

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Disszertáció

**A myofibrilláris fehérjék szulfhidril oxidációjához köthető
kontraktilis hatások humán szívizomsejteken**

Dr. Hertelendi Zita

**Témavezetők: Dr. Papp Zoltán
Dr. Tóth Attila**

DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KARDIOLÓGIAI INTÉZET
KLINIKAI FIZIOLÓGIAI TANSZÉK

DEBRECEN, 2008

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	5
1.1. Szabadgyökök és a hatásukra kialakuló oxidatív és nitroztatív stressz	6
1.2. Szulfhidril csoportok és jelentőségük	8
1.3. Peroxinitrit	13
1.4. A kontraktilis rendszer fehérjéi	14
1.5. Ischaemiás-reperfúziós károsodás	16
1.6. Szívelégtelenség	20
1.7. Antioxidánsok alkalmazásával kapott eredmények	21
1.8. Célkritikák	23
2. Módszerek	24
2.1. Etikai vonatkozások	24
2.2. Szívizom biopsziák	24
2.3. Mechanikai mérések izolált szívizomsejteken	24
2.4. Oxidáló és redukáló szerek alkalmazása	30
2.5. Oxidáló és redukáló ágensek hatásának tanulmányozása mechanikai mérőrendszeren	32
2.6. Biokémiai módszerek	32
2.6.1. SH tartalom meghatározása Ellman reakcióval	33
2.6.2. Szulfhidril oxidáció kvalitatív vizsgálata biotinilációval és Western Immunoblottal	34
2.6.3. Immunprecipitáció	34
2.7. Statisztikai módszerek	35
3. Eredmények	36
3.1. Myofibrilláris fehérjék SH oxidációjának kontraktilis következményei	36
3.2. Kontraktilis fehérjék SH oxidációval szemben mutatott érzékenységeinek meghatározása és a mechanikai változásokért felelős fehérjék azonosítása	43
3.3. SH oxidáció szerepe a peroxinitrit által kiváltott kontraktilis dysfunkcióban	46
4. Megbeszélés	51
5. Összefoglalás	56
6. Köszönetnyilvánítás	57
7. Irodalom	58
7.1. Hivatkozott közlemények listája	58
7.2. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	69
7.3. Az értekezéshez fel nem használt saját közlemények	69
8. Függelék	74

Rövidítések jegyzéke

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

cTnI: cardiális troponin I

DTDP: 2,2'-ditiodipiridin

DTNB²⁻: 5,5'-ditio-bisz-2-nitrobenzoesav

DTT: ditiotritol

ECL: felerősített kemilumineszcencia

F₀: Ca²⁺-aktivált maximális erő

F_{passzív}: passzív erő

GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

GSH: redukált glutation

H₂O₂: hidrogén-peroxid

HIF-1 α : hipoxia indukált faktor-1 α

jodoacetyl-PEO₂-biotin: (+)-biotiniljodoacetamidil-3,6-dioxaoktanediamin

k_{tr}: aktin-miozin ciklus sebességét jellemző állandó

MLC1: miozin könnyű lánc 1

NAC: N-acetyl-L-cisztein

NADH: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid

NADPH: nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF- κ B: nukleáris faktor kappa B

NO: nitrogén-monoxid

NO⁻: nitroxil-anion

NO⁺: nitrozónium-kation

NOS: nitrogén-monoxid-szintáz

·OH: hidroxilgyök

¹O₂: szinglet oxigén

O₂: oxigén

O₂⁻: szuperoxid-anion

pCa: Ca²⁺ koncentráció 10-es alapú negatív logaritmusa

pCa₅₀: félmaximális erő létrejöttéhez szükséges pCa érték

PN: peroxinitrit

RNS: reaktív nitrogén szabadgyökök

ROS: reaktív oxigén szabadgyökök

SEM: mintaközép hibája

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SH: szulfhidril

TNB: 2-nitro-5-tiobenzóat sav

1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedekben intenzíven tanulmányozták a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) molekuláris szintű hatásait és azoknak a sejtek és szervek funkciójában megnyilvánuló következményeit. Leírták a szabályozott körülmények között kis mennyiségben termelődő ROS fiziológiai funkcióit, ugyanakkor világossá vált, hogy az oxidatív stressznek számos kórállapot kialakulásában meghatározó szerepe van. Ezen kórállapotok közül kiemelhető a szívelégtelenség és az ischaemiás-reperfúziós károsodás. Számos kísérletben bizonyították a szívizomsejteket érő oxidatív stressz kontraktilis funkcióra kifejtett káros hatását, és vizsgálták ennek szerteágazó molekuláris hátterét. Mai tudásunk szerint a szabadgyökök sokféleképpen reakcióba léphetnek nukleinsavakkal, lipidekkel, fehérjékkel, és károsíthatják ezek működését. Ezen károsodások nagyon sok esetben irreverzibilisek, és az oxidáció a makromolekulák végleges funkcióromlását eredményezi. Azonban a fehérjék cisztein oldalláncain jelen lévő szulfhidril (SH) csoportok oxidációja többnyire reverzibilis. Ez a reverzibilitás lehetővé teszi a SH csoportok redox regulációban megfigyelt szabályozó szerepét, és megadja oxidatív stressz során a szabadgyökökkel szembeni védelemben és az adaptív válaszban betöltött jelentőségét. Egyre többen tanulmányozzák az SH csoportok oxidatív hatásra bekövetkező változásait, ennek funkcionális következményeit, legkülönbözőbb betegségekben megfigyelhető szerepét, és a sejtek redox homeosztázisában betöltött funkcióját. Fehérjék SH csoportjait a ROS-hoz hasonlóan reaktív nitrogén szabadgyökök (RNS) és származékaik is képesek oxidálni, köztük a sokat vizsgált peroxinitrit is, valamint oxidációjuk SH specifikus oxidálószerrel szelektíven tanulmányozható.

Jelen disszertáció a szívizomsejtek myofibrilláris fehérjéinek szulfhidril csoportjain bekövetkező oxidációval és ennek a kontraktilis funkcióra kifejtett következményeivel foglalkozik. A disszertáció bemutatja egy SH specifikus oxidálószerrel (2,2'-ditiodipiridin, DTDP) és peroxinitrittel humán mintákon végzett vizsgálataink eredményeit. *In vitro* kísérleteink során mindig egymás mellett tanulmányoztuk az oxidáció hatására kialakuló mechanikai változásokat és ezek biokémiai hátterét. Különös figyelmet szenteltünk az SH oxidáció által kiváltott változások revertálhatóságának vizsgálatára, melynek szerepe lehet a káros elváltozások kialakulásának megelőzésében és kezelésében egyaránt. Vizsgáltuk továbbá, hogy a peroxinitrit

által kiváltott kontraktilis depresszióhoz milyen mértékben és körülmények között járul hozzá a SH oxidáció. Munkánkban bemutatjuk a myofibrilláris fehérjék SH oxidációjának és az aktin-miozin ciklus károsodott Ca^{2+} -regulációjának összefüggéseit humán szívizomban.

1.1. Szabadgyökök és a hatásukra kialakuló oxidatív és nitrozatív stressz

A sejtekben az intermedier anyagcsere során, illetve enzimatis és nem enzimatis úton tökéletlenül redukált oxigénszármazékok keletkeznek. Ezek rendkívül reaktívak és egy vagy több párosítatlan spinű elektront tartalmaznak, vagyis szabadgyökök. Az oxigént tartalmazó szabadgyököket reaktív oxigén szabadgyököknek (ROS-nek), míg a nitrogént tartalmazókat reaktív nitrogén szabadgyököknek (RNS-nek) nevezi a szakirodalom. A ROS csoportjába tartozó biológiai jelentőséggel bíró, elsődleges szabadgyök a szuperoxid-anion (O_2^-), mely oxigén (O_2) molekulából egyetlen elektron felvételével keletkezik. További elektron befogása eredményezi a hidrogén-peroxid (H_2O_2) kialakulását, mely definíció szerint nem tekinthető szabadgyöknek, viszont magas reaktivitása és hasonló biológiai viselkedése miatt sokan a szabadgyökök között említik. Újabb elektron felvételével hidroxilgyök ($\cdot\text{OH}$) keletkezik. A szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) egy igen rövid élettartamú és reaktivitású formája a molekuláris oxigénnek, melynél a külső elektron egy magasabb energiaszintű pályán található (Dean és mtsai, 1997; Giordano, 2005). RNS közé tartozik a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) által termelt nitrogén-monoxid (NO), amelynek számos fiziológias funkciója is jól ismert (pl.: neurotransmisszió, vérnyomás-szabályozás, vazodilatáció)(Valko és mtsai, 2007; Bergendi és mtsai, 1999). A NO-ból további reaktív molekulák képződhetnek, így a nitrozonium-kation (NO^+), a nitroxil-anion (NO^-) és a peroxinitrit (ONOO^-).(Droge, 2002; Valko és mtsai, 2007)

A szabadgyökök kialakulását leíró korábban egyeduralkodó „kémiai baleset” elmélet ma már túlhaladott, és ismert, hogy szabályozott körülmények között is keletkeznek. Az emlős sejtekben az élettani folyamatok során ROS termelődése elsősorban a mitokondriumokban zajló oxidatív foszforilációhoz, és a normális celluláris aerob metabolizmushoz kötött. Szabadgyököket termelnek a mitokondriális elektron transzportlánc enzimeit: a xantin-oxidáz (XO) (Hare és Stamler, 2005b), a nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz (Griendling és mtsai, 2000), a NOS (Landmesser és mtsai, 2003; Kuzkaya és mtsai, 2003), a citokróm p450 (Ide és

mtsai, 1999), továbbá ciklooxygenáz izoenzimek, a lipoxigenázok és a monooxygenázok. A ROS és származékaik károsíthatják a sejtek működését, ezért a sejtek a szabadgyökök szintjét szabályozó többszörös antioxidáns védelemmel rendelkeznek. Ilyen antioxidáns védelmet biztosít a sejtekben a szuperoxid-diszmutáz (SOD) rendszer, a kataláz, a glutation-peroxidáz rendszer, a tioredoxin és a ROS-t termelő folyamatok nagyfokú kompartmentalizációja (Kunsch és Medford, 1999). Nem enzimatis úton történő szabadgyök eliminációban az antioxidáns hatású anyagok játszanak jelentős szerepet. Kiemelkedő fontosságú ezek közül a C-vitamin, E-vitamin, A-vitamin, ubikinon, fehérjék szulfhidril csoportjai, valamint a glutation.

A ROS sejtek működésében betöltött biológiai szerepe tehát többoldalú. A szabadgyökök lényeges szerepet játszanak számos fiziológiai folyamatban, de ugyanakkor káros hatásúak lehetnek, ha nagy mennyiségben termelődnek. Élettani funkcióik megfigyelhetők több jelátviteli folyamatban, fagocitáló sejtekben bizonyították meghatározó részvételüket. Befolyásolják specifikus transzkripció faktorok aktivitását, mint pl. a nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) (Hirotani és *mtsai*, 2002), HIF-1 α (hipoxia indukált faktor-1 α) (Ryan és *mtsai*, 1998; Carmeliet és *mtsai*, 1998). Ily módon a génexpressziós mintázat modulálásán keresztül befolyásolják az angiogenezist, metabolikus folyamatokat, apoptózist, vasculáris aktivitást, remodellinget és a gyulladást (Iyer és *mtsai*, 1998).

Az élő szervezetben folyamatosan termelődő ROS-et a sejtek védekező mechanizmusait képező antioxidáns molekulák, enzimek folyamatosan inaktiválják, eliminálják. Kóros körülmények között ezen antioxidáns rendszerek elégtelenül működhetnek, vagy a ROS fokozott mértékben termelődhetnek, mely meghaladhatja az antioxidáns rendszerek kapacitását. Ezáltal a különböző makromolekulák oxidációja jön létre, ami a sejtek funkcionális és morfológiai károsodásához vezet. Ezt a jelenséget oxidatív stressznek nevezzük. Oxidatív stressz során nukleinsavak, proteinek, szénhidrátok, lipid molekulák károsodnak. A DNS oxidációja a lánc törését, purin nukleotidok módosulását, DNS és fehérjék keresztkötését eredményezi, mely a génexpresszióra messzemenő hatással van (Rahman, 2003). Lipidek oxidációja során megváltozik a membránok permeabilitása, zavart szenved az ion homeosztázis, míg lipid peroxidáció során rendkívül citotoxikus termékek, mint pl. malondialdehid, keletkeznek. A fehérjék oxidációja aminosav oldalláncaik módosulását, keresztkötött protein aggregátumok kialakulását, valamint a polipeptid lánc hasítását eredményezi. Az aminosav oldallánccok módosulásai közül legfontosabbak a cisztein oldallánccok SH oxidációja, a lizin, arginin és prolin

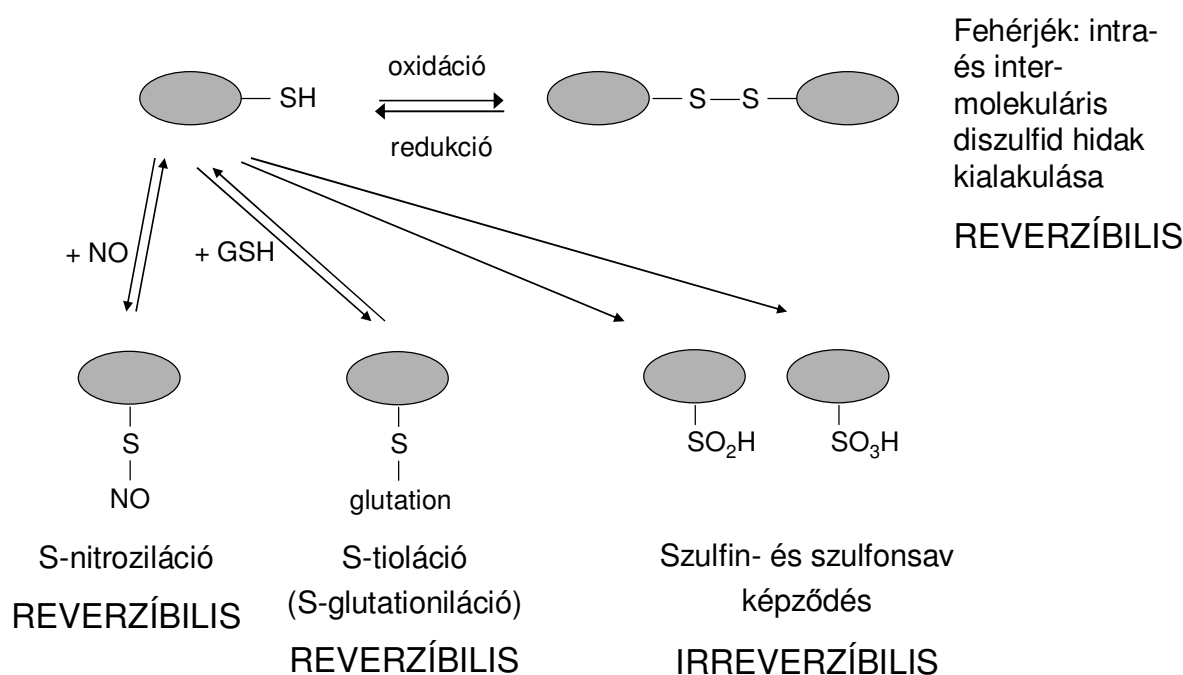
aminosavak karbonilációja és a tirozin oldalancok nitrálódása (Eaton és *mtsai*, 2002a). Kimutatták a szabadgyökök hatására kialakuló protein denaturációt is, mely a fehérjéket proteolitikus rendszerekkel, proteázokkal szemben érzékenyebbé teszi (Davies és *mtsai*, 1987). Így a véglegesen károsodott fehérjéket az intracelluláris proteolitikus rendszerek gyorsan és szelektíven degradálják (Grune és *mtsai*, 2003). A mérsékelt oxidatív hatást követő degradációnak a proteinek turnoverében is fontos szerepe lehet. Amennyiben a károsodott proteinek lebontása mégsem következik be, úgy akumulálódnak a sejtekben (Giasson és *mtsai*, 2002). A makromolekulák oxidatív stressz hatására kialakuló fentebb leírt változásai mutagenezist, karcinogenezist, metabolikus folyamatok megváltozását, fehérje inaktivációt eredményezhetnek.

Jelenleg az oxidatív stressznek számos betegség és kórfolyamat pathogenezisében ismert központi szerepe. Ilyenek a ischaemiás-reperfúziós károsodás, a szívelégtelenség, az atherosclerosis, daganatos megbetegedések, az Alzheimer-kór, az öregedés folyamata (Droge, 2002; Valko és *mtsai*, 2007), az apoptózis (von Harsdorf és *mtsai*, 1999; Pimentel és *mtsai*, 2001; Adeghate, 2004) és a szívizom hypertrophia kifejlődése (Pimentel és *mtsai*, 2001; Kwon és *mtsai*, 2003; Li és *mtsai*, 2002; Date és *mtsai*, 2002; Higuchi és *mtsai*, 2002). Kiemeljük ezen folyamatok közül a ischaemiás-reperfúziós károsodást és a szívelégtelenséget, melyek pathomechanizmusával és az oxidatív károsodás hozzájárulásával részletesebben foglalkozunk.

1.2. Szulfhidril csoportok és jelentőségük

Az intracelluláris fehérjék cisztein oldalláncain jelen lévő szulfhidril (tiol, SH) csoportoknak sokrétű szerepük van az eukarióta sejtekben. Proteinek SH csoportjai központi szerepet töltenek be katalitikus folyamatokban, elektron transzferben, fehérjék struktúrájának kialakításában. Számos enzim aktív helyén található cisztein, mint pl. proteázok, calpain, papain, glutation reduktáz, tioredoxin, glutaredoxin stb. estében. Fémion kötő képességük révén feladatuk ismert DNS-kötő fehérjék működésében. Ugyanakkor sok SH csoportnak nincs metabolikus funkciója, viszont részt vesznek az antioxidáns védelemben és az intracelluláris redox állapot fenntartásában.

Fehérjék SH csoportjai kifejezetten érzékenyek bizonyultak mind oxigén, mind nitrogén tartalmú szabadgyökökkel szemben. Többféle oxidatív ágens így pl. szuperoxid, hidrogén-peroxid és peroxinitrit (Viner és *mtsai*, 1999) SH csoportokkal szembeni reakcióképességét bizonyították protein modell rendszerekben, sejtekben, *in vitro* és *in vivo* kísérletekben. Fehérjék SH csoportjai oxidatív hatásra többféleképpen alakulhatnak át. Proteinek (P) SH csoportjai egymással reagálva intra- és intermolekuláris diszulfid hidak (PSSP) kialakulását eredményezi. Ezen reakció nagyon fontos tulajdonsága, hogy reverzibilis, akárcsak a vegyes diszulfidok kialakulása, az S-tioláció. Ez utóbbi során kis molekulatömegű tiolok (cisztein, homocisztein, glutation stb.) kapcsolódnak a fehérjék SH csoportjaihoz. Jelentőségénél fogva kiemelhető ezek közül a glutation kapcsolódása, az S-glutationiláció (PSSG). Reverzibilis a NO és a fehérje SH csoportja közötti reakció következtében megvalósuló S-nitroziláció (PSNO) is. Továbbá lehetséges a SH csoportok irreverzibilis oxidációja is szulfinsavvá (PSO_2H) vagy szulfonsavvá (PSO_3H) (Giustarini és *mtsai*, 2004)(1. ábra).



1. ábra. Fehérjék szulfhidril csoportjainak lehetséges oxidatív módosulásai

Intracelluláris proteinek különböző oxidatív hatásokra reverzibilis és irreverzibilis módon alakulhatnak át. Fiziológiai és patológiás szereppel egyaránt bírhat a szulfhidril csoportok reverzibilis S-nitrozilációja, S-tiolációja és átalakulásuk fehérjéken belüli vagy fehérjék közötti diszulfid hidakká. Irreverzibilis módosulásuk szulfín- és szulfonsavvá a fehérjék funkciójának végleges elvesztését eredményezheti.

A reverzibilis úton kialakult diszulfidok redukciója redukáló tulajdonságú molekulákkal és enzimatis úton is megvalósulhat. Fehérjéken belüli és fehérjék között kialakuló diszulfid hidak redukcióját a sejtekben a tioredoxin rendszer biztosítja (Giustarini és mtsai, 2004). A GSH mind fehérjékhez való kötődését, mind a GSH disszociációját a glutaredoxin katalizálja.

Intracelluláris fehérjék és enzimek SH csoportjain történő oxidatív modifikáció következményeit különböző szintű kísérletekben tanulmányozták. Jelenlegi tudásunk szerint a cisztein oldalláncok oxidatív poszttranszlációs módosításának élettani és kórélettani szerepe

egyaránt van. Fehérjék redox regulációjának, vagyis működésük redox reakción keresztül megvalósuló módosulásának, egyik eszköze a diszulfid képződés, beleértve vegyes diszulfidok kialakulását is. Az SH oxidációnak a sejtek metabolikus szabályozásában betöltött feladatát illetően sok adattal rendelkezünk, de sok ezzel kapcsolatos kérdés ugyanakkor még megválaszolatlan.

A cisztein oldalláncok oxidációjának hatását meghatározza a kérdéses oldallánc molekulán belüli elhelyezkedése. Amennyiben az oxidálódó cisztein a katalitikus centrumban vagy a molekula térszerkezetének kialakulása szempontjából kritikus helyen található, a módosulása befolyásolni fogja a molekula működését. Így jónéhány fehérje funkciója, melyek kritikus helyen tartalmaznak ciszteint, regulálható redox reakciókon keresztül. Mindeztidáig több enzim esetében mutatták ki kritikus cisztein oldalláncának oxidációján keresztül megvalósuló redox regulációját. Ezek között találunk transzkripcióban, translációban, degradációban, metabolikus folyamatokban részt vevő enzimeket egyaránt. Ilyen enzimek a cAMP-dependens protein-kináz, tirozin-hidroxiláz, α -ketoglutarát-dehidrogenáz, gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), protein-kináz C, kreatin-kináz stb. (Klatt és Lamas, 2000; Borges és mtsai, 2002; Eaton és mtsai, 2002b; Nulton-Persson és mtsai, 2003; Barrett és mtsai, 1999; Mohr és mtsai, 1999; Ward és mtsai, 2000; Reddy és mtsai, 2000; Humphries és mtsai, 2002). A katalitikus centrumban SH csoportot tartalmazó GAPDH esetében a kulcsfontosságú helyen levő cisztein oxidációja az enzim inaktivációját jelenti. A kreatin-kináz esetében a katalitikus folyamat nem ciszteinhez kötött, de az enzim olyan helyen tartalmaz ciszteint, mely a szubsztrát megkötéséért felelős. Így ezen cisztein oxidatív módosítása szintén az enzim inaktivációját eredményezi (Miller és mtsai, 1990). Kimutatták humán sejtvonalakon az S-glutationiláció G-aktin polimerizációjában betöltött regulatorikus szerepét. Ezekkel szemben más fehérjék esetében mint pl. a glikogén-foszforiláz a SH oxidáció nem okozott változást az enzimaktivásban.

A sejtek anyagcseréjének regulációban fontos szerepet gyanítanak, már csak az intracelluláris magasabb szintje miatt is, a glutationnak. Az elmúlt években egyre több szerző vont párhuzamot a fehérjék működésének foszforiláció és S-glutationiláció útján történő szabályozása között. A kétféle szabályozás közötti hasonlóságot képezi, hogy mindkettő a fehérjék reverzibilis, kovalens kötéssel történő módosítását jelenti. A foszforiláció szerin, treonin és tirozin oldalláncokon történhet, míg az S-glutationiláció kizárólag cisztein aminosavakon. A fő különbség a két szabályozási folyamat között, hogy míg a foszforiláció enzim által katalizált, és

így a cél struktúra felismerése által biztosítja a reakció specificitását, addig az S-glutationiláció történhet katalízis nélkül (nem enzimatis úton) is.

Szulfhidril csoportoknak továbbá szerepet tulajdonítanak a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában is. Az optimális redox környezet fenntartása egyrészt a bioszintetikus folyamatokhoz szükséges redukáló ekvivalensek megfelelő termelődéséhez, másrészt a makromolekulák fiziológiás funkciójához szükséges környezet biztosításához is elengedhetetlen. Fiziológiás körülmények között az intracelluláris környezet erősen redukáló, és a korábban leírt reverzibilis folyamatok a szulfhidril képződés irányába vannak eltolva. Nagyon sok szerző szerint a fehérjék SH csoportjai fiziológiás körülmények között közel 100%-ban redukált állapotban vannak. Ugyanakkor más kutatócsoportok megfigyelték kontroll körülmények között S-glutationilált fehérjék jelenlétét is (Fratelli és *mtsai*, 2002; Lind és *mtsai*, 2002; Pastore és *mtsai*, 2003), mely megerősíti az S-glutationiláció szignál transzdukcióban és redox regulációban betöltött szerepét. Az oxidatív hatásokra igen érzékeny SH csoportok módosulása oxidatív stressz során valószínűleg az elsők között következik be. Ezáltal a sejtek oxidatív ágensekkel szembeni védelmében fontos szerepet töltenek be. Mivel a SH oxidáció nagyon sok esetben reverzibilis, ezen csoportok mintegy pufferek is a sejteket ért oxidatív hatásokat. Ezzel a SH csoportok reverzibilis oxidációja egyben megvédi a fehérjét az irreverzibilis módosulástól is. Körültekintően megtervezett kísérletekben a módosított cisztein oldalláncokat akár az oxidatív stressz biomarkereként is értékelhetjük.

Redox reakciók tanulmányozása során nyert eredmények értelmezésében a reakciók lejátékozódását meghatározó tényezők figyelembe vétele segítségünkre lehet. Az elektronátmenettel járó redox reakciók végbemenetelét többek között a reakcióban részt vevő oxidáló- és redukálószeres redox potenciálja határozza meg. Befolyásolja a reakciók lejátékozódását a résztvevő partnerek koncentrációja, a pH és a hőmérséklet is. Makromolekulák esetében nem elhanyagolható tényező ezek aktuális konformációja és a reakcióba lépő oldalláncok molekulán belüli helyzete. Ezen alapelvek és törvényszerűségek a biológiai rendszerekben is érvényesülnek, viszont ezen rendszerek rendkívüli komplexitása a redox reakciók lejátékozódását összetett módon befolyásolja. Az itt említett tényezők figyelembe vétele fontos lehet annak megértéséhez, hogy a sejtekben végbemenő redox folyamatokat hogyan tudjuk befolyásolni, hogyan revertálhatjuk a reverzibilis redox reakciókat, és hogy az alapkutatásban és a klinikumban miért létezik ennyi ellentmondásos adat az antioxidánsok alkalmazásával kapcsolatban.

Egy nagyon fontos kérdés, hogy a proteinek SH oxidációja specifikusan történik-e vagy bármilyen oxidatív hatás a környezetben lévő SH csoportokat válogatás nélkül, gyakorlatilag véletlenszerűen módosítja. Jelenleg kevés adatunk van arra vonatkozóan, hogy redox reguláció során nem enzimek által katalizált SH oxidáció és S-glutationiláció esetében mi határozza meg, hogy az adott intracelluláris környezetben melyik cisztein oxidálódik. Hasonló módon kevés ismerettel rendelkezünk arról, hogy oxidatív és nitrozatív stressz során a fehérjék véletlenszerűen oxidálódnak-e, vagy SH oxidációval szemben különböző érzékenységet mutatnak. Állatkísérletes adatok szerint a szívizomzat egyes fehérjéinek oxidációja az oxidatív inzultus mértékétől függően mutatható ki, mely arra enged következtetni, hogy a fehérjék SH oxidációja nem egyforma mértékben következik be (Eaton és mtsai, 2002a). Feltételezhető továbbá, hogy proteinek SH oxidációjának kimenetelét meghatározza, hogy a reagáló cisztein környezetében van-e aktuálisan valamilyen kis mólsúlyú tiol. Nem rendelkezünk adatokkal az itt említett kérdések humán vonatkozásait illetően.

Az SH oxidációt több vonatkozásban összefüggésbe hozták betegségek kialakulásával. S-glutationilált fehérjék szintjének szignifikáns emelkedését tapasztalták hyperlipidaemiában, krónikus veseelégtelenségben, diabetes mellitusban (Giustarini és mtsai, 2003; Niwa és mtsai, 2000; Al Abed és mtsai, 2001; Takayama és mtsai, 2001). Nem tudjuk ugyanakkor, hogy a fokozott S-glutationiláció az említett betegségek kialakulásához hozzájárul vagy adaptív jellegű. Feltételezik, hogy az apoptózis folyamatának elindításában is szerepet játszik a tiol oxidáció (Hampton és mtsai, 1998). Myocardiális fehérjék ischaemiás-reperfúziós károsodás alatti SH oxidációjáról is beszámoltak (Eaton és mtsai, 2002a).

A szakirodalomban kutatva kevés adatot találtunk a myofibrilláris fehérjéket érő SH oxidáció és a kontraktilitás összefüggésének vizsgálatát illetően, és nem rendelkezünk ismeretekkel ennek humán vonatkozásaival kapcsolatban. SH oxidációnak izomösszehúzódásra gyakorolt hatását egy ausztrál munkacsoport tanulmányozta patkány nyúzott harántcsíkolt izomrostokon (Lamb és Posterino, 2003; Posterino és Lamb, 1996). H_2O_2 és egy SH specifikus oxidálószer a ditiodipiridin (DTDP) hatását vizsgálták. Mindkét oxidálószer befolyásolta az izomrostok Ca^{2+} -érzékenységét, és ezt különböző SH specifikus redukálószerekkel a koncentrációtól és inkubálási időtartamoktól függően sikerült revertálni. Megfigyelték ezen preparátumokban a DTDP kontrakciós erőt csökkentő hatását, habár párhuzamos biokémiai mérésekkel nem támasztották alá az SH változások kialakulását. Kísérleteik eredményei arra

utalnak, hogy az izomműködésre a fehérjék SH csoportjainak redox státusza hatást gyakorol. Laboratóriumunkban folytatott korábbi vizsgálatok mellett ezen kutatócsoport kísérletei biztosították a kiindulási pontot munkánkhoz.

1.3. Peroxinitrit

A peroxinitrit (ONOO^-) egy erőteljes oxidálószer, mely szuperoxid-anionból és NO-ból irreverzibilis úton keletkezik. A peroxinitrit alkalikus közegben stabil anionként viselkedik, azonban féléletideje jelentősen lerövidül semleges pH-n. A peroxinitrit a fehérjékkel elsősorban tirozin oldalláncokon reagál, nitrotirozin képződését eredményezve (Reiter és *mtsai*, 2000). Nitrotirozin keletkezése elméletileg nem csak peroxinitrit hatására történhet, de *in vivo* ez a legvalószínűbb módja. Nitrotirozin képződés egyéb lehetséges forrásai, mint a dinitrogén-oxid és a nitrit *in vivo* koncentrációja túlságosan alacsony, hogy szignifikáns nitrálódást eredményezzenek. Nitrotirozin képződés egyszerűen kimutatható biopsziákból és *in vitro* kísérletekben is, ezért a nitrotirozin tartalmú fehérjék jelenlétét a peroxinitrit hatás markerének tekintik. A peroxinitrit kisebb affinitással, de proteinek SH csoportjaival is reakcióba léphet, oxidálva ezeket. A peroxinitrit által indukált nitrotirozin képződést kiterjedten vizsgálták, és ennek eredményeképpen jelentőségéről egyre több adattal rendelkezünk. Ezzel szemben korlátozott ismereteink vannak a peroxinitrit SH csoportokon kifejtett hatásáról. Akárcsak a NO-nak vagy egyéb szabadgyököknek a peroxinitritnek is fiziológias és káros hatásokat is tulajdonítanak (Vinten-Johansen, 2000).

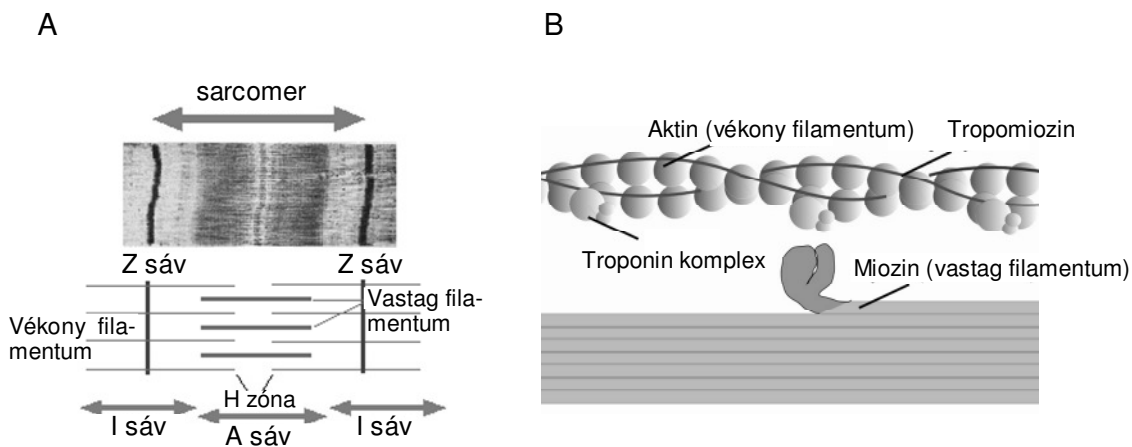
A neutrophil sejtek és a macrophagok egyaránt termelnek peroxinitritet, melynek a baktériumokra adott válaszbán van szerepe. Kis koncentrációban leírták a peroxinitrit cardioprotektív hatását is (Nossuli és *mtsai*, 1997). Ugyanakkor kifejezett nitrotirozin képződést detektáltak sepsisben és myocarditisben szenvedő betegek szívizom biopsziáiban (Beckman és Koppenol, 1996). Humán ereken talált atherosclerotikus laesiókban szintén extenzív nitrotirozin képződést mutattak ki (Beckmann és *mtsai*, 1994). Hasonlóan fokozott nitrotirozin képződést találtak sepsisben, tüdőgyulladásban, felnőttkori légzési distressz szindrómában szenvedő betegek tüdő mintáiban (Haddad és *mtsai*, 1994; Kooy és *mtsai*, 1995), míg kontroll tüdő mintákban minimális nitrálódást tapasztaltak. Több tanulmányban leírták a peroxinitrit kontraktilis

mechanikát károsító hatását, melyet összefüggésbe hoztak ischaemiás-reperfúziós károsodás, szívelégtelenség során kialakuló és proinflammatorikus citokinek által indukált (Ferdinandy és mtsai, 2000) myocardiális dysfunkcióval.

A peroxinitrit mediált nitrotirozin képződés az oxidálódó fehérjék irreverzibilis változásához vezet. Így a nitrotirozin képződés okozta károsodás kivédése a fehérjék újraképződésével vagy ezen elváltozások kialakulásának megelőzésével lehetséges. Ennek megfelelően terápiás beavatkozási lehetőség is csak ezen pontoknak megfelelően lehetséges. Ugyanakkor a peroxinitrit által kiváltott reverzibilis SH oxidáció magában rejti a lehetőséget a kialakult változások visszafordítására, anélkül hogy a sejteknek a proteineket újra kellene termelniük. Ezen lehetőség későbbiekben történő kihasználásához azonban tisztázni kell, hogy az SH oxidáció peroxinitrit hatására milyen körülmények között jön létre, milyen következményekkel jár, és hogyan revertálható.

1.4. A kontraktilis rendszer fehérjéi

A kontraktilis rendszer vékony és vastag filamentumokból, a vékony filamentumok regulatórikus rendszeréből és citoszkeletális komponensekből épül fel (2. ábra). Működési egysége a Z-vonaltól Z-vonalig terjedő sarcomer. A Z-vonalban helyezkednek el a horgonyzó fehérjék, ahol a citoszkeletális filamentumok kapcsolódnak az aktin filamentumokhoz. A vastag filamentumok hosszú α -helikális szerkezetű farokkal és globuláris struktúrájú fejjel rendelkező miozinból épülnek fel. A miozin fejek alkotják a vékony és vastag filamentumok közötti kereszthidakat, melyek egyben az ATP hidrolízis helyei. Minden miozin fejhez két miozin könnyű lánc asszociálódik. A vékony filamentumokat a G-aktinból polimerizálódó kettős láncok alkotják. A feltekeredő aktin láncok között helyezkedik el egy hosszú flexibilis fehérje, a tropomiozin. A tropomiozinhoz az aktin fonalat felépítő minden hetedik G-aktinnak megfelelően egy troponin komplex kapcsolódik. A tropomiozin és a troponin molekulák képezik a kontraktilis rendszer regulatórikus egységét. A troponin komplexet a troponin C (cTnC), troponin T (cTnT) és troponin I (cTnI) fehérjék 1:1:1 arányban alkotják. A cTnT a tropomiozin kötő alegység, a cTnC a Ca^{2+} megkötéséért felelős, míg a cTnI a komplex inhibitorikus alegysége (Zot és Potter, 1987).



2. ábra A kontraktilis fehérje rendszer felépítése

A kontraktilis rendszer működési egysége, a sarcomer, a myofilamentumok helyzete alapján sávokra tagolható (A). Ezen sávok szabályos rendszerben történő elhelyezkedése eredményezi a szívizomsejtek harántcsíkolatát. Az ábra B része a vékony és vastag filamentumokat felépítő fehérjéket ábrázolja.

A szívizom kontrakciói és relaxációi az intracelluláris fehérjékhez tartósan nem asszociált, úgynevezett „szabad” Ca^{2+} koncentráció változásainak függvénye, melyet a rövidülésre képes kontraktilis fehérje rendszer alakít át erővé (Solaro és mtsai, 1971). A kontraktilis rendszer erőgenerálásának és rövidülésének lényege a vastag és vékony filamentumok egymás mellett történő elcsúszása, melyet ATP jelenlétében a Ca^{2+} koncentráció növekedése indít el. A szívizom myofibrilláris Ca^{2+} receptorának a vékony filamentum troponin C molekulája tekinthető, mely jelentős Ca^{2+} affinitással bír (Palmer és Kentish, 1994). A systole alatt felszabaduló Ca^{2+} az extracelluláris térből és a sarcoplasmaticus reticulum (SR) raktáraiból szabadul fel. Ca^{2+} kötődése a troponin C-hez ennek jellegzetes konformáció változását eredményezi, melynek hatására a cTnI

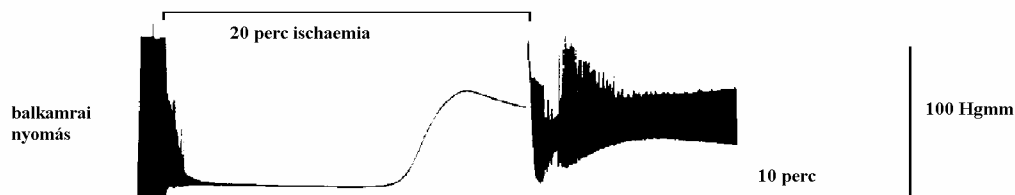
aktinnal alkotott kapcsolata felszakad, és a tropomiozin következményes elcsúszásával az aktin miozin-kötő helyei felszabadulnak. Ez végeredményben lehetővé teszi az aktin-miozin kereszthidak kialakulását és az erőgenerálást. A relaxáció során a Ca^{2+} a troponin C-ről disszociál, visszaáll a troponin C eredeti konformációja, és ismét blokkolódik az aktin felszínén a keresztkötések kialakításához szükséges felület.

1.5. Ischaemiás-reperfúziós károsodás

A szívizomzatot érő átmeneti ideig tartó ischaemiával és azt követő reperfúzióval számos klinikailag jól definiált helyzetben számolhatunk. Így pl.: instabil angina esetén, akut myocardiális infarktus spontán, thrombolysis, vagy coronaria intervenció miatt bekövetkező korai reperfúziója kapcsán, cardioplegiával együtt járó nyitott szívműtétek és szívtranszplantációk során, sőt ischaemiás szívbetegek terheléses kardiológiai vizsgálata alatt is (Kloner és mtsai, 1998). A ischaemiás-reperfúziós szívizom károsodás (kábult myocardium, “stunning”) során kialakuló reverzibilis változások a pumpafunkció csökkenését eredményezik (Piper és mtsai, 1998).

Ma már tudjuk, hogy az ischaemiás periódus alatti sejtkárosító folyamatok (ischaemiás károsodás) lényegesen eltérnek a reperfúzió alatt bekövetkező celluláris jelenségektől (reperfúziós károsodás). A celluláris változások rendkívül sokrétűek (Ca^{2+} túlsúly, szabadgyökök okozta károsodás, proteolitikus folyamatok aktiválódása, energiahány, membránkárosodás, hiperkontraktilitás, stb.), és nem teljes mértékben feltártak. Az ischaemiás-reperfúziós funkciózavarok hátterének részleteiben történő megértése ezért még várat magára.

Ismert, hogy stunningban az ischaemia kialakulása után a kontraktilis erő gyakorlatilag azonnal megszűnik (3. ábra), bár azt az intracelluláris ATP-koncentráció vagy a Ca^{2+} tranziens változásai nem indokolják. A kontraktilis erő ischaemiás megszűnésének metabolikus elmélete értelmében a pumpafunkció hirtelen romlása azért következik be, mert a myofibrilláris rendszer válaszadó-készsége Ca^{2+} -ra nézve a megváltozott metabolikus viszonyok miatt jelentősen romlik, vagyis a Ca^{2+} -érzékenység csökken (Eisner és mtsai, 1989).



3. ábra. Langendorff-szerint perfundált izolált patkány szív balkamrai nyomásváltozásai egy 20 percig tartó globális ischaemiás periódus előtt, alatt és után.

Az ischaemia kezdetét követően a balkamrai nyomás gyorsan megszűnt, 10-15 perc elmúltával ischaemiás kontraktúra alakult ki. A reperfúziót halmozott arrhythmia követék, majd a kamranyomás egy, a pre-ischaemiához viszonyított csökkent funkcionalitású szinten stabilizálódott (kábult myocardium, stunning). (Az illusztrációként használt ábra témavezetőm mérési anyagából származik.)

Ischaemia alatt az anaerob energiatermelő folyamatok következtében az O_2 -hiányos szívizomzat jelentősen acidotikussá válik, az anorganikus foszfát pedig a kreatinfoszfát és az ATP hidrolízise következtében felszaporodik (Allen és Orchard, 1987; Elliott és mtsai, 1992). Az ischaemiás myocardium rohamos funkció csökkenésének tehát jelentős mértékben metabolikus okai vannak, melyek részben intracelluláris acidózishoz részben foszfát akkumulációhoz köthetők (Kentish, 1986; Kentish, 1991; Palmer és Kentish, 1994).

Az ischaemiát követő reperfúzió első perceiben a szívizomzat ismét telítetté válik oxigénnel, és az extracelluláris térből az ischaemia alatt felszaporodott metabolitok az újraindult coronaria keringéssel gyorsan távoznak (Piper és mtsai, 1998). Az izomsejtek intracelluláris homeosztázisának regenerációja némileg hosszabb időt igényel, sőt a hirtelen megváltozott környezetben a sarcolemma transzportfehérjéi kezdetben kóros ionmozgásokat is eredményeznek (Piper és mtsai, 1998; Kloner és mtsai, 1998). Számos egymástól független laboratóriumban *in vitro* és *in vivo* állatkísérletekben bizonyították, hogy a reperfúzió alatt jelentős oxigén-szabadgyök képződéssel kell számolni (Kloner és mtsai, 1998). A képződő szabadgyökök mennyiségét arányosnak találták az ischaemia súlyosságával (Bolli és mtsai, 1989). A pontos pathomechanizmus, illetve a szabadgyökök hozzájárulása a kontraktilis depresszió kialakulásához egyelőre még részleteiben nem tisztázott. Feltételezik, hogy a többszörösen

telítetlen zsírsavak peroxidációja kifejezetten membránkárosító hatású, és befolyásolja a membránok permeabilitását. Kimutatták, hogy ezen peroxidált lipidek megváltoztatják a Na^+ - Ca^{2+} cserélő működését, valamint gátolják a Na^+ - K^+ -ATPáz aktivitását. A szabadgyökök ez utóbbi hatásának szerepe lehet a reperfúzió során megfigyelhető Ca^{2+} -túltöltöttség kialakulásában is. Feltételezhető továbbá, hogy a ROS a kontraktilis fehérjék szelektív károsítása útján hozzájárulhatnak a myofilamentáris rendszer Ca^{2+} -érzékenységeinek csökkenéséhez. Ezen mechanizmusban egyes szulfhidril csoportok oxidációjának szerepét is gyanítják (Suzuki és *mtsai*, 1991). Kimutatták, hogy szuperoxid-anion hatására a kontraktilis rendszerben kialakuló Ca^{2+} -aktivált maximális erő dózis-függő módon csökkent. Ugyancsak állatkísérletekben mutatták ki először, hogy antioxidánsok preventív adása a stunning során kialakuló dysfunkciót részben kivédheti, mellyel megerősítették a szabadgyökök szignifikáns etiológiai szerepét az ischaemiát követő kontraktilis depresszió kialakulásában. Később hasonló eredményeket publikáltak humán, cardioplegiát és szívmotort használó szívűtékek kapcsán antioxidánsok alkalmazásával. Coronaria by-pass műtétek anyagait feldolgozó humán tanulmányok szintén az oxidatív stressz szerepét erősítették meg, mérve az artériás és vénás oldal között az oxidált glutation szint különbségét (Ferrari és *mtsai*, 1990).

A reperfúzió kezdetén a szívműtörtök intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációja átmenetileg jelentősen fokozott (Gao és *mtsai*, 1995), mely további sejtkárosító folyamatokat indukál (reperfúziós károsodás). Ugyanakkor a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció a korai reperfúzió alatt halmozott arrhythmiákat eredményezhet. Sokszorosan bizonyított tény, hogy a reperfúzió első 5-10 percét követően a myoplasmaticus Ca^{2+} -koncentráció normalizálódik, a Ca^{2+} tranziensek visszaállnak a pre-ischaemiás szintre. Ezzel összefüggésben a sejtek metabolizmusa is normalizálódik. Ennek ellenére rövid, akár reverzibilisnek tartott ischaemiás periódust követően is számolnunk kell egy, akár több óráig is elhúzódó, csökkent kamrafunkcióval. Igazolást nyert, hogy a csökkent funkcionalitás hátterében olyan folyamatok állnak, melyek végeredményben közvetlenül a myofibrilláris rendszert károsítják (Gao és *mtsai*, 1995; Marban és *mtsai*, 1989; Gao és *mtsai*, 1996).

Némileg meglepő, hogy a kiterjedt vizsgálatok ellenére sem világos még, hogy melyek a stunned myocardiumra jellemző mechanikai funkciózavar molekuláris okai. A bizonytalanság forrásai sokrétűek. Bár a csökkent kontraktilitás hátterében egy, a reperfúzió legelején (a Ca^{2+} -túlterhelt szakaszban) bekövetkező Ca^{2+} -függő proteolízis nagyon valószínű, nem rendelkezünk

abszolút érvényű bizonyítékokkal arra vonatkozólag, hogy más mechanizmusok (pl. oxigén-szabadgyökök által kiváltott károsodások) azt milyen mértékben egészítik ki. Számos megfigyelés utal arra, hogy a Ca^{2+} -függő proteolitikus folyamatok egy neutrális intracelluláris proteázhoz, a μ -calpain kötődnek (Matsumura és mtsai, 1996; Gao és mtsai, 1996; Gao és mtsai, 1997; Yoshida és mtsai, 1995). A Ca^{2+} -koncentráció növekedésére aktiválódó μ -calpain *in vitro* körülmények között számos regulatorikus és strukturális funkcióval bíró myofibrilláris fehérjét degradál (Di Lisa és mtsai, 1995; Goll és mtsai, 1991b). A szívizomzat ischaemiás-reperfúziós károsodása kapcsán a cTnI (Gao és mtsai, 1996), a dezmin és más citoszeletális fehérjék (pl. spektrin, α -aktinin) degradációja merült fel. Mindezek alapján a stunned myocardium kialakulásában számos strukturális és regulatorikus funkcióval bíró fehérje károsodása valószínűsíthető. A funkció romlásához nem szükséges nagymérvű protein degradáció. Ez a tény magyarázhatja azt, hogy a finom változásokat miért olyan nehéz értékelni. A myocardium kábult állapotának megszűnése (mely órától napokig tarthat) valószínűleg összefüggésbe hozható azokkal a sejtszinten érvényesülő reparatív folyamatokkal, melyek a myofilamentumok károsodott fehérjeit cserélik le újonnan szintetizált proteinekre.

Hogyan élheti túl a szívizom az ischaemiás-reperfúziós inzultust? Feltételezik, hogy a szívizomzat ischaemiás-reperfúziós károsodással szembeni védelme egy kétfázisú adaptáció, úgynevezett „rövid tartamú védelem” és „hosszú tartamú védelem” révén valósul meg (Kloner és mtsai, 1998). A rövid távú védekezés az O_2 kínálat és felhasználás közötti új egyensúly létrehozásával valósul meg, mégpedig a kontraktilitás csökkenésével és az energiatermelés anaerob útjának (glikolízis) fokozásával. A hosszú távú védelem celluláris folyamata még nem tekinthető tisztázottnak. Valószínűsíthető, hogy az ischaemia olyan sejten belüli szignálok indukálására képes, melyek védekező jellegű genetikai újraprogramozást eredményeznek. Amennyiben az ischaemia teljessé válik és időtartama nő, úgy a védekező mechanizmusok elégtelenné válnak, és végeredményben a szívizomsejtek elpusztulnak.

Patkány „dolgozó szív” preparátumokkal végzett kísérletekben igazolták myocardiális fehérjék ischaemiás és repurfúziós károsodás alatti SH oxidációját (Eaton és mtsai, 2002a). Ezen kísérletek során bizonyították myofilamentáris fehérjék közül az aktin SH oxidációját, valamint további membrán, citoszolikus, citoszeletális fehérjék és sejt anyagcserében részt vevő enzimek tiol oxidációját. Kulcsfontosságú ciszteinek oxidációja a fehérjék inaktiválásán keresztül hozzájárulhat a stunning során kialakuló pumpafunkció romlásához, de az SH oxidáció és a

cardiális dysfunkció közötti pontos kapcsolatot nem ismerjük. Kimutatták állatkísérletekben, hogy myocardiális ischaemia alatt csökken a redukált glutation és a proteinek SH csoportjainak száma, míg reperfúzió alatt az oxidált glutation akkumulálódik a sejtekben (Ceconi és *mtsai*, 2000). A SH csoportok redox állapotának változása összekapcsolható lehet ischaemia alatt a nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) mennyiségének csökkenésével is, hiszen a glutation redukált állapotban tartásához NADPH jelenléte szükséges, a glutation rendszer pedig befolyással lehet a fehérjék SH státuszára (Ceconi és *mtsai*, 2000).

Több tanulmányban a peroxinitritet az ischaemiás-reperfúziós károsodás során megfigyelt myocardiális dysfunkció kialakulásában jelentős tényezőnek tekintik. A szakirodalomban adatokkal rendelkezünk a peroxinitrit myofibrilláris mechanikát károsító hatásáról is. Szívizomsejt tenyészetekben megfigyelték a peroxinitrit kontraktilis funkciót csökkentő hatását (Ishida és *mtsai*, 1996). Korábban laboratóriumunkban folyó humán izolált szívizomsejteken végzett kísérletekben peroxinitrit hatására a Ca^{2+} -aktivált erő csökkenését tapasztalták (Borbely és *mtsai*, 2005). Ezen kísérletekben a Z-vonalakban elhelyezkedő fehérje, az α -actinin fokozott nitro tirozínációját figyelték meg, mely ezáltal hozzájárulhat a kontraktilis funkció romlásához fokozott peroxinitrit termeléssel járó állapotokban. Igazolták, hogy a peroxinitrit-indukált szerkezeti és funkcionális változások a myocardiális fehérjékben létrejövő nitro tirozín oldalláncok mennyiségével összefüggést mutat. Kimutatták, hogy ischaemiás-reperfúziós károsodásban megemelkedik a NO szintje, mely mivel a peroxinitrit keletkezésének egyik fő meghatározója, a peroxinitrit mennyiségét is megnövelheti.

1.6. Szívelégtelenség

A szívelégtelenség egy olyan komplex kórkép szerteágazó etiológiával, melyet romló szívizomfunkcióval és a szervezet számára elégtelen perctérfogattal jellemezhetünk. Kialakulásában a szívizom kóros átépülése, megváltozott hemodinamika, a neurohumorális rendszer aktivációja, citokinek fokozott termelődése és az endothel kóros működése mellett feltehetően az oxidatív és nitrozatív károsodásoknak is szerepe van. Ezen oxidatív változások hozzájárulása a pathomechanizmushoz valószínűleg a különböző etiológiák esetén eltérő.

Antraciklin és alkohol indukált cardiomyopathiákban a ROS patológiás szerepét megalapozottnak tekinthetjük. Ugyanakkor emberben a szívelégtelenség egyéb formáinak kialakulásában a szabadgyökök hozzájárulása nem teljesen tisztázott. Szívelégtelenség során fokozottnak találták a NADPH-oxidáz működését (Hilenski és mtsai, 2004) valamint a xantin-oxidáz aktivitását (Landmesser és mtsai, 2002) a cardiovasculáris rendszerben, és ezt összefüggésbe hozták a kialakuló vasoconstrictióval és csökkent kamrafunkcióval (Hare és Stamler, 2005a). Megfigyelték az iNOS (NOS2) fokozott aktivitását, nitrozatív stressz kialakulását és S-nitrozilált proteinek felhalmozódását is (Hare, 2003). Humán tanulmányok az oxidatív stressz szívelégtelenségben betöltött fontosságát bizonyították a felszabaduló oxidált glutation mennyiségének mérésével (Ferrari és mtsai, 1998; Delanty és mtsai, 1997; Mallat és mtsai, 1998; Weitz és mtsai, 1991). Ismeretlen azonban, hogy ezen elváltozások milyen mechanizmuson keresztül vezetnek a szívelégtelenség kialakulásához, és hogyan károsítják a kontraktilis rendszer fehérjeit. Nem tudjuk továbbá, hogy az oxidatív károsodás, különös tekintettel az SH oxidációra, milyen mértékben járul hozzá a szívelégtelenség kifejlődéséhez.

Irodalmi adatok alapján a congestív szívelégtelenség kialakulásában is szerepet játszhat a peroxinitrit megnövekedett termelődése. Állatkísérletes modellekben a myocardialis fehérjéken végbemenő nitrotyrozin oldalláncok képződése, valamint a szív pumpafunkciójának romlása között szoros összefüggést mutattak ki. Peroxinitrittel vagy citokinekkal kezelt patkány „dolgozó szív” preparátumokon csökkent a szívizomzat ATP felhasználása, mely alapján a peroxinitrit kontraktilis funkcióra kifejtett közvetlen hatása feltételezhető. A myofibrilláris kreatin-kináz 40 kDa molekulatömegű izoformájának nitrálódását igazolták doxorubicin-kezelt egérszívekben és peroxinitrit-kezelt patkányszív trabekulákban. Az eddigi kísérletes eredmények alapján megállapítható, hogy a peroxinitrit-indukált nitrotyrozin-oldallánc képződés szívelégtelenség során nemcsak egyetlen célfehérje károsodását jelenti sem állatokból származó, sem humán szívpreparátumokban.

1.7. Antioxidánsok alkalmazásával kapott eredmények

Oxidatív stresszel kapcsolatos kutatások alapján komoly lehetőségeket láttak egyes cardiovasculáris kórállapotok antioxidáns terápiájában. Sajnos az ehhez fűzött remények csak

részben igazolódtak. Az alapkutatásban és a klinikumban is az antioxidánsok preventív és terápiás jelleggel történő adásával kapcsolatos eredmények a sok biztató megfigyelés ellenére sem egységesek (Marczin és mtsai, 2003). Több kutató laboratórium vizsgálta ischaemiás-reperfúziós károsodás *in vivo* és *in vitro* modelljeiben különböző redukálószer hatását. A kapott szerteágazó eredmények okai lehetnek a különböző kísérleti állatfajok, az ischaemia időtartama, az ez alatt fennálló kollaterális vérkeringés, az antioxidáns alkalmazásának időpontja és módja, és a cardioprotekció vizsgálatának különböző végpontjai.

Nagy klinikai tanulmányokban szintén vizsgálták az antioxidánsok hatását. Az eddigi vizsgálatok között egyaránt találunk pozitív, negatív és semleges eredménnyel zárultakat. Humán klinikai tanulmányok vizsgálták az E-vitamin és egyéb antioxidánsok primer prevencióban történő adását. Több ezer beteg bevonásával végzett nagy tanulmányok mint a HOPE vagy a GISSI nem támasztották alá az E-vitamin jótékony hatását cardiovasculáris megbetegedésekben (Yusuf és mtsai, 2000; 1999). Ugyanakkor más tanulmányban az E-vitaminnak mérsékelt, de szignifikáns metabolikus és funkcionális hatásait tapasztalták alacsony rizikójú elektív coronaria bypass műtéten átesett betegekben (Yau és mtsai, 1994). Az E-vitamin adásával kapcsolatban egyes vizsgálatok alapján további problémát jelentett a plazma koncentráció megfelelő szintű emelkedésének elérése. Azt találták, hogy legalább 2 hét orális adása szükséges a myocardiális E-vitamin koncentráció kétszeres emelkedéséhez (Mickle és mtsai, 1991).

A C-vitamin adásával kapcsolatos eredmények sem egyöntetűek. Cardiopulmonális bypass műtéten átesett betegekben vizsgálták magas dózisú C-vitamin myocardiális hatásait (Dingchao és mtsai, 1994). A C-vitamin kezelt betegekben a posztoperatív cardiális indexet magasabbnak találták, rövidebb intenzív osztályos és kórházi ápolást igényeltek. Másik tanulmány billentyű műtétek kapcsán szintén megerősítette a magas dózisú C-vitamin kezelés előnyös biokémiai hatásait a plazma antioxidáns rendszereinek fenntartásában, azonban ez az előnyösebb antioxidáns státusz nem eredményezett a sebészi ischaemia által indukált metabolikus változásokban módosulást (Marczin és mtsai, 2003).

Az intracelluláris glutation (GSH) státusz javítására gyakran alkalmaznak N-acetil-L-ciszteint (NAC), a GSH szintézis egyik membrán permeábilis prekursorát. Ígéretes állatkísérleteket követően humán vizsgálatokban a NAC adásával pozitív eredményekről számoltak be a repfúziós károsodás csökkentésében, a szívinfarktusz és a szív-műtétek során kialakuló ischaemiás-reperfúziós károsodás kezelésében (Ferrari és mtsai, 1991; Arstall és mtsai,

1995; Koramaz és mtsai, 2006). Ezen kis betegszámú vizsgálatok eredményeit nagy klinikai tanulmányok azonban még nem támasztották alá.

A nagy klinikai tanulmányok a komoly erőfeszítések ellenére sem tisztázták még az antioxidánsok adásának cardiovasculáris betegségek terápiájában betöltött szerepét és módját. A leírt állat kísérletek és humán vizsgálatok tapasztalatai mutatják, hogy az oxidatív károsodás reverziójának és prevenciójának kérdését a szervezet szintjén rendkívül komplex tényezők együttese határozza meg. Ezen ellentmondásos eredmények azonban a szakemberek véleménye alapján sem kérdőjelezhetik meg az oxidatív stressz hozzájárulását a korábban említett betegségek pathomechanizmusához.

1.8. Célkitűzések

Tudományos kutatásainkban célul tűztük ki:

1. A szívizom fehérjék SH oxidációjának a kontraktilis funkcióra gyakorolt hatását megvizsgálni humán permeabilizált szívizomsejteken.
2. A fehérjék SH oxidációjának revertálhatóságát tanulmányozni különböző SH specifikus redukálószerekkel: ditiotreitollal, redukált glutationnal és N-acetil-L-ciszteinnel.
3. Azonosítani a mechanikai változásokért felelős SH-oxidált fehérjéket.
4. Peroxinitrit kontraktilitást-csökkentő hatásának SH-oxidatív komponensét meghatározni.

2. Módszerek

2.1. Etikai vonatkozások

Humán szívizom minták feldolgozása a World Medical Association által kiadott Helsinki Deklarációnak megfelelően történt. A kísérletek végrehajtását a Magyar Egészségügyi Minisztérium (No. 323- 8/2005-1018EKU) és a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága (No. DEOEC RKEB/IKEB 2553-2006) is jóváhagyta.

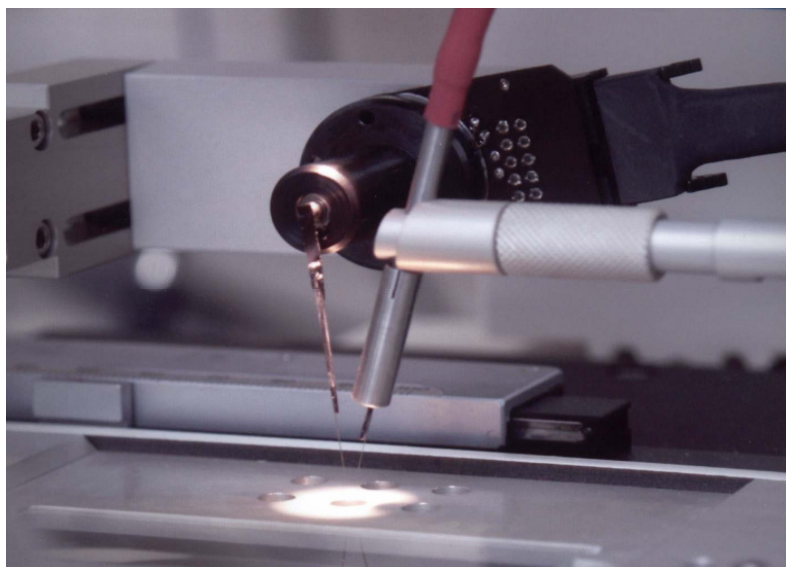
2.2. Szívizom biopsziák

A kísérletek során felhasznált humán bal kamrai szívizom minták 37 és 56 év közötti, férfi és női agyhalál állapotában levő szervdonorokból származtak. A halál oka baleset vagy subarachnoideális vérzés miatt bekövetkező cerebrális contusio és vérzés volt. A szív pulmonális és aorta billentyű-homograft készítése céljából lett eltávolítva. A graftok készítéséhez fel nem használt bal kamrai myocardiumot kapta meg laboratóriumunk. A donorok cardiális megbetegedésben nem szenvedtek, és egyedül rövid idejű dobutamin és furosemid kezelésben részesültek. A mintákat cardioplegiás oldatban (110 mM NaCl, 16 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 1,2 mM CaCl₂, 5 mM NaHCO₃; pH 7,4) szállították 4 °C-on, majd cseppfolyós nitrogénben fagyasztottuk, és felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

2.3. Mechanikai mérések izolált szívizomsejteken

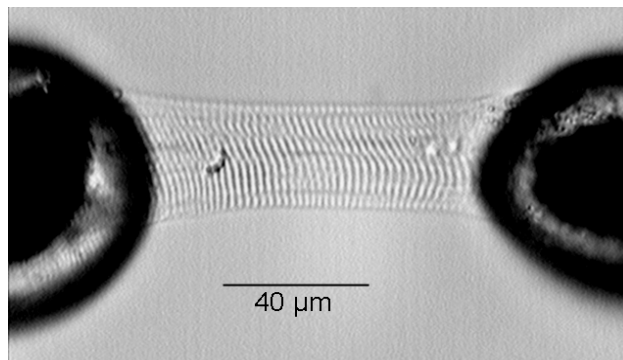
A szívizom mintákat -80 °C-ról kivéve relaxáló oldatban olvasztottuk fel (pH 7,0; koncentrációk mmol/l-ben: szabad Mg²⁺ 1, KCl 145, EGTA 2, ATP 4, imidazol 10). A mintákból a kontraktilis mérésekhez szükséges szívizom sejteket mechanikusan izoláltuk. A cardiomyocytákat tartalmazó szuszpenziót 5 percig 0,5%-os (relaxáló oldatban) triton-X-100-zal kezeltük. A triton kezelés eredményeként a sejtek membránrendszerei átjárhatóvá váltak, vagyis

„kémiaiilag nyúzott” szívizomsejteket nyertünk, és így lehetőség nyílt a myofibrilláris funkciók kontrollált intracelluláris körülmények között történő vizsgálatára. A preparátumokat ezt követően 3-szor mostuk és centrifugáltuk egy percre 1000 rpm-en a triton eltávolítása céljából. Az így módon nyert izolált, permeabilizált cardiomyocytákat szilikon ragasztóval egy érzékeny erőmérőhöz és egy piezoelektromos motorhoz rögzítettük (4., 5. ábra).



4. ábra. Az izolált szívizomsejtek kontraktilis tulajdonságainak mérésére szolgáló mérőrendszer központi része

Az izolált szívizomsejt egyik végét olyan rovartühöz ragasztottuk, mely egy érzékeny erőmérő toldaléka (jobb oldal), másik végét ugyanilyen módszerrel egy piezoelektromos motorhoz (bal oldal) rögzítettük. A tűk mozgását elektromotoros mikromanipulátorokkal illetve a motor számítógépes vezérlésével valósítottuk meg. A szívizomsejtet övező oldatok cseréjét a tárgyasztal oldalirányú mozgatása révén értük el, melynek során a preparátumot az egyik kis volumenű oldatcseppből (kb. 55 μ l) a másikba vittük át. A mérőkád folyamatos hűtésével biztosítottuk a mérésekhez szükséges hőmérsékletet.



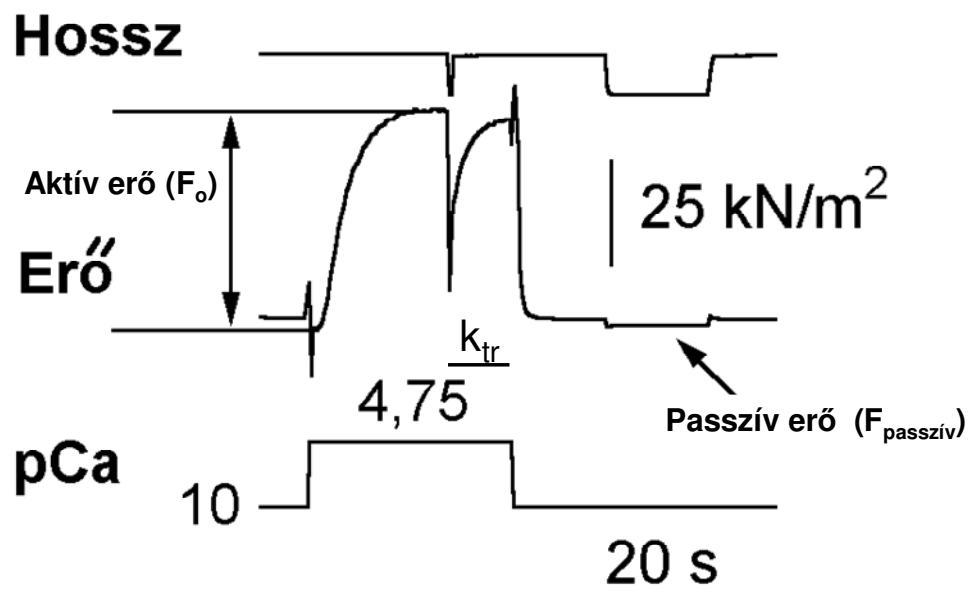
5. ábra. Izolált és membránrendszerétől megfosztott szívizomsejt.

A vizsgálni kívánt izolált cardiomyocytát invertáló mikroszkóp tárgyasztalán szilikon ragasztóval a két vékony rozsdamentes acéltűhöz ragasztottuk. Az átlagos sarcomerhosszt relaxáló oldatban 2,2 μm-re állítottuk.

A mérésekhez szükséges relaxáló és aktiváló oldatok összetételét számítógépes program (Fabiato & Fabiato, 1979) szerint határoztuk meg. A kiindulási relaxáló és aktiváló oldatok Ca^{2+} -koncentrációja pCa (Ca^{2+} -koncentráció 10-es alapú negatív logaritmus) 10 és pCa 4,75 volt. A pCa 4,75 értéknél kisebb Ca^{2+} -koncentrációjú aktiváló oldatokat ezen kiindulási oldatok elegyítésével állítottuk elő. A szívizomsejtek Ca^{2+} -kontrakcióit izometriás körülmények között 15°C-on mértük. A sejtek aktiválása előtt a sarcomerek átlagos hosszát a mikroszkóphoz kapcsolt számítógépes videojel feldolgozó rendszer segítségével 2,2 μm-re állítottuk be.

A mérések során a szívizomsejt relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő átvitelét a kontraktilis erő fokozódása követte (6. ábra). A maximális Ca^{2+} aktivált erő kifejlődése után egy úgynevezett „release-restretch” manővert végeztünk, melynek során a sejtet eredeti hosszának 20%-ával megrövidítettük, majd ezt követően visszaállítottuk a kiindulási hosszát. Ezt a mérőrendszer az előzetesen beállított protokoll szerint az elektromágneses motorhoz rögzített rovartü mozgatásával hajtotta végre. Az igen nagysebességű, 20 msec alatt kivitelezett, hosszváltoztatás során a kialakult aktin-miozin keresztkötések döntő többsége felszakadt, majd azok

újából felépültek. Ezt az eseményt a regisztrátumon a kontraktilis erő megszűnése, majd annak gyors regenerációja kísérte. Az erő regenerációjának üteme elsősorban az aktin-miozin ciklus sebességétől függött, melyet a k_{tr} paraméterrel jellemeztünk. A k_{tr} paramétert az erő görbék „release-retch” manővert követő részének illesztésével lehetett becsülni. Az izometriás csúcserőt, mely az aktív (F_o) és passzív ($F_{passzív}$) komponensek összege, a gyors rövidüléssel párhuzamos hirtelen erőcsökkenésből határoztuk meg. Ezt követően a relaxáló oldatban kivitelezett, lényegesen hosszabb ideig tartó „release-retch” manőver révén a sejt passzív erőkomponensét mértük (6. ábra).



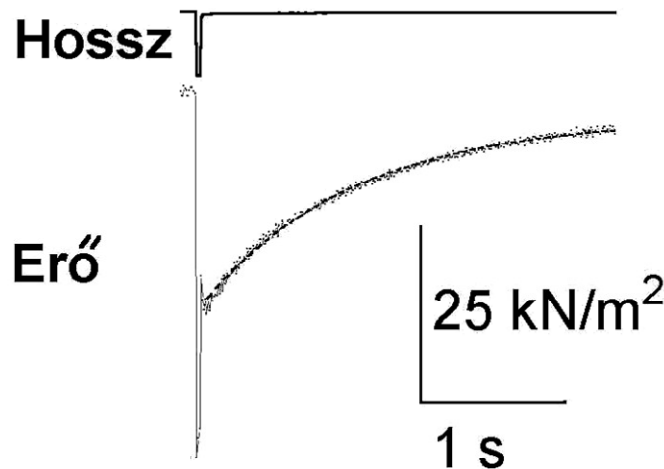
6. ábra. Kontraktilis paraméterek mérése egyetlen szívizomsejten.

A Ca^{2+} -kontraktúrákat a szívizomsejt relaxáló oldatból (pCa 10) magas Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatba (pCa 4,75) történő átvitelével mértük. Az aktiváció alatti gyors hosszváltozást („release-retch” manőver) a kontraktilis erő megszűnése, majd gyors regenerációja kísérte. A relaxáló oldatban végrehajtott hosszváltoztatás révén a sejt passzív feszítettségét ítéltük meg. (Mintavételezési frekvencia 20 Hz volt.)

Az izometriás erőmérés során a kialakult maximális feszülést mind analóg módon, mind digitális jelek formájában egyedi fejlesztésű komputer program segítségével regisztráltuk. Az ASCII formátumú mérési eredményeket egyesével olvastuk be az ORIGIN grafikus program erre a célra definiált adatfeldolgozó rutinjába. A beolvasott adatokat grafikusan megjelenítettük. Az aktiváló oldatban végrehajtott „release-restretch” manővert követő erőregenerálódás alatti periódust a következő monoexponenciális függvény segítségével illesztettük (7. ábra):

$$F = F1 + F2 * (1 - \text{EXP}(-t * k_{tr})) \quad (2)$$

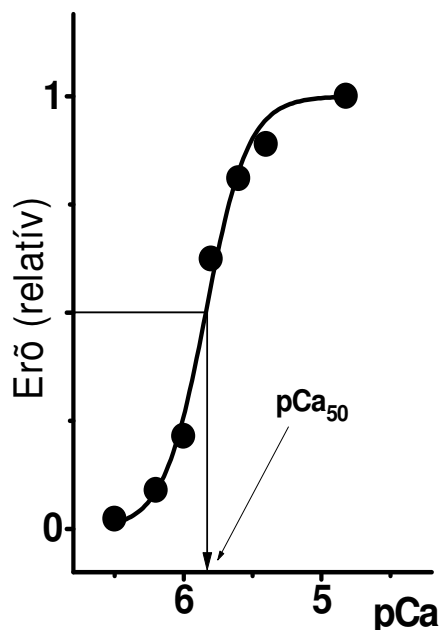
ahol t az idő, $F1$ az a minimális erőérték, ahonnan az illesztett görbe indul, $F2$ az a maximális erőérték melyhez az illesztett görbe közelít, és k_{tr} az exponens időállandója.



7. ábra. A „release-restretch” manőver következtében kialakult erőtranziens és a k_{tr} paraméter illesztésének vázlata.

Felül a szívizomsejt Ca^{2+} -kontraktúrájának csúcsán végrehajtott gyors hosszcsökkentése (a sejt eredeti hosszának 80%-ra) és nyújtása az eredeti hosszra látható, míg alul a következményes erőtranziens ábrázoltuk. Az erő regenerációs szakaszára illesztett exponenciális függvény időállandója a k_{tr} paraméter, mely az aktin-miozin ciklus sebességét jellemzi. (A mintavételezési frekvencia 1000 Hz volt.)

A kontraktúra amplitudóját különböző, egyre csökkenő Ca^{2+} -koncentrációjú ($p\text{Ca}$ 4,75 - $p\text{Ca}$ 7,0) aktiváló oldatokban határoztuk meg. Ezek segítségével szerkesztettük meg a sejtre jellemző Ca^{2+} -érzékenységi görbét. A félmaximális erőt eredményező Ca^{2+} -koncentráció, az úgynevezett $p\text{Ca}_{50}$ érték, a Ca^{2+} -érzékenységet önmagában jellemző számadat (8. ábra).

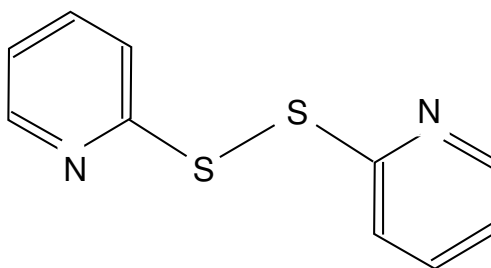


8. ábra. Az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenységének mérése egyetlen szívizomsejten.

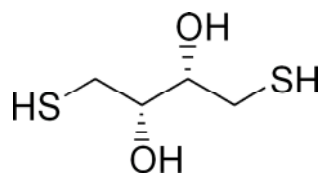
Az aktivációk során kialakuló aktív erőt a Ca^{2+} -koncentráció ($p\text{Ca}$) függvényében ábrázolva minden egyes sejtnek megszerkesztettük a Ca^{2+} -érzékenységi görbét. A félmaximális erő létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} -koncentráció ($p\text{Ca}_{50}$) a sejt Ca^{2+} -érzékenységét közvetlenül jellemző adat.

2.4. Oxidáló- és redukálószer alkalmazása

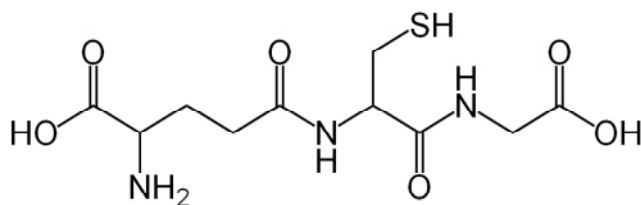
Kísérleteinkben oxidálószerként az SH specifikus DTDP-t (9. ábra) és peroxinitritet alkalmaztuk. A DTDP (Sigma, St. Louis, USA) különböző koncentrációit relaxáló oldatban állítottuk elő. DTDP-vel történő inkubációs idő 2 perc volt. Az egyes kísérletek előtt a peroxinitrit (Calbiochem, San Diego, CA, USA) koncentrációját 302 nm-en abszorbancia méréssel határoztuk meg. Ezt követően készítettük el a megfelelő koncentrációjú törzsoldatot, melynek pH-ját KOH-dal 11-re állítottuk be, hogy a peroxinitrit lebomlását jelentéktelen sebességre lassítsuk. A törzsoldat 20 µl-ét a mérő rendszerben rögzített szívizomsejtet körülvevő 180 µl relaxáló oldatba pipettáztuk. A relaxáló oldatban az alacsony pH (7,2) következtében a peroxinitrit hamar lebomlott, félélet ideje a rendszerünkben kb. 3 másodpercre tehető. A peroxinitrit inkubáló cseppbe történő injekcióját követően egy percet vártunk. Kontroll kísérletekben mutattuk ki, hogy a peroxinitrit oldatban lévő esetleges hidrogén-peroxid kontamináció és a peroxinitrit bomlástermékei (nitrit és nitrát) a mérési eredményeinket nem befolyásolták. A redukáló hatású, SH specifikus DTT-vel (Eastman Kodak Company, Rochester, USA), GSH-val (Sigma, St. Louis, USA) és NAC-nel (Sigma, St. Louis, USA) 30 percig inkubáltuk a sejteket (9. ábra). Kontroll mérések és irodalmi adatok alapján ezen időtartamok elegendőek voltak az SH státusz steady-state állapotának eléréséhez.



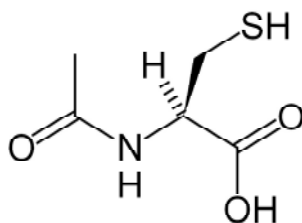
DTDP



DTT



GSH



NAC

9. ábra Az alkalmazott oxidoreduktív ágensek képletei

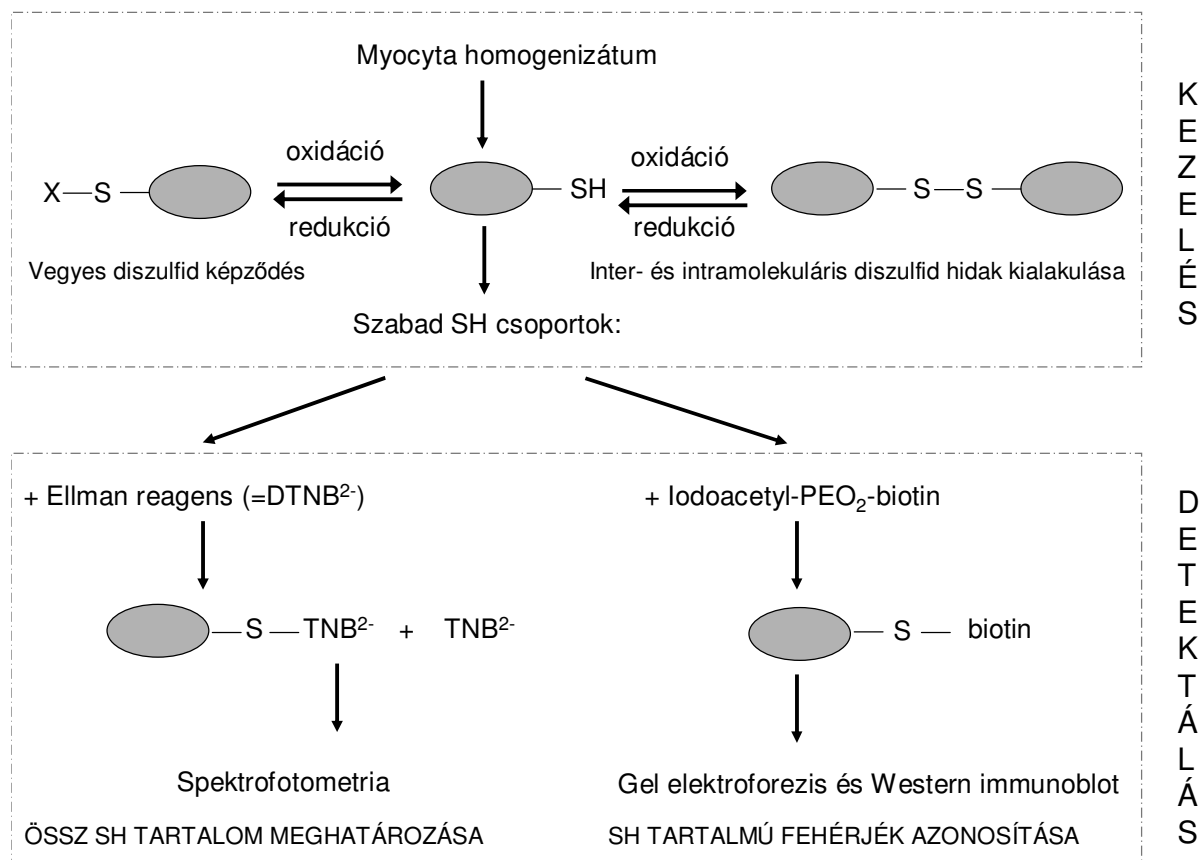
A DTDP molekulában a két piridin gyűrűt diszulfid híd köti össze. A DTT két SH csoportot tartalmazó redukálószer, mely miközben redukálja reakció partnerét önmaga ciklikus diszulfiddá alakul. A GSH és a NAC is csak egy SH csoportot tartalmaz molekulánként.

2.5. Oxidáló és redukáló ágensek hatásának tanulmányozása mechanikai mérőrendszeren

A különböző kontraktilis paramétereket kontroll körülmények között, az oxidáló és redukáló ágensek alkalmazása előtt, és ezek alkalmazását követően is meghatároztuk. A DTDP és a peroxinitrit esetében először a koncentráció-hatás görbét vettünk fel. Ehhez az oxidálószernek egyre növekvő koncentrációival inkubáltuk a sejteket, majd aktiváló oldatban (pCa 4,75) mértük a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt. Az így nyert görbék alapján közel félmaximális erőcsökkenést 2,5 mM DTDP és 50 μM peroxinitrit koncentrációk váltottak ki. További kísérleteinkben ezen koncentrációk alkalmazásával tanulmányoztuk az oxidáció következtében kialakuló kontraktilis változásokat (Ca^{2+} -érzékenység, aktin-miozin ciklus sebessége) majd pedig ezek revertálhatóságát. Ehhez kontroll körülmények között felvett Ca^{2+} -erő összefüggés meghatározását követően, 2,5 mM DTDP illetve 50 μM peroxinitrit koncentrációk mellett inkubáltuk a preparátumokat. Majd ismételt Ca^{2+} -erő összefüggés felvételét követően valamelyik redukálószerrel 30 percig kezeltük a cardiomyocytákat. Ennek hatását egy harmadik Ca^{2+} -erő összefüggés regisztrálásával vizsgáltuk.

2.6. Biokémiai módszerek

A vizsgált kontraktilis változások biokémiai hátterének tisztázásához többféle módszert alkalmaztunk. A kontraktilis fehérjék szulfhidril tartalmának kvantitatív változásait az SH specifikus Ellman reagenssel vizsgáltuk. A myofibrilláris fehérjék biotinizációjával és Western blot analízisével az egyes fehérjék szintjén bekövetkező változásokat detektáltuk (10. ábra). A mechanikai és biokémiai méréseinkből származó adatok megbízható összevethetősége érdekében hasonló kísérleti körülmények (hőmérséklet, inkubációk időtartama) megteremtésére törekedtünk a különböző módszerek alkalmazása során. Továbbá a mechanikai és biokémiai kísérleteinkben ugyanolyan módon előállított izolált, permeabilizált szívizomsejteket tartalmazó homogenizátumot használtuk.



10. ábra. Szulfhidril oxidáció vizsgálata biokémiai módszerekkel.

A szívizom homogenizátum oxidáló és redukáló szerekkel történő kezelését követően a fehérjék szulfhidril csoportjait kvantitatív és kvalitatív módon vizsgáltuk. A kezeléseket követően a SH csoportok összmenységét SH specifikus Ellman reagenssel mértük. A kontraktilis fehérjék biotinilációjával és ezt követő Western blot analízisével szelektíven tanulmányoztuk, mely fehérjék érzékenyek szulfhidril oxidációra.

2.6.1. SH tartalom meghatározása Ellman reakcióval

Redukált állapotban levő szulfhidril csoportok mennyiségének meghatározásához 5 mg/ml fehérjetartalmú homogenizátumot a különböző oxidáló és redukáló szerekkel kezeltünk 22 °C-on. Ezt követően a homogenizátumot 15 percig inkubáltuk Ellman reagenssel. Az Ellman reagens a fehérjék redukált állapotban levő szulfhidril csoportjaihoz képes kapcsolódni, mely kötés kialakulása során sárga színű 2-nitro-5-tiobenzóat sav (TNB²⁻) keletkezik. Ezen termék

mennyisége spektrofotometriás úton (412 nm-en) mérhető, és arányos a kiindulási homogenizátumban levő szulfhidril csoportok számával. A szulfhidril tartalom megítéléséhez NAC-nel és GSH-nal kalibrációs görbéket készítettünk.

2.6.2. Szulfhidril oxidáció kvalitatív vizsgálata biotinilációval és Western immunoblottal

A myofibrilláris fehérjék SH oxidációra mutatott érzékenységet szintén izolált permeabilizált szívizomsejteket tartalmazó homogenizátumból határoztuk meg. A homogenizátumot DTDP-vel (0-tól 30 mM-ig) vagy peroxinitrittel (0-tól 1000 μ M-ig), majd szekvenciálisan alkalmazott DTT-lal, GSH-nal vagy NAC-nel kezeltük. Ezután a reagenseket a homogenizátum többszöri mosásával eltávolítottuk, és a protein koncentrációt 5 mg/ml-re állítottuk be. A preparátumokat 60 μ M (+)-biotiniljodoacetamidil-3,6-dioxaoctanediamin (iodoacetyl-PEO₂-biotin, Pierce, Rockford, IL, USA) jelenlétében 90 percig, 22 °C-on inkubáltuk. Ezen időtartam alatt a biotiniláló ágens a fehérjék redukált állapotban levő SH csoportjaihoz kapcsolódott. A biotinilációt követően a homogenizátumot háromszor mostuk, majd SDS-mintapufferben (Sigma, St. Louis, MO, USA) főztük. A fehérje koncentrációt dot blot módszerrel ellenőriztük, majd 25 μ g protein homogenizátumot vittünk fel 10 %-os illetve 6-18 %-os gradiens gélre (Biorad, Hercules, CA, USA). A molekulásúly szerint szétválasztott fehérjéket 5 %-os tejporban blokkoltuk 1 óráig, majd peroxidáz konjugált streptavidinnel inkubáltuk 30 percig. A jeleket felerősített chemiluminescencia (ECL) segítségével autoradiographiás filmen (Primax RTG-B, Berlin, Germany) vizualizáltuk. A filmekken kapott sötét sávok reprezentálták a biotinált fehérjéket. A jelintenzitás arányos volt az oxidoreduktív szerekkel kezelt fehérjék SH csoportjainak számával.

2.6.3. Immunprecipitáció

A fenn leírtak szerint biotinilált myofibrilláris fehérjékből a miozin könnyű lánc 1-et (MLC1) és a cardiális troponin I-t (cTnI) immunprecipitációval választottuk el. A biotinilált fehérjéket tartalmazó homogenizátumokat először 1ml térfogatra hígítottuk (0,1 mg/ml fehérje

koncentráció) 0,1 % Triton-X 100-at tartalmazó TBS-sel (immunprecipitációs puffer). A MLC1 immunprecipitációjához a homogenizátumokat 30 µl protein agarose gyanta (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) jelenlétében szobahőmérsékleten 60 percig 1 µg anti-MLC1 antitesttel (Sigma, St. Louis, MO, USA) vagy kontrollként ugyanilyen mennyiségű egér IgG-vel (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) inkubáltuk. A gyantához kötött komplexeket 3 alkalommal mostuk immunprecipitációs pufferrel (centrifugálás: 1800 rpm , 1 perc). Ezt követően az immunkomplexeket tartalmazó üledékeket 10 percig főztük SDS-mintapufferrel (Sigma, St. Louis, MO, USA), majd minden mintát két egyenlő részre osztottunk. A minták egyik feléből a biotinilált fehérjék mennyiségét határoztuk meg, másik feléből az immunprecipitáció hatékonyságát ellenőriztük. A biotinilált fehérjék kimutatására ebben az esetben is peroxidáz konjugált streptavidint, Western immunoblot és ECL módszereket alkalmaztunk. Az immunprecipitáció hatékonyságának megállapításához a precipitációhoz használt MLC1 ellenes antitesttel inkubáltunk 1:50 000 hígításban.

A cTnI immunprecipitációjához 20 µl kolloidális vassal konjugált cTnI-ellenes antitestet (Liason, Diasorin, Saluggia, Italy) adtunk a biotinilált fehérjéket tartalmazó homogenizátumokhoz. Egy órás szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a cTnI-antitest komplexeket mágneses tábla felett szeparáltuk és mostuk 3 alkalommal a megfelelő mosó pufferrel (mosó puffer, Liaison Diasorin, Saluggia, Italy). A vas-antitest-fehérje komplexeket SDS-mintapufferben megfőztük, két részre osztottuk az MLC1 precipitációjához hasonlóan. A homogenizátumok egyik feléből ebben az esetben is a biotinilált fehérjék mennyiségét határoztuk meg, míg a másik feléből az immunprecipitáció hatékonyságát igazoltuk. Ez utóbbihoz anti-cTnI antitestet (16A11 klón, RDI, Concord, MA) használtunk 1:10 000 hígításban.

2.5. Statisztikai módszerek

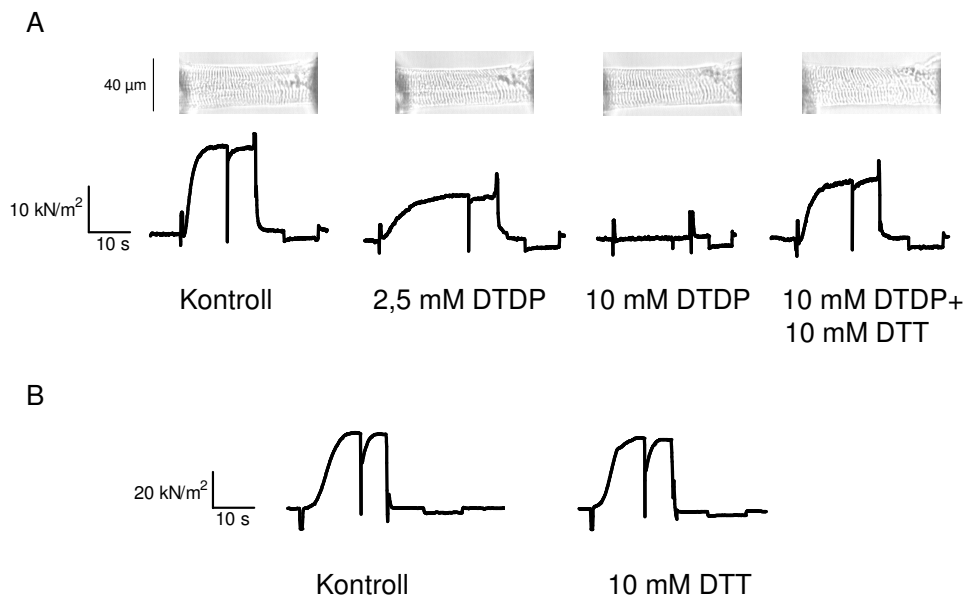
A nyert adatokat Microsoft Excel program segítségével táblázatos formában rendeztük. Az ábrákat és az illesztéseket részben az Origin (Microcal Software, Inc., MA, USA), részben a Graph Pad program segítségével készítettük el. A disszertációban bemutatott adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. Az ábrákon számos esetben nem láthatóak hibajelek. Ennek az az oka, hogy a hibajelek nagysága ezen esetekben kisebb volt, mint az átlagokat jelölő szimbólumok

mérete. Az egyes kísérletekhez tartozó elemszámot a megfelelő ábrák alatt tüntettük fel. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a Student-féle t -próba (ugyanazon sejten végzett kísérletek esetében páros, egyéb esetekben páratlan próbát használva) eredményeként a kapott p érték kisebb volt 0,05-nél (Somogyi és Trón, 1975).

3. Eredmények

3.1. Myofibrilláris fehérjék SH oxidációjának kontraktilis következményei

Humán kamrai szívműködéseken tanulmányoztuk a SH oxidáció aktív és passzív erőre, valamint az aktin-miozin ciklus keresztkötési kinetikáját jellemző k_{tr} paraméterre gyakorolt hatását ismételt izometriás Ca^{2+} -kontraktúrák kiváltásával. DTDP egyre növekvő koncentrációinak hatására a Ca^{2+} -aktivált maximális erő csökkenését tapasztaltuk (11/A ábra). Az itt alkalmazott legmagasabb DTDP koncentráció (10 mM) az erőt gyakorlatilag nullára csökkentette. Ezt követően szekvenciálisan használt 10 mM DTT az F_o -t a kontroll érték 77,6%-ra hozta vissza, bizonyítva a DTDP által kiváltott kontraktilis funkció károsodás reverzibilis voltát. Érdekes, hogy sem az erő csökkenését, sem a növekedését nem kísérte a szívműködés harántcsíkolatának mikroszkóp alatt látható változása. Megfigyeltük, hogy a DTT önmagában, előzetes oxidálószerrel történő kezelés nélkül, nem befolyásolta szignifikánsan a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt, F_o DTT kezelés előtt $27 \pm 5 \text{ kN/m}^2$ volt, utána $25,6 \pm 4,6 \text{ kN/m}^2$ $n=5$ kísérlet alapján (11/B ábra).

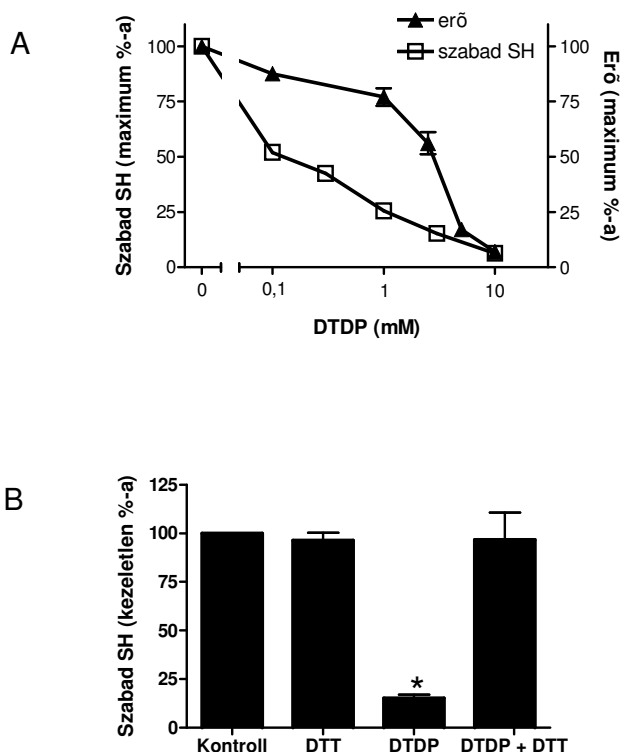


11. ábra. DTDP kezelés által kiváltott reverzibilis erő csökkenés humán permeabilizált cardiomyocyteken

Az SH specifikus oxidálószer, a DTDP hatására az aktív erő csökkenését tapasztaltuk, melyet nem kísért a myofibrilláris rendszer mikroszkópos struktúrájának változása (A). Az erő csökkenés DTT-vel reverzibilisnek bizonyult, ugyanakkor kontroll kísérletekben az önmagában alkalmazott DTT nem befolyásolta a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt (B).

Ezt követően meg akartunk bizonyosodni, hogy a kialakult kontraktilis változások hátterében a SH csoportok oxidációja áll. Ehhez összehasonlítottuk DTDP emelkedő koncentrációinak a Ca^{2+} -aktivált maximális erőre és a kontraktilis fehérjék SH tartalmára gyakorolt hatását (12. ábra). A SH csoportok redox állapotának változását myocita homogenizátumokban SH specifikus Ellman reagenssel határoztuk meg. Ezen kísérletek szerint a DTDP növekvő koncentrációi által kiváltott erő csökkenést a fehérjék SH csoportjainak paralell oxidációja kísérte. Az erő nagymértékű csökkenése azonban csak alacsonyabb SH tartalom

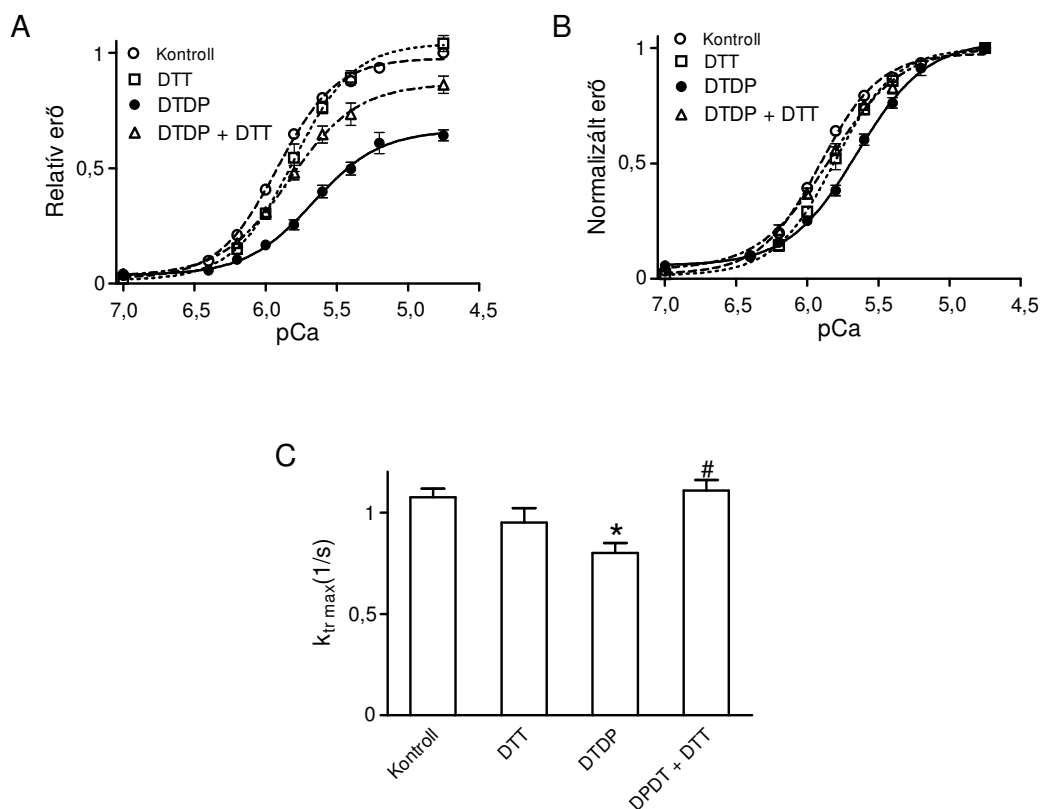
mellett következett be. Ellman reagenssel történő meghatározás alapján a DTT képes volt a SH csoportokat teljes mértékben revertálni: az SH tartalom 2,5 mM DTDP után $14,8 \pm 2,4\%$ volt, ezt követő DTT kezelés után pedig $96,6 \pm 14,1\%$ (mindkettő a kontrollhoz képest vett százalékos értékben van kifejezve). A DTT önmagában alkalmazva a fehérjék redox státuszában sem idézett elő számottevő változást, az SH tartalom a kontroll $98,2 \pm 7,6\%$ -a volt.



12. ábra. Myofibrilláris fehérjék SH tartalmának és a Ca^{2+} -aktivált maximális erőnek paralell változásai

(A) Egyre növekvő DTDP koncentrációk Ca^{2+} -aktivált erőre és a SH csoportok mennyiségére gyakorolt hatása. Szimbólumok a kezeléseket követően mért értékek átlagait (a kontrollhoz - 0 mM DTDP - hasonlítva), míg a hibajelek a SEM-et jelölik. (B) Az oszlopdiagram az Ellman reakció útján meghatározott SH tartalom változásait jelöli 10 mM DTT, 2,5 mM DTDP, valamint 2,5 mM DTDP és ezt követően szekvenciálisan alkalmazott 10 mM DTT hatására. ($n=3$, $*p<0,05$ vs. kontroll)

Következő lépésként a SH oxidáció myofibrilláris mechanikára gyakorolt hatását részleteiben vizsgáltuk. Ehhez 2,5 mM DTDP koncentrációt alkalmaztunk, mely a DTDP koncentráció-hatás görbéje alapján közel felére csökkentette a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt. Különböző szubmaximális Ca^{2+} -koncentrációk mellett regisztráltuk a 2,5 mM DTDP kontraktilis erőre gyakorolt hatását (13/A ábra). A Ca^{2+} -érzékenységben bekövetkezett változás meghatározásához a kapott erő értékeket a maximumra normalizáltuk DTDP kezelés előtt és után (13/B ábra). DTDP hatására a Ca^{2+} -érzékenység csökkenését találtuk, vagyis a Ca^{2+} -erő görbe jobbra tolódott ($\Delta p\text{Ca}_{50} = 0,22 \pm 0,02$; $p < 0,01$ vs. kontroll). 10 mM DTT szekvenciális alkalmazása DTDP-t követően revertálta a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt ($86,1 \pm 0,1\%$ kontrollhoz képest; $p < 0,05$ vs. DTDP) és a Ca^{2+} -érzékenységet ($\Delta p\text{Ca}_{50} = 0,06 \pm 0,02$ vs. kontroll; $p < 0,05$ vs. DTDP) egyaránt (13/A, B ábra). Az önmagában alkalmazott DTT kezelés nem befolyásolta sem az aktív erőt, sem a Ca^{2+} -érzékenységet. A relaxáló oldatban meghatározott passzív erő ($F_{\text{passzív, kontroll}} = 2,6 \pm 0,3 \text{ kN/m}^2$) DTDP hatására kissé fokozódott ($F_{\text{passzív, DTDP}} = 2,8 \pm 0,2 \text{ kN/m}^2$; $p < 0,05$ vs. kontroll), majd ezután végzett DTT inkubációt követően ezen magasabb értéken maradt ($F_{\text{passzív, DTDP+DTT}} = 3,5 \pm 0,5 \text{ kN/m}^2$; $p < 0,05$ vs. kontroll). Az aktin-miozin ciklus kinetikáját maximális Ca^{2+} -koncentrációnál jellemző $k_{\text{tr, max}}$ paraméter 2,5 mM DTDP hatására $1,07 \pm 0,04 \text{ 1/s}$ értékről $0,8 \pm 0,05 \text{ 1/s}$ -ra csökkent. Szekvenciálisan alkalmazott DTT ezen paraméter teljes reverzióját eredményezte ($k_{\text{tr, max}} = 1,11 \pm 0,05 \text{ 1/s}$). DTT önmagában a keresztkötési kinetikát sem változtatta meg (13/C ábra). A kezelések nélkül mért kontroll Ca^{2+} -erő összefüggések alapján a Ca^{2+} -aktivált maximális erőben, a passzív erőben, a Ca^{2+} -érzékenységben, a keresztkötési kinetikában tapasztalt változások nem a preparátum leromlásának köszönhetően alakultak ki (adatokat nem mellékeltek).



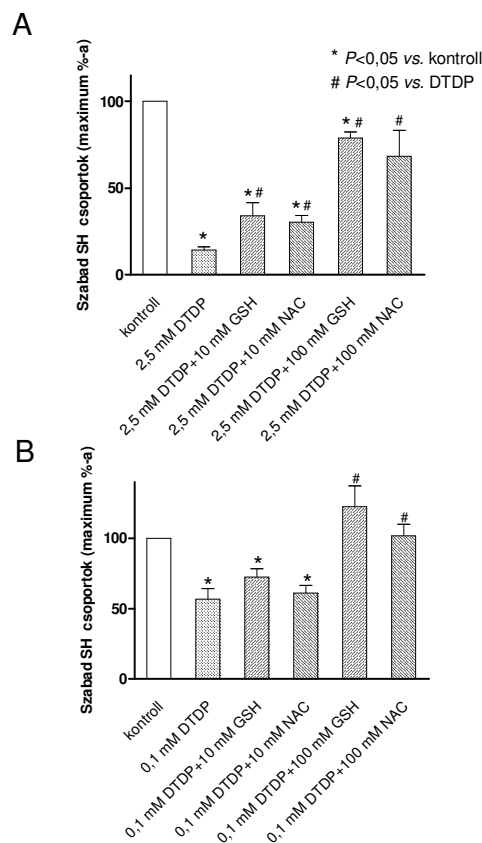
13. ábra. SH oxidáció és redukció miofibrilláris kontraktilitásra gyakorolt hatásai

A relatív (A) és normalizált (B) Ca^{2+} -erő összefüggések alapján 2,5 mM DTDP a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt és a Ca^{2+} -érzékenységet is csökkentette. 2,5 mM DTDP szignifikáns változást idézett elő az aktin-miozin ciklus keresztkötési kinetikájában (C). Mindezen változások reverzibilisnek bizonyultak 10 mM DTT-vel történő inkubációt követően. ($n=31$; $*p<0,05$ vs. kontroll, $\#p<0,05$ vs. DTDP)

Megvizsgáltuk a DTDP által kiváltott SH oxidáció egyéb redukálószerekkel, a fiziológiásnak tekinthető GSH-nal és a mindennapos gyógyászatban használt NAC-nel, történő reverzióját. A DTT-vel szemben, 2,5 mM DTDP alkalmazását követően 10 mM GSH és NAC csak részlegesen volt képes revertálni az oxidáció által okozott SH tartalom csökkenését Ellman reakciók alapján (14. ábra). A szabad SH csoportok mennyisége a kontrollhoz képest 2,5 mM DTDP-t követően $14 \pm 2\%$ volt, 2,5 mM DTDP + 10 mM GSH után $34 \pm 8\%$, 2,5 mM DTDP + 10 mM NAC után pedig $30 \pm 4\%$ ($p < 0,05$ vs. 2,5 mM DTDP mindkét esetben). Azonban ezen

redukálószer 100 mM koncentrációban alkalmazva hatékonyabbnak bizonyultak a reverzióban. SH tartalom 2,5 mM DTDP + 100 mM GSH esetében $79 \pm 3\%$, 2,5 mM DTDP + 100 mM NAC esetében $68 \pm 15\%$ volt.

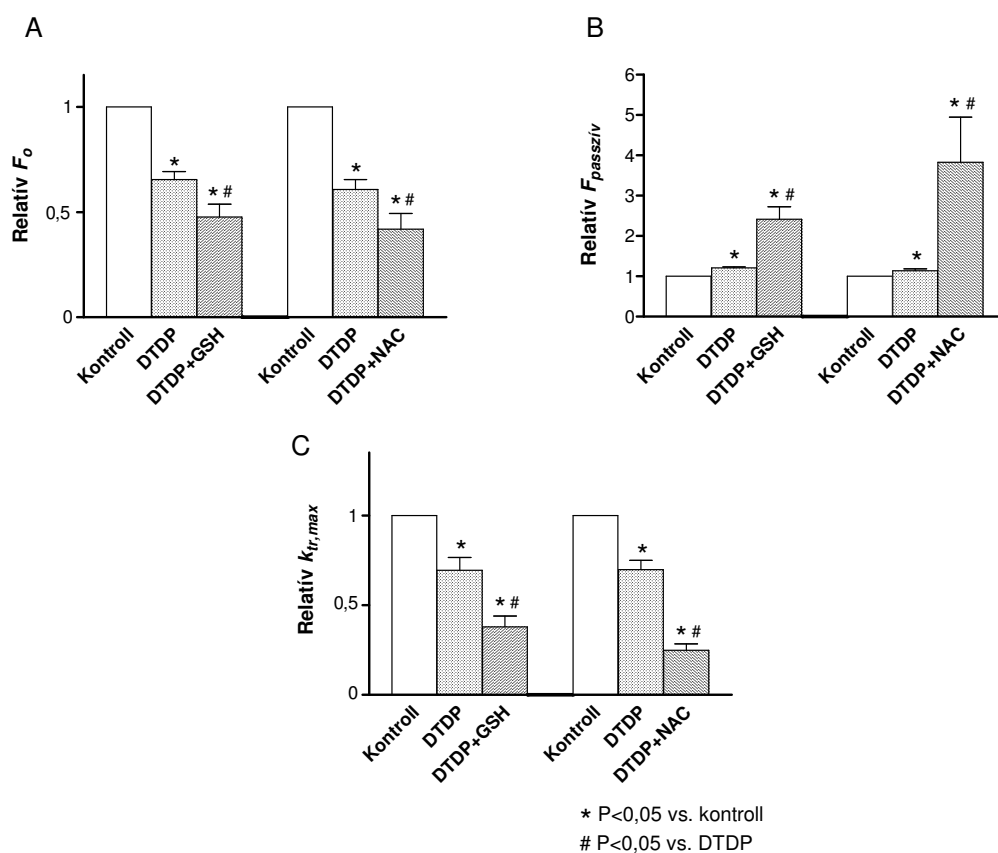
Ezen redukálószer hatását 0,1 mM DTDP-vel történő inkubációt követően is meghatároztuk (14. ábra). Erre azért volt szükség, mert a 0,1 mM DTDP koncentráció eredményezte a SH csoportok közel 50%-os oxidációját. Míg a 0,1 mM DTDP után szekvenciálisan használt 10 mM GSH és NAC nem változtatta meg szignifikáns mértékben az SH csoportok mennyiségét, addig 100 mM-os koncentrációban mindkét redukáló szer az SH csoportok teljes reverzióját váltotta ki.



14. ábra. Különböző koncentrációkban alkalmazott GSH és NAC revertáló hatása

Az oszlopdiagramokon (átlag $\pm$ SEM) a fehérjék Ellman reagenssel meghatározott SH tartalmát jelöltük. Az SH csoportok mennyiségében 2,5 mM DTDP által kialakított jelentős csökénést 10 mM GSH és NAC csak részlegesen, míg 100 mM GSH és NAC majdnem teljes mértékben revertálták (A). 0,1 mM DTDP kezelést követően csak 100 mM koncentrációban alkalmazott redukálószerekkel tudunk szignifikáns mértékű reverziót elérni.

2,5 mM DTDP után alkalmazott 10 mM GSH és NAC az SH oxidáció által kialakított kontraktilis változásokat érdekes módon nem revertálták, hanem tovább rontották (15 ábra), vagyis segítségükkel a DTT-hez hasonló revertáló hatást nem sikerült elérni. A GSH és NAC a Ca^{2+} -aktivált maximális erőben és a k_{tr} paraméterben bekövetkező csökkenést tovább csökkentették, a passzív erőben pedig robosztus növekedést eredményeztek.

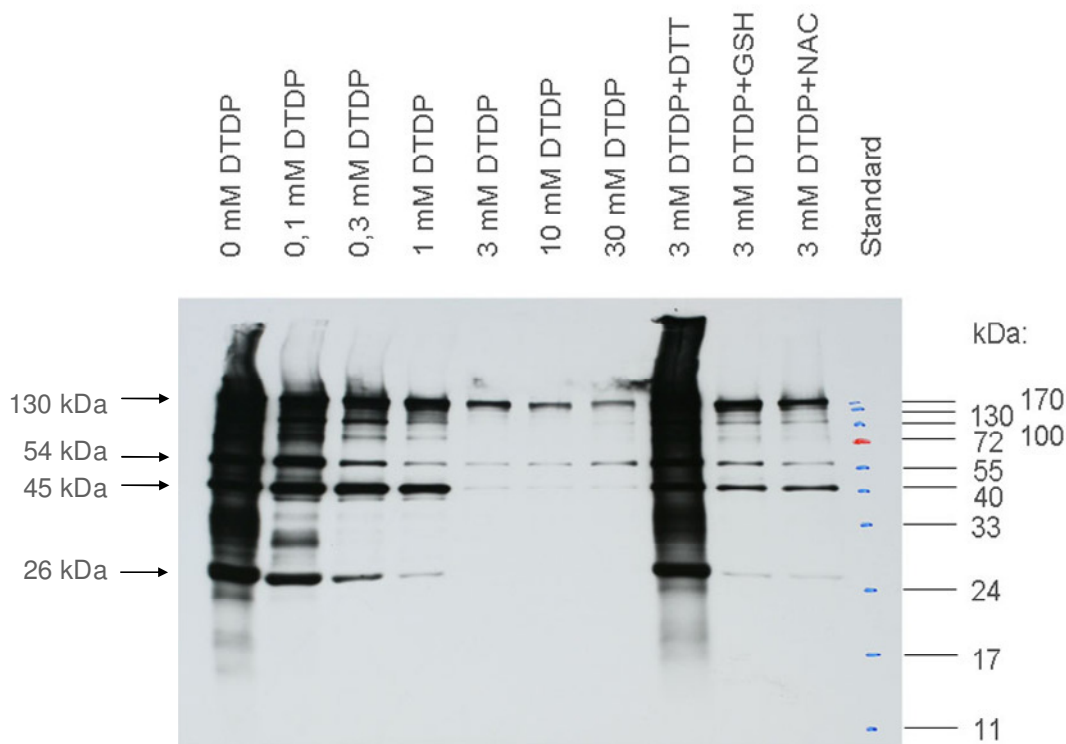


15. ábra. GSH és NAC mechanikai hatásai DTDP kezelést követően

A 2,5 mM DTDP alkalmazását követően 10 mM GSH és NAC az F_0 -t tovább csökkentette, míg a passzív erőnek többszörös növekedését eredményezte, a keresztükötési kinetikát tovább lassította. ($n = 8-26$, átlag $\pm$ SEM)

3.2. Kontraktilis fehérjék SH oxidációval szemben mutatott érzékenységének meghatározása és a mechanikai változásokért felelős fehérjék azonosítása

Az individuális myofibrilláris fehérjék szintjén DTDP és DTT hatására bekövetkező SH módosulás meghatározását szintén myocytá homogenizátumokból végeztük. Az oxidoreduktív ágensekkel történő kezeléseket követően a fehérjék redukált állapotban levő SH csoportjait biotiniláltuk, majd Western immunoblot analízist végeztünk (16. ábra). A kapott Western blot képeken a jelintenzitás a DTDP egyre növekvő koncentrációi hatására a SH csoportok oxidációjával párhuzamosan egyre csökkent. Ez az eredmény az Ellman reakció során kapott SH tartalom kvantitatív változásainak meghatározásával összhangban van. A festődési mintázat koncentráció függő változása a myocardiális fehérjék SH oxidációval szembeni eltérő érzékenységét igazolja. A sávok jelintenzitása DTDP kezelést követő DTT hatására visszatért, bizonyítva a DTDP által kiváltott oxidáció reverzibilis jellegét a vizualizált fehérjéken. Fontos megfigyelés volt, hogy több myofibrilláris fehérje oxidációja 0,1 és 1 mM közötti DTDP koncentráció tartományban történt, ahol az erő csökkenés kisebb mértékű volt. Magasabb DTDP koncentrációknál (1-10 mM), melyek a kifejezett kontraktilis változásokért voltak felelősek, 4 darab: 130, 54, 45 és 26 kDa móltömegű fehérje oxidációját emelhettük ki. Ezen fehérjék közül a két kisebb méretűnek teljes oxidációját, míg a nagyobb molekula tömegűek részleges módosulását figyeltük meg a legmagasabb DTDP koncentrációnál is. A 45 és 26 kDa tömegű fehérjék teljes oxidációja és a 0-10 mM DTDP koncentráció hatására meredeken bekövetkező erőcsökkenés együttesen ezen fehérjék redox státusza és a kontraktilis erő közötti potenciálisan szoros kapcsolatot jelezte.



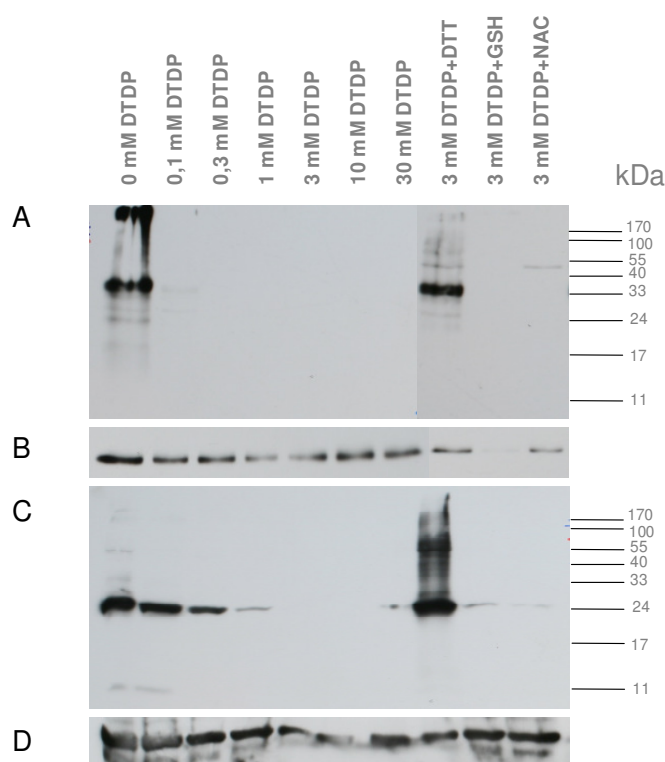
16. ábra. DTDP kezelt myofibrilláris fehérjék Western blot analízise

A jelintenzitás csökkenése arányos a fehérjék SH oxidációjának mértékével. A redukálószeres teljes (DTT) és részleges (GSH, NAC) revertáló hatása figyelhető meg. Bal oldalon lévő nyilak jelzik azon fehérjéket, melyeknek kiemelt szerepét feltételeztük a kontraktilis változásokban. (Három független kísérletet végeztünk, melyek közül egy reprezentatív regisztrátum látható az ábrán.)

A 26 kDa-nál elhelyezkedő fehérje azonosságát illetően elsősorban a cardiális troponin I (cTnI) és a miozin könnyűlánc 1 (MLC1) jött szóba. Ezen fehérjék azonosításához immunprecipitációt végeztünk. Az 17/B és D ábrán látható, hogy a cTnI és a MLC1 elválasztása a többi fehérjétől sikeres volt, az összes DTDP koncentrációnak megfelelően kapott sávok a cTnI és MLC1 kezelésektől független jelenlétére utaltak. Azonban mikor ezen precipitált fehérjéket a SH szelektív biotinizáció alapján mutattuk ki (17/A és C ábra), a cTnI igen alacsony (0,1 mM) DTDP koncentrációnál bekövetkező teljes oxidációját tapasztaltuk. Ugyanakkor a MLC1

esetében kapott mintázat teljes egészében hasonlított a kérdéses 26 kDa-os fehérjénél látott jelintenzitás csökkenéshez. Így ez a kísérlet a MLC1-et a SH oxidációval szemben aránylag magasabb rezisztenciát mutató fehérjeként azonosította, melynek oxidációja a myofibrilláris mechanikára befolyással lehet.

A 45 kDa tömegű fehérje, mely az MLC1-hez hasonló oxidációs érzékenységet mutatott, Western blot és ezüsfestés (adatokat nem mutatjuk) alapján aktinnak bizonyult. A 130 és 54 kDa tömegű fehérjéket molekulatömegük alapján miozin kötő C proteinnek és dezminnek valószínűsítettük.

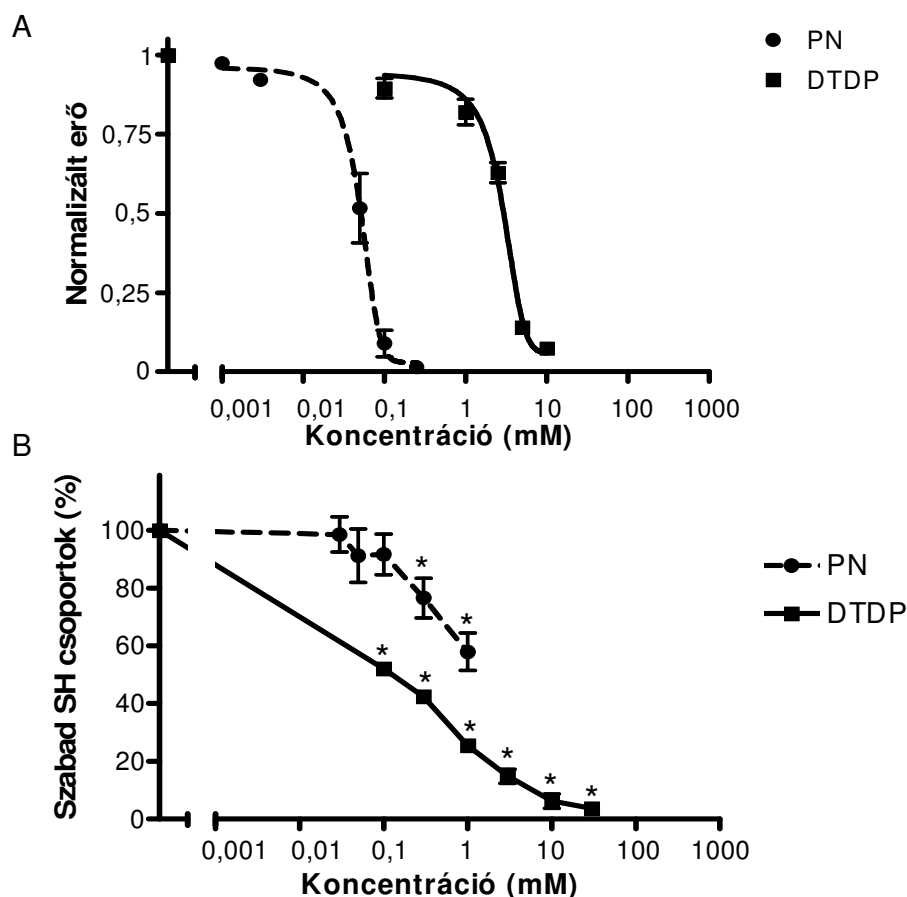


17. ábra. 26 kDa molekulatömegű fehérje miozin könnyű lánc 1-ként történő azonosítása

Azonos mennyiségű DTDP kezelt, biotinilált fehérjékből cTnI és MLC1 ellenes antitestekkel precipitáltuk a vizsgált fehérjét, majd gél elektroforézist és Western immunoblotot végeztünk. Az immunprecipitáció sikerességét cTnI (B) és MLC1 (D) ellen termelt antitestekkel igazoltuk. Az A és C ábrán a fehérjéket DTDP kezelést követően szabadon maradt, majd biotinilált SH csoportjainak megfelelően mutattuk ki. A troponin I (A) már 0,1 mM DTDP hatására oxidálódott. Az MLC1 (C) esetében kapott mintázat viszont messzemenően hasonlított a 16. ábrán látható 26 kDa-nál lévő sávokhoz. A DTT egyaránt visszaállította a cTnI és MLC1 eredeti redox állapotát. (Három független kísérletet végeztünk, melyek közül egy reprezentatív regisztrátum látható az ábrán.)

3.3. SH oxidáció szerepe a peroxinitrit által kiváltott kontraktilis dysfunkcióban

A peroxinitrittel folytatott kísérletek első lépéseként összevetettük a peroxinitrit és a DTDP Ca^{2+} -aktivált maximális erőre gyakorolt hatását. Mindkét oxidálószer az F_0 -t dózis függő módon nullára csökkentette (18. ábra). A peroxinitrit esetében az erő csökkenés μM -os koncentráció tartományban következett be ($\text{EC}_{50,\text{peroxinitrit}} = 49 \mu\text{M}$), míg a DTDP hasonló hatását magasabb koncentrációk mellett fejtette ki ($\text{EC}_{50,\text{DTDP}} = 2,75 \text{ mM}$). A DTDP és a peroxinitrit SH oxidáló hatását Ellman reakcióval is összehasonlítottuk. Míg a DTDP esetében az erőcsökkenés és a SH oxidáció ugyanabban a koncentráció tartományban következett be, addig a peroxinitrit esetében az erőcsökkenést kiváltó koncentrációk mellett csak mérsékelt SH oxidáció következett be. A peroxinitrit csak magas koncentrációban eredményezett nagyfokú csökkenést a myofibrilláris fehérjék SH csoportjainak számában, 1 mM hatására az SH tartalom $58 \pm 7\%$ -ra csökkent.

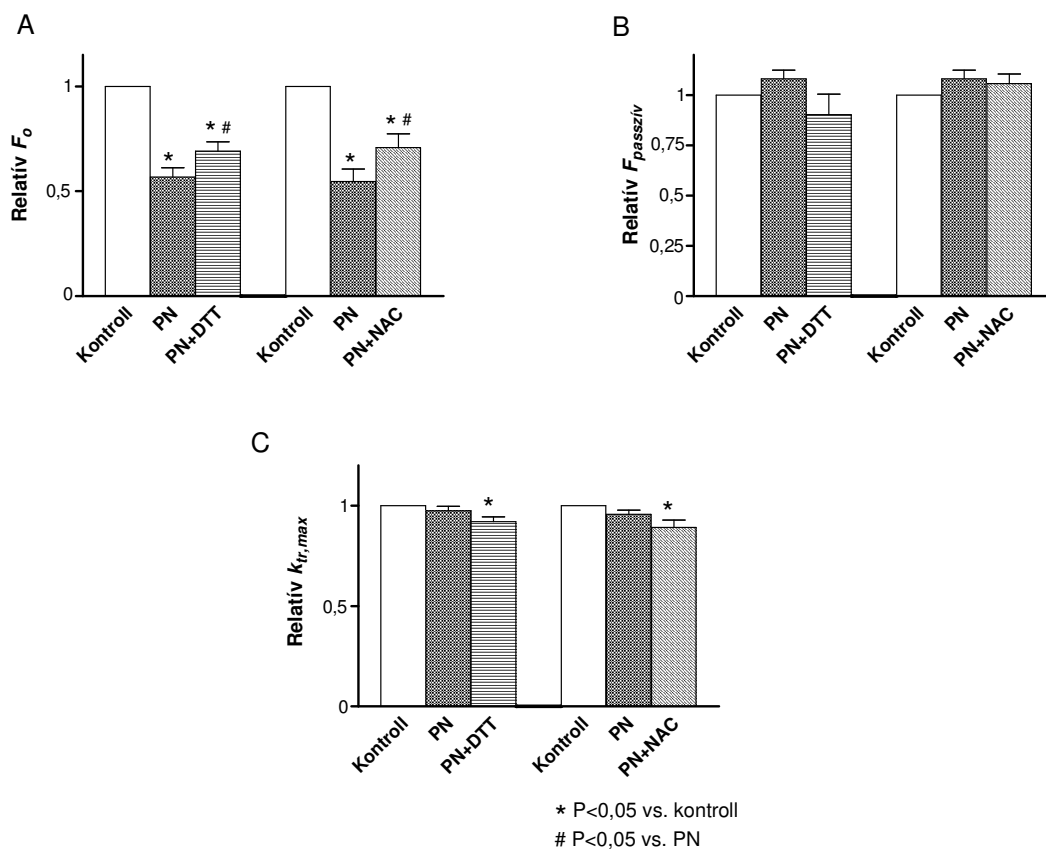


18. ábra. DTDP és peroxinitrit kontraktilis erőre és a fehérjék SH tartalmára kifejtett hatásának összehasonlítása

A DTDP és a peroxinitrit (PN) különböző koncentráció tartományban, de egyaránt lerontotta a kontraktilis erőt (A). A 18/B ábra a két oxidálószer SH csoportokra gyakorolt hatását ábrázolja. Ez alapján a DTDP mechanikára és SH csoportokra kifejtett hatása egymásnak megfelelő koncentrációk mellett volt megfigyelhető, míg a peroxinitritnél a két hatás részben eltérő koncentrációk mellett jelentkezett. A szimbólumok az átlagértékeket, a hibajelek pedig a SEM-et reprezentálják (ahol a szimbólumok nem fedik teljesen a szórást mutató vonalakat). ($n = 4-20$, $*p < 0,05$ vs. kontroll)

Ezt követően részletesen vizsgáltuk a közel félmaximális erőcsökkenést eredményező 50 μM peroxinitrit kontraktilis paraméterekre gyakorolt hatását (19. ábra). A Ca^{2+} -aktivált maximális erő $56 \pm 4\%$ -ra csökkent 50 μM peroxinitrit kezelés hatására, míg a passzív erő és a keresztkötési kinetika nem változott szignifikáns mértékben. SH specifikus redukálószeret alkalmaztunk, hogy becsülni tudjuk az SH oxidáció hozzájárulását a peroxinitrit okozta

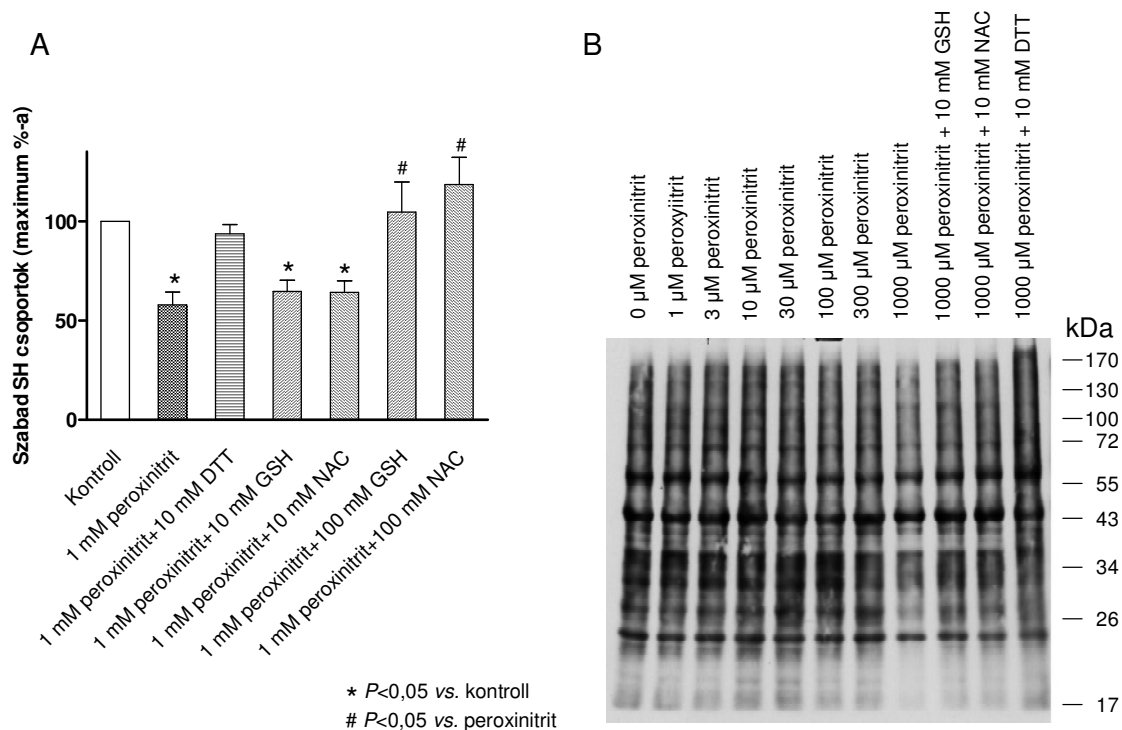
erősökkenéshez. 10 mM DTT és 10 mM NAC peroxinitrittel történő inkubációt követően részleges, de szignifikáns mértékű reverziót váltott ki a kontraktilis erőt illetően. Az F_o DTT-t követően $69 \pm 4\%$ -ra, NAC után pedig $71 \pm 7\%$ -ra nőtt ($p < 0,05$ vs. peroxinitrit mindkét esetben). Ezek alapján a peroxinitrit kontraktilis erőt csökkentő hatása legalább ennek a redukálószerekkel revertálható hányadnak megfelelő mértékben tekinthető az SH oxidáció következményének más fehérje módosító hatásai mellett. A DTT és NAC a passzív erőt nem változtatta jelentős mértékben. A $k_{tr,max}$ esetében mindkét redukálószer kismértékű emelkedést okozott. Az aktin-miozin ciklus sebességében kisfokú csökkenést kezelések nélkül (kontroll kísérletekben) is tapasztaltunk, feltehetően a preparátumok leromlásának következtében.



19. ábra. Peroxinitrit által kiváltott mechanikai hatások részleges reverziója

Az oszlopdiagramok illusztrálják a F_o , $F_{passzív}$ és a $k_{tr,max}$ változásait. A peroxinitrit (PN) által kiváltott erő csökkenést a DTT és NAC részlegesen revertálta. A peroxinitrit nem befolyásolta a passzív erőt és a keresztkötési kinetikát. A szimbólumok az átlagértékeket, a hibajelek pedig a SEM-et reprezentálják. ($n = 12-31$, $*p < 0,05$ vs. kontroll).

Biokémiai módszerekkel erősítettük meg, hogy az SH oxidációnak szerepe lehet a peroxinitrit mediált kontraktilis változások kialakulásában. Ellman reakció alapján 1 mM peroxinitrit hatására SH tartalomban kialakult csökkenést ($58 \pm 7\%$) 10 mM DTT teljes mértékben revertálni volt képes ($94 \pm 5\%$). Érdekes módon, mikor 10 mM GSH-t és NAC-t alkalmaztunk a peroxinitritet követően, a fehérjék SH tartalmát szignifikánsan nem változtatták meg. SH csoportok mennyisége kontrollhoz képest 1 mM peroxinitrit + 10 mM GSH után $65 \pm 6\%$, 1 mM peroxinitrit + 10 mM NAC után $64 \pm 6\%$ volt. Azonban mikor 100 mM koncentrációban alkalmaztuk a redukálószeret, teljes reverziót tudtunk elérni. 1 mM peroxinitrit + 100 mM GSH $105 \pm 15\%$ -ra, 1 mM peroxinitrit + 100 mM NAC $118 \pm 14\%$ -ra növelte a proteinek SH tartalmát. Peroxinitrit esetében is megkíséreltük egyes fehérjék oxidáló hatással szembeni fokozott érzékenységének kimutatását. Az SH specifikus biotiniláció és Western blot meghatározás azonban a myofibrilláris fehérjék szabad SH csoportjait jellemző jelintenzitás egyöntetű, minden fehérjét egyformán érintő csökkenését mutatta. Ezen kísérletek szerint peroxinitrit egyre növekvő koncentrációi hatására kialakuló változásokat 10 mM DTT teljes mértékben, míg 10 mM GSH és NAC részlegesen revertálta. Habár ezen eredmények az Ellman reakcióval kapottakkal összhangban vannak, nem tudtunk segítségükkel peroxinitrit specifikus szelektív myocardialis protein oxidációt azonosítani.



19. ábra. Peroxinitrit SH oxidáló hatását vizsgáló biokémiai tesztek

Az oszlopdiagram a peroxinitrit oxidáló hatásának redukáló szerek minőségétől és koncentrációjától függő revertálhatóságát mutatja Ellman reakció alapján ($n = 9$)(A). SH specifikus biotiniláció és Western blot analízis a kontraktilis fehérjék hasonló érzékenységet állapította meg a peroxinitrit SH oxidáló hatásával szemben (B, $n = 6$, $*p < 0,05$ vs. kontroll). A szimbólumok az átlagértékeket, a hibajelek pedig a SEM-et reprezentálják.

Megbeszélés

A disszertáció alapjául szolgáló kutatásainkban a Ca^{2+} -regulált kontraktilis erő és a myofilamentáris fehérjék SH oxidációja közötti összefüggést vizsgáltuk. Eredményeink alapján a kontraktilis proteinek SH oxidációjának messzemenő hatásai vannak a myocardialis kontraktilitásra. A fehérjék SH oxidációja így nem csak a sejtek elsővonalbeli antioxidáns védelmének gyengülését jelenti, hanem veszélyeztetheti a kontraktilis funkciót is. Munkánk során azonosítottuk a myofilamentáris fehérjék egy csoportját, így az MLC1-et és az aktint, melyek oxidációja lassítja az aktin-miozin ciklus kinetikáját, valamint csökkenti a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt és a Ca^{2+} -érzékenységet. Az *in vitro* kiváltott SH oxidációt és mechanikai következményeit megfelelően választott és alkalmazott redukálószerrel reverzibilisnek találtuk, mely az SH oxidációval összekapcsolt kórállapotokban új terápiás célpont lehet. Legjobb tudomásunk szerint ez az első tanulmány, mely az oxidatív károsodás SH függő komponensét és ennek a Ca^{2+} -regulált erőre gyakorolt hatását humán szívizomzaton vizsgálta.

A DTDP által kialakított SH tartalom csökkenésével a Ca^{2+} -aktivált maximális erő, a Ca^{2+} -érzékenység és az aktin-miozin ciklus sebessége is csökkent. Figyelemre méltó, hogy mindezen változások az SH státusz visszaállításával revertálhatóak voltak, mely a kettő közötti szoros összefüggést jelzi. Ugyanakkor a passzív erőben bekövetkezett kismértékű növekedést egyik redukálószerrel sem sikerült revertálni. A passzív erő egyik meghatározója a gigantikus elasztikus fehérje, a titin. Így feltételezhetjük, hogy a titin molekula oxidáció indukált konformáció változása a passzív tenzióra hatással van, és szerkezetének visszaállítását kísérletes modellünkben nem tudtuk biztosítani. A titin oxidációt a nagy molekulatömege és ennek köszönhető technikai nehézségek miatt másokhoz hasonlóan mi sem vizsgáltuk.

Meg kell azonban jegyezzük, hogy a SH oxidációt kiváltó ágens kémiai természetétől, a módosított myofilamentáris fehérjéktől és fajtól függően más mechanikai változások is kifejlődhetnek. Így például patkány nyúzott izomrostokon a Ca^{2+} -érzékenység fokozódását tapasztalták DTDP hatására (Lamb és Posterino, 2003; Posterino és Lamb, 1996). A közelmúltban közzétették rágcsálók szív-preparátumaival végzett kísérleteket, melyek szerint a tiol csoportokkal reagáló HNO (nitroxil) Ca^{2+} -aktivált maximális erő növekedését eredményezte (Dai és mtsai, 2007). Meg kell említenünk, hogy utóbbi kísérletekben a SH oxidált fehérjék szintje

alacsony volt, és a mechanikai változásokért csak az igen reaktív SH csoportokon keresztül megvalósuló redox folyamatok lehettek felelősek.

A szívizomsejteket önmagában, előzetes oxidálószer kezelés nélkül DTT-nek kitéve, sem a kontraktilis erőben, sem a SH tartalomban nem találtunk változást. Ezen eredmények egybevágóak azon korábbi állatkísérletes adatokkal, melyek szerint a kontraktilis fehérjék SH csoportjai fiziológiai körülmények között elsősorban redukált állapotban vannak (Ceconi és mtsai, 2000; Eaton és mtsai, 2002a; Hertelendi és mtsai, 2008).

Patkány szívizom mintákban *in vitro* ischaemiát és reperfúziót követően igazolták, hogy citoszol, membrán, myofilamentáris és citoskeletális fehérjék egyaránt S-tiolálódnak (Eaton és mtsai, 2002a). Ezen adatok a humán izolált szívizomsejteken nyert eredményeinkkel összhangban a myocardium struktúrális és regulatórikus fehérjéit egyaránt érintő SH specifikus változásokat igazoltak. Azonban kísérleteinkben nem figyeltünk meg változást a cardiomyocyták mikroszkópos szerkezetében, még a kontraktilis erőt nullára csökkentő SH oxidáció mellett sem. Ez ellentétben áll laboratóriumunk korábbi eredményeivel, mely szerint a peroxinitrit (Borbély és mtsai, 2005) és egy proteolitikus enzim, a μ -calpain (Papp és mtsai, 2000) a sarcomer struktúrát mikroszkópos képek alapján jól láthatóan károsította. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a SH oxidáció a kontraktilis erő finom regulációján keresztül befolyásolja a myofibrilláris erő generációt, anélkül, hogy változást eredményezne a sarcomerek szerkezetében.

Munkánk során célunk volt különböző redukálószeres SH specifikus mechanikai változásokra kifejtett hatását és revertáló képességét is megvizsgálni. Redukálószeres DTDP után alkalmazva nem kaptunk egységes eredményeket. A DTT a SH tartalomban, a Ca^{2+} -aktivált maximális erőben, a Ca^{2+} -érzékenységben és a keresztkötési kinetikában oxidációt követően kialakult változásokat egyaránt hatékonyan revertálta. A GSH és a NAC viszont ezen kontraktilis paramétereknek további romlását eredményezte, míg a SH tartalmat koncentráció függő módon revertálta. Meg kell azonban jegyezzük, hogy pontos koncentráció-hatás összefüggések felvételére ebben az esetben nem került sor, így a GSH és NAC nagyobb koncentrációban a funkcionális paraméterekre elképzelhetően nagyobb hatással is lehet.

Összehasonlítva a DTDP Ca^{2+} -aktivált erőre és a SH oxidációra gyakorolt koncentráció-függő hatását meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a fehérjék SH csoportjainak legalább 50%-ban oxidálódnia kell szignifikáns erőcsökkenés kialakulásához. A legkifejezettebb erőcsökkenést okozó DTDP koncentrációknál (1-10 mM) két kontraktilis protein (26 kDa és 45 kDa) teljes SH

oxidációjára hívták fel a figyelmet biokémiai meghatározásaink. Ezen myocardiális mechanikára kritikus hatással bíró fehérjéknek megkíséreltük az azonosítását. Immunprecipitációval MLC1-ként azonosítottuk a 26 kDa molekulatömegű fehérjét. A 45 kDa-nál futó fehérjét molekulatömeg és nagy mennyiségben megfigyelt előfordulása alapján aktinként határoztuk meg. Ezek az eredmények a szakirodalmi adatokkal is összhangban vannak. Jelenlegi feltételezések szerint a MLC1-nek meghatározó szerepe van a miozin motor finom hangolásán keresztül az erő generálásra és a keresztkötési kinetikára (Hernandez és mtsai, 2007; Lowey és mtsai, 1993). Továbbá állatkísérletes modellekben több bizonyíték létezik az aktin ischaemia-reperfúzió alatti oxidációjával kapcsolatban (Canton és mtsai, 2004; Eaton és mtsai, 2002a; Milzani és mtsai, 1997; Powell és mtsai, 2001). Vizsgálataink alapján más fehérjék oxidációjának is kiemelt szerepe lehet az erő generálásra, mint pl. a miozin kötő protein C-nek, vagy a dezminnek. A cTnI proteolitikus fragmentációja más mechanizmusokkal együtt a stunning legvalószínűbb mechanizmusának tűnik jelenleg (Bolli és Marban, 1999; Gao és mtsai, 1997; Murphy és mtsai, 2000). Ezzel szemben vizsgálataink alapján a cTnI SH oxidációjának szerepe a myofibrilláris dysfunkcióban kevésbé valószínű.

A peroxinitritre, a NO metabolitjára, számos esetben mint az egyik legkárosabb nitrozatív ágensre hivatkoznak (Katori és mtsai, 2006; Wang és Zweier, 1996; Weinstein és mtsai, 2000), habár a peroxinitritnek ismertek fiziológiás funkciói is (Ferdinandy, 2006). A peroxinitrit káros hatásait összefüggésbe hozták ischaemiás reperfúziós károsodással, citokin indukált, és szívelégtelenségben kialakuló kontraktilis dysfunkcióval. A peroxinitrit által mediált tirozin oldalláncok oxidációja nitrotirozin képződést eredményez, melyet a peroxinitrit által kiváltott fehérje károsodás jelének tartanak (Reiter és mtsai, 2000). Azonban a peroxinitrit reagál a proteinek SH csoportjaival is. Ebben a munkában célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a peroxinitrit által kiváltott mechanikai változások SH dependens komponensét, valamint a peroxinitrit hatásait összehasonlítsuk a SH specifikus DTDP hatásaival. 50 μ M peroxinitrit alkalmazása közel 50%-os kontraktilis erőcsökkenést eredményezett, melyet követően DTT-t és NAC-t szekvenciálisan adva a F_0 -t részlegesen, de szignifikáns mértékben növelni tudtuk. Peroxinitrit adását követően alkalmazott redukálószerekkel kiváltott reverzió alapján a peroxinitrit SH oxidáló hatása körülbelül 20%-ban tehető felelőssé az F_0 csökkenésben. Összességében tehát úgy tűnik, hogy a peroxinitrit mediált mechanikai változások kisebb része

tulajdonítható SH oxidációnak, míg nagyobb hányada az egyéb protein módosulások, elsősorban nitrotirozin képződés számlájára írható (Goll és *mtsai*, 1991a).

Laboratóriumunk korábbi eredményei alapján a peroxinitrit mediált kontraktilis változások leginkább a struktúrális protein, az α -aktinin nirtációjához köthető, szemben a DTDP okozta változásokkal, ahol az aktin és az MLC1 oxidációja volt kiemelhető. A sarcomer fehérjék eltérő részvétele a DTDP és peroxinitrit mediált hatásban magyarázhatja, hogy miért nem változott a keresztkötési kinetika peroxinitrit esetén, és miért módosult DTDP alkalmazásakor. SH specifikus biotiniláció peroxinitrit hatására a fehérjék mérsékelt, de valamennyi fehérjét egyformán érintő SH oxidációját bizonyította, a DTDP kezelés hatására megfigyelt szelektív oxidációval szemben. Ugyanakkor a peroxinitrit SH oxidáló hatása kapcsán nem tudtunk megnevezni egyetlen konkrét sarcomer fehérjét sem, melynek a változása kritikus hatással bírt volna a mechanikára.

Az összevethető mértékű SH tartalom csökkenést okozó 50 μ M peroxinitrit és 0,1 mM DTDP-t követően 10 mM GSH és NAC nem eredményezett reverziót a SH csoportok számában, szemben 10 mM DTT vagy 100 mM GSH és NAC alkalmazásával. Ezen eredmények azt mutatják, hogy kellően magas koncentrációban a GSH és NAC is képes rendszerünkben az SH csoportok oxidációját revertálni.

A reverzió vonatkozásában kapott eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy a DTT egy rendkívül hatékony redukálószernek bizonyult, mely a SH oxidációhoz köthető biokémiai és mechanikai változásokat is revertálta. A GSH-nal és NAC-nel kapott eredmények látszólag ellentmondásosak voltak. DTDP után mindkettő a SH csoportok számában részleges reverziót eredményezett, mely azonban érdekes módon a F_o , $k_{tr,max}$ további csökkenését, valamint a passzív erő többszörös növekedését okozta. Ugyanakkor peroxinitrit után a DTT és a NAC a kontraktilis változás részleges reverzióját váltotta ki.

Ismert, hogy a SH oxidáló ágensek a tiol csoportokkal sokféleképpen léphetnek reakcióba, inter- és intramolekuláris diszulfid hidak, valamint vegyes diszulfidok kialakulását eredményezve. Így például a DTDP a proteinek között és a proteineken belül diszulfid hidakat alakíthat ki. Ezen kívül önmaga ketté hasadva az egyik fele a fehérje ciszteinjéhez kötődhet, míg a másik fele tiopiridon formájában felszabadul (Lamb és Posterino, 2003). A DTT alacsony redox potenciáljának köszönhetően a fehérjék diszulfid kötéseit és a vegyes diszulfidokat is hatékonyan képes redukálni (CLELAND, 1964). A gyengébb redukálószerként ismert GSH és NAC

hatékonysága kísérleteinkben elmaradt a DTT-től. Ismert, hogy az antioxidánsokkal folytatott humán nagy klinikai tanulmányok eredményei szintén ellentmondásosak (Ceconi és *mtsai*, 2003; Griendling és FitzGerald, 2003; Munteanu és *mtsai*, 2004). Ugyanakkor a NAC humán alkalmazásával nem egy vizsgálat pozitív eredménnyel zárult (Koramaz és *mtsai*, 2006). A humán klinikai tanulmányok változatos eredményei és izolált szívizomsejteken végzett kísérleteink is az antioxidánsok és az alkalmazási körülményeik megfelelő megválasztására hívja fel a figyelmet.

Összefoglalva kísérleteink igazolták, hogy a Ca^{2+} -aktivált aktív erő, a Ca^{2+} -független passzív erő és az aktin-miozin ciklus kinetikája komplex összefüggést mutat a kontraktilis fehérjék SH oxidációjával. A Ca^{2+} -reguláció és az SH státusz közötti kapcsolat a sejten belüli antioxidáns rendszerek hatékony működésének fontosságára hívja fel a figyelmet. A SH oxidáció által kiváltott mechanikai változások méréseink alapján hozzájárulhatnak a postischaemiás kontraktilis depresszió, más néven a stunning kialakulásához. Adataink alapján néhány kritikus kontraktilis fehérje SH státusza kiemelt jelentőséggel bír a Ca^{2+} -regulált erő generálás szempontjából. Humán modell vizsgálatainkban a SH oxidáció szerepét igazoltuk a peroxinitrit kiváltotta kontraktilis depresszióban is, habár itt ez a folyamat kisebb jelentőséggel bírt. A myofibrilláris fehérjék redukált és oxidált állapotának különböző kombinációi ellentétes hatásokat is eredményezhetnek a kontraktilis funkcióban. A SH oxidáció reverzibilitásának vizsgálata során nyert eredmények és az azokból levonható következtetések hozzájárulhatnak az oxidatív stresszel összekapcsolható betegségekben a gyógyszeres terápia elvek kidolgozásához.

5. Összefoglalás

Az oxidatív stressz és a szulfhidril (SH) oxidáció szerepéről sok ismerettel rendelkezünk az ischaemiás-reperfúziós károsodás és a szívelégtelenség kapcsán, azonban a mechanikai funkciózavar kialakulásának mechanizmusa nem tisztázott. Kutatásaink során ezért célul tűztük ki, hogy humán bal kamrai izolált szívműsejteken vizsgáljuk a myofibrilláris rendszer fehérjéinek SH csoportjain bekövetkező oxidáció Ca^{2+} -aktivált maximális (F_0) és Ca^{2+} -független passzív ($F_{\text{passzív}}$) erőre, valamint az aktin-miozin ciklus kinetikájára (k_{tr}) gyakorolt hatását. In vitro modell kísérleteinkben a SH oxidációt ditiodipiridinnel (DTDP) és peroxinitrittel, revertálhatóságát ditiotreitollal (DTT), redukált glutationnal (GSH), N-acetil-L-ciszteinnel (NAC) vizsgáltuk.

DTDP a kontraktilis fehérjék oxidációjával párhuzamosan csökkentette az F_0 -t ($EC_{50}=2.46\pm 0.22$ mM). Az erőcsökkenéssel párhuzamos mechanikai és biokémiai változatokat a továbbiakban 2,5 mM DTDP kezelés mellett vizsgáltuk. 2,5 mM DTDP egyaránt csökkentette az F_0 -t (64%-ra), a Ca^{2+} -érzékenységet ($\Delta pCa_{50}=0,22\pm 0,02$) és a k_{tr} -t (75%-ra), míg a $F_{\text{passzív}}$ kismértékű (10%-os) emelkedését eredményezte. Ezen változásokkal párhuzamosan a myofibrilláris fehérjék szabad SH tartalma 15%-ra csökkent. DTT-vel a vizsgált paraméterekben, a $F_{\text{passzív}}$ -t kivéve, teljes reverziót értünk el, szemben a GSH-nal és NAC-nel, melyek alkalmazásával a részlegesen revertált SH tartalom mellett a kontraktilis paraméterek további romlását tapasztaltuk. A SH oxidációt molekuláris szinten vizsgálva azonosítottuk a miozin könnyű lánc 1-et és az aktint, melyek oxidációjának kritikus szerepe lehet a kontraktilis változások létrejöttében.

Kísérleteinkben igazoltuk a SH oxidáció szerepét a peroxinitrit kiváltotta kontraktilis depresszióban is. Az 50 μM peroxinitrit kezelés hatására az F_0 $56 \pm 4\%$ -ra csökkent, melyet 10 mM DTT és 10 mM NAC alkalmazásával egyaránt sikerült részlegesen revertálni $69 \pm 4\%$ - illetve $71 \pm 7\%$ -ra. Így a peroxinitrit mediált Ca^{2+} -aktivált erő csökkenésért a SH oxidáció ezen kisebb, revertálható hányadban tehető felelőssé.

Eredményeink alapján a Ca^{2+} -aktivált maximális erő, a Ca^{2+} -független passzív erő és az aktin-miozin ciklus kinetikája a myofibrilláris fehérjék SH státusával szoros összefüggést mutat. Vizsgálataink alapján a kontraktilis fehérjék SH oxidációja hozzájárulhat ischaemiás-reperfúziós károsodás és szívelégtelenség során kialakuló kontraktilis dysfunkcióhoz. Végül, ezen

kontraktilitást csökkentő hatások revertálhatósága felhívja a figyelmet a megfelelően alkalmazott antioxidáns kezelésekben rejlő terápiás lehetőségekre.

6. Köszönetnyilvánítás

Külön köszönettel tartozom témavezetőimnek: Dr. Papp Zoltánnak a DEOEC Kardiológiai Intézet Klinikai Fiziológiai Tanszék vezetőjének és Dr. Tóth Attila adjunktusnak a szakmai irányításukért, a Ph.D. tanulmányaim alatt és a disszertáció elkészítéséhez nyújtott pótolhatatlan segítségükért és tanácsaikért.

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Kardiológiai Intézet munkatársainak, kiemelten Professzor Dr. Édes István Intézet Igazgató Úrnak, hogy a Debreceni Egyetem Doktori Iskola keretében végzett munkámat mindenkor támogatták.

Köszönöm a Klinikai Fiziológiai Tanszék valamennyi dolgozójának a munkám elvégzésében nyújtott önzetlen segítségét.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Hivatkozott közlemények listája

(1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. **354**, 447-455.

Adeghate, E. (2004). Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol.Cell Biochem*. **261**, 187-191.

Al Abed, Y., VanPatten, S., Li, H., Lawson, J. A., FitzGerald, G. A., Manogue, K. R., & Bucala, R. (2001). Characterization of a novel hemoglobin-glutathione adduct that is elevated in diabetic patients. *Mol.Med*. **7**, 619-623.

Allen, D. G. & Orchard, C. H. (1987). Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ.Res*. **60**, 153-168.

Arstall, M. A., Yang, J., Stafford, I., Betts, W. H., & Horowitz, J. D. (1995). N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects. *Circulation*. **92**, 2855-2862.

Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Konig, S., Fales, H. M., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B., & Chock, P. B. (1999). Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry*. **38**, 6699-6705.

Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am.J Physiol*. **271**, C1424-C1437.

Beckmann, J. S., Ye, Y. Z., Anderson, P. G., Chen, J., Accavitti, M. A., Tarpey, M. M., & White, C. R. (1994). Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol.Chem Hoppe Seyler*. **375**, 81-88.

Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., & Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. **65**, 1865-1874.

Bolli, R. & Marban, E. (1999). Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*. **79**, 609-634.

- Bolli, R., Patel, B. S., Hartley, C. J., Thornby, J. I., Jeroudi, M. O., & Roberts, R. (1989). Nonuniform transmural recovery of contractile function in stunned myocardium. *Am.J Physiol.* **257**, H375-H385.
- Borbely, A., Toth, A., Edes, I., Virag, L., Papp, J. G., Varro, A., Paulus, W. J., Van, D., V, Stienen, G. J., & Papp, Z. (2005). Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc.Res.* **67**, 225-233.
- Borges, C. R., Geddes, T., Watson, J. T., & Kuhn, D. M. (2002). Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation. Potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition during oxidative stress. *J Biol.Chem.* **277**, 48295-48302.
- Canton, M., Neverova, I., Menabo, R., Van Eyk, J., & Di Lisa, F. (2004). Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **286**, H870-H877.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., & Keshert, E. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* **394**, 485-490.
- Ceconi, C., Bernocchi, P., Boraso, A., Cargnoni, A., Pepi, P., Curello, S., & Ferrari, R. (2000). New insights on myocardial pyridine nucleotides and thiol redox state in ischemia and reperfusion damage. *Cardiovasc.Res.* **47**, 586-594.
- Ceconi, C., Boraso, A., Cargnoni, A., & Ferrari, R. (2003). Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch.Biochem.Biophys.* **420**, 217-221.
- CLELAND, W. W. (1964). DITHIOTHREITOL, A NEW PROTECTIVE REAGENT FOR SH GROUPS. *Biochemistry* **3**, 480-482.
- Dai, T., Tian, Y., Tocchetti, C. G., Katori, T., Murphy, A. M., Kass, D. A., Paolocci, N., & Gao, W. D. (2007). Nitroxyl increases force development in rat cardiac muscle. *J Physiol.* **580**, 951-960.
- Date, M. O., Morita, T., Yamashita, N., Nishida, K., Yamaguchi, O., Higuchi, Y., Hirotsu, S., Matsumura, Y., Hori, M., Tada, M., & Otsu, K. (2002). The antioxidant N-2-mercaptopyrionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model. *J Am.Coll.Cardiol.* **39**, 907-912.

- Davies, K. J., Lin, S. W., & Pacifici, R. E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J Biol.Chem.* **262**, 9914-9920.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., & Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem.J.* **324**, 1-18.
- Delanty, N., Reilly, M. P., Pratico, D., Lawson, J. A., McCarthy, J. F., Wood, A. E., Ohnishi, S. T., Fitzgerald, D. J., & FitzGerald, G. A. (1997). 8-epi PGF2 alpha generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. *Circulation.* **95**, 2492-2499.
- Di Lisa, F., De Tullio, R., Salamino, F., Barbato, R., Melloni, E., Siliprandi, N., Schiaffino, S., & Pontremoli, S. (1995). Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem.J.* **308**, 57-61.
- Dingchao, H., Zhiduan, Q., Liye, H., & Xiaodong, F. (1994). The protective effects of high-dose ascorbic acid on myocardium against reperfusion injury during and after cardiopulmonary bypass. *Thorac.Cardiovasc.Surg.* **42**, 276-278.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82**, 47-95.
- Eaton, P., Byers, H. L., Leeds, N., Ward, M. A., & Shattock, M. J. (2002a). Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. *J Biol.Chem.* **277**, 9806-9811.
- Eaton, P., Wright, N., Hearse, D. J., & Shattock, M. J. (2002b). Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J Mol.Cell Cardiol.* **34**, 1549-1560.
- Eisner, D. A., Nichols, C. G., O'Neill, S. C., Smith, G. L., & Valdeolmillos, M. (1989). The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cells. *J Physiol.* **411:393-418.**, 393-418.
- Elliott, A. C., Smith, G. L., Eisner, D. A., & Allen, D. G. (1992). Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts. *J Physiol.* **454:467-90.**, 467-490.
- Ferdinandy, P. (2006). Peroxynitrite: just an oxidative/nitrosative stressor or a physiological regulator as well? *Br.J Pharmacol.* **148**, 1-3.

Ferdinandy, P., Danial, H., Ambrus, I., Rothery, R. A., & Schulz, R. (2000). Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ.Res.* **87**, 241-247.

Ferrari, R., Agnoletti, L., Comini, L., Gaia, G., Bachetti, T., Cargnoni, A., Ceconi, C., Curello, S., & Visioli, O. (1998). Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur.Heart J.* **19 Suppl B:B2-11.**, B2-11.

Ferrari, R., Alfieri, O., Curello, S., Ceconi, C., Cargnoni, A., Marzollo, P., Pardini, A., Caradonna, E., & Visioli, O. (1990). Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart. *Circulation.* **81**, 201-211.

Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A., Alfieri, O., Pardini, A., Marzollo, P., & Visioli, O. (1991). Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. *Am J Med.* **91**, 95S-105S.

Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., & Ghezzi, P. (2002). Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A.* **99**, 3505-3510.

Gao, W. D., Atar, D., Backx, P. H., & Marban, E. (1995). Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca^{2+} responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ.Res.* **76**, 1036-1048.

Gao, W. D., Atar, D., Liu, Y., Perez, N. G., Murphy, A. M., & Marban, E. (1997). Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ.Res.* **80**, 393-399.

Gao, W. D., Liu, Y., Mellgren, R., & Marban, E. (1996). Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca^{2+} -dependent proteolysis? *Circ.Res.* **78**, 455-465.

Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic.Biol.Med.* **32**, 1264-1275.

Giordano, F. J. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin.Invest.* **115**, 500-508.

- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Colombo, R., Petralia, S., Giampaoletti, S., Milzani, A., & Rossi, R. (2003). Protein glutathionylation in erythrocytes. *Clin.Chem.* **49**, 327-330.
- Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., Colombo, R., & Dalle-Donne, I. (2004). S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol.Med.* **8**, 201-212.
- Goll, D. E., Dayton, W. R., Singh, I., & Robson, R. M. (1991a). Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J Biol.Chem.* **266**, 8501-8510.
- Goll, D. E., Dayton, W. R., Singh, I., & Robson, R. M. (1991b). Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J Biol.Chem.* **266**, 8501-8510.
- Griendling, K. K. & FitzGerald, G. A. (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* **108**, 2034-2040.
- Griendling, K. K., Sorescu, D., & Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.* **86**, 494-501.
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., & Davies, K. J. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **305**, 709-718.
- Haddad, I. Y., Pataki, G., Hu, P., Galliani, C., Beckman, J. S., & Matalon, S. (1994). Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin.Invest.* **94**, 2407-2413.
- Hampton, M. B., Fadeel, B., & Orrenius, S. (1998). Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **854:328-35.**, 328-335.
- Hare, J. M. (2003). Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol.Cell Cardiol.* **35**, 719-729.
- Hare, J. M. & Stamler, J. S. (2005b). NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin.Invest.* **115**, 509-517.
- Hare, J. M. & Stamler, J. S. (2005a). NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin.Invest.* **115**, 509-517.

Hernandez, O. M., Jones, M., Guzman, G., & Szczesna-Cordary, D. (2007). Myosin essential light chain in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol.* **292**, H1643-H1654.

Hertelendi, Z., Tóth, A., Borbély, A., Galajda, Z., van der Velden, J., Stienen, G. J. M., Édes, I., & Papp, Z. (2008). Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antiox.Redox.Signal.* **in press**.

Higuchi, Y., Otsu, K., Nishida, K., Hirotani, S., Nakayama, H., Yamaguchi, O., Matsumura, Y., Ueno, H., Tada, M., & Hori, M. (2002). Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol.Cell Cardiol.* **34**, 233-240.

Hilenski, L. L., Clempus, R. E., Quinn, M. T., Lambeth, J. D., & Griendling, K. K. (2004). Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24**, 677-683.

Hirotani, S., Otsu, K., Nishida, K., Higuchi, Y., Morita, T., Nakayama, H., Yamaguchi, O., Mano, T., Matsumura, Y., Ueno, H., Tada, M., & Hori, M. (2002). Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation.* **105**, 509-515.

Humphries, K. M., Juliano, C., & Taylor, S. S. (2002). Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J Biol.Chem.* **277**, 43505-43511.

Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Utsumi, H., Kang, D., Hattori, N., Uchida, K., Arimura, K., Egashira, K., & Takeshita, A. (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ.Res.* **85**, 357-363.

Ishida, H., Ichimori, K., Hirota, Y., Fukahori, M., & Nakazawa, H. (1996). Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury. *Free Radic.Biol.Med.* **20**, 343-350.

Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., & Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* **12**, 149-162.

Katori, T., Donzelli, S., Tocchetti, C. G., Miranda, K. M., Cormaci, G., Thomas, D. D., Ketner, E. A., Lee, M. J., Mancardi, D., Wink, D. A., Kass, D. A., & Paolocci, N. (2006). Peroxynitrite and myocardial contractility: in vivo versus in vitro effects. *Free Radic.Biol.Med.* **41**, 1606-1618.

Kentish, J. C. (1986). The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *J Physiol.* **370:585-604.**, 585-604.

Kentish, J. C. (1991). Combined inhibitory actions of acidosis and phosphate on maximum force production in rat skinned cardiac muscle. *Pflugers Arch.* **419**, 310-318.

Klatt, P. & Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur.J Biochem.* **267**, 4928-4944.

Kloner, R. A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., & Braunwald, E. (1998). Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation.* **97**, 1848-1867.

Kooy, N. W., Royall, J. A., Ye, Y. Z., Kelly, D. R., & Beckman, J. S. (1995). Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am.J Respir.Crit Care Med.* **151**, 1250-1254.

Koramaz, I., Pulathan, Z., Usta, S., Karahan, S. C., Alver, A., Yaris, E., Kalyoncu, N. I., & Ozcan, F. (2006). Cardioprotective effect of cold-blood cardioplegia enriched with N-acetylcysteine during coronary artery bypass grafting. *Ann.Thorac.Surg.* **81**, 613-618.

Kunsch, C. & Medford, R. M. (1999). Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ.Res.* **85**, 753-766.

Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, D. G., & Dikalov, S. (2003). Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol.Chem.* **278**, 22546-22554.

Kwon, S. H., Pimentel, D. R., Remondino, A., Sawyer, D. B., & Colucci, W. S. (2003). H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol.Cell Cardiol.* **35**, 615-621.

Lamb, G. D. & Posterino, G. S. (2003). Effects of oxidation and reduction on contractile function in skeletal muscle fibres of the rat. *J.Physiol* **546**, 149-163.

Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., Mitch, W. E., & Harrison, D. G. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin.Invest.* **111**, 1201-1209.

Landmesser, U., Spiekermann, S., Dikalov, S., Tatge, H., Wilke, R., Kohler, C., Harrison, D. G., Hornig, B., & Drexler, H. (2002). Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. **106**, 3073-3078.

Li, J. M., Gall, N. P., Grieve, D. J., Chen, M., & Shah, A. M. (2002). Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*. **40**, 477-484.

Lind, C., Gerdes, R., Hamnell, Y., Schuppe-Koistinen, I., von Lowenhielm, H. B., Holmgren, A., & Cotgreave, I. A. (2002). Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch.Biochem.Biophys*. **406**, 229-240.

Lowey, S., Waller, G. S., & Trybus, K. M. (1993). Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speeds of shortening. *Nature*. **365**, 454-456.

Mallat, Z., Philip, I., Lebre, M., Chatel, D., Maclouf, J., & Tedgui, A. (1998). Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation*. **97**, 1536-1539.

Marban, E., Koretsune, Y., Corretti, M., Chacko, V. P., & Kusuoka, H. (1989). Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation*. **80**, IV17-IV22.

Marczin, N., El Habashi, N., Hoare, G. S., Bundy, R. E., & Yacoub, M. (2003). Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch.Biochem.Biophys*. **420**, 222-236.

Matsumura, Y., Saeki, E., Inoue, M., Hori, M., Kamada, T., & Kusuoka, H. (1996). Inhomogeneous disappearance of myofilament-related cytoskeletal proteins in stunned myocardium of guinea pig. *Circ.Res*. **79**, 447-454.

Mickle, D. A., Weisel, R. D., Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1991). Effect of orally administered alpha-tocopheryl acetate on human myocardial alpha-tocopherol levels. *Cardiovasc.Drugs Ther*. **5 Suppl 2:309-12.**, 309-312.

Miller, R. M., Sies, H., Park, E. M., & Thomas, J. A. (1990). Phosphorylase and creatine kinase modification by thiol-disulfide exchange and by xanthine oxidase-initiated S-thiolation. *Arch.Biochem.Biophys*. **276**, 355-363.

- Milzani, A., DalleDonne, I., & Colombo, R. (1997). Prolonged oxidative stress on actin. *Arch.Biochem.Biophys.* **339**, 267-274.
- Mohr, S., Hallak, H., de Boitte, A., Lapetina, E. G., & Brune, B. (1999). Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol.Chem.* **274**, 9427-9430.
- Munteanu, A., Zingg, J. M., & Azzi, A. (2004). Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality? *J Cell Mol.Med.* **8**, 59-76.
- Murphy, A. M., Kogler, H., Georgakopoulos, D., McDonough, J. L., Kass, D. A., Van Eyk, J. E., & Marban, E. (2000). Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science* **287**, 488-491.
- Niwa, T., Naito, C., Mawjood, A. H., & Imai, K. (2000). Increased glutathionyl hemoglobin in diabetes mellitus and hyperlipidemia demonstrated by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Clin.Chem.* **46**, 82-88.
- Nossuli, T. O., Hayward, R., Scalia, R., & Lefer, A. M. (1997). Peroxynitrite reduces myocardial infarct size and preserves coronary endothelium after ischemia and reperfusion in cats. *Circulation.* **96**, 2317-2324.
- Nulton-Persson, A. C., Starke, D. W., Mieyal, J. J., & Szweda, L. I. (2003). Reversible inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in response to alterations in the mitochondrial glutathione status. *Biochemistry.* **42**, 4235-4242.
- Palmer, S. & Kentish, J. C. (1994). The role of troponin C in modulating the Ca²⁺ sensitivity of mammalian skinned cardiac and skeletal muscle fibres. *J Physiol.* **480**, 45-60.
- Papp, Z., Van, D., V, & Stienen, G. J. (2000). Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc.Res.* **45**, 981-993.
- Pastore, A., Tozzi, G., Gaeta, L. M., Bertini, E., Serafini, V., Di Cesare, S., Bonetto, V., Casoni, F., Carrozzo, R., Federici, G., & Piemonte, F. (2003). Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich's ataxia: a potential role in the pathogenesis of the disease. *J Biol.Chem.* **278**, 42588-42595.
- Pimentel, D. R., Amin, J. K., Xiao, L., Miller, T., Viereck, J., Oliver-Krasinski, J., Baliga, R., Wang, J., Siwik, D. A., Singh, K., Pagano, P., Colucci, W. S., & Sawyer, D. B. (2001). Reactive

oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ.Res.* **89**, 453-460.

Piper, H. M., Garcia-Dorado, D., & Ovize, M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc.Res.* **38**, 291-300.

Posterino, G. S. & Lamb, G. D. (1996). Effects of reducing agents and oxidants on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad. *J.Physiol* **496** (Pt 3), 809-825.

Powell, S. R., Gurzenda, E. M., & Wahezi, S. E. (2001). Actin is oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic.Biol.Med.* **30**, 1171-1176.

Rahman, I. (2003). Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem.Mol.Biol.* **36**, 95-109.

Reddy, S., Jones, A. D., Cross, C. E., Wong, P. S., & Van, D., V (2000). Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *Biochem.J.* **347 Pt 3:821-7.**, 821-827.

Reiter, C. D., Teng, R. J., & Beckman, J. S. (2000). Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol.Chem.* **275**, 32460-32466.

Ryan, H. E., Lo, J., & Johnson, R. S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* **17**, 3005-3015.

Solaro, R. J., Pang, D. C., & Briggs, F. N. (1971). The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100. *Biochim.Biophys.Acta.* **245**, 259-262.

Suzuki, S., Kaneko, M., Chapman, D. C., & Dhalla, N. S. (1991). Alterations in cardiac contractile proteins due to oxygen free radicals. *Biochim.Biophys.Acta.* **1074**, 95-100.

Takayama, F., Tsutsui, S., Horie, M., Shimokata, K., & Niwa, T. (2001). Glutathionyl hemoglobin in uremic patients undergoing hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int.Suppl.* **78:S155-8.**, S155-S158.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J Biochem.Cell Biol.* **39**, 44-84.

Viner, R. I., Williams, T. D., & Schoneich, C. (1999). Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry*. **38**, 12408-12415.

Vinten-Johansen, J. (2000). Physiological effects of peroxynitrite: potential products of the environment. *Circ.Res.* **87**, 170-172.

von Harsdorf, R., Li, P. F., & Dietz, R. (1999). Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*. **99**, 2934-2941.

Wang, P. & Zweier, J. L. (1996). Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J.Biol.Chem.* **271**, 29223-29230.

Ward, N. E., Stewart, J. R., Ioannides, C. G., & O'Brian, C. A. (2000). Oxidant-induced S-glutathiolation inactivates protein kinase C- α (PKC- α): a potential mechanism of PKC isozyme regulation. *Biochemistry*. **39**, 10319-10329.

Weinstein, D. M., Mihm, M. J., & Bauer, J. A. (2000). Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **294**, 396-401.

Weitz, Z. W., Birnbaum, A. J., Sobotka, P. A., Zarling, E. J., & Skosey, J. L. (1991). High breath pentane concentrations during acute myocardial infarction. *Lancet*. **337**, 933-935.

Yau, T. M., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Burton, G. W., Ingold, K. U., Ivanov, J., Mohabeer, M. K., Tumati, L., & Carson, S. (1994). Vitamin E for coronary bypass operations. A prospective, double-blind, randomized trial. *J Thorac.Cardiovasc.Surg.* **108**, 302-310.

Yoshida, K., Inui, M., Harada, K., Saido, T. C., Sorimachi, Y., Ishihara, T., Kawashima, S., & Sobue, K. (1995). Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ.Res.* **77**, 603-610.

Yusuf, S., Dagenais, G., Pogue, J., Bosch, J., & Sleight, P. (2000). Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N.Engl.J Med.* **342**, 154-160.

Zot, A. S. & Potter, J. D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu.Rev Biophys.Biophys.Chem.* **16:535-59.**, 535-559.

7.2. Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

1. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, van der Velden J, Stienen GJ, Édes I, Papp Z. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca^{2+} sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(7):1175-84.

impakt faktor: 5,484

2. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Édes I, Tósaki A, Papp Z. The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2008; [Epub ahead of print] doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00445.x

impakt faktor: 6,807

7.3. Az értekezéshez fel nem használt *in extenso* közlemények

1. Kaheinen P, Pollesello P, **Hertelendi Z**, Borbély A, Szilágyi S, Nissinen E, Haikala H, Papp Z. Positive inotropic effect of levosimendan is correlated to its stereoselective Ca^{2+} sensitizing effect but not to stereoselective phosphodiesterase inhibition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006; 98(1):74-8.

impakt faktor: 1,788

2. Birinyi P, Tóth A, Jóna I, Acsai K, Almássy J, Nagy N, Prorok J, Gherasim I, Papp Z, **Hertelendi Z**, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp F, Papp JG, Varró A, Nánási PP, Magyar J. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca^{2+} transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2008; 78(3):476-84.

impakt faktor: 6,127

3. Molnár A, Borbély A, Czuriga D, Siket MI, Szilágyi Sz, **Hertelendi Z**, Pásztor TE, Galajda Z, Szerafin T, Jaquet K, Papp Z, Édes I, Tóth A. Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2008; (in press)

impakt faktor:5,581

7.4. Idézhető absztraktok

1. Barta J, Tóth A, **Hertelendi Z**, Édes I, Jacquet K, Reidlich A, Papp Z. Protection of Calpain-1 induced cTnI degradation by PKA phosphorylation in vitro. J Mol Cell Cardiol. 2000; 34:A7.
2. Barta J, Tóth A, **Hertelendi Z**, Édes I, Jacquet K, Reidlich A, Papp Z. The effects of missense mutations on Calpain-1 induced cTnI degradation. Cardiol Hung. 2002; Suppl.1:89.
3. **Hertelendi Z**, Tóth A, Jenei Cs, Édes I, Jacquet K, Papp Z. A myocardium ischaemiás károsodása következtében felszabaduló troponin degradációs termékek vizsgálata Cardiol. Hung. 2005; 35:A20.
4. **Hertelendi Z**, Tóth A, Jenei Cs, Édes I, Jacquet K, Papp Z. Troponin I degradation products released into the bloodstream during myocardial ischaemic injury. J Muscle Res Cell Motil. 2005; 26:81.
5. Borbély A, **Hertelendi Z**, Tóth A, Szilágyi Sz, Édes I, Varró A, Papp JGy, Papp Z. Contractile alterations in isolated human cardiomyocytes following oxidative protein modifications. J Muscle Res Cell Motil 2005; 26:81.
6. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Contractile protein oxidation and its mechanical consequence in the human myocardium. Cardiol Hung 2006; 36:A20.
7. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Possible molecular determinants of altered myocardial function during oxidative stress. Eur J Heart Failure. 2006; 5S1:371.

8. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Contractile protein oxidation and its mechanical consequence in the human myocardium *Exp Clin Cardiol.* 2006; 11:3.

9. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Contractile protein oxidation and its mechanical consequence in the human myocardium. *New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 7th Meeting*, című rendezvény kongresszusi kiadványa 2006; p45.

10. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. The effects of different oxidoreductive agents on the contractile force production in human left ventricular cardiomyocytes. *Cardiol. Hung.* 2007; 37:A18.

11. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. A myofibrilláris rendszer oxidatív és nitrozatív károsodása humán kamrai szívműködősejtekben. *Biokémia* 2007; 31:53.

12. Papp Z, **Hertelendi Z**, Szilágyi Sz, Édes I, Pollesello P. Mechanisms of action of the Ca^{2+} -sensitizer levosimendan. *Acta Physiol.* 2007; 191:13.

13. **Hertelendi Z**, Toth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Sulfhydryl group oxidation of myofilament proteins reduces contractile force and its Ca^{2+} -sensitivity of human left ventricular cardiomyocytes. *Eur Heart J.* 2007; 28:433-434.

14. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Édes I, Papp Z. The effect of different oxidoreductive agents on the contractile force production in human left ventricular cardiomyocytes. *New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 8th Meeting*, című rendezvény kongresszusi kiadványa 2008; p68.

7.5. Előadások

1. **Hertelendi Z**, Tóth A, Jenei Cs, Édes I, Jacquet K, Papp Z. A myocardium ischaemiás károsodása következtében felszabaduló troponin degradációs termékek vizsgálata Magyar Kardiológusok Társasága Tudományos Kongresszusa, Balatonfüred, 2005. május

2. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. A kontraktilis fehérje oxidáció és mechanikai következményei a humán myocardiumban Magyar Kardiológusok Társasága Tudományos Kongresszusa, Balatonfüred, 2006. május

3. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. A kontraktilis fehérje oxidáció és mechanikai következményei a humán myocardiumban Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. június

4. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Contractile protein oxidation and its mechanical consequence in the human myocardium V. International Symposium on Myocardial Cytoprotection, Pécs, 2006. szeptember

5. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Különböző oxidoreduktív ágensek hatása a kontraktilitásra humán bal kamrai cardiomyocytákon Magyar Kardiológusok Társasága Tudományos Kongresszusa, Balatonfüred, 2007. május

7.6. Poszterek

1. **Hertelendi Z**, Tóth A, Jenei Cs, Édes I, Jacquet K, Papp Z. Troponin I degradation products released into the bloodstream during myocardial ischaemic injury. XXXIV European Muscle Conference, Hortobágy, 2005. szeptember

2. Borbély A, **Hertelendi Z**, Tóth A, Szilágyi Sz, Édes I, Varró A, Papp JGy, Papp Z. Contractile alterations in isolated human cardiomyocytes following oxidative protein modifications. XXXIV European Muscle Conference, Hortobágy, 2005. szeptember

3. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Possible molecular determinants of altered myocardial function during oxidative stress. Heart Failure Congress of the European Society of Cardiology, Helsinki, 2006. június

4. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Contractile protein oxidation and its mechanical consequence in the human myocardium. New frontiers in Basic Cardiovascular Research 7th meeting, Debrecen, 2006. október

5. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Sulfhydryl group oxidation of myofilament proteins reduces contractile force and its Ca^{2+} -sensitivity of human left ventricular cardiomyocytes. European Society of Cardiology Congress, Vienna, 2007. szeptember

6. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Édes I, Papp Z. The effect of different oxidoreductive agents on the contractile force production in human left ventricular cardiomyocytes. New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 8th Meeting, Krakow, 2008. június

8. Függelék