az infarktusos állatokból származó szívizommintákban, ami összhangban állt ezen állatok fokozott szimpatikus idegrendszeri aktivációjával, valamint azok kontraktilis fehérjéinek csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységgel. Szívelégtelenség során az adekvát perctérfogat fenntartásának érdekében fokozott szimpatikus idegrendszeri aktiváció jön létre. Ez fokozott  $\beta$ -receptor aktivációhoz, és számos, az excitációs-kontrakciós kapcsolatban résztvevő fehérje PKA-mediált foszforilációjához vezet. A szívelégtelenség előrehaladott stádiumában a fokozott szimpatikus idegrendszeri aktiváció a  $\beta$ -adrenerg receptorok deszenzitizációjához vezet, ami a PKA-mediált szignalizációs útvonal down-regulációját eredményezi. Vizsgálataink arra utalnak, hogy az SR33805 gátolta az infarktuson átesett patkány szívizomsejtekben a PKA aktivitását, ami a csökkent TnI foszforiláción keresztül magyarázhatja a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$  iránti szenzitizációját az SR33805 kezelést követően. Ebben a tekintetben az SR33805 egyedülállóan tűnik a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő szerek családjában, mivel ezen anyagok némelyike

épp a foszfodiészteráz aktivitásra fejt ki gátló hatást, ami fokozott cAMP szinteket eredményez, és következményesen növeli a TnI fehérjén található PKA-specifikus foszforilációs helyek telítettségét. Ezzel szemben kísérleti eredményeink az SR33805 direkt PKA gátló hatását igazolták, ami inkább a  $\beta$ -receptor blokkolók hatásmechanizmusára emlékeztet.

Összefoglalva, az SR33805 fokozta az infarktuson átesett patkányokból származó szívműködő sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet. Ennek háttérében a kontraktilitást szabályzó fehérjék foszforilációs állapotában bekövetkező változásokat igazoltuk, amit a szer részben a PKA aktivitás direkt gátlásával ért el, a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban bekövetkező káros következmények nélkül. Mindezek alapján az SR33805 kezelés *in vitro* igazolt jótékony hatásai hozzájárultak az állatokban *in vivo* megfigyelt kontraktilitás javulásához, így a szer potenciális terápiás szerepe felmerülhet a későbbiekben a humán szívelégtelenség kezelésében.

## 6. Összefoglalás

A krónikus szívelégtelenség molekuláris háttere a mai napig nem teljesen egyértelmű, így a betegség patofiziológiájának részletesebb feltárása hozzájárulhat a szívelégtelenség új terápiáinak megjelenéséhez.

Kísérleteink során azt kívántuk megvizsgálni, hogy az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenségben megfigyelt regionális kontraktilis diszfunkció hátterében felfedezhető-e a szívizomsejtek miofibrilláris fehérjéinek foszforilációs változásai. Emellett poszt-infarktusos állatmodellben tesztelni kívántuk - a kórosan átépült szívizmon korábban még nem vizsgált -  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló SR33805 lehetséges  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő hatásait.

Vizsgálataink során az alábbi új megállapításokat tettük: 1) Az elektromos ingerléssel kiváltott szívelégtelenség sertés modelljében alacsony proteinkináz A-mediált troponin I foszforiláció jön létre az ingerléshez közeli területeken, ami nagymértékű, sejtről-sejtre kialakuló variabilitást mutat. 2) A szívizom ezen heterogén átépülése hatással van a szívizomsejtek által generált erő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységére, így ennek következtében hozzájárulhat az állatokban megfigyelt regionális kontraktilis eltérésekhez. 3) Az SR33805 változásokat indukál a kontraktilitást szabályzó fehérjék foszforilációs állapotában poszt-infarktusos patkánymodellben, amit részben a proteinkináz A aktivitásának direkt gátlásával ér el. 4) A szer ezen hatásai fokozzák az izolált szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, így azok hozzájárulnak az infarktuson átesett állatokban *in vivo* megfigyelt kontraktilitás javulásához.

Eredményeink rámutatnak a szívelégtelenség során tapasztalt regionális kontraktilis diszfunkció molekuláris aspektusaira, továbbá felhívják a figyelmet egy új típusú farmakológiai  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítő mechanizmusra, mely a szívelégtelenség terápiája során a jövőben talán kiaknázható lehet.

## 7. A saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /75/2012.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Czuriga Dániel

Neptun kód: THKBBP

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

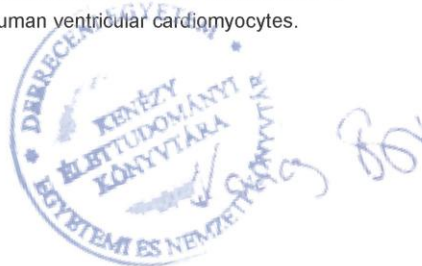
### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Czuriga, D.**, Tóth, A., Pásztor, E.T., Balogh, Á., Bodnár, A., Nizsalóczki, E., Lionetti, V., Recchia, F.A., Czuriga, I., Édes, I., Papp, Z.: Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure.  
*Basic Res. Cardiol.* 107 (2), 13p., 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-012-0244-x>  
IF:6.128 (2010)
2. Ait Mou, Y., Tóth, A., Cassan, C., **Czuriga, D.**, de Tombe, P.P., Papp, Z., Lacampagne, A., Cazorla, O.: Beneficial effects of SR33805 in failing myocardium.  
*Cardiovasc. Res.* 91 (3), 412-419, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr096>  
IF:6.051 (2010)



### További Közlemények

3. **Czuriga, D.**, Paulus, W.J., Czuriga, I., Édes, I., Papp, Z., Borbély, A.: Cellular mechanisms for diastolic dysfunction in the human heart.  
*Curr. Pharm. Biotechnol. Epub ahead of print (2012)*  
IF:3.455 (2010)
4. Kovács, K.R., **Czuriga, D.**, Bereczki, D., Bornstein, N.M., Csiba, L.: Silent brain infarction: A review of recent observations.  
*Int. J. Stroke. "accepted by publisher", 2012.*  
IF:3.125 (2010)
5. Papp, Z., **Czuriga, D.**, Balogh, L., Balogh, Á., Borbély, A.: How cardiomyocytes make the heart old.  
*Curr. Pharm. Biotechnol. Epub ahead of print (2012)*  
IF:3.455 (2010)
6. **Czuriga, D.**, Papp, Z., Czuriga, I., Balogh, Á.: Cardiac aging: A review.  
*Eur Surg. 43 (2), 69-77, 2011.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10353-011-0600-3>  
IF:0.534 (2010)
7. Czuriga I., **Czuriga D.**, Borbély A.: Diastolés szívelégtelenség =Diastolic heart failure.  
*Orvosképzés. 85 (1), 49-54, 2010.*
8. **Czuriga, D.**, Stienen, G.J.M., Velden van der, J., Papp, Z.: Cardiomyocytes and cardiac contractile function.  
In: *Advances in Cardiomyocyte Research*. Ed.: Péter P. Nánási, Transworld Research Network, Kerala, India, 227-244, 2009.
9. Molnár, A., Borbély, A., **Czuriga, D.**, Siket, M.I., Szilágyi, S., Hertelendi, Z., Páztorné Tóth, E., Balogh, Á., Galajda, Z., Szeráfin, T., Jaquet, K., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes.  
*J. Biol. Chem. 284 (2), 1031-1039, 2009.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M807600200>  
IF:5.328



10. Édes, I., **Czuriga, D.**, Csányi, G., Chlopicki, S., Recchia, F.A., Borbély, A., Galajda, Z., Édes, I., Velden van der, J., Stienen, G.J.M., Papp, Z.: Rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine, and porcine cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293 (1), R20-R29, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00537.2006>  
IF:3.661

**Összesített impakt faktor: 31.737**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 12.179**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.02.28



## **Köszönetnyilvánítás**

Hálával tartozom Dr. Papp Zoltán Professzor Úrnak, témavezetőmnek, aki Ph.D-s éveim alatt rengeteg segítséget, támogatást nyújtott, és lehetővé tette azt, hogy megismerkedjem a tudományos ismeretszerzés érdekfeszítő és felemelő érzésével.

Köszönöm Dr. Édes István Professzor Úrnak, a Kardiológiai Intézet igazgatójának szakmai segítségnyújtását, hasznos tanácsait, és azt, hogy lehetővé tette számomra intézetében a kísérletek megvalósítását.

Hálával tartozom Dr. Tóth Attila Tanár Úrnak, Dr. Balogh Ágnesnek, valamint Pásztorné Tóth Enikőnek, amiért kutatómunkám során számos alkalommal készséggel segédkeztek a kísérletek elvégzésében, a technikai akadályok leküzdésében, valamint ragyogó ötleteikkel nagyban hozzájárultak a jelen disszertációban bemutatott új eredmények megszületéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Walter Paulus Professzor Úrnak és Dr. Borbély Attila barátomnak, akiktől sok segítséget kaptam, és nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy munkám során betekintést nyerhessek egy külföldi kutatólaboratórium belső műhelymunkájába.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom Édesapámnak, Dr. Czuriga Istvánnak, aki önzetlen segítségével folyamatos iránymutatást nyújtott Ph.D-s éveim alatt is, Édesanyámnak, aki áldozatkész tevékenységével lehetővé tette számomra a gördülékeny munkát, valamint Testvéreimnek és Menyasszonyomnak, akik támogatása sok erőt adott a felmerülő akadályok leküzdéséhez.