

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Kalász Judit

**Az oxidatív stressz, az akut stressz és a női nemi
hormonok hatása a szívmusclejtek kontraktilis
funkciójára**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az oxidatív stressz, az akut stressz és a női nemi hormonok hatása a szívmusclejtek kontraktilis funkciójára

Kalász Judit

Témavezető: Dr. Borbély Attila



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	8
2	Irodalmi áttekintés.....	9
2.1	Az oxidatív stressz szerepe és jelentősége a kardiovaszkuláris megbetegedésekben.....	9
2.1.1	<i>A reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezése.....</i>	9
2.1.2	<i>Oxidatív stressz kardiovaszkuláris megbetegedésekben.....</i>	11
2.1.3	<i>Oxidatív fehérjekárosodások a szívizom kontraktilis rendszerében.....</i>	12
2.2	A mieloperoxidáz enzim (MPO).....	14
2.2.1	<i>Az MPO jellemzői, klorinációs és peroxidáz aktivitása.....</i>	14
2.2.2	<i>Az MPO jelentősége kardiovaszkuláris megbetegedésekben.....</i>	16
2.2.3	<i>A mieloperoxidáz fő effektora, a hipoklórossav (HOCl).....</i>	16
2.3	A titin óriásfehérje szerepe a szarkomerben.....	17
2.4	A női nem és a stressz szerepe kardiovaszkuláris megbetegedésekben.....	19
2.4.1	<i>A női nemi hormonok védő szerepe.....</i>	19
2.4.2	<i>A stressz szerepe a kardiovaszkuláris kórképekben.....</i>	20
3	Célkitűzések.....	22
4	Anyagok és módszerek.....	23
4.1	Szívizom minták.....	23
4.1.1	<i>Humán bal kamrai szívizom minták.....</i>	23
4.1.2	<i>Akut stressz és ovariectomia patkánymodellben.....</i>	23
4.2	Izometriás erő mérése membránfosztott, bal kamrai szívizomsejt preparátumokon.....	24
4.2.1	<i>A mieloperoxidáz enzim humán szívizomsejtek erőgenerálására kifejtett hatásának vizsgálata.....</i>	26
4.2.2	<i>Az akut stressz és az ovariectomia hatása a szívizomsejtek erőgenerálására.....</i>	26

4.3	MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérése.....	26
4.4	Szérum ösztrogén, progeszteron, glükóz és koleszterin szint meghatározása	27
4.5	Fehérje SH-oxidáció, karboniláció és foszforiláció meghatározására	28
4.5.1	<i>A miofilamentális fehérjék SH tartalmának meghatározása Ellman reakcióval</i>	28
4.5.2	<i>Fehérje oxidáció meghatározása SH-csoport biotinálási módszerrel</i>	28
4.5.3	<i>Fehérjék vizsgálata redukáló és nem redukáló oldatkörnyezetben</i>	29
4.5.4	<i>Fehérje karboniláció vizsgálata</i>	30
4.5.5	<i>Szívizomfehérjék foszforilációs állapotának meghatározása</i>	32
4.6	Adatelemzés és statisztika.....	32
5	Eredmények	34
5.1	A mieloperoxidáz enzim (MPO) hatásának vizsgálata.....	34
5.1.1	<i>Az MPO funkcionális hatásainak vizsgálata humán bal kamrai szívizomsejteken</i>	34
5.1.2	<i>A Met gátolja az MPO klorinációs aktivitását, azonban a peroxidáz aktivitásra nincs hatással</i>	39
5.1.3	<i>Az MPO hatására létrejövő oxidatív fehérjekárosodások vizsgálata.....</i>	40
5.2	Az ovariectómia és az akut stressz hatása patkány bal kamrai szívizomsejtek kontraktilis funkciójára	46
5.2.1	<i>Az ovariectómia és a stressz hatása a kísérleti állatok fizikális és laboratóriumi paramétereire</i>	46
5.2.2	<i>Az ovariectómia és a stressz hatása a szérum ösztrogén és progeszteron szintre</i>	47
5.2.3	<i>Az ovariectómia befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis funkcióját.....</i>	48
5.2.4	<i>Az ovariectómia és stressz hatása a miofilamentáris fehérjék összetételére és foszforilációs állapotára.....</i>	49
5.2.5	<i>A szívizomsejt kontraktilis funkció összefüggése a miokardiális fehérjék foszforilációjával, valamint a női nemi hormonok szintjével</i>	51
6	Megbeszélés.....	52

6.1	A mieloperoxidáz enzim (MPO) hatása a humán szívizomsejtek mechanikai és biokémiai jellemzőire	52
6.2	A stressz és a női nemi hormonok hatásai a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára és a miofilamentáris fehérjék foszforilációjára.....	56
7	Összegzés	61
8	Summary.....	62
9	Irodalomjegyzék	63
10	Publikációs lista.....	71
11	Tárgyszavak.....	73
12	Köszönetnyilvánítás	74

Rövidítések jegyzéke

ABAH	– 4-aminobenzhidrazid (MPO inhibitor)
ACE	– angiotenzin konvertáz enzim
ACS	– akut koronária szindróma
ACTH	– adrenokortikotróp hormon
ADH	– antidiuretikus hormon
AT1	– egyes típusú angiotenzin receptor
BK	– bal kamra
COX	– ciklooxygenáz
CRH	– kortikotropin elválasztást serkentő hormon
CV	– kardiovaszkuláris
DM	– diabetes mellitus
DTDP	– dithiodipiridin
DTT	– dithiotreitol
EDTA	– etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	– etilén-glikol-tetraecetsav
F _{aktív}	– kalcium-függő aktív erő
F _{passzív}	– kalcium független passzív erő
H ₂ O ₂	– hidrogén peroxid
HFpEF	– szívelégtelenség megtartott ejekciós frakcióval
HOCl	– hipoklórossav
HPA	– hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely
HRT	– hormonpótló terápia
I/R	– iszkémia-reperfúzió
KI	– karbonilációs index
LDL	– alacsony denzitású lipoprotein
MetSO	– metionin-szulfoxid
MHC	– miozin nehézlánc
MI	– miokardiális infarktusz
MLC-1	– miozin könnyűlánc-1
MMP	– mátrix metalloproteináz
MPO	– mieloperoxidáz enzim

MPO-I – MPO-inhibitor
MyBP-C – miozinkötő C-fehérje
N2B-Us – N2B unique sequence
nHill – Hill-koefficiens
NOS – nitrogén-monoxid szintáz
ONOO· – peroxinitrit
OVX – ovariectomizált
PBST – tween tartalmú foszfát puffer
pCa₅₀ – Ca²⁺ érzékenység
PKA – protein-kináz A
RAAS – renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
ROS – reaktív oxigén származékok
RNS – reaktív nitrogén származékok
SH – szulfhidril
SOD – szuperoxid dizmutáz
TCM – Takotsubo kardiomiopátia
Tm – tropomiozin
TnI – troponin-I
XO – xantin-oxidáz

1 Bevezetés

A miokardiális infarktus (MI), az iszkémiás szívbetegség és a szívelégtelenség a fejlett országokban a kardiovaszkuláris okból bekövetkező halálozás jelentős hányadáért tehetőek felelőssé. Ezen kórképek kialakulása során a szívizomzatban jellegzetes strukturális és funkcionális változások következnek be, melyek együttesen a szív funkciójának károsodásához vezetnek. A miokardiális diszfunkció háttérében álló folyamatok feltárása alapvető fontosságú, hiszen ezek alaposabb megismerése új támadásponttal rendelkező gyógyszerek kifejlesztéséhez, ennek következtében pedig a kardiovaszkuláris mortalitás csökkenéséhez vezethetnek. A kardiovaszkuláris rendszert érintő megbetegedések kialakulása során a szív szisztolés és diasztolés funkciózavarához a miofilamentáris fehérjerendszert érintő oxidatív károsodások, valamint a β -adrenerg jelátviteli útvonal által közvetített foszforilációs változások is nagymértékben hozzájárulnak.

Epidemiológiai vizsgálatok alapján a kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulása és azok rizikófaktorainak megoszlása tekintetében a női és férfi nem között markáns különbségek figyelhetők meg. Utóbbiak részben a női nemi hormonok protektív hatásaival hozhatók összefüggésbe. A hagyományos rizikófaktorok mellett a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában szerepet játszhat az emocionális, vagy fizikai stressz is, mely a β -adrenerg útvonalat aktiválva fejti ki hatását. Ezen tényezők részletesebb vizsgálata nagyban hozzájárulhat a női nemi hormonok kardiovaszkuláris betegségekben betöltött szerepének pontosabb megismeréséhez.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Az oxidatív stressz szerepe és jelentősége a kardiovaszkuláris megbetegedésekben

2.1.1 *A reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezése*

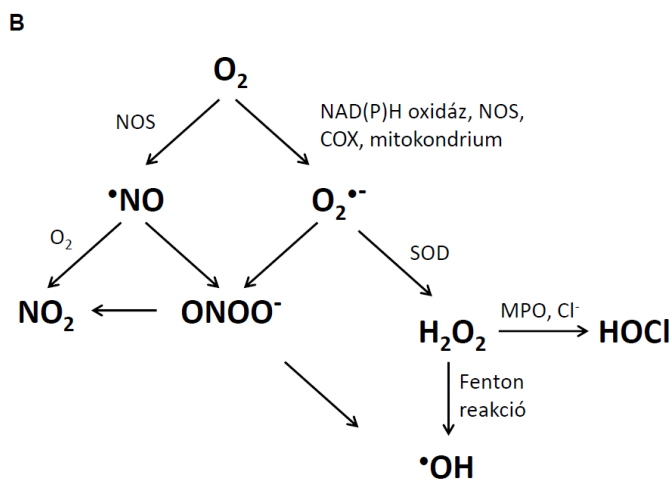
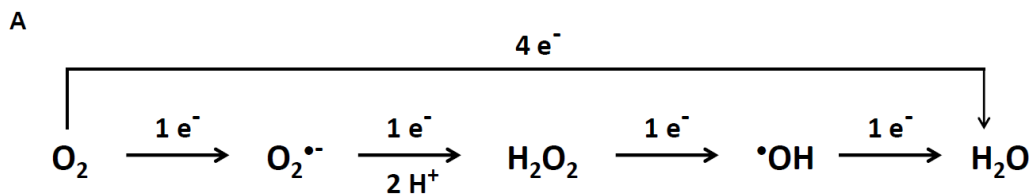
Oxidatív stresszről akkor beszélünk, amikor a sejtekben, szövetekben keletkező reaktív oxigén származékok (ROS) és nitrogén intermedierek (RNS) mennyisége meghaladja a szervezet antioxidáns rendszereinek kapacitását, így utóbbiak nem képesek semlegesíteni a ROS/RNS molekulák oxidatív potenciálját, ami a szervezet molekuláinak (fehérjék, lipidek, nukleinsavak) károsodásához vezet. A ROS/RNS keletkezésének lehetőségei és hatásai részletes tárgyalása meghaladják ezen értekezés kereteit, így a következőkben a témaválasztásunk szempontjából fontos résztvevők kiemelésével alkotunk képet a folyamatról, az egyéb kapcsolódó elemek szerepét csak említés szintjén tárgyaljuk.

A ROS keletkezésének legismertebb forrása a biológiai oxidáció, vagy sejtlégzés folyamata, melynek során a szervezet molekuláris oxigén felhasználásával állít elő energiát. A sejtek aerob metabolizmusának energiatermelő folyamatában a molekuláris oxigén négyelektronos redukciójával víz keletkezik (**1. ábra A panel**). Az oxigén tökéletlen redukciója azonban ROS keletkezéséhez vezet. A ROS tehát a molekuláris oxigén tökéletlen redukciója során a mitokondriumokban (elektrontranszportlánc 1-es komplex, NADH-dehidrogenáz, valamint 3-as komplex, ubiszemikinon és redukált citokróm-b)⁽¹⁾, ezen kívül például gyulladási folyamatokban a NAD(P)H-oxidáz (Nox) hatására a fagocitákban, a biotranszformáció folyamatában a májban (citokróm p450), valamint nem enzimikus úton (ionizáló sugárzás, fotolízis, nitrogén-oxidok, ózon) is keletkezhet. Szívizomsejtekben főként a Nox2 és 4 és a xantin-oxidáz (XO) működése révén termelődnek ezen reaktív intermedierek, azonban a szervezet ROS/RNS generáló enzimeit közé tartozik a nitrogén-monoxid szintáz (NOS), a citokróm p450, a ciklooxygenáz (COX) és a lipoxigenáz is⁽²⁾.

ROS keletkezése során az oxigénből, egy elektron hozzáadásával szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) jön létre, mely egy gyengébb szabadgyök, belőle szuperoxid dizmutáz (SOD) hatására hidrogén-peroxid (H_2O_2) képződik. A H_2O_2 egy stabil⁽³⁾ és membránpermeabilis

molekula⁽⁴⁾, melynek *in vivo* koncentrációja nagymértékben függ a képződési és lebomlási sebességétől^(5, 6). A H₂O₂ semlegesítését két enzimrendszer végzi a szervezetben: magas H₂O₂ koncentrációnál a kataláz enzim, míg alacsony H₂O₂ koncentrációknál a glutation-peroxidáz enzim redukált glutation felhasználásával redukálja a H₂O₂-t vízzé. Amennyiben nem semlegesítődik, úgy a H₂O₂ fémionokkal (vas, réz) reakcióba lépve egy elektron hozzáadásával hidroxil-gyököt ([•]OH) képez a Fenton reakcióban, vagy a mieloperoxidáz (MPO) enzim ko-szubsztrátjaként hipoklórossavat (HOCl) hoz létre (**1. ábra B panel**). Előbbi nagy reaktivitással és extrém rövid életidővel (10⁻⁹s) rendelkezik⁽⁷⁾, utóbbi az MPO effektoraként később kerül részletes bemutatásra. Az RNS képződés folyamatában a molekuláris oxigénből NOS hatására nitrogén-monoxid szabadgyök ([•]NO) jön létre. A [•]NO-ból O₂ felhasználásával nitrogén-dioxid (NO₂), vagy szuperoxiddal egyesülve peroxinitrit (ONOO⁻) keletkezik (**1. ábra B panel**).

A ROS/RNS tagjai között megkülönböztetünk szabadgyököket (O₂^{•-}, [•]OH, [•]NO) és nem szabadgyök típusú származékokat (H₂O₂, szinglet oxigén (¹O₂)). *Szabadgyököknek* nevezzük azokat az atomokat vagy molekulákat, amelyek külső elektronhéjukon párosítatlan elektronnal rendelkeznek, ennek köszönhetően rendkívül reakcióképesek. Rövid életidejű molekulák, azonban nem gyök típusú molekulákkal reagálva újabb szabadgyököket képeznek, oxidatív láncreakciót indítva el, így nagyobb távolságokban is érvényesül hatásuk.



1. ábra Szabadgyökök képződése.

A molekuláris oxigén redukciója vízzé (A). Reaktív oxigén és nitrogén intermedierek keletkezése (B). (Magyarázat a szövegben. O₂^{•-}: szuperoxid, [•]OH: hidroxil gyök, NOS: nitrogén-monoxid szintáz, COX: ciklooxigenáz, [•]NO: nitrogén-monoxid, SOD: szuperoxid-dizmutáz, NO₂: nitrogén-dioxid, ONOO⁻: peroxinitrit, MPO: mieloperoxidáz, HOCl:hipoklórossav.) (Kalyanaraman B, *Redox Biology 1*, 2013 alapján)

2.1.2 Oxidatív stressz kardiovaszkuláris megbetegedésekben

Az oxidatív stressz központi szerepet játszik a gyulladással járó kardiovaszkuláris kórállapotokban: hipertóniában, atheroszklerózisban, iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodásban, MI-ban, bal kamrai (BK) remodelling során és szívelégtelenségben⁽⁸⁾.

Fiziológias körülmények között a ROS részt vesznek az érátmérő szabályozásában, azonban a túlzott ROS produkció endothél diszfunkció, lipid peroxidáció és simaizom proliferáció révén a magas vérnyomásra jellemző érdiszfunkció kialakulásához vezet^(9, 10). Az atheroszklerózis progressziójában az endotélsejtek, makrofágok és az érfa simaizomsejtjei által termelt ROS az alacsony denzitású lipoproteint (LDL) oxidálva gyulladást indítanak be⁽¹¹⁾, endotél diszfunkciót okoznak⁽¹²⁾ és destabilizálják az atheroszklerotikus plakkokat. A plakk ruptúra következtében létrejövő csökkent vérrellátás az érintett szívmuszkulátúra oxigénhiányos állapotát okozza, mely MI-hoz és I/R károsodáshoz vezet. *Oxigén paradox* néven ismert az a jelenség, mely szerint az oxigénhiányos állapotot követő reperfúzió alatt éri nagyfokú oxidatív károsodás a szívmuszkulátúrát⁽⁷⁾. Ennek hátterében egyrészt az iszkémia alatt a szívmuszkulátúrában felszaporodott nagy mennyiségű XO, valamint Nox2 és Nox4 upreguláció⁽¹³⁾ állnak, melyek a reperfúzió során oxigén felhasználásával szabadgyököket képeznek⁽⁷⁾. A neutrofilek beáramlása az oxigénhiányos területre iszkémia alatt ugyan lassú^(14, 15), azonban a reperfúzió során a miokardium által generált proinflammatorikus szignálok hatására beáramló neutrofil granulocitákból kiszabaduló ROS gyors akkumulációja figyelhető meg, melyek közvetlenül károsítják a szívmuszkulátúrát^(15, 16). Kísérletes körülmények között leukocytamentes vérrel történő reoxigenizáció csökkentette az infarktus méretét⁽¹⁷⁾, klinikai vizsgálatok során ugyanakkor az anti-neutrofil terápia alkalmazása nem hozta meg a várt eredményt⁽¹⁵⁾.

A MI-ban megfigyelhető szívmuszkulátúra elhalást követően a hegszövet kialakulása során újbóli, leukocytákkal járó gyulladást okozó reakció zajlik le az érintett szívmuszkulátúrában. A túlzott mértékű gyulladást okozó folyamatok azonban káros átépüléshez, ún. adverz remodellinghez és szívelégtelenséghez vezethetnek⁽¹⁸⁾. BK-i remodelling során a ROS növekedési jelátviteli útvonalakat aktiválnak, így hipertrofiához vezetnek⁽¹⁹⁾, aktiválják a mátrix metalloproteinázokat (MMP), így kollagén degradációt kiváltva hozzájárulnak a BK dilatációhoz⁽⁹⁾. MI-t követően a Nox2 és a Nox4 emelkedett expresszióját igazolták szívmuszkulátúrában^(13, 20) és kimutatták, hogy MI után p47phox

(Nox2 regulatórikus faktor) és Nox4 knockout egerekben kisebb mértékű szívizomsejt hipertrófia, BK dilatáció és BK diszfunkció alakul ki^(21, 22). Szívelégtelenségben a ROS a Ca^{2+} -ATP-ázok működésének befolyásolása révén a szívizomsejtek Ca^{2+} túltöltődéséhez, ezáltal kontraktilis diszfunkcióhoz⁽²³⁾, valamint endotél diszfunkció, intersticiális fibrózis és apoptózis kialakuláshoz vezetnek⁽²⁾.

2.1.3 Oxidatív fehérjekárosodások a szívizom kontraktilis rendszerében

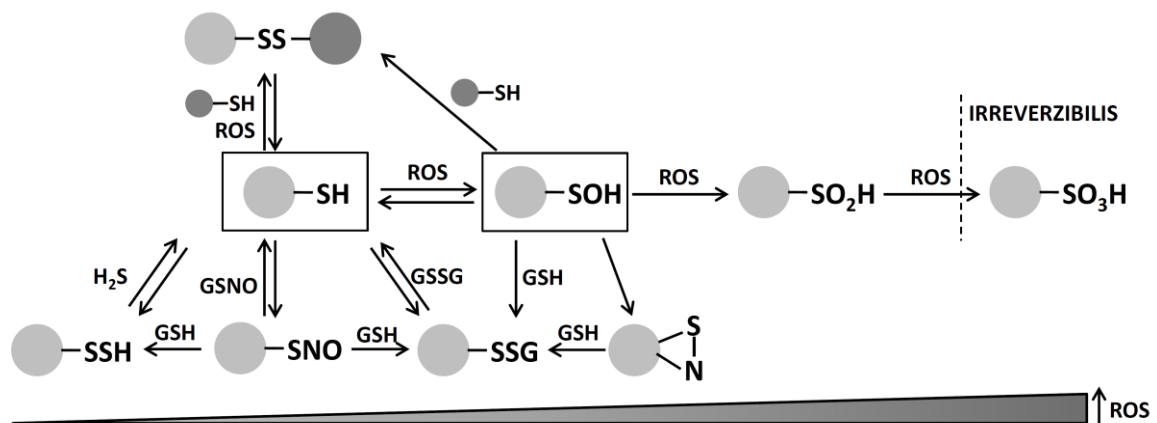
A ROS nemcsak indirekt módon (Ca^{2+} homeosztázis zavara, kinázok aktiválása), hanem a miofilamentális fehérjék funkciójának direkt károsítása révén is képesek csökkenteni a kontraktilis rendszer erőgeneráló képességét, ezáltal kontraktilis diszfunkciót előidézni⁽²⁴⁻²⁶⁾. A H_2O_2 szívizomra kifejtett hatásai például két csoportba sorolhatók: 1. *direkt* fehérje oxidáció, melynek során a szulfhidril (SH)-csoport oxidáció és/vagy karboniláció megy végbe (aktin, miozin könnyűlánc-1 (MLC-1)⁽²⁷⁾); 2. *indirekt* hatások, amikor a H_2O_2 másodlagos messengerként protein kinázokat aktivál (redox signaling, protein-kináz C delta (PKC δ), troponin I (TnI) foszforiláció^(28, 29)). A H_2O_2 koncentrációfüggő módon BK diszfunkciót okoz patkány szívben⁽²⁹⁾ és diszulfid-hídképződést indukál aktin és tropomiozin (Tm) esetében⁽³⁰⁾.

A kontraktilis rendszer oxidatív károsodása a szarkomerek szintjén egyes aminosavak módosításával valósul meg.

A *metionin (Met) oxidációja* során metionin-szulfoxid (MetSO) keletkezik, amely enzimatikusan, a MetSO-reduktáz segítségével képes visszaalakulni a kiindulási aminosavvá⁽³¹⁾. Ezek alapján a fehérjék felszíni Met oldalláncait, a szervezet endogén antioxidánsaiként, hatékony szabadgyök scavengerként tartják számon⁽³²⁾. A MetSO azonban nagyobb mértékű oxidatív károsodás hatására irreverzibilisen metionin-szulfoná alakulhat^(33, 34).

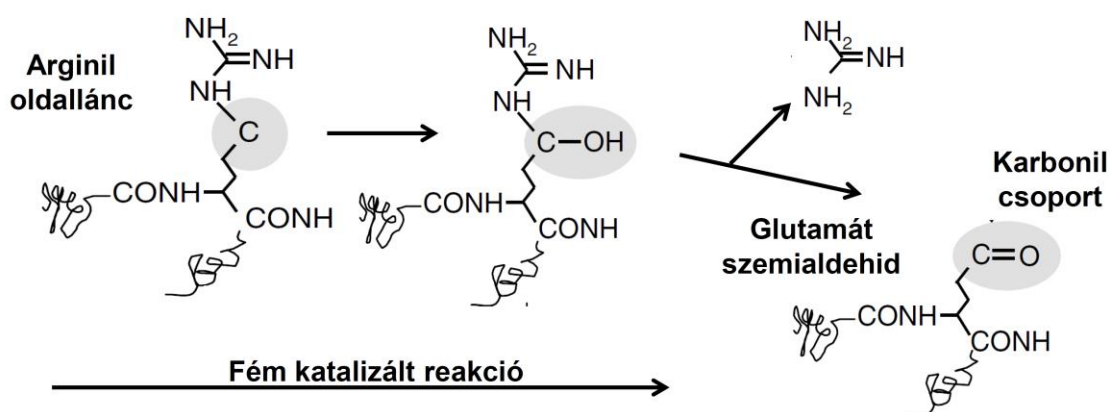
A cisztein (Cis) aminosav terminális SH csoportjának köszönhetően szintén rendkívül érzékeny az oxidatív károsodásra. A Cis szabad SH csoportjainak oxidációjakor intra- vagy intermolekuláris *diszulfid hidak* (RS-SR') keletkezhetnek az instabil szulfénsav (R-S-OH) intermediereken keresztül, vagy anélkül. A szulfénsav további ROS hatására szulfinsavvá (R-SO₂H), majd szulfonsavvá (R-SO₃H) alakul. Oxidált glutationnal történő reakcióban glutationilált tiol (RS-SG), hidrogén-szulfid hatására szulfhidrált tiol (R-SSH), NO hatására S-nitrozilált tiol (R-S-NO) képződik, míg nitroxil (HNO) hatására

szulfínamid, vagy diszulfid jön létre⁽²⁴⁾. Az S-glutationilálás és diszulfid-képződés reverzibilis, míg a szulfon sav keletkezése irreverzibilis reakció⁽³⁵⁾. Újabb eredmények szerint az eddig irreverzibilisnek gondolt szulfínsav keletkezéssel járó oxidáció szulfiredoxinnal revertálható⁽³⁶⁾. A közelmúlt kutatásai megerősítették, hogy nem minden, Cis-t érintő oxidatív posztranszlációs módosítás vezet a kontraktilis funkció csökkenéséhez: enyhe oxidatív stresszt követően a fehérjék S-nitrozilálása (SNO) kardioprotektív, HNO hatására pedig a kalcium-érzékenység és kontraktilis erő növekedése figyelhető meg. Ugyanakkor a fehérjéken megfigyelték a redox-állapot érzékelésére alkalmas ciszteinek jelenlétét, amelyek a sejt oxidatív stimulusra adott választ szabályozzák (redox-switches)⁽³⁵⁾ (2. ábra).



2. ábra A cisztein oxidatív posztranszlációs módosításai. A cisztein szabad SH csoportjának reverzibilis átalakulása diszulfiddá (-SS-), vagy szulfénsavvá (-SOH). Protektív mechanizmusok: szulfhidráció (-SSH), S-nitroziláció (-SNO) és S-glutationiláció (-SSG). A szulfénsav intermedier reakciói: diszulfid, szulfenilamid (-S-N-), valamint szulfínsav (-SO₂H) és szulfonsav (SO₃H) képződés. (Chung, *Circ. Res.* 2013. alapján)

Nagyobb mértékű oxidatív stressz hatására a szívizomfehérjék karbonilációja következik be. Direkt oxidációval a fehérjék lizin, arginin, prolin és threonin aminosav oldalláncain alakulhatnak ki karbonil csoportok. A fém katalizált reakció (Fenton reakció – vas jelenlétében, *in vivo*) során aldehidek és ketonok keletkeznek, például glutamát-szemialdehid argininből⁽³⁷⁾. Emellett lipideken, szénhidrátokon és előrehaladott glikációs végtermékeken (advanced glycation end-products, AGEs) keletkezett karbonilgyökökkel reakcióba lépve cisztein, lizin és hisztidin aminosavakon is kialakulhatnak karbonilszármazékok másodlagos reakció során⁽³⁸⁾ (3. ábra).



3. ábra Fehérje aminosav oldalláncok karbonilációjának mechanizmusa. (Magyarázat a szövegben) Nyström T, *The EMBO Journal*, 2005 alapján

A tirozin aminosavak oxidatív hatásra nitrálódhatnak és klorinálódhatnak. A 3-klorotirozin az MPO-működés specifikus markere⁽³⁹⁾, míg nitrotirozin keletkezhet MPO^(40, 41) és ONOO⁻⁽²⁶⁾ reakciói során is. MPO hatására a tirozin aminosav tirozil gyökké is oxidálódhat, majd két tirozil gyök ditirozinná összekapcsolódva fehérje kereszthidakat képez⁽⁴²⁾.

2.2 A mieloperoxidáz enzim (MPO)

2.2.1 Az MPO jellemzői, klorinációs és peroxidáz aktivitása

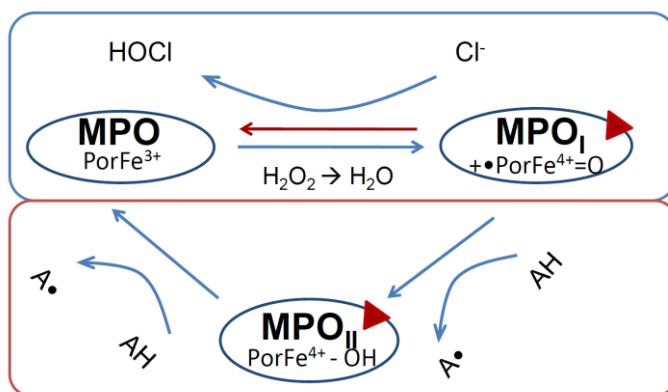
Az MPO (EC 1.11.2.2) - az eozinofil (EPO), tiroid (TPO) és laktoperoxidáz (LPO) mellett - a hemperoxidáz enzimcsalád tagja⁽⁴³⁾. Az enzimcsalád tagjai működésük során a kosubsztrátként funkcionáló H₂O₂ felhasználásával tesznek szert erős oxidáló erőre, mellyel effektorként vesznek részt a kórokozók elleni küzdelemben (MPO - baktériumok elpusztítása; EPO - paraziták elleni küzdelem, és a célpont molekulák poszttranszlációs módosítása; TPO - a szervezetbe kerülő jodid-ion oxidálása atomi jóddá). Az MPO -az enzimcsalád tagjai közül egyedül- képes arra, hogy a H₂O₂ oxidatív potenciálját emelve a kloridion (Cl⁻) oxidációjával hipoklórossavat (HOCl) hozzon létre⁽⁴⁴⁾.

Az MPO a leukociták azurofil granulumaiban található, leukocita aktivációt követően szekretálódik és vesz részt a természetes immunválaszban. Főként neutrophil granulociták tartalmazzák, azonban fellelhető monocitákban, valamint a szöveti makrofágok egyes típusaiban is⁽⁴⁴⁾. Természetes immunválaszban betöltött baktériumölő

szerepe mellett a fagoszómákon kívül kerülve gyulladási folyamatokban az általa létrehozott ROS a szervezet szöveteit, fehérje, lipid és DNS szerkezetét is károsíthatják⁽⁴⁵⁾.

Az MPO enzim egy 144 kDa molekulatömegű tetramer, amely két megegyező - egy-egy könnyű és egy-egy nehéz polipeptid-láncot tartalmazó - alegységből épül fel, melyeket diszulfid-híd köt össze. Mindkét alegység egy-egy hem prosztetikus csoportot tartalmaz, melyek az enzimesalád többi tagjától eltérően kettő helyett három kovalens kötéssel rögzülnek. Utóbbiak a protoporfirin váz helyzetét megváltoztatva az enzim nagyobb reaktivitását és klorinálási képességét biztosítják⁽⁴⁶⁾.

Az MPO működése során ROS-t képez, halogenizációs (klorinációs), illetve peroxidáz ciklusán keresztül. Mindkét ciklus első lépése a H_2O_2 redukálása vízzé, miközben az enzimben található hem-vas a nyugalmi Fe^{3+} (ferri) állapotból Fe^{4+} (ferril) állapotba kerül (Compound I, $\cdot Fe^{4+}=O$). Ebből az aktivált állapotból az enzim két-elektronos redukcióval (halogenizációs ciklus), vagy két egymást követő egy elektronos redukcióval (peroxidáz ciklus) tud natív állapotába visszatérni. Utóbbi esetben a Compound II ($Fe^{4+}-OH$) állapot is közbeiktatásra kerül⁽⁴⁶⁾ (**4. ábra**). Mivel a halogenizációs ciklus két-elektronos oxidációja során - a kevésbé reaktív, thiol oxidációban részt vevő - hipotiocianát ($HOSCN$)⁽⁴⁷⁾ és kis mennyiségű hipobromosav ($HOBr$) mellett *in vivo* leginkább, kísérleti körülményeink között pedig kizárólag a nagy reaktivitású $HOCl$ keletkezik, ezért a továbbiakban az MPO ezen aktivitására, mint *klorinációs aktivitásra* hivatkozunk. A *peroxidáz aktivitás* működése során reaktív nitrogén intermedierek (nitrozónium ion (NO^+), nitrit, NO_2), tirozil-gyök és ditirozin keletkeznek.



4. ábra A mieloperoxidáz enzim (MPO) klorinációs (fent) és peroxidáz (lent) aktivitása (magyarázat a szövegben)

Az MPO működése az MPO-inhibitor (MPO-I) 4-aminobenzhidrazid (ABAH) segítségével gátolható. Az ABAH az MPO Compound I és II által oxidálódik, és a képződő

gyökök az enzimet a klorinációs és peroxidáz cikluson kívül álló, lassú turnover-rel rendelkező Compund III-ba taszítják, így mindkét említett aktivitás gátlódik⁽⁴⁵⁾.

2.2.2 Az MPO jelentősége kardiovaszkuláris megbetegedésekben

Ismert, hogy a teljes, vagy részleges MPO deficienciával élő személyek (2000-4000 kaukázusi emberből 1) között kisebb a CV megbetegedések előfordulásának valószínűsége⁽⁴⁴⁾. Az MPO génjében több nukleotid polimorfizmust is kimutattak, melyek hatással lehetnek az MPO koncentrációjára és aktivitására (-463G/A: GG - magasabb MPO mRNS és fehérjeszint, -129G/A: A allél - csökkent MPO szérumszint). Emellett a MPO enzim szintje a kor előrehaladtával nő, valamint nőkben magasabb, mint férfiakban⁽⁴⁸⁾.

A közelmúlt kutatásai alapján az MPO ígéretes biomarker a CV megbetegedésekben. Összefüggést mutattak ki az MPO plazmaszintje és a MI mortalitása között⁽⁴⁹⁾, a MPO-t ezen kívül gyulladáshoz biomarkerként azonosították iszkémiás szívbetegségben és akut koronária szindrómában (ACS) is⁽⁵⁰⁾. Az MPO a nitrogén-monoxid felhasználásával csökkenti a vazodilatációt⁽⁵¹⁾, jelenléte pedig kimutatható az ateroszklerotikus plakkban is, ahol képes oxidálni az LDL-t⁽⁵²⁾. Az MPO plazmakoncentrációja nem különbözik iszkémiás és non-iszkémiás kardiomiopátiában, ami az enzim független szerepére utal a BK diszfunkció kialakulásában⁽⁵³⁾. Mindezek alapján a MPO gátlása ígéretes terápiás célpont lehet az infarktusért felelős ér megnyitása során bekövetkező reperfüziós károsodás kivédésében és/vagy csökkentésében.

2.2.3 A mieloperoxidáz fő effektora, a hipoklórossav (HOCl)

MPO hatására H_2O_2 és kloridion reakciója során nagy reaktivitású HOCl keletkezik. A MPO klorinációs aktivitása során képződő HOCl erős oxidálószerként ismert, emellett gyenge sav, fiziológiás pH-n a konjugált bázisával, a hipoklorit-anionnal (OCl^-) egyenlő arányban van jelen⁽⁴⁸⁾. Rövid életideje ellenére a HOCl-t nagy reaktivitása és széles célspektruma a leukociták legerősebb oxidánsává teszi, membránpermeabilis molekulaként az intracelluláris célpontokat is eléri. Az MPO által generált HOCl koncentrációja mikromólos nagyságrendű⁽⁵⁴⁾, azonban gyulladáshoz szövetben millimólos értéket is elérhet⁽⁵⁵⁾. Antimikrobiális hatása mellett a szervezet fehérje-, lipid- és DNS-szerkezetét is képes károsítani. A HOCl nukleotidokkal történő reakciója kloraminok ($RNHCl$, $RR'NCl$) képződéséhez⁽⁵⁶⁾, ezáltal a kettősszalú DNS disszociációjához vezethet⁽⁵⁷⁾. Telítetlen

zsírsavakkal és koleszterinnel klorhidrineket képezve képes a membránstruktúrák stabilitását csökkenteni⁽³¹⁾.

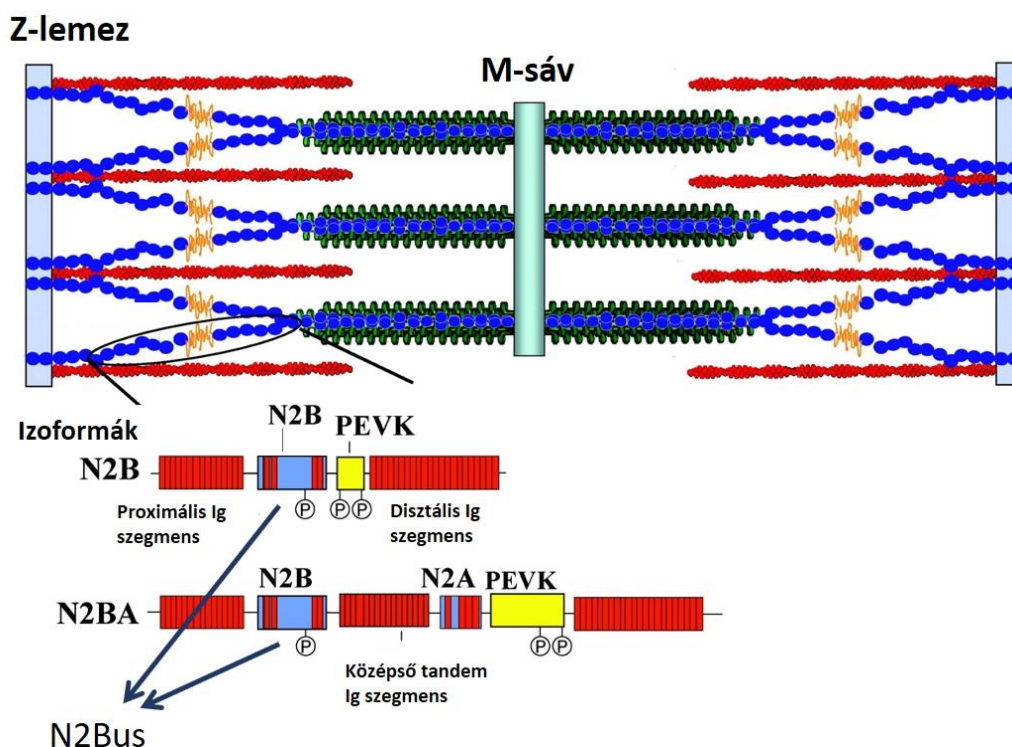
A HOCl a fehérjék aminosav-oldalláncaival nagyfokú reaktivitást mutat, a következő sorrendben: Met > Cis >> His ~ α -aminosavak > Trp > Lys >> Tyr ~ Arg > Gln ~ Asn⁽⁵⁸⁾. Emellett kimutatták, hogy a nem csak a HOCl közvetlenül, hanem a hatására képződő kloraminok (Lys, His) is képesek oxidálni az aminosavakat⁽⁵⁷⁾. A HOCl által kiváltott fehérje poszttranszlációs módosítások magukba foglalják a Cis aminosavakból szulfenil-klorid intermedieren keresztül létrehozott diszulfidok képződését⁽³¹⁾, valamint a kloraminok aldehiddé alakulásakor létrejövő karbonil-csoportok keletkezését is⁽⁵⁹⁾. Tyr aminosavat klorinálva 3-klorotirozint hoz létre, amely a HOCl-okozta oxidatív fehérjekárosodás specifikus markere⁽⁶⁰⁾. Metioninnal szembeni nagy reaktivitása miatt az aminosav, mint HOCl-scavenger és endogén antioxidáns ismert⁽³²⁾.

2.3 A titin óriásfehérje szerepe a szarkomerben

A titin a szarkomer legnagyobb fehérjéje, molekuláris rugóként működve felelős a szívizomsejt kalcium független passzív erejének ($F_{\text{passzív}}$) kialakításáért. A titin a fél szarkomeren végighúzódik, a Z lemeztől az M sávig terjed, biztosítja a szarkomer magas fokú rendezettségét⁽⁶¹⁾. Az óriásfehérje több miofilamentális és regulatórikus fehérjével áll kapcsolatban, részt vesz jelátviteli folyamatokban, mechanoszenzorként érzéklni képes a diasztolés megnyúlás és a szisztolés kontrakció alatt bekövetkező erőváltozásokat⁽⁶²⁾. Szerepe van a korai diasztolés visszarendeződésben, valamint a Frank-Starling mechanizmusra jellemző hosszfüggő aktivációban⁽⁶³⁾.

Emlős szívizomban a titin két izoformája található meg: a hosszabb és rugalmasabb N2BA (~3,2-3,7 MDa) és a rövidebb és merevebb N2B (~3 MDa)⁽⁶⁴⁾, melyek aránya egészséges humán szívizomzatban 35:65-re tehető. Rágcsálószívben ugyanakkor szinte kizárólag a rövidebb és merevebb N2B izoforma fordul elő. A titin fehérje nyújthatóságáért a szarkomer I sávjában található, ~1 MDa-os szakasz a felelős, amely a proximális és disztális immunglobulinszerű (Ig) doméneket, a PEVK (prolinban, glutaminsavban, valinban és lizinben gazdag) régiót, valamint az N2B elemet tartalmazza. Az N2BA izoforma N2A elemet is tartalmaz, ezen kívül egy további, ún. középső Ig doménnel és változó hosszúságú PEVK régióval rendelkezik, melyek biztosítják ezen izoforma magasabb fokú rugalmasságát⁽⁶³⁾ (**5.ábra**).

Az N2BA és N2B titin izoformák arányának megváltozása (titin izoforma váltás) hatással van a szívműködés passzív feszülésére. Dilatatív kardiomiopátiában az N2BA/N2B arány növekedését és csökkent $F_{\text{passzív}}$ -t figyeltek meg⁽⁶⁵⁾. Ugyanakkor magas frekvenciájú kamrai ingerléssel indukált szívelégtelenség kutyamodellben az N2B izoforma emelkedett expressziója megnövekedett titin függő szívműködés feszüléssel társult⁽⁶⁶⁾. A titin merevségét poszttranszlációs módosítások is befolyásolják, ugyanis a fehérje a szívműködés passzív feszülését befolyásoló foszforilációs helyekkel rendelkezik (protein-kináz A, G, $C\alpha$ (PKA, PKG, PKC α)⁽⁶⁷⁾, Ca^{2+} /kalmodulin függő protein kináz II (CaMKII)⁽⁶⁸⁾). A HFpEF-ben szenvedő betegek szívéből származó membránfosztott szívműködés emelkedett $F_{\text{passzív}}$ jellemzi, háttérben eddig a titin fehérje N2B régiójában található N2B unique sequence (N2Bus) csökkent PKA, valamint PKG általi foszforilációját igazolták^(64, 69, 70). A kísérletek során PKA és PKG kezelés csökkentette az $F_{\text{passzív}}$ -t. Ezzel szemben a PKC α a PEVK régiót foszforilálva emeli a titin merevségét, ezáltal a szívműködés $F_{\text{passzív}}$ -t⁽⁷¹⁾. A titint érő oxidatív károsodások is fontos szerepet játszhatnak az $F_{\text{passzív}}$ szabályozásában: a N2Bus régióban oxidáció hatására létrejövő diszulfid hidak növelik a szívműködés passzív feszülését⁽⁷²⁾.



5. ábra A titin fehérje szerkezete. (Magyarázat a szövegben. Ig – immunoglobulin-szerű domén, PEVK - prolinban, glutaminsavban, valinban és lizinben gazdag régió, N2Bus – N2B unique sequence régió) *LeWinter, Circulation, 2010 alapján*

2.4 A női nem és a stressz szerepe kardiovaszkuláris megbetegedésekben

2.4.1 *A női nemi hormonok védő szerepe*

A *nem* fontos szereppel bír a CV megbetegedések kialakulásában, az alkalmazott terápia hatékonyságában, valamint a mortalitásban egyaránt⁽⁷³⁾. Számos tanulmányban igazolták, hogy a menopauza előtt álló nők esetében kisebb a CV megbetegedések kialakulásának valószínűsége a menopauzán átesett nőkhöz, valamint a férfiakhoz viszonyítva. Nőkben az iszkémiás szívbetegség kialakulása 10-15 évvel későbbre tehető a kedvezőbb lipid profilnak köszönhetően⁽⁷⁴⁾. Menopauza előtti nőknél kisebb a BK hipertrófia és remodelling incidenciája, valamint az I/R károsodás mértéke⁽⁷⁵⁾. A HFpEF előfordulása gyakoribb idős nők esetében, melyhez hozzájárul az obezitás és a diabetes mellitus (DM) magasabb prevalenciája, valamint a női szívizomzat emelkedett intrinsic feszülése is⁽⁷⁶⁾. Ezen megfigyelések a női nemi hormonok (ösztrogén és progeszteron) kardioprotektív hatását valószínűsítik, azonban a hormonpótló terápia (HRT) - habár kísérletes körülmények között pozitív eredményeket mutatott - klinikai alkalmazás során mégsem javította a kimenetelt, sőt növelte a CV rizikót⁽⁷⁴⁾.

2.4.1.1 Az ösztrogén szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben

Az ösztrogén egy szteroidhormon, mely hatását magreceptorain (ER α és ER β), valamint membránreceptorán (GPR30) keresztül fejt ki, ezáltal egyes gének transzkripciójának szabályozása mellett gyors, nongenomikus sejtválaszokat is indukálhat⁽⁷⁷⁾. Az ösztrogénreceptorok nőkben és férfiakban egyaránt kimutathatóak szívizomsejtekben, fibroblasztokban, endotél- és érfal simaizom sejtekben⁽⁷⁶⁾. Sőt, az ösztrogén androgénből aromatáz enzim segítségével végbemenő lokális konverzióját is megfigyelték zsírszövetben⁽⁷³⁾. Az ösztrogénreceptorok upregulációját mutatták ki hipertrófiában és szívelégtelenségben, míg ER β knock-out egéren megnövekedett BK hipertrófiát és fibrózist⁽⁷⁶⁾, valamint nagyobb I/R károsodást és nekrozist észleltek⁽⁷⁵⁾.

Az ösztrogén stimulálja az angiotenzinogén szintézisét, azonban a renin elválasztást, az ACE aktivitást, az AT1-es angiotenzin receptorok denzitását és az aldoszteron termelődést csökkenti, így a renin-angiotenzin rendszerre (RAAS) gátló hatást kifejtve csökkenti a vérnyomást⁽⁷⁸⁾. Emellett a NOS expresszióját és aktivitását génszinten és citoplazmatikus kontrollal befolyásolva elősegíti az NO mediált vazodilatációt⁽⁷⁹⁾, valamint I/R károsodás során az L-típusú Ca²⁺ csatornákat S-nitrozilálva csökkenti a sejtek

Ca²⁺ túltöltődését⁽⁷³⁾. Anti-inflammatórikus és antioxidáns hatása a ROS termelődés és az apoptózis csökkentésében és a hősokk válasz kialakulásának elősegítésében nyilvánul meg^(80, 81).

2.4.1.2 A progeszteron hatásai a kardiovaszkuláris rendszerben

A progeszteron a petefészek által termelt mennyiséggel azonos, vagy azt meghaladó szinten termelődik a mellékvesében is⁽⁸²⁾. Stressz állapotokban - lévén a kortizol prekursora⁽⁸³⁾ - a mellékvese progeszteron termelése és szekréciója nemtől és ösztrogéntől függetlenül emelkedik⁽⁸⁴⁾ adrenokortikotróp hormon (ACTH) stimuláció hatására⁽⁸⁵⁾. A progeszteron genomikus és non-genomikus válaszokat aktivál magreceptorokon (PR-A és PR-B) és membránkött receptorokon keresztül (mPR α - ϵ). Előbbi esetben receptorai nukleáris transzkripciós faktorként működve progeszteron rezponzív elemekhez kötődve szabályozzák a target gének transzkripcióját, ami egy lassabb progeszteron választ eredményez. Bebizonyosodott azonban, hogy a progeszteron membránkött receptorokon keresztül számos szignáltranszdukciós útvonalat aktiválva (PKA, PKG, PKC, ERK) is képes hatásait közvetíteni. Ez utóbbira mint non-genomikus válaszra hivatkozunk, azonban meg kell jegyezni, hogy ezen citoplazmatikus útvonalak gyors aktiválódása mind transzkripció függő, mind pedig transzkripció független hatásokat is eredményezhet^(86, 87).

A progeszteron a gyulladásos reakció gátlása révén csökkenti az I/R-s károsodás mértékét⁽⁸⁸⁾, emellett a repolarizáció felgyorsításával antiarritmiás hatást is kifejt⁽⁸⁹⁾. Képes gátolni az szívizomsejtek apoptózisát⁽⁹⁰⁾, érfal simaizom sejteken antiproliferatív hatást közvetít⁽⁹¹⁾. Normotenzív és hipertenzív betegekben NOS aktivációt követően az NO szint emelésével vazodilatációt okoz, így csökkenti a vérnyomást⁽⁸⁷⁾.

2.4.2 A stressz szerepe a kardiovaszkuláris kórképekben

Az ismert CV rizikófaktorok - mint a dohányzás és az egészségtelen táplálkozás - mellett a pszichoszociális stressz is káros hatást gyakorol a CV rendszerre. Ennek egyik megnyilvánulása a Takotsubo kardiomiopátia (TCM, stressz kardiomiopátia, „broken heart” szindróma), mely elsősorban menopauzán átesett nőknél alakul ki, nagyfokú emocionális vagy fizikai stresszhelyzetet követően⁽⁹²⁾. TCM-ban a katekolamin szint ugrásszerű emelkedése után a BK apikális hipokinézise és ballonszerű tágulata jön létre⁽⁹³⁾, melynek hátterében a β 2-adrenerg receptorok Gs-ről Gi fehérjére történő

átkapcsolódását⁽⁹⁴⁾ és az ennek hatására bekövetkező szívizomsejt kontraktilitás csökkenést valószínűsítik. A betegség prognózisa jó, a falmozgászavar az esetek többségében néhány nap vagy hét alatt eltűnik⁽⁹⁵⁾, azonban 4-5%-os akut mortalitás jellemzi a kórképet⁽⁹⁶⁾.

A szervezet stresszválasza a hipotalamusz-adenohipofízis-glükokortikoid (HPA) - tengelyen keresztül valósul meg. Időben először a mellékvesevelő katekolaminszekréciója és a szimpatikus idegrendszer aktivációja következik be, majd a szervezetet érő stressz hatására hipotalamusz két neurohormonja a kortikotropin felszabadító hormon (CRH) és az antidiuretikus hormon (ADH) növeli az adenohipofízis ACTH elválasztását, amit percek alatt glükokortikoid szekréció követ, melynek hatásai órák múlva jelentkeznek. Glükokortikoidok hatására a CV rendszer válaszkészsége a szimpatikus aktiválással szemben fokozódik⁽⁹⁷⁾. A szimpatikus idegrendszer aktiválódása a β -adrenerg jelátvitelen keresztül központi szerepet játszik a szívizomsejtek kontraktilis funkciójának és Ca^{2+} érzékenységének szabályozásában. A kontraktilis fehérjék (miozinkötő C-fehérje (MyBP-C), troponin-I (TnI), titin) PKA-mediált foszforilációja befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis működését⁽⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾.

3 Célkitűzések

1. A miokardiális infarktus és az iszkémia/reperfúziós károsodás kialakulásában szerepet játszó mieloperoxidáz enzim (MPO) hatásmechanizmusának vizsgálata

In vitro modellrendszerben, humán bal kamrai szívizomminták felhasználásával célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk

- a MPO és szubsztrátjának, a hidrogén peroxidnak hatásait membránfosztott szívizomsejtek kontraktilis funkciójára
- a MPO peroxidáz és klorinációs aktivitásának következtében létrejövő oxidatív miofilamentáris fehérjemódosulásokat (szulhidril (SH)-csoport oxidáció és karboniláció)
- a MPO-indukált funkcionális hatások és biokémiai változások revertálhatóságát, illetve kivédhetőségét (MPO-I, Met, DTT).

2. Stressz és az ovariectómia hatásainak vizsgálata a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára

Nőstény, valamint ovariectomizált nőstény patkánymodellben annak vizsgálata, hogy

- a női nemi hormonok hiánya és az akut stressz hatással van-e a bal kamrai izolált szívizomsejtek erőgenerálására
- milyen poszttranszlációs miofilamentáris fehérjemódosulások magyarázhatják a szívizomsejtek kontraktilis funkciójában bekövetkező változásokat

4 Anyagok és módszerek

4.1 Szívizom minták

4.1.1 *Humán bal kamrai szívizom minták*

A bal kamrai szívizom minták négy, technikai okok miatt fel nem használt humán donor szívből származtak (egy 41 és egy 46 éves nő, valamint egy 53 és egy 56 éves férfi). A donorok kórtörténetében CV megbetegedés nem szerepelt, a halál oka baleset, szubarachnoidális vérzés, agyi kontúzió és vérzéses stroke volt. A betegek az agyhalál megállapítása előtt rövid ideig intravénás dobutamin, furosemid és plazmatérfogat növelő kezeléssel kívül más gyógyszeres terápiában nem részesültek. A szívek eltávolítást követően kardioplégias oldatba (110 mM NaCl, 16 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 1,2 mM CaCl₂, 5 mM NaHCO₃, pH 7,4) kerültek, majd folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztás után felhasználásig -80°C-on tároltuk őket. A humán szívizom mintákon végzett kísérleteink a Helsinki Deklarációban megfogalmazott irányelveknek megfelelően, a Magyar Egészségügyi Minisztérium (engedély szám: No. 323-8/2005-1018EKU) és a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek.

4.1.2 *Akut stressz és ovariectomia patkánymodellben*

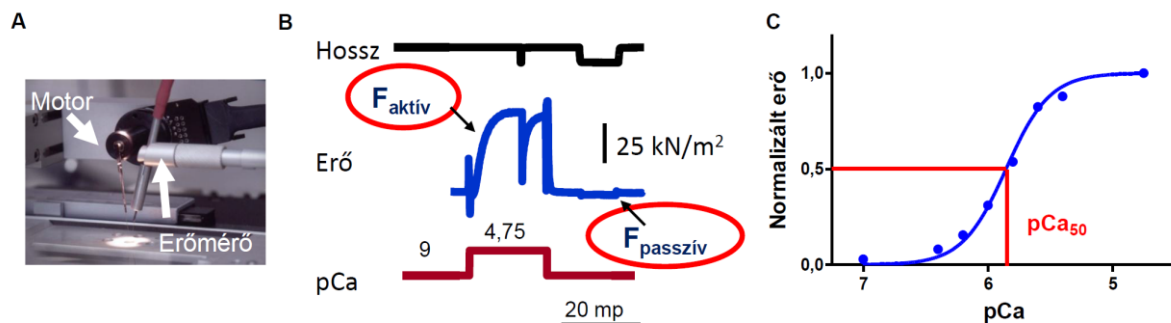
Az állatmodellt az eszéki J. J. Strossmayer Egyetem Orvostudományi Karának Orvosi Biológia Intézetében hozták létre 2013 júniusa és szeptembere között, 32 nőtény Sprague-Dawley patkány bevonásával. Az állatok fele (n=16) ovariectomián (OVX) esett át 12 hetes korban. Az operáció a HUS-QREC-PRD-932 (Issue: 01, Revision 03) protokoll szerint történt, melynek során az elaltatott állatokból eltávolításra kerültek az ováriumok és a petevezetékek egy része. Kontrollként a fennmaradó 16, életkorban megegyező, nem operált nőtény patkány szolgált (kontroll). Az állatokat normál ketrecekben, szobahőmérsékleten, természetes nap-éj ciklusok mellett tartották, számukra a standard laboratóriumi táplálék, valamint víz szabadon elérhető volt. 28 hetes korban 8 kontroll és 8 OVX állatot akut stressz kezelésnek vetettek alá (kontroll-S és OVX-S csoport). A stressz protokoll során az állatokat egy 4°C-os szobában egy olyan átmérőjű fémhengerbe zárták, mely korlátozta őket szabad mozgásukban (cold restrained stress). Az egy óra leteltével az állatokat azonnal kombinált isofluran (Forane[®], Abbott Laboratories Ltd, Queenborough,

Egyesült Királyság) inhaláció és intramuszkuláris ketamin (Ketanest[®]S, Pfizer Corporation, Bécs, Ausztria, 30 mg/ttkg) injekció felhasználásával elaltatták. Vértételt követően számos szervet, köztük a szívet is kimetszték, a bal kamrát leválasztották, folyékony nitrogénbe helyezték, majd -80 °C-on tárolták. A kísérleti protokollt az Eszéki Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. A minták szállítása az Eszéki Orvostudományi Egyetem és a Debreceni Egyetem között meglévő mintaszállítási egyezmény alapján történt (DETTI/22-3/2013).

4.2 Izometriás erő mérése membránfosztott, bal kamrai szívizomsejt preparátumokon

Az izometriás erőmérő rendszer segítségével mind a humán, mind pedig a patkány bal kamrai szívizomsejtek erőgenerálási paramétereit vizsgáltuk, a szívizomsejtek izolálását mindkét esetben azonos módon végeztük. Ennek során a fagyasztott bal kamrai szívizom minták megfelelő méretű darabjait felolvasztottuk, majd proteáz inhibitorokat (0,5 mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF), 10 µM E-64, 40 µM leupeptin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) tartalmazó izoláló oldatban (100 mM KCl, 2 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 1 mM MgCl₂, 4 mM Na₂ATP, 10 mM imidazol; pH 7,0) mechanikai szövethomogenizátor (potter) segítségével megtörtük. Ezt követően 0,5%-os Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) detergenssel kiegészített izoláló oldat segítségével permeabilizáltuk a szívizomsejteket. Az izoláló oldattal történő három mosási lépést követően az izolált szívizomsejteket jégen tartottuk a mérések kivitelezéséig. Az erőmérések során a membránfosztott szívizomsejtek végeit két rovartű, valamint szilikon ragasztó (DAP, Baltimore, MD, USA) segítségével egy érzékeny erőmérőhöz (Sensonor, Horten, Norvégia) és egy mozgatható elektromágneses motorhoz (Aurora Scientific Inc., Aurora, Kanada) rögzítettük (**6. ábra**). A méréseket az erőmérő rendszerhez kapcsolt, kamerával ellátott fénymikroszkóp 15°C-os tárgyasztalán végeztük. A szívizomsejtek mechanikai paramétereinek meghatározása előtt a preparátumok átlagos szarkomer hosszát 2,3 µm-re állítottuk be. A vizsgált erőparaméterek meghatározásához aktiváló (37,34 mM KCl, 10 mM BES, 6,24 mM MgCl₂, 7 mM CaEGTA, 6,99 mM Na₂ATP, 15 mM Na₂CrP, 40 µM leupeptin, 10 µM E64; pH 7,2), illetve relaxáló (37,11 mM KCl, 10 mM BES, 6,41 mM MgCl₂, 7 mM EGTA, 6,94 mM Na₂ATP, 15 mM Na₂CrP, 40 µM leupeptin, 10 µM E64; pH 7,2) oldatokat készítettünk, melyek pCa értéke (a Ca²⁺ koncentráció negatív tízes alapú logaritmus (-log₁₀[Ca²⁺])) 4,5, illetve 9 volt. A köztes Ca²⁺ koncentrációjú oldatokat az aktiváló és relaxáló oldatok megfelelő arányú elegyítésével hoztuk létre a Fabiato és

Fabiato által kidolgozott módszer alapján⁽¹⁰¹⁾. Az izometriás erőt a szívizomsejtek relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő mozgásával mértük. Az erő kifejlődése után a motor segítségével a preparátum hosszát az eredeti hossz 80%-ára (20%-kal) csökkentettük, majd 2 ms múlva visszaállítottuk az eredeti sejthosszát („release-retch”). Ezen manőver során a képződött aktin-miozin keresztkötések felszakadtak, az erő a maximális értékről nullára esett (totál erő ($F_{\text{totál}}$)), majd a jelenlévő Ca^{2+} jelenlétében újraépült. A Ca^{2+} -független, passzív erőkomponenst ($F_{\text{passzív}}$) relaxáló oldatban hasonló, de hosszabb (8 s) manőver alkalmazásával határoztuk meg. Az $F_{\text{totál}}$ -ból kivonva az $F_{\text{passzív}}$ -ot kiszámítható a szívizomsejt Ca^{2+} -függő aktív ereje ($F_{\text{aktív}}$). Az $F_{\text{aktív}}$ és $F_{\text{passzív}}$ értékek a preparátum keresztmetszetére normalizálva, kN/m^2 -ben is megadhatóak. Ha a szubmaximális Ca^{2+} koncentrációjú oldatokban mért $F_{\text{aktív}}$ -ot az aktiváló oldatban (pCa 4,75) kapott erőértékhez viszonyítva ábrázoljuk, egy szigmoid görbét kapunk. A görbe illesztésével meghatározható a Ca^{2+} érzékenység, melyet a fél maximális erő létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} koncentrációval jellemezhetünk (pCa₅₀). Minden egyes szívizomsejt-mérés eredményét individuálisan illesztettük. Az illesztéshez a következő módosított Hill egyenletet használtuk: $F = F_{\text{max}}[\text{Ca}^{2+}]^{\text{nHill}} / (\text{pCa}_{50}^{\text{nHill}} + [\text{Ca}^{2+}]^{\text{nHill}}) + F_{\text{passzív}}$, ahol F egy adott Ca^{2+} koncentrációhoz tartozó „steady-state” erő, F_{max} a maximális erő, nHill konstans és pCa₅₀ megfelel annak a $[\text{Ca}^{2+}]$ -nak, ahol $F_{\text{totál}} - F_{\text{passzív}} = F_{\text{max}}/2$.



6. ábra: Membránfosztott szívizomsejtek kontraktilis erejének mérése. Az izometriás erőmérő rendszer központi része, bal oldalon a mozgatható elektromágneses motor, jobb oldalon az érzékeny erőmérő (A). Kalciumfüggő aktív erő ($F_{\text{aktív}}$) és kalcium független passzív erő ($F_{\text{passzív}}$) meghatározása (B). A kalcium érzékenységet jellemző pCa₅₀ paraméter meghatározása a szívizomsejtek normalizált erő – kalcium összefüggését ábrázoló szigmoid görbe segítségével (C).

A különböző Ca^{2+} koncentrációjú oldatokkal végzett mérések után újra meghatároztuk a maximális $F_{\text{aktív}}$ -ot (pCa 4,75). Azokon a sejteken, amelyek maximális Ca^{2+} függő erőgenerálása nem érte el a mérés kezdetén kapott érték 80%-át további

méréseket nem végeztünk, az addig kapott értékeket az eredmények értékelésénél nem vettük figyelembe.

4.2.1 A mieloperoxidáz enzim humán szívizomsejtek erőgenerálására kifejtett hatásának vizsgálata

Az MPO funkcionális hatásának tanulmányozását humán bal kamrai szívizomsejteken végeztük. Meghatároztuk az $F_{\text{aktív}}$ -ot, az $F_{\text{passzív}}$ -ot, valamint pCa_{50} -et az MPO-szubsztrát H_2O_2 (30 μ M, 15 perc, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), MPO+ H_2O_2 (MPO: 8 U/l, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), MPO+ H_2O_2 +MPO-I (4-aminobenzhidrazid, 50 μ M, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) és MPO+ H_2O_2 +Met (10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kezelések előtt, illetve azokat követően. Az MPO+ H_2O_2 által kiváltott hatások revertálhatóságát a redukálószer dithiotreitol (DTT, 10 mM, 30 perc, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) alkalmazásával vizsgáltuk. A különböző kezelések $F_{\text{aktív}}$ -ra és $F_{\text{passzív}}$ -ra kifejtett hatásait a kezelés előtt mért (kezeletlen) értékekhez viszonyítva, százalékos formában adtuk meg. A kapott értékeket az izoláló oldatban inkubált (15 perc) szívizomsejtek erőgenerálásához viszonyítottuk (idő kontroll). Az egyes kezelések során 3-4 szívből származó 5-12 szívizomsejtet használtunk.

4.2.2 Az akut stressz és az ovariectomia hatása a szívizomsejtek erőgenerálására

Az akut stressz és az ovariectomia szívizomsejt funkcióra kifejtett hatásainak vizsgálatakor - a humán szívizomzaton folytatott kísérletekhez hasonlóan- az $F_{\text{aktív}}$ -ot, az $F_{\text{passzív}}$ -ot, valamint a pCa_{50} -et mértük a kontroll, stressznek kitett kontroll (kontroll-S), ovariectomizált (OVX) és stressznek kitett ovariectomizált (OVX-S) állatcsoportokban. Csoportonként 10-10 szívizomsejt került vizsgálatra.

4.3 MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérése

Az MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérését speciális, kereskedelmi forgalomban elérhető kitek segítségével végeztük (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). A klorinációs aktivitást mérő esszé működése során az MPO által generált hipoklorit (OCl^-) alakítja át a non-fluoreszcens szubsztrátot (APF, 2-(6-(4-aminofenoxi)-3-

oxo-3H-xanthén-9-yl) benzoésav) erős fluoreszcenciával rendelkező fluoreszcenciáé, míg a peroxidáz aktivitást mérő esszé esetén az MPO a nonfluoreszcens ADHP-t (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) fluoreszcens resorufinná alakítja. A keletkező fluoreszcencia intenzitás-növekedést NovoStar Microplate Readerrel (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) különböző hullámhosszon detektáltuk (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 520 nm a klorinációs, valamint λ_{ex} 544 nm, λ_{em} 590 nm a peroxidáz esszé esetében). A reakcióelegy non-fluoreszcens szubsztrátból (18 μ M APF, vagy 45 μ M ADHP), esszé pufferből (foszfát puffer (PBS), pH 7,4), valamint 30 μ M H₂O₂, 38 U/l MPO+H₂O₂, MPO+H₂O₂+50 μ M MPO-I, vagy MPO+H₂O₂+10 mM Met tartalmú oldatból állt. Az aktivitásokat 5 percen keresztül, 24 másodperces intervallumokban mértük. A fluoreszcencia intenzitás értékeit a telítést megelőzően lineáris regresszióval illesztettük, a függvény meredeksége szolgált az MPO aktivitásának meghatározására. Az MPO hiányában mért értéket háttérnek tekintettük, az enzimaktivitást erre normalizáltuk. Későbbiekben az MPO+H₂O₂ aktivitás értékeit tekintettük 100%-nak, ehhez hasonlítottuk az MPO-I, valamint a Met hatását.

4.4 Szérum ösztrogén, progeszteron, glükóz és koleszterin szint meghatározása

Az ovariektómizált patkánymodellben a szérum ösztadiol és progeszteron szintek meghatározása kompetitív elven működő kemilumineszcens immunoesszé (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) segítségével történt. Az ösztadiol mérés során mesterolon hatására a mintából felszabaduló endogén ösztadiol verseng a biotinált antitesteken lévő kötőhelyekért a hozzáadott, ruténium-komplexszel jelölt ösztadiol-származékkal (mérési tartomány 4,9 pg/ml-4,3 ng/ml). A szérum progeszteron szint mérése során az endogén progeszteron danazol hatására szabadul fel és verseng a biotinált antitest kötőhelyeiért a hozzáadott ruténium-komplexszel jelölt, progeszteron-származékkal (mérési tartomány 29,9 pg/ml - 60,1 ng/ml).

A szérum glükóz szint mérése enzimatis, fotometrikus módszerrel történt (Roche Diagnostics GmbH). Ennek során glükóz-6-foszfát, majd glukonát-6 foszfát jött létre ATP és hexokináz, valamint NADP felhasználásával. A reakció során NADPH képződik, melynek sebessége arányos a glükóz koncentrációval és fotometriásan detektálható.

A szérum koleszterol meghatározása enzimatis, kolorimetriás módszerrel történt (Roche Diagnostics GmbH). A koleszterol, koleszterol-oxidáz által történő oxidációja során keletkező H₂O₂ hatására 4-aminofenazonból és fenolból vörös quinoneimin festék keletkezik, melynek intenzitása arányos a szérum koleszterol koncentrációjával.

4.5 Fehérje SH-oxidáció, karboniláció és foszforiláció meghatározására

4.5.1 *A miofilamentális fehérjék SH tartalmának meghatározása Ellman reakcióval*

Az MPO hatására a miofilamentális fehérjerendszeren bekövetkező SH-oxidációt Ellman reakció segítségével vizsgáltuk. A membránfosztott bal kamrai, humán szívizomsejteket 15 percen keresztül izoláló oldatban (Iso) inkubáltuk (idő kontroll), vagy 30 μM H_2O_2 -t, illetve 38 U/l MPO+ H_2O_2 -t tartalmazó Iso-val kezeltük. Mosási lépéseket követően a mintákat 15 percig Ellman reagensben (5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoésav), DTNB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) inkubáltuk, amely a fehérjék SH csoportjával reagálva a sárga színű 2-nitro-5-tiobenzoesavat (NTB) hoz létre. Az NTB abszorbanciáját NovoStar Microplate Readerrel mértük 412 nm-en. Az ismert SH tartalmú N-acetil-L-ciszteín (NAC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) standard sor Ellman reagenssel történő inkubáció után mért abszorbancia értékeit használtuk kalibrációs görbeként (exponenciális illesztés). A minták SH tartalmát 1 mg liofilizált szívizom homogenizátumra vonatkoztatva adtuk meg, 100%-nak tekintve az idő kontroll (Iso) minták SH-tartalmát. A méréseket minden minta esetében háromszor ismételtük.

4.5.2 *Fehérje oxidáció meghatározása SH-csoport biotinálási módszerrel*

Az SH-biotinálás során egy 25 mg tömegű bal kamrai humán szívizom mintából membránfosztott szívizomsejteket izoláltunk, majd az egyes mintákat 150 μl térfogatban kezeltünk 30 μM H_2O_2 -ot vagy 38 U/L MPO+ H_2O_2 -ot tartalmazó izoláló oldatban 15 percen keresztül. Pozitív kontrollként az oxidáló szer dithiodipiridinnel (DTDP, 2,5 mM, 2 perc) kezelt minták szolgáltak. A miofilamentális fehérjék SH csoportjait biotinnal jelöltük (EZ-Link Iodoacetyl-LC-Biotin, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A jelölés 60 percig, szobahőmérsékleten, sötétben zajlott, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3) és 0,1 mg/ml biotin tartalmú reakció pufferben a gyártó utasítása alapján. (A biotint ezt megelőzően dimetilformamidban (DMF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldottuk fel, és reakció pufferben hígítottuk 0,1 mg/ml koncentrációjúra). A biotinos jelölést és mosást követően a mintákat mintapufferben (8 M urea, 2 M thiourea, 3% nátrium-dodecilszulfát (SDS), 75 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, brómfenolkék, 10 μM E-64 és 40 μM leupeptin) szolubilizáltuk 1 órán át, folyamatos rázatás mellett.

Centrifugálást követően (16000 g 5 percig) a fehérjekoncentrációt a felülúszóból dot-blot módszerrel határoztuk meg (standardként marha szérum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) szolgált), majd a homogenizátum fehérje koncentrációját 1 mg/ml-re állítottuk be. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) során a miofilamentális fehérjék méret szerinti elválasztásához 0,5% agarózzal erősített 2 és 4%-os, valamint 10%-os és 15%-os poliakrilamid géleket, ezen kívül 4-15%-os gradiens géleket (BioRad, Hercules, CA, USA) használtunk. Nitrocellulóz membránra történő transzfert követően (TransBlot Turbo, BioRad) a fehérjemennyiséget fluoreszcens fehérje festékkel (Sypro Ruby Protein Blot Stain, Invitrogen, Eugene, OR, USA) határoztuk meg. A membránokat 10%-os, 0,1% Tween-20 tartalmú PBS-ben (PBST) oldott tejpórral blokkoltuk. A biotinnal jelölt SH csoportokat tormaperoxidázzal konjugált streptavidinnel (1:100000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) mutattuk ki, melynek végkoncentrációja 5 ng/ml volt. A streptavidinnel történt 30 perces inkubáció és a PBST-vel történő mosás után kapott jeleket felerősített kemilumineszcens módszer (ECL) segítségével tettük láthatóvá, azokat a fehérjemennyiségre normalizáltuk (**7. ábra**).

4.5.3 Fehérjék vizsgálata redukáló és nem redukáló oldatkörnyezetben

4.5.3.1 Fehérje-kereszthidak kialakulásának vizsgálata

A *Canton és munkatársai*⁽¹⁰²⁾ által leírt módszer alapján humán, BK-i szívizom mintákat H₂O₂ vagy MPO+H₂O₂ kezelést követően redukáló (1x Laemmli-féle mintapuffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, összetétel: 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -merkaptóetanol (β -ME), 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8), illetve nem redukáló (ugyanaz a puffer, de β -ME hozzáadása nélkül) körülmények között szolubilizáltuk. A fehérjéket 10%-os poliakrilamid gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása után a membránokat monoklonális tropomiozin ellenes (anti-Tm, CH1-es klón, 1:10000), vagy monoklonális aktin ellenes (anti-aktin, HHF35-ös klón, 1:1000, Dako Cytomation, Glostrup, Dánia) antitestekkel jelöltük. A jeleket tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel detektáltuk és ECL módszerrel tettük láthatóvá.

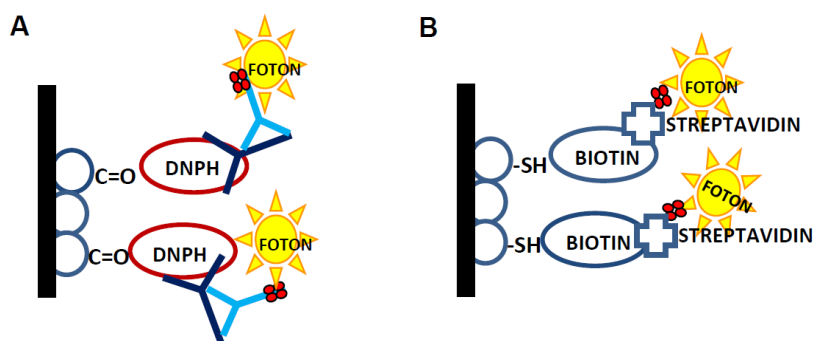
4.5.3.2 A titin óriásfehérje oxidációs állapotól függő oldhatóságának vizsgálata

Membránfosztott szívizomsejt izolálást követően a mintákat H_2O_2 , MPO, DTT kezelésnek vetettük alá a fentebb ismertetett módon. A titin oxidációs állapotól függő oldódásának pozitív kontrolljaként az SH-oxidálószer DTDP emelkedő koncentrációjú oldataiban inkubáltuk mintáinkat (0,125 μ M – 2,5 mM DTDP, 2 perc). Nem redukáló oldószerben (8 M urea, 3% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 μ M E-64 és 40 μ M leupeptin, 1 óra rázatás, centrifugálás 16000 g, 5 perc) történő denaturálással nyertük a kísérletek során felülúszónak nevezett frakciót. Ezt követően a nem-redukáló pufferben fel nem oldódott, visszamaradt pelletet feloldottuk redukáló pufferben (8 M urea, 2 M tiourea, 3% SDS, 75 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, brómfenolkék, 10 μ M E-64 és 40 μ M leupeptin, 1 óra vortex, 2 perc 99°C, centrifugálás). Utóbbira, azaz pellet feloldása során keletkezett fehérjeoldat felülúszójára kísérleteink során pellet néven hivatkozunk. Oldást követően a minták fehérjekoncentrációját 1 mg/ml-re állítottuk be dot-blot segítségével. (Ekkor már a nem redukáló pufferben oldott mintákat is redukáló pufferben hígítottuk, hogy biztosítsuk a titin gélbe való bejutását). A titin fehérje gélelektroforetikus vizsgálatára 0,5% agarózt tartalmazó 2%-os poliakrilamid géleket használtunk. Futtatást követően a fehérjéket Coomassie blue festékkel (Reanal, Budapest, Magyarország) festékkel vizualizáltuk, majd meghatároztuk a felülúszó/pellet arányt, azaz a nem redukáló, illetve redukáló környezetben feloldódott titin mennyiségét az egyes kezeléseket követően.

4.5.4 Fehérje karboniláció vizsgálata

A fentiekben ismertetett módszerrel humán, bal kamrai szívizom mintákat (15 mg) izoláltunk, majd azokat H_2O_2 és MPO kezelésnek vetettük alá. A fehérje karboniláció pozitív kontrolljaként 7 percen keresztül Fenton reagenssel (50 μ M $FeSO_4$, 6 mM aszkorbinsav és 1,5 mM H_2O_2) kezelt mintákat alkalmaztunk. A mintákat mosás után egy 8 M ureát, 3% SDS-t, 50 mM 6,8-as pH-val rendelkező Tris-HCl-t, 10 μ M E-64-t, valamint 40 μ M leupeptin-t tartalmazó mintapufferben oldottuk fel (1 óra vortex). Maximális fordulaton történő centrifugálást (16000 g, 5 perc) követően a felülúszót felhasználva elvégeztük a karbonil- csoportok derivatizálását. A karbonilcsoportok derivatizálásának alapja az, hogy a fehérjeoldathoz hozzáadott 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit, Millipore, Billerica, MA, USA) a fehérjék karbonil

csoportjaihoz kötődve 2,4-dinitrofenilhidrazont (DNPhidrazon) képez (7. ábra). A savas közegben zajló reakciót követően, centrifugálás (1000 g, 1 perc) után a titin fehérje esetében a pellet, míg kisebb molekulatömegű fehérjék esetében (15-300 kDa) a pellet és a felülúszó neutralizálására került sor. A neutralizálást lúgos pH-jú mintapufferben (8 M urea, 2 M tiourea, 3% SDS, 75 mM DTT, 0,05 M Tris-bázis (pH 14), 10% glicerol és brómfenolkék) 30 perces rázatás során végeztük. A derivatizált és neutralizált minták fehérjetartalmát centrifugálást (16000 g, 5 perc) követően dot-blot módszer segítségével, BSA standard mellett határoztuk meg, majd a fehérjekoncentrációt 1 mg/ml-re állítottuk be. A fehérjék elválasztására gélelektroforézist végeztünk 0,5%-os agarózzal megerősített 2 és 4%-os, valamint 10 és 15%-os poliakrilamid gélek, illetve 4-15%-os előgyártott gradiens gélek felhasználásával. A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk fél-száraz blottolási rendszer segítségével (TransBlot Turbo, BioRad, Hercules, CA, USA), majd a pontos fehérjemennyiséget Sypro Ruby fehérje blotfestékekkel határoztuk meg. A nem specifikus kötőhelyek blokkolására 2%-os, PBST-ben oldott BSA oldatot használtunk. Ezt követően a gyártó által előírt módon a derivatizált karbonil csoportokat felismerő elsődleges (nyúlban termeltetett anti-DNP antitest, 1:150 arányú hígítás 1%-os BSA/PBST oldatban, 1 órás inkubáció), valamint a tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestet (kecskében termeltetett nyúl ellenes IgG, 1:300 arányú hígítás 1%-os BSA/PBST oldatban, 1 órás inkubáció) alkalmaztuk. A karbonilált fehérjéket ECL módszerrel tettük láthatóvá. Az OxyBlot™ módszerrel meghatározott fehérje karbonilációt fehérjemennyiségre normalizáltuk, majd a karboniláció mértékét karbonilációs index formájában adtuk meg. (KI=1-nek tekintettük a 15 perces izoláló oldatos kezelésen átesett, ún. idő-kontroll minták karboniláltsági állapotát).



7. ábra: A fehérje karboniláció vizsgálata Oxyblot™ technikával (A) és az SH-oxidáció vizsgálata SH-csoport biotinálással (B). (C=O – karbonil csoport, DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazin, SH – szulfhidril csoport)

4.5.5 Szívizomfehérjék foszforilációs állapotának meghatározása

Kontroll és ovariektomizált patkányokból nyert BK-i szívizomszövetből (20 mg) szívizomsejteket izoláltunk, majd ezeket mintapufferben (8 M urea, 2 M tiourea, 3% SDS, 75 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40 μ M leupeptin, 10 μ M E64, 10% glicerol és brómfenolkék) szolubilizáltuk. Centrifugálást követően (16000 g, 5 perc) a felülúszóból dot-blot módszerrel meghatároztuk a minta fehérje koncentrációját, majd azt 1 mg/ml-re állítottuk be. A titin, a miozinkötő C fehérje (MyBP-C) és a troponin I (TnI) elválasztásához 0,5%-os agarózzal megerősített 2 és 4%-os, valamint 15%-os poliakrilamid géleket használtunk. A szívizomfehérjék foszforilációs állapotát ProQ[®] Diamond foszfoprotein gélfestékkel (Invitrogen, Eugene, OR, USA) vizsgáltuk, míg a fehérjemennyiség meghatározását Coomassie blue festékkel végeztük. A fehérjék foszforilációs szintjét fehérje mennyiségre normalizáltuk és egy belső kontrollhoz (ugyanazon kontroll patkány bal kamrai szívizom homogenizátuma minden gélen) viszonyítva, százalékos értékben kifejezve adtuk meg.

4.6 Adatelemzés és statisztika

A membránfosztott szívizomsejtek erőgenerálását egy személyre szabott erőmérő rendszer segítségével mértük (National Instruments (Austin, TX, USA), DAQ platform). A mért értékeket a programhoz kapcsolódó LabVIEW (National Instruments) modul rögzítette. Az eredmények értékeléséhez és ábrázolásához Excel (Microsoft, 2007) és GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornia, USA) programokat használtunk.

A biokémiai kísérleteket (Western immunoblot, foszforilációs gélfestési eljárások) minimum három, különböző izolálás során nyert szívizom minta felhasználásával ismételtük meg. A kemilumineszcens (antitestek), fluoreszcens (Sypro Ruby – fehérjemennyiség, Pro Q Diamond – foszforiláció), valamint látható fény tartományába eső (Coomassie) jelek intenzitásának meghatározására a görbe alatti terület mérését végeztük ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) és Magic Plot (Szentpétervár, Oroszország) programok segítségével.

Az adatokat az ábrákon és a szövegben átlag \pm SEM (mintaközép hibája) formájában tüntettük fel. A csoportok és a kezelések közötti különbségek statisztikai elemzésére variancia analízist (ANOVA, Bonferroni és Dunnet posthoc teszt,) vagy többszintű kevert-

hatás lineáris regressziós analízist használtunk. Utóbbi figyelembe veszi azt a tényt, hogy az ugyanazon szívből többszöri mérésekkel nyert észlelések egymástól nem függetlenek. A normalizált és relatív pCa-erő összefüggések összehasonlításához páros és páratlan t-tesztet alkalmaztunk. A fehérje foszforiláció, nemi hormonok és szívizomsejt funkció közötti összefüggéseket lineáris regresszióval határoztuk meg. Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak egy változást, ha p értéke kisebb volt, mint 0,05.

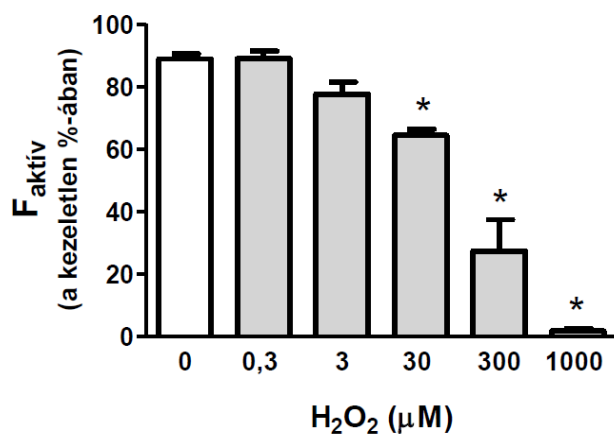
5 Eredmények

5.1 A mieloperoxidáz enzim (MPO) hatásának vizsgálata

5.1.1 *Az MPO funkcionális hatásainak vizsgálata humán bal kamrai szívműködéseken*

5.1.1.1 Az MPO szubsztrát hidrogén-peroxid (H_2O_2) dózisának kiválasztása

Ismert, hogy az MPO szubsztrátja, a H_2O_2 önmagában is károsítja a szívműködéseket kontraktilis funkcióját. Az MPO-val végzett kísérletek előtt egy olyan H_2O_2 koncentráció meghatározására törekedtünk, amely már rendelkezik önálló funkcionális hatással, de ez a hatás MPO jelenlétében fokozódik. Ennek érdekében a szívműködéseket emelkedő koncentrációjú H_2O_2 kezeléseknek tettük ki (15 perc). Az inkubációk során alkalmazott koncentrációk közül a 30 μM -os H_2O_2 oldat csökkentette szignifikánsan a szívműködések aktív erejét (a kezelés előtti érték $64,5 \pm 2$ %-ára, $n=3$), így ezt a H_2O_2 dózist használtuk további kísérleteinkben (**8. ábra**).

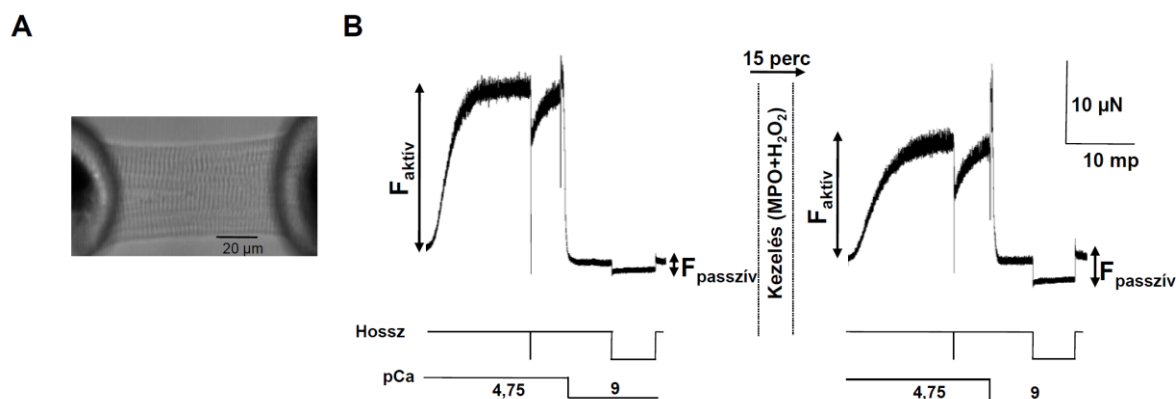


8. ábra: Emelkedő koncentrációjú hidrogén-peroxid (H_2O_2) kezelés csökkenti a szívműködések aktív erejét ($F_{aktív}$). Az erőértékeket a kezelés előtti érték százalékában adtuk meg, és az Iso-ban kezelt (0, időkontroll) minták erőértékeihez hasonlítottuk. (Az adatokat átlag \pm SEM formában ábrázoltuk.)

5.1.1.2 Az MPO+ H_2O_2 kezelés károsítja a humán szívműködések kontraktilis funkcióját

MPO (8 U/l) és H_2O_2 (30 μM) együttes alkalmazásakor (15 perc) a membránfosztott humán, bal kamrai szívműködések maximális, kalcium-függő aktív erejének ($F_{aktív}$, pCa 4,75) szignifikáns csökkenését (a kezelés előtti érték $57,7 \pm 4,1$ %-ára, $n=12$) és a kalcium-független passzív erőkomponens ($F_{passzív}$, pCa 9,0) jelentős növekedését (a kezeletlen szívműködéseken mért érték $179,6 \pm 14,6$ %-ára, $n=12$) tapasztaltuk (**9-10. ábra**). A

szívizomsejtek izoláló oldatban (Iso) történő inkubációja során (15 perc, idő kontroll) az $F_{\text{aktív}}$ csak kismértékben csökkent (a kezelés előtti érték $89,0 \pm 1,6\%$ -ára).

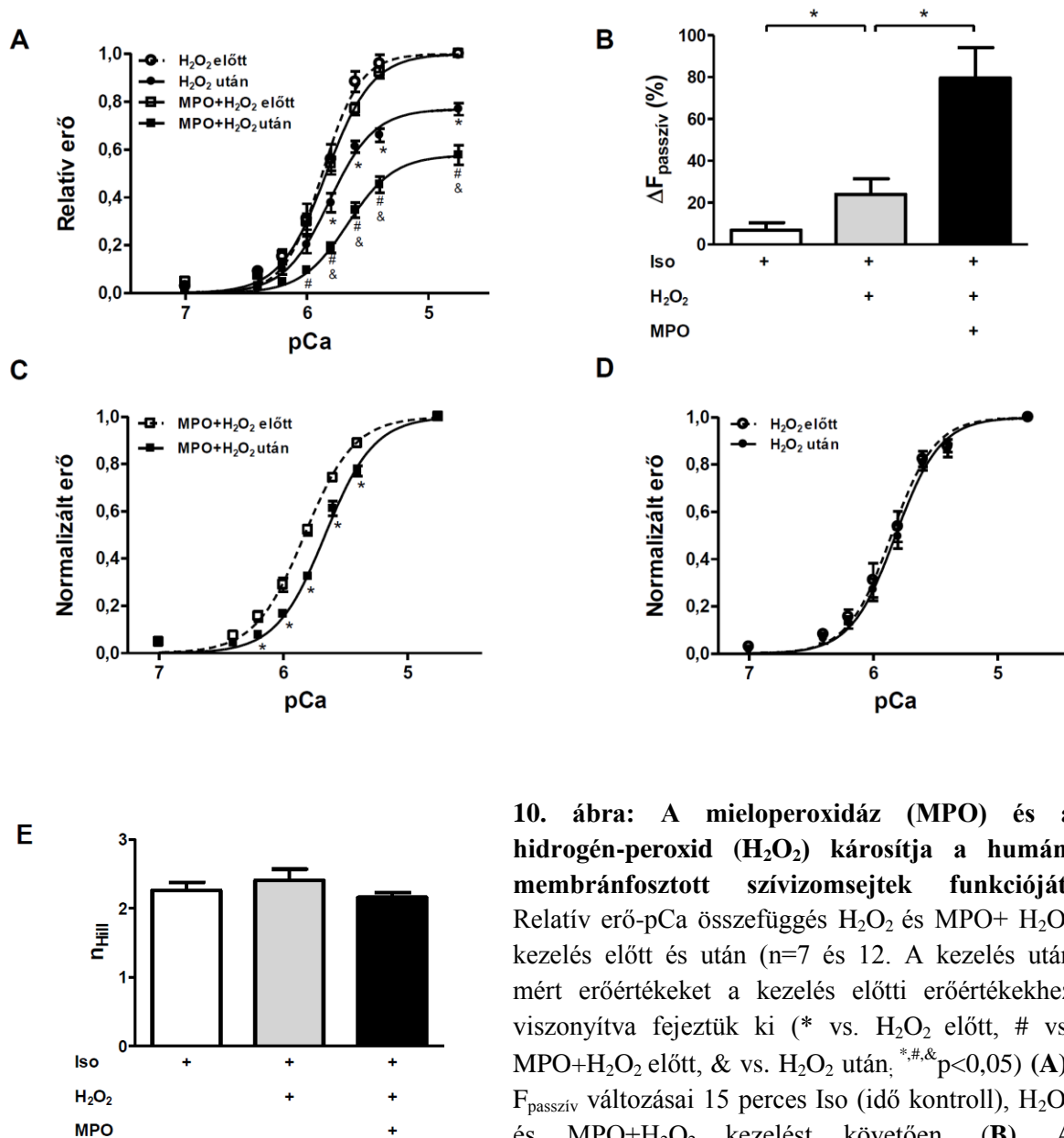


9. ábra: Membránfosztott humán bal kamrai szívizomsejt fénymikroszkópos képe. A szívizomsejt két rovartű és akváriumragasztó segítségével egy érzékeny erőmérőhöz, valamint egy elektromágneses motorhoz rögzítve látható (szarkomer hossz: $2,3 \mu\text{m}$, nagyítás 320x) (A). A szívizomsejt erőmérés során rögzített eredeti regisztrátum, melyen megfigyelhető a maximális kalcium tartalmú aktiváló oldatban (pCa 4,75) mért kalcium-függő aktív erő ($F_{\text{aktív}}$) és a kalcium mentes relaxáló oldatban (pCa 9) mért kalcium-független passzív erőkomponens ($F_{\text{passzív}}$) változása 15 perces MPO+H₂O₂ kezelés hatására (B).

Amennyiben a kezelések előtt és után a szubmaximális Ca²⁺ koncentrációjú aktiváló oldatokban mért erőértékeket a kezelések előtti maximális ($F_{\text{aktív}}$, pCa 4,75) erőértékekhez viszonyítottuk (relatív erő-pCa összefüggés), úgy a MPO+H₂O₂ kezelést követően bekövetkező erőcsökkenés szignifikánsan nagyobb volt a H₂O₂ kezeléshez viszonyítva. Az MPO+H₂O₂ hatására létrejövő $F_{\text{passzív}}$ növekedés ugyancsak szignifikánsban nagyobb volt a H₂O₂ kezelést követően tapasztalt $F_{\text{passzív}}$ növekedésnél ($79,6 \pm 14,6\%$ vs. $23,9 \pm 7,4\%$, $p < 0,001$) (10. ábra).

A kontraktilis fehérjerendszer kalciumérzékenységének (pCa_{50}) meghatározásakor a szubmaximális Ca²⁺ koncentrációjú oldatokkal végzett aktivációk során mért erőértékeket a maximális Ca²⁺ koncentrációjú aktiváló (pCa 4,75) oldatban kezelés előtt és kezelés után meghatározott erőválaszra normalizálva (normalizált erő) adtuk meg. MPO+H₂O₂ kezelést követően a normalizált erő-pCa összefüggés szignifikáns jobbra tolódását, azaz a pCa_{50} csökkenését tapasztaltuk ($pCa_{50} 5,83 \pm 0,02$ vs. $5,66 \pm 0,02$, $p < 0,001$, $n = 12$). Ezzel szemben a H₂O₂-kezelés a pCa_{50} értéket nem befolyásolta ($5,85 \pm 0,05$ vs. $5,82 \pm 0,03$, $p = 0,55$, $n = 7$). A kalcium érzékenységi görbe meredekségét jellemző Hill-koefficiens (n_{Hill}) egyik kezelés hatására sem változott (10. ábra). A szívizomsejtek kezelés előtti $F_{\text{aktív}}$, $F_{\text{passzív}}$ és pCa_{50}

értékei között mérhető különbség 5,4%, 5,5%, illetve 0,9% volt. Sem a H_2O_2 , sem a $MPO+H_2O_2$ kezelés nem eredményezett fénymikroszkóppal észlelhető strukturális változást a szívizomsejtek harántcsíkolatában.

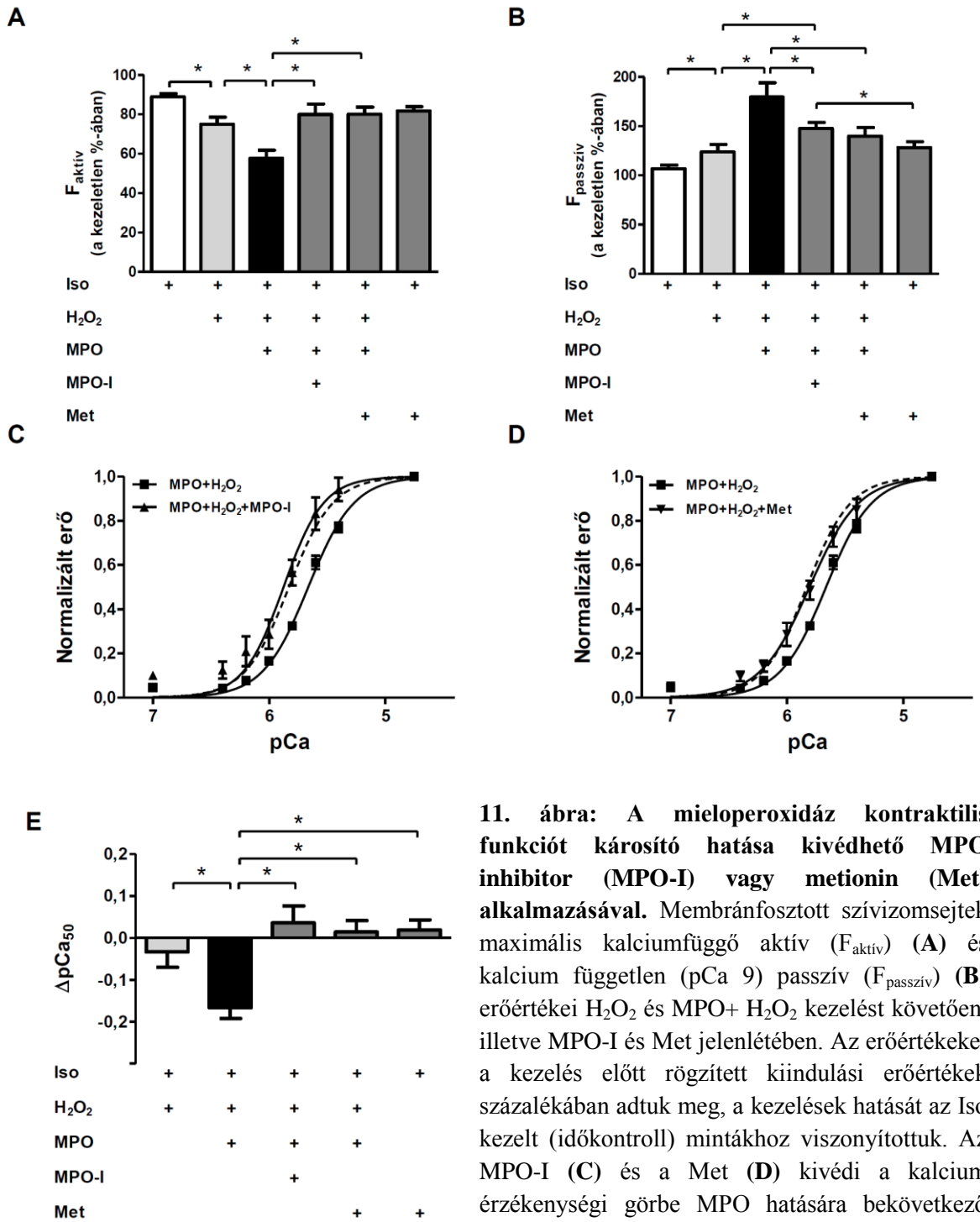


10. ábra: A mieloperoxidáz (MPO) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2) károsítja a humán, membránfosztott szívizomsejtek funkcióját. Relatív erő-pCa összefüggés H_2O_2 és $MPO+H_2O_2$ kezelés előtt és után ($n=7$ és 12). A kezelés után mért erőértékeket a kezelés előtti erőértékekhez viszonyítva fejeztük ki (* vs. H_2O_2 előtt, # vs. $MPO+H_2O_2$ előtt, & vs. H_2O_2 után; *,#, & $p<0,05$) (A). $F_{\text{passzív}}$ változásai 15 perces Iso (idő kontroll), H_2O_2 és $MPO+H_2O_2$ kezelést követően. (B). A normalizált erő-pCa összefüggés $MPO+H_2O_2$

kezelés hatására jobbra tolódik (a kalcium értékenség csökken). (C). A H_2O_2 nincs hatással a szívizomsejtek kalcium érzékenységére (D). Változatlan Hill-koefficiens H_2O_2 és $MPO+H_2O_2$ kezelést követően (E). (Az adatokat átlag \pm SEM formában ábrázoltuk.)

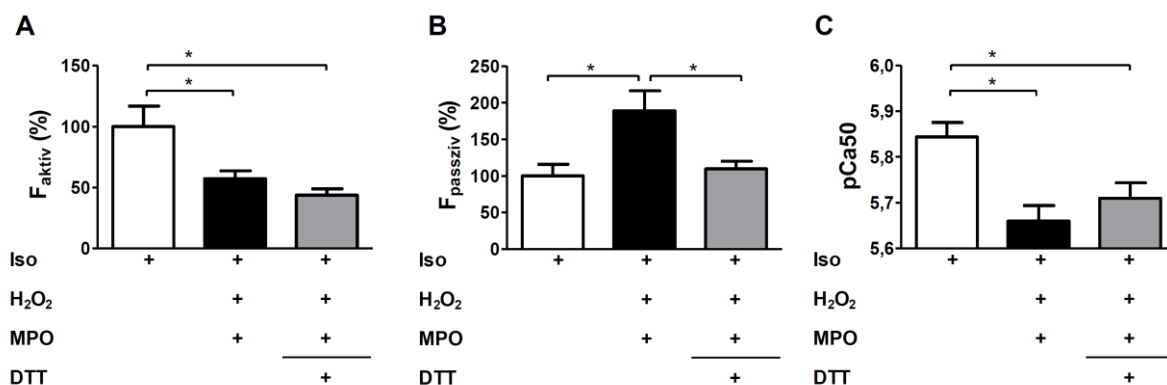
5.1.1.3 Az MPO-inhibitor (MPO-I) és a metionin (Met) kivédi, a dithiotreitol (DTT) részlegesen revertálja az MPO-okozta kontraktilis diszfunkciót

Az MPO+H₂O₂ kezelés szívizomsejtekre kifejtett káros funkcionális hatásainak kivédhetőségét az MPO-I 4-aminobenzhidrazid (50 μM), valamint az antioxidáns Met (10 mM) és a redukálószer DTT (10 mM) segítségével vizsgáltuk. Mind az MPO-I, mind a Met kivédte az MPO hatására létrejövő F_{aktív} csökkenést (MPO: 57,7±4,1%, MPO-I: 80,0±5,3%, Met: 80,1±3,6%, p<0,001 vs. MPO, n=5-6) és F_{passzív} növekedést (MPO: 179,6±14,6%, MPO-I: 147,7±6,1% és Met: 139,9±8,7%, p<0,05 vs. MPO, n=5-6). Az MPO-I és Met jelenlétében mért F_{aktív} és F_{passzív} összevethető volt a H₂O₂ kezelés után meghatározott erőértékekkel. Az MPO-I és a Met jelenlétében a kalcium érzékenységi görbe jobbra tolódása (a pCa₅₀ csökkenése) nem volt megfigyelhető (MPO-I: 5,88±0,07 vs. MPO: 5,66±0,02, p<0,05 illetve Met: 5,81±0,04 vs. MPO: 5,66±0,02, p<0,001, n=5-6) (**11. ábra**).



11. ábra: A mieloperoxidáz kontraktilis funkciót károsító hatása kivédhető MPO inhibitor (MPO-I) vagy metionin (Met) alkalmazásával. Membránfosztott szívizomsejtek maximális kalciumfüggő aktív ($F_{\text{aktív}}$) (A) és kalcium független (pCa 9) passzív ($F_{\text{passzív}}$) (B) erőértékei H_2O_2 és MPO+ H_2O_2 kezelést követően, illetve MPO-I és Met jelenlétében. Az erőértékeket a kezelés előtt rögzített kiindulási erőértékek százalékában adtuk meg, a kezelések hatását az Iso kezelt (időkontroll) mintákhoz viszonyítottuk. Az MPO-I (C) és a Met (D) kivédi a kalcium érzékenységi görbe MPO hatására bekövetkező jobbra tolódását. A szaggatott vonalak az Iso-ban mért kalcium érzékenységet jelölik. (E) A kalcium érzékenységet jellemző pCa_{50} érték változásai H_2O_2 , MPO+ H_2O_2 , MPO-I és Met kezeléseket után. (Az adatokat átlag \pm SEM formában ábrázoltuk, * $p<0,05$)

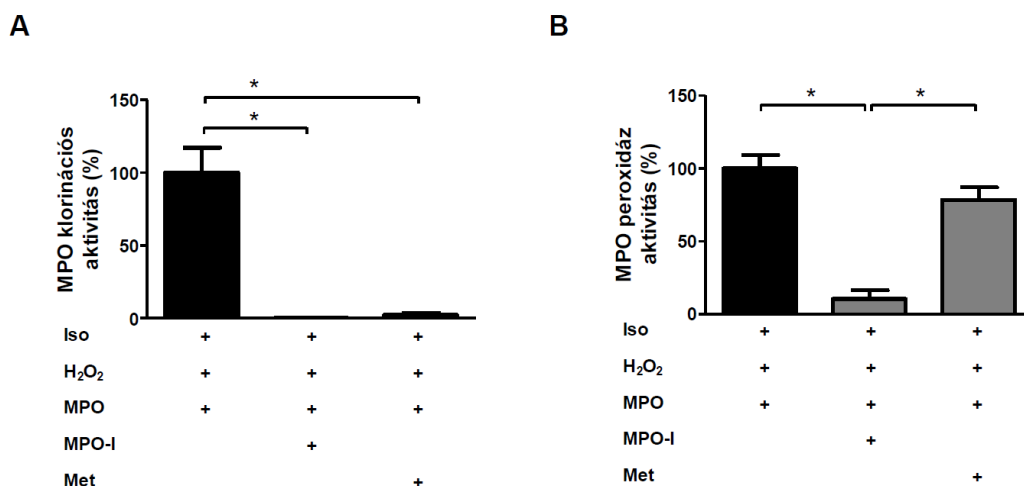
A redukálószer DTT MPO kezelést követően visszafordította az MPO által indukált $F_{\text{passzív}}$ növekedést ($\Delta F_{\text{passzív}}$ MPO: $89,3 \pm 27,3\%$ vs. DTT: $19,7 \pm 10,4\%$, $p < 0,05$, $n=6$), ugyanakkor az $F_{\text{aktív}}$ (MPO: $57,3 \pm 6,4\%$ vs. DTT: $43,8 \pm 5,1\%$, $p = \text{N.S.}$, $n=6$) és a pCa_{50} ($5,66 \pm 0,03$ vs. $5,69 \pm 0,03$, $p = \text{N.S.}$, $n=6$) MPO hatására bekövetkező csökkenését a DTT nem volt képes revertálni (**12. ábra**).



12. ábra: A redukálószer DTT hatása az MPO kezelésen átesett szívműködés aktív ($F_{\text{aktív}}$, **A**) és passzív erejére ($F_{\text{passzív}}$, **B**), valamint kalcium érzékenységre (pCa_{50} , **C**). (Az adatokat $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában ábrázoltuk, $*p < 0,05$)

5.1.2 A Met gátolja az MPO klorinációs aktivitását, azonban a peroxidáz aktivitásra nincs hatással

Az MPO funkcionális hatásainak hátterében álló biokémiai mechanizmusok feltérképezéséhez meghatároztuk az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását MPO-I és Met jelenlétében. Az MPO-I az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását is gátolta (a kiindulási aktivitás $0,3 \pm 0,2\%$, illetve $10,4 \pm 6\%$ -ára, $p < 0,001$, $n=4$). Ezzel szemben a Met csak az MPO klorinációs aktivitását csökkentette ($2,3 \pm 1,3\%$ -ra, $p < 0,001$, $n=4$), az enzim peroxidáz aktivitására nem volt hatással ($78,4 \pm 8,6\%$, $p = \text{N.S.}$, $n=4$) (**13. ábra**). Eredményeink arra utalnak, hogy az MPO szívműködés funkciót károsító hatásai az enzim klorinációs aktivitásán keresztül valósulnak meg.



13. ábra: MPO-inhibitor (MPO-I) és metionin (Met) hatása a mieloperoxidáz (MPO) klorinációs és peroxidáz aktivitására. A Met szelektíven gátolja az MPO klorinációs aktivitását (A), míg az enzim peroxidáz aktivitására nincs hatással (B). Az egyes gátlószerek jelenlétében mért értékeket az MPO (Iso és H₂O₂ jelenlétében mért) aktivitásának százalékában adtuk meg. (Az adatokat átlag±SEM formában ábrázoltuk, *p<0,05)

5.1.3 Az MPO hatására létrejövő oxidatív fehérjekárosodások vizsgálata

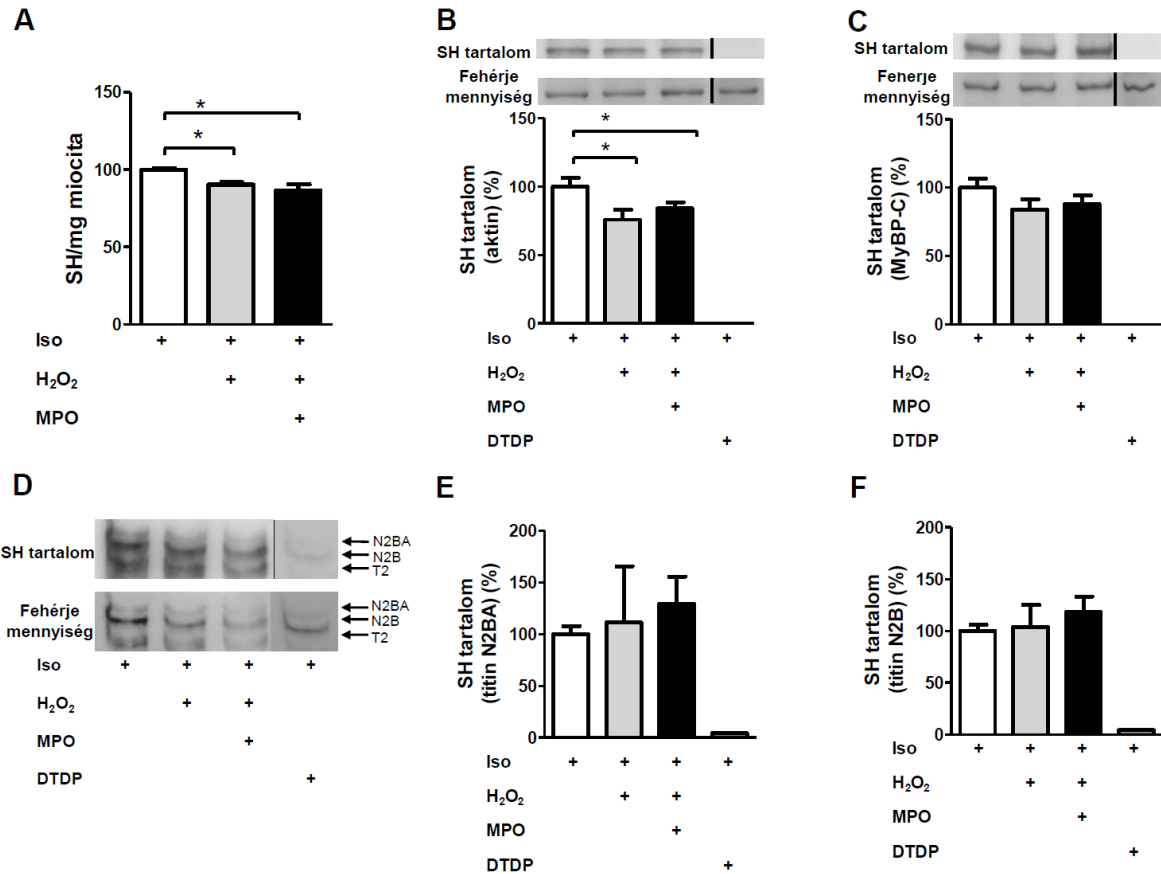
Biokémiai kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az MPO működése során keletkező oxidánsok hogyan károsítják a szívizomsejtek fehérjerendszerét. Ennek érdekében részletesen tanulmányoztuk az MPO kezelés hatására a miofilamentáris fehérjék SH-csoport tartalmában és karbonilációjában bekövetkező változásokat.

5.1.3.1 Az MPO+H₂O₂ kezelés hatása a miofilamentális fehérjék SH-tartalmára

A miofilamentáris fehérjék SH tartalmát Ellman reakcióval vizsgáltuk. Az izoláló oldatban (Iso) inkubált szívizomsejtek (idő kontroll) SH-csoport mennyiségéhez viszonyítva H₂O₂ és kombinált MPO+H₂O₂ kezelés során is kismértékű, de szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a fehérjék össz SH-csoport tartalmában (90,4±1,5%, p<0,05, n=3, illetve 86,7±4%, p<0,01, n=3) (14. ábra). A kísérletek során használt humán donor szívizom minták kiindulási SH tartalma szignifikánsan nem különbözött egymástól (az átlag SH tartalom legnagyobb különbsége két donor között 6,1 %-nak adódott).

Ezt követően SH biotinálási módszer segítségével kísérletet tettünk az SH oxidáció átesett fehérjék azonosítására. Pozitív kontrollként az oxidálószer dithiodipyriddinnel (DTDP) kezelt mintákat használtunk. H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelés hatására szignifikánsan

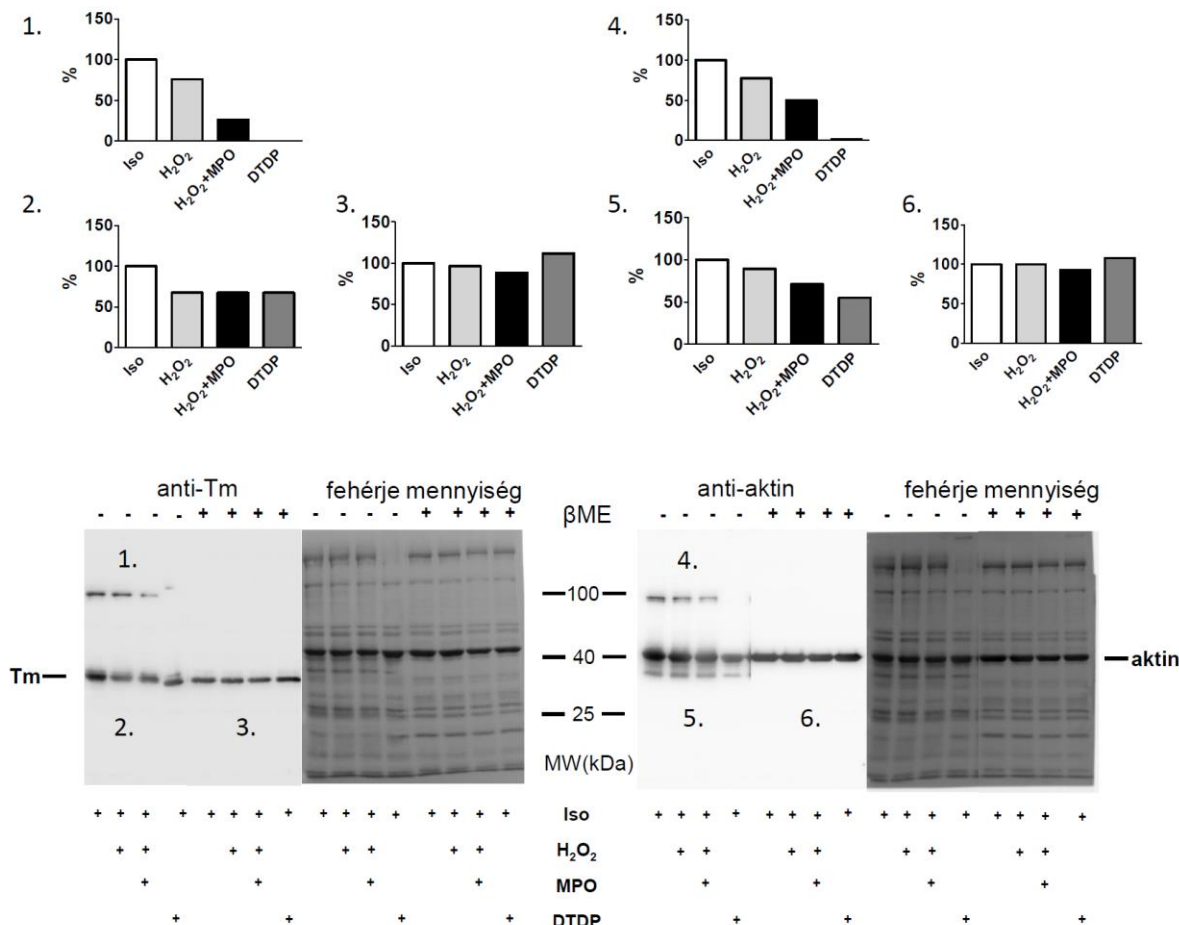
csökkent az aktin SH tartalma ($75,9\pm 7,1\%$ -ra, $p<0,01$, $n=4$, valamint $84,2\pm 4,4\%$ -ra, $p<0,05$, $n=9$, az Iso-ban kezelt minták SH tartalmához viszonyítva). Ezzel szemben MyBP-C és az óriás szarkomer fehérje, a titin rugalmasabb (N2BA) és rigidebb (N2B) izoformájának SH tartalma egyik kezelést követően sem változott jelentősen (**14. ábra**).



14. ábra: A mieloperoxidáz (MPO) és a H₂O₂ azonos hatást fejt ki miofilamentáris fehérjék szulfhidril (SH) csoportjaira. Szívizomsejtek össz-SH tartalmának meghatározása H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelés után Ellman reakcióval. **(A)** A fehérje biotinálási módszerrel vizsgált SH tartalom meghatározás eredményei kemilumineszcens SH, valamint a fluoreszcensen meghatározott fehérjemennyiségi jellel aktin **(B)**, miozin kötő C fehérje (MyBP-C) **(C)**, a titin N2BA **(D, E)**, valamint a titin N2B izoformájának **(D, F)** esetében H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezeléseket követően. T2 jelöli a titin degradációs termékét. Pozitív kontrollként az oxidálószer dithiodipyriddinnel (DTDP, 2,5 mM, 2 perc) kezelt minták szolgáltak. Az SH tartalom mértékét az Iso-ban meghatározott SH tartalom (idő kontroll) százalékában adtuk meg. (Az adatokat átlag±SEM formában ábrázoltuk, * $p<0,05$ vs. Iso)

SH oxidáció hatására intermolekuláris diszulfid-hidak is keletkezhetnek a fehérjék között, melyek nagy molekulatömegű komplexek kialakulásához vezetnek. Western

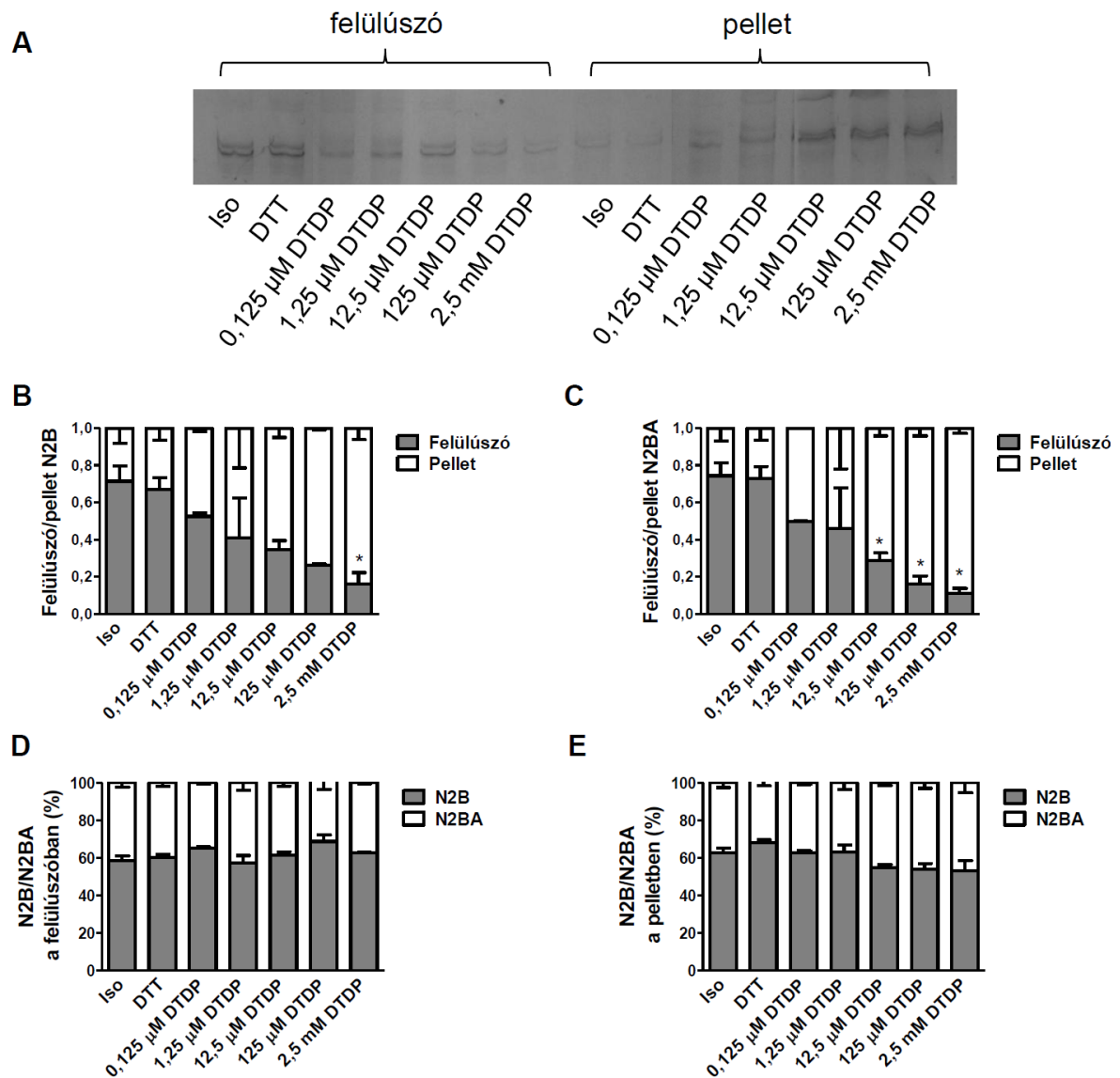
immunoblot technika segítségével redukáló és nem redukáló puffer-környezetben vizsgáltuk a fehérje-komplexek lehetséges szerepét az MPO-okozta kontraktilis diszfunkció kialakulásában. Nem redukáló környezetben egy közel 90 kDa molekulatömegű, tropomiozin és aktin tartalmú fehérje-komplexet sikerült kimutatnunk, azonban ennek intenzitása H₂O₂, vagy MPO+H₂O₂ kezelés hatására csökkent (**15. ábra**).



15. ábra: A H₂O₂ és a mieloperoxidáz (MPO) kezelés nem növeli a fehérjék közötti diszulfid kereszthidak mennyiségét. Tropomiozin (Tm) (bal panel gélkép) és aktin (jobb panel gélkép) ellenes antitesttel jelölt, nem redukáló (β-merkaptotetanol (β-ME) nélkül) és redukáló (+β-ME) pufferkörnyezetben szolubilizált szívizomminták reprezentatív, kemilumineszcensen detektált membránképe. A fehérjemennyiség meghatározása fluoreszcens fehérjefestékekkel történt. (MW – molekulatömeg). A reprezentatív gélképek denzitometriás kiértékelése Iso kontrollhoz viszonyítva százalékos formában.

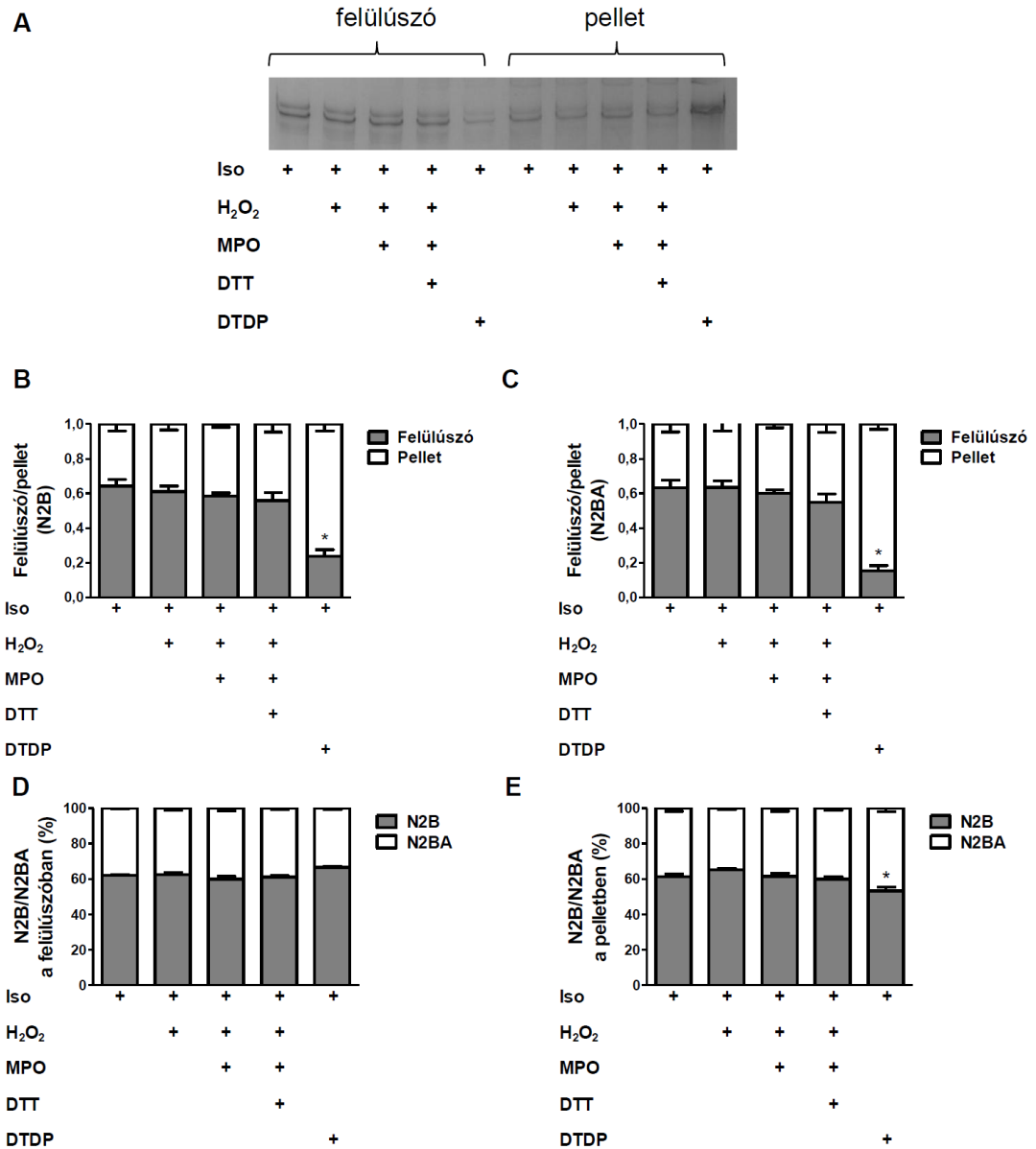
A titin óriásfehérje redukált állapota elengedhetetlen a fehérje megfelelő mértékű oldódásához. Kísérleteink során ezért az óriásfehérje nem redukáló és redukáló környezetben oldott, eltérő mértékben oxidált alakjainak mennyiségét is megvizsgáltuk. Növekvő koncentrációjú DTDP kezelés hatására - vélhetően diszulfid-hidak

keletkezésének köszönhetően - jelentősen csökkent a nem redukáló pufferben történő denaturálással nyert felülúszó titin tartalma, míg a pelletben maradó titin mennyisége növekedett. A felülúszó/pellet arány tehát mind az N2B, mind az N2BA titin izoforma esetében szignifikánsan csökkent. A kezelések nem befolyásolták a titin izoforma arányát a kiindulási (Iso, adat) mintához viszonyítva sem a felülúszó, sem pedig a pellet esetében (16. ábra).



16. ábra: Emelkedő koncentrációjú dithiodipiridin (DTDP) kezelés csökkenti a titin fehérje oldhatóságát nem redukáló puffer környezetben. Humán, bal kamrai szívizomminták nem redukáló (felülúszó), valamint a pellet esetében redukáló pufferben, különböző koncentrációjú DTDP kezelést követő feloldásából nyert titin mennyiségét bemutató reprezentatív gélkép (A). Az oxidálószer DTDP koncentrációjának emelésével csökken a felülúszó/pellet arány mind a titin N2B (B), mind a titin N2BA (C) izoformájának esetében. A kezelések során az N2B/N2BA izoformák aránya a felülúszó (D) és a pellet (E) esetében is állandó marad.

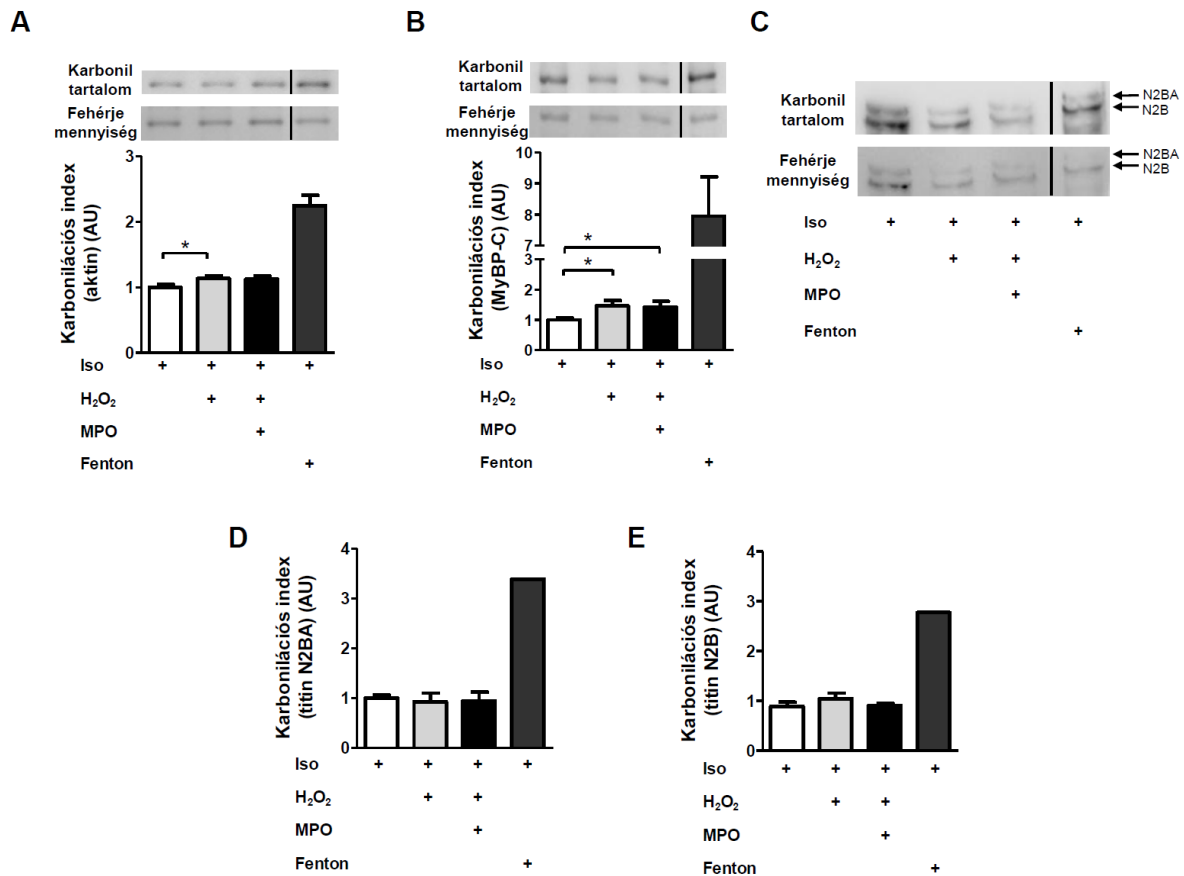
A H_2O_2 , valamint az $MPO+H_2O_2$ kezelés nem változtatta meg a titin fehérje nem redukáló pufferben történő oldhatóságát (**17. ábra**). A felülúszó/pellet arány az N2B és az N2BA izoforma esetén is változatlan maradt, így a kezelés vélhetően nem járt diszulfidhidak keletkezésével. Az N2B/N2BA arány nem változott sem a felülúszóban, sem a pelletben H_2O_2 és $MPO+H_2O_2$ kezelést követően.



17. ábra: A H_2O_2 , valamint az $MPO+H_2O_2$ kezelés nem befolyásolja a titin fehérje oldhatóságát. Reprezentatív gékép a nem redukáló és redukáló környezetben H_2O_2 , MPO, dithiotreitól (DTT) és dithiodipiridin (DTDP) kezeléseket követően feloldott bal kamrai szívizommintákból kinyerhető titin mennyiségéről (A). H_2O_2 , valamint $MPO+H_2O_2$ kezelés hatására nem változik a felülúszó/pellet arány sem a titin N2B (B) sem a titin N2BA (C) izoformáját vizsgálva. Titin izoformák megoszlása a felülúszó (D), illetve a pellet (E) esetében H_2O_2 és $MPO+H_2O_2$ kezelés után.

5.1.3.2 Az MPO hatása a szívizomfehérjék karbonilációjára

A miofilamentális fehérjék karbonilációjának vizsgálatakor H_2O_2 kezelés hatására kismértékű, de szignifikáns növekedést tapasztaltunk az aktin karbonil-csoport tartalmában (karbonilációs index (KI)= $1,1 \pm 0,046$, $p < 0,05$, $n=5$). Ez az érték azonban nem változott MPO hozzáadását követően (KI= $1,1 \pm 0,052$, $p=0,9$ vs. H_2O_2 , $n=11$) (**18. ábra**). Az aktinhoz hasonlóan kismértékű, de szignifikáns növekedést mértünk a MyBP-C fehérje karbonilációjában mind H_2O_2 (KI= $1,5 \pm 0,2$, $p < 0,05$, $n=2$), mind pedig MPO+ H_2O_2 kezelés után (KI= $1,4 \pm 0,2$, $n=4$ $p < 0,05$ vs. idő kontroll). Az óriásfehérje titin N2BA és N2B izoformájának karbonilációja nem változott H_2O_2 és MPO+ H_2O_2 kezelést követően sem (N2BA- H_2O_2 : KI= $0,9 \pm 0,2$, $p=0,47$ vs. Iso és MPO: $1,0 \pm 0,2$, $p=0,68$ vs. Iso, N2B- H_2O_2 : KI= $1,0 \pm 0,1$, $p=0,36$ vs. Iso és MPO: KI= $0,9 \pm 0,1$, $p=0,64$ vs. Iso) (**18. ábra**).



18. ábra: A mieloperoxidáz (MPO) és H₂O₂ kezelés hatására nő az aktin, valamint a miozinkötő C fehérje (MyBP-C) karbonilációja. Reprezentatív, kemilumineszcensen (karboniláció) és fluoreszcensen (fehérjemennyiség) detektált membránképek (A-C), valamint a H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelés hatására létrejövő karboniláció mértéke aktin (A), MyBP-C (B) és a titin N2BA (D), valamint N2B (E) izoformájának esetében. Pozitív kontrollként Fenton reagenssel (FeSO₄, H₂O₂ és aszkorbinsav) kezelt minták szolgáltak. A fehérjekarboniláció mértékét karbonilációs index formájában fejeztük ki (KI=1, az Iso-ban kezelt minták karbonilációja). (Az adatokat átlag±SEM formában ábrázoltuk, *p<0,05.)

5.2 Az ovariectómia és az akut stressz hatása patkány bal kamrai szívműködésére

5.2.1 Az ovariectómia és a stressz hatása a kísérleti állatok fizikális és laboratóriumi paramétereire

A Kontroll, Kontroll-S, OVX és OVX-S állatok esetében mért legfontosabb fizikális és laborparamétereket az **1. táblázatban** részleteztük. Az állatok testsúlya, valamint szívtömege szignifikánsan nagyobb volt az OVX-S csoportban, azonban a szív-testtömeg arány nem különbözött a vizsgált állatcsoportok között. A szérum glükóz, valamint

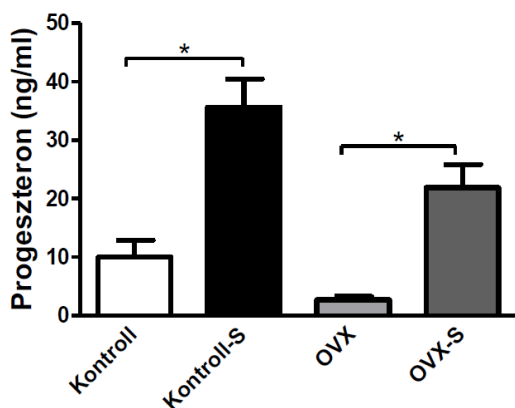
koleszterin értékek hasonlóak voltak a négy állatcsoportban. Egyéb releváns fizikális paraméterek (szívfrekvencia, vérnyomás) nem kerültek rögzítésre.

	Kontroll	Kontroll-S	OVX	OVX-S	
Testtömeg (g)	288,4±4,7	286,6±2,4	297,8±3,9	328,6±5,8 ^{*,†,‡}	P<0,001
Szívtömeg (g)	1,14±0,05	1,14±0,03	1,23±0,04	1,30±0,04 [*]	P< 0,050
Szív/testtömeg arány (mg/g)	3,96±0,20	3,99±0,10	4,14±0,11	3,98±0,17	N.S.
Progeszteron (ng/ml)	10±2,9	35,6±4,8 [*]	2,8±0,5	21,9±4,0 [‡]	*P<0,001 ‡ P<0,01
Glükóz (mmol/l)	11,8±0,9	9,7±0,7	9,9±0,4	10,3±0,7	N.S.
Koleszterin (mmol/l)	2,4±0,1	2,6±0,3	2,5±0,1	2,6±0,1	N.S.

1. táblázat: Morfológiai paraméterek, valamint progeszteron, glükóz és koleszterin szérumszintjei a Kontroll, ovariectomizált (OVX), valamint akut stressznek (Kontroll-S, OVX-S) kitett állatcsoportokban. Az adatokat átlag±SEM formában ábrázoltuk, *: vs. Kontroll), †: vs. Kontroll-S, ‡: vs. OVX. (társ szerzői eredmények)

5.2.2 Az ovariectómia és a stressz hatása a szérumszintjeire és progeszteron szintre

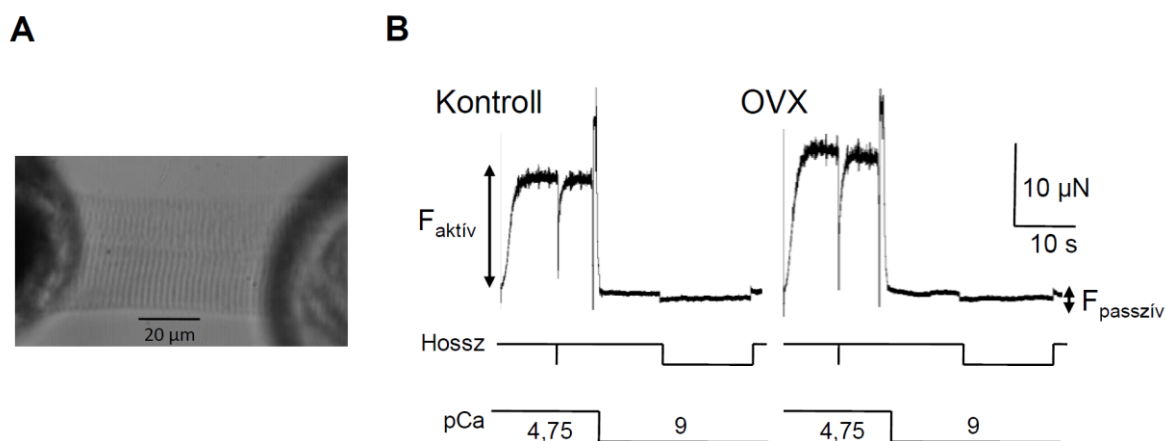
A Kontroll és OVX patkányok szérumszintjében meghatároztuk a női nemi hormonok koncentrációját. A vizsgálat során az OVX állatok ösztrogén szintje nem érte el az alsó detekciós értéket (4,9 pg/ml), amely sikeres ovariectomiára utal. A Kontroll állatok kb. 25%-nak volt mérhető ösztrogénszintje, melyet az állatok eltérő ciklusa magyarázhat. A szérumszintje minden állatcsoportban a mérhető tartományba esett. Szignifikánsan magasabb (több, mint háromszoros) szérumszintet mértünk a Kontroll-S (35,6±4,8 ng/ml), valamint az OVX-S (21,9±4,0 ng/ml) patkányokban a Kontroll (10±2,9 ng/ml) és az OVX (2,8±0,5 ng/ml) állatok értékeihez viszonyítva (n=8/csoport, p<0,001 Kontroll-S vs. Kontroll; p<0,01 OVX-S vs. OVX) (**19. ábra**). Akut stressz hatására a Kontroll-S, illetve az OVX-S csoportban a progeszteron szintben bekövetkező emelkedés (25,6 ng/ml, ill. 19,1 ng/ml) hasonló mértékű volt (**1. táblázat**).



19. ábra: Kemilumineszcens módszerrel meghatározott szérumszintjei. Az akut stressz-protokollnak alávetett állatok progeszteron szintje jelentősen emelkedett. (n=8/csoport, S - stresszelt, OVX - ovariectomizált, p<0,05) (társ szerzői eredmények)

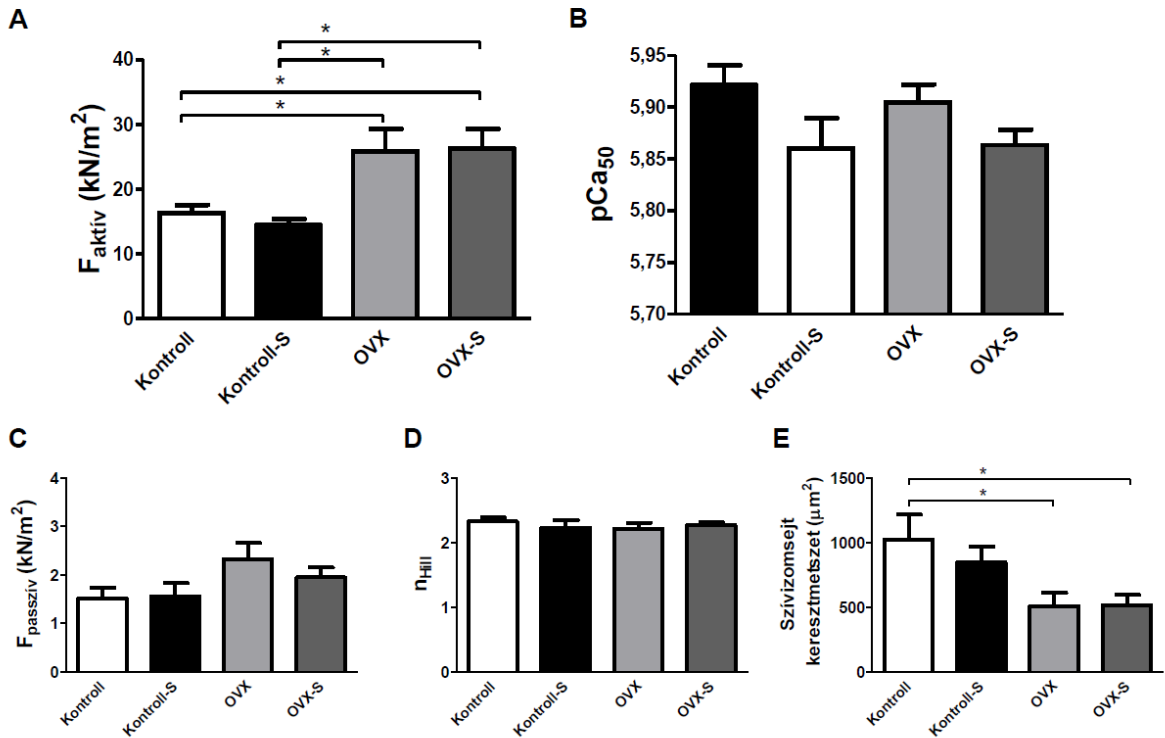
5.2.3 Az ovariectómia befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis funkcióját

Vizsgálataink során a Kontroll és az OVX patkányok bal kamrai szívizomszövetéből izolált, membránfosztott szívizomsejteken (n=10/csoport) az $F_{\text{aktív}}$ -ot, az $F_{\text{passzív}}$ -ot, valamint a pCa_{50} -et 2,3 μm -es szarkomerhosszon határoztuk meg (**20. ábra**).



20. ábra: Érzékeny erőmérőhöz, valamint egy elektromágneses motorhoz rovartűk segítségével rögzített membránfosztott patkány bal kamrai szívizomsejt fénymikroszkópos képe. (szarkomer hossz 2,3 μm , nagyítás 320x) (A). A szívizomsejt erőmérés során rögzített eredeti regisztrátum, melyen megfigyelhető a maximális kalciumtartalmú aktiváló oldatban (pCa 4,75) mért kalciumfüggő aktív erő ($F_{\text{aktív}}$) és a kalciummentes relaxáló oldatban (pCa 9) mért kalcium független passzív erőkomponens ($F_{\text{passzív}}$) a Kontroll és az ovariectómizált (OVX) állatcsoportban (B).

Az $F_{\text{aktív}}$ szignifikánsan nagyobbak bizonyult OVX, valamint OVX-S állatok esetében a Kontroll, illetve a Kontroll-S állatokhoz viszonyítva ($25,9 \pm 3,4 \text{ kN/m}^2$ és $26,3 \pm 3,0 \text{ kN/m}^2$ vs. $16,4 \pm 1,2 \text{ kN/m}^2$ és $14,4 \pm 0,9 \text{ kN/m}^2$, $p < 0,05$). Ezzel szemben az akut stressz nem befolyásolta az $F_{\text{aktív}}$ -ot sem a Kontroll, sem az OVX állatcsoportban. A stressz hatására a pCa_{50} -ben bekövetkező csökkenés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Sem az ovariectomia, sem pedig a stressz nem befolyásolta a $F_{\text{passzív}}$, valamint az n_{Hill} koefficiens értékét. Nem találtunk fénymikroszkóppal látható különbséget a különböző állatcsoportokból izolált szívizomsejtek harántcsíkolatában, azonban méréseink alapján az OVX, illetve az OVX-S állatok felhasznált szívizomsejtjeinek keresztmetszete szignifikánsan kisebb volt (**21. ábra**). A szarkomerhossz-erő összefüggés mind a négy állatcsoportban megőrzött volt, nyújtás hatására nőtt az $F_{\text{aktív}}$, illetve az $F_{\text{passzív}}$ is.



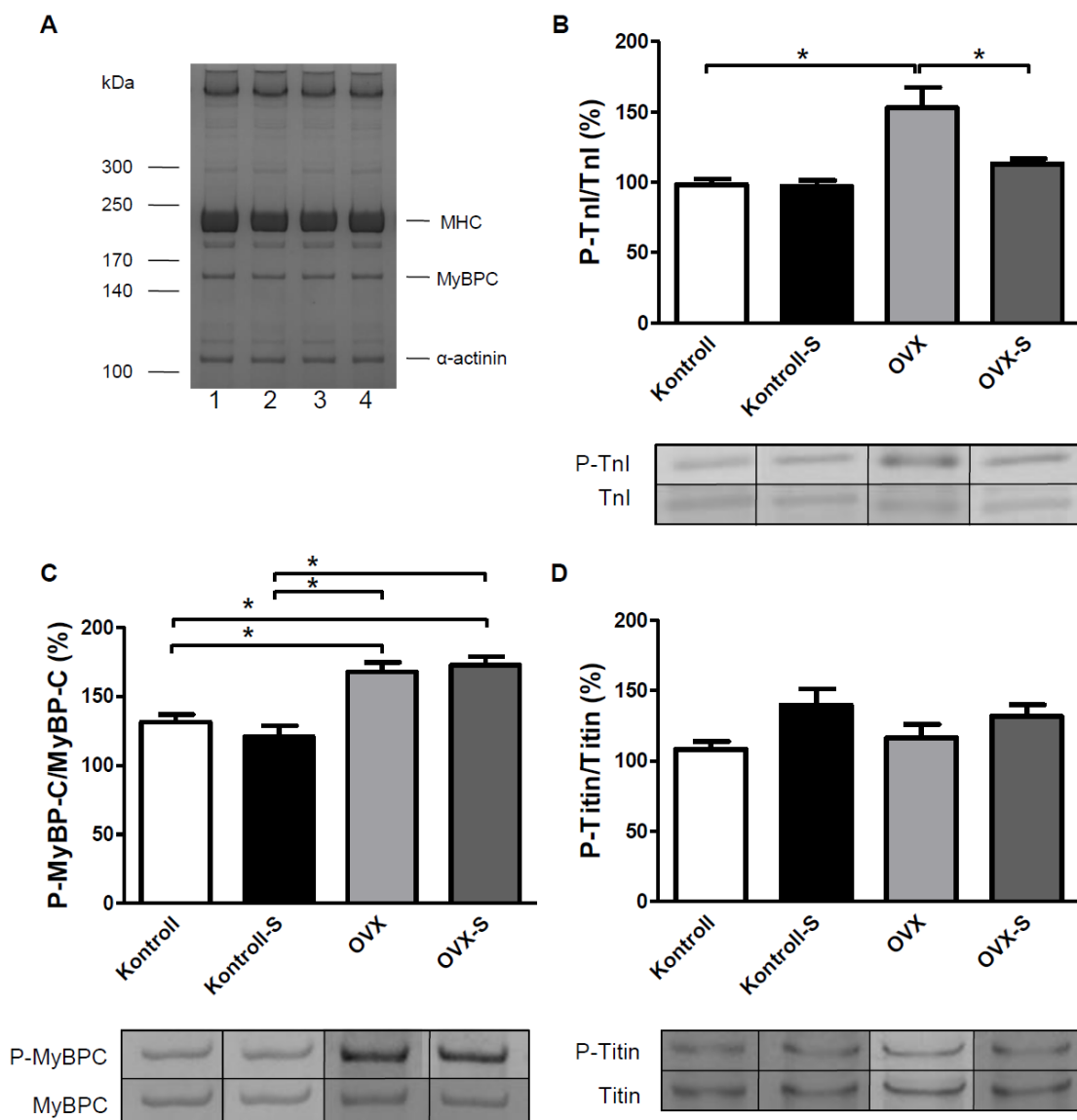
21. ábra: Az ovariektómia és a stressz hatása a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára.

Az ovariektómián átesett állatokból izolált szívizomsejtek (OVX, OVX-S) aktív ereje (F_{aktiv}) emelkedett (A). A kalcium érzékenységi görbék félpontjainak (pCa_{50}) alakulása a négy állatcsoportban (B). Az ovariektómia és a stressz nem befolyásolta a szívizomsejtek passzív erejét ($F_{passzív}$) (C) és a Hill-koefficiensét (D). Az OVX állatcsoportokban mért szívizomsejtek keresztmetszete kisebb (E). (n=10 sejt, 5-7 állatból/csoport) (a szívizomsejtek mérése részben társszerzői támogatással történt)

5.2.4 Az ovariektómia és stressz hatása a miofilamentáris fehérjék összetételére és foszforilációs állapotára

A szívizomsejtek fehérje-összetételét SDS-gélelektroforézist követő Coomassie festéssel, míg a fehérjék foszforilációs állapotát speciális foszfoprotein festési eljárással vizsgáltuk. Ezen kísérletek során nem találtunk lényeges különbséget a miofilamentáris fehérje-összetételben a Kontroll és OVX csoportok között. A TnI foszforilációja szignifikánsan magasabb volt az OVX állatokban a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($153 \pm 14,4\%$ vs. $98,5 \pm 4\%$, $p < 0,001$), ez azonban nem mutatott összefüggést a szívizomsejteken mért pCa_{50} -el ($r = 0,268$, $p = 0,73$). Az OVX-S állatcsoportban mérhető TnI foszforiláció ($113,1 \pm 3,6\%$) összevethető volt a Kontroll és Kontroll-S csoportokban meghatározott értékekkel. A MyBP-C foszforilációja szignifikánsan magasabbnak adódott OVX állatokban a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($167,7 \pm 7\%$ vs. $131,4 \pm 5,5\%$, $p < 0,001$),

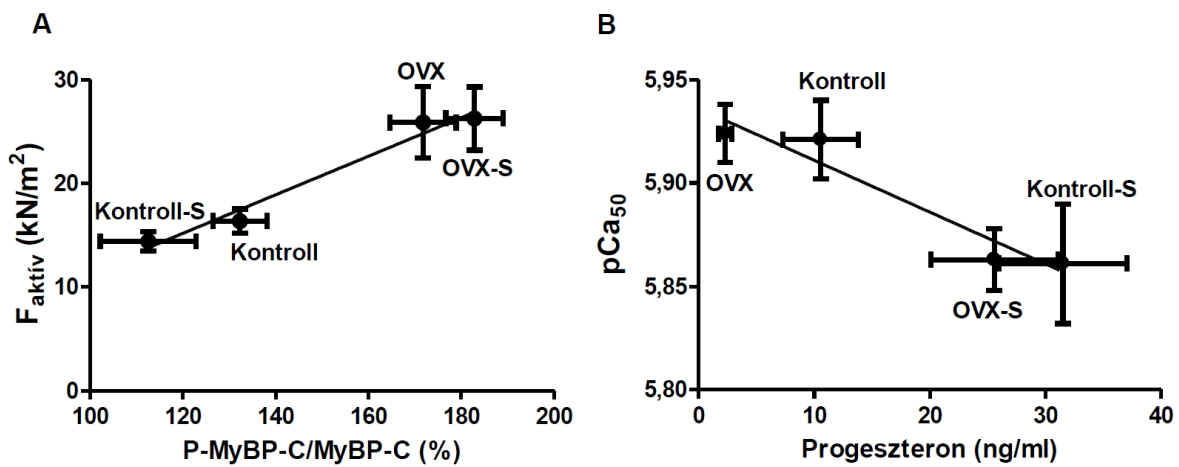
azonban az OVX-S állatokban további, szignifikáns emelkedés nem volt megfigyelhető ($182,9 \pm 6,2\%$). A funkcionális méréseknél tapasztalt változatlan $F_{\text{passzív}}$ értékeknek megfelelően nem találtunk különbséget a titin foszforilációban a négy állatcsoport között (22. ábra).



22. ábra: Fehérjeösszetétel és fehérjefoszforiláció a Kontroll és ovariektómizált (OVX) állatok szívizommintáiban. Változatlan fehérjeösszetétel a Kontroll (1), stresszelt kontroll (Kontroll-S) (2), OVX (3) és OVX-S (4) állatok bal kamrai szívizomszövetében. (Coomassie blue mennyiségi fehérjefestés, 4%-os poliakrilamid gél 0,5%-os agarózzal erősítve, MHC – miozin nehézlánc) (A). Emelkedett troponin-I összfoszforiláció (P-TnI) az OVX csoportban (B). A miozin-kötő C fehérje összfoszforilációja (P-MyBP-C) emelkedett az OVX és OVX-S állatokban (C). Változatlan titin összfoszforiláció a négy állatcsoportban (D). (A fehérje foszforilációt proteinmennyiségre normalizáltuk és egy belső kontroll százalékában fejeztük ki, $p < 0,05$).

5.2.5 A szívizomsejt kontraktilis funkció összefüggése a miokardiális fehérjék foszforilációjával, valamint a női nemi hormonok szintjével

A szívizomsejtek funkcionális paramétereit a fehérje foszforiláció értékeivel összevetve szignifikáns korrelációt találtunk az $F_{\text{aktív}}$, valamint a MyBPC foszforiláció között ($r=0,986$, $p<0,05$). A titin foszforiláció ugyanakkor nem mutatott összefüggést a szívizomsejteken meghatározott $F_{\text{passzív}}$ -vel ($r=0,139$, $p=0,86$). A szérumban mért progeszteron szint és a szívizomsejteken meghatározott pCa_{50} értékek között szignifikáns, inverz korreláció volt megfigyelhető ($r=0,963$, $p<0,05$) (23. ábra).

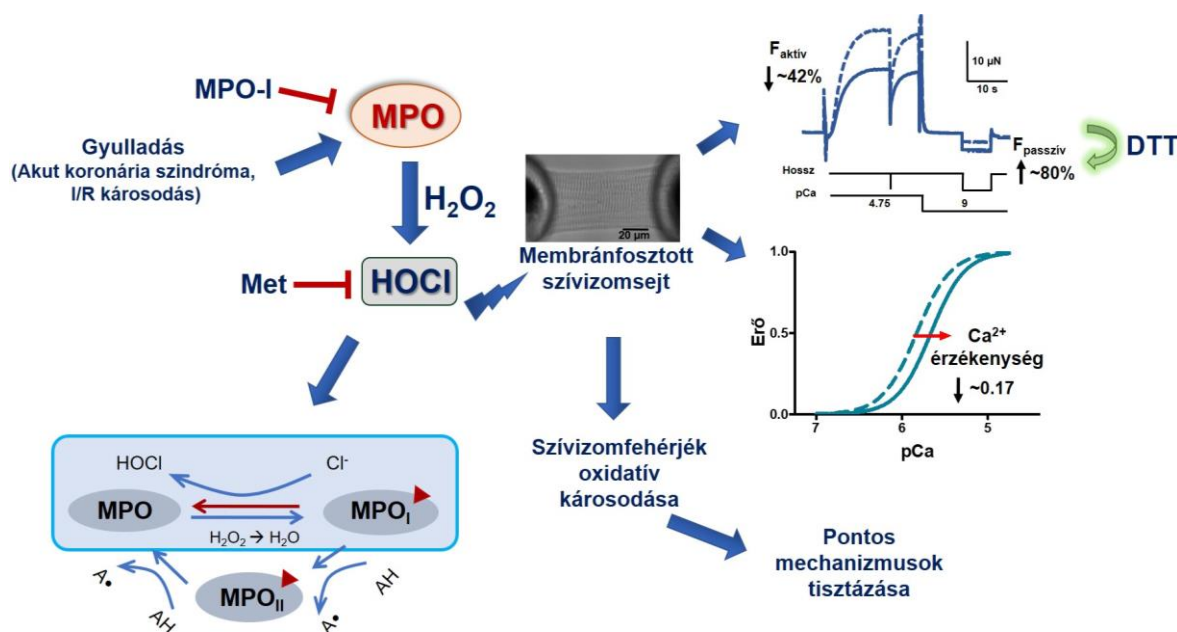


23. ábra: Összefüggés a fehérjefoszforiláció, a progeszteron szint és a szívizomsejtek kontraktilis funkciója között. Korreláció a miozin-kötő C fehérje (MyBP-C) összfoszforilációja és a szívizomsejtek aktív ereje ($F_{\text{aktív}}$) között ($r=0,986$, $p<0,05$, lineáris regresszió) (A). A szívizomsejtek kalcium érzékenysége (pCa_{50}) inverz korrelációt mutat a szérumban mért progeszteron szinttel ($r=0,963$, $p<0,05$, lineáris regresszió).

6 Megbeszélés

6.1 A mieloperoxidáz enzim (MPO) hatása a humán szívizomsejtek mechanikai és biokémiai jellemzőire

Az MPO hatását izolált, humán szívizomsejteken vizsgálva megállapítottuk, hogy (1) a MPO az *in vitro* kísérleti körülmények között rontotta a kalciumfüggő izometriás erőgenerálást, növelte a kalcium független passzív erőt és csökkentette a kalcium érzékenységet; (2) az MPO által kiváltott funkcionális változások kivédhetők voltak MPO-inhibitorral, valamint az antioxidáns metionin alkalmazásával, az MPO kiváltotta passzív erő növekedés redukálószerrel revertálhatónak bizonyult; (3) az aktin fehérje SH-oxidációja, valamint az aktin és a MyBP-C karbonilációja H_2O_2 és H_2O_2 +MPO kezelés hatására növekedett; (4) az MPO által kiváltott funkcionális hatásokat az MPO klorinációs aktivitása közvetíti (24. ábra).



24. ábra: A mieloperoxidáz enzim vizsgálata során kapott eredményeink összefoglalása (Magyarázat a szövegben)

Miokardiális gyulladás és I/R károsodás során az oxidatív stressz növekedése és kontraktilis diszfunkció kialakulása figyelhető meg⁽¹⁵⁾. Méréseink során az MPO+ H_2O_2 kezelés szignifikánsan csökkentette a szívizomsejtek aktív erejét és jelentősen csökkentette a kalcium érzékenységet is. Ezzel szemben egy 30 μ M-os H_2O_2 oldatban történt inkubáció

önmagában csupán az aktív erő kisebb mértékű csökkenését eredményezte, míg 3 μM H_2O_2 kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a szívizomsejtekre. Ez összhangban áll azzal a korábbi tanulmánnyal, melyben 10 μM H_2O_2 nem csökkentette a maximális Ca-aktiválta erőt permeabilizált patkány szív preparátumokban^(103, 104). A H_2O_2 hatása önmagában koncentráció dependens: növekvő koncentrációk alkalmazása egyre nagyobb mértékben károsítja a szívizomsejt kontraktilis funkcióját. Az MPO+ H_2O_2 kezelés aktív erőre kifejtett jelentős károsító hatásának hátterében azonban a reakcióban képződő erős oxidáns, a HOCl állhat. Egy korábbi vizsgálatban a HOCl kezelés (10 és 50 μM , 1 perc) szignifikánsan csökkentette a maximális erőt⁽¹⁰³⁾, az MPO+ H_2O_2 kezelés hatásához hasonlóan. A MPO+ H_2O_2 kezelés során fénymikroszkóppal vizsgálva a szívizomsejtek harántcsíkolata nem változott, azonban fontos megjegyezni, hogy elektronmikroszkópos vizsgálatok során HOCl hatására a miofilament hálózat sérülése igazolódott⁽¹⁰³⁾. A kalcium független passzív erő H_2O_2 hatására kismértékben, míg H_2O_2 +MPO hatására jelentős mértékben fokozódott. Ezen eredményeink összefüggésben állnak a korábbi megfigyeléssel, miszerint membránfosztott patkány trabekulák esetében az alacsony H_2O_2 koncentráció (10 μM) nem növelte a passzív erőt, míg a HOCl-val történő kezelés (10 μM és 50 μM) annak szignifikáns emelkedését okozta⁽¹⁰⁴⁾. Bizonyított, hogy az óriás szarkomer fehérje, a titin molekuláris rugóként működve kulcsszerepet játszik a membránfosztott szívizomsejtek passzív erejének kialakításában⁽¹⁰⁵⁾. A szívizomsejtek passzív ereje titin izoformaváltás⁽⁶³⁾, valamint poszttranszlációs módosulások (foszforiláció⁽¹⁰⁶⁾, SH-oxidáció⁽⁷²⁾ és feltehetően karboniláció) hatására változhat. Korábbi eredmények alapján oxidatív stressz hatására diszulfid hidak képződnek a titin molekulák N2B unique sequence régiójában (N2B-U_s), melynek hatására nő a fehérje rigiditása⁽⁷²⁾. Jelen tanulmányunkban nem sikerült biokémiai módszerekkel kimutatni a titin fehérje H_2O_2 +MPO kezelést követő SH oxidációját és karbonilációját, funkcionális méréseinkben azonban a DTT szignifikánsan csökkentette a szívizomsejtek H_2O_2 +MPO kiváltotta $F_{\text{passzív}}$ növekedését. Az MPO hatás redukálószerrel megvalósított revertálhatósága annak oxidatív természetére utal.

H_2O_2 +MPO kezelés hatására kísérleteinkben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk kalciumérzékenységben, amely ellentmondásban áll egy korábbi tanulmány eredményeivel, ahol HOCl kezelést követően a $p\text{Ca}_{50}$ érték emelkedését tapasztalták⁽¹⁰⁴⁾. Az eltérő eredmények hátterében több tényező is állhat: kísérleteinkben nem ismert például a keletkező HOCl mennyisége, így a két kísérleti elrendezésben különbség lehet az alkalmazott dózist illetően, emellett a permeabilizált miocitákon, illetve trabekulákon

elvégzett kezelés nehezen vehető össze egymással. A H₂O₂ kezelés nem volt hatással a sejtek kalcium érzékenységére, így azt feltételezzük, hogy az inkább struktúrális, mintsem regulatórikus változásokat okoz a miofilamentumok szintjén, akár az erőgeneráló kereszthidak számának csökkentése révén. *MacFarlane* és munkatársai⁽²⁵⁾ hasonló eredményeket kaptak, amikor szuperoxid anion kezelésnek tették ki permeabilizált patkány szívizom preparátumot: az aktív erő dóziszfüggő csökkenését a szuperoxid anion kereszthidakra gyakorolt hatásával magyarázták. Kísérletükben - eredményeinkhez hasonlóan - a kalcium-érzékenység változatlan maradt.

Az utóbbi években számos CV megbetegedésben (például I/R károsodás, akut MI, HFpEF) igazolták az MPO szerepét. Az MPO, mint biomarker szérumszintjének meghatározása hasznos lehet ezen kórállapotok diagnosztizálásában, az enzim gátlásának pedig kiemelt szerepe lehet ezen kórképek kezelésében^(45, 107). Az MPO gátlás potenciális negatív immunológiai következményei ellenére az MPO-inhibitorok jelenleg is számos CV megbetegedés (miokardiális infarktus, HFpEF) kezelésére klinikai kipróbálás alatt állnak.

Az általunk alkalmazott MPO-I, a 4-aminobenzhidrazid képes volt kivédeni az MPO szívizomsejtekre gyakorolt káros hatásait. Az inhibitorhoz hasonlóan az antioxidáns, HOCl scavenger aminosav, a Met is képes volt megakadályozni azt, hogy az MPO kifejtse funkcionális hatásait, amiből arra következtetünk, hogy az észlelt változásokért az MPO klorinációs aktivitása tehető felelőssé. Ez utóbbi megállapításunkat MPO aktivitás assay-vel is megerősítettük. A HOCl leggyorsabban kéntartalmú aminosavakkal (Met, Cys) képes reakcióba lépni⁽¹⁰⁸⁾, ennek megfelelően az általunk alkalmazott nagy dózisú Met képes volt hatástalanítani a HOCl oxidatív kapacitását. A Met oldalláncok oxidációjával Met-szulfoxid (MetSO) keletkezik. Mivel ez a folyamat MetSO-reduktáz jelenlétében reverzibilis⁽³³⁾, így a Met-nak potenciálisan protektív szerepet tulajdonítanak oxidatív stresszel járó kórfolyamatokban⁽³¹⁾. Korábbi tanulmányok alapján ismert, hogy a fiziológiásan releváns Met oldalláncok oxidációja a fehérjék funkciókárosodását okozhatja⁽¹⁰⁹⁾, mely utóbbit kimutatták szívizomfehérjék esetében is (pl. aktin)⁽¹¹⁰⁾. Fontos azonban megjegyezni, hogy a HOCl károsító mechanizmusának nagy reakciósebessége miatt a HOCl keletkezésének gátlása hatékonyabb lehet, mint a már létrejött HOCl közömbösítése.

Az MPO inhibitorral és Met-nal két ponton is sikeresen kivédtük az MPO oxidatív hatásait. A redukálószer DTT azonban a csak részlegesen volt képes visszafordítani az MPO-indukált mechanikai változásokat: a passzív erőt a kiindulási értékre csökkentette,

azonban az aktív erőt és a pCa_{50} értéket nem befolyásolta. Az MPO által közvetített oxidatív hatások sokfélesége⁽²⁴⁾ miatt valószínűsíthető, hogy esetünkben több, különböző reakció eltérő poszttranszlációs módosításokat eredményezett a szívizomfehérjéken. Az Cys SH oldalláncai például oxidáció hatására mind reverzibilis (intra- és intermolekuláris diszulfid-hidak képződése), további oxidáció hatására pedig irreverzibilis (szulfinsav, szulfonsav) reakciókban vesznek részt⁽³⁵⁾. Ugyanígy a Met is szenvedhet reverzibilis és irreverzibilis (Met-szulfon) módosulást⁽³³⁾, a HOCl pedig bizonyítottan fehérje karbonilációt is okoz, amely szintén irreverzibilis folyamat.

Jelen tanulmányunkban a H_2O_2 +MPO hatására megfigyelt szívizom SH oxidáció összhangban áll a szívizom szeleteken nagy dózisú HOCl által kiváltott SH oxidációval⁽¹¹¹⁾. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy oxidatív hatások jelentősen módosíthatják az aktin és miozin filamentumok szerkezetét⁽¹¹²⁾. Humán bal kamrai szívizomsejteken az oxidatív hatású DTDP pedig csökkentette az aktin és a miozin-könnyűlánc-1 SH-tartalmát, mellyel párhuzamosan csökkent a szívizomsejtek aktív erőgenerálása⁽²⁷⁾. Mindezek alapján kísérleteinkben mi is megvizsgáltuk az egyes szívizomfehérjék SH oxidációjának mértékét: aktin esetében szignifikáns SH tartalom csökkenést tapasztaltunk, azonban ennek mértéke nem növekedett MPO hatására, így ez önmagában nem magyarázza a szívizomsejtek aktív erejének csökkenését.

Egy, a munkacsoportunk által korábban használt miokardiális infarktus egér modellben a kalcium-érzékenység csökkenéséhez az aktin és MHC karbonilációja társult, míg magas koncentrációban alkalmazott H_2O_2 az aktin karbonilációját idézte elő⁽¹¹³⁾. Jelen tanulmányunkban 0,1 mM-nál magasabb H_2O_2 dózist annak MPO gátló hatása miatt nem alkalmaztunk⁽⁴⁵⁾, így a funkcionális méréseinknél is használt 30 μ M-os kezelést követően értékeltük a fehérjék karbonilációját. Az aktin és MyBP-C esetében kismértékű növekedést tapasztaltunk a karbonilációs indexben. Mivel ezen paraméterben további növekedést nem észleltünk az MPO kezelés hatására, így az MPO-indukált funkcionális hatásokat nem tudtuk egy-egy konkrét szívizomfehérje SH oxidációjával, vagy karbonilációjával magyarázni.

A szívizom fehérjék között kialakuló keresztkötéseket nem-redukáló pufferben feloldott mintákon vizsgáltuk. *Canton és munkatársai*^(30, 102) nem-redukáló körülmények között aktin, tropomiozin és dezmin fehérjék esetében kereszthídképződést mutattak ki H_2O_2 perfúziót követően patkány szívizomban, valamint Tm dimerek kialakulását tapasztalták szívelégtelen betegekből származó biopsziák vizsgálatakor. Kísérletünkben mi ezzel

szemben egy aktin és Tm ellenes antitestre jelet adó fehérjekomplexet azonosítottunk nem-redukáló körülmények között, melynek mennyisége MPO kezelés hatására a várakozásokkal ellentétben csökkent. A jelenség hátterében valószínűleg az állhat, hogy a kezelés hatására a fehérje oldhatósága csökkent, így nem-redukáló pufferben oldva kevesebb tudott a gélbe jutni.

Az MPO szívizomsejtekre kifejtett hatásának közvetítésében egyéb fehérjemódosulások (pl. klorináció⁽¹¹⁴⁾, nitrálás⁽¹¹⁵⁾, Met oxidáció, szulfonsavképződés⁽¹¹⁶⁾, fehérjedegradáció⁽³¹⁾) is szerepet kaphatnak, melyek vizsgálatára kísérleteink nem terjedtek ki.

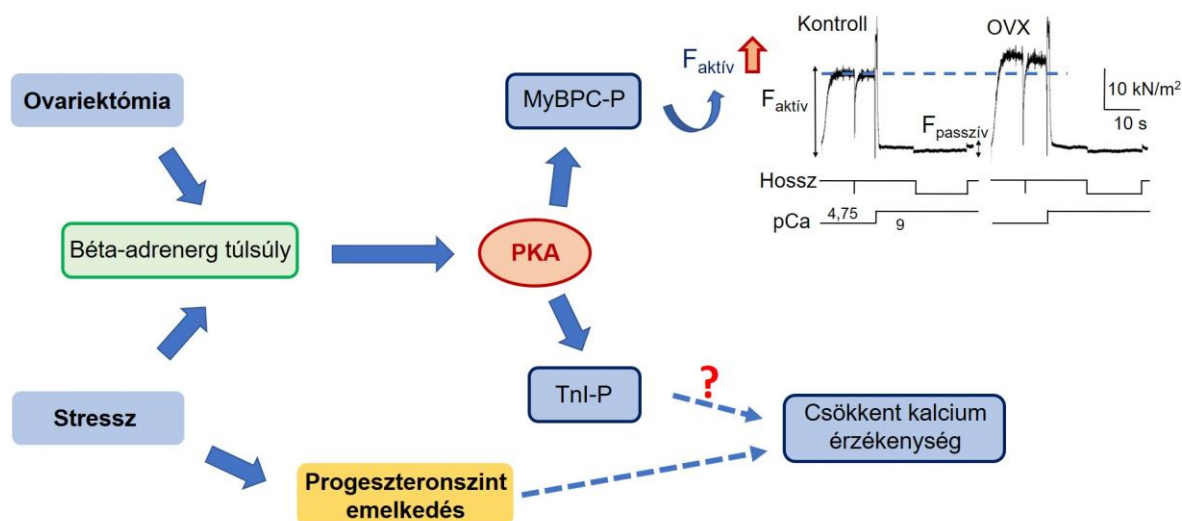
Jelen tanulmányunkban az MPO rontotta a szívizomsejtek kontraktilis funkcióját. Számos tanulmány született már az oxidatív stressz káros hatásairól, azonban újabb bizonyítékok egy sokkal komplexebb kép mellett szólnak. Kimutatták ugyanis, hogy az enyhe oxidatív stressz akár kardioprotektív is lehet, sőt akár javíthatja is a kontraktilis apparátus teljesítményét^(35, 117). Összességében elmondható, hogy az oxidatív ágensek szívizomra kifejtett hatása nagyban függ azok erősségétől és természetétől, valamint a miofilamentumok redox környezetétől.

6.2 A stressz és a női nemi hormonok hatásai a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára és a miofilamentáris fehérjék foszforilációjára

Az elmúlt évtizedekben a fizikai és emocionális stressz, valamint a női nemi hormonok kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt hatásairól számos tanulmány került publikálásra. Ugyanakkor továbbra is kevés adat áll rendelkezésre ezen tényezőknek a szívizom kontraktilis funkcióra és a miofilamentáris fehérjerendszerre kifejtett hatásairól. Fontos megjegyezni, hogy a különböző állatmodellekben az alkalmazott stressz típusa, időtartama, és az alkalmazás módja (akut, vagy krónikus) nagyban befolyásolhatja a kiváltott válaszokat, illetve azok mértékét. Mivel a krónikus stressz hatásai a fellépő deszenzitizáció miatt nehezen tanulmányozhatóak, így jelen állatmodellünkben az akut stressz hatásait vizsgáltuk. A kísérletünkben alkalmazott akut stressz protokoll (hideg immobilizációval) hatására az ACTH és kortikoszteroid szintek növekedése, a szívfrekvencia csökkenése és a pulzustérfogat emelkedése következik be⁽¹¹⁸⁾.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy 1. a stressznek kitett állatcsoportokban (kontroll-S, OVX-S) a szérum progeszteron szint több mint háromszor magasabb, mint a kontroll és OVX állatokban; 2. az OVX állatokból származó szívizomsejtek $F_{\text{aktív}}$ -ja

szignifikánsan magasabb a kontroll állatokéhoz képest; 3. $F_{\text{passzív}}$ és kalcium érzékenység (pCa_{50}) nem különbözik az egyes állatcsoportok között, azonban akut stresszt követően pCa_{50} jelzett csökkenése figyelhető meg; 4. a szérum progoszteron szint inverz korrelációt mutat a pCa_{50} értékekkel; 5. a miofilamentáris fehérjék összetétele nem különbözik a vizsgált állatcsoportokban, ugyanakkor a MyBP-C foszforilációja szignifikánsan magasabb az OVX állatokban (25. ábra).



25. ábra: Az ovariectómia és az akut stressz vizsgálata során kapott eredményeink összefoglalása (Magyarázat a szövegben)

Ismert, hogy stressz hatására a szérum progoszteron szint nemtől függetlenül jelentősen megemelkedik, melynek háttérében a hormon mellékvesekéregből történő szekréciója áll^(82, 84, 119). A progoszteron (kortizol előanyaga) szint növekedése fontos komponense a szervezet hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengelye által közvetített stresszválasznak^(119, 120). A progoszteronszint jelentős emelkedése az általunk vizsgált állatmodellben is megfigyelhető volt a stressznek kitett Kontroll, és OVX-en átesett állatcsoportban. *Sze és kutatócsoportja*⁽¹²¹⁾ hím és nőstény patkányokon úszás hatására a szérum progoszteron szint szignifikáns növekedését mutatták ki, bár ennek kiindulási szintje és a növekedés mértéke némiképp elmaradt a kísérleteinkben az OVX és OVX-S csoportokban megfigyelt változásoktól. *Kalil és munkatársai*⁽⁸⁴⁾ az immobilizáció, mint stresszforrás hatására bekövetkező szérum progoszteron emelkedés időbeli lefolyását vizsgálva szignifikáns mértékű emelkedést mértek a stressz első óráiban nőstény, hím, ovariectomizált nőstény, valamint gonadektómián átesett hím állatokban is. A progoszteron szint emelkedésének mértéke ebben a modellben teljes mértékben

összevethető volt saját kísérleteinkben a Kontroll és az OVX állatcsoportokban mért hormonszintekkel.

A progeszteron szívre gyakorolt hatásait számos tanulmány vizsgálta, azonban a progeszteron receptorok bal kamrai szívizommintákban történő kimutatására irányuló - progeszteron receptor (PR) A és B magreceptor ellenes antitestek felhasználásával végzett - kísérletek mind egér⁽¹²²⁾, mind pedig humán szövetekben negatív eredménnyel zárultak⁽¹²³⁾. Ezzel szemben humán pitvari szívizomzatban ösztrogén hatására a PR mRNS szintjének növekedését igazolták, melyet fehérjeszinten is sikerült kimutatni posztmenopauzás nőkben, ugyanakkor a PR-expresszió fokozódása a férfiakból származó szövetekben nem volt igazolható⁽¹²⁴⁾. Irodalmi adatok a progeszteron kardiovaszkuláris hatásait egyre inkább nem genomi útvonalak aktiválódásával hozzák összefüggésbe⁽¹²⁵⁾. Az, hogy ezek a gyors szignáltranszdukciós utak is szerepet kapnak a progeszteron válaszbán, felveti az akut stressz által kiváltott progeszteronszint emelkedés esetleges hatásait a szívizomsejtek kontraktilis működésére és/vagy annak szabályozására.

A stressz hatására felszabaduló katekolamin többlet a β -adrenerg jelátviteli úton keresztül a PKA aktiválódásához vezet. A TnI PKA-mediált foszforilációja a miofilamentáris rendszer kalcium érzékenységének csökkenése révén befolyásolja a kontraktilis funkciót⁽⁹⁹⁾. Jelen tanulmányunkban nem találtunk jelentős különbséget a pCa_{50} értékek között a négy állatcsoportban, csupán egy, a stressz hatására bekövetkező, kismértékű, nem szignifikáns kalcium érzékenység csökkenés volt megfigyelhető a stressznek kitett Kontroll-S, illetve az OVX-S állatcsoportok esetében, ez azonban nem járt együtt a TnI fehérje foszforilációs állapotának változásával. Az ellentmondó eredményeket az általunk használt nem kináz- és foszforilációs hely specifikus festési eljárás is magyarázhatja. Kísérleteink során ugyanis az egyes fehérjék összfoszforilációs szintjét határoztuk meg, mely nem ad információt a különböző protein-kinázok (PKA, PKC- β II, δ , ϵ) által mediált specifikus foszforilációs helyekről. Utóbbiak foszforilációja ugyanis akár ellentétes módon is befolyásolhatja a miofilamentáris rendszer kalcium érzékenységét⁽¹²⁶⁾. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy a PKA-függő foszforiláció szintje rágcsálók esetében magasabb, mint a nagyobb emlősök esetében, ami megnehezíti a kisebb különbségek kimutatását⁽¹²⁷⁾.

Kísérleteink során szignifikáns összefüggést találtunk a szérum progeszteron szint és a szívizomsejtek pCa_{50} értékei között. Ez arra utal, hogy a Kontroll-S, illetve az OVX-S állatokban megfigyelt kismértékű, nem szignifikáns Ca^{2+} érzékenység csökkenés kiváltója

az emocionális stressz volt. A megfigyelésünk alapján azonban nem dönthető el egyértelműen, hogy a Ca^{2+} érzékenységre a stressz indukált progeszteron, vagy a stressz hatására kialakuló β -adrenerg túlsúly volt hatással. *Feridooni és munkatársai*⁽¹²⁸⁾ a progeszteron akut hatásait vizsgálva egér szíven ugyancsak a Ca^{2+} érzékenység csökkenését figyelték meg a nőstények esetében progeszteron adását követően, mely változás progeszteron receptor antagonistával kivédhetőnek bizonyult. A progeszteron ugyanakkor hím állatokban nem befolyásolta a Ca^{2+} -érzékenységet.

Ovariektómiát követően a β -adrenerg receptorok upregulációja és a β -adrenerg jelátviteli út stimulációja következik be⁽¹²⁹⁾, mely a szíven pozitív inotróp hatást közvetít, emeli a szívfrekvenciát és a kontraktilitást⁽¹³⁰⁾. Kísérletes körülmények között az ovariektómia növeli mind az alap és az izoprenalin-indukálta kontrakciót, valamint a β 1-adrenerg receptor expresszióját⁽¹³¹⁾. A β 1-adrenerg receptor stimulációja Gs proteineket aktiválva a cAMP koncentráció növekedéséhez és PKA aktiválódáshoz vezet. A PKA képes foszforilálni a miofilamentáris fehérjéket, többek között a MyBP-C-t is⁽¹³²⁾. A MyBP-C fehérje foszforilációja gyorsítja az aktin-miozin kereszthidak kialakulásának kinetikáját⁽¹³³⁾ és növeli a kalcium aktiválta maximális erőt⁽¹³⁴⁾. Ezen megfigyeléssel összhangban, kísérleteinkben is szignifikáns $F_{\text{aktív}}$ növekedést tapasztaltunk az OVX állatokban. Ezen felül a MyBP-C foszforilációja szignifikáns korrelációt mutatott az $F_{\text{aktív}}$ értékekkel. Eredményeink alapján az OVX állatokból izolált szívizomsejtek $F_{\text{aktív}}$ növekedésének hátterében az ovariektómia hatására bekövetkező β 1-adrenerg stimuláció következtében kialakuló MyBP-C foszforiláció állhat. A női szívizomsejtekben fiziológiásan is kisebb és lassabb kontrakciókat, valamint alacsonyabb Ca^{2+} tranzienseket mutattak ki, melyek hozzájárulhatnak a nők esetében megfigyelhető alacsonyabb CV rizikóhoz⁽¹³⁵⁾.

Wattanapermpool és munkatársai⁽¹³⁶⁾ patkányokban emelkedett kalcium érzékenységet és csökkent miofibrilláris ATPáz aktivitást találtak 10 héttel az ovariektómia után. Ezzel szemben kísérleteinkben 16 héttel az ovariektómiát követően a $p\text{Ca}_{50}$ értékek az OVX és a Kontroll állatcsoportban nem különböztek. A tapasztalt eltérés az ovariektómia után a szívizom kontraktilis funkciójában az esetleges kompenzatórikus mechanizmusok aktiválódásának időfüggésére hívja fel a figyelmet.

Munkánk során nem találtunk különbséget az egyes állatcsoportok között sem az $F_{\text{passzív}}$ értékekben, sem pedig annak fő regulátorának, a titin fehérjének a foszforilációs állapotában. *Bupha-Intr*⁽¹³⁷⁾ patkány trabekula preparátumokon, illetve szívizommintákon

végzett kísérleteiben az ovariectomia ugyancsak nem volt hatással a szívizom merevségre, a kollagén tartalomra, valamint a titin izoforma arányra sem. Nőkben azonban a bal kamra szívizomzat nagyobb merevsége hozzájárulhat a diasztolés diszfunkció gyakoribb előfordulásához.

A tanulmányunkban alkalmazott stressz forma (hideg és immobilizáció) a mindennapi életben viszonylag ritkán fordul elő. Az akut, főként emocionális vagy fizikai stressz hatására létrejövő, a klinikai gyakorlatban is gyakran megfigyelhető takotsubo kardiomiopátia (TCM) a bal kamra és szívcsúcs átmeneti, az esetek többségében teljesen reverzibilis falmozgászavara. A betegek szérumában háromszor magasabb katecholamin koncentráció mutatható ki, mint a MI-ban szenvedő betegeknél⁽⁹⁶⁾. A TCM az esetek döntő többségében posztmenopauzális nőkben alakul ki. *Ueyama és munkatársai*⁽¹³⁸⁾ a TCM patkánymodelljében kimutatták, hogy az OVX állatok között nagyobb mértékben csökkent a bal kamra funkció azokban az egyedekben, akik nem részesültek ösztrogénpótlásban. A TCM patofiziológiája máig nem ismert teljes mértékben, azonban a közelmúlt kutatásai világossá tették, hogy egyes betegeknél a korai szövődmények (akut szívelégtelenség, malignus kamrai ritmuszavarok, hirtelen halál) kialakulása mellett a szívfunkció tartós károsodását is eredményezheti. A TCM lehetséges kiváltó okainak alaposabb megismerése az elmúlt években jelentősen megváltoztatta ennek a korábban benignusnak vélt kórállapotnak a klinikai megítélését. Ezáltal egyre nagyobb igény mutatkozik a TCM hátterében álló akut és késői folyamatok részletes feltérképezésére, valamint adekvát, specifikus terápia kidolgozására.

7 Összegzés

Az oxidatív stressz és az akut stressz fontos szerepet játszik számos kardiovaszkuláris betegség (pl. miokardiális inkarktusz, iszkémia-reperfúziós károsodás, szívelégtelenség) kialakulásában. Összetett hatásmechanizmusuk egyik pilléréként a miofilamentáris fehérjék poszttranszlációs módosításai által kontraktilis diszfunkciót is előidézhetnek.

A mieloperoxidáz enzim (MPO) hatására képződő oxidánsok *in vitro* az aktív erő és a miofilamentáris rendszer kalcium érzékenységének csökkentése, valamint a passzív erő növelése révén károsítják a humán bal kamrai szívmusclejtek kontraktilis funkcióját. Ezen funkcionális hatások létrejöttében szerepet játszhat a szulfhidril-csoport (SH) oxidáció, míg a fehérje karboniláció jelentősége elhanyagolhatónak tűnik. A MPO hatásai MPO inhibitorral és az antioxidáns hatású metioninnal kivédhetőek. Az azonosított funkcionális és biokémiai eltérések terápiás jelentőséggel bírhatnak az MPO által indukált kontraktilis diszfunkció és miofilamentáris fehérjeváltozások kivédésében/visszafordításában emelkedett MPO szinttel járó kardiovaszkuláris kórfolyamatokban. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az akut stressz hatására jelentős mértékben növekszik a szérumban a progeszteronszint mind nem ovariectomizált, mind pedig ovariectomizált nőstény patkányokban. Az ösztrogén hiánya befolyásolja a bal kamrai izolált szívmusclejtek funkcióját: a miozin-kötő C fehérje (MyBP-C) foszforilációja által növekszik a Ca^{2+} -aktivált erőgenerálás. A szérumban a progeszteron szint növekedésével párhuzamosan csökken a miofilamentáris rendszer kalcium érzékenysége, melynek hátterében a szervezet emocionális stresszre adott védelmi válasza állhat.

Az oxidánsok károsító és a női nemi hormonok védő szerepének pontos mechanizmusa a fent említett kardiovaszkuláris betegségeknél továbbra sem teljesen tisztázott. A specifikus miofilamentáris fehérje módosulások funkcionális hatásainak pontosabb megértése nagyban hozzájárulhat a kardiovaszkuláris betegségek újszerű kezelési lehetőségeinek kifejlesztéséhez.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00048 számú, „Életet veszélyeztető akut megbetegedések súlyossági és halálozási mutatóinak javítása transzlációs orvostudományi megközelítésben – Stay Alive” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.



8 Summary

Oxidative stress and acute stress have been showed to play an important role in the pathogenesis of several cardiovascular pathologies (myocardial infarction, ischemia/reperfusion injury, heart failure). Among multiple pivotal effects they also induce contractile dysfunction by posttranslational modifications of myofilament proteins.

In our experiments the *MPO-derived oxidants* contributed to myocardial contractile dysfunction *in vitro* by decreasing the cardiomyocyte force production and the myofilament Ca^{2+} sensitivity and increasing the passive force component in human cardiomyocytes. These functional alterations could be induced by SH group oxidation, however, seemed to be independent from carbonylation of myofilamentary proteins. The deleterious effects of MPO could be prevented by MPO inhibition and the antioxidant Met. The identified functional and biochemical alterations may provide a pharmacological tool for the prevention and/or reversion of MPO-induced contractile dysfunction and myofilament protein alterations, which could have therapeutic implications in cardiac pathologies characterized by elevated MPO levels. In our other study, single acute stress significantly increased serum progesterone levels in both non- ovariectomized and ovariectomized rats. The lack of estrogen alters contractile function of left ventricular isolated cardiomyocytes by increasing Ca^{2+} -activated force production through myosin-binding protein C phosphorylation. Parallel with the stress-induced increase in the serum progesterone level, a decrease in the myofilament Ca^{2+} -sensitivity could be observed. The latter might be a protective response of the body to the emotional stress.

The exact mechanisms underlying the detrimental effects of oxidants and the protective effects of female hormones in the pathogenesis of the above-mentioned cardiac pathologies remains unanswered. Better understanding of the functional consequences of the specific myofilament protein modifications may lead to the development of novel therapeutic approaches for cardiovascular diseases.

*The preparation of this doctoral thesis was supported by
GINOP-2.3.2-15-2016-00048 Stay alive project of the European Union
and co-financed by the European Regional Development Fund.*



9 Irodalomjegyzék

1. Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 2014; 114(3): 524-37.
2. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart.* 2007; 93(8): 903-7.
3. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens.* 1998; 16(3): 291-303.
4. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998; 92(9): 3007-17.
5. Liu X, Zweier JL. A real-time electrochemical technique for measurement of cellular hydrogen peroxide generation and consumption: evaluation in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(7): 894-901.
6. Mutze S, Hebling U, Stremmel W, Wang J, Arnhold J, Pantopoulos K, et al. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. *J Biol Chem.* 2003; 278(42): 40542-9.
7. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013; 1: 244-57.
8. Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients.* 2019; 11(9).
9. Rodrigo R, Libuy M, Feliu F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers.* 2013; 35(6): 773-90.
10. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003; 42(6): 1075-81.
11. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; 407(6801): 233-41.
12. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87(10): 840-4.
13. Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med.* 2014; 24(5): 202-5.
14. Reimer KA, Murry CE, Richard VJ. The role of neutrophils and free radicals in the ischemic-reperfused heart: why the confusion and controversy? *J Mol Cell Cardiol.* 1989; 21(12): 1225-39.
15. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004; 61(3): 481-97.
16. Chatelain P, Latour JG, Tran D, de Lorgeril M, Dupras G, Bourassa M. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation.* 1987; 75(5): 1083-90.
17. Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, Winkelstein JA, Becker LC. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation.* 1989; 80(6): 1816-27.

18. Fang L, Moore XL, Dart AM, Wang LM. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol.* 2015; 12(3): 305-12.
19. Afanas'ev I. ROS and RNS signaling in heart disorders: could antioxidant treatment be successful? *Oxid Med Cell Longev.* 2011; 2011: 293769.
20. Sirker A, Zhang M, Murdoch C, Shah AM. Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure. *Am J Nephrol.* 2007; 27(6): 649-60.
21. Landmesser U, Wollert KC, Drexler H. Potential novel pharmacological therapies for myocardial remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009; 81(3): 519-27.
22. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(35): 15565-70.
23. Sawyer DB. Oxidative stress in heart failure: what are we missing? *Am J Med Sci.* 2011; 342(2): 120-4.
24. Steinberg SF. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circ Res.* 2013; 112(2): 393-405.
25. MacFarlane NG, Miller DJ. Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ Res.* 1992; 70(6): 1217-24.
26. Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, et al. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res.* 2005; 67(2): 225-33.
27. Hertelendi Z, Toth A, Borbely A, Galajda Z, van der Velden J, Stienen GJ, et al. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(7): 1175-84.
28. Sumandea MP, Steinberg SF. Redox signaling and cardiac sarcomeres. *J Biol Chem.* 2011; 286(12): 9921-7.
29. Avner BS, Hinken AC, Yuan C, Solaro RJ. H₂O₂ alters rat cardiac sarcomere function and protein phosphorylation through redox signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299(3): H723-30.
30. Canton M, Neverova I, Menabo R, Van Eyk J, Di Lisa F. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286(3): H870-7.
31. Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids.* 2003; 25(3-4): 259-74.
32. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(26): 15036-40.
33. Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(1): 93-105.
34. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev.* 1999; 107(3): 323-32.
35. Chung HS, Wang SB, Venkatraman V, Murray CI, Van Eyk JE. Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2013; 112(2): 382-92.
36. Findlay VJ, Tapiero H, Townsend DM. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomed Pharmacother.* 2005; 59(7): 374-9.

37. Nystrom T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 2005; 24(7): 1311-7.
38. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003; 9(4): 169-76.
39. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest.* 1997; 99(9): 2075-81.
40. Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem.* 1996; 271(32): 19199-208.
41. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2004; 114(4): 529-41.
42. Heinecke JW, Li W, Daehnke HL, 3rd, Goldstein JA. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J Biol Chem.* 1993; 268(6): 4069-77.
43. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 445(2): 214-24.
44. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(6): 1102-11.
45. Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol.* 2007; 152(6): 838-54.
46. Arnhold J, Flemmig J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 500(1): 92-106.
47. Lane AE, Tan JT, Hawkins CL, Heather AK, Davies MJ. The myeloperoxidase-derived oxidant HOSCN inhibits protein tyrosine phosphatases and modulates cell signalling via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. *Biochem J.* 2010; 430(1): 161-9.
48. van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(11): 2899-937.
49. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49(20): 1993-2000.
50. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008; 2008: 135625.
51. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, Lau D, Mollnau H, Ortak M, et al. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(6): 902-11.
52. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(12): 1717-25.
53. Sinning C, Schnabel R, Peacock WF, Blankenberg S. Up-and-coming markers: myeloperoxidase, a novel biomarker test for heart failure and acute coronary syndrome application? *Congest Heart Fail.* 2008; 14(4 Suppl 1): 46-8.

54. Spickett CM, Jerlich A, Panasencko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszynska T, et al. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol.* 2000; 47(4): 889-99.
55. Zhang C, Patel R, Eiserich JP, Zhou F, Kelpke S, Ma W, et al. Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281(4): H1469-75.
56. Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chem Res Toxicol.* 2001; 14(8): 1071-81.
57. Prutz WA. Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 349(1): 183-91.
58. Pattison DI, Davies MJ. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem Res Toxicol.* 2001; 14(10): 1453-64.
59. Winterbourn CC. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology.* 2002; 181-182: 223-7.
60. Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(5): 403-9.
61. Linke WA, Kruger M. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda).* 2010; 25(3): 186-98.
62. Linke WA. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2008; 77(4): 637-48.
63. LeWinter MM, Granzier H. Cardiac titin: a multifunctional giant. *Circulation.* 2010; 121(19): 2137-45.
64. Kruger M, Linke WA. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46(4): 490-8.
65. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, et al. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2004; 110(2): 155-62.
66. Wu Y, Bell SP, Trombitas K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM, et al. Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation.* 2002; 106(11): 1384-9.
67. Kruger M, Linke WA. The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem.* 2011; 286(12): 9905-12.
68. Hamdani N, Krysiak J, Kreuzer MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, et al. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res.* 2013; 112(4): 664-74.
69. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MP, Bronzwaer JG, et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation.* 2012; 126(7): 830-9.
70. Borbely A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, et al. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res.* 2009; 104(6): 780-6.
71. Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, et al. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res.* 2009; 105(7): 631-8, 17 p following 38.

72. Grutzner A, Garcia-Manyes S, Kotter S, Badilla CL, Fernandez JM, Linke WA. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys J*. 2009; 97(3): 825-34.
73. Fazal L, Azibani F, Vodovar N, Cohen Solal A, Delcayre C, Samuel JL. Effects of biological sex on the pathophysiology of the heart. *Br J Pharmacol*. 2014; 171(3): 555-66.
74. Rossouw JE. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2002; 53(3): 550-7.
75. Murphy E, Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2007; 75(3): 478-86.
76. Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Seeland U, Hetzer R. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circ J*. 2010; 74(7): 1265-73.
77. Meyer MR, Haas E, Barton M. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. *Hypertension*. 2006; 47(6): 1019-26.
78. Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2002; 53(3): 672-7.
79. Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(5): 425-38.
80. Khalil RA. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. *Hypertension*. 2005; 46(2): 249-54.
81. Stice JP, Knowlton AA. Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response. *Mol Med*. 2008; 14(7-8): 517-27.
82. Fajer AB, Holzbauer M, Newport HM. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. *J Physiol*. 1971; 214(1): 115-26.
83. Wirth MM, Meier EA, Fredrickson BL, Schultheiss OC. Relationship between salivary cortisol and progesterone levels in humans. *Biol Psychol*. 2007; 74(1): 104-7.
84. Kalil B, Leite CM, Carvalho-Lima M, Anselmo-Franci JA. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress*. 2013; 16(4): 452-60.
85. Holzbauer M, Newport HM. Quantitative estimation of 17alpha-hydroxypregn-4-ene-3,20-dione (17alphaOH-progesterone) in adrenal venous blood and adrenal glands. *J Physiol*. 1968; 198(1): 91-102.
86. Singh M, Su C, Ng S. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front Neurosci*. 2013; 7: 159.
87. Thomas P, Pang Y. Protective actions of progesterone in the cardiovascular system: potential role of membrane progesterone receptors (mPRs) in mediating rapid effects. *Steroids*. 2013; 78(6): 583-8.
88. Dhote VV, Balaraman R. Gender specific effect of progesterone on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci*. 2007; 81(3): 188-97.
89. Cheng J, Zhang J, Ma X, Su D. Frequency-dependent acceleration of cardiac repolarization by progesterone underlying its cardiac protection against drug-induced proarrhythmic effects in female rabbits. *Eur J Pharmacol*. 2012; 689(1-3): 172-8.
90. Morrissy S, Xu B, Aguilar D, Zhang J, Chen QM. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. *Aging Cell*. 2010; 9(5): 799-809.

91. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. In vitro effects of progesterone and progestins on vascular cells. *Steroids*. 2003; 68(10-13): 831-6.
92. Komamura K, Fukui M, Iwasaku T, Hirotani S, Masuyama T. Takotsubo cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *World J Cardiol*. 2014; 6(7): 602-9.
93. Akashi YJ, Goldstein DS, Barbaro G, Ueyama T. Takotsubo cardiomyopathy: a new form of acute, reversible heart failure. *Circulation*. 2008; 118(25): 2754-62.
94. Wright PT, Tranter MH, Morley-Smith AC, Lyon AR. Pathophysiology of takotsubo syndrome: temporal phases of cardiovascular responses to extreme stress. *Circ J*. 2014; 78(7): 1550-8.
95. Roshanzamir S, Showkathali R. Takotsubo cardiomyopathy a short review. *Curr Cardiol Rev*. 2013; 9(3): 191-6.
96. Lyon AR, Citro R, Schneider B, Morel O, Ghadri JR, Templin C, et al. Pathophysiology of Takotsubo Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2021; 77(7): 902-21.
97. Fonyó A, Ligeti E. Az orvosi élettan tankönyve.
98. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005; 111(6): 774-81.
99. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, et al. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res*. 2003; 57(1): 37-47.
100. Gresham KS, Stelzer JE. The contributions of cardiac myosin binding protein C and troponin I phosphorylation to beta-adrenergic enhancement of in vivo cardiac function. *J Physiol*. 2016; 594(3): 669-86.
101. Fabiato A, Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Paris)*. 1979; 75(5): 463-505.
102. Canton M, Skyschally A, Menabo R, Boengler K, Gres P, Schulz R, et al. Oxidative modification of tropomyosin and myocardial dysfunction following coronary microembolization. *Eur Heart J*. 2006; 27(7): 875-81.
103. Miller DJ, MacFarlane NG. Intracellular effects of free radicals and reactive oxygen species in cardiac muscle. *J Hum Hypertens*. 1995; 9(6): 465-73.
104. MacFarlane NG, Miller DJ. Effects of the reactive oxygen species hypochlorous acid and hydrogen peroxide on force production and calcium sensitivity of rat cardiac myofilaments. *Pflugers Arch*. 1994; 428(5-6): 561-8.
105. van Heerebeek L, Franssen CP, Hamdani N, Verheugt FW, Somsen GA, Paulus WJ. Molecular and cellular basis for diastolic dysfunction. *Curr Heart Fail Rep*. 2012; 9(4): 293-302.
106. Borbely A, van Heerebeek L, Paulus WJ. Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circ Res*. 2009; 104(1): 12-4.
107. Tiden AK, Sjogren T, Svensson M, Bernlind A, Senthilmohan R, Auchere F, et al. 2-thioxanthines are mechanism-based inactivators of myeloperoxidase that block oxidative stress during inflammation. *J Biol Chem*. 2011; 286(43): 37578-89.
108. Szuchman-Sapir AJ, Pattison DI, Ellis NA, Hawkins CL, Davies MJ, Witting PK. Hypochlorous acid oxidizes methionine and tryptophan residues in myoglobin. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45(6): 789-98.

109. Oien DB, Canello T, Gabizon R, Gasset M, Lundquist BL, Burns JM, et al. Detection of oxidized methionine in selected proteins, cellular extracts and blood serums by novel anti-methionine sulfoxide antibodies. *Arch Biochem Biophys.* 2009; 485(1): 35-40.
110. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Di Simplicio P, Colombo R, et al. Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(9): 927-37.
111. Fliss H. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Mol Cell Biochem.* 1988; 84(2): 177-88.
112. Wilson GJ, dos Remedios CG, Stephenson DG, Williams DA. Effects of sulphhydryl modification on skinned rat skeletal muscle fibres using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *J Physiol.* 1991; 437: 409-30.
113. Balogh A, Santer D, Pasztor ET, Toth A, Czuriga D, Podesser BK, et al. Myofilament protein carbonylation contributes to the contractile dysfunction in the infarcted LV region of mouse hearts. *Cardiovasc Res.* 2014; 101(1): 108-19.
114. Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr.* 2011; 48(1): 8-19.
115. Yan Z, Liang F, Guo L, Wang J, Wang XL, Cheng XL, et al. Myeloperoxidase increased cardiomyocyte protein nitration in mice subjected to nonlethal mechanical trauma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393(3): 531-5.
116. Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46(8): 965-88.
117. Gao WD, Murray CI, Tian Y, Zhong X, DuMond JF, Shen X, et al. Nitroxyl-mediated disulfide bond formation between cardiac myofilament cysteines enhances contractile function. *Circ Res.* 2012; 111(8): 1002-11.
118. Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009; 33(7): 1089-98.
119. Traslavina GA, Franci CR. The CRH-R(1) receptor mediates luteinizing hormone, prolactin, corticosterone and progesterone secretion induced by restraint stress in estrogen-primed rats. *Brain Res.* 2011; 1421: 11-9.
120. Baker ME, Chandsawangbhuwana C, Ollikainen N. Structural analysis of the evolution of steroid specificity in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *BMC Evol Biol.* 2007; 7: 24.
121. Sze Y, Gill AC, Brunton PJ. Sex-dependent changes in neuroactive steroid concentrations in the rat brain following acute swim stress. *J Neuroendocrinol.* 2018; 30(11): e12644.
122. Uotinen N, Puustinen R, Pasanen S, Manninen T, Kivineva M, Syvala H, et al. Distribution of progesterone receptor in female mouse tissues. *Gen Comp Endocrinol.* 1999; 115(3): 429-41.
123. Asavasupreechar T, Saito R, Miki Y, Edwards DP, Boonyaratanakornkit V, Sasano H. Systemic distribution of progesterone receptor subtypes in human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020; 199: 105599.
124. Kararigas G, Becher E, Mahmoodzadeh S, Knosalla C, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific modification of progesterone receptor expression by 17beta-oestradiol in human cardiac tissues. *Biol Sex Differ.* 2010; 1(1): 2.
125. Nakamura H, Kurokawa J, Bai CX, Asada K, Xu J, Oren RV, et al. Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway: an in vitro patch-clamp and computational modeling study. *Circulation.* 2007; 116(25): 2913-22.

126. Solaro RJ, van der Velden J. Why does troponin I have so many phosphorylation sites? Fact and fancy. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48(5): 810-6.
127. Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, et al. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008; 29(6-8): 189-201.
128. Feridooni HA, MacDonald JK, Ghimire A, Pyle WG, Howlett SE. Acute exposure to progesterone attenuates cardiac contraction by modifying myofilament calcium sensitivity in the female mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017; 312(1): H46-H59.
129. Thawornkaiwong A, Preawnim S, Wattanapermpool J. Upregulation of beta 1-adrenergic receptors in ovariectomized rat hearts. *Life Sci.* 2003; 72(16): 1813-24.
130. Kam KW, Qi JS, Chen M, Wong TM. Estrogen reduces cardiac injury and expression of beta1-adrenoceptor upon ischemic insult in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 309(1): 8-15.
131. Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao YL, Yan CD, Gu SL. Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol.* 2008; 93(9): 1034-43.
132. Yang Q, Hewett TE, Klevitsky R, Sanbe A, Wang X, Robbins J. PKA-dependent phosphorylation of cardiac myosin binding protein C in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2001; 51(1): 80-8.
133. Tong CW, Stelzer JE, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. Acceleration of crossbridge kinetics by protein kinase A phosphorylation of cardiac myosin binding protein C modulates cardiac function. *Circ Res.* 2008; 103(9): 974-82.
134. Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res.* 2000; 86(1): 51-8.
135. Parks RJ, Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling. *Pflugers Arch.* 2013; 465(5): 747-63.
136. Wattanapermpool J. Increase in calcium responsiveness of cardiac myofilament activation in ovariectomized rats. *Life Sci.* 1998; 63(11): 955-64.
137. Bupha-Intr T, Oo YW, Wattanapermpool J. Increased myocardial stiffness with maintenance of length-dependent calcium activation by female sex hormones in diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300(5): H1661-8.
138. Ueyama T, Hano T, Kasamatsu K, Yamamoto K, Tsuruo Y, Nishio I. Estrogen attenuates the emotional stress-induced cardiac responses in the animal model of Tako-tsubo (Ampulla) cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42 Suppl 1: S117-9.

10 Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/52/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kalász Judit
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kalász, J.**, Pásztorné Tóth, E., Fagyas, M., Balogh, Á., Tóth, A., Csató, V., Édes, I., Papp, Z., Borbély, A.: Myeloperoxidase impairs the contractile function in isolated human cardiomyocytes.
Free Radic. Biol. Med. 84, 116-127, 2015.
IF: 5.784
2. **Kalász, J.**, Pásztorné Tóth, E., Bódi, B., Fagyas, M., Tóth, A., Bhattoa, H. P., Vári, S. G., Balog, M., Blažetić, S., Heffer, M., Papp, Z., Borbély, A.: Single acute stress-induced progesterone and ovariectomy alter cardiomyocyte contractile function in female rats.
Croat. Med. J. 55 (3), 239-249, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3325/cmj.2014.55.239>
IF: 1.305

További közlemények

3. Kovács, Á., **Kalász, J.**, Pásztorné Tóth, E., Tóth, A., Papp, Z., Dhalla, N. S., Barta, J.: Myosin heavy chain and cardiac troponin T damage is associated with impaired myofibrillar ATPase activity contributing to sarcomeric dysfunction in Ca²⁺-paradox rat hearts.
Mol. Cell. Biochem. 403 (1-2), 57-68, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-017-2954-8>
IF: 2.561
4. Alvarado, G., Jeney, V., Tóth, A., Csősz, É., Kalló, G., Huynh, A. T., Hajnal, C., **Kalász, J.**, Pásztorné Tóth, E., Édes, I., Gram, M., Akerström, B., Smith, A., Eaton, J. W., Balla, G., Papp, Z., Balla, J.: Heme-induced contractile dysfunction in Human cardiomyocytes caused by oxidant damage to thick filament proteins.
Free Radic. Biol. Med. 89, 248-262, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.158>
IF: 5.784





5. Csató, V., Pető, A., Fülöp, G. Á., Rutkai, I., Pásztoriné Tóth, E., Fagyas, M., **Kalász, J.**, Édes, I., Tóth, A., Papp, Z.: Myeloperoxidase evokes substantial vasomotor responses in isolated skeletal muscle arterioles of the rat.
Acta Physiol. 214 (1), 109-123, 2015.
IF: 4.066
6. Balogh, Á., Tóth, A., Pásztoriné Tóth, E., Nagy, L., Kovács, Á., **Kalász, J.**, Contreras, G. A., Édes, I., Papp, Z.: Myofilament carbonylation modulates contractility in human cardiomyocytes.
Exp. Clin. Cardiol. 20 (1), 2026-2035, 2014.
7. Daragó, A., Fagyas, M., Mányiné Siket, I., Facskó, A., Megyesi, Z., **Kalász, J.**, Galajda, Z., Szerafin, T., Hársfalvi, J., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A., Szentmiklósi, J. A.: Differences in Angiotensin Convertase Enzyme (ACE) Activity and Expression May Contribute to Shorter Event Free Period After Coronary Artery Bypass Graft Surgery.
Cardiovasc. Ther. 30 (3), 136-144, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00252.x>
IF: 2.852

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,352

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
7,089**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.02.12.



11 Tárgyszavak

Magyarul: mieloperoxidáz, oxidatív stressz, szívizomsejt, kontraktilis funkció, akut stressz, ösztrogén, progeszteron, poszttranszlációs fehérje módosítás

Angolul: myeloperoxidase, oxidative stress, cardiomyocyte, contractile function, acute stress, estrogen, progesterone, posttranslational protein modification

12 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Borbély Attilának. Orvosi hivatása mellett is mindig szakított időt arra, hogy aktívan hozzájáruljon a közös munkánkhoz. Habár a laborban nagyon keveset volt szerencsénk együtt dolgozni, mégis folyamatosan jelen volt, és tanácsaival, szakértelmével és átgondolt meglátásaival rengeteget tett a kísérletek és cikkek elkészültéért. Végtelen türelmére és csípős humorára nagyon nagy szükségünk volt az évek során. Külön köszönöm, hogy megismerhettem a családját, és remélem, hogy a jövőben témavezetőből és hallgatóból barátokká válhatunk.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Édes Istvánnak, hogy az általa vezetett Kardiológiai Intézetben végezhettem munkámat, mert ez által molekuláris biológusként közelebb kerülhettem ehhez a tudományághoz és közlő szemléltettem az ott zajló magasszintű gyógyító munkát.

Hálával tartozom Prof. Dr. Papp Zoltánnak, amiért az irányítása alatt álló szívizomsejt munkacsoport tagja lehettem. Külön köszönöm azt, hogy betekintést engedett az alapkutatás világába hazai és nemzetközi szinten egyaránt, és hogy hallgatóként az ország és Európa legrangosabb kardiológiai konferenciáira is eljuthattam.

Köszönöm Prof. Dr. Tóth Attilának, hogy lelkes és kreatív kutatói hozzáállásával jó példával járt mindannyiunk előtt. Habár TDK hallgatóként dolgoztunk együtt többet, a PhD éveim alatt is kérhettem a tanácsait, ha elakadtam a munkámmal. Ilyenkor biztos lehettem benne, hogy az irodájából négy telerajzolt papírral és legalább két hétre elegendő feladattal távozom.

Köszönöm a támogatást, a sok közös élményt és együtt eltöltött időt a tanszék akkori hallgatóinak és dolgozóinak! Külön köszönöm Dr. Balogh Ágnesnek azt a sok ismeretet, amit átadott nekem a PhD képzésem elején, későbbiekben pedig a hasznos, átgondolt tanácsai, segítőkészsége és kedvessége sok holtpontra átsegített. Köszönöm továbbá Dr. Bódi Beátának és Dr. Fagyas Miklósnak a kísérletek során nyújtott segítséget.

És aki nélkül ez a munka nem születhetett volna meg: Pásztorné Tóth Enikő. Óriási labortapasztalata, szaktudása és ötletei nélkülözhetetlenek voltak a munkánk során. Örülök, hogy mellette szerezhettem laboratóriumi rutint. Hasznos tanácsai, tippjei a mai napig fülemben csengenek, a tőle ellesett trükkök és mozdulatok pedig már a kezemben vannak és sikerrel kamatoztatom őket a napi munkám során. És azok a nagy nevetések....! Köszönöm, Enikő!

Köszönöm a családom, párom és barátaim támogatását!

Munkámat Drága Szüleimnek és Drága Nagyszüleimnek ajánlom!

(végezetül, köszönöm magamnak)