

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Kalász Judit

Témavezető: Dr. Borbély Attila



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2021

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Kalász Judit, molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Borbély Attila, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Halmosi Róbert, az MTA doktora

Prof. Dr. Bay Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2021. július 14., 11 óra (online)

Az értekezés bírálói: Dr. Sárközy Márta Julianna, PhD

Dr. Pórszász Róbert, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Halmosi Róbert, az MTA doktora

Prof. Dr. Bay Péter, az MTA doktora

Dr. Sárközy Márta Julianna, PhD

Dr. Pórszász Róbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2021. július 14., 13 óra (online)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a kalaszjudit1@gmail.com email címre a vitát megelőző nap (2021.07.13.) 16:00 óráig.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

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

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

1.1. Az oxidatív stressz szerepe és jelentősége a kardiovaszkuláris megbetegedésekben

1.1.1. A reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezése

Oxidatív stresszről akkor beszélünk, amikor a sejtekben, szövetekben keletkező reaktív oxigén származékok (ROS) és nitrogén intermedierek (RNS) mennyisége meghaladja a szervezet antioxidáns rendszereinek kapacitását, így utóbbiak nem képesek semlegesíteni a

ROS/RNS molekulák oxidatív potenciálját, ami a szervezet molekuláinak (fehérjék, lipidek, nukleinsavak) károsodásához vezet. A ROS a molekuláris oxigén tökéletlen redukciója során a mitokondriumokban (elektrontranszportlánc 1-es komplex, NADH-dehidrogenáz, valamint 3-as komplex, ubiszemikinon és redukált citokróm-b), gyulladásoz folyamatokban a NAD(P)H-oxidáz (Nox) hatására a fagocitákban, a biotranszformáció folyamatában a májban (citokróm p450), valamint nem enzimátikus úton (ionizáló sugárzás, fotólízis, nitrogén-oxidok, ózon) is keletkezhet. Szívizomsejtekben főként a Nox2 és 4 és a xantin-oxidáz (XO) működése révén termelődnek ezen reaktív intermedierek. ROS keletkezése során az oxigénből, egy elektron hozzáadásával szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) jön létre, mely egy gyengébb szabadgyök, belőle szuperoxid dizmutáz (SOD) hatására hidrogén-peroxid (H_2O_2) képződik. A H_2O_2 egy stabil és membránpermeábilis molekula, melynek *in vivo* koncentrációja nagymértékben függ a képződési és lebomlási sebességétől. A H_2O_2 semlegesítését két enzimrendszer végzi a szervezetben: magas H_2O_2 koncentrációnál a kataláz enzim, míg alacsony H_2O_2 koncentrációknál a glutation-peroxidáz enzim redukálja a H_2O_2 -t vízzé. Amennyiben nem semlegesítődik, úgy a H_2O_2 fémionokkal (vas, réz) reakcióba lépve egy elektron hozzáadásával hidroxil-gyököt ($\cdot OH$) képez a Fenton reakcióban, vagy a mieloperoxidáz (MPO) enzim ko-szubsztrátjaként hipoklórossavat (HOCl) hoz létre. Előbbi nagy reaktivitással és extrém rövid életidővel (10^{-9} s) rendelkezik, utóbbi az MPO effektoraként szolgál. Az RNS képződés folyamatában a molekuláris oxigénből NOS hatására nitrogén-monoxid szabadgyök ($\cdot NO$) jön létre. A $\cdot NO$ -ból O_2 felhasználásával nitrogén-dioxid (NO_2), vagy szuperoxiddal egyesülve peroxinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) keletkezik.

1.1.2. Oxidatív stressz kardiovaszkuláris megbetegedésekben

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

körülmények között a ROS részt vesznek az érátmérő szabályozásában. Az ateroszklerózis progressziójában az endotélsejtek, makrofágok és az érfal simaizomsejtjei által termelt ROS az alacsony denzitású lipoproteint (LDL) oxidálva endotél diszfunkciót okoznak és destabilizálják az ateroszklerotikus plakkokat. A plakk ruptúra következtében létrejövő csökkent vérellátás az érintett szívmuszkuláció oxigénhiányos állapotát okozza, mely MI-hoz és I/R károsodáshoz vezet. *Oxigén paradox* néven ismert az a jelenség, mely szerint az oxigénhiányos állapotot követő reperfúzió alatt éri nagyfokú oxidatív károsodás a szívmuszkulációt. Ennek hátterében egyrészt az iszkémia alatt a szívmuszkulációban felszaporodott nagy mennyiségű XO, valamint Nox2 és Nox4 upreguláció állnak, melyek a reperfúzió során oxigén felhasználásával szabadgyököket képeznek. A neutrofilek beáramlása az oxigénhiányos területre iszkémia alatt ugyan lassú, azonban a reperfúzió során beáramló neutrofil granulocitákból kiszabaduló ROS gyors akkumulációja figyelhető meg, melyek közvetlenül károsítják a szívmuszkulációt. A MI-ban megfigyelhető szívmuszkuláció elhalást követően a hegyszövet kialakulása során újbóli, leukocita beáramlással járó gyulladási reakció zajlik le az érintett szívmuszkulációban. A túlzott mértékű gyulladási folyamatok azonban káros átépüléshez, *remodelling*hez és szívelégtelenséghez vezethetnek. BK-i remodelling során a ROS növekedési jelátviteli útvonalakat aktiválnak, így hipertrofiához vezetnek, aktiválják a mátrix metalloproteinázokat (MMP), így kollagén degradációt kiváltva hozzájárulnak a BK dilatációhoz. Szívelégtelenségben a ROS a Ca^{2+} -ATP-ázok működésének befolyásolása révén a szívmuszkuláció Ca^{2+} túltöltődéséhez, ezáltal kontraktilis diszfunkcióhoz, valamint endotél diszfunkció, intersticiális fibrózis és apoptózis kialakulásához vezetnek.

1.1.3. Oxidatív fehérjekárosodások a szívmuszkuláció kontraktilis rendszerében

A ROS nemcsak indirekt módon (Ca^{2+} homeosztázis zavara, kinázok aktiválása), hanem a miofilamentális fehérjék funkciójának direkt károsítása révén is képesek csökkenteni a kontraktilis rendszer erőgeneráló képességét, ezáltal kontraktilis diszfunkciót előidézni. A

H₂O₂ szívizomra kifejtett hatásai két csoportba sorolhatók: 1. *direkt* fehérje oxidáció, melynek során a szulfhidril (SH)-csoport oxidáció és/vagy karboniláció megy végbe (aktin, miozin könnyűlánc-1 (MLC-1)); 2. *indirekt* hatások, mikor a H₂O₂ másodlagos messengerként protein kinázokat aktivál (redox signaling, protein-kináz C delta (PKC δ), troponin I (TnI) foszforiláció). A H₂O₂ koncentrációfüggő módon BK diszfunkciót okoz patkány szívben és diszulfid-hídképződést indukál aktin és tropomiozin (Tm) esetében.

A kontraktilis rendszer oxidatív károsodása a szarkomerek szintjén egyes aminosavak módosításával valósul meg. A *metionin (Met) oxidációja* során metionin-szulfoxid (MetSO) keletkezik, amely a MetSO-reduktáz segítségével képes visszaalakulni a kiindulási aminosavvá. Ezek alapján a fehérjék felszíni Met oldalláncait a szervezet endogén antioxidánsaiként, hatékony szabadgyök scavengerként tartják számon. A cisztein (Cis) aminosav terminális SH csoportjának köszönhetően szintén rendkívül érzékeny az oxidatív károsodásra, melynek hatására intra- vagy intermolekuláris *diszulfid hidak* (RS-SR') keletkezhetnek az instabil szulfénsav (R-S-OH) intermediéren keresztül, vagy anélkül. A szulfénsav további ROS hatására szulfínsavvá (R-SO₂H), majd szulfonsavvá (R-SO₃H) alakul. Oxidált glutationnal történő reakcióban glutationilált tiol (RS-SG) képződik. Az S-glutationilálás és diszulfid-képződés reverzibilis, míg a szulfonsav keletkezése irreverzibilis reakció. Ezzel szemben a közelmúlt kutatásai megerősítették, hogy az enyhe oxidatív stressz kardioprotektív (fehérjék S-nitrozilálása (SNO)), vagy szabályozó (redox állapotot érzékelő és válaszreakciót beindító, „redox-kapcsolóként” működő ciszteinek) szerepet is betölthet. HNO hatására a kalcium-érzékenység és kontraktilis erő növekedése figyelhető meg.

Nagyobb mértékű oxidatív stressz hatására a szívizomfehérjék *karbonilációja* következik be. Direkt oxidációval a fehérjék lizin, arginin, prolin és threonin aminosav oldalláncain alakulhatnak ki karbonil csoportok. A fém katalizált reakció (Fenton reakció - vas jelenlétében, *in vivo*) során aldehidek és ketonok keletkeznek. Emellett lipideken,

szénhidrátokon és előrehaladott glikációs végtermékeken keletkezett karbonilgyökökkel reakcióba lépve cisztein, lizin és hisztidin aminosavakon is kialakulhatnak karbonilszármazékok másodlagos reakció során.

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

1.2. A mieloperoxidáz enzim (MPO)

1.2.1. Az MPO jellemzői, klorinációs és peroxidáz aktivitása

Az MPO (EC 1.11.2.2) a hemperoxidáz enzimesalád tagja. Az enzimesalád tagjai működésük során a kosubsztrátként funkcionáló H₂O₂ felhasználásával tesznek szert erős oxidáló erőre, mellyel effektorként vesznek részt a kórokozók elleni küzdelemben. Az MPO -az enzimesalád tagjai közül egyedül- képes arra, hogy a H₂O₂ oxidatív potenciálját emelve a kloridion (Cl⁻) oxidációjával hipoklórossavat (HOCl) hozzon létre.

Az MPO a leukociták azurofil granulumaiban található, leukocita aktivációt követően szekretálódik és vesz részt a természetes immunválaszban. Főként neutrophil granulociták tartalmazzák, azonban fellelhető monocitákban, valamint a szöveti makrofágok egyes típusaiban is. Természetes immunválaszban betöltött baktériumölő szerepe mellett a fagoszómákon kívül kerülve gyulladásos folyamatokban az általa létrehozott ROS a szervezet szöveteit, fehérje, lipid és DNS szerkezetét is károsíthatják.

Az MPO enzim egy 144 kDa molekulatömegű tetramer, amely két megegyező alegységből épül fel, melyeket diszulfid-híd köt össze. Az MPO működése során ROS-t képez, halogenizációs (klorinációs), illetve peroxidáz ciklusán keresztül. Mivel a halogenizációs ciklus két-elektronos redukciója során *in vivo* leginkább, kísérleti körülményeink között pedig kizárólag a nagy reaktivitású HOCl keletkezik, ezért a

továbbiakban az MPO ezen aktivitására, mint *klorinációs aktivitásra* hivatkozunk. A *peroxidáz aktivitás* két egyelektronos redukciója során reaktív nitrogén intermedierek, tirozilgyök és ditirozin keletkeznek. Az MPO működése az MPO-inhibitor (MPO-I) 4-aminobenzhidrazid (ABAH) segítségével gátolható.

1.2.2. Az MPO jelentősége kardiovaszkuláris megbetegedésekben

Ismert, hogy a teljes, vagy részleges MPO deficienciával élő személyek (2000-4000 kaukázusi emberből 1) között kisebb a CV megbetegedések előfordulásának valószínűsége. A MPO enzim szintje a kor előrehaladtával nő, valamint nőkben magasabb, mint férfiakban.

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

1.2.3. A mieloperoxidáz fő effektora, a hipoklórossav (HOCl)

MPO hatására H_2O_2 és kloridion reakciója során nagy reaktivitású HOCl keletkezik. A MPO klorinációs aktivitása során képződő HOCl erős oxidálószerként ismert, rövid életideje ellenére nagy reaktivitása, membránpermeabilitása és széles célspektruma a leukociták legerősebb oxidánsává teszi. Az MPO által generált HOCl koncentrációja mikromólos nagyságrendű, azonban gyulladáshoz szövetben millimólos értéket is elérhet. A HOCl a fehérjék aminosav-oldalláncaival nagyfokú reaktivitást mutat. A HOCl által kiváltott fehérje

poszttranszlációs módosítások magukba foglalják a Cis aminosavakból szulfenil-klorid intermedieren keresztül létrehozott diszulfidok képződését, valamint a kloraminok aldehiddé alakulásakor létrejövő karbonil-csoportok keletkezését is. Tyr aminosavat klorinálva 3-klorotirozint hoz létre, amely a HOCl- okozta oxidatív fehérjekárosodás specifikus markere. Metioninnal szembeni nagy reaktivitása miatt az aminosav mint HOCl-scavenger és endogén antioxidáns ismert.

1.3. A titin óriásfehérje szerepe a szarkomerben

A titin a szarkomer legnagyobb fehérjéje, molekuláris rugóként működve felelős a szívizomsejt kalcium független passzív erejének ($F_{\text{passzív}}$) kialakításáért. A titin a fél szarkomeren végighúzódik, a Z lemeztől az M sávig terjed, biztosítja a szarkomer magas fokú rendezettségét. Az óriásfehérje részt vesz jelátviteli folyamatokban, mechanoszenzorként érzékeli képes a diasztolés megnyúlás és a szisztolés kontrakció alatt bekövetkező erőváltozásokat. Emlős szívizomban a titin két izoformája található meg: a hosszabb és rugalmasabb N2BA (~3,2-3,7 MDa) és a rövidebb és merevebb N2B (~3 MDa), melyek aránya egészséges humán szívizomzatban 35:65-re tehető. Rágcsálószívben ugyanakkor szinte kizárólag a rövidebb és merevebb N2B izoforma fordul elő. Az izoformák arányának megváltozása (titin izoforma váltás) hatással van a szívizomsejtek passzív feszülésére. A titin merevségét poszttranszlációs módosítások is befolyásolják, ugyanis a fehérje a szívizomsejt passzív feszülését befolyásoló foszforilációs helyekkel rendelkezik (protein-kináz A, G, $C\alpha$ (PKA, PKG, PKC α), Ca^{2+} /kalmódulin függő protein kináz II (CaMKII)). A titint érő oxidatív károsodások is fontos szerepet játszhatnak az $F_{\text{passzív}}$ szabályozásában: a N2Bus régióban oxidáció hatására létrejövő diszulfid hidak növelik a szívizomsejtek passzív feszülését.

1.4. A női nem és a stressz szerepe kardiovaszkuláris megbetegedésekben

1.4.1 A női nemi hormonok védőszerepe

A *nem* fontos szereppel bír a CV megbetegedések kialakulásában, az alkalmazott terápia hatékonyságában, valamint a mortalitásban egyaránt. A menopauza előtt álló nők esetében kisebb a CV megbetegedések kialakulásának valószínűsége: az iszkémiás szívbetegség kialakulása 10-15 évvel későbbre tehető a kedvezőbb lipid profilnak köszönhetően, kisebb a BK hipertrófia és remodelling incidenciája, valamint az I/R károsodás mértéke is. Ezen megfigyelések a női nemi hormonok (ösztrogén és progeszteron) kardioprotektív hatását valószínűsítik, azonban a hormonpótló terápia klinikai alkalmazás során mégsem javította a kimenetelt, sőt növelte a CV rizikót.

1.4.2 Az ösztrogén és a progeszteron szerepe a kardiovaszkuláris rendszerben

Az *ösztrogén* egy szteroidhormon, mely hatását magreceptorain ($ER\alpha$ és $ER\beta$), valamint membránreceptorán (GPR30) keresztül fejti ki. Az ösztrogénreceptorok nőkben és férfiakban egyaránt kimutathatóak szívizomsejtekben, fibroblasztokban, endotél- és érfal simaizom sejtekben. Az ösztrogénreceptorok upregulációját mutatták ki hipertrófiában és szívelégtelenségben. Az ösztrogén a renin-angiotenzin rendszerre (RAAS) gátló hatást kifejtve csökkenti a vérnyomást. Emellett a NOS expresszióját befolyásolva elősegíti az NO mediált vazodilatációt, valamint I/R károsodás során csökkenti a sejtek Ca^{2+} túltöltődését. Anti-inflammatorikus és antioxidáns hatása a ROS termelődés és az apoptózis csökkentésében nyilvánul meg.

A *progeszteron* a petefészek által termelt mennyiséggel azonos, vagy azt meghaladó szinten termelődik a mellékvesében is. Stressz állapotokban - lévén a kortizol prekürzora - a mellékvese progeszteron termelése és szekréciója nemtől és ösztrogéntől függetlenül emelkedik adrenokortikotrop hormon (ACTH) stimuláció hatására. A progeszteron genomikus és non-genomikus válaszokat aktivál magreceptorokon (PR-A és PR-B) és

membránkötött receptorokon keresztül (mPR α - ϵ). A gyulladásszerű reakció gátlása révén csökkenti az I/R-s károsodás mértékét, emellett a repolarizáció felgyorsításával antiaritmiás hatást is kifejt. A progeszteron képes gátolni az szívműködés sejtek apoptózist, érfa simaizom sejteken antiproliferatív hatást közvetít, NOS aktivációt követően az NO szint emelésével vazodilatációt okoz, így csökkenti a vérnyomást.

1.4.3 A stressz szerepe a kardiovaszkuláris kórképekben

Az ismert CV rizikófaktorok mellett a pszichoszociális stressz is káros hatást gyakorol a CV rendszerre. Ennek egyik megnyilvánulási formája a Takotsubo kardiomiopátia (TCM), mely elsősorban menopauzán átesett nőknél alakul ki nagyfokú emocionális vagy fizikai stresszhelyzetet követően. TCM-ban a katekolamin szint ugrásszerű emelkedése után a BK apikális hipokinizise és ballonszerű tágulata jön létre, melynek hátterében a β 2-adrenerg receptorok Gs-ről Gi fehérjére történő átkapcsolódását és az ennek hatására bekövetkező szívműködés kontraktilitás csökkenést valószínűsítik.

A szervezet stresszválasza a hipotalamusz-adenohipofízis-glükokortikoid (HPA) - tengelyen keresztül valósul meg. Időben először a mellékvesével katekolaminszekréciója és a szimpatikus idegrendszer aktivációja következik be, amit percekben belül glükokortikoid szekréció követ. Glükokortikoidok hatására a CV rendszer válaszkészsége a szimpatikus aktiválással szemben fokozódik. A szimpatikus idegrendszer aktiválódása a β -adrenerg jelátvitelen keresztül központi szerepet játszik a szívműködés kontraktilis funkciójának és Ca²⁺ érzékenységének szabályozásában. A kontraktilis fehérjék (miozinkötő C-fehérje (MyBP-C), troponin-I (TnI), titin) PKA-mediált foszforilációja befolyásolja a szívműködés kontraktilis működését.

2. Célkitűzések

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

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

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

2.2. Stressz és az ovariektómia hatásainak vizsgálata a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára

Nőstény, valamint ovariektomizált nőstény patkánymodellben annak vizsgálata, hogy

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

3. Anyagok és módszerek

3.1 Szívizom minták

3.1.1 Humán bal kamrai szívizom minták

A bal kamrai szívizom minták négy, technikai okok miatt fel nem használt humán donor szívből származtak (egy 41 és egy 46 éves nő, valamint egy 53 és egy 56 éves férfi). A szívek eltávolítást követően kardioplégias oldatba kerültek, majd folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztás után felhasználásig -80°C -on tároltuk őket. A humán szívizom mintákon végzett kísérleteink a Helsinkai Deklarációban megfogalmazott irányelveknek megfelelően, a Magyar Egészségügyi Minisztérium (engedély szám: No. 323-8/2005-1018EKU) és a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek.

3.1.2 Akut stressz és ovariectomia patkánymodellben

Az állatmodellt az eszéki J.J. Strossmayer Egyetem Orvostudományi Karának Orvosi Biológia Intézetében hozták létre 32 nőtény Sprague-Dawley patkány felhasználásával. Az állatok fele ($n=16$) ovariectomián (OVX) esett át 12 hetes korban. Az operáció során az elaltatott állatokból eltávolításra kerültek az ováriumok és a petevezetékek egy része. Kontrollként a fennmaradó 16, életkorban megegyező, nem operált nőtény patkány szolgált (Kontroll). 28 hetes korban 8 Kontroll és 8 OVX állatot akut stressz kezelésnek vetettek alá (Kontroll-S és OVX-S csoport): az állatokat egy 4°C -os szobában 1 órára egy olyan átmérőjű fémhengerbe zárták, mely korlátozta őket szabad mozgásukban (cold restrained stress). Ezt követően az állatokat azonnal kombinált isofluran inhaláció és intramuszkuláris ketamin (30 mg/ttkg) injekció felhasználásával elaltatták. Vérvételt követően a szívet kimetszették, a bal kamrát leválasztották, folyékony nitrogénbe helyezték, majd -80°C -on tárolták. A kísérleti protokollt az Eszéki Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. A minták szállítása az Eszéki Orvostudományi Egyetem és a Debreceni Egyetem között meglévő mintaszállítási egyezmény alapján történt (DETTI/22-3/2013).

3.2 Izometriás erő mérése membránfeszített, bal kamrai szívműsejt preparátumokon

A szívműsejtek izolálása során a fagyasztott bal kamrai szívmű minták darabjait felolvasztottuk, majd proteáz inhibitorokat tartalmazó izoláló oldatban mechanikai szövetomogenizátor segítségével megtörtük. Ezt követően a szívműsejteket 0,5%-os Triton-X-100 detergenssel kiegészített izoláló oldat segítségével permeabilizáltuk. Az erőmérések során a szívműsejtek végeit szilikon ragasztó segítségével egy érzékeny erőmérőhöz és egy mozgatható elektromágneses motorhoz rögzítettük, a preparátumok átlagos szarkomer hosszát 2,3 μm -re állítottuk be. Az erőparaméterek meghatározása aktiváló, illetve relaxáló oldatokban történt, melyek pCa értéke (a Ca^{2+} koncentráció negatív tízes alapú logaritmus $(-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}])$) 4,5, illetve 9 volt. Az izometriás erőt a szívműsejtek relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő mozgatásával mértük. Az erő kifejlődése után a motor segítségével a preparátum hosszát az eredeti hossz 80%-ára (20%-kal) csökkentettük, majd 2 ms múlva visszaállítottuk az eredeti sejt hosszát („release-restretch”). Ezen manőver során a képződött aktin-miozin keresztkötések felszakadtak, az erő a maximális értékről nullára esett (totál erő ($F_{\text{totál}}$)), majd a jelenlévő Ca^{2+} jelenlétében újraépült. A Ca^{2+} -független, passzív erőkomponenst ($F_{\text{passzív}}$) relaxáló oldatban hasonló, de hosszabb (8 s) manőver alkalmazásával határoztuk meg. Az $F_{\text{totál}}$ -ból kivonva az $F_{\text{passzív}}$ -ot kiszámítható a szívműsejt Ca^{2+} -függő aktív ereje ($F_{\text{aktív}}$). Az $F_{\text{aktív}}$ és $F_{\text{passzív}}$ értékeket a preparátum keresztmetszetére normalizálva, kN/m^2 -ben adtuk meg. Ha a szubmaximális Ca^{2+} koncentrációjú oldatokban mért $F_{\text{aktív}}$ -ot az aktiváló oldatban (pCa 4,75) kapott erőértékhez viszonyítva ábrázoljuk, egy szigmoid görbét kapunk. A görbe illesztésével meghatározható a Ca^{2+} érzékenység, melyet a fél maximális erő létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} koncentrációval jellemezhetünk (pCa_{50}).

3.2.1 A mieloperoxidáz enzim humán szívműsejtek erőgenerálására kifejtett hatásának vizsgálata

Az MPO funkcionális hatásának tanulmányozása során meghatároztuk az $F_{\text{aktív}}$ -ot, az $F_{\text{passzív}}$ -ot, valamint pCa_{50} -et az MPO-szubsztrát H_2O_2 (30 μ M, 15 perc), MPO+ H_2O_2 (MPO, 8 U/l), MPO+ H_2O_2 +MPO-I (4-aminobenzhidrazid, 50 μ M) és MPO+ H_2O_2 +Met (10 mM) kezelések előtt, illetve azokat követően. Az MPO+ H_2O_2 által kiváltott hatások revertálhatóságát a redukálószer dithiotreitol (DTT, 10 mM, 30 perc) alkalmazásával vizsgáltuk. A különböző kezelések $F_{\text{aktív}}$ -ra és $F_{\text{passzív}}$ -ra kifejtett hatásait a kezelés előtt mért (kezeletlen) értékekhez viszonyítva, százalékos formában adtuk meg. A kapott értékeket az izoláló oldatban inkubált (15 perc) szívműsejtek erőgenerálásához viszonyítottuk (idő kontroll). Az egyes kezelések során 3-4 szívből származó 5-12 szívműsejtet használtunk.

3.2.2 Az akut stressz és az ovariectomia hatása a szívműsejtek erőgenerálására

A humán szívműszaton folytatott kísérletekhez hasonlóan az $F_{\text{aktív}}$ -ot, az $F_{\text{passzív}}$ -ot, valamint a pCa_{50} -et mértük a kontroll, stressznek kitett kontroll (Kontroll-S), ovariectomizált (OVX) és stressznek kitett ovariectomizált (OVX-S) állatcsoportokban. Csoportonként 10-10 szívműsejt került vizsgálatra.

3.3 MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérése

Az MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérését speciális, kereskedelmi forgalomban elérhető kitek segítségével végeztük. A *klorinációs aktivitást* mérő esszé működése során az MPO által generált hipoklorit (OCI) alakítja át a non-fluoreszcens szubsztrátot erős fluoreszcenciával rendelkező fluoresceinné, míg a *peroxidáz aktivitást* mérő esszé esetén az MPO a nonfluoreszcens ADHP-t fluoreszcens resorufinná alakítja. A keletkező fluoreszcencia intenzitás-növekedést különböző hullámhosszon detektáltuk. A fluoreszcencia intenzitás értékeit a telítést megelőzően lineáris regresszióval illesztettük, a függvény meredeksége szolgált az MPO aktivitásának meghatározására. Az MPO hiányában mért értéket háttérnek

tekintettük, az enzimaktivitást erre normalizáltuk. Az MPO+H₂O₂ aktivitás értékeit tekintettük 100%-nak, ehhez hasonlítottuk az MPO-I, valamint a Met hatását.

3.4 Szérum ösztrogén, progeszteron, glükóz és koleszterin szint meghatározása

Az ovariectómizált patkánymodellben a szérum ösztradiol és progeszteron szintek meghatározása kompetitív elven működő kemilumineszcens immunoesszé segítségével történt. Az ösztradiol mérés során a mérési tartomány 4,9 pg/ml - 4,3 ng/ml, a progeszteron szint mérése során a mérési tartomány 29,9 pg/ml - 60,1 ng/ml között volt. A szérum glükóz szint mérése enzimátikus, fotometrikus módszerrel, a szérum koleszterol meghatározása enzimátikus, kolorimetriás módszerrel történt.

3.5 Fehérje SH-oxidáció, karboniláció és foszforiláció meghatározására

3.5.1 A miofilamentális fehérjék SH tartalmának meghatározása Ellman reakcióval

Az MPO hatására a miofilamentális fehérjerendszeren bekövetkező SH-oxidációt Ellman reakció segítségével vizsgáltuk. A membránfosztott bal kamrai, humán szívizomsejteket 15 percen keresztül izoláló oldatban (Iso) inkubáltuk (idő kontroll), vagy 30 µM H₂O₂-t, illetve 38 U/l MPO+H₂O₂-t tartalmazó Iso-val kezeltük. Mosási lépéseket követően a mintákat Ellman reagensben inkubáltuk, amely a fehérjék SH csoportjával reagálva sárga színű 2-nitro-5-tiobenzoesavat (NTB) hoz létre. Az NTB abszorbanciáját 412 nm-en mértük. Az ismert SH tartalmú N-acetil-L-cisztein (NAC) standard sor Ellman reagenssel történő inkubáció után mért abszorbancia értékeit használtuk kalibrációs görbeként (exponenciális illesztés). A minták SH tartalmát 1 mg liofilizált szívizom homogenizátumra vonatkoztatva adtuk meg, 100%-nak tekintve az idő kontroll (Iso) minták SH-tartalmát.

3.5.2 Fehérje oxidáció meghatározása SH-csoport biotinálási módszerrel

Az SH-biotinálás során membránfosztott szívizomsejteket izoláltunk, majd H₂O₂-ot vagy MPO+H₂O₂-ot tartalmazó izoláló oldatban kezeltük. Pozitív kontrollként az oxidálószer dithiodipiridinnel (DTDP) kezelt minták szolgáltak. A miofilamentális fehérjék SH csoportjait

biotinnal jelöltük, majd mosást követően mintapufferben szolubilizáltuk. Centrifugálást követően a fehérjekoncentrációt a felülúszóból dot-blot módszerrel határoztuk meg. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) során a miofilamentális fehérjék méret szerinti elválasztásához 0,5% agarózzal erősített 2 és 4%-os, valamint 10%-os és 15%-os poliakrilamid géleket, ezen kívül 4-15%-os grádiens géleket használtunk. Nitrocellulóz membránra történő transzfert követően a fehérjemennyiséget fluoreszcens fehérje festékkel (Sypro Ruby Protein Blot Stain) határoztuk meg. A biotinnal jelölt SH csoportokat tormaperoxidázzal konjugált streptavidinnel mutattuk ki, majd a mosás után kapott jeleket felerősített kemilumineszcens módszer (ECL) segítségével tettük láthatóvá.

3.5.3 Fehérje karboniláció vizsgálata

Humán, bal kamrai szívizom mintákat H_2O_2 és MPO kezelésnek vetettük alá. Pozitív kontrollként Fenton reagenssel kezelt mintákat alkalmaztunk. A mintákat mintapufferben oldottuk fel, centrifugálást követően a felülúszót felhasználva elvégeztük a karbonilcsoportok derivatizálását. A derivatizált és neutralizált minták fehérjetartalmát centrifugálást követően dot-blot módszer segítségével határoztuk meg. A fehérjék elválasztására gélelektroforézist végeztünk, a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a pontos fehérjemennyiséget Sypro Ruby fehérje blotfestékkel határoztuk meg. Ezt követően a gyártó által előírt módon a derivatizált karbonil csoportokat felismerő elsődleges, valamint másodlagos antitestet alkalmaztunk. A karbonilált fehérjéket ECL módszerrel tettük láthatóvá. Az OxyBlotTM módszerrel meghatározott fehérje karbonilációt fehérjemennyiségre normalizáltuk, majd a karboniláció mértékét karbonilációs index formájában adtuk meg. (KI=1-nek tekintettük az ún. idő kontroll minták karboniláltsági állapotát).

3.5.4 Szívizomfehérjék foszforilációs állapotának meghatározása

Kontroll és ovariektomizált patkányokból nyert szívizomsejteket mintapufferben szolubilizáltuk, centrifugáltuk, a felülúszóból dot-blot módszerrel meghatároztuk a fehérje

koncentrációt. A titin, a miozinkötő C fehérje (MyBP-C) és a troponin I (TnI) fehérjéket gélen elválasztottuk, a fehérjék foszforilációs állapotát ProQ[®] Diamond foszfoprotein gélfestékkel vizsgáltuk, míg a fehérjemennyiség meghatározását Coomassie blue festékkel végeztük. A fehérjék foszforilációs szintjét fehérje mennyiségre normalizáltuk és egy belső kontrollhoz viszonyítva, százalékos értékben kifejezve adtuk meg.

3.6 Adatelemzés és statisztika

A membránfosztott szívizomsejtek erőgenerálását egy személyre szabott erőmérő rendszer segítségével mértük (National Instruments). Az eredmények értékeléséhez és ábrázolásához Excel (Microsoft, 2007) és GraphPad Prism 5.0 programokat használtunk.

A kemilumineszcens (antitestek), fluoreszcens (Sypro Ruby-fehérjemennyiség, Pro Q Diamond-foszforiláció), valamint Coomassie jelek intenzitásának meghatározására a görbe alatti terület mérését végeztük ImageJ és Magic Plot programok segítségével.

Az adatokat az ábrákon és a szövegben átlag \pm SEM formájában tüntettük fel. Statisztikai elemzésére variancia analízist (ANOVA, Bonferroni és Dunnet posthoc teszt), vagy többszintű kevert-hatás lineáris regressziós analízist, pCa-erő összefüggések összehasonlításához páros és páratlan t-tesztet alkalmaztunk. A fehérje foszforiláció, nemi hormonok és szívizomsejt funkció közötti összefüggéseket lineáris regresszióval határoztuk meg. Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak egy változást, ha p értéke kisebb volt, mint 0,05.

4. Eredmények

4.1 A mieloperoxidáz enzim (MPO) hatásának vizsgálata

4.1.1 Az MPO funkcionális hatásainak vizsgálata humán bal kamrai szívműködéseken

Az MPO-val végzett kísérletek előtt egy olyan H_2O_2 koncentráció meghatározására törekedtünk, amely már rendelkezik önálló funkcionális hatással, de ez a hatás MPO jelenlétében fokozódik. Az inkubációk során alkalmazott koncentrációk közül a $30 \mu\text{M}$ -os H_2O_2 oldat csökkentette szignifikánsan a szívműködés aktív erejét, így ezt a H_2O_2 dózist használtuk további kísérleteinkben.

4.1.2 Az MPO+ H_2O_2 kezelés károsítja a humán szívműködés kontraktilis funkcióját

MPO (8 U/l) és H_2O_2 ($30 \mu\text{M}$) együttes alkalmazásakor (15 perc) a membránfosztott humán, bal kamrai szívműködés maximális kalcium-függő aktív erejének ($F_{\text{aktív}}$, pCa 4,75) szignifikáns csökkenését (a kezelés előtti érték $57,7 \pm 4,1\%$ -ára, $n=12$) és a kalcium-független passzív erőkomponens ($F_{\text{passzív}}$, pCa 9,0) jelentős növekedését (a kezeletlen szívműködésen mért érték $179,6 \pm 14,6\%$ -ára, $n=12$) tapasztaltuk. A szívműködés izoláló oldatban (Iso) történő inkubációja során (15 perc, idő kontroll) az $F_{\text{aktív}}$ csak kismértékben csökkent (a kezelés előtti érték $89,0 \pm 1,6\%$ -ára). Amennyiben a kezeléseket előtt és után a szubmaximális Ca^{2+} koncentrációjú aktiváló oldatokban mért erőértékeket a kezeléseket előtti maximális ($F_{\text{aktív}}$, pCa 4,75) erőértékekhez viszonyítottuk (relatív erő-pCa összefüggés), úgy a MPO+ H_2O_2 kezelést követően bekövetkező erőcsökkenés szignifikánsan nagyobb volt a H_2O_2 kezeléshez viszonyítva. Az MPO+ H_2O_2 hatására létrejövő $F_{\text{passzív}}$ növekedés ugyancsak szignifikánsan nagyobb volt a H_2O_2 kezelést követően tapasztalt $F_{\text{passzív}}$ növekedésnél ($79,6 \pm 14,6\%$ vs. $23,9 \pm 7,4\%$, $p < 0,001$).

A kontraktilis fehérjerendszer kalciumérzékenységének (pCa_{50}) meghatározásakor a szubmaximális Ca^{2+} koncentrációjú oldatokkal végzett aktivációk során mért erőértékeket a maximális Ca^{2+} koncentrációjú aktiváló (pCa 4,75) oldatban kezelés előtt és kezelés után

meghatározott erőválaszra normalizálva (normalizált erő) adtuk meg. MPO+H₂O₂ kezelést követően a normalizált erő-pCa összefüggés szignifikáns jobbra tolódását, azaz a pCa₅₀ csökkenését tapasztaltuk (pCa₅₀ 5,83±0,02 vs. 5,66±0,02, $p<0,001$, n=12) . Ezzel szemben a H₂O₂-kezelés a pCa₅₀ értéket nem befolyásolta (5,85±0,05 vs. 5,82±0,03, $p=0,55$, n=7). A szívmuszkuluszok kezelés előtti F_{aktív}, F_{passzív} és pCa₅₀ értékei között mérhető különbség 5,4%, 5,5%, illetve 0,9% volt. Sem a H₂O₂, sem a MPO+H₂O₂ kezelés nem eredményezett fénymikroszkóppal észlelhető struktúrális változást a szívmuszkuluszok harántcsíkjában.

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

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

A redukálószer DTT MPO kezelést követően visszafordította az MPO által indukált F_{passzív} növekedést ($\Delta F_{\text{passzív}}$ MPO: 89,3±27,3% vs. DTT: 19,7±10,4%, $p<0,05$, n=6), ugyanakkor az F_{aktív} (MPO: 57,3±6,4% vs. DTT: 43,8±5,1%, $p=N.S.$, n=6) és a pCa₅₀ (5,66±0,03 vs. 5,69±0,03, $p=N.S.$, n=6) MPO hatására bekövetkező csökkenését a DTT nem volt képes revertálni.

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

Az MPO funkcionális hatásainak háttérében álló biokémiai mechanizmusok feltérképezéséhez meghatároztuk az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását MPO-I és Met jelenlétében. Az MPO-I az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását is gátolta (a kiindulási aktivitás $0,3\pm 0,2\%$, illetve $10,4\pm 6\%$ -ára, $p<0,001$, $n=4$). Ezzel szemben a Met csak az MPO klorinációs aktivitását csökkentette ($2,3\pm 1,3\%$ -ra, $p<0,001$, $n=4$), az enzim peroxidáz aktivitására nem volt hatással ($78,4\pm 8,6\%$, $p=N.S$, $n=4$).

4.1.5 Az MPO hatására létrejövő oxidatív fehérjekárosodások vizsgálata

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

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

A szívizomsejtek izoláló oldatban meghatározott SH-csoport mennyiségéhez viszonyítva H₂O₂ és kombinált MPO+H₂O₂ kezelés során kismértékű, de szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a fehérjék össz SH-csoport tartalmában ($90,4\pm 1,5\%$, $p<0,05$, $n=3$, illetve $86,7\pm 4\%$, $p<0,01$, $n=3$).

Ezt követően kísérletet tettünk az SH oxidáción átesett fehérjék azonosítására. H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelés hatására szignifikánsan csökkent az aktin SH tartalma ($75,9\pm 7,1\%$ -ra, $p<0,01$, $n=4$, valamint $84,2\pm 4,4\%$ -ra, $p<0,05$, $n=9$, az Iso-ban kezelt minták SH tartalmához viszonyítva). Ezzel szemben MyBP-C és az óriás szarkomer fehérje, a titin rugalmasabb (N2BA) és rigidebb (N2B) izoformájának SH tartalma egyik kezelést követően sem változott jelentősen. SH oxidáció hatására intermolekuláris diszulfid-hidak is keletkezhetnek a fehérjék között, melyek nagy molekulatömegű komplexek kialakulásához vezetnek. Western

immunoblot technika segítségével nem redukáló környezetben egy közel 90 kDa molekulatömegű, tropomiozin és aktin tartalmú fehérje-komplexet sikerült kimutatnunk, azonban ennek intenzitása H_2O_2 , vagy MPO+ H_2O_2 kezelés hatására csökkent.

Kísérleteink során a titin nem redukáló és redukáló környezetben oldott, eltérő mértékben oxidált alakjainak mennyiségét is megvizsgáltuk. Növekvő koncentrációjú DTDP kezelés hatására jelentősen csökkent a nem redukáló pufferben történő denaturálással nyert felülúszó titin tartalma, míg a pelletben maradó titin mennyisége növekedett. A felülúszó/pellet arány tehát mind az N2B, mind az N2BA titin izoforma esetében szignifikánsan csökkent. A kezelések nem befolyásolták a titin izoforma arányát a kiindulási (Iso, adat) mintához viszonyítva sem a felülúszó, sem pedig a pellet esetében.

4.1.7 Az MPO hatása a szívizomfehérjék karbonilációjára

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

4.2 Az ovariectomia és az akut stressz hatása patkány bal kamrai szívizomsejtek kontraktilis funkciójára

4.2.1 Az ovariectomia és a stressz hatása a kísérleti állatok fizikális és laboratóriumi

paramétereire

Az állatok testsúlya, valamint szívtömege szignifikánsan nagyobb volt az OVX-S csoportban, azonban a szív-testtömeg arány nem különbözött a vizsgált állatcsoportok között. A szérumban a glükóz, valamint koleszterin értékek hasonlóak voltak a négy állatcsoportban.

4.2.2 Az ovariectomia és a stressz hatása a szérumban az ösztrogén és a progeszteron szintre

A Kontroll és OVX patkányok szérumban meghatároztuk a női nemi hormonok koncentrációját. A vizsgálat során az OVX állatok ösztrogén szintje nem érte el az alsó detekciós értéket (4,9 pg/ml), amely sikeres ovariectomiára utal. Szignifikánsan magasabb (több, mint háromszoros) szérumban a progeszteron szintet mértünk a Kontroll-S (35,6±4,8 ng/ml), valamint az OVX-S (21,9±4,0 ng/ml) patkányokban a Kontroll (10±2,9 ng/ml) és az OVX (2,8±0,5 ng/ml) állatok értékeihez viszonyítva (n=8/csoport, p<0,001 Kontroll-S vs. Kontroll; p<0,01 OVX-S vs. OVX). Akut stressz hatására a Kontroll-S, illetve az OVX-S csoportban a progeszteron szintben bekövetkező emelkedés (25,6 ng/ml, ill. 19,1 ng/ml) hasonló mértékű volt.

4.2.3 Az ovariectomia befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis funkcióját

Az $F_{aktív}$ szignifikánsan nagyobbak bizonyultak OVX, valamint OVX-S állatok esetében a Kontroll, illetve a Kontroll-S állatokhoz viszonyítva (25,9±3,4 kN/m² és 26,3±3,0 kN/m² vs. 16,4±1,2 kN/m² és 14,4±0,9 kN/m², p<0,05, n=10). Ezzel szemben az akut stressz nem befolyásolta az $F_{aktív}$ -ot sem a Kontroll, sem az OVX állatcsoportban. A stressz hatására a pCa₅₀-ben bekövetkező csökkenés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Sem az ovariectomia, sem pedig a stressz nem befolyásolta az $F_{passzív}$, valamint az n_{Hill} koefficiens értékét. Az OVX, illetve az OVX-S állatok felhasznált szívizomsejtjeinek keresztmetszete

szignifikánsan kisebb volt. A szarkomerhossz-erő összefüggés mind a négy állatcsoportban megőrzött volt, nyújtás hatására nőtt az $F_{\text{aktív}}$, illetve az $F_{\text{passzív}}$ is.

4.2.4 Az ovariectómia és stressz hatása a miofilamentáris fehérjék összetételére és foszforilációs állapotára

A miofilamentáris fehérje-összetételben a Kontroll és OVX csoportok között nem találtunk lényeges különbséget. A TnI foszforilációja szignifikánsan magasabb volt az OVX állatokban a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($153 \pm 14,4\%$ vs. $98,5 \pm 4\%$, $p < 0,001$), ez azonban nem mutatott összefüggést a szívizomsejteken mért pCa_{50} -el ($r = 0,268$, $p = 0,73$). Az OVX-S állatcsoportban mérhető TnI foszforiláció ($113,1 \pm 3,6\%$) összevethető volt a Kontroll és Kontroll-S csoportokban meghatározott értékekkel. A MyBP-C foszforilációja szignifikánsan magasabbnak adódott OVX állatokban a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($167,7 \pm 7\%$ vs. $131,4 \pm 5,5\%$, $p < 0,001$), azonban az OVX-S állatokban további, szignifikáns emelkedés nem volt megfigyelhető ($182,9 \pm 6,2\%$). A funkcionális méréseknél tapasztalt változatlan $F_{\text{passzív}}$ értékeknek megfelelően nem találtunk különbséget a titin foszforilációban a négy állatcsoport között.

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

A szívizomsejtek funkcionális paramétereit a fehérje foszforiláció értékeivel összevetve szignifikáns korrelációt találtunk az $F_{\text{aktív}}$, valamint a MyBPC foszforiláció között ($r = 0,986$, $p < 0,05$). A titin foszforiláció ugyanakkor nem mutatott összefüggést a szívizomsejteken meghatározott $F_{\text{passzív}}$ -vel ($r = 0,14$, $p = 0,86$). A szérumban mért progeszteron szint és a szívizomsejteken meghatározott pCa_{50} értékek között szignifikáns, inverz korreláció volt megfigyelhető ($r = 0,96$, $p < 0,05$).

5. Megbeszélés

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

Miokardiális gyulladás és I/R károsodás során az oxidatív stressz növekedése és kontraktilis diszfunkció kialakulása figyelhető meg. Méréseink során az MPO+H₂O₂ kezelés szignifikánsan csökkentette a szívizomsejtek aktív erejét és jelentősen csökkentette a kalcium érzékenységet is. A H₂O₂ hatása önmagában koncentráció dependens, a MPO+H₂O₂ kezelés aktív erőre kifejtett jelentős károsító hatásának hátterében azonban a reakcióban képződő erős oxidáns, a HOCl állhat. A MPO+H₂O₂ kezelés során fénymikroszkóppal vizsgálva a szívizomsejtek harántcsíkolata nem változott, azonban fontos megjegyezni, hogy elektronmikroszkópos vizsgálatok során HOCl hatására a miofilament hálózat sérülése igazolódott. A kalcium független passzív erő H₂O₂ hatására kismértékben, míg H₂O₂+MPO hatására jelentős mértékben fokozódott. Ezen eredményeink összefüggésben állnak azzal a korábbi megfigyeléssel, miszerint a membránfosztott patkány trabekulák esetében az alacsony H₂O₂ koncentráció (10 μM) nem növelte a passzív erőt, míg a HOCl-val történő kezelés annak szignifikáns emelkedését okozta. Bizonyított, hogy az óriás szarkomer fehérje, a titin molekuláris rugóként működve kulcsszerepet játszik a membránfosztott szívizomsejtek passzív erejének kialakításában. A szívizomsejtek passzív ereje titin izoformaváltás, valamint poszttranszlációs módosulások (foszforiláció, SH-oxidáció és feltehetően karboniláció) hatására változhat. Jelen tanulmányunkban nem sikerült biokémiai módszerekkel kimutatni a titin fehérje H₂O₂+MPO kezelést követő SH oxidációját és karbonilációját, funkcionális méréseinkben azonban a DTT szignifikánsan csökkentette a szívizomsejtek H₂O₂+MPO kiváltotta F_{passzív} növekedését. Az MPO hatás redukálószerrel megvalósított revertálhatósága annak oxidatív természetére utal. H₂O₂+MPO kezelés hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk kalciumérzékenységben, amely ellentmondásban áll egy korábbi tanulmány

eredményeivel, ahol HOCl kezelést követően a pCa₅₀ érték emelkedését tapasztalták. Az eltérő eredmények hátterében több tényező is állhat: kísérleteinkben nem ismert például a keletkező HOCl mennyisége, így a két kísérleti elrendezésben különbség lehet az alkalmazott dózist illetően, emellett a permeabilizált miocitákon, illetve trabekulákon elvégzett kezelés nehezen vethető össze egymással. A H₂O₂ kezelés nem volt hatással a sejtek kalcium érzékenységére, így azt feltételezzük, hogy az inkább struktúrális, mintsem regulatórikus változásokat okoz a miofilamentumok szintjén, akár az erőgeneráló kereszthidak számának csökkentése révén.

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

Az általunk alkalmazott MPO-I, a 4-aminobenzhidrazid képes volt kivédeni az MPO szívmiocardiumsejtekre gyakorolt káros hatásait. Az inhibitorhoz hasonlóan a Met is képes volt megakadályozni azt, hogy az MPO kifejtse funkcionális hatásait, amiből arra következtetünk, hogy az észlelt változásokért az MPO klorinációs aktivitása tehető felelőssé. Ez utóbbi megállapításunkat MPO aktivitás assay-vel is megerősítettük. Korábbi tanulmányok alapján ismert, hogy a fiziológiásan releváns Met oldalláncok oxidációja a fehérjék funkciókárosodását okozhatja, mely utóbbit kimutatták szívmiocardiumfehérjék esetében is (pl. aktin). Az MPO inhibitorral és Met-nal két ponton is sikeresen kivédtük az MPO oxidatív hatásait. A redukálószer DTT azonban a csak részlegesen volt képes visszafordítani az MPO-indukált mechanikai változásokat: a passzív erőt a kiindulási értékre csökkentette, azonban az aktív erőt és a pCa₅₀ értéket nem befolyásolta. Az MPO által közvetített oxidatív hatások

sokfélesége miatt valószínűsíthető, hogy esetünkben több, különböző reakció eltérő poszttranszlációs módosításokat eredményezett a szívizomfehérjéken. Kísérleteinkben az aktin esetében szignifikáns SH tartalom csökkenést tapasztaltunk, azonban ennek mértéke nem növekedett MPO hatására, így ez önmagában nem magyarázza a szívizomsejtek aktív erejének csökkenését.

Egy, a munkacsoportunk által korábban használt miokardiális infarktus egér modellben a kalcium-érzékenység csökkenéséhez az aktin és MHC karbonilációja társult, míg magas koncentrációban alkalmazott H_2O_2 az aktin karbonilációját idézte elő. Jelen tanulmányunkban $30 \mu M$ -os H_2O_2 kezelést követően az aktin és MyBP-C esetében kismértékű növekedést tapasztaltunk a karbonilációs indexben. Mivel ezen paraméterben további növekedést nem észleltünk az MPO kezelés hatására, így az MPO-indukált funkcionális hatásokat nem tudtuk egy-egy konkrét szívizomfehérje SH oxidációjával, vagy karbonilációjával magyarázni.

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

Az MPO szívizomsejtekre kifejtett hatásának közvetítésében egyéb fehérjemódosulások (pl. klorináció, nitrálás, Met oxidáció, szulfonsav-képződés, fehérjedegradáció) is szerepet kaphatnak, melyek vizsgálatára kísérleteink nem terjedtek ki.

Jelen tanulmányunkban az MPO rontotta a szívizomsejtek kontraktilis funkcióját. Számos tanulmány született már az oxidatív stressz káros hatásairól, azonban újabb bizonyítékok egy sokkal komplexebb kép mellett szólnak. Kimutatták ugyanis, hogy az enyhe

oxidatív stressz akár kardioprotektív is lehet, sőt akár javíthatja is a kontraktilis apparátus teljesítményét. Összességében elmondható, hogy az oxidatív ágensek szívizomra kifejtett hatása nagyban függ azok erősségétől és természetétől, valamint a miofilamentumok redox környezetétől.

5.2 Az akut stressz és a női nemi hormonok hatásai a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára és a miofilamentáris fehérjék foszforilációjára

A különböző állatmodellekben az alkalmazott stressz típusa, időtartama, és az alkalmazás módja (akut, vagy krónikus) nagyban befolyásolhatja a kiváltott válaszokat, illetve azok mértékét. Mivel a krónikus stressz hatásai a fellépő deszenzitizáció miatt nehezen tanulmányozhatóak, így jelen állatmodellünkben az akut stressz hatásait vizsgáltuk. A kísérletünkben alkalmazott akut stressz protokoll (hideg immobilizációval) a mindennapi életben viszonylag ritkán fordul elő, hatására is azonban az ACTH és kortikoszteroid szintek növekedése következik be. A szérum progeszteronszint - nemtől független - jelentős emelkedése a stressznek kitett Kontroll, és OVX-en átesett állatcsoportban az általunk vizsgált állatmodellben is megfigyelhető volt, annak mértéke szintén teljes mértékben összevethető volt a szakirodalomban mért hormonszintekkel. A progeszteron kardiovaszkuláris hatásait egyre inkább nem genomi útvonalak aktiválódásával hozzák összefüggésbe. Az, hogy ezek a gyors szignáltranszdukciós utak is szerepet kapnak a progeszteron válaszban, felveti az akut stressz által kiváltott progeszteronszint emelkedés esetleges hatásait a szívizomsejtek kontraktilis működésére és/vagy annak szabályozására.

A stressz hatására felszabaduló katekolamin többlet a β -adrenerg jelátviteli úton keresztül a PKA aktiválódásához vezet. A TnI PKA-mediált foszforilációja a miofilamentáris rendszer kalcium érzékenységének csökkenése révén befolyásolja a kontraktilis funkciót. Jelen tanulmányunkban csupán egy, a stressz hatására bekövetkező, kismértékű, nem szignifikáns kalcium érzékenység csökkenés volt megfigyelhető a stressznek kitett Kontroll-

S, illetve az OVX-S állatcsoportok esetében, ez azonban nem járt együtt a TnI fehérje foszforilációs állapotának változásával. Az ellentmondó eredményeket az általunk használt nem kináz- és foszforilációs hely specifikus festési eljárás is magyarázhatja.

Kísérleteink során szignifikáns összefüggést találtunk a szérum progeszteron szint és a szívműködés pCa₅₀ értékei között. Ez arra utal, hogy a Kontroll-S, illetve az OVX-S állatokban megfigyelt kismértékű, nem szignifikáns Ca²⁺ érzékenység csökkenés kiváltója az emocionális stressz volt. A megfigyelésünk alapján azonban nem dönthető el egyértelműen, hogy a Ca²⁺ érzékenységre a stressz indukált progeszteron, vagy a stressz hatására kialakuló β -adrenerg túlsúly volt hatással.

Az ovariectomiát követően bekövetkező β -adrenerg jelátviteli út stimulációja, a következményes cAMP koncentráció-növekedés és PKA aktiválódás a miofilamentáris fehérjék foszforilációjához vezet. A MyBP-C fehérje foszforilációja gyorsítja az aktin-miozin kereszthidak kialakulásának kinetikáját és növeli a kalcium aktiválta maximális erőt. Ezen megfigyeléssel összhangban, kísérleteinkben is szignifikáns F_{aktív} növekedést tapasztaltunk az OVX állatokban. Ezen felül a MyBP-C foszforilációja szignifikáns korrelációt mutatott az F_{aktív} értékekkel. Eredményeink alapján az OVX állatokból izolált szívműködés F_{aktív} növekedésének hátterében az ovariectomia hatására bekövetkező β 1-adrenerg stimuláció következtében kialakuló MyBP-C foszforiláció állhat.

Munkánk során az irodalmi adatokkal összhangban nem találtunk különbséget az egyes állatcsoportok között sem az F_{passzív} értékekben, sem pedig annak fő regulátorának, a titin fehérjének a foszforilációs állapotában.

A klinikai gyakorlatban egyre gyakrabban előforduló takotsubo kardiomiopátia esetén egyre nagyobb igény mutatkozik az akut stressz és a női nemi hormonok akut és késői hatásainak a szívfunkcióra kifejtett hatásainak részletes feltérképezésére, valamint adekvát, specifikus terápia kidolgozására.

A doktori értekezésben szereplő új tudományos eredmények

Eredményeink alapján az alábbi új megállapításokat fogalmazzuk meg:

1. Az MPO az *in vitro* kísérleti körülmények között rontja a kalciumfüggő izometriás erőgenerálást, növeli a kalcium független passzív erőt és csökkenti a kalcium érzékenységet.
2. Az MPO által kiváltott funkcionális változások kivédhetők MPO-inhibitorral, valamint az antioxidáns metionin alkalmazásával, míg a passzív erő növekedése redukálószerrel revertálható.
3. Az aktin fehérje SH-oxidációja, valamint az aktin és a MyBP-C karbonilációja H_2O_2 és H_2O_2 +MPO kezelés hatására növekedett.
4. Az MPO által kiváltott funkcionális hatásokat az MPO klorinációs aktivitása közvetíti.
5. Az ovariectómia növelte a szívműködés erőgenerálását, mellyel párhuzamosan emelkedett MyBP-C foszforiláció igazolódott.
6. Az ovariectómia nem volt hatással a szívműködés passzív erejére és kalciumérzékenységére, azonban akut stresszt követően a pCa_{50} értékek jelzett csökkenése figyelhető meg. Utóbbi inverz korrelációt mutat a stressz hatására megemelkedett szérumszinttel.

6. Összefoglalás

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

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

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



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

Jelölt: Kalász Judit
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,352

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

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

Debrecen, 2021.02.12.



7. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

Köszönöm a támogatást, a sok közös élményt és együtt eltöltött időt a tanszék akkori hallgatóinak és dolgozóinak! Külön köszönöm Dr. Balogh Ágnesnek azt a sok ismeretet, amit átadott nekem a PhD képzésem elején, későbbiekben pedig a hasznos, átgondolt tanácsai,

segítőkészsége és kedvessége sok holtponton átsegített. Köszönöm továbbá Dr. Bódi Beátának és Dr. Fagyas Miklósnak a kísérletek során nyújtott segítséget.

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

Köszönöm a családom, párom és barátaim támogatását!

Munkámat Drága Szüleimnek és Drága Nagyszüleimnek ajánlom!

(végezetül, köszönöm magamnak)

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

