

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Miokardiális szarkomer diszfunkció  
akut és krónikus patkány modellekben**

**Dr. Kovács Árpád**

**Témavezető: Dr. Barta Judit**



**Debreceni Egyetem**

**Laki Kálmán Doktori Iskola**

**Debrecen, 2017**



## TARTALOMJEGYZÉK

|   |    |
|---|----|
| <b>LEGGYAKORIBB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>  | 6  |
| <b>1. BEVEZETÉS</b>   | 7  |
| <b>2. ELMÉLETI HÁTTÉR ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>  | 11 |
| <b>2.1. A szarkomer működésének molekuláris alapjai</b>                                   | 11 |
| <i>A kontraktilis apparátus aktív mechanikája</i>   | 11 |
| <i>A kontraktilis rendszer passzív feszülése</i>  | 13 |
| <b>2.2. A Ca<sup>2+</sup> szerepe akut miokardiális diszfunkcióban</b>                    | 16 |
| <i>Miokardiális iszkémia-reperfúzió</i>   | 16 |
| <i>A Ca<sup>2+</sup> paradox jelenség</i>   | 18 |
| <b>2.3. A RAS szerepe krónikus miokardiális diszfunkcióban</b>                            | 19 |
| <i>A RAS útvonalak patofiziológiai szerepe</i>  | 20 |
| <i>Az mRen2 patkány modell</i>  | 22 |
| <b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b>  | 24 |
| <b>3.1. A szarkomer diszfunkció mechanizmusának vizsgálata Ca<sup>2+</sup> paradoxban</b> | 24 |
| <b>3.2. A szöveti RAS szerepének vizsgálata diasztolés diszfunkcióban</b>                 | 24 |
| <b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>  | 25 |
| <b>4.1. Módszerek I: a Ca<sup>2+</sup> paradox modell</b>                                 | 25 |
| <i>A kísérleti állatok felhasználásának irányelvei</i>                                    | 25 |
| <i>Ca<sup>2+</sup> paradox Langendorff szerint</i>  | 25 |
| <i>Bal kamrai nyomásmérés</i>   | 26 |
| <i>Miofibrilláris ATPáz aktivitás</i>   | 27 |
| <i>Izolált szívműködés mechanikai vizsgálatának mérőrendszere</i>                         | 27 |

|  |    |
|--|----|
| <i>Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)</i>  | 30 |
| <i>Western immunoblot</i>  | 30 |
| <i>MHC izoformák szeparációja</i>  | 31 |
| <i>Titin esszék</i>  | 32 |
| <i>Statisztikai analízis</i>   | 32 |
| <b>4.2. Módszerek II: az mRen2 modell</b>  | 33 |
| <i>A kísérleti állatok felhasználásának irányelvei</i>   | 33 |
| <i>A hipertónia transzgenikus mRen2 patkány modellje</i>   | 33 |
| <i>Miokardiális ACE és ACE2 aktivitás</i>  | 33 |
| <i>Izolált szívműködő sejtek mechanikai teljesítménye</i>  | 35 |
| <i>Titin esszék</i>  | 35 |
| <i>Protein kináz Ca (PKCa) és aktin kontroll Western immunoblot</i>  | 36 |
| <i>Statisztikai analízis</i>   | 37 |
| <b>5. EREDMÉNYEK</b>   | 38 |
| <b>5.1. Kontraktilis és miofibrilláris diszfunkció Ca<sup>2+</sup> paradoxban</b>  | 38 |
| <i>A Ca<sup>2+</sup> paradox drámaian rontja a bal kamra funkciót</i>  | 38 |
| <i>A miofibrilláris Ca<sup>2+</sup>-stimulált ATPáz aktivitás csökken,<br/>míg a Mg<sup>2+</sup>-függő ATPáz aktivitás nő Ca<sup>2+</sup> paradoxban</i> | 39 |
| <i>A Ca<sup>2+</sup> paradox lerontja a szívműködő sejtek Ca<sup>2+</sup>-aktivált erőgenerációját</i>   | 40 |
| <b>5.2. α-MHC és cTnT degradáció Ca<sup>2+</sup> paradoxban</b>  | 42 |
| <i>A Ca<sup>2+</sup> paradox károsítja a miofibrillumok integritását:<br/>célkeresztben az α-MHC és a cTnT</i>   | 42 |
| <b>5.3. Megnövekedett szívműködő sejt Ca<sup>2+</sup>-független passzív feszülés az mRen2 patkányokban</b>   | 46 |
| <i>A Ca<sup>2+</sup>-aktivált erőgeneráció nem változik az mRen2 szívműködő sejtekben</i>  | 46 |

|  |    |
|--|----|
| <i>A passzív feszülés nő az mRen2 szívekben</i>                                      | 47 |
| <b>5.4. A szöveti RAS intracelluláris diszregulációja és a kardiális titin</b>       |    |
| <b>    megváltozott foszforilációs mintázatának kapcsolata az mRen2 modellben</b>    | 48 |
| <i>A szöveti RAS jótékony útvonalának hatásfoka romlik az mRen2 bal kamrában</i>     | 48 |
| <i>A kardiális PKCa expresszió nő az mRen2 modellben</i>                             | 48 |
| <i>A titin PEVK domén foszforilációja nő az mRen2 szívizomzatban</i>                 | 49 |
| <b>6. MEGBESZÉLÉS</b>  | 51 |
| <b>6.1. A kontraktilis fehérjék degradációja az aktomiozin</b>                       |    |
| <b>    mechanoenzim diszfunkciójához vezet kísérletes Ca<sup>2+</sup> paradoxban</b> | 51 |
| <b>6.2. A lokális RAS alternatív útvonalának gyengülése együtt jár a kardiális</b>   |    |
| <b>    titin-mediált passzív feszülés növekedésével mRen2 patkányokban</b>           | 54 |
| <b>6.3. A doktori értekezésben megfogalmazott új tézisek</b>                         | 57 |
| <b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b>  | 58 |
| <b>8. SUMMARY</b>  | 59 |
| <b>IRODALOMJEGYZÉK</b>   | 60 |
| <b>    Hivatkozott közlemények jegyzéke</b>  | 60 |
| <b>    Saját közlemények jegyzéke</b>  | 72 |
| <b>TÁRGYSZAVAK</b>   | 74 |
| <b>KEYWORDS</b>  | 75 |
| <b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>   | 76 |

## LEGGYAKORIBB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**ACE:** angiotenzin konvertáló enzim

**ATP:** adenzin-trifoszfát

**cTnT:** kardiális troponin T

**dP/dt<sub>max</sub>:** a bal kamrai nyomás idő szerinti első deriváltjának maximuma

**dP/dt<sub>min</sub>:** a bal kamrai nyomás idő szerinti első deriváltjának minimuma

**EF:** bal kamrai ejekciós frakció

**HFpEF:** szívelégtelenség megtartott ejekciós frakcióval

**HFrEF:** szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval

**k<sub>tr,max</sub>:** az aktin-miozin erőregeneráció maximális sebességi állandója

**MHC:** miozin nehéz lánc

**mRen2:** egér *Ren-2<sup>d</sup>* renin gént hordozó transzgenikus patkány törzs

**N2-Bus:** szívspecifikus egyedi titin szekvencia

**pCa:**  $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$

**PEVK:** prolinban, glutamátban, valinban és lizinben gazdag titin szekvencia

**RAS:** renin-angiotenzin rendszer

**PKC $\alpha$ :** protein kináz C $\alpha$

**SD:** Sprague-Dawley kontroll patkány törzs

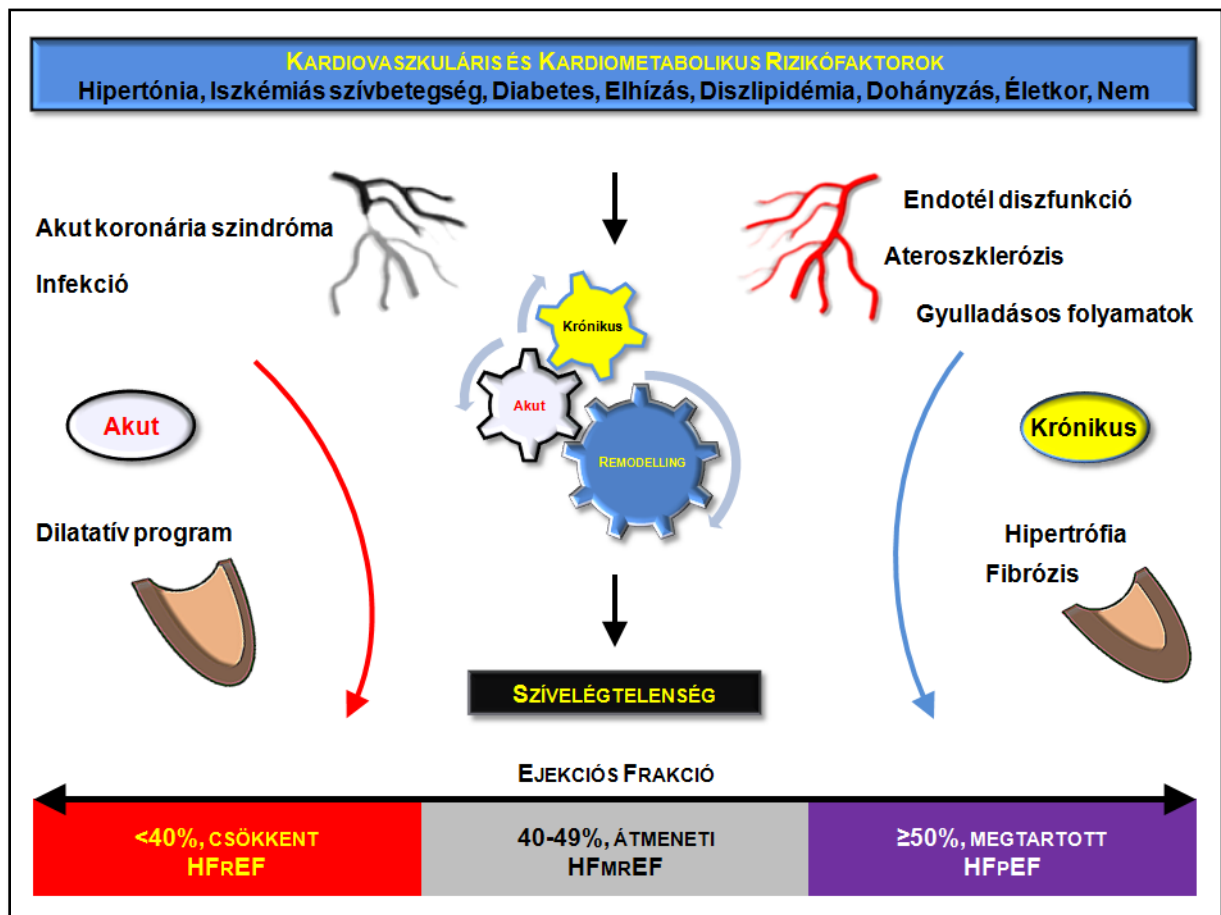
**Ser:** szerin

## 1. BEVEZETÉS

A humán szívelégtelenség egy kardiovaszkuláris epidémia, kiemelkedő egészségügyi problémát és globális kihívást jelent. A szívelégtelenség prevalenciája a fejlett országok felnőtt lakosságának körében 1-2%, melynek diagnózisa után az 5 és 10 éves túlélés mindössze 50% és 10% [68]. Mivel klinikai szempontból a szívelégtelen betegek jelentős része a kamrai ejekció és telődés strukturális vagy funkcionális romlását mutatja, ezért a szívelégtelenség egy olyan komplex szindróma, mely a kardiális szisztolés vagy diasztolés kapacitás bármilyen jellegű diszfunkciójából adódhat [13].

A kardiovaszkuláris betegség kontinuumban [23] számos rizikófaktor képes beindítani a szívelégtelenség felé vezető krónikus szívizom átépülést, másnéven *remodelling*-et (1. ábra). Az adaptációs folyamatok során azonban akut események progresszív módon ronthatják a klinikai állapotot [30], és ezáltal gyorsíthatják a betegség lefolyását (2. ábra). Öregedő populációkban olyan kardiovaszkuláris komorbiditásokkal mint a hipertónia, obezitás és diabetes mellitus, a szívelégtelenség gyakran megtartott bal kamrai ejekciós frakcióval (EF,  $\geq 50\%$ ) jelentkezik, mely állapotra diasztolés szívelégtelenségként tekinthetünk (HFpEF, *heart failure with preserved ejection fraction*). Másfelől viszont, akut koronária szindróma fellépte esetén a bal kamrai miokardiális infarktus a csökkent EF ( $<40\%$ ) legfőbb oka, mely leginkább szisztolés szívelégtelenségként írható le (HFrEF, *heart failure with reduced ejection fraction*) [11]. A domináns funkciózavartól függetlenül a diasztolés és szisztolés szívelégtelenség klinikai elhatárolása és kezelése komoly gyakorlati nehézségekbe ütközik. Az Európai Kardiológus Társaság (ESC, *European Society of Cardiology*) 2016-os ajánlása [63] a szürke zónát a HFpEF és HFrEF határán éppen ezért úgy definiálta, mint szívelégtelenség átmeneti (40-49%) EF mellett, létrehozva ezzel egy harmadik szívelégtelenség kategóriát (HFmrEF,

*heart failure with mid-range ejection fraction*). Sajnálatos módon a szívelégtelenség minden fenotípusának prevalenciája és mortalitása magas [11].

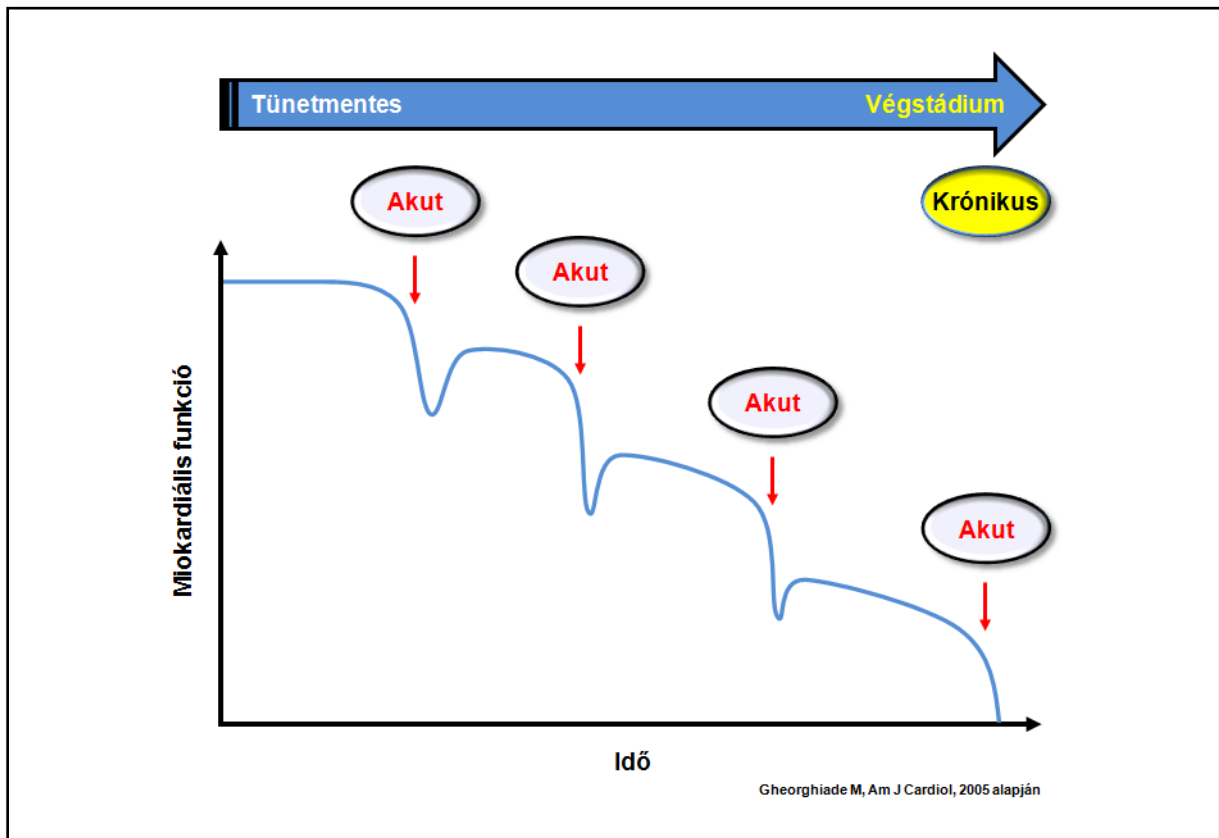


**1. ábra** A kardiovaszkuláris betegség kontinuum sémája [23,63].

HFmrEF: szívelégtelenség átmeneti ejekciós frakcióval (*heart failure with mid-range ejection fraction*); HFpEF: szívelégtelenség megtartott ejekciós frakcióval (*heart failure with preserved ejection fraction*); HFrEF: szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval (*heart failure with reduced ejection fraction*).

Transzlációs szempontból humán és kísérletes szívelégtelenségre az EF-től függetlenül jellemző a szívműködés kóros kontrakciója és relaxációja, valamint a miokardiális hipertrofia és a kollagén felszaporodása az extracelluláris térben [82]. A szarkomer a legkisebb funkcionális egység a szívben. A szarkomert alkotó strukturális, funkcionális és regulátor fehérjék patofiziológiai modulációja ezért alapvetően befolyásolja a szívműködés kontrakció-relaxáció finoman hangolt ciklusát (3. ábra). A miofilamentális fehérjék kiemelt célpontjai számos poszttranszkripció és poszttranszlációs módosulásnak különböző

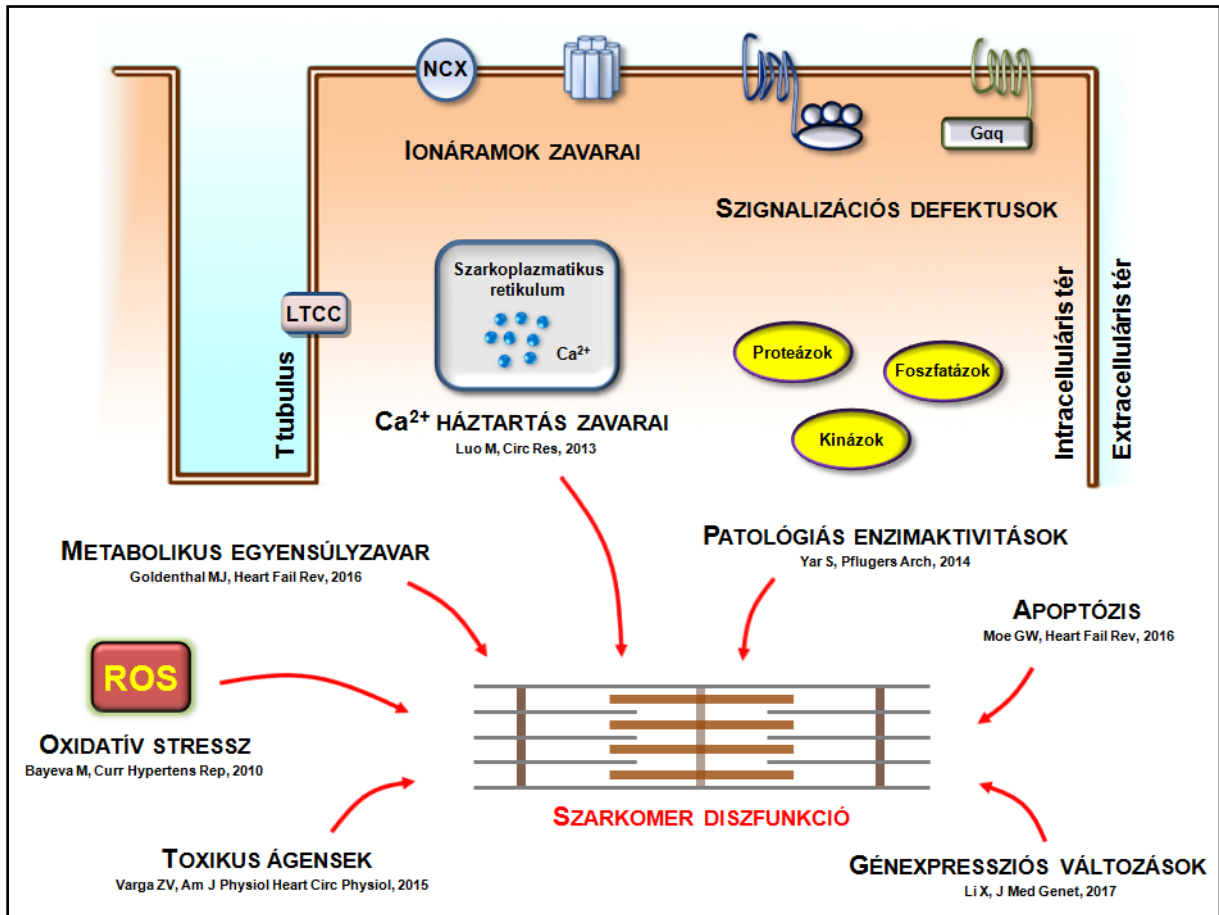
sejtszignalizációs útvonal aktivációja vagy deaktivációja által [36]. A beteg szívben ilyen jellegű kóros modulációk a miofilamentális fehérjék akut degradációjához vagy krónikus foszforilációs változásaihoz vezetve ronthatják a szívműködés erőgenerációs kapacitását és elaszticitását [36].



**2. ábra** A szívelégtelenségben bekövetkező krónikus miokardiális funkcióromlás akut epizódokkal terhelt időbeli lefolyása [30].

A legújabb ESC szívelégtelenség irányelv a szívelégtelenség patofiziológiájának jobb molekuláris megértését változatlanul terápiás szükségnek tartja [63]. Annak ellenére ugyanis, hogy a miokardiális infarktus adekvát terápiája a megfelelő és azonnali revaszkularizáció, a beavatkozás eredményeként fellépő iszkémia-reperfüzió károsodások és malignus aritmiák komoly gyakorlati kihívást jelentenek [27]. Az is ismert, hogy a hipertónia a szívelégtelenség leggyakoribb komorbiditása, melyben a legjelentősebb kóros tényező a renin-angiotenzin rendszer (RAS) patológiás aktivitása, a RAS terápiás gátlása azonban a szívelégtelenség egyik

fenotípusában (HFrEF) hatásos, míg a másokban (HFpEF) nem [10]. Az akut és krónikus miokardiális diszfunkció mechanizmusainak jobb megértése tehát reális terápiás konzekvenciával bír.



**3. ábra** A szarkomer diszfunkció leggyakoribb intracelluláris patofiziológiai tényezői szívelégtelenségben [6,32,51,53,56,84,90].

Gαq: G-protein kapcsolt receptor; LTCC: L-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatorna; NCX: 3Na<sup>+</sup>/1Ca<sup>2+</sup>-cseretranszporter; ROS: reaktív oxigén gyökök.

## 2. ELMÉLETI HÁTTÉR ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A szarkomer működésének molekuláris alapjai

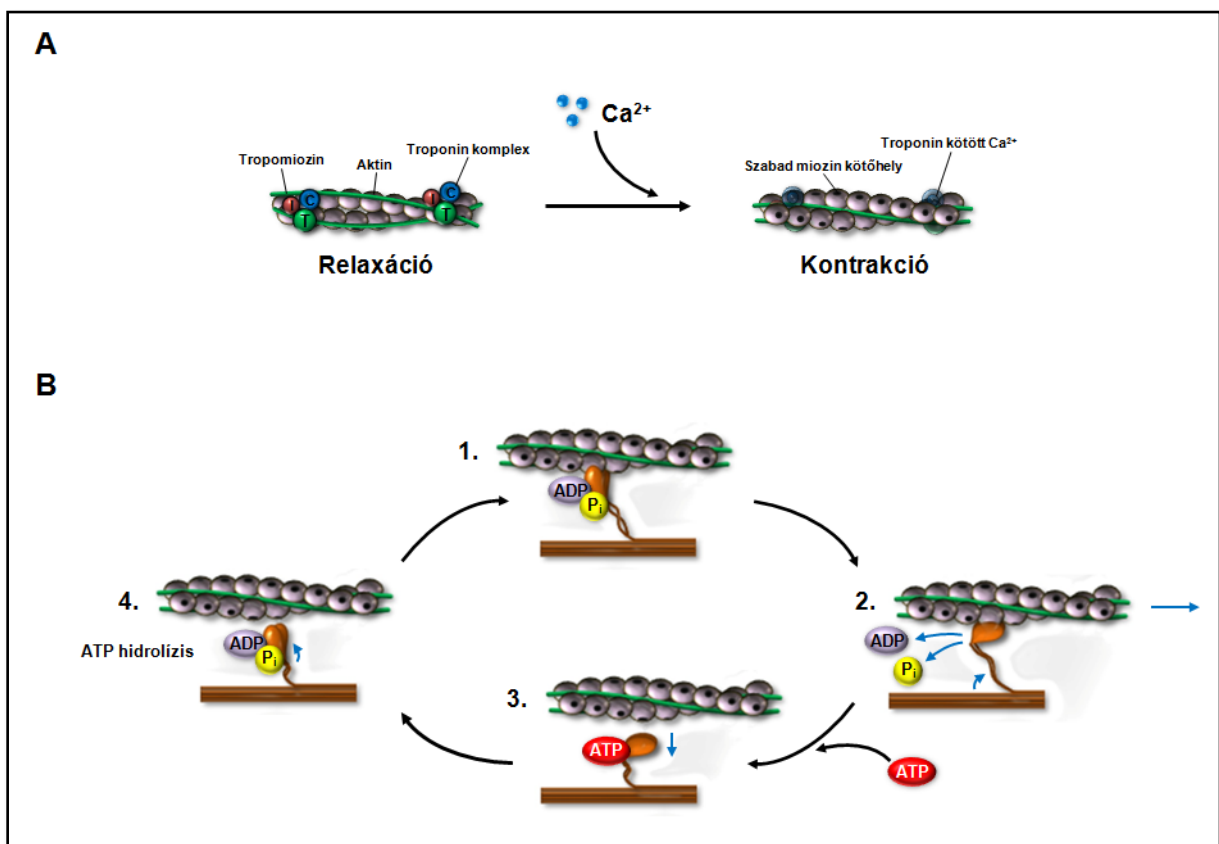
A szívizomsejtekben az ún. vékony (dominánsan aktin) és vastag (dominánsan miozin) filamentumok szarkomerekbe rendeződnek, melyek fénymikroszkóposan is látható harántcsíkolatot mutatnak (9. ábra A panel). A szívizomsejtek által kifejtett mechanikai munka a szarkomer kontraktilis (aktív), valamint nem kontraktilis rugalmas és viszkózus (passzív) elemeinek összhatásán alapul.

#### *A kontraktilis apparátus aktív mechanikája*

A szívizom-kontrakció mechanizmusának élettani alapja az aktin molekulák és a miozin molekulák ún. „feji” régiói közötti kereszthidak képződése és felbomlása. A kereszthíd-ciklus eredményeként az interdigitáló vékony és vastag filamentumok egymáson való elcsúszása egymáshoz közelíti a Z-korongokat, ezért a szarkomer megrövidül. Ez az ún. „csúszó filamentum modell” [74].

Diasztolé során az intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  alacsony, a kontrakciót szabályozó troponin fehérje komplex [kardiális troponin C (cTnC), I (cTnI), T (cTnT)] és a tropomiozin megakadályozza az erőgeneráló aktin-miozin kölcsönhatást (4. ábra A panel). Szisztolé során az intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  emelkedése indítja meg és tartja fent a filamentumok csúszását. A miofilamentális kontrakcióhoz szükséges kémiai energiát a miozin által végzett adenozin-trifoszfát (ATP) hidrolízis biztosítja. A relaxációhoz a miozin fejek ismételt ATP kötése szükséges, ennek elmaradása esetén az aktin-miozin komplex megmerevedik (rigor). Az aktin-miozin ciklus komplex és dinamikus körfogását a kereszthíd-ciklus *steady state* leegyszerűsített 4 lépéses sémájaként a 4. ábra B panel mutatja be. A  $Mg^{2+}$ -függő miozin ATPáz aktivitás által végzett bazális ATP hidrolízis juttatja a miozint egy inorganikus foszfátot ( $P_i$ ) és adenozin-difoszfátot (ADP) kötő magas energia állapotba (4. lépés). A

troponin komplex  $\text{Ca}^{2+}$ -indukált konformáció-változása szabadítja fel a vékony filamentum miozin kötőhelyeit a miozin-fejek számára (4. ábra A panel), ezáltal lehetővé téve az erőgeneráló aktin-miozin kereszthidak kialakulását (1. lépés). Az aktin-aktivált miozin ATPáz hatására bekövetkező  $\text{P}_i$  disszociáció (2. lépés) indukálja az aktint kötő miozin-fejek erő kifejtését jelentő evezőcsapás-szerű konformáció-változását (*power stroke*). A relaxációhoz szükséges következő lépésben a miozin-fejek újbóli ATP-kötése leszorítja az ADP-t, és a miozin-fejek leválnak az aktinról (3. lépés) [74].



**4. ábra** A szívizomsejt kontrakció molekuláris háttere [36,75-76,92].

**A)** A vékony filamentumok konformációs viszonyai a  $\text{Ca}^{2+}$  függvényében. **B)** A csúszó filamentum modell négy lépésben. ADP: adenzin-difoszfát; ATP: adenzin-trifoszfát; C: kardiális troponin C; I: kardiális troponin I; MHC: miozin nehéz lánc; MLC-1: miozin könnyű lánc-1; MLC-2: miozin könnyű lánc-2;  $\text{P}_i$ : inorganikus foszfát; T: kardiális troponin T.

A miozin motor fehérje tehát azáltal generál erőt és elmozdulást, hogy ATPáz aktivitását összehangolja az aktinnal létesített ciklikus interakciójával. A kontrakció ereje egyrészt a ciklusban részt vevő aktin-miozin kereszthidak számától, másrészt a

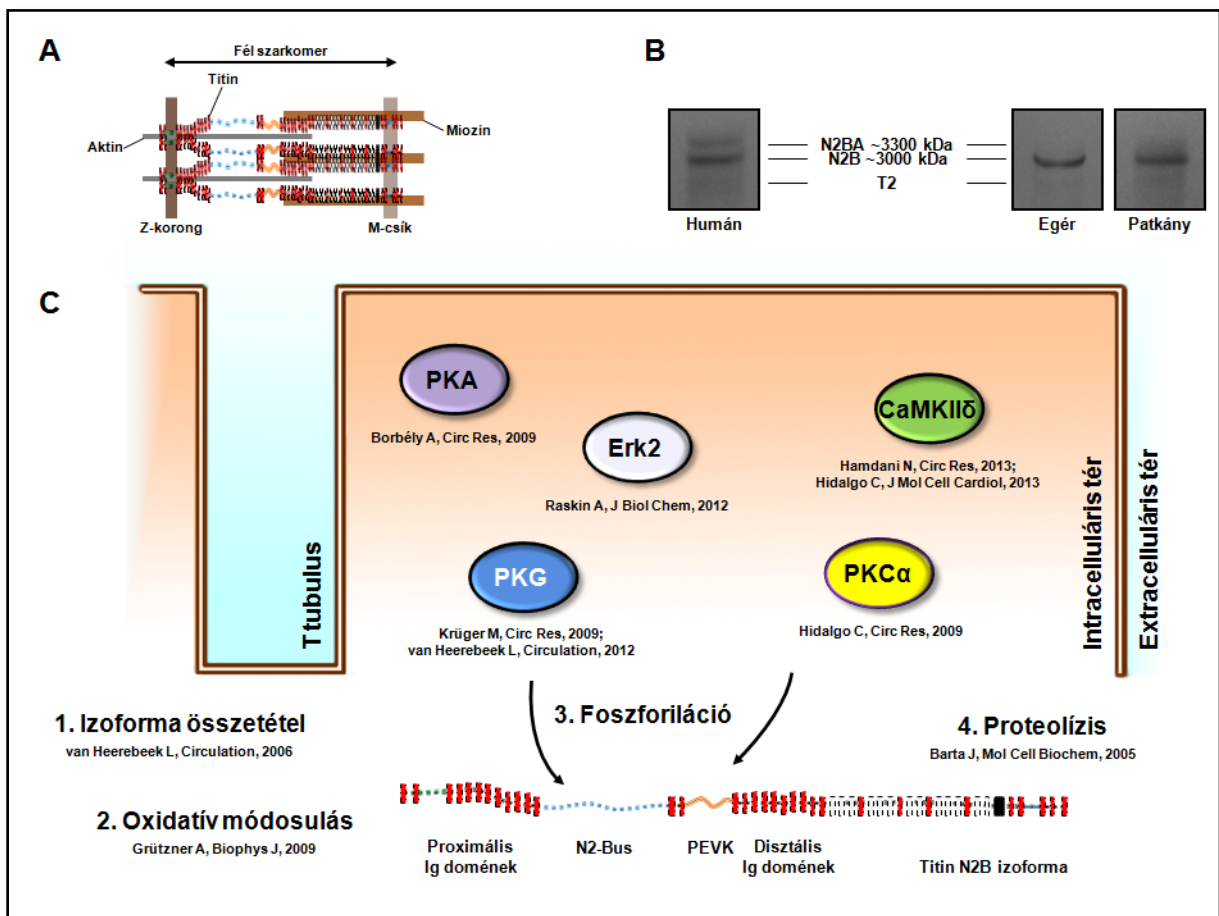
ciklusismétlődések sebességétől függ; utóbbi a miozin ATPáz aktivitását tükrözi. A miozint két miozin nehéz lánc (MHC), valamint két esszenciális miozin könnyű lánc (MLC-1) és két regulatórikus miozin könnyű lánc (MLC-2) alkotja [92]. Emlősökben két különböző MHC izoforma ismert ( $\alpha$ -MHC és  $\beta$ -MHC), melyet két különböző gén kódol. A rágcsáló kamrai szívmizomzatban az  $\alpha$ -MHC az elsődleges (~90%), míg a humán kamrai miokardiumban a  $\beta$ -MHC a predomináns izoforma. Az MHC izoforma kompozíció összefüggésben van az erőgeneráció sebességével és energetikájával, ugyanis az  $\alpha$ -MHC nagyobb aktomiozin ATPáz aktivitása gyorsabb kontrakciókat tesz lehetővé, míg a  $\beta$ -MHC tekinthető a „gazdaságosabb” izoformának [92].

Patológias körülmények között a miofilamentumok (aktin és miozin), valamint a regulátor fehérjék (troponin komplex és tropomiozin) izoforma összetételének megváltozása [92], oxidációs [75] és foszforilációs [36] állapotának módosulása, vagy degradációja [76] egyaránt képes befolyásolni az erőgeneráció teljesítményét,  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet és kinetikáját.

#### *A kontraktilis rendszer passzív feszülése*

A szívmizomsejt passzív feszülés és egyben a celluláris diasztolé egyik fő tényezője a titin óriásfehérje [52]. A titin 3000-3700 kDa molekulaméretével a legnagyobb ismert polipeptid, és mintegy molekuláris rugó kifestülve a fél szarkomeren (a Z-korongtól az M-csíkig) az izom szerkezeti stabilitásáért felel a relaxáció során (5. ábra A panel). A titin méretében és elaszticitásában is különböző izoformákban expresszálódik. Felnőtt humán szívben a titin két fő izoformája expresszálódik: egy rövidebb és merevebb N2B (~3000 kDa) izoforma és egy hosszabb, rugalmasabb N2BA (>3200 kDa) izoforma (5. ábra B panel). Ez a két izoforma osztály alapvetően az I-csík régióban különbözik egymástól, míg a molekula többi része (titin Z-korong, A-csík és M-csík régiók) konstitutívan expresszálódik. A titin elasztikus rugója éppen a szarkomer I-csík régiójába esik, melynek komplex szekvenciájában két nyújtható szegmens található. A tandem immunoglobulin-szerű (Ig) domének régióit a

“proximális Ig domének” (Ig10-Ig20), “középső Ig domének” (Ig24-Ig76; alternatív *splicing*), és “disztális Ig domének” (Ig80-Ig95) alkotják. Az intrinszik rendezetlen struktúrák magukban foglalják az egyedi szekvenciájú szívspecifikus ún. “N2-B” elemet (N2-Bus, *N2-B unique sequence*) és az ún. “PEVK” szegmenst (prolinban, glutamátban, valinban és lizinben gazdag elem). Mindezen titin izoformák kialakulása egy sokszoros alternatív *splicing* folyamat eredményei különösen a titin I-csík régióban (~230 exon).



**5. ábra** A szarkomer óriásfehérjére: a titin [5,9,34,37,40-41,48,66,82-83].

**A)** A titin elhelyezkedése a szarkomeren belül. **B)** Felnőtt humán és rágcsáló (egér, patkány) kardiális titin izoformák (N2BA és N2B) Coomassie kézzel festett blot képeken. **C)** A titin struktúráját és elaszticitását befolyásoló poszttranszkripció (1.) és poszttranszlációs (2-4.) módosulások. CaMKII $\delta$ : Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependens protein kináz-II $\delta$ ; Erk2: extracelluláris szignál-regulált kináz-2; Ig: immunglobulin-szerű; N2-Bus: N2-B *unique sequence* (egyedi szekvencia) domén; PEVK: prolin, glutamát, valin és lizin aminosavakban gazdag domén; PKA: protein kináz A; PKC $\alpha$ : protein kináz C $\alpha$ ; PKG: protein kináz G; T2: szükségeszerű titin degradációs termék.

A titin izoforma kompozíciója fajokként eltérő, ami predominánsan az N2B izoforma rágcsálókban és az N2BA nagyobb emlősökben. A hosszú titin izoformák (N2BA) kisebb passzív feszülést eredményeznek, míg a rövid izoformák (N2B) nagyobb passzív feszülést biztosítanak [18]. A titin izoforma összetételének megváltozása [82], oxidatív [34] és foszforilációs állapotának módosulása, vagy degradációja [5] direkt módon befolyásolhatja a titin-dependens passzív feszülést (5. ábra C panel).

Krónikus kardiovaszkuláris betegségekben a szarkomer passzív mechanikai tulajdonságait meghatározó patofiziológiai tényező a titin foszforilációs állapotának kinázok által mediált változatos modulációja (5. ábra C panel) [52]. A titin krónikus foszforilációs hiánya a szívelégtelenség, különösen a HFpEF fenotípus jellegzetessége. A protein kináz A (PKA) a titint az N2-B rugalmas doménon (pl. Ser-3991 a patkány, illetve Ser-4010 a humán szekvencia szerint) foszforilálva csökkenti a szívműködés passzív feszülését. *In vitro* a szívműködés passzív feszülését csökkentő PKA-mediált hatás kifejezettebb HFpEF betegekben, mint HFrfEF és egészséges kontroll egyéneknél. Mindez arra utal, hogy a titin foszforilációjának csökkenése lényegesen hozzájárul a diasztolés feszülés növekedéséhez HFpEF-ben [9]. A protein kináz G (PKG) a titint az N2-B rugalmas doménon (pl. Ser-4080 a patkány, illetve Ser-4099 a humán szekvencia szerint) foszforilálva szintén csökkenti a passzív feszülést [48], ennek megfelelően a titin PKG-mediált foszforilációjának csökkenése szintén növelheti a szívműködés passzív feszülést HFpEF-ben [83]. Egy másik kináz, az extracelluláris szignál-regulált kináz-2 (ERK2), szintén az N2-B rugalmas doménon (pl. Ser-3991 a patkány, illetve Ser-4010 a humán szekvencia szerint) foszforilálva csökkenti a szívműködés passzív feszülését [66]. Továbbá, számos titin oldallánc, egyesek a titin nyújtható szakaszának N2-B rugalmas és PEVK doménjeiben (pl. Ser-4043 és Ser-12884 a patkány, illetve Ser-4062 és Ser-12022 a humán szekvencia szerint, a fenti sorrendben), míg mások a Z-korong, A-csík és M-csík titinben,  $Ca^{2+}$ /kalmodulin-függő protein kináz-IIδ (CaMKIIδ)-

függő foszforilációja szintén csökkenti a szívizomsejtek passzív feszülését [37]. Ezzel szemben, a protein kináz  $C\alpha$  (PKC $\alpha$ ) a titin PEVK domén (pl. Ser-12742 és Ser-12884 a patkány, illetve Ser-11878 és Ser-12022 a humán szekvencia szerint) kizárólagos foszforilációjával növeli a molekula által közvetített passzív feszülést [40].

## **2.2. A $Ca^{2+}$ szerepe akut miokardiális diszfunkcióban**

Az akut koszorúér-elzáródás okozta szívizom-károsodás egy kétarcú folyamat eredménye. Az egyik patológiai tényező maga az iszkémia, a másik probléma bizonyos esetekben éppen a reperfüzió (iszkémia-reperfüzió károsodások). Az akut miokardiális infarktus aktuálisan leghatékonyabb terápiája az időben végzett koronária revaszkularizáció, mely leginkább képes mérsékelni az infarktus méretét, megőrizni a bal kamrai szisztolés funkciót, valamint késleltetni a krónikus átépülést és szívelégtelenséget. A reperfüzió azonban paradox módon hozzájárulhat az infarktus során kialakuló miokardiális károsodáshoz [27].

### *Miokardiális iszkémia-reperfüzió*

A felnőtt szívizomsejtek főként terminális sejtek, ezért sejtvesztés esetén replikatív kapacitásuk nincs vagy minimális. Ebből következik, hogy minden terápiás beavatkozás, köztük a szívizom reperfüzió legfontosabb célja a kardiális struktúra és funkció megőrzése. Iszkémiában az oxigénhiányt a csökkent koronária áramlás váltja ki. Hipoxiában (főleg kísérletes körülmények között) az áramlás ugyan normális, de az nem képes elég oxigént biztosítani. Mindezen fogalmak a csökkent celluláris oxigénellátás olyan állapotait írják le, amelyekben a mitokondriális oxidatív folyamatok elégtelenné válnak. Amint az energiaellátás képtelen kielégíteni az intracelluláris anyagcsere igényeit, a sejtmetabolizmus progresszíven romló zavara lép fel. A „metabolikus veszélybe” került sejtet, ha csak a korai reperfüzió meg nem menti, az iszkémia elkerülhetetlenül az elhalás felé sodorja.

Izolált szívben a koronária áramlás teljes megszűnése (globális iszkémia) a kontraktilitás hirtelen romlását eredményezi, ami részben az intracelluláris acidózis következménye, mely másodpercekkel az iszkémia indukcióját követően mérsékli a szarkolemmán belüli  $\text{Ca}^{2+}$  mozgást a szarkoplazmatikus retikulumban és a miofilamentumokhoz [26]. Röviddel ezután a szívizomsejt energia-töltöttsége lecsökken, és a kreatin-foszfát szintek még az ATP szinteknél is gyorsabban és nagyobb mértékben esnek. A metabolizmus anaerob módon zajlik, mely szubsztrát-szintű foszforiláció révén termel ATP-t laktát képződése mellett. A kontraktilitás csökkenése (és ezáltal a csökkent ATP fogyasztás) és a fokozott anaerob ATP termelés egyaránt kardioprotektív, de a kontrakció rovására menő celluláris mechanizmusok. A reperfüzió ebben a fázisban a mitokondrium megtartott funkciójára utaló magas energiájú foszfát produkcióját eredményezi.

Rövid iszkémiás periódust követő korai reperfüzió után aritmiák lépnek fel, amik bár a sikeres reperfüzió és az életképes miociták bizonyítékának is tekinthetők, farmakológiai kontrolljuk mégis nagy gyakorlati problémát jelent. Ismert az is, hogy az iszkémiás miokardium reperfüzió után nem azonnal nyeri vissza funkcióját, hanem napokkal, akár hetekkel később. Ez a jóindulatú és reverzibilis poszt-iszkémiás kontraktilis diszfunkció az ún. *stunning* [7]. Kialakulásában a legvalószínűbb mechanizmus a kontraktilis apparátust érő oxidatív stressz és  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődés. Hosszabb hipoperfüziós epizódok egyes betegekben krónikus regionális funkciózavart okozhatnak, melyek reperfüzió hatására helyreállhatnak (hibernáció). A *stunning* nem jósolható és specifikusan nem kezelhető, de súlyos esetekben a tüneti kezelés segíthet megtartani a perctérfogatot és elkerülni az irreverzibilis károsodást.

Tartós irreverzibilis iszkémia utáni reperfüzió azonban már nem képes a kontraktilitást helyreállítani, helyette a szöveti és mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  akkumulációját, az ATP termelő mitokondriális oxigén felhasználás csökkenését, és a diasztolés funkció további romlását okozza [25]. Szövettanilag a késői reperfüzió a citoszol duzzadásával és szétrepedéséhez

vezető ödémával, valamint masszív hiperkontraktúrával és szarkolemmális károsodással jár. Ha a koronária véráramlás tartósan alacsony marad, akkor viszont további laktát felszabadulás, a diasztolés nyomás emelkedése (a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis súlyos zavarának a jele) és a szarkolemma súlyos károsodása (pl. troponin kiáramlás) következik be. Számos tanulmány szerint a  $\text{Ca}^{2+}$ , a reaktív oxigén gyökök és a pH változásai járulnak hozzá a poszt-iskémiás kontraktilis diszfunkcióhoz. Úgy gondolják, hogy *stunning* és tartós iszkémia után szabad gyökök képződése és  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődés vezet az ún. reperfúziós paradoxhoz [7].

### *A $\text{Ca}^{2+}$ paradox jelenség*

Paradox módon, ha egy fiziológiásan perfundált izolált szívet átmenetileg  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Krebs-Henseleit pufferrel, majd ismét fiziológiásan perfundálunk, akkor a szív hamar tönkremegy. Ezt az emlékezetes, de váratlan megfigyelést elsőként *Zimmerman* és *Hülsmann* írta le öt évtizeddel ezelőtt [97]. Azóta a rövid ideig  $\text{Ca}^{2+}$  depletált szíven kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  repláció okozta adverz hatás az ún.  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxként ismert jelenség [98]. Habár az *in vivo* patofiziológiában a  $\text{Ca}^{2+}$  deplációja és replációja nem kizárólagosan jelentkezik iszkémia-reperfúzió során, a citoszolikus  $[\text{Ca}^{2+}]$  extrém emelkedése az egyik kulcselem az iszkémia-reperfúzió miokardium károsodásban [73]. Éppen ezért a  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxnak kitett izolált szív széles körben ismert modell az iszkémia-reperfúzió során fellépő  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődés okozta strukturális és funkcionális miokardiális károsodás mechanizmusainak a tanulmányozására [62].

A  $\text{Ca}^{2+}$  paradox patomechanizmusa már részben ismert. A  $\text{Ca}^{2+}$  deplációt követő  $\text{Ca}^{2+}$  repláció globális bal kamrai funkcionális következménye a szisztolés nyomás látványos csökkenése és ezzel párhuzamosan a végdiasztolés nyomás jelentős emelkedése [89,94]. A  $\text{Ca}^{2+}$  paradox hatására fellépő drámai kontraktilis zavar hátterében miokardiális hiperkontraktúra és kiterjedt ultrastrukturális károsodás áll [91].  $\text{Ca}^{2+}$  depláció alatt ugyanis megbomlik az egymással szomszédos szívizomsejtek interkaláló korongjai közötti kapcsolat

[29], szétfoszlik a  $\beta$ -disztroglikán, és felbomlanak a sejt-sejt, illetve a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok [55]. Végül masszív  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődésben kialakul a hiperkontraktúra [20], mialatt a szív „sápadttá” válik a mioglobin veszteség miatt [45]. Mivel a sejt-sejt szétválás egyik szükséges lépése a jelenségnek, ezért úgy gondolják, hogy az izolált szívizomsejtek elkerülik a  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxot [28,61]. Mindezen megfigyelések azt sugallják, hogy  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxban a kontraktúra a kontraktilis diszfunkció legfőbb oka.

Ezzel szemben, számos párhuzamos intracelluláris változás is bekövetkezik a  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxnak kitett izolált szívekben. A  $\text{Ca}^{2+}$ -repláció kiváltotta excesszív  $\text{Ca}^{2+}$  beáramláshoz hozzájárul a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cseretranszporter reverz működése és a tranziens receptor potenciál csatornák aktivációja [46], valamint a nem specifikus transzmembrán beáramlás [55]. A szarkolemma szétesése [64] is bekövetkezik a  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítására képtelen szarkolemmális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált és  $\text{Mg}^{2+}$  ATPáz elégtelenségével [65]. A mikroszóma frakció is károsodik a szarkoplazmatikus retikulum csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált és  $\text{Mg}^{2+}$  ATPáz aktivitásával és  $\text{Ca}^{2+}$  kötésével [1]. Ezek a folyamatok együttesen  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődést előidézve az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  mozgás kiterjedt zavarát okozzák. Ugyanakkor, azt egyelőre még nem sikerült tisztázni, hogy  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxban vajon a szarkomer szétesése és a miofilamentumok károsodása is hozzájárul-e a kontraktilis elégtelenséghez. Ezzel kapcsolatban a  $\text{Ca}^{2+}$  paradox patkány modelljeiben az MLC-1 [70], valamint a troponin I és az  $\alpha$ -fodrin degradációját [93] már leírták. Annak ellenére, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  paradox mostanában nem egy „forró téma”, a legújabb tudományos erőfeszítések láthatóan mégis képesek voltak új betekintést nyújtani a  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődés mechanizmusába.

### **2.3. A RAS szerepe krónikus miokardiális diszfunkcióban**

A krónikus szív-érrendszeri megbetegedések kialakulása során olyan neurohumorális mechanizmusok (pl. fokozódó RAS aktivitás és szimpatikus tónus) érvényesülnek, melyek

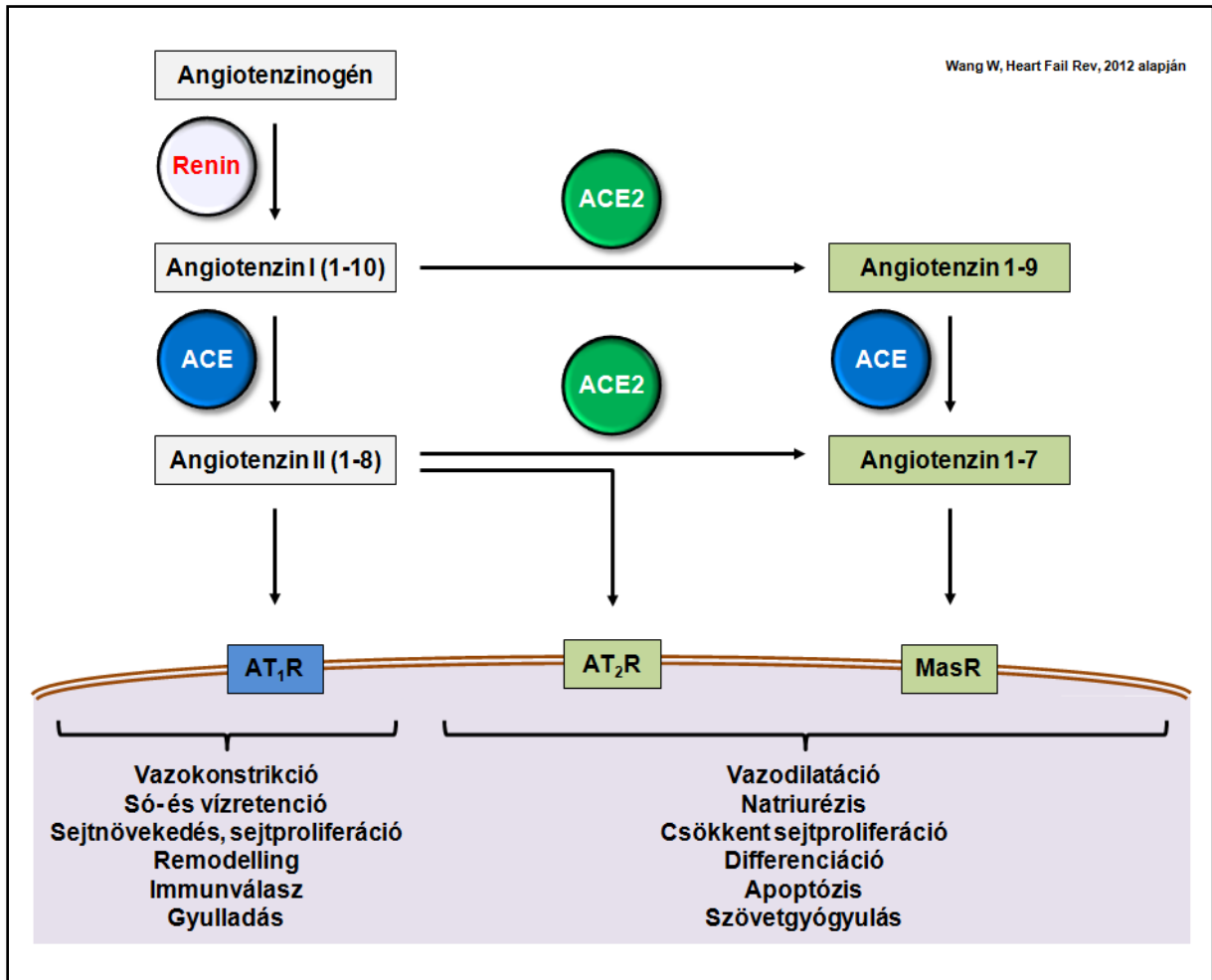
rövidebb távon ugyan támogathatják a keringést, hosszabb távon azonban rontják a szív funkcióját. A neurohumorális rendszer túlműködése a szívizomzat strukturális és funkcionális átépülése (*remodelling*) révén a kamrák elégtelen telődését és ürülését eredményezi, ami végső soron a kontraktilis diszfunkciót elmélyíti. Mindezen folyamatok következtében szívelégtelenség alakul ki.

#### *A RAS útvonalak patofiziológiai szerepe*

A hipertónia a leggyakoribb humán betegség és egyben a szívelégtelenség leggyakoribb társbetegsége [17]. A jellemzően hipertónia talaján kialakuló HFpEF-ben a bal kamra hipertrófia és fibrózis növeli a szívizomzat merevségét, ami következményesen rontja a bal kamrai relaxációt és diasztolés telődést, ami diasztolés diszfunkció kifejlődéséhez vezet [10]. A RAS biokémiai kaszkádja kulcstényező a vérnyomás szabályozásában, ennek megfelelően a RAS változásai kritikusak a hipertónia kialakulásában és fenntartásában [79].

A RAS enzimatisz lépéseinek sorozatában a veséből származó renin sebesség-meghatározó módon és rendkívül specifikusan hasítja a májból a véráramba kerülő angiotenzinogént [87]. Az így keletkező inaktív angiotenzin I molekulát az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) alakítja tovább biológiailag aktív angiotenzin II molekulává. Kardiovaszkuláris betegségekben az angiotenzin II AT<sub>1</sub>R típusú receptorán közvetíti a RAS patológiás hatásait, melyek elsősorban a fokozott szimpatikus tónus és aldoszteron szekréció, vazokonstriktió, só- és vízretenció, immun- és gyulladáshos válaszok, valamint a globális kardiovaszkuláris sejtproliferáció és *remodelling* (6. ábra). Ezzel szemben, az ACE homológ ACE2 enzim egy ellen-regulatórikus szereplő a RAS szignalizációban [87]. Az ACE és ACE2 egyaránt endotélium-kötött, M2 családba tartozó metalloproteinázok (karboxipeptidázok), jelentős expresszióval a szívben, vesében, agyban és az érrendszerben. Az ACE-val mutatott jelentős biokémiai hasonlóság ellenére azonban az ACE2 érzéketlen a klasszikus ACE gátlókkal (pl. captopril) szemben [22,80]. Az ACE2 az angiotenzin II bontásával angiotenzin

1-7 molekulát képez, mely Mas receptorán (MasR) hatva fejt ki a RAS előnyös hatásait, melyek elsősorban a vazodilatáció, natriurézis, szövetgyógyulás, differenciáció, apoptózis és a csökkent sejtproliferáció (6. ábra).



**6. ábra** A renin-angiotenzin rendszer (RAS) enzimatisz kaszkádjának fő lépései [87].

ACE: angiotenzin konvertáló enzim; AT<sub>1</sub>R és AT<sub>2</sub>R: angiotenzin II receptor 1-es és 2-es típus, a fenti sorrendben; MasR: Mas receptor.

Továbbá, az ACE2 multifunkcionális enzimként számos biológiai szubsztráttal bír, így angiotenzin I-ből inaktív angiotenzin 1-9 peptidet is képez, illetve egyéb vazoaktív peptideket (pl. apelin-13 és -17) is hasít [87]. Mindezek tehát két ellentétes hatású ág működését igazolják a RAS jelátvitelében, az egyik ág a klasszikus ACE – angiotenzin II – AT<sub>1</sub>R tengely, míg a másik ág az alternatív ACE2 – angiotenzin 1-7 – MasR tengely. Érdekeség, hogy az alternatív útvonal aktivitása a klasszikus úton termelődő angiotenzin I és II

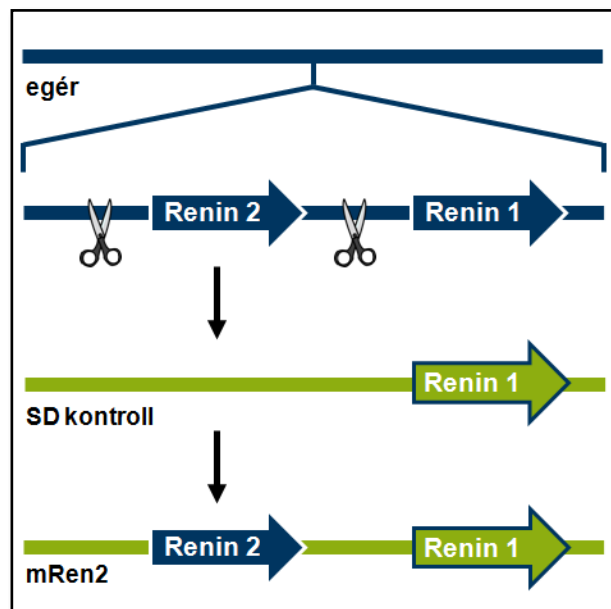
menyiségének függvénye, tekintettel arra, hogy ezen peptidek az ACE2 szubsztrátjai. Az ACE2 az angiotenzin II-indukált miokardiális hipertrófia, fibrózis és diasztolés diszfunkció negatív regulátora, ezért hiánya hipertóniában és miokardiális infarktusból adózó patológiás *remodelling*-hez vezet [87]. Az ACE2 – angiotenzin 1-7 – MasR tengely modulációja éppen ezért jelenthet új terápiás stratégiát hipertóniában és szívelégtelenségben.

A RAS inhibitorok gyakorlati sikere valóban igazolja a RAS központi szerepét a hipertónia patofiziológiájában, ezáltal a szívelégtelenség kialakulásában [79]. Mindazonáltal, a szívelégtelenség HFpEF és HFrEF fenotípusainak patomechanizmusa és terápiája egymástól lényegesen eltér [11]. Érdekes módon, hipertóniához társuló szívelégtelenségben a RAS elemei is fenotípustól függő módon változnak meg, ugyanis humán HFpEF-ben a szérumban ACE aktivitás nagyobb, míg az ACE2 aktivitás kisebb, mint HFrEF-ben [81]. Különösen a RAS gátlóinak (pl. AT<sub>1</sub>R blokkoló: irbesartan; ACE gátló: perindopril) hatékonysága tűnik ellentmondásosnak, mivel azok HFrEF-ben bázisterápiának számítanak, de HFpEF-ben eredménytelenek [10]. Mivel HFpEF-ben a mai napig nincs klinikailag igazolt terápiás módszer, ezért a legújabb HFpEF tanulmányok a patofiziológia jobb megértésére és klinikailag releváns alcsoportok létrehozására buzdítanak.

#### *Az mRen2 patkány modell*

Az ellentmondó gyakorlati tapasztalat igazolja a *Mullins* által bevezetett renin túlexpresszázó hipertónia modell jelentőségét (7. ábra), amelyben az egér *Ren-2<sup>d</sup>* renin gént hordozó transzgenikus patkány törzs (mRen2) a primer hipertónia modellje a pontosan meghatározott genetikai háttér előnyével [58]. Mivel ezekben az állatokban felmerült a szöveti angiotenzin II patofiziológiai szerepe [49], ezért az mRen2 modell alkalmas a lokális patológiás RAS jelátvitelhez köthető miokardiális diszfunkció tanulmányozására. Figyelemre méltó, hogy az mRen2 patkányok fenotípusának karaktere hasonló ahhoz, mint ami humán szívelégtelenségben is látható [50]. Nevezetesen, az mRen2 miokardium hipertrófiát,

extracelluláris kollagén felhalmozódást és perivaszkuláris fibrózist [3,24,100], valamint angiotenzin II-mediált oxidatív stresszt mutat [88]. Továbbá, egyes mágneses rezonancia képalkotó (MRI) és echokardiográfiás vizsgálatok *in vivo* csökkent bal kamrai szisztolés funkciót (EF) állapítottak meg ezekben az állatokban [21,88]. A  $\beta$ -adrenerg receptorok *downreguláció*-ját a papilláris izmok izoproterenolra adott csökkent pozitív inotróp válaszkészségével [12,99] és nyúzott rostok csökkent  $Ca^{2+}$ -érzékenységgel társulva [15,99] szintén leírták az mRen2 modellben. Ezek a funkcionális változások összességében a kontraktilitás zavarára és a HFrEF fenotípusra jellemző eltérések [11,82]. Ugyanakkor, más mRen2 tanulmányokban szívultrahang [44] és MRI [35,54] vizsgálatokkal normál EF mellett kóros diasztolés funkciót azonosítottak. Az mRen2 szívek relaxációs zavara összhangban lehet a belőlük származó nyúzott bal kamrai rostok megnövekedett diasztolés feszülésével [99]. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a hipertóniás mRen2 patkányok kardiális diszfunkciójának fenti változatai megfelelően tükrözik a humán betegségben fellépő miokardiális átépülés sokszínűségét [11,17,82].



**7. ábra** Az mRen2 transzgenikus patkány törzs genetikai háttere az egér *Ren-2<sup>d</sup>* (Renin 2) gén tandem inzerciója a Sprague-Dawley (SD) kontroll törzsbe [58].

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

#### 3.1. A szarkomer diszfunkció mechanizmusának vizsgálata $\text{Ca}^{2+}$ paradoxban

Célul tűztük ki a  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődés kiváltását követően csökkent szívizom-kontraktilitás háttérében álló lehetséges funkcionális és strukturális szarkomer diszfunkció felderítését. Munkánk során  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxnak kitett szívekben meghatároztuk a miofibrilláris ATPáz aktivitásokat, karakterizáltuk az izolált szívizomsejtek mechanikai teljesítményét, valamint megvizsgáltuk a  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxban lehetséges fehérjedegradáció célpontjait a kontraktilis (pl. aktin, miozin), strukturális (pl. titin,  $\alpha$ -aktinin) és regulátor (pl. troponin komplex, MLC) miofilamentális fehérjék között.

#### 3.2. A szöveti RAS szerepének vizsgálata diasztolés diszfunkcióban

Célunk volt meghatározni a RAS patológiás aktivitásának közvetlen hatását a kardiális szarkomer működésére a renint túlexpresszázó mRen2 állattörzsben. Tanulmányunkban 15 hetes hím homozigóta mRen2 patkányokban meghatároztuk a miokardiális ACE és ACE2 aktivitásokat, karakterizáltuk az izolált szívizomsejtek funkcióját, felmértük az angiotenzin II útvonalon a  $\text{PKC}\alpha$  expressziót, valamint megvizsgáltuk a szarkomer passzív feszüléséért felelős titin foszforiláltsági állapotát.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Módszerek I: a $\text{Ca}^{2+}$ paradox modell

#### *A kísérleti állatok felhasználásának irányelvei*

Az állatkísérleti protokollokat a „*Canadian Council on Animal Care*” és a „*National Institute of Health*” iránymutatásai alapján ellenőrizte és elfogadta a „*University of Manitoba Animal Care Committee*”. A  $\text{Ca}^{2+}$  paradox korábbi kísérletes protokoll gyakorlatát követve hím Sprague-Dawley patkányok (SD, 250-300 g) szívét Langendorff szerint perfundáltuk [89,91,94]. A humánus és fájdalommentes feláldozás érdekében kísérleti állataink szívét ketamin (90 mg/kg) és xylazin (10 mg/kg) anesztéziában izoláltuk.

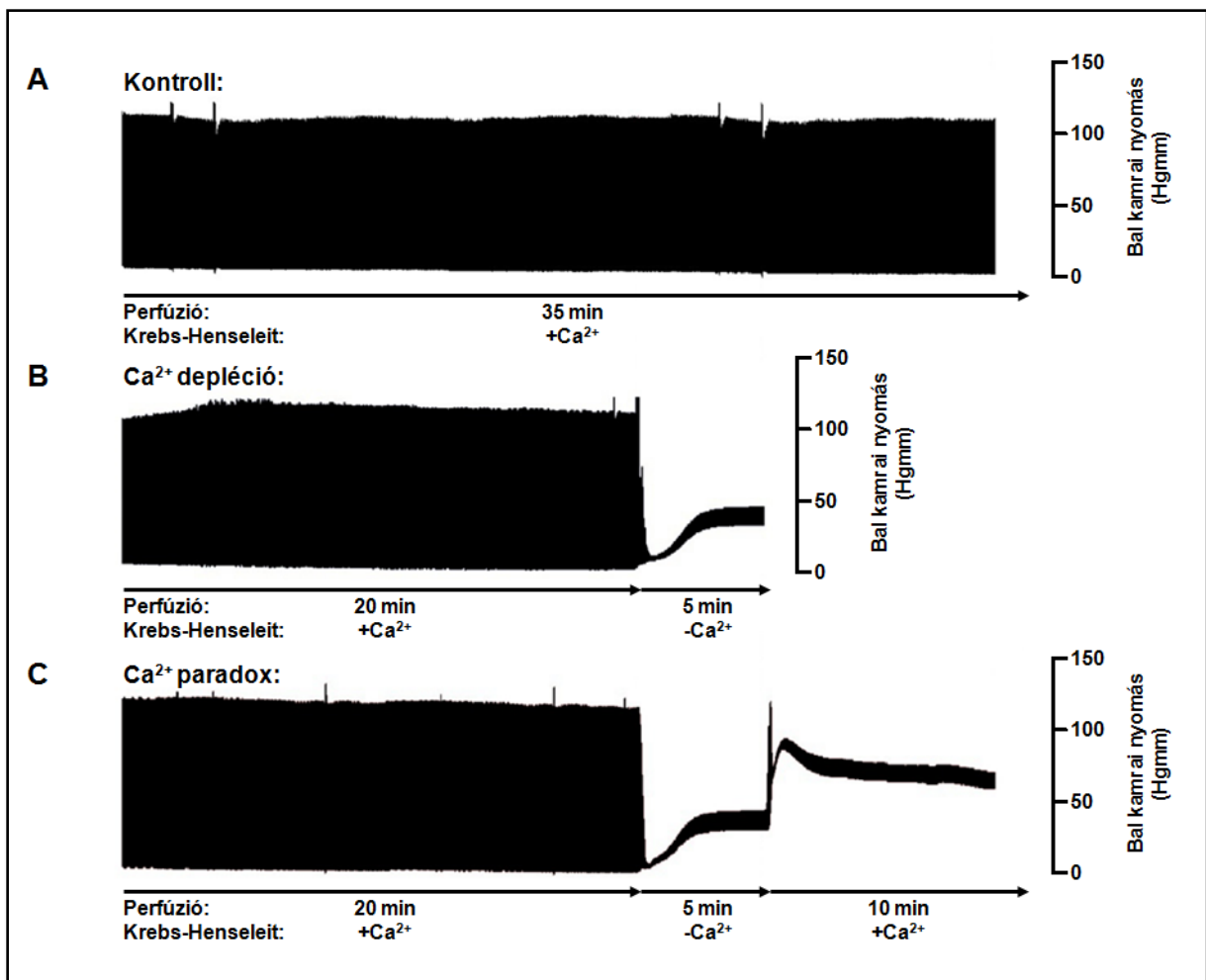
#### *$\text{Ca}^{2+}$ paradox Langendorff szerint*

Az izolált SD szíveket fiziológias Krebs-Henseleit oldattal [120,0 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,25 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25,0 mM  $\text{NaHCO}_3$  és 8,6 mM glükóz (mind Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); pH 7,4] Langendorff módszerrel (37 °C, 95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) perfundáltuk. A perfúzió során a szíveket egy *Phipps and Bird* stimulátorral (Richmond, VA, USA) elektromosan ingereltük (300 stimulus/perc, 2,5-3,0 ms négyszögimpulzus, 30 V amplitúdó).

Húsz perces stabilizációs periódust követően a szíveket 3 csoportba ( $n = 7-9$ /csoport) randomizáltuk (8. ábra). Ezt követően a szíveket perfundáltuk vagy továbbra is fiziológias ( $\text{Ca}^{2+}$ -os) Krebs-Henseleit pufferrel 15 percig (kontroll; 8. ábra A panel), vagy  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes, máskülönben normál pufferrel 5 percig ( $\text{Ca}^{2+}$  depléció; 8. ábra B panel), majd  $\text{Ca}^{2+}$  depléciót követően ismét fiziológias Krebs-Henseleit pufferrel 10 percig ( $\text{Ca}^{2+}$  paradox; 8. ábra C panel).

## Bal kamrai nyomásmérés

A Langendorff szerint perfundált szívek bal kamrai üregébe erőmérőhöz (modell: 1050, BP-Biopac System, Goleta, CA, USA) csatlakoztatott vízzel teli latex ballont helyeztünk. Regisztráltuk a bal kamra által kifejtett nyomást (*left ventricular developed pressure*) és a bal kamrai végdiasztolés nyomást (*left ventricular end-diastolic pressure*), valamint meghatároztuk a bal kamrában kifejlődő nyomás idő szerinti első deriváltjának maximum és minimum értékét ( $dP/dt_{\max}$  és  $dP/dt_{\min}$ , a fenti sorrendben). A kiindulási végdiasztolés nyomást a ballon felfújásával 10 Hgmm-re állítottuk be.



### 8. ábra A Ca<sup>2+</sup> paradox kísérletes modellje.

Reprezentatív bal kamrai nyomásgörbék az idő függvényében Langendorff szerint perfundált patkány szívekben. **A)** Kontroll perfúzió Krebs-Henseleit fiziológias oldattal. **B)** Kontroll perfúziót követő Ca<sup>2+</sup> depléció. **C)** Ca<sup>2+</sup> repléció Ca<sup>2+</sup> depléció után: Ca<sup>2+</sup> paradox.

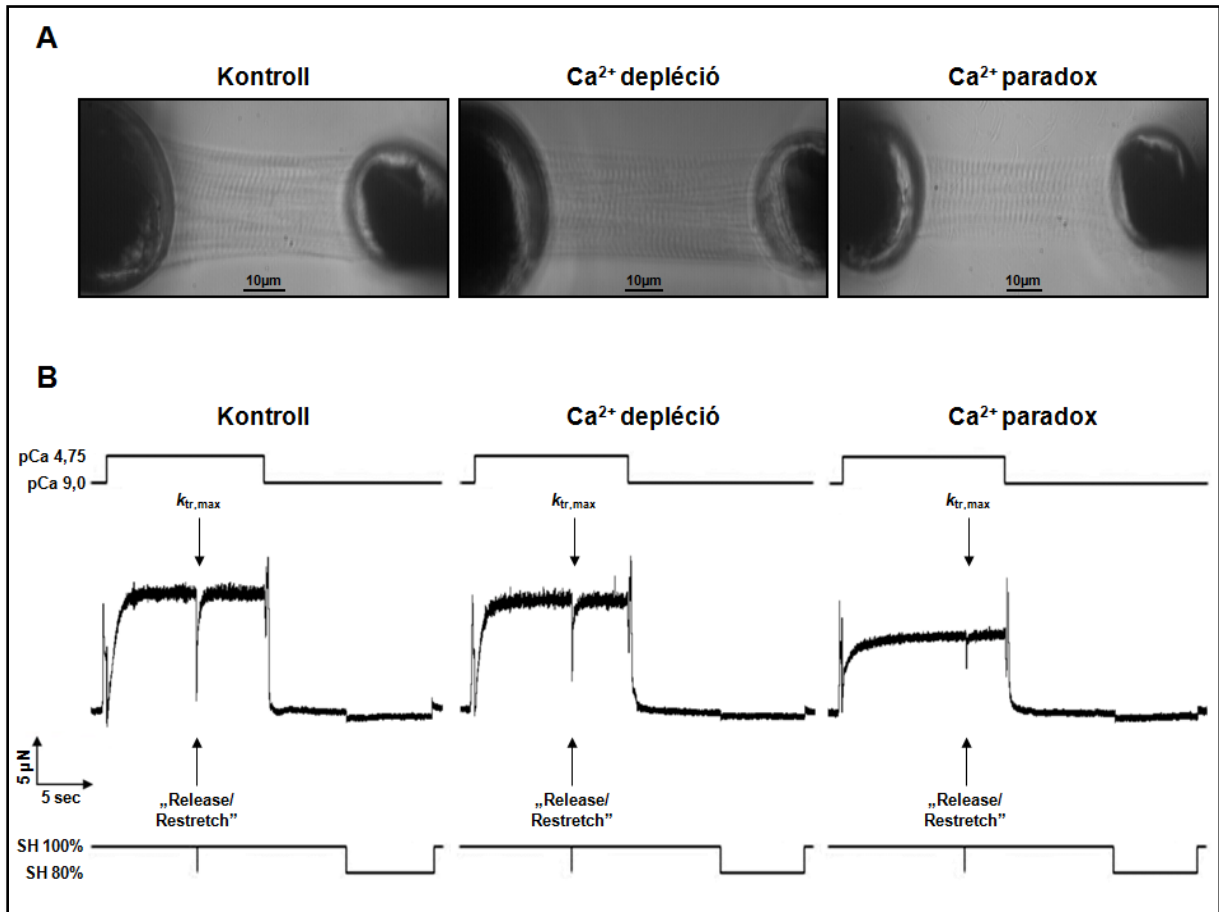
### *Miofibrilláris ATPáz aktivitás*

Bal kamrai miofibrillumokat ( $n = 7-9$ /csoport) *Solaro* leírása alapján izoláltunk [71], majd szuszpenziós médiumban szuszpendáltunk [100,0 mM KCl, 20,0 mM Tris\_HCl (mindkettő Sigma-Aldrich); pH 7,0]. Korábbi protokoll alapján [60] a totál ATPáz aktivitást a következő pufferben mértük: 20,0 mM imidazol, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,0 mM Na<sub>2</sub>ATP, 5,0 mM NaN<sub>3</sub>, 50,0 mM KCl, 0,01 mM szabad Ca<sup>2+</sup> (mind Sigma-Aldrich); pH 7,0. A bazális Mg<sup>2+</sup>-függő ATPáz aktivitást szintén ebben a pufferben határoztuk meg, kivéve, hogy ekkor a szabad Ca<sup>2+</sup>-ot 1,0 mM EGTA-ra cseréltük. A reakcióidő 37 °C-on 5 perc volt, melyet jéghideg 12%-os triklórecetsav hozzáadásával állítottunk le. Centrifugálást követően a foszfátot a felülúszóból kolorimetriás módszerrel határoztuk meg [78]. A Ca<sup>2+</sup>-stimulált ATPáz aktivitást a totál és a bazális (Mg<sup>2+</sup>) ATPáz aktivitás különbségeként számoltuk.

### *Izolált szívizomsejtek mechanikai vizsgálatának mérőrendszere*

A mélyfagyasztott (−70 °C) szívizomszövet mintákat izoláló oldatban (1,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 100,0 mM KCl, 2,0 mM EGTA, 4,0 mM ATP, 10,0 mM imidazol; pH 7,0) 4 °C-on mechanikailag izoláltuk és 0,5% Triton X-100 detergenssel membrán-permeabilizáltuk. Az izolált szívizomsejteket rozsdamentes rovartűk segítségével egy nagy sebességű hosszvezérlő motorhoz (Aurora Scientific, Aurora, Kanada) és egy érzékeny erőmérő egységhez (SensoNor AS, Horten, Norvégia) rögzítettük 15 °C-on (9. ábra A panel). Ezt követően a szívizomsejtek izometriás erőgenerációját [59] 2,3 μm szarkomerhosszon regisztráltuk, majd LabVIEW szoftver segítségével elemeztük (National Instruments, Austin, TX, USA). Az izolált szívizomsejtek Ca<sup>2+</sup>-függő erőgenerációját a preparátum relaxáló oldatból (10,0 mM BES, 37,11 mM KCl, 6,41 mM MgCl<sub>2</sub>, 7,0 mM EGTA, 6,94 mM ATP, 15,0 mM kreatin-foszfát; pH 7,2) aktiváló oldatba (összetétele megegyezik a relaxáló oldattal, de EGTA helyett CaEGTA-t tartalmaz) történő transzferével indukáltuk (9. ábra B panel). Kísérleteinkben a Ca<sup>2+</sup> koncentrációkat  $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$  egységekben adtuk meg, így a relaxáló oldat pCa 9,0, míg a

maximális aktiváló oldat pCa 4,75 volt. Minden oldatot frissen egészítettünk ki proteáz inhibitorokkal: fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF): 0,5 mM; leupeptin: 40  $\mu$ M; és E-64: 10  $\mu$ M. Minden említett vegyszer a Sigma-Aldrich-tól származik.



**9. ábra** A kontraktilis apparátus működése a kontroll, Ca<sup>2+</sup>-depletált és Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban.

**A)** Izolált, nyúzott szívizomsejtek mikroszkópos képe. A szívizomsejt-méretű preparátumokat szilikon ragasztó segítségével egy elektromágneses motorhoz (bal oldalon) és egy érzékeny erőmérőhöz (jobb oldalon) rögzítve feszítettük ki. Meg kell jegyeznünk, hogy csak a látszólag ép harántcsíkolattal bíró szívizomsejtek kerültek kiválasztásra és vizsgálatra. A szarkomerhosszt 2,3  $\mu$ m-re állítottuk be. A vonalas mérték 10  $\mu$ m. **B)** Az eredeti erőregisztrátumok a celluláris erőmérések kivitelezését demonstrálják. A membránfosztott szívizomsejtek maximális Ca<sup>2+</sup>-aktivált erőgenerációját a preparátumok relaxáló –  $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$  (pCa) 9,0 – oldatból maximális aktiváló – pCa 4,75 – oldatba történő transzferével indukáltuk. Az erőgeneráció maximális sebességi állandójának ( $k_{tr,max}$ ) meghatározása érdekében gyors ún. *release/restretch* manővert végeztünk pCa 4,75 mellett. A Ca<sup>2+</sup>-független erőt az eredeti sejthossz feszülésmentes 80%-án ismét relaxáló oldatban mértük.

A membránfosztott szívizomsejtek Ca<sup>2+</sup>-aktivált erőgenerációját maximális (pCa 4,75) és szubmaximális (pCa 5,4-7,0) aktiváló oldatok használatával regisztráltuk. A Ca<sup>2+</sup>-

kontrakciók plátó fázisában egy ún. *release-restretch* manővert hajtottunk végre az erő-regeneráció sebességi állandójának ( $k_{tr}$ ) meghatározása érdekében [59] (9. ábra B panel). A beavatkozás eredményeként (az eredeti sejthossz 80%-án) az aktin-miozin kereszthidak felbomlanak, majd az újból kialakuló erő exponenciálisan illeszthető. A  $k_{tr}$  aktin-miozin ciklus-állandót a pCa 4,75-6,0 tartományban határoztuk meg, mivel pCa >6,0 mellett az alacsony jel-zaj viszony az erő-regeneráció pontos illesztését nem tette lehetővé.

A különböző pCa (pCa 4,75-7,0) által kiváltott egyes aktív erő értékeket az adott pCa sorban megfelelő maximális erőre (pCa 4,75 mellett) normalizáltuk, majd a kapott pontsort Origin 6.0 elemző program segítségével (OriginLab, Northampton, MA, USA) egy speciális szigmoid (módosított *Hill*) függvénnyel illesztettük [59]:

$$F = F_0 * [Ca^{2+}]^{n_{Hill}} / (Ca_{50}^{n_{Hill}} + [Ca^{2+}]^{n_{Hill}});$$

melyben F a *steady state* erő adott  $[Ca^{2+}]$  mellett, míg  $F_0$ ,  $n_{Hill}$  és  $Ca_{50}$  (vagy pCa<sub>50</sub>) jelöli a maximális  $Ca^{2+}$ -aktivált erőt szaturáló  $[Ca^{2+}]$  mellett, valamint a szigmoid összefüggés meredekségét és félpontját, a fenti sorrendben. Ebből a szigmoid lefutású ún.  $Ca^{2+}$ -érzékenységi görbéből adódik a fél-maximális erő kifejtéshez szükséges pCa érték (pCa<sub>50</sub>), mely paraméter önmagában jellemzi az erőgeneráció  $Ca^{2+}$ -érzékenységét.

A vizsgált szívizomsejtek  $Ca^{2+}$ -független passzív erejét relaxáló oldatban (pCa 9,0) a preparátum 20%-os megrövidítése (a kezdeti hossz 80%-a) mellett mértük (9. ábra B panel). A kardiomiociták által kifejtett erő plátó szakasza és az ezt követő rapid *release* (nincs erőgeneráló aktin-miozin kapcsolat) zéró erő közötti különbség felel meg a szívizomsejtek totál erejének, amelyből a  $Ca^{2+}$ -független passzív erőkomponenst kivonva megkapjuk a  $Ca^{2+}$ -függő aktív erőt.

Kísérleteinkben a Langendorff-perfundált szívekből (n = 5-7/csoport) izolált szívizomsejtek (n = 12-13/csoport) kontraktilis teljesítményét vizsgáltuk. A mechanikai mérőrendszerrel regisztrált originális erőértékeket ( $\mu N$ -ban; 9. ábra B panel) a vizsgált

szívizomsejt keresztmetszetére ( $\mu\text{m}^2$ -ben a sejt szélességéből és magasságából számítva) vonatkoztatva az adott szívizomsejt feszüléseként fejeztük ki ( $\text{kN}/\text{m}^2$ -ben).

#### *Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)*

A Langendorff-perfundált bal kamrai szövetmintákat ( $n = 5/\text{csoport}$ ) fagyos mozsárban porítottuk és jéghideg pufferben [30,0 mM KCl, 15,0 mM imidazol, 5,0 mM NaCl, 1,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,0 mM EGTA, 1,0 mM EDTA, 0,5 mM DTT és  $\text{CaCl}_2$ , 0,3 mM *Calpain Inhibitor I* (Calbiochem, San Diego, CA, USA), leupeptin és *Phosphatase Inhibitor Cocktail I* (mind Sigma-Aldrich, ha másként nincs jelölve); pH 7,5] homogenizáltuk. A fehérjekoncentrációt kolorimetriás módszerrel BCA reagenssel határoztuk meg. A homogenizátumokat alikvotolás után azonnal nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapufferben 3 percig főztük. A  $\text{Ca}^{2+}$  paradox minták homogenizátumaiban a fehérjéket egy-dimenziós SDS-PAGE használatával (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) grádiens gélben (koncentráció tartomány: 6-18%; 30  $\mu\text{g}$  fehérje/sáv) szeparáltuk és ezüstfestéssel vizualizáltuk [31]. A kisméretű miofilamentális fehérjéket ( $\leq 100$  kDa körül) egy-koncentrációs SDS-PAGE használatával [ $\alpha$ -aktinin: 7%; dezmin: 10%; aktin, cTnT, Tm és cTnI: 15%; MLC-1 és MLC-2: 20% (Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories); 5-10  $\mu\text{g}$  fehérje/sáv] szeparáltuk.

#### *Western immunoblot*

Az általunk vizsgált miofilamentális fehérjéket gélelektroforézist követő protein transzfer után Western immunoblottal azonosítottuk. A fehérjék vizualizációját fokozott kemilumineszcens (ECL, *enhanced chemiluminescence*) detekcióval a korábbiakhoz hasonlóan végeztük [5].

A membránokat a következő elsődleges antitestekkel jelöltük: anti- $\alpha$ -aktinin EA-53 klón (Sigma-Aldrich), hígítás 1:5000; anti-dezmin DE-U-10 klón (Sigma-Aldrich), hígítás 1:7000; anti-aktin (Abcam, Cambridge, UK), hígítás 1:1000; anti-cTnT 1A11 klón (Research

Diagnostics, Flanders, NJ, USA), hígítás 1:3000; anti-Tm (Sigma-Aldrich), hígítás 1:600; anti-cTnI 19C7 klón (Research Diagnostics), hígítás 1:1000; anti-MLC-1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), hígítás 1:7000; anti-MLC-2 (Abcam), hígítás 1:400. A detekcióhoz peroxidáz-konjugált másodlagos antitestet (Sigma-Aldrich) használtunk megfelelően, hígítás 1:3000.

#### *MHC izoformák szeparációja*

Az MHC Coomassie késsel végzett analíziséhez a  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxnak kitett patkány kamrai szöveteket (n = 5/csoport) denaturáló körülmények között homogenizáltuk. Az MHC izoformákat ( $\alpha$  és  $\beta$ ) 4%-os poliakrilamid gélen (4  $\mu\text{g}$  fehérje/sáv) a korábban leírtakhoz hasonlóan szeparáltuk [16,19]. Az elektroforézist konstans 220 V feszültségen 3-3,5 órán át 15 °C-on végeztük. A géleket *Coomassie brilliant blue R-250* gélfestékkel (Bio-Rad Laboratories) 2 órán át festettük, majd 7%-os ecetsavval mostuk. Humán szívelégtelen kamrai szívizomszövet szolgált  $\alpha$ -MHC és  $\beta$ -MHC izoforma kontrollként. Az MHC izoformákat GS-670 Imaging Densitometer (Bio-Rad Laboratories) rendszerrel dokumentáltuk.

Az MHC Western immunoblot analíziséhez a mintákat (n = 4-6/csoport) a mechanikai mérésekhez hasonlóan dolgoztuk fel, de ebben az esetben a szívizomszövetet izoláló oldat helyett mintapufferben oldottuk fel. Hím SD patkány *musculus soleus* vázizom szolgált  $\beta$ -MHC izoforma kontrollként. Az MHC izoformákat korábbi SDS-PAGE protokollt módosítva szeparáltuk [77]. A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd elsődleges [pán anti-MHC (Sigma-Aldrich), hígítás 1:10000; és anti- $\beta$ -MHC izoforma: egér IgM, MYH7 (A4.840) sc-53089 (Santa Cruz Biotechnology), hígítás 1:1000] és másodlagos [peroxidáz-konjugált másodlagos antitest (Sigma-Aldrich), hígítás 1:3000; és kecske anti-egér IgM, 115-035-075 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), hígítás 1:20000] antitestekkel megfelelően jelöltük. A fehérjéket ECL reakcióval detektáltuk és MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzsálem, Izrael) rendszerrel dokumentáltuk. A

jelintenzitásokat ImageJ 1.41o képelemző program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) segítségével értékeltük.

### *Titin esszék*

A titin izoforma összetétel és foszforiláció vizsgálatát korábbi leírást módosítva végeztük [9]. A Langendorff-perfundált kamrai szívizomszöveteket a mechanikai mérésekhez hasonlóan készítettük elő (n=3 duplikátumban/csoport), és SDS mintapufferben [8,0 M urea, 2,0 M tiourea, 3,0% SDS, 75,0 mM ditiotreitól (DTT), 0,05 M Tris\_HCl (pH 6,8), 10,0% glicerol, 0,004% bróm-fenol kék, 40,0 µM leupeptin, 10,0 µM E-64 (mind Sigma-Aldrich)] tártuk fel. A Ca<sup>2+</sup> paradox kísérleti csoportjai mellett humán szívelégtelen kamrai minta szolgált N2BA és N2B titin izoforma kontrollként. Centrifugálást követően (16000 g 5 percig 24 °C-on) a fehérjekoncentrációt a felülúszóból dot-blot technikával határoztuk meg és 2 mg/ml koncentrációra állítottuk be BSA standard alapján. A titin szeparációját agarózzal megerősített 2%-os géleken PAGE technikával végeztük. A minták a géleken 2 mA konstans áramerősség mellett 540 percig futottak. A géleket Coomassie kék (Reanal Kft., Budapest, Magyarország) fehérjefestékkel festettük a titin azonosítása és izoforma analízise céljából.

### *Statisztikai analízis*

Az adatokat átlag ± a középérték közepes hibája (SEM) formában tüntettük fel. A statisztikai analíziseket és az eredmények ábrázolását GraphPad Prism 5.02 szoftverrel (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) végeztük. A Ca<sup>2+</sup> paradox csoportjai közötti különbségeket egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA) Bonferroni *post-hoc* teszt használatával értékeltük, ahol P<0,05 értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

## 4.2. Módszerek II: az mRen2 modell

### *A kísérleti állatok felhasználásának irányelvei*

Az állatkísérleti protokollokat az Európai Parlament 2010/63/EU sz. előírásával összhangban ellenőrizte és elfogadta a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (Etikai engedély száma: 1/2013/DE MÁB). A transzgenikus mRen2 patkány törzs vizsgálatában szintén SD patkányok szolgáltak geno- és fenotípus kontrollként [50].

### *A hipertónia transzgenikus mRen2 patkány modellje*

Egér *Ren-2<sup>d</sup>* renin transzgén hordozó (mRen2) hím homozigóta patkányokat (n = 6) a „Max Delbrück Centrum Für Molekulare Medizin” (MDC in the Helmholtz Association, Berlin-Buch, Németország) intézettől szereztük be. Az mRen2, valamint az azonos nemű, korban illesztett kontroll SD patkányok (n = 6, Wobe Kft., Budapest, Magyarország) 9 hetes korukban érkeztek állatházunkba. Az állatokat standard laboratóriumi diétán (normál patkány táp és csapvíz *ad libitum*) mindenféle farmakológiai (pl. vérnyomáscsökkentő) kezelés nélkül tartottuk. A kísérleti állatokat 15 hetes korukban ketamin (50 mg/kg) és xylazin (5 mg/kg) anesztéziában áldoztuk fel. A patkányok szívét eltávolítottuk, a bal kamrát izoláló oldatban azonnal leválasztottuk, folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd későbbi felhasználás céljából  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### *Miokardiális ACE és ACE2 aktivitás*

Körülbelül 0,1 g (nedves tömeg) mélyfagyasztott bal kamrai mintát (n = 4, SD és mRen2 patkányokból egyaránt) tízszeres térfogatú jéghideg *Dulbecco's* foszfát-puffer sóoldatban (DPBS,  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Mg}^{2+}$ -mentes, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) homogenizáltunk (Pro200 homogenizátor, ProScientific, Oxford, CT, USA). A fehérjekoncentrációt BCA reagenssel borjú szérum albumin (BSA, mindkettő Sigma-Aldrich) standardhoz viszonyítva határoztuk meg. A fehérjekoncentráció 20 mg/ml körül volt. Az ACE

aktivitás meghatározás reakcióelegye 6 µl szívhomogenizátumot tartalmazott pufferben (100,0 mM Tris\_HCl, 15,0 µM Abz-FRK(Dnp)P, 50,0 mM NaCl, 10,0 µM ZnCl<sub>2</sub>; pH 7,0). A 45 perces reakcióidő során a fluoreszcens intenzitásokat (excitáció: 320 nm; emisszió: 405 nm) 60 másodpercenként mértük. A mért értékeket az idő függvényében ábrázoltuk és lineáris regresszióval illesztettük. Az ACE aktivitást az alábbi képlet szerint kalkuláltuk:

$$\text{ACE aktivitás} = (S / k) * D / P;$$

melyben S a fluoreszcens intenzitás emelkedésének sebessége (meredekség), k a fluoreszcens intenzitás emelkedése 1 µmol szubsztrát hasítása esetén, D a hígítási faktor (35 ezekben a kísérletekben) és P a fehérjekoncentráció (mg/ml-ben). Egy Unit megfelel 1 µmol szubsztrát hasításának 1 perc alatt 1 mg fehérje által.

Az ACE2 aktivitás meghatározását korábbi leíráshoz hasonlóan végeztük [81]. Az ACE2 aktivitás meghatározás reakcióelegyéhez 20 µl szövethomogenizátumot adtunk proteáz inhibitorok jelenlétében: 10,0 µM Bestatin-hidroklorid; 10,0 µM Z-prolil-prolin (Enzo Life Science, Exeter, UK); 5,0 µM Amastatin-hidroklorid; 10,0 µM Captopril és 5,0 mM NaCl; 100,0 µM ZnCl<sub>2</sub>; 75,0 mM Tris\_HCl; pH 6,5 (mind Sigma-Aldrich, ha nincs másként megadva). A reakció-hőmérséklet 37 °C volt. A 84 perces reakcióidő során a fluoreszcens intenzitásokat (excitáció: 320 nm; emisszió: 405 nm) 6 percenként mértük. A mért értékeket az idő függvényében ábrázoltuk és lineáris regresszióval illesztettük. Az illesztést  $r^2 > 0,8$  esetén fogadtuk el. Az ACE2 aktivitást az alábbi képlet szerint kalkuláltuk:

$$\text{ACE2 aktivitás} = (S / k) * D / P;$$

melyben S a fluoreszcens intenzitás emelkedésének sebessége (meredekség), k a fluoreszcens intenzitás emelkedése 1 nmol szubsztrát hasítása esetén, D a hígítási faktor (10 ezekben a kísérletekben) és P a fehérjekoncentráció (mg/ml-ben). Egy Unit megfelel 1 nmol szubsztrát hasításának 1 perc alatt 1 mg fehérje által.

### *Izolált szívizomsejtek mechanikai teljesítménye*

SD kontroll és mRen2 szívekből (n = 4/csoport) izolált szívizomsejtek (n = 5-6/szív) mechanikai teljesítményét a Ca<sup>2+</sup> paradox protokollja szerint vizsgáltuk (lásd 4.1. fejezet).

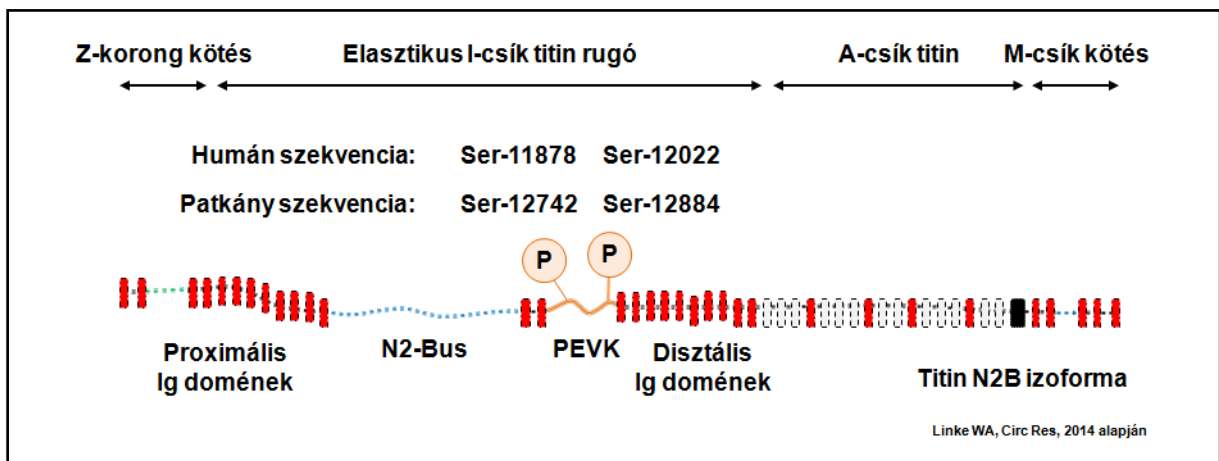
### *Titin esszék*

A titin izoforma összetétel és foszforiláció vizsgálatát korábbi leírást módosítva végeztük [9,40]. A titin szeparációját és azonosítását SD és mRen2 bal kamrai szövetmintákban (n = 4 duplikátumban/csoport) a Ca<sup>2+</sup> paradox protokolljának megfelelően végeztük el (lásd 4.1. fejezet). Az SD kontroll és mRen2 mintákat tartalmazó géleket Pro-Q Diamond foszfoprotein festékkel (Invitrogen; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) is megfestettük 90 percig a titin teljes foszforilációs állapotának becslésére. Ezt követően a géleket a gyártó utasításai szerint mostuk és kezeltük.

Ezen túlmenően Western immunoblottal vizsgáltuk a titin PEVK domén (prolin, glutamát, valin és lizin aminosavakban gazdag szakasz) egyes szerin oldalláncainak foszforilációját is [52]. Az általunk használt foszfo-specifikus antitesteket *Granzier* és munkatársai validálták [40,42]. Ezek a foszfo-specifikus antitestek a teljes humán titin szekvencia alapján a Ser-11878 (PS26, GL Biochem, Shanghai, Kína, hígítás 1:1000) és a Ser-12022 (PS170, Genscript, Piscataway, NJ, USA, hígítás 1:1000) foszforilált oldalláncokat ismerik fel. A humán Ser-11878 és Ser-12022 foszforilációs helyek egyenként megfelelnek a patkány szekvencia Ser-12742 és Ser-12884 oldalláncainak [39] (10. ábra). Végül peroxidáz-konjugált másodlagos antitestet (anti-nyúl-POD, Sigma-Aldrich) és ECL reakciót használtunk a detekcióhoz.

A fehérje sávokat MF-ChemiBIS 3.2 gëldokumentációs rendszerrel (DNR Bio-Imaging Systems) dokumentáltuk. A 2%-os géleken 3000-3300 kDa körül kizárólag a titin szignálintenzitásait azonosítottuk, melyeket ImageJ 1.41o képelemző programmal (National Institutes of Health) értékeltünk. Az optikai denzitásokat görbe alatti területre konvertáltuk

(MagicPlot szoftver, Magicplot Systems LLC, Szentpétervár, Oroszország). Ezek után a totál titin foszforilációt a Pro-Q Diamond által kapott foszfo-protein jelintenzitás és a Coomassie késsel kapott teljes fehérjemennyiség szignál hányadosaként fejeztük ki. Hasonlóképpen, a titin PEVK domén oldallánc-specifikus ECL szignálokat a transzferált protein mennyiségének megfelelő Western blot festés jelintenzitására normalizáltuk. A titin foszforiláció mértékét az SD és mRen2 csoportokban egymáshoz viszonyított relatív egységekben fejeztük ki.



**10. ábra** A titin PEVK régió ismert protein kinázok által foszforilált oldalláncai [52]. A titin – patkányokban predomináns – N2B izoformájának sematikus szerkezete. A PEVK domén ismert foszforilációs helyei (P) a humán és az identikus patkány szekvencia alapján. Ig: immunglobulin-szerű; N2-Bus: N2-B *unique sequence* (egyedi szekvencia) domén; PEVK: prolin, glutamát, valin és lizin aminosavakban gazdag domén; Ser: szerin.

*Protein kináz  $\text{Ca}$  (PKC $\alpha$ ) és aktin kontroll Western immunoblot*

Körülbelül 0,1 g (nedves tömeg) mélyfagyasztott SD és mRen2 bal kamrai szívizomszövetet (n = 4/csoport) tízszeres térfogatú jéghideg DPBS-ben ( $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Mg}^{2+}$ -mentes, Gibco, Thermo Fisher Scientific) homogenizáltunk (Pro200 homogenizátor, ProScientific). A homogenizátumokat azonos volumenű kétszeresen koncentrált SDS mintapufferrel (Sigma-Aldrich) egészítettük ki és 10 percig 100 °C-on inkubáltuk. Ötven  $\mu\text{g/sáv}$  fehérjét vittünk fel 10%-os SDS-poliakrilamid gélekre. A membránokat 3% BSA (Sigma-Aldrich) Tris-pufferelt sóoldatban (TBS, Sigma-Aldrich) blokkoltuk. A PKC $\alpha$  expressziót és aktivitást anti-PKC $\alpha$  (Sigma-Aldrich, hígítás 1:20000) [57] és anti-foszfo(Ser-657/Tyr-658)-PKC $\alpha$  (EMD

Millipore, Temecula, CA, USA, hígítás 1:500) antitestekkel teszteltük, a fenti sorrendben. Az aktin expressziót anti-aktin antitesttel (Sigma-Aldrich, hígítás 1:3500) vizsgáltuk. A szignálokat a titinhez hasonló módon rögzítettük és dolgoztuk fel.

#### *Statisztikai analízis*

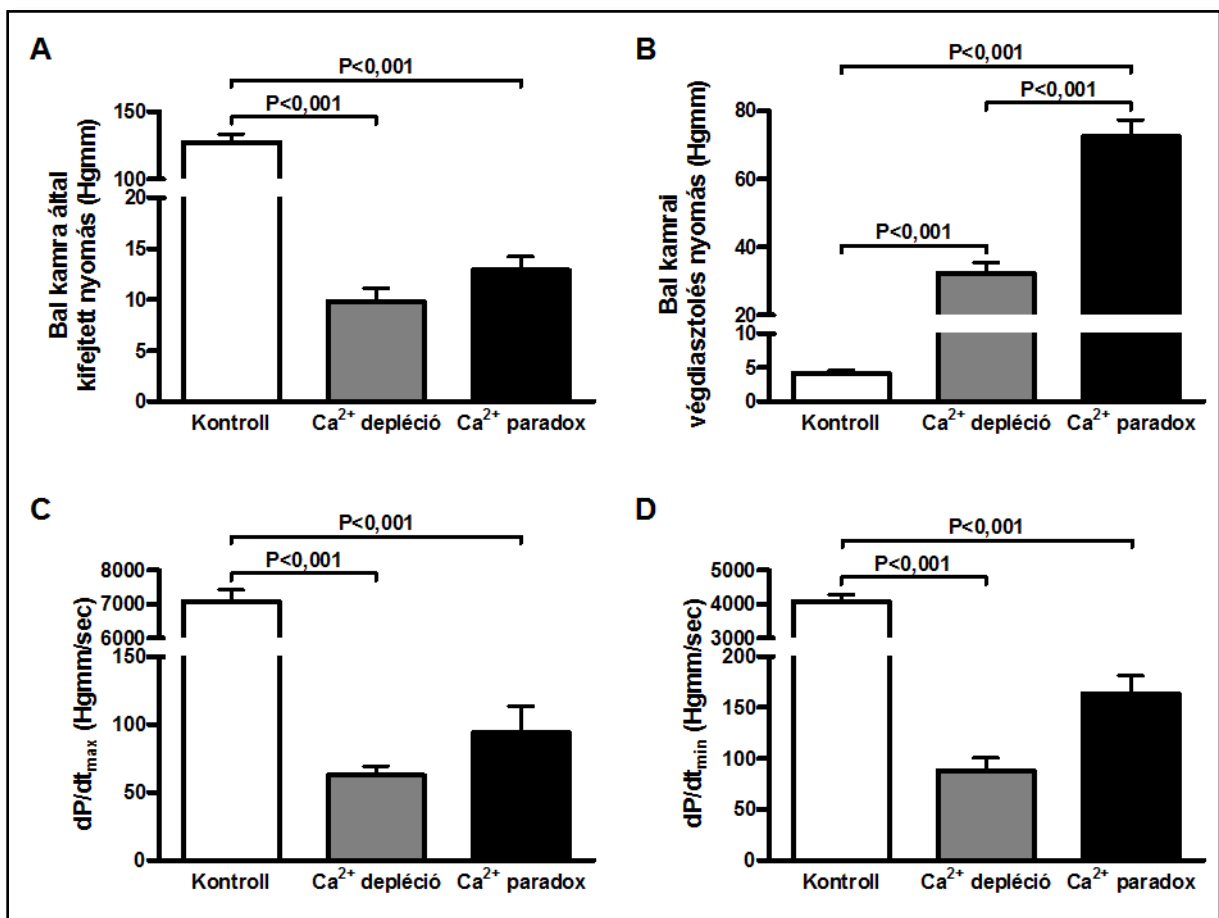
Az adatokat átlag  $\pm$  a középérték közepes hibája (SEM) formában GraphPad Prism 5.02 szoftverrel (GraphPad Software) tüntettük fel. Az SD és mRen2 csoportok összehasonlítására nem-paraméteres Mann-Whitney tesztet használtunk, ahol  $P < 0,05$  értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Kontraktilis és miofibrilláris diszfunkció $\text{Ca}^{2+}$ paradoxban

*A  $\text{Ca}^{2+}$  paradox drámaian rontja a bal kamra funkciót*

A kontroll bal kamra által kifejtett nyomás ( $127,4 \pm 6,1$  Hgmm) látványosan csökkent  $\text{Ca}^{2+}$  depléció ( $9,8 \pm 1,3$  Hgmm,  $P < 0,001$ ) és  $\text{Ca}^{2+}$  paradox ( $12,9 \pm 1,3$  Hgmm,  $P < 0,001$ ) hatására egyaránt (11. ábra A panel). A kontroll  $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$  és  $\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$  ( $7073,8 \pm 351,0$  és



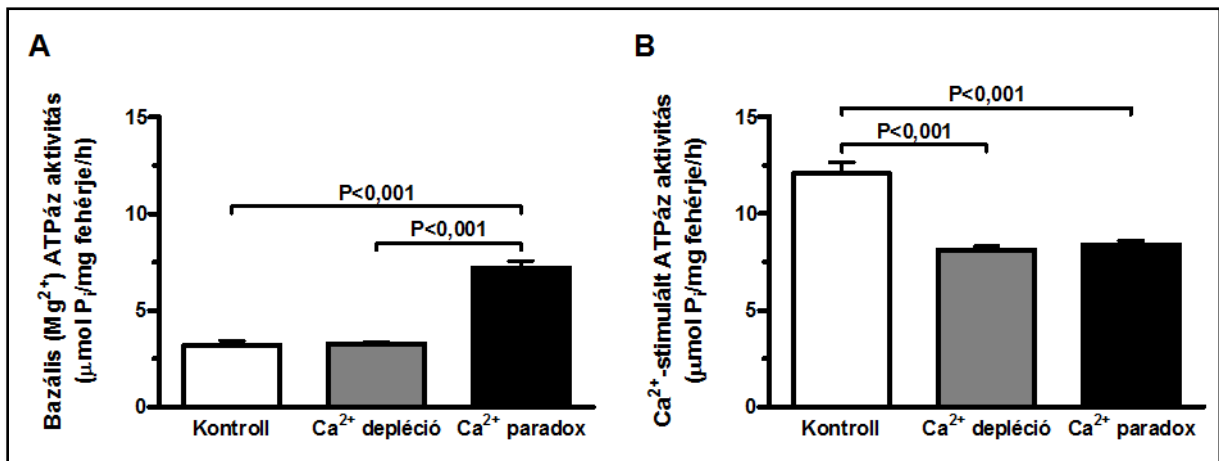
**11. ábra** A bal kamrai kontraktilitás paramétereit kontroll perfúzió,  $\text{Ca}^{2+}$  depléció és  $\text{Ca}^{2+}$  paradox során Langendorff szerint perfundált patkány szívekben.

**A)** A bal kamra által kifejtett nyomás (*left ventricular developed pressure*). **B)** Bal kamrai végdiasztolés nyomás (*left ventricular end-diastolic pressure*). **C)** A bal kamrában kifejlődő nyomás idő szerinti első deriváltjának maximuma ( $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ ). **D)** A bal kamrában kifejlődő nyomás idő szerinti első deriváltjának minimuma ( $\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$ ) abszolút értékben. Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek,  $n = 7-9$ /csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha ANOVA szerint  $P < 0,05$ .

4075,3 ± 206,2 Hgmm/sec, a fenti sorrendben) ugyancsak jelentősen zuhant Ca<sup>2+</sup> depléció (62,6 ± 6,9 és 87,9 ± 12,6 Hgmm/sec, a fenti sorrendben, P<0,001) és Ca<sup>2+</sup> paradox (93,9 ± 19,7 és 163,4 ± 17,9 Hgmm/sec, a fenti sorrendben, P<0,001) során (11. ábra C és D panel, a fenti sorrendben). Ugyanakkor, a kontroll bal kamrai végdiasztolés nyomás (4,1 ± 0,5 Hgmm) markánsan emelkedett Ca<sup>2+</sup> deplécióban (32,2 ± 3,3 Hgmm, P<0,001), és még tovább nőtt Ca<sup>2+</sup> paradoxban (72,4 ± 5,0 Hgmm, P<0,001; 11. ábra B panel).

*A miofibrilláris Ca<sup>2+</sup>-stimulált ATPáz aktivitás csökken, míg a Mg<sup>2+</sup>-függő ATPáz aktivitás nő Ca<sup>2+</sup> paradoxban*

A kontroll bazális Mg<sup>2+</sup>-függő ATPáz aktivitás (3,20 ± 0,25 μmol P<sub>i</sub>/mg fehérje/h) nem változott Ca<sup>2+</sup> deplécióban (3,27 ± 0,10 μmol P<sub>i</sub>/mg fehérje/h), de nőtt Ca<sup>2+</sup> paradox során (7,21 ± 0,36 μmol P<sub>i</sub>/mg fehérje/h, P<0,001; 12. ábra A panel). Ezzel szemben, a kontroll Ca<sup>2+</sup>-stimulált ATPáz aktivitás (12,08 ± 0,57 μmol P<sub>i</sub>/mg fehérje/h) lecsökkent Ca<sup>2+</sup> deplécióban (8,13 ± 0,19 μmol P<sub>i</sub>/mg fehérje/h, P<0,001), és az is maradt Ca<sup>2+</sup> paradox során is (8,40 ± 0,22 μmol P<sub>i</sub>/mg fehérje/h, P<0,001; 12. ábra B panel).



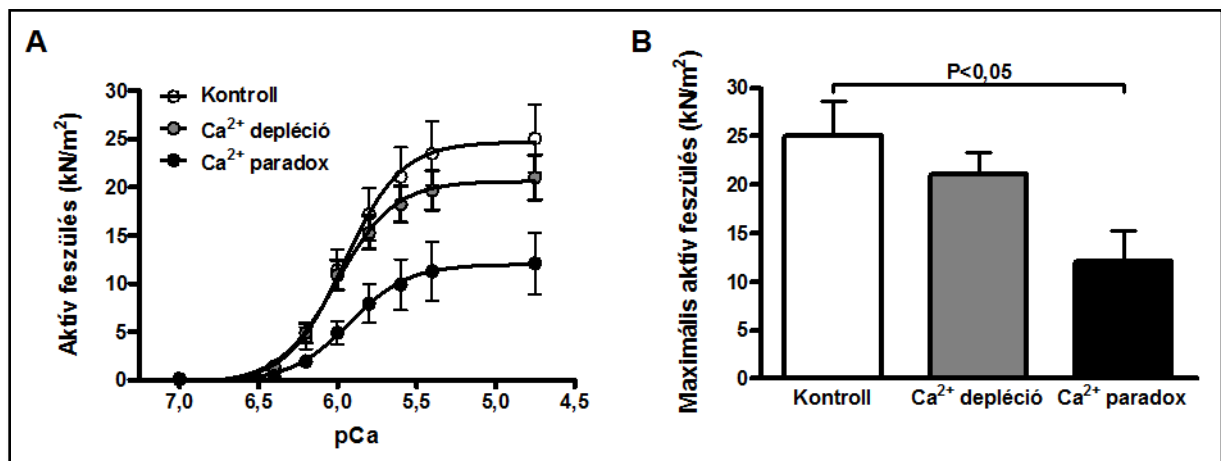
**12. ábra** Bal kamrai miofibrilláris ATPáz aktivitások a kontroll, Ca<sup>2+</sup> depléció és Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban.

**A)** Bazális Mg<sup>2+</sup>-függő miofibrilláris ATPáz aktivitás. **B)** Ca<sup>2+</sup>-stimulált miofibrilláris ATPáz aktivitás. Az adatok átlagérték ± SEM formában szerepelnek, n = 7-9/csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha ANOVA szerint P<0,05.

### A $Ca^{2+}$ paradox lerontja a szívműködés $Ca^{2+}$ -aktivált erőgenerációját

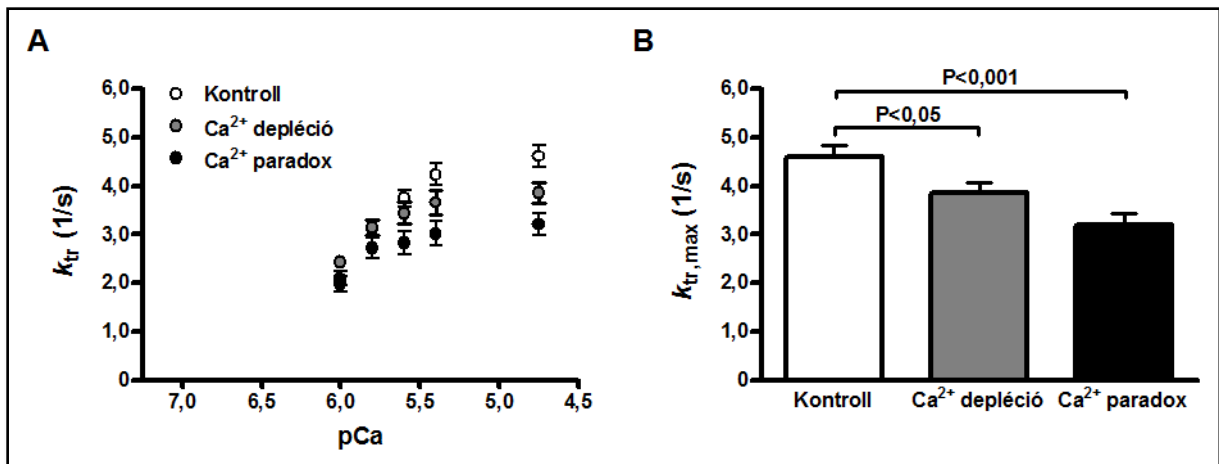
Az általunk kiválasztott, izolált és kifeszített szívműködés látszólag ép harántcsíkolattal (9. ábra A panel) és mérhető funkcióval (9. ábra B panel) bírtak a  $Ca^{2+}$  paradox mindhárom vizsgálati csoportjában. Mind az aktív feszülés (13. ábra A panel), mind a  $k_{tr}$  (14. ábra A panel) vs. pCa összefüggések nyilvánvaló különbségeket mutattak a kísérleti csoportok  $Ca^{2+}$ -függő erőgenerációjában. A kardiomiociták maximális aktív feszülése (13. ábra B panel)  $Ca^{2+}$  deplécióban ( $21,04 \pm 2,32$  kN/m<sup>2</sup>) nem volt szignifikánsan különböző a kontroll értékektől ( $25,07 \pm 3,51$  kN/m<sup>2</sup>), de az jelentősen csökkent a  $Ca^{2+}$  paradoxnak kitett sejtekben ( $12,12 \pm 3,19$  kN/m<sup>2</sup>,  $P < 0,05$ ). A kontroll szívműködés maximális  $k_{tr}$  értékétől pCa 4,75 mellett ( $k_{tr,max}$ ,  $4,61 \pm 0,22$ ) a  $Ca^{2+}$  depléció ( $3,85 \pm 0,21$ ,  $P < 0,05$ ) és a  $Ca^{2+}$  paradox ( $3,21 \pm 0,23$ ,  $P < 0,001$ ) csoportok sejtei egyaránt alacsonyabb értékeket produkáltak (14. ábra B panel).

A vizsgált szívműködés  $Ca^{2+}$ -érzékenységére vonatkozóan (15. ábra A panel) a pCa<sub>50</sub> érték  $5,99 \pm 0,02$  volt a  $Ca^{2+}$  depléció csoportban, amely azonban szignifikánsan nem



**13. ábra** Izolált szívműködés mechanikai teljesítménye a kontroll,  $Ca^{2+}$  depléció és  $Ca^{2+}$  paradox csoportokban.

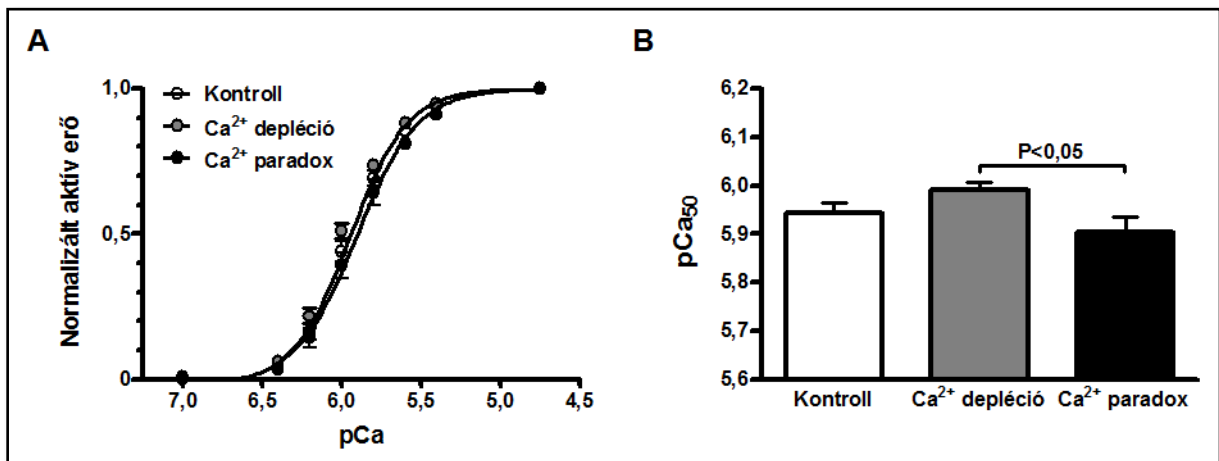
**A)** A szívműködés aktív feszülése 2,3  $\mu$ m szarkomerhosszon az alkalmazott pCa függvényében. **B)** A vizsgált szívműködés maximális aktív feszülését pCa 4,75 mellett oszlopdiagramon hasonlítottuk össze. Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek,  $n = 12-13$ /csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha ANOVA szerint  $P < 0,05$ .



**14. ábra** Az aktin-miozin ciklus sebessége a kontroll, Ca<sup>2+</sup> depléció és Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban.

**A)** Az erőregeneráció sebességi állandója ( $k_{tr}$ ) az alkalmazott pCa függvényében. **B)** A vizsgált szívizomsejtek erőregenerációjának maximális sebességi állandóját pCa 4,75 mellett ( $k_{tr,max}$ ) oszlopdiagramon hasonlítottuk össze. Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek, n = 12-13/csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha ANOVA szerint  $P < 0,05$ .

különbözött a kontroll csoport pCa<sub>50</sub> értékétől ( $5,94 \pm 0,02$ ; 15. ábra B panel). Ugyanakkor, a pCa<sub>50</sub> értéke  $5,90 \pm 0,03$  volt Ca<sup>2+</sup> repléció követően, ami a Ca<sup>2+</sup> depléció csoporthoz képest alacsonyabb Ca<sup>2+</sup>-érzékenységre utal a Ca<sup>2+</sup> paradox csoportban ( $P < 0,05$ ; 15. ábra B panel).



**15. ábra** Az erőregeneráció Ca<sup>2+</sup>-érzékenysége kontroll, Ca<sup>2+</sup>-depletált és Ca<sup>2+</sup> paradoxnak kitett szívizomsejtekben.

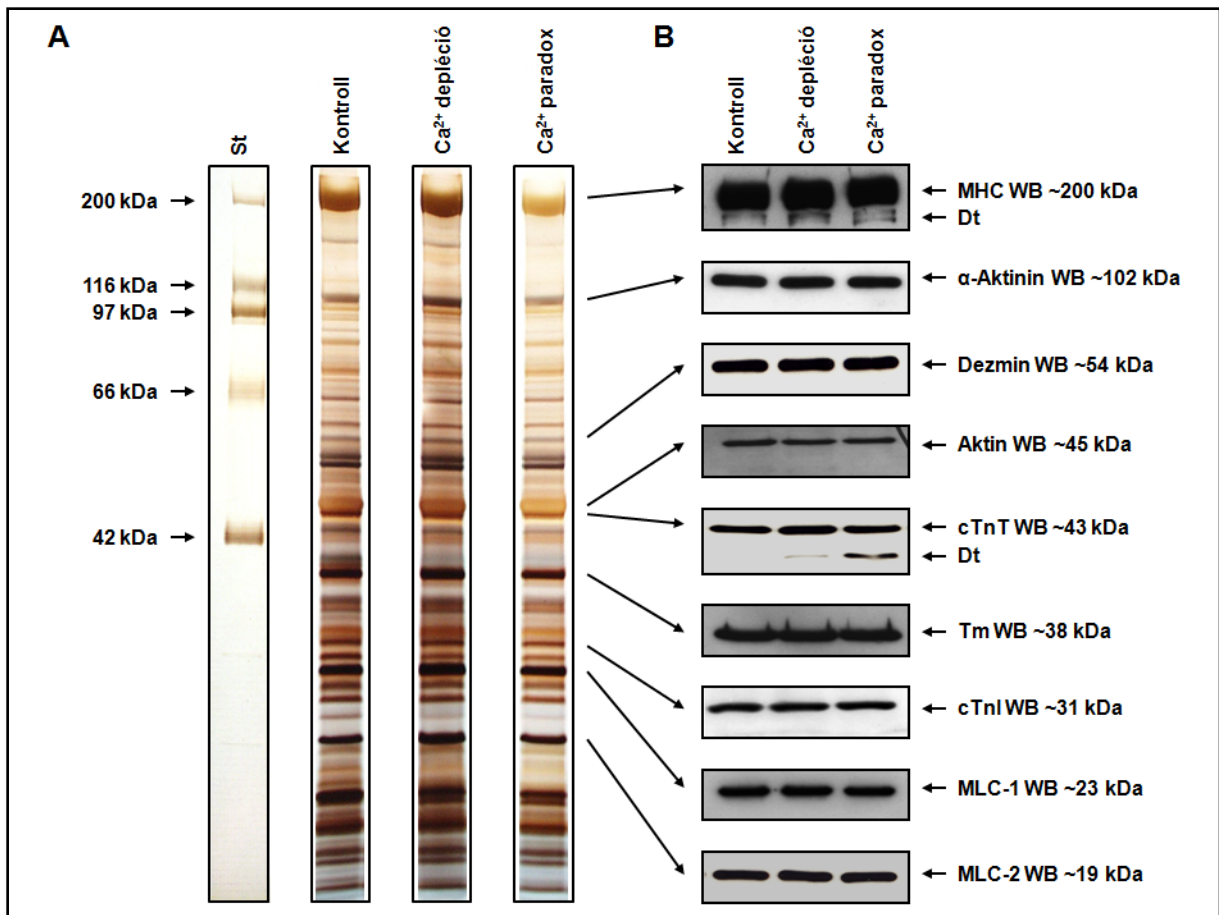
**A)** A normalizált aktív erő-pCa összefüggések illesztésével a szívizomsejtek szigmoid Ca<sup>2+</sup>-érzékenységi görbéjét kapjuk meg. **B)** Az erőregeneráció Ca<sup>2+</sup>-érzékenységét a félmaximális kontrakcióhoz szükséges pCa szerint (pCa<sub>50</sub>) oszlopdiagramon hasonlítottuk össze. Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek, n = 12-13/csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha ANOVA szerint  $P < 0,05$ .

A szívizomsejtek passzív feszülésében (18. ábra C panel) a kontrollhoz képest ( $2,13 \pm 0,29 \text{ kN/m}^2$ ) nem találtunk változást sem  $\text{Ca}^{2+}$  deplécióban ( $2,11 \pm 0,54 \text{ kN/m}^2$ ), sem  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxban ( $2,25 \pm 0,35 \text{ kN/m}^2$ ).

## 5.2. $\alpha$ -MHC és cTnT degradáció $\text{Ca}^{2+}$ paradoxban

*A  $\text{Ca}^{2+}$  paradox károsítja a miofibrillumok integritását: célkeresztben az  $\alpha$ -MHC és a cTnT*

A miokardiális homogenizátumok reprezentatív fehérjeösszetétele ( $\leq 200 \text{ kDa}$ ) ezüsttel festett grádiensgélen a 16. ábra A panelen látható. A potenciális fehérjedegradáció kimutatására célzott Western immunoblot módszerrel vizsgáltuk meg számos miofilamentális fehérje integritását (16. ábra B panel). A kontroll csoporthoz képest a pán MHC Western immunoblot szemmel láthatóan több fehérjesávot is azonosított a  $\text{Ca}^{2+}$  depléció és a  $\text{Ca}^{2+}$  paradox csoportokban, mely sávok nagyobb mobilitással jelentek meg, mint az MHC anyamolekula, utalva ezzel az MHC degradációjára (16. ábra B panel). A faj-függő MHC expressziós sajátosságokból adódóan a  $\beta$ -MHC izoformát Western immunoblottal nem tudtuk kimutatni az általunk vizsgált patkány szívekben (17. ábra C panel). Ennek megfelelően a 16. ábra B panelen látható MHC izoforma az  $\alpha$ -MHC, mivel ez az egyetlen MHC izoforma, ami a mintáinkban expresszálódik. Az MHC izoformák specifikus elektroforetikus szeparációját követő Coomassie festés szintén csak az  $\alpha$ -MHC izoformát igazolta a kontroll csoportban (17. ábra A panel), mely izoforma azonban az anyamolekulától valamivel alacsonyabb fehérjesávként jelent meg a  $\text{Ca}^{2+}$  depléció és a  $\text{Ca}^{2+}$  paradox csoportokban, utalva ezzel az MHC degradációra ezekben a mintákban (17. ábra B panel).

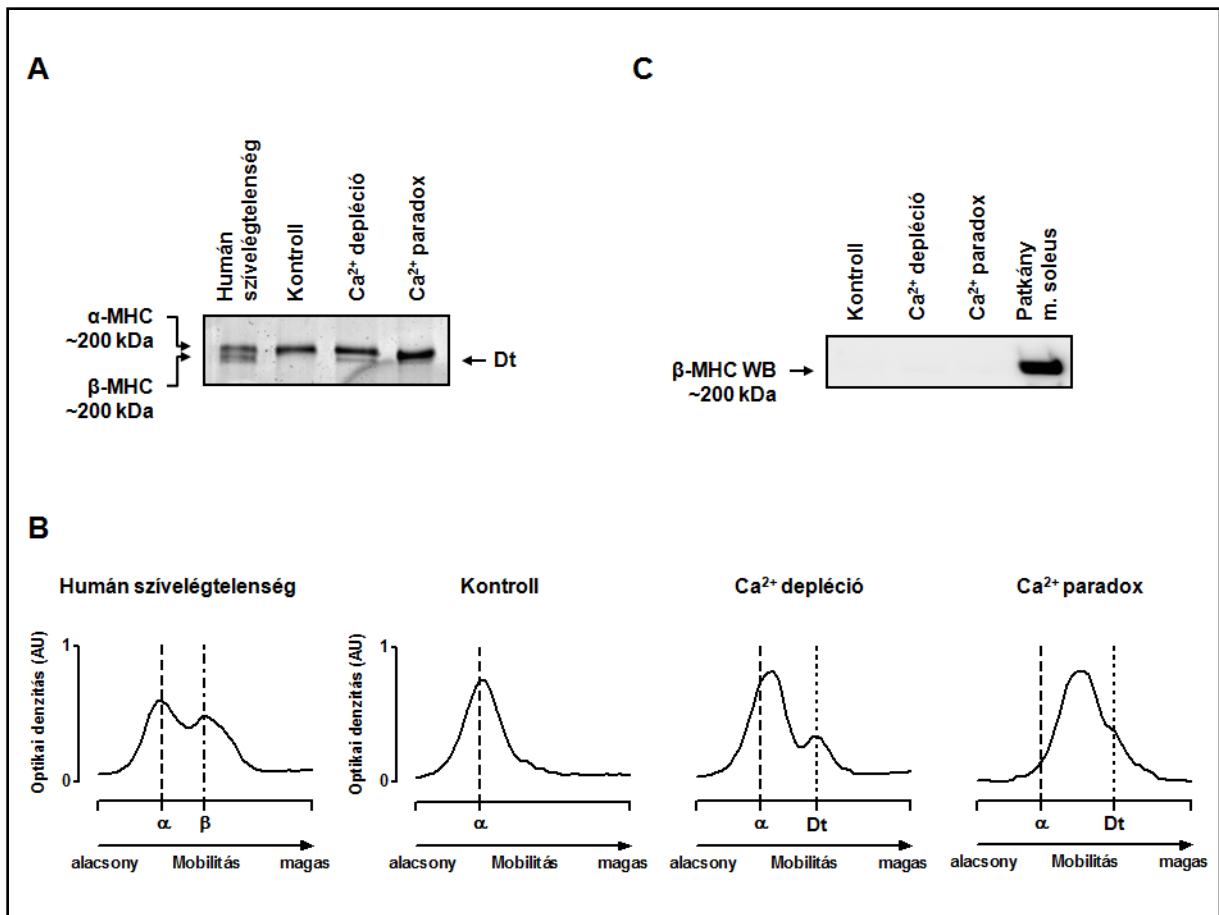


**16. ábra** Fehérje kompozíció és degradáció Langendorff-perfundált patkány szívek kamrai homogenizátumaiban.

**A)** Reprezentatív fehérje mintázat ( $\leq 200$  kDa) ezüsttel festett 6-18% grádiens poliakrilamid géleken. A kontroll,  $\text{Ca}^{2+}$  depléció és  $\text{Ca}^{2+}$  paradox minták együtt futottak, de más sorrendben (fekete keretben). St: molekulaméret standard. **B)** Reprezentatív vágatlan képek az egyes miofilamentális fehérjék azonosításáról és degradációjuk vizsgálatáról Western immunoblot (WB) szerint. A fehérje sávok 200 kDa, 102 kDa, 54 kDa, 43 kDa, 38 kDa, 31 kDa, 23 kDa és 19 kDa körül együtt futottak a miozin nehéz láncsal (MHC), az  $\alpha$ -aktininnel, a dezminnel, az aktinnal, a kardiális troponin T-vel (cTnT), a tropomiozinnal (Tm), a kardiális troponin I-vel (cTnI), a miozin könnyű lánc 1-es (MLC-1) és 2-es típusal (MLC-2), a fenti sorrendben. Dt: degradációs termék.

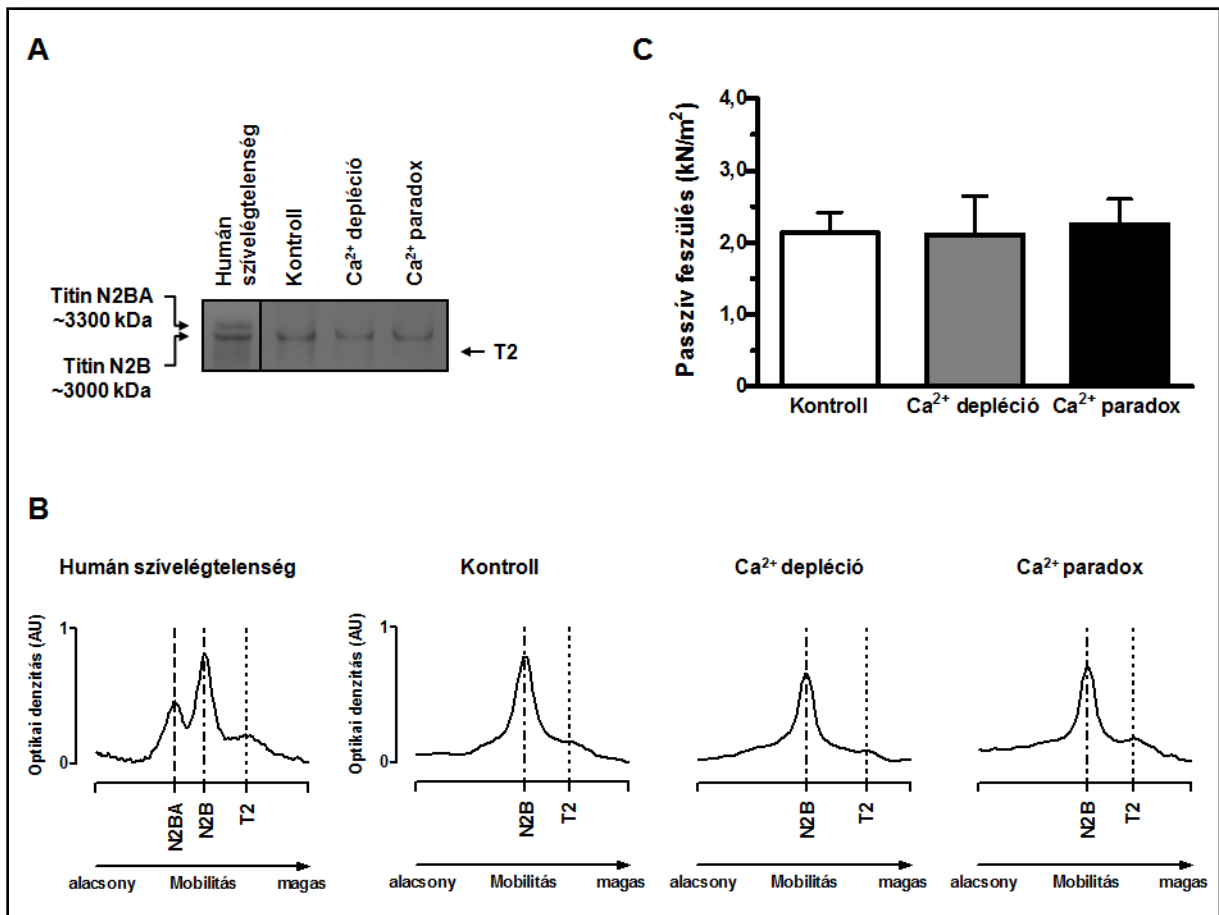
Továbbá, ahogy az a 16. ábra B panelen látható, a cTnT is szemmel látható progresszív degradációt mutatott  $\text{Ca}^{2+}$  depléció és  $\text{Ca}^{2+}$  repléció hatására.

Ezzel szemben, kísérleti csoportjaink között nem találtunk változást a fehérjék mennyiségében és integritásában az  $\alpha$ -aktinin, dezmin, aktin, Tm, cTnI, MLC-1 és MLC-2 esetében (16. ábra B panel). Látszólag a titin sem mutatott degradációt  $\text{Ca}^{2+}$  depléció és  $\text{Ca}^{2+}$  paradox során (18. ábra A és B panel).



**17. ábra** MHC izoformák vizsgálata kamrai homogenizátumokban a kontroll, Ca<sup>2+</sup> depléció és Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban.

**A)** Az MHC izoformákat poliakrilamid géleken szeparáltuk, majd Coomassie késsel festettük. A vágatlan reprezentatív kísérletben a minták együtt futottak. Humán szívelégtelen kamrai minta α-MHC és β-MHC izoforma kontrollként szolgált. **B)** A megfelelő optikai denzitások – tetszőleges egységben (*arbitrary unit*, AU) – az MHC anyamolekula (α izoforma) nagyobb migrációs mobilitását, valamint egy degradációs termék (Dt) ezzel párhuzamos megjelenését igazolták a Ca<sup>2+</sup> depléció és a Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban. Öt független MHC szeparációt végeztünk hasonló eredménnyel. **C)** A 200 kDa körül megjelenő β-MHC fehérje sáv szemmel látható hiánya a kontroll, Ca<sup>2+</sup> depléció és Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban Western immunoblot (WB) szerint. Patkány *musculus* (m.) soleus vázizom antitest kontrollként szolgált.



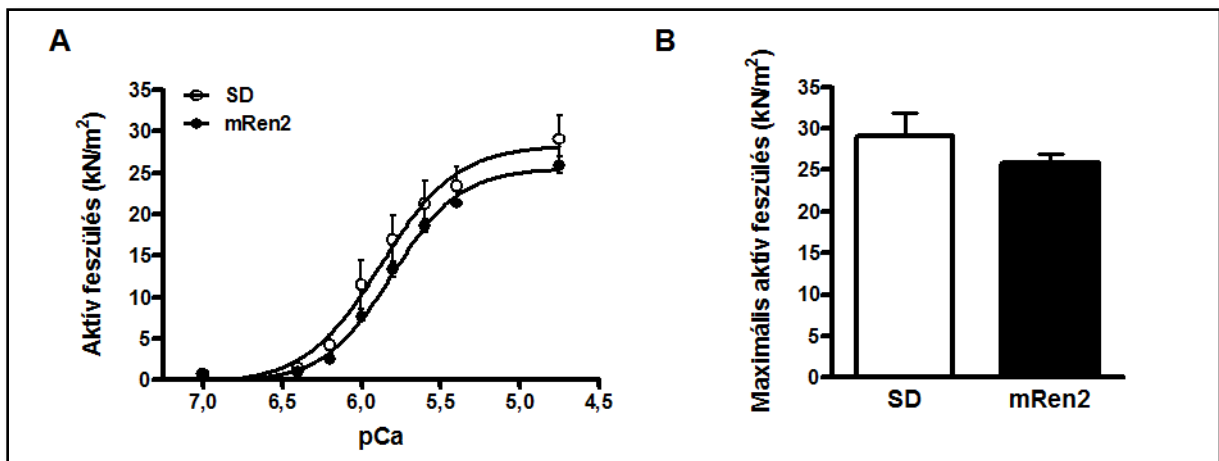
**18. ábra** A kardiális titin vizsgálata a kontroll, Ca<sup>2+</sup> depléció és Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban.

**A)** Reprezentatív Coomassie kékel festett képek az agarózzal erősített poliakrilamid géleken végzett titin szeparáció eredményét mutatják humán szívelégtelenségben, valamint a kontroll, Ca<sup>2+</sup> depléció és Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban. A kontroll, Ca<sup>2+</sup> depléció és Ca<sup>2+</sup> paradox minták egymás mellett futottak. Humán szívelégtelen kamrai minta N2BA és N2B titin izoforma kontrollként szolgált (független kísérlet, fekete keretben). T2: szükségeszerű titin degradációs termék. **B)** A megfelelő optikai denzitások – tetszőleges egységben (*arbitrary unit*, AU) – csak az N2B titin izoforma jelenlétét, valamint hasonló mobilitását igazolták a Ca<sup>2+</sup> depléció és a Ca<sup>2+</sup> paradox csoportokban. Három független titin szeparációt végeztünk duplikátumban hasonló eredménnyel. **C)** A szívizomsejtek titin által meghatározott Ca<sup>2+</sup>-független passzív feszülése 2,3  $\mu$ m szarkomerhosszon pCa 9,0 mellett. Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek, n = 12-13/csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha ANOVA szerint P<0,05.

### 5.3. Megnövekedett szívizomsejt $\text{Ca}^{2+}$ -független passzív feszülés az mRen2 patkányokban

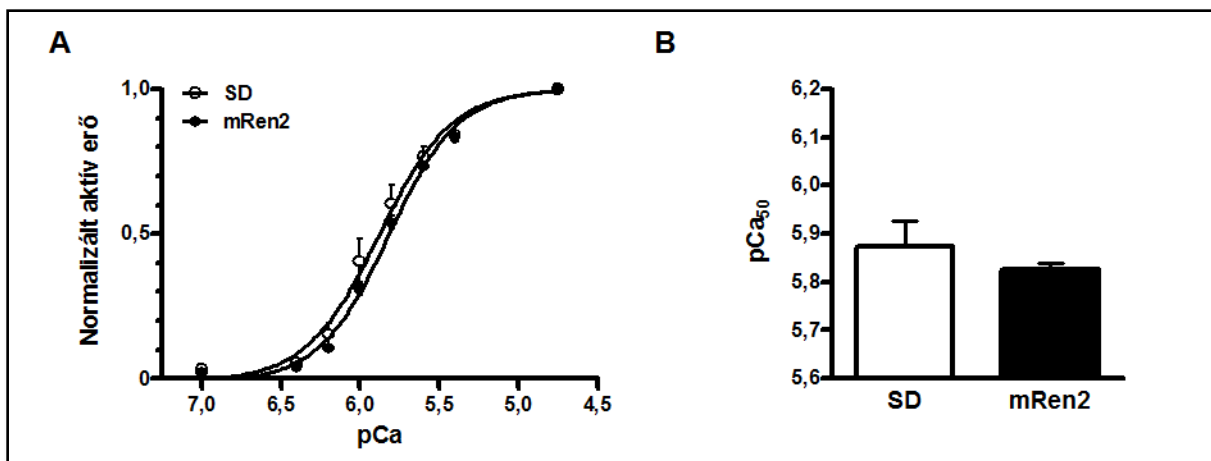
*A  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált erőgeneráció nem változik az mRen2 szívizomsejtekben*

A  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált erőgenerációt az SD és mRen2 állatokból izolált bal kamrai szívizomsejteken tanulmányoztuk (19-20. ábra). A kardiomiociták  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált maximális feszülése szignifikánsan nem különbözött az SD ( $29,05 \pm 2,80 \text{ kN/m}^2$ ) és mRen2 ( $25,89 \pm 0,99 \text{ kN/m}^2$ ) patkányokban (19. ábra A és B panel). Hasonlóképpen, az erőgeneráció  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységében sem találtunk szignifikáns különbséget az SD ( $5,87 \pm 0,05$ ) és mRen2 ( $5,83 \pm 0,01$ ) csoportok között (20. ábra A és B panel).



**19. ábra** Izolált bal kamrai szívizomsejtek mechanikai teljesítménye Sprague-Dawley (SD) kontroll és renin transzgenikus (mRen2) patkányokban.

**A)** A szívizomsejtek aktív feszülése  $2,3 \mu\text{m}$  szarkomerhosszon az alkalmazott  $\text{pCa}$  függvényében. **B)** A vizsgált szívizomsejtek maximális aktív feszülését  $\text{pCa}$  4,75 mellett oszlopdiagramon hasonlítottuk össze. Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek,  $n = 5-6$  szívizomsejt átlaga/4 szív/csoport. A csoportok között statisztikai különbséget ( $P < 0,05$ ) nem-paraméteres Mann-Whitney próbával nem találtunk.

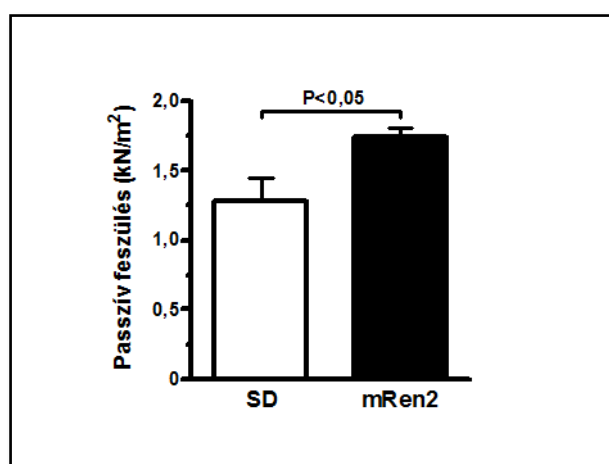


**20. ábra** Az erőgeneráció Ca<sup>2+</sup>-érzékenysége SD és mRen2 szívműsejtekben.

**A)** A normalizált aktív erő-pCa összefüggések illesztésével a szívműsejtek szigmoid Ca<sup>2+</sup>-érzékenységi görbéjét kapjuk meg. **B)** Az erőgeneráció Ca<sup>2+</sup>-érzékenységet a félmaximális kontrakcióhoz szükséges pCa szerint (pCa<sub>50</sub>) oszlopdiagramon hasonlítottuk össze. Az adatok átlagérték ± SEM formában szerepelnek, n = 5-6 szívműsejt átlaga/4 szív/csoport. A csoportok között statisztikai különbséget (P<0,05) nem-paraméteres Mann-Whitney próbával nem találtunk.

*A passzív feszülés nő az mRen2 szívekben*

A változatlan aktív kontraktilis paraméterekkel szemben, a szívműsejtek Ca<sup>2+</sup>-független passzív feszülése (21. ábra) magasabb volt az mRen2 patkányok bal kamrájában (1,74 ± 0,06 kN/m<sup>2</sup>, P<0,05), mint az SD kontroll bal kamrában (1,28 ± 0,18 kN/m<sup>2</sup>).



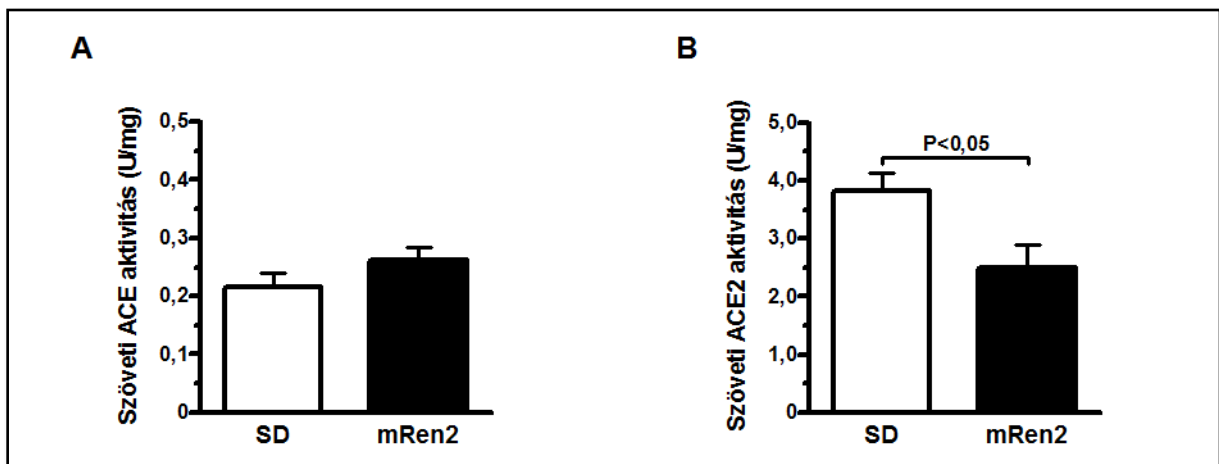
**21. ábra** A titin által meghatározott szívműsejt passzív feszülés.

A szívműsejt-méretű preparátumok (n = 5-6 szívműsejt átlaga/szív) titin által meghatározott Ca<sup>2+</sup>-független passzív feszülése 2,3 μm szarkomerhosszon pCa 9,0 mellett. Az adatok átlagérték ± SEM formában szerepelnek, n = 4 szív/csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha nem-paraméteres Mann-Whitney próbával P<0,05.

#### 5.4. A szöveti RAS intracelluláris diszregulációja és a kardiális titin megváltozott foszforilációs mintázatának kapcsolata az mRen2 modellben

*A szöveti RAS jótékony útvonalának hatásfoka romlik az mRen2 bal kamrában*

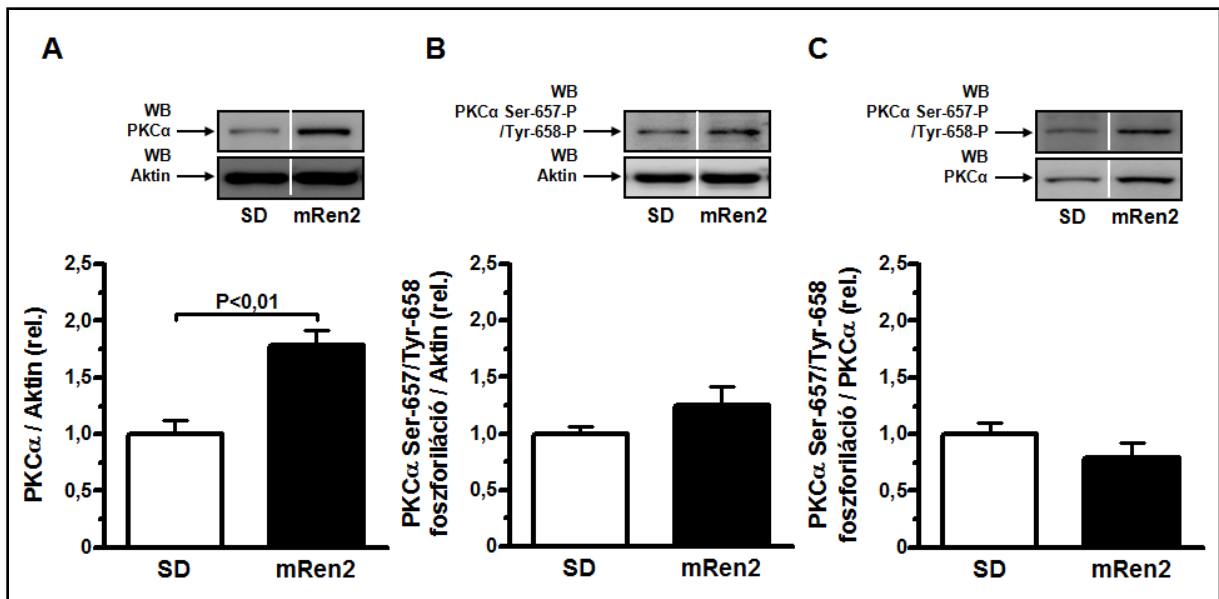
A kardiális angiotenzin konverzióért felelős ACE aktivitás hasonló volt az SD ( $0,22 \pm 0,02$  U/mg) és mRen2 ( $0,26 \pm 0,02$  U/mg) bal kamrában (22. ábra A panel). Ezzel szemben, a bal kamrai angiotenzin II eliminálásáért felelős ACE2 aktivitás (22. ábra B panel) az SD kontrollhoz képest ( $3,82 \pm 0,31$  U/mg) alacsonyabb volt az mRen2 csoportban ( $2,49 \pm 0,40$  U/mg,  $P < 0,05$ ).



**22. ábra** A renin-angiotenzin rendszer (RAS) enzimek aktivitása SD és mRen2 bal kamrában. **A)** Miokardiális angiotenzin konvertáló enzim (ACE) aktivitás. **B)** Miokardiális ACE2 aktivitás. Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek,  $n = 4$  szív/csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha nem-paraméteres Mann-Whitney próbával  $P < 0,05$ .

*A kardiális PKC $\alpha$  expresszió nő az mRen2 modellben*

A következő lépésben a szöveti RAS szignalizációs útvonalban effektor PKC $\alpha$  expresszióját és foszforilációját vizsgáltuk meg. A bal kamrai PKC $\alpha$  expresszió (23. ábra A panel) az SD kontrollhoz képest ( $1,00 \pm 0,12$ )  $1,78 \pm 0,14$ -szeres emelkedést mutatott az mRen2 állatokban ( $P < 0,01$ ). Ezzel párhuzamosan az mRen2 szívekben nem volt különbség a foszforilált (Ser-657/Tyr-658) PKC $\alpha$  relatív mennyiségében, sem az aktin ( $1,25 \pm 0,17$  mRen2-ben vs.  $1,00 \pm 0,06$  SD-ben; 23. ábra B panel), sem a PKC $\alpha$  expresszióra normalizálva ( $0,79 \pm 0,13$  mRen2-ben vs.  $1,00 \pm 0,10$  SD-ben; 23. ábra C panel).

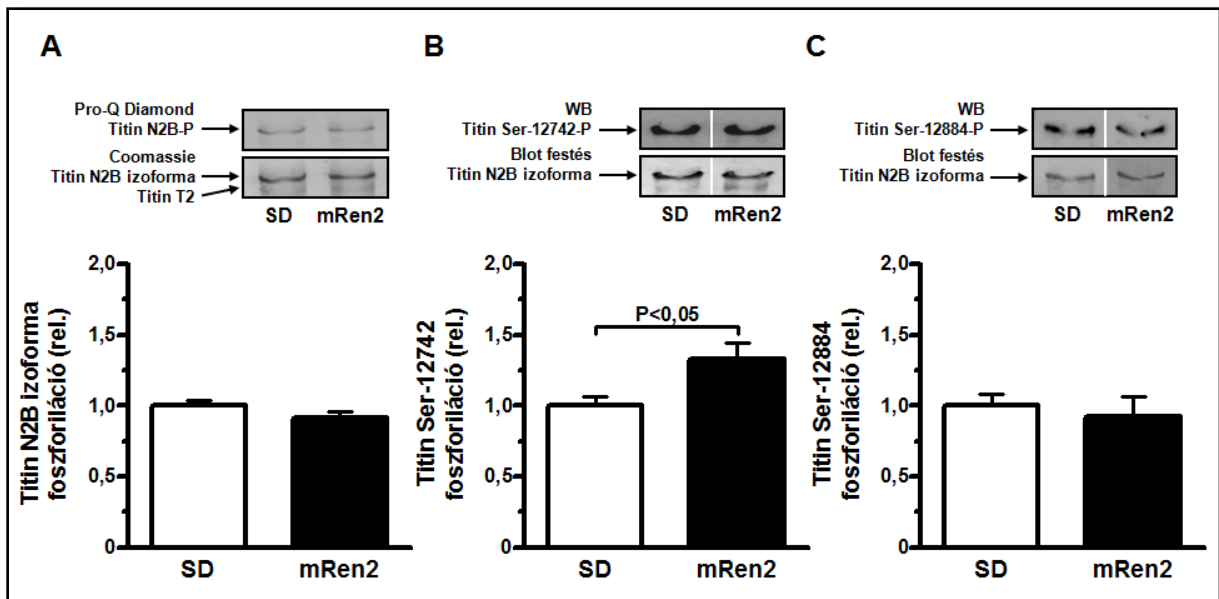


**23. ábra** Protein kináz  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) expresszió és foszforiláció vizsgálata SD és mRen2 bal kamrában Western immunoblot (WB) szerint.

**A)** PKC $\alpha$  expresszió a PKC $\alpha$  és aktin WB jelintenzitások arányában ugyanazon a membránon, négy mintán duplikátumban. **B)** PKC $\alpha$  foszforiláció (P) a P(Ser-657/Tyr-658)-PKC $\alpha$  és aktin WB jelintenzitások arányában ugyanazon a membránon, négy mintán triplikátumban. **C)** PKC $\alpha$  foszforiláció (P) a P(Ser-657/Tyr-658)-PKC $\alpha$  és PKC $\alpha$  WB szignálok arányában különböző membránokon, négy mintán triplikátumban. A kísérletekben az SD és mRen2 minták együtt futottak, de esetenként más sorrendben (reprezentatív képeken fehér vonal a fekete keretben). Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek, relatív skálán (rel.) az SD csoportra normalizálva,  $n = 4$  szív/csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha nem-paraméteres Mann-Whitney próbával  $P < 0,05$ . Ser: szerin; Tyr: tirozin.

#### *A titin PEVK domén foszforilációja nő az mRen2 szívizomzatban*

Gél- és blotfestés hasonló titin expressziós mintázatot mutatott az mRen2 és SD szívekben (24. ábra). A domináns fehérjesáv 3000 kDa körül az N2B titin izoformának felel meg, melyet esetenként egy halványabb sáv követ (T2 titin). Pro-Q Diamond foszfoprotein specifikus festéssel a titin hasonló foszforilációs szintjét találtuk az mRen2 ( $0,92 \pm 0,04$ ) és SD ( $1,00 \pm 0,04$ ) szívekben (24. ábra A panel). Hasonlóan, nem láttunk különbséget a titin PKC $\alpha$ -specifikus Ser-12884 (PEVK domén) foszforilációjában sem ( $0,92 \pm 0,14$  mRen2-ben vs.  $1,00 \pm 0,08$  SD-ben; 24. ábra C panel). Az mRen2 miokardium ( $1,33 \pm 0,12$ ,  $P < 0,05$ ) azonban a kontrolltól nagyobb PKC $\alpha$ -specifikus Ser-12742 foszforilációt mutatott ( $1,00 \pm 0,06$ ) ugyanabban a titin (PEVK) régióban (24. ábra B panel).



**24. ábra** Titin izoforma expresszió és foszforiláció vizsgálata SD és mRen2 bal kamrában.

**A)** A patkány N2B titin izoformát agarózzal erősített poliakrilamid géleken szeparáltuk, és Coomassie kékkel festettük. Az N2B titin foszforilációt (P) Pro-Q Diamond foszfo-protein specifikus gélfestéssel vizsgáltuk, melynek jelintenzitását ugyanannak a fehérje sávnak (N2B titin) a Coomassie jelintenzitásához viszonyítottuk. **B)** Titin oldallánc-specifikus Ser-12742 foszforiláció (P) Western immunoblot (WB) szerint. **C)** Titin oldallánc-specifikus Ser-12884 foszforiláció (P) WB szerint. A foszfo-WB szignált minden esetben a megfelelő transzferált N2B titin jelintenzitáshoz (blot festék) viszonyítottuk. A kísérletekben az SD és mRen2 minták egy gélen futottak, de esetenként más sorrendben (reprezentatív képeken fehér vonal a fekete keretben). A mintákat duplikátumban futtattuk, legalább háromszor ismételve. Az adatok átlagérték  $\pm$  SEM formában szerepelnek, relatív skálán (rel.) az SD csoportra normalizálva,  $n = 4$  szív/csoport. Statisztikai különbséget akkor tüntettünk fel, ha nem-paraméteres Mann-Whitney próbával  $P < 0,05$ . Ser: szerin.

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. A kontraktilis fehérjék degradációja az aktomiozin mechanoenzim diszfunkciójához vezet kísérletes $\text{Ca}^{2+}$ paradoxban

Tanulmányunkban első alkalommal jellemeztük a miofibrillumok szintjén a  $\text{Ca}^{2+}$  paradox kardiális funkcióra kifejtett hatását. Megfigyeléseink alapján  $\text{Ca}^{2+}$  depléció, majd repléció hatására az izolált szívek globális funkciózavarához megváltozott miofibrilláris ATPáz aktivitás és csökkent szívizomsejt  $\text{Ca}^{2+}$ -függő erőgeneráció társul. Továbbá, a  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxot elszenvedő szívekben a kontraktilis fehérjék ( $\alpha$ -MHC és cTnT) degradációja következik be. Eredményeink arra utalnak, hogy az aktin-miozin interakció elégtelensége feltehetőleg a miofibrillumok károsodása által járul hozzá a  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltöttségben kialakuló kontraktilis diszfunkcióhoz.

Kísérleteinkben  $\text{Ca}^{2+}$  megvonásban és  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxban egyaránt a bal kamra által kifejtett nyomás és  $\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$  drámai csökkenését figyeltük meg (11. ábra A és C panel, a fenti sorrendben), ami korábbi vizsgálatokkal összhangban [89,94] a pumpafunkció nagymértékű hanyatlásának a jele. Mindemellett,  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxban a bal kamra jelentős végdiasztolés nyomásemelkedése és a csökkent  $\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$  a diasztolés telődés zavarára utal (11. ábra B és D panel, a fenti sorrendben), ami pedig párhuzamba állítható a miokardium nagyobb nyugalmi feszülésével [1]. A  $\text{Ca}^{2+}$  paradox szívek hiperkontraktúrája [62] ezért funkcionálisan a kontrakció és relaxáció párhuzamos elégtelenségeként fogható fel.

A megemelkedett diasztolés feszülés és nyomás felveti a relaxációhoz szükséges ATP hiányának lehetőségét. A citoszolikus ATP tartalom azonban nemcsak hogy megőrzött a hiperkontraktúrát kiváltó intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődés során, hanem éppen előfeltétele a  $\text{Ca}^{2+}$  paradox kialakulásának [69]. Mindazonáltal, izolált és nyüzött patkány szívizomsejteken végzett kísérletek felvetették az ATP kompartmentalizáció lehetőségét az iszkémiás

kontraktúra során [85]. Bizonyos patológiás körülmények között ezért a  $[Mg^{2+}\text{-ATP}]$  eltérő lehet a miofibrillumokban és a citoszolban. Ezek alapján tehát elméletileg lehetséges, hogy  $Ca^{2+}$  paradox szívekben a miofilamentális kompartment ATP elvonása kóros relaxációhoz [86], ezáltal hiperkontraktúrához vezet, míg a citoszolikus ATP tartalom megőrzött lehet. Ugyanakkor, már leírták, hogy a kontraktúra kialakulását az intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  emelkedése ATPázok aktiválása révén mozdítja előre, következésképpen a belső  $Ca^{2+}$  túltöltődés elősegíti az ATP deplécióját és gyorsítja a rigor kialakulását [73]. A disszertációban bemutatott saját kísérleteinkben a  $Ca^{2+}$  paradoxot elszenvedett izolált szívek miofibrillumaiában a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitás nőtt (12. ábra A panel), de a  $Ca^{2+}$ -stimulált ATPáz aktivitás csökkent (12. ábra B panel). Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy  $Ca^{2+}$  paradoxban a miozin fejek nagyobb mértékű bazális ATP hidrolízisét az ATP metabolitok kisebb mértékű disszociációja követi, hozzájárulva ezzel relaxáció során a merevebb aktin-miozin interakciókhoz és/vagy a helyi ATP elhasználásához. A szívizom kontrakciójának szabályozásában általános jelenség, hogy a  $Mg^{2+}$ -ADP szorosan kötődve a miozinhoz elősegíti az izometriás feszülés kialakulását és redukálja a feszülés kinetikáját [59]. Nyúzott patkány rostokon végzett kísérletek bemutatták, hogy a  $Mg^{2+}$ -ADP direkt módon hat a rigor kialakulására és a miozin ATPáz aktivitására, sugallva ezzel az összefüggést a merev keresztidák kialakulása és a miozin ATPáz aktivitás növekedése között [86]. Valóban, patkány permeabilizált szívizomsejtekben a rigor fokozott miozin ATPáz aktivitással társult, továbbá, a  $Mg^{2+}$ -ADP stimulálta a miozin ATPáz [72]. Ezek az eredmények felvetik a  $Mg^{2+}$ -ADP disszociációs lépésekre és/vagy a további  $Mg^{2+}$ -ATP kötésre és a keresztidák szétválására kifejtett gátló hatását [86]. Mivel a kontrakció maximális sebességét elsősorban a keresztidák szétválásának mértéke irányítja [14], így a  $Mg^{2+}$ -ADP felszabadulás válik a fő sebesség-meghatározó lépéssé a keresztid-ciklusban, ezáltal a kontraktúra kialakulásában [72,86]. Eszerint úgy tűnik, hogy  $Ca^{2+}$  paradoxban a stimulált ATPáz a  $Mg^{2+}$ -függő forma,

ami fokozott ATP hidrolízist és mérsékelt  $P_i$  és ADP felszabadulást eredményez. Ez a látszólagos ellentmondás arányaiban egyre több aktinhoz kötött miozin fejhez vezethet minden egyes kereszthíd-ciklusban. A merev aktin-miozin kapcsolat és/vagy a magasabb bazális ATP fogyasztás pedig nagyobb nyugalmi feszüléshez vezethet. Ez az elképzelés magyarázhatja a bal kamra magasabb végdiasztolés nyomását  $Ca^{2+}$  paradoxban, annak ellenére, hogy  $Ca^{2+}$  paradox során a diasztolés intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  relatíve alacsony [43]. Másfelől viszont azt találtuk, hogy a  $Ca^{2+}$  depletált és  $Ca^{2+}$  paradox szívekben a globális szisztolés funkcióról csökkenett miofibrilláris  $Ca^{2+}$ -stimulált ATPáz aktivitással társult. Régóta ismert, hogy a miozin ATPáz határozza meg az izomösszehúzódás sebességét [4], ezért a  $Ca^{2+}$ -aktivált kontrakció sebességének paraméterei (pl.  $dP/dt$ ) szorosan korrelálnak a *power stroke* beindításához szükséges miofibrilláris  $Ca^{2+}$ -stimulált ATPáz aktivitással [14]. Következésképpen, az alacsony  $Ca^{2+}$ -stimulált ATPáz aktivitás csökkent  $Ca^{2+}$ -függő kontrakcióval társul, ami viszont szisztolés diszfunkciót eredményez, csakúgy, mint a  $Ca^{2+}$  paradox szívben.

Ezen túlmenően, első alkalommal kíséreltük meg vizsgálni a celluláris mechanikai funkciót  $Ca^{2+}$  paradoxban, és írtuk le a maximális aktív feszülés (13. ábra *B* panel) és a  $k_{tr,max}$  (14. ábra *B* panel) jelentős csökkenését a Langendorff-perfúziót túlélő szívizomsejtekben. Ezek az izolált preparátum eredmények összhangban állnak a bal kamrai kontraktilitás leleteivel, ugyanis az aktív feszülés csökkenését a bal kamrában kifejlődő nyomáscsökkenés celluláris alapjának gondoljuk. Megítélésünk szerint a  $dP/dt_{max}$  esése a csökkent  $k_{tr,max}$  globális visszatükröződése a redukált  $Ca^{2+}$ -stimulált ATPáz aktivitás miatt. A  $Ca^{2+}$ -függő paraméterekkel szemben, az izolált szívizomsejtek passzív feszülését a  $Ca^{2+}$  depléció és  $Ca^{2+}$  repléció egyáltalán nem érintette (18. ábra *C* panel).  $Ca^{2+}$  paradoxban ezért nem valószínű, hogy a szarkomer passzív elemei elsődlegesen felelnének a miokardium merevségéért.

Biokémiai kísérleteinkben esszenciális kontraktilis fehérjék, név szerint az  $\alpha$ -MHC (17. ábra A és B panel) és a cTnT (16. ábra B panel), graduális károsodását figyeltük meg a  $\text{Ca}^{2+}$  paradox felé vezető úton. Korábbi tanulmányok alapján a miofibrillumok bizonyos degradációja előfordulhat paradox után, amely felveti a cTnT kiszabadulásának lehetőségét a szétesett membránon keresztül [67]. Hasonlóképpen,  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődésnek kitett tengerimalac szívek homogenizátumai a cTnT degradációját mutatták. A troponin alegységek vagy fragmentumaik és más szívizom fehérjék közötti lehetséges keresztkötések szerepét ezért már felvetették a  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxot követő sejthalálban [33]. Ezek a megfigyelések teljes összhangban állnak az általunk végzett Western blot esszék eredményével, ami progresszív cTnT degradációra utal  $\text{Ca}^{2+}$  megvonás és  $\text{Ca}^{2+}$  paradox során, habár mi nem figyeltünk meg keresztkötött cTnT formákat.

## **6.2. A lokális RAS alternatív útvonalának gyengülése együtt jár a kardiális titin-mediált passzív feszülés növekedésével mRen2 patkányokban**

Munkánk során a hipertónia mRen2 modelljében a kardiális angiotenzin II képződésért felelős ACE változatlan aktivitása mellett (22. ábra A panel) leírtuk a kardiális angiotenzin II lebontásért felelős szöveti ACE2 aktivitás csökkenését (22. ábra B panel), ami korábbi eredményekkel összhangban [100] a miokardiális angiotenzin II csökkent eliminációjára, ezáltal a helyi RAS patológiás aktivitására utal. Továbbá, a szöveti angiotenzin II szignalizációs útvonalon megfigyeltük a PKC $\alpha$  fokozott expresszióját az mRen2 állatok bal kamrájában. Végül, kimutattuk a szarkomer passzív feszülését meghatározó titin PEVK doménjének emelkedett foszforilációs szintjét, ami hozzájárulhat a szívizomsejtek megnövekedett nyugalmi feszüléséhez, ezáltal a globális diasztolés diszfunkcióhoz az mRen2 patkányokban.

A renin túlzott expressziójának hatására súlyos hipertónia alakul ki az mRen2 patkányokban [58]. Az mRen2 állatok nagyfokú nyomásterhelése kézzelfogható zavarokat okoz a szívben. Mások eredményeivel összhangban saját vizsgálataink alapján az mRen2 kardiális fenotípus fő jellemzői a bal kamrai hipertrófia, fibrózis, normál EF és diasztolés diszfunkció. Mindezen morfológiai és funkcionális jegyek karakterisztikusak a humán HFpEF-re is [95].

Tanulmányunkban ezért vizsgáltuk a diasztolés diszfunkcióhoz vezető molekuláris mechanizmusokat az mRen2 állatmodellben. Az mRen2 patkányok *in vivo* kóros bal kamrai relaxációjához társulva az identikus bal kamrai szívizomsejtek megnövekedett  $Ca^{2+}$ -független (passzív) feszülését találtuk (21. ábra), míg a  $Ca^{2+}$ -aktivált (aktív) erőgenerációban szignifikáns változást nem láttunk (19. és 20. ábra). Az mRen2 szívekből nyúzott bal kamrai rostok fokozott diasztolés feszülését korábban már leírták [99]. Fontos azonban megjegyezni, hogy olyan multicelluláris preparátumokban, mint a nyúzott papilláris izom, a szívizomzat feszülését intra- és extracelluláris tényezők alakítják ki. Ugyanakkor, a disszertációban bemutatott mechanikai kísérleteinkben az intracelluláris tényezők önálló szerepét első alkalommal vizsgáltuk – az extracelluláris mátrixtól függetlenül – mRen2 állatokból izolált membránfosztott szívizomsejteken. Valóban, szívelégtelen betegek szívizom biopsziáin végzett kísérletek bemutatták egyrészt, hogy a szívizomsejtek passzív feszülése megnő HFpEF-ben [8], másrészt, hogy ez a passzív feszülés HFpEF-ben nagyobb, mint HFrEF-ben [82]. Ezek alapján a szívizomsejtek magas nyugalmi feszülését a HFpEF-ben látható diasztolés diszfunkció celluláris jellegzetességének tartják [10-11].

Intracellulárisan a kontraktilis apparátus passzív feszülésének fő meghatározója a fél szarkomeren áthidaló titin molekula [52]. A titint elsőként vizsgáltuk az mRen2 patkányokban. A fehérjedegradáció különösebb jelei nélkül az mRen2 szívekben csak az N2B titin izoforma expresszióját figyeltük meg (24. ábra A panel), ezért a titin expressziós vagy

proteolitikus változásait valószínűtlennek tartjuk a szívizomsejtek magasabb passzív feszülésének kialakításában.

Az angiotenzin II intracellulárisan aktiválja a PKC $\alpha$ - és a CaMKII $\delta$ -mediált fehérje foszforilációt, több miofibrilláris fehérje mellett a titinen is hatva [52]. Ennek megfelelően a PKC $\alpha$  expressziós szintje 1,8-szeres emelkedést mutatott (23. ábra A panel), míg a foszforilált (Ser-657/Tyr-658) és a totál PKC $\alpha$  aránya nem változott az mRen2 állatok bal kamrájában (23. ábra B és C panel, a fenti sorrendben), ami az aktivált (foszforilált) PKC $\alpha$  magasabb szintjére utal az mRen2 patkányokban.

A titin N2-Bus (egyedi rugalmas szekvencia) doménben számos PKA, PKG, ERK2 és CaMKII $\delta$  által foszforilálható oldallánc található [52]. Ennek a titin régióknak az alulfoszforiláltsága experimentális és humán HFpEF-ben növeli a titin-dependens passzív feszülést [9,38-39,96]. Ugyanakkor, Pro-Q Diamond foszfo-specifikus gélfestésen alapuló kísérleteinkben az mRen2 patkányokban mi nem találtunk változást ebben a régióban (24. ábra A panel).

Korábbi kísérletek azonban arról árulkodtak, hogy a titin PEVK domént a Pro-Q Diamond festék nem ismeri fel [42]. A PKC $\alpha$  viszont a titint a PEVK rugalmas elem Ser-12742 és Ser-12884 oldalláncain foszforilálja, ami pedig növeli a szívizomsejtek passzív feszülését [40]. Habár mindkét említett aminosav fontos a strukturális integritás fenntartásában, úgy tűnik, hogy a PKC $\alpha$ -mediált PEVK foszforiláció a Ser-12742 oldalláncot preferálja [2]. Érdekes módon, a PEVK régiót a CaMKII $\delta$  is foszforilálja [41], hozzájárulva ezzel a beteg miokardium diasztolés feszülésének kialakításához [37]. Mindezeket figyelembe véve, a titin PEVK foszforilációt Ser-12742 és Ser-12884 elleni foszfo-specifikus antitestekkel vizsgáltuk. Az mRen2 bal kamrában a Ser-12742 megnövekedett és Ser-12884 változatlan foszforilációs szintjét találtuk (24. ábra B és C panel, a fenti sorrendben). A PEVK Ser-12742 hiperfoszforilációját korábban leírták aorta lekötésen átesett egerekben [42], a

hipertónia idős kutya modelljében [38], csakúgy, mint humán szívelégtelenségben [37,47]. Ezen felül, egy friss transzlációs közlemény is bemutatta ugyanennek az oldalláncnak (Ser-12742) a hiperfoszforilációját humán magas vérnyomáshoz társuló HFpEF-ben [96]. Eszerint a kollagén- és titin-dependens feszülés szignifikáns növekedése együtt jár a titin foszforilációs szintjének egyértelmű változásaival, úgymint hipofoszforiláció a PKA/PKG helyeken az N2-Bus elemben, és PKC $\alpha$ -függő hiperfoszforiláció a Ser-11878 (Ser-12742 patkányban) oldalláncon a PEVK elemben.

### **6.3. A doktori értekezésben megfogalmazott új tézisek**

A doktori értekezés eredményei alapján az alábbi új megállapításokat fogalmazzuk meg:

- Ca<sup>2+</sup> paradoxot elszenvedett szívben az  $\alpha$ -MHC és a cTnT degradációja együtt jár a miofibrillumok megváltozott ATPáz aktivitásával és az izolált szívizomsejtek csökkent Ca<sup>2+</sup>-aktivált erőgenerációjával, amik együttesen hozzájárulhatnak a pumpafunkció globális zavarához.

- A hipertónia mRen2 transzgenikus patkány modelljében a miokardiális ACE2 aktivitás csökkenése együtt jár a titin PKC $\alpha$ -mediált PEVK (Ser-12742) hiperfoszforilációjával, ami hozzájárulhat az izolált szívizomsejtek megnövekedett passzív feszüléséhez.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxot elszenvedő izolált szívek globális és celluláris funkciózavarához csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulált ATPáz aktivitás társul, ami potenciálisan a miofilamentális fehérjék degradációjának eredménye. A disszertációban bemutatott adatok alapján úgy gondoljuk, hogy a szív relaxációjának  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxban látható súlyos zavara valószínűleg a kereszthíd-ciklus elégtelenségének tudható be a kóros miofibrilláris ATPáz aktivitás miatt, és látszólag nincs közvetlen összefüggésben a titinnel. Másfelől viszont elképzelhető, hogy  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxban a szisztolés funkció drámai csökkenésének egyik molekuláris alapja az  $\alpha$ -MHC és cTnT hasítása, ami a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált erőgeneráció kölcsönösen egymástól függő paramétereinek redukcióját okozza ezzel a szívizomsejtek, a miofibrillumok és az izolált szív szintjén.

A RAS jelátvitelének genetikai stimulációja által kiváltott hipertóniában a bal kamrában kifejlődő diasztolés diszfunkció celluláris és molekuláris alapja korrelál a humán HFpEF-ben is látható mechanisztikus változásokkal. Eredményeink felvetik a miokardiális RAS tengelyek egyensúlyának felborulását mint patofiziológiai tényezőt a diasztolés diszfunkció kialakulásában. A disszertáció eredményei arra utalnak, hogy a Ser-12742 hiperfoszforiláció a titin PEVK elemében és a megnövekedett passzív feszülés a szívizomsejtekben közös jellegzetességei a RAS-mediált kísérletes hipertóniában látható diasztolés diszfunkciónak és a klinikai HFpEF-nek.

## 7. SUMMARY

Isolated rat hearts suffered  $\text{Ca}^{2+}$  paradox demonstrate impaired global and cellular contractility that is accompanied by decreased  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated ATPase activity potentially as a result of myofilament protein degradation. According to data provided in this study, we conclude that significant deterioration in cardiac relaxation seen in  $\text{Ca}^{2+}$  paradoxical hearts is probably due to a failure in cross-bridge cycling because of an altered myofibrillar ATPase activity, and is apparently not related directly to titin. On the other hand, it is likely that one of the molecular bases of dramatic decrease in systolic function in  $\text{Ca}^{2+}$  paradox may be  $\alpha$ -MHC and cTnT cleavage, resulting in a collective reduction of interdependent parameters of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated force generation at the level of cardiomyocytes, myofibrils and isolated heart.

In hypertension due to the genetic stimulation of RAS signaling cellular and molecular basis of the left ventricular diastolic dysfunction correlates with the mechanistic changes seen in human HFpEF. Our results implicate the pathophysiological role of the imbalance of myocardial RAS pathways in the development of diastolic dysfunction. Data provided here suggest that hyperphosphorylation at Ser-12742 in the PEVK element of titin and increased cardiomyocyte passive tension are common features of diastolic dysfunction in RAS-mediated experimental hypertension and clinical HFpEF.

## IRODALOMJEGYZÉK

### Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. **Alto LE, Dhalla NS.** Role of changes in microsomal calcium uptake in the effects of reperfusion of Ca<sup>2+</sup>-deprived rat hearts. *Circ Res* 48: 17-24, 1981.
2. **Anderson BR, Bogomolovas J, Labeit S, Granzier H.** The effects of PKC $\alpha$  phosphorylation on the extensibility of titin's PEVK element. *J Struct Biol* 170: 270-277, 2010.
3. **Bachmann S, Peters J, Engler E, Ganten D, Mullins J.** Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int* 41: 24-36, 1992.
4. **Bárány M.** ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50: Suppl:197-218, 1967.
5. **Barta J, Tóth A, Edes I, Vaszily M, Papp JG, Varró A, Papp Z.** Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol Cell Biochem* 278: 1-8, 2005.
6. **Bayeva M, Ardehali H.** Mitochondrial dysfunction and oxidative damage to sarcomeric proteins. *Curr Hypertens Rep* 12: 426-432, 2010.
7. **Bolli R, Marbán E.** Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 79: 609-634, 1999.
8. **Borbély A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ.** Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111: 774-781, 2005.
9. **Borbély A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ, Paulus WJ.** Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res* 104: 780-786, 2009.

10. **Borlaug BA, Paulus WJ.** Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J* 32: 670–679, 2011.
11. **Borlaug BA, Redfield MM.** Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation* 123: 2006-2014, 2011.
12. **Böhm M, Moll M, Schmid B, Paul M, Ganten D, Castellano M, Erdmann E.** Beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in cardiac hypertrophy of renin transgenic rats. *Hypertension* 24: 653-662, 1994.
13. **Braunwald E.** Research advances in heart failure: a compendium. *Circ Res* 113: 633-645, 2013.
14. **Brenner B, Eisenberg E.** Rate of force generation in muscle: correlation with actomyosin ATPase activity in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3542-3546, 1986.
15. **Brixius K, Savvidou-Zaroti P, Mehlhorn U, Bloch W, Kranias EG, Schwinger RH.** Increased Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of myofibrillar tension in heart failure and its functional implication. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1: I111-I117, 2002.
16. **Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, Schiaffino S.** Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 85: 1734-1742, 1992.
17. **Campbell RT, McMurray JJ.** Comorbidities and differential diagnosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail Clin* 10: 481-501, 2014.
18. **Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitás K, Labeit S, Granzier H.** Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 86: 59-67, 2000.
19. **Cummins P, Lambert SJ.** Myosin transitions in the bovine and human heart. A developmental and anatomical study of heavy and light chain subunits in the atrium and ventricle. *Circ Res* 58: 846-858, 1986.

20. **Daly MJ, Elz JS, Nayler WG.** Contracture and the calcium paradox in the rat heart. *Circ Res* 61: 560-569, 1987.
21. **De Mello W, Rivera M, Rabell A, Gerena Y.** Aliskiren, at low doses, reduces the electrical remodeling in the heart of the TGR(mRen2)<sup>27</sup> rat independently of blood pressure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 14: 23-33, 2013.
22. **Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S.** A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87: E1-9, 2000.
23. **Dzau VJ, Antman EM, Black HR, Hayes DL, Manson JE, Plutzky J, Popma JJ, Stevenson W.** The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). *Circulation* 114: 2850-2870, 2006.
24. **Engler S, Paul M, Pinto YM.** The TGR(mRen2)<sup>27</sup> transgenic rat model of hypertension. *Regul Pept* 77: 3-8, 1998.
25. **Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Alfieri O, Visioli O.** Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. *Eur Heart J* 14 Suppl G: 25-30, 1993.
26. **Ferrari R, Cargnoni A, Bernocchi P, Pasini E, Curello S, Ceconi C, Ruigrok TJ.** Metabolic adaptation during a sequence of no-flow and low-flow ischemia. A possible trigger for hibernation. *Circulation* 94: 2587-2596, 1996.
27. **Ferrari R, Balla C, Malagù M, Guardigli G, Morciano G, Bertini M, Biscaglia S, Campo G.** Reperfusion Damage - A Story of Success, Failure, and Hope. *Circ J* 81: 131-141, 2017.
28. **Frank JS, Brady AJ, Farnsworth S, Mottino G.** Ultrastructure and function of isolated myocytes after calcium depletion and repletion. *Am J Physiol* 250: H265-H275, 1986.

29. **Ganote CE, Nayler WG.** Contracture and the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol* 17: 733-745, 1985.
30. **Gheorghiade M, De Luca L, Fonarow GC, Filippatos G, Metra M, Francis GS.** Pathophysiologic targets in the early phase of acute heart failure syndromes. *Am J Cardiol* 96: 11G-17G, 2005.
31. **Giulian GG, Moss RL, Greaser M.** Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels. *Anal Biochem* 129: 277-287, 1983.
32. **Goldenthal MJ.** Mitochondrial involvement in myocyte death and heart failure. *Heart Fail Rev* 21: 137-155, 2016.
33. **Gorza L, Menabò R, Vitadello M, Bergamini CM, Di Lisa F.** Cardiomyocyte troponin T immunoreactivity is modified by cross-linking resulting from intracellular calcium overload. *Circulation* 93: 1896-1904, 1996.
34. **Grützner A, Garcia-Manyses S, Kötter 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* 97: 825-834, 2009.
35. **Habibi J, DeMarco VG, Ma L, Pulakat L, Rainey WE, Whaley-Connell A, Sowers JR.** Mineralocorticoid receptor blockade improves diastolic function independent of blood pressure reduction in transgenic model of RAAS overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H1484–H1491, 2011.
36. **Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Dos Remedios C, Duncker DJ, Borbely A, Papp Z, Paulus W, Stienen GJ, Marston SB, van der Velden J.** Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil* 29: 189-201, 2008.

37. **Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, Krüger M, Backs J, Linke WA.** Crucial role for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res* 112: 664-674, 2013.
38. **Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA.** Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 97: 464–471, 2013.
39. **Hamdani N, Franssen C, Lourenço A, Falcão-Pires I, Fontoura D, Leite S, Plettig L, López B, Ottenheijm CA, Becher PM, González A, Tschöpe C, Díez J, Linke WA, Leite-Moreira AF, Paulus WJ.** Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail* 6: 1239–1249, 2013.
40. **Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H.** PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 105: 631–638, 2009.
41. **Hidalgo CG, Chung CS, Saripalli C, Methawasini M, Hutchinson KR, Tsapralis G, Labeit S, Mattiazzi A, Granzier HL.** The multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII $\delta$ ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol* 54: 90–97, 2013.
42. **Hudson B, Hidalgo C, Saripalli C, Granzier H.** Hyperphosphorylation of mouse cardiac titin contributes to transverse aortic constriction-induced diastolic dysfunction. *Circ Res* 109: 858–866, 2011.
43. **Jansen MA, Badlou BA, van Echteld CJ, Ruigrok TJ.** Cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration during Ca<sup>2+</sup> depletion of isolated rat hearts. *Mol Cell Biochem* 203: 169-175, 2000.

44. **Jessup JA, Zhang L, Presley TD, Kim-Shapiro DB, Wang H, Chen AF, Groban L.** Tetrahydrobiopterin restores diastolic function and attenuates superoxide production in ovariectomized mRen2.Lewis rats. *Endocrinology* 152: 2428-2436, 2011.
45. **Kawabata K, Osada M, Netticadan T, Dhalla NS.** Beneficial effect of ischemic preconditioning on Ca<sup>2+</sup> paradox in the rat heart. *Life Sci* 63: 685-692, 1998.
46. **Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S.** Ca<sup>2+</sup> paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 161: 1734-1750, 2010.
47. **Kötter S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Müller AE, Helling S, Marcus K, Dos Remedios C, Linke WA, Krüger M.** Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 99: 648–656, 2013.
48. **Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA.** Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 104: 87-94, 2009.
49. **Lee MA, Böhm M, Kim S, Bachmann S, Bachmann J, Bader M, Ganten D.** Differential gene expression of renin and angiotensinogen in the TGR(mREN-2)27 transgenic rat. *Hypertension* 25: 570-580, 1995.
50. **Lee MA, Böhm M, Paul M, Bader M, Ganten U, Ganten D.** Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *Am J Physiol* 270: E919-E929, 1996.
51. **Li X, Zhang P.** Genetic determinants of myocardial dysfunction. *J Med Genet* 54: 1-10, 2017.
52. **Linke WA, Hamdani N.** Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res* 114: 1052-1068, 2014.

53. **Luo M, Anderson ME.** Mechanisms of altered  $\text{Ca}^{2+}$  handling in heart failure. *Circ Res* 113: 690-708, 2013.
54. **Ma L, Gul R, Habibi J, Yang M, Pulakat L, Whaley-Connell A, Ferrario CM, Sowers JR.** Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the transgenic (mRen2) rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H2341-2351, 2012.
55. **Mani H, Tanaka H, Adachi T, Ikegawa M, Dai P, Fujita N, Takamatsu T.** How does the  $\text{Ca}^{2+}$ -paradox injury induce contracture in the heart? A combined study of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics and cell structures in perfused rat hearts. *Acta Histochem Cytochem* 48: 1-8, 2015.
56. **Moe GW, Marín-García J.** Role of cell death in the progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 21: 157-167, 2016.
57. **Molnár A, Borbély A, Czuriga D, Ivetta SM, Szilágyi S, Hertelendi Z, Pásztor ET, Balogh A, Galajda Z, Szerafin T, Jaquet K, Papp Z, Edes I, Tóth A.** Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 284: 1031-1039, 2009.
58. **Mullins JJ, Peters J, Ganten D.** Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344: 541-544, 1990.
59. **Papp Z, Szabó A, Barends JP, Stienen GJ.** The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 543: 177-189, 2002.
60. **Pierce GN, Dhalla NS.** Mechanisms of the defect in cardiac myofibrillar function during diabetes. *Am J Physiol* 248: E170-E175, 1985.
61. **Piper HM, Spahr R, Hütter JF, Spieckermann PG.** The calcium and the oxygen paradox: non-existent on the cellular level. *Basic Res Cardiol* 80 Suppl 2:159-163, 1985.

62. **Piper HM.** The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc Res* 45: 123-127, 2000.
63. **Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P; Authors/Task Force Members.** 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 37: 2129-2200, 2016.
64. **Post JA, Nievelstein PF, Leunissen-Bijvelt J, Verkleij AJ, Ruigrok TJ.** Sarcolemmal disruption during the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol* 17: 265-273, 1985.
65. **Preuner J.** Functional alterations of the sarcolemma in Ca<sup>2+</sup>-free perfused hearts. *Basic Res Cardiol* 80 Suppl 2: 19-23, 1985.
66. **Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Zieseniss A, Lee LK, Yamazaki KG, Granzier HL, Gregorio CC, McCulloch AD, Omens JH, Sheikh F.** A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem* 287: 29273-29284, 2012.
67. **Rempis A, Scheffold T, Greten J, Haass M, Greten T, Kübler W, Katus HA.** Intracellular compartmentation of troponin T: release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 27: 793-803, 1995.
68. **Roger VL.** Epidemiology of heart failure. *Circ Res* 113: 646-659, 2013.
69. **Ruigrok TJ, Boink AB, Spies F, Blok FJ, Maas AH, Zimmerman AN.** Energy dependence of the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol* 10: 991-1002, 1978.

70. **Samarel AM, Ferguson AG, Vander Heide RS, Davison R, Ganote CE.** Release of unassembled rat cardiac myosin light chain 1 following the calcium paradox. *Circ Res* 58: 166-171, 1986.
71. **Solaro RJ, Pang DC, Briggs FN.** The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* 245: 259-262, 1971.
72. **Stapleton MT, Allshire AP.** Modulation of rigor and myosin ATPase activity in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1349-1358, 1998.
73. **Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE.** Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 66: 135-146, 1990.
74. **Stehle R, Iorga B.** Kinetics of cardiac sarcomeric processes and rate-limiting steps in contraction and relaxation. *J Mol Cell Cardiol* 48: 843-850, 2010.
75. **Steinberg SF.** Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circ Res* 112: 393-405, 2013.
76. **Streng AS, de Boer D, van der Velden J, van Dieijen-Visser MP, Wodzig WK.** Posttranslational modifications of cardiac troponin T: an overview. *J Mol Cell Cardiol* 63: 47-56, 2013.
77. **Talmadge RJ, Roy RR.** Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol (1985)* 75: 2337-2340, 1993.
78. **Taussky HH, Shorr E.** A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 202: 675-685, 1953.
79. **te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH.** Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res* 116: 960-975, 2015.
80. **Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ.** A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275: 33238-33243, 2000.

81. **Úri K, Fagyas M, Mányiné Siket I, Kertész A, Csanádi Z, Sándorfi G, Clemens M, Fedor R, Papp Z, Édes I, Tóth A, Lizanecz E.** New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure. *PLoS One* 9: e87845, 2014.
82. **van Heerebeek L, Borbély A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ.** Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113: 1966-1973, 2006.
83. **van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MP, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Somsen A, Verheugt FW, Niessen HW, Paulus WJ.** Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 126: 830-839, 2012.
84. **Varga ZV, Ferdinandy P, Liaudet L, Pacher P.** Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309: H1453-H1467, 2015.
85. **Veksler VI, Lechene P, Matrougui K, Ventura-Clapier R.** Rigor tension in single skinned rat cardiac cell: role of myofibrillar creatine kinase. *Cardiovasc Res* 36: 354-362, 1997.
86. **Ventura-Clapier R, Veksler V.** Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res* 74: 920-929, 1994.
87. **Wang W, Bodiga S, Das SK, Lo J, Patel V, Oudit GY.** Role of ACE2 in diastolic and systolic heart failure. *Heart Fail Rev* 17: 683-691, 2012.
88. **Whaley-Connell A, Govindarajan G, Habibi J, Hayden MR, Cooper SA, Wei Y, Ma L, Qazi M, Link D, Karuparthi PR, Stump CS, Ferrario CM, Sowers JR.** Angiotensin-II mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic TG (mRen2) 27 Ren2 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E355–E363, 2007.

89. **Xu YJ, Saini HK, Zhang M, Elimban V, Dhalla NS.** MAPK activation and apoptotic alterations in hearts subjected to calcium paradox are attenuated by taurine. *Cardiovasc Res* 72: 163-174, 2006.
90. **Yar S, Monasky MM, Solaro RJ.** Maladaptive modifications in myofilament proteins and triggers in the progression to heart failure and sudden death. *Pflugers Arch* 466: 1189-1197, 2014.
91. **Yates JC, Dhalla NS.** Structural and functional changes associated with failure and recovery of hearts after perfusion with Ca<sup>2+</sup>-free medium. *J Mol Cell Cardiol* 7: 91-103, 1975.
92. **Yin Z, Ren J, Guo W.** Sarcomeric protein isoform transitions in cardiac muscle: a journey to heart failure. *Biochim Biophys Acta* 1852: 47-52, 2015.
93. **Zhang JY, Tong W, Wu F, Bi SH, Xu M, Jin ZX, Yang Y, Jiang XF, Zhou JJ.** Different roles for contracture and calpain in calcium paradox-induced heart injury. *PLoS One* 7: e52270, 2012.
94. **Zhang M, Xu YJ, Saini HK, Turan B, Liu PP, Dhalla NS.** TNF-alpha as a potential mediator of cardiac dysfunction due to intracellular Ca<sup>2+</sup>-overload. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 57-63, 2005.
95. **Zile MR, Gottdiener JS, Hetzel SJ, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Baicu CF, Massie BM, Carson PE; I-PRESERVE Investigators.** Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation* 124: 2491-2501, 2011.
96. **Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, Slater R, Palmer BM, Van Buren P, Meyer M, Redfield MM, Bull DA, Granzier HL, LeWinter MM.** Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation* 131: 1247-1259, 2015.

97. **Zimmerman AN, Hülsmann WC.** Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 211: 646-647, 1966.
98. **Zimmerman AN, Daems W, Hülsmann WC, Snijder J, Wisse E, Durrer D.** Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovasc Res* 1: 201-209, 1967.
99. **Zobel C, Brixius K, Pietsch M, Munch G, Bolck B, Schwinger RH.** Unchanged sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, reduced Ca<sup>2+</sup> sensitivity, and negative force-frequency relationship in transgenic rats overexpressing the mouse renin gene. *J Mol Med* 76: 533-544, 1998.
100. **Zolk O, Quattek J, Seeland U, El-Armouche A, Eschenhagen T, Böhm M.** Activation of the cardiac endothelin system in left ventricular hypertrophy before onset of heart failure in TG(mREN2)<sup>27</sup> rats. *Cardiovasc Res* 53: 363-371, 2002.



Nyilvántartási szám: DEENK/175/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

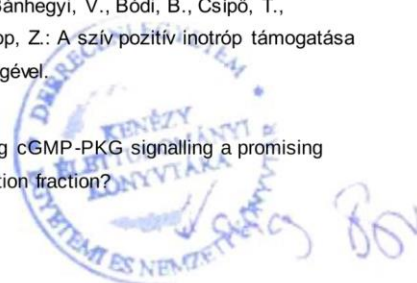
Jelölt: Kovács Árpád  
Neptun kód: K5539B  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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 Ca<sup>2+</sup>-paradox rat hearts.  
Mol. Cell. Biochem. 403 (1-2), 57-68, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-017-2954-8>  
IF: 2.613 (2015)
2. **Kovács, Á.**, Fülöp, G. Á., Kovács, A., Csipő, T., Bódi, B., Priksz, D., Juhász, B., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Granzier, H. L., Édes, I., Fagyas, M., Papp, Z., Barta, J., Tóth, A.: Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats.  
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 310 (11), H1671-H1682, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00842.2015>  
IF: 3.324 (2015)

### További közlemények

3. Nagy, L., Gödény, I., Nánási, P. P., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csipő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., **Kovács, Á.**, Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotrop támogatása a miozin-aktivátor hatású omecantiv-mecarbil segítségével.  
Cardiol. Hung. 47 (1), 69-76, 2017.
4. **Kovács, Á.**, Alogna, A., Post, H., Hamdani, N.: Is enhancing cGMP-PKG signalling a promising therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction?  
Neth. Heart. J. 24 (4), 268-274, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12471-016-0814-x>  
IF: 2.062 (2015)





5. Barta, J., **Kovács, Á.**: Szívelégtelenség és cilostazol.  
Cardiol. Hung. 45 (2), 108-116, 2015.
6. Nagy, L., **Kovács, Á.**, Bódi, B., Pásztorné Tóth, E., Fülöp, G. Á., Tóth, A., Édes, I., Papp, Z.: The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat.  
Br. J. Pharmacol. 172 (18), 4506-4518, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13235>  
IF: 5.259
7. **Kovács, Á.**, Papp, Z., Nagy, L.: Causes and pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction.  
Heart Fail. Clin. 10 (3), 389-398, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hfc.2014.04.002>  
IF: 1.844
8. Balogh, Á., Tóth, A., Pásztorné 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.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,102**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):**  
5,937

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, 2017.06.14.



## TÁRGYSZAVAK

Ca<sup>2+</sup> paradox

izolált szívműködő sejtek

miofibrilláris ATPáz aktivitás

miofilamentális fehérje degradáció

renin-angiotenzin rendszer

szarkomer diszfunkció

titin foszforiláció

## KEYWORDS

Ca<sup>2+</sup> paradox

isolated cardiomyocytes

myofibrillar ATPase activity

myofilament protein degradation

renin-angiotensin system

sarcomere dysfunction

titin phosphorylation

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Barta Judit*nak, akinek kivételes precizitása és professzionalitása zsinórmértékül szolgált PhD tanulmányaim alatt. Hálásan köszönöm, hogy hallgatójává fogadott és támogatott céljaim elérésében. Remélem, hogy közös munkánk tovább mutat a PhD fokozatom megszerzésénél.

Őszintén hálás vagyok a kivételes lehetőségért, hogy szakmai példaképeim irányítása alatt valósíthattam meg tudományos alkotómunkámat. Köszönöm *Dr. Papp Zoltán* Professzor Úrnak mindazt az önzetlen támogatást, amivel napról napra segíti szakmai pályafutásomat. Köszönöm *Dr. Tóth Attila* Professzor Úrnak, hogy érdekesnek talált a közös munkára. Az együtt megvalósított kísérletek és őszinte kritikák élménye azóta is szakmai és emberi támpont számomra. Köszönöm *Dr. Édes István* Professzor Úrnak, a Kardiológiai Intézet vezetőjének, a folyamatos segítséget és támogatást szakmai karrierem során.

Hálásan köszönöm *Dr. Balogh Ágnes*, *Dr. Czuriga Dániel* és *Dr. Fülöp Gábor Áron* önzetlen és baráti támogatását. Szakmai munkájuk színvonala és hangulata a mai napig követendő példa számomra. Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet a Klinikai Fiziológiai Tanszék minden munkatársának és PhD hallgatójának is a munkámhoz nyújtott segítségükért.

Köszönöm feleségemnek és családomnak töretlen hitüket és támogatásukat.

*A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00043. számú, „Szív- és érkeletési kiválóságközpont (IRONHEART)” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. Az EMBERI ERŐFORRÁSOK MINISZTERIUMA ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.*



