

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Fehérje karboniláció miofilamentáris hatásai és szerepe  
a posztinfarktusos szívizom-átépülésben**

**Dr. Balogh Ágnes**

**Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán**



**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2014**

## Tartalomjegyzék

1.	BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	3
1.1.	Miokardiális infarktus és a posztinfarktusos remodeláció .....	3
1.2.	A kontraktilis rendszer felépítése .....	5
1.3.	A kontrakció mechanizmusa .....	7
1.4.	A kontraktilis erő $Ca^{2+}$ -függése és annak meghatározása .....	8
1.5.	A kontraktilis rendszer posztinfarktusos remodelációja .....	9
1.6.	Szabad gyökök és oxidatív stressz .....	11
1.7.	Fehérje karboniláció .....	14
2.	CÉLKITŰZÉSEK .....	16
3.	METODIKÁK .....	17
3.1.	Szívizomminták .....	17
3.1.1.	Humán egészséges donor szívizomminták .....	17
3.1.2.	A miokardiális infarktus egérmódelje .....	17
3.1.2.1.	Experimentális szívinfarktus kialakítása .....	17
3.1.2.2.	Szívultrahang .....	18
3.1.2.3.	Az infarktus méretének becslése .....	18
3.2.	<i>In vitro</i> fehérje karboniláció Fenton-reakcióval .....	19
3.3.	Fehérje karboniláció kimutatása oxyblot módszerrel .....	19
3.4.	SH oxidáció vizsgálata .....	20
3.4.1.	Ellman-reakció .....	20
3.4.2.	SH-specifikus biotiniláció és Western immunoblot .....	21
3.5.	Kardiális TnI foszforilációs státuszának vizsgálata .....	21
3.6.	Rekombináns troponin komplexek karbonilációja .....	22
3.7.	Izometriás erőmérések permeabilizált szívizomsejt preparátumokon .....	23
3.7.1.	Poszttranszlációs fehérje módosulások funkcionális hatásainak vizsgálata .....	25
3.8.	Adatfeldolgozás, statisztikai analízis .....	26
4.	EREDMÉNYEK .....	27
4.1.	Humán szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek karbonilációja .....	27
4.1.1.	Fenton-kezelés karbonilációt indukál .....	27
4.1.2.	Agresszív Fenton-kezelés SH oxidációt okoz .....	27
4.1.3.	A fehérje karboniláció izometriás körülmények között csökkenti a kontraktilis erőt .....	29
4.1.4.	A fehérje karboniláció a szívizomsejtek kontraktilis diszfunkciójához vezet .....	31
4.2.	Posztinfarktusos szívizom-átépülés egér szívekben a szívizomsejtek szintjén .....	32
4.2.1.	Az infarktus mérete és globális bal kamra funkció .....	32
4.2.2.	Csökkent $Ca^{2+}$ -érzékenység miokardiális infarktus után .....	33
4.2.3.	Alacsonyabb TnI foszforiláció az infarktusos területen .....	35
4.2.4.	Fokozott SH oxidáció funkcionális következmények nélkül .....	38
4.2.5.	Intenzív karboniláció a szívinfarktust követő szívizom-átépülésben .....	38
4.2.6.	A karboniláció egér szívizomsejteken is csökkenti a $Ca^{2+}$ -érzékenységet .....	39
4.2.7.	A miofilamentumok karbonilációjának hatása független a foszforilációtól .....	42
5.	MEGBESZÉLÉS .....	45
5.1.	Kontraktilis fehérjék karbonilációja befolyásolja a humán szívizomsejtek kontraktilitását .....	45
5.2.	A karboniláció jelentősége a kontraktilis rendszer posztinfarktusos remodelációjában .....	49
6.	ÖSSZEFOGLALÁS .....	55
7.	RÖVIDÍTÉSJEJYZÉK .....	57
8.	IRODALOMJEJYZÉK .....	59
8.1.	Hivatkozott közlemények jegyzéke .....	59
8.2.	Saját közlemények jegyzéke .....	69
9.	TÁRGYSZAVAK .....	71
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	73
11.	FÜGGELÉK .....	74

# 1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

## 1.1. Miokardiális infarktus és a posztinfarktusos remodeláció

Az iszkémiás szívbetegség világszerte a vezető halálokok közé tartozik, az összhalálozás mintegy 12,8%-áért felelős. Európában minden hatodik férfi és hetedik nő halálát a miokardiális infarktus (MI) okozza [1]. Az akut szívinfarktus incidenciájára vonatkozó hazai adatok hiányosak, de különböző adatbázisok alapján becsülve Magyarországon évente 20 000 új infarktusos betegre számíthatunk [2]. A szívinfarktus az elhúzódó (>20 perc) iszkémia következtében létrejövő szívizomelhalás, melynek diagnózisa a klinikai tünetek, EKG eltérések és a kardiális nekroenzimek emelkedett szintje alapján állítható fel. A háttérben az esetek nagy részében ateroszklerotikus plakkruptúra és trombotikus koszorúér-elzáródás áll. Az utóbbi években számos nemzetközi tanulmány az akut miokardiális infarktus mind korai, mind késői halálozásának csökkenését mutatta, mely a primer koronária intervenció, a modern antitrombotikus kezelés és a szekunder prevenció elterjedésével magyarázható [1].

Ennek köszönhetően egyre több beteg éli túl az akut eseményt, ezeknél a pácienseknél azonban a posztinfarktusos szívizom-átépülés, remodeláció folyamatával kell számolnunk, mely végső soron szívelégtelenség kialakulásához vezethet. A szívizomzat infarktust követő átépülése mind a nekrotikus, mind az infarktus által közvetlenül nem érintett bal kamrai szegmentumokat magában foglalja, klinikailag a szívüregek kitágulásában, bal kamra hipertrófiában és romló szisztolés funkcióban nyilvánul meg, de a pontos celluláris és molekuláris mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak. Az infarktus akut szakasza során a szívizomsejtek apoptózis és nekrozis útján elhalnak. A nekrotizáló terület nagyságát az iszkémiás miokardium méretén kívül egyéb tényezők is befolyásolják, így a prekondicionálás mértéke vagy a kollaterális hálózat fejlettségi szintje [3].

A miokardium limitált endogén regeneratív kapacitásának köszönhetően az elhalt területen heg képződik. Az akut miokardiális izomvesztés következtében a neurohumorális rendszerek aktivációja következik be. Mindez az akut szakban kompenzatorikus jellegű, a perctérfogat fenntartása érdekében történik, azonban hosszú távon ezen folyamatok patológiás mértéket öltenek és hozzájárulnak a szívizomzat kóros átépüléséhez. Infarktus során elsőként a szimpatikus idegrendszer aktivációja figyelhető meg, melynek pozitív inotróp és kronotróp hatásai vannak. Ezzel hozzájárul a perctérfogat fenntartásához, azonban növeli a miokardium oxigénigényét, emellett a katekolaminok proarritmiás hatásával is számolnunk kell. Hosszú távon az elhúzódó szimpatikotónia a főtális génexpresszió aktiválódásához, bal kamra hipertrófiához, valamint fehérje oxidációhoz, kóros foszforilációs mintázathoz és kontraktilis diszfunkcióhoz vezet [4]. A kóros szívizom-átépüléshez hozzájárul még a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) fokozott működése is, mely vazokonstrikción és folyadék retenció által célozza a vérnyomás fenntartását, azonban hosszabb távon ez a hatás is ártalmas. Ezen felül számolnunk kell még a nátriuretikus peptidek és az endotelinek emelkedett szintjének következményeivel is [3].

A neurohumorális rendszerek aktivációján kívül egyéb hatásokról sem szabad megfeledkezni [5]. A szívizomzatban a nekrozis intenzív gyulladást indukál, mely az adott területen granulocita infiltrációval és proteolitikus enzimek, valamint szabad gyökök felszabadulásával jár együtt. A gyulladást előidéző folyamatok nélkülözhetetlenek az elhalt törmelék eltakarításában és a megfelelő hegeképződésben, azonban a gyulladást előidéző sejtekből és egyéb forrásokból felszabaduló szabad gyökök tovább károsíthatják a környező struktúrákat [6]. A proteolitikus enzimek aktivációja és a következményes fehérje-degradáció pedig az infarktusos terület expanszióját, esetleg bal kamrai ruptúrát eredményezhet.

Ezen változások globálisan a szív egészét érintve határozzák meg az infarktus kimenetelét, illetve a posztinfarktusos szívizom-átépülés folyamatát. A háttérben a miokardiumot felépítő sejtekben, főként a szívizomsejtekben bekövetkező elváltozások állnak, ugyanis a fentiek eredőjeként a túlélő szívizomsejtek működése adaptív módon megváltozik [6]. Disszertációm egy része a posztinfarktusos szívizomsejt-átépülés molekuláris és celluláris elemeire koncentrált. Ezen változások egyaránt érintik a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis elemeit [7] és a kontraktilis rendszer működését [8]. Ebben a munkában a kontraktilis rendszert érintő változásokat tanulmányoztuk, melyek következményeinek megértéséhez elengedhetetlen a kontraktilis rendszer felépítésének és működésének ismerete.

## **1.2. A kontraktilis rendszer felépítése**

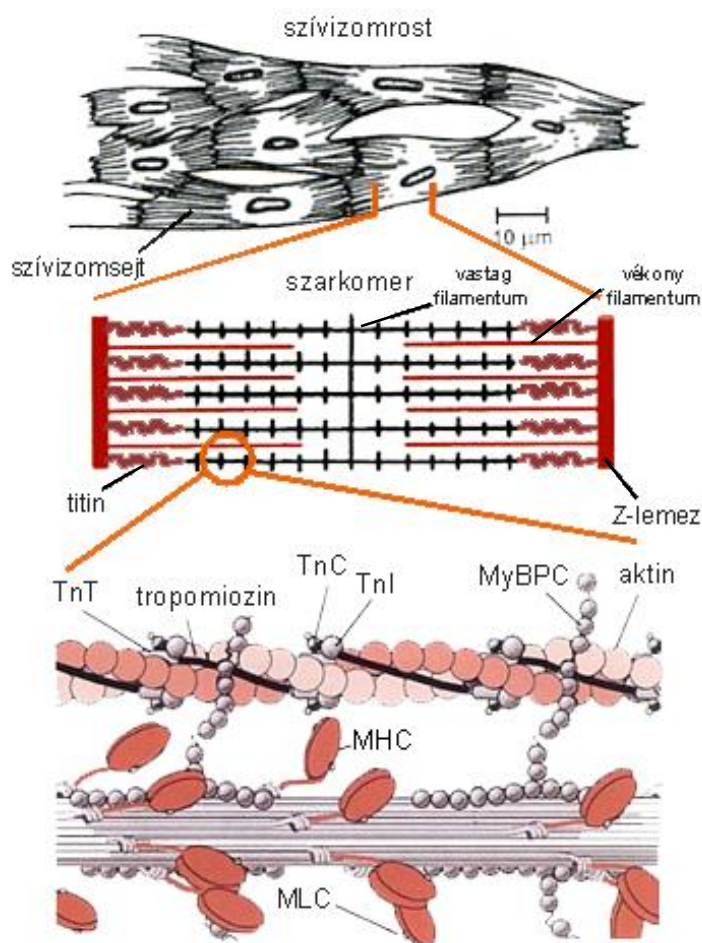
A bal kamrai miokardium felépítésében számos sejtípus vesz részt, a szív működése szempontjából legnagyobb jelentőséggel a szívizomsejtek bírnak, melyek kontraktilis funkciójuk révén biztosítják a véráramlást. Születés után mintegy  $6 \times 10^9$  szívizomsejttel rendelkezünk, melyek száma az élet során csökken, az idős populáció esetén az eredeti sejtszám mintegy egyharmadával számolhatunk [9].

A szívizomsejtek jellegzetes harántcsíkolatot mutatnak a miofibrillumok elrendeződésének köszönhetően. A szívizom funkcionális és morfológiai alapegysége a miofilamentumokból felépülő szarkomer, amelyet két Z-lemez határol (1. ábra). Vékony és vastag filamentumokat különítünk el, melyek felépítésében számos kontraktilis fehérje vesz részt. A vékony filamentumok a Z-lemezhez kapcsolódnak a két szomszédos szarkomer felől, míg a vastag filamentumok az A-csíknak megfelelően helyezkednek el.

A vastag filamentumok zömében miozinból, kisebb részben egyéb fehérjékből épülnek fel. A miozin két, kb. 200 kDa molekulatömegű miozin nehéz láncból ( $\alpha$ - és  $\beta$ -MHC) és négy kisebb polipeptidből (miozin könnyű láncok, az esszenciális MLC-1 és a

regulatorikus MLC-2) épül fel. A vastag filamentum felépítésében részt vesz még a miozinkötő C-fehérje (MyBPC), mely stabilizálja a filamentumot és különböző típusú módosulásainak szerepe van több kórkép kialakulásában.

A vékony filamentum legfontosabb alkotóeleme az aktin. A 43-48 kDa molekulatömegű globuláris aktin monomerek polimerizációval hozzák létre az aktin filamentumot. Két egymás köré tekeredett aktin filamentum szolgáltatja a vékony filamentumok vázát. Erre a kettős hélixre fonódik rá a tropomiozin, mely egyrészt stabilizálja az aktint, másrészt pedig takarja az aktin miozinkötő helyeit. A vékony filamentum minden hetedik globuláris aktin monomeréhez egy-egy troponin komplex (Tn) kötődik (1. ábra). A Tn három különböző funkcióval rendelkező alegységből áll.



**1. ábra A kontraktilis rendszer felépítése.** A szívizomrostok szívizomsejtekből épülnek fel. A szívizomsejtek alapegységét a vékony és vastag kontraktilis filamentumokból felépülő szarkomer képezi. A szarkomer óriás molekulája, a titin harmadik filamentumként vesz részt a szarkomer kialakításában. A vékony filamentum felépítésében az aktin, a tropomiozin és a troponin komplex tagjai, a troponin C (TnC), a troponin I (TnI) és a troponin T (TnT) vesznek részt. A vastag filamentumot többek között a miozin nehéz lánc (MHC), a miozin könnyű láncok (MLC) és a miozinkötő C-fehérje (MyBPC) alkotják. Opie, L. H. (2004). *Heart physiology from cell to circulation* alapján módosítva.

A troponin C (TnC) a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje, mely  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzorként működve az aktin és a miozin kölcsönhatását  $[\text{Ca}^{2+}]$ -függő módon szabályozza, a troponin T (TnT) a tropomiozint kötő egység, végül a troponin I (TnI) az aktin-miozin interakciót gátló struktúra. A szívizomzat harmadik filamentumaként is említik a titint, mely a szívizomzat óriási fehérjéje. Komplex funkciókat tölt be a kontraktilis rendszerben, többek között stabilizálja a miozin filamentumokat, másrészt molekuláris rugóként működve fontos szerepe van a szívizomsejtek passzív feszülésének meghatározásában [9].

### **1.3. A kontrakció mechanizmusa**

A kontrakció alapját az akciós potenciál hatására a kamrai szívizomsejtek citoplazmájába beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  képezi. A diasztolés  $10^{-7}$  mol/l-es  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$  az extracelluláris térből és döntően az intracelluláris raktárakból beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  következtében  $10^{-6}$  mol/l-es értékre emelkedik az akciós potenciál hatására megnyíló ioncsatornák közreműködésével [9]. A sejtekbe beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  a TnC-hez kötődve lehetővé teszi a vékony filamentumok vázát alkotó aktin és a vastag filamentum miozinja közötti kapcsolat létrejöttét. Az aktin-miozin ciklikus interakció lényege, hogy időről-időre kereszthidak/keresztkötések alakulnak ki az aktin és a miozin között, melynek eredményeként a vékony filamentumok becsúsznak a vastag filamentumok közé („sliding”/csúszófilamentum mechanizmus), a szarkomer közepének irányába. Az aktin-miozin kapcsolat az adenzin-trifoszfát (ATP) hidrolíziséből származó kémiai energiát mechanikai munkává konvertálja. Nyugalmi állapotban a miozin adenzin-difoszfátot (ADP) és inorganikus foszfátot ( $\text{P}_i$ ) köt. Amennyiben az  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$  emelkedik, úgy a vékony filamentumokon végbemenő konformációs változások a miozinejek aktinhoz való kapcsolódását indukálják, az izom aktiválódik. A keresztkötésekről ezt követően disszociál az ADP és az  $\text{P}_i$ , amit a miozinej erőit generáló konformáció-változása kísér („power stroke”), ennek eredményeként a vékony és vastag filamentumok egymás fölött elmozdulnak („sliding”), kezdetét veszi a rövidülés. Az aktin

és miozin ezt követő disszociációjához a miozinnak ATP megkötésére van szüksége. Az intracelluláris ATP koncentráció csökkenésével járó kóros állapotokban (pl. hosszantartó iszkémia során) az ATP hiány következtében az aktin-miozin kapcsolat rögzülhet, mely a szívizomzatban rigoros tónusfokozódást eredményezhet. Az ATP-kötés hatására csökken tehát (átmenetileg) a miozin affinitása a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot kötött vékony filamentum iránt. A miozin ezután ismét hasítja az ATP-t. Az ebből származó energia azonban nem szabadul fel közvetlenül, ahhoz a miozinnak ismét az aktinhoz (rendszerint újabb kötőhelyen) kell kapcsolódnia. Az újból létrejövő kapcsolat teszi teljessé a ciklust, mely - ha az  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$  továbbra is magas - a fenti lépések ismétlődésével folytatódik. Ép metabolikus viszonyok mellett a rövidülés addig tart, amíg az  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$  ismét alacsony szintre nem süllyed [9]. Újabb vizsgálatok alapján számos közti lépéssel számolhatunk még, melynek ismertetésétől a disszertációban eltekintek.

#### **1.4. A kontraktilis erő $\text{Ca}^{2+}$ -függése és annak meghatározása**

Az összehúzódás erejét elsősorban a  $\text{Ca}^{2+}$  szabályozza. A szív miofibrilláris struktúrái által generált kontraktilis erőt és annak  $\text{Ca}^{2+}$ -függését gyakran membránrendszerüktől megfosztott, ún. permeabilizált szívizomsejteken tanulmányozzák izometriás  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúra kialakulása során. Intakt szívizomsejteken mindez akadályokba ütközik, ami az  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$  folyamatos és gyors változásából, valamint az  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$  mérésének nehézségeiből adódik. Ezzel szemben a permeabilizált preparátumok mioplazmatikus terében a szabad  $[\text{Ca}^{2+}]$  szabályozható, a kialakult erő pedig kontrollált szarkomerhosszak mellett egyidejűleg mérhető. Amennyiben az erőértékeket a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció függvényben tüntetjük fel, úgy jellegzetes szigmoid lefutású görbét kapunk ( $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés vagy  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységi görbe). A  $[\text{Ca}^{2+}]$  kifejezésére rendszerint a moláris érték tízes alapú logaritmusának -1-szeresét alkalmazzuk ( $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}] = \text{pCa}$ ), így pCa-erő összefüggésről is beszélhetünk. A szigmoid lefutású görbe az ún. Hill-egyenlettel illeszthető, mely a

kontraktilis rendszer által generált erő  $\text{Ca}^{2+}$ -függésének legfontosabb kvantitatív értékeit tartalmazza, így az ún. Hill-koefficiens ( $n_{Hill}$ ) és a félmaximális erő kifejlődéséhez szükséges  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt ( $pCa_{50}$ ). Az  $n_{Hill}$  a szigmoid görbe meredekségére, és egyúttal a kontraktilis rendszeren belüli kooperativitás mértékére jellemző adat. A  $pCa_{50}$  értéke a TnC  $\text{Ca}^{2+}$  iránti affinitásának függvénye, ez a paraméter a kontraktilis fehérjerendszer  $\text{Ca}^{2+}$  iránti érzékenységét önmagában jellemzi. A kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége nagyban függ a szarkomerhossztól, az úgynevezett hosszfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítés képezi a Frank-Starling mechanizmus alapját. A szívműködés nyújtása, azaz a szarkomerhossz növelés hatására fokozódik a TnC  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége és következményesen a kontrakciós erő. Ezen felül számos tényező és állapot befolyásolja még a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét. Jelen munkában a posztinfarktusos eltérésekre és az oxidatív stressz kontraktilis hatásaira összpontosítottunk.

### **1.5. A kontraktilis rendszer posztinfarktusos remodellációja**

A szívinfarktust követő miofilamentáris változásokról számos tanulmány látott napvilágot az utóbbi években. A kontraktilis rendszer működését jellemző paraméterek közül a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége került leginkább a figyelem középpontjába, melyről még jelenleg is ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Több munkacsoport eredményei arra utalnak, hogy szívinfarktus után nem változik a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység [10, 11]. Ezzel szemben de Tombe és munkatársai alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet mutattak ki [12] patkányokban 32-36 héttel az infarktust követően. Mások a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység konzekvens növekedéséről számoltak be [8, 13], így például van der Velden munkacsoportja 3 héttel az infarktus után egy sertésmodellen mutatta ki a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység fokozódását. Az irodalmi adatokat a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység posztinfarktusos változásairól táblázat formájában tüntettem fel (1. táblázat).

A  $Ca^{2+}$ -érzékenység változásának hátterében a miofilamentumokat felépítő fehérjék poszttranszlációs módosulásai állnak [8, 14, 15]. A szívinfarktus lezajlását követően a perctérfogat fenntartása érdekében tartósan aktiválódó neurohumorális rendszerek (RAAS és a szimpatikus idegrendszer mediálta  $\beta$ -adrenerg stimuláció) hatására megváltozik a fehérjék foszforilációja [4]. A tartós szimpatikus aktiváció következtében a szívizomsejtekben  $\beta$ -adrenerg downreguláció jön létre, mely a protein kináz A (PKA) mediálta csökkent miofilamentáris fehérje foszforilációban nyilvánul meg [13, 16-19]. A fokozott RAAS aktivációhoz köthető megnövekedett protein kináz C (PKC)-függő foszforiláció szerepe szintén megerősítést nyert [20].

kísérleti állapot	modell	AMI óta eltelt idő	mintavételezés helye	$Ca^{2+}$ -érzékenység változás iránya	referencia
patkány	koronária ligáció	32-36 hét	nem infarcerált szeptális és bal kamra szabad fal miokardium	↓	Belin, 2006
patkány	koronária ligáció	24 hét	jobb kamra	↓	de Tombe, 1996
patkány	koronária ligáció	14 hét	nem infarcerált bal kamrai miokardium	↔	Cazorla, 2005
patkány	koronária ligáció	12 hét	jobb kamra	↔	Daniels, 2001
patkány	koronária ligáció	12 és 28 hét	jobb kamra	↔	Daniels, 2007
egér	1 óra koronária ligáció és 24 óra reperfüzió	24 óra	távoli, nem infarcerált bal kamrai miokardium	↔	Rao, 2007
sertés	koronária ligáció	3 hét	távoli, nem infarcerált bal kamrai miokardium	↑	van der Velden, 2004
sertés	koronária ligáció	3 hét	nem infarcerált bal kamrai miokardium	↑	Duncker, 2009

**1.táblázat Irodalmi adatok összefoglalása a  $Ca^{2+}$  érzékenység posztinfarktusos változásairól.**

A foszforilációs hatásokon kívül az oxidatív eredetű poszttranszlációs fehérje módosulásoknak is kiemelkedő jelentősége van a kontraktilis rendszer működésének szabályozásában [21-24]. Az aktin és a tropomiozin karbonilációját és szulfhidril (SH) csoportjainak oxidációját találták iszkémiát követően patkány bal kamrában [25], illetve a

tropomiozin SH oxidációját kimutatták sertés és kutya szívekben koronária mikroembolizációt követően [14]. Ezen felül a tropomiozin SH oxidációját összefüggésbe hozták a kontraktilis diszfunkció mértékével is a sertés modellben. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az oxidatív károsodás, ha csak részben is, de felelős lehet a posztinfarktusos miokardiális funkcióromlásért.

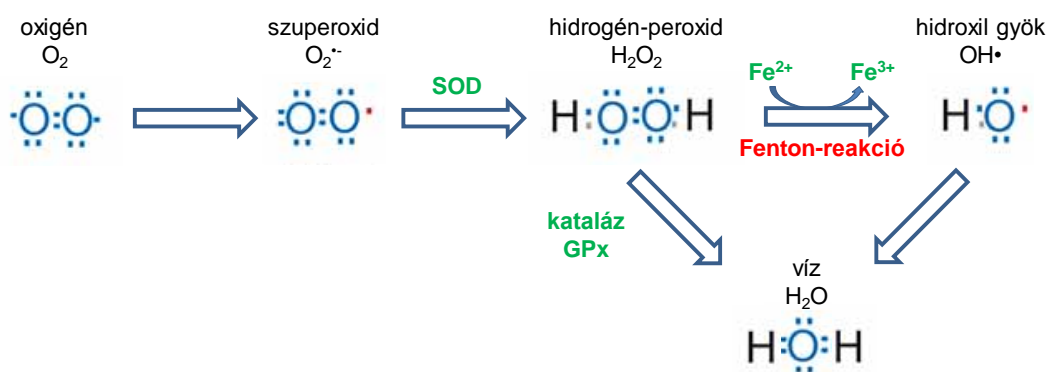
Míg az iszkémia közvetlen hatásai az infarcerálódott területre korlátozódnak, a szívizomzat átépülése az iszkémia által közvetlenül nem érintett területen is fellelhető [6, 26]. Az azonban nem tisztázott, hogy a fent részletezett neurohumorális és oxidatív hatások egyformán érvényesülnek-e a bal kamra különböző területein, beleértve az elzáródott ér ellátási területén túlélő szívizomzatot is. Kísérleteink során többek között erre a kérdésre is választ kerestünk.

#### **1.6. Szabad gyökök és oxidatív stressz**

Az oxidatív stressz a reaktív oxigén/nitrogén szabad gyökök (ROS/RNS) és az antioxidáns mechanizmusok közötti egyensúly megbomlásával jellemezhető állapot, mely szerepet játszik több kardiovaszkuláris kórkép kialakulásában, így a szívelégtelenség [27, 28] vagy a posztinfarktusos remodeláció folyamatában [5]. A szabad gyökök fő forrását a kardiovaszkuláris rendszerben a mitokondriális légzési lánc jelenti, emellett nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidázok (NADPH oxidázok), a xantin-oxidáz, nitrogén-monoxid szintetáz, a mieloperoxidáz és a lipoxigenázok is jelentős mennyiségű szabad gyök termeléséért felelősek [29]. Míg fiziológias körülmények között enzimatis és nem-enzimatis antioxidáns rendszerek ellensúlyozzák a ROS/RNS káros hatásait, az oxidatív stresszállapotokat az antioxidánsokkal szembeni ROS/RNS túlsúly jellemzi. Az oxigén alapú szabad gyökök az oxigén inkomplett redukciója kapcsán jönnek létre. A sejtekben keletkező ROS között tartjuk számon a rövid féléletidejű, nem membránpermeábilis szuperoxid gyököt ( $O_2^{\cdot-}$ ), melyből szuperoxid-dizmutáz hatására

hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) keletkezik. A  $H_2O_2$  egy sokkal stabilabb molekula, membránpermeábilis és fontos résztvevője a celluláris redox homeosztázisnak. Kataláz és glutation-peroxidáz közreműködésével közömbösíthető, végeredményben víz képződik belőle. Fémionok jelenlétében azonban a  $H_2O_2$  a Fenton-reakció során hidroxil gyökké ( $OH\cdot$ ) alakul (2. ábra). A szabad gyökök között ez utóbbi a legreaktívabb, ezáltal a legsúlyosabb károsodást képes létrehozni. A nitrogén szabad gyökök közül kiemelendő a nitrogén-monoxid ( $NO\cdot$ ), melyből  $O_2^{\cdot-}$  jelenlétében egy újabb szabad gyök, a peroxinitrit ( $ONOO\cdot$ ) keletkezik. Ezen felül meg kell még említeni a mieloperoxidáz enzim által termelt hipoklórossavat, amely szintén egy igen potens oxidatív ágens [29].

Ezek a szabad gyökök fiziológias körülmények között is keletkeznek, sőt, számos fehérje és szignalizációs útvonal működését befolyásolják a kardiovaszkuláris rendszerben. Többek között hatással vannak protein foszfatázok és kinázok működésére, befolyásolják azok aktivitását, különböző transzkripciós faktorok regulációjában vesznek részt.



**2. ábra A reaktív oxigén szabad gyökök (ROS).** A ROS olyan oxigén alapú molekulák, melyek külső elektronhéjukon párosítatlan elektront tartalmaznak. Az oxigénből keletkezik a relatíve kis reakcióképességű szuperoxid anion, melyből a szuperoxid-dizmutáz (SOD) hatására hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) képződik. Ez utóbbi nem rendelkezik párosítatlan elektronnal, fokozott reaktivitása miatt mégis a ROS közé sorolják. A  $H_2O_2$ -t a kataláz és a glutation peroxidáz (GPx) semlegesíti, míg vas jelenlétében a  $H_2O_2$ -ből a Fenton-reakció során keletkezik a legreaktívabb ROS, a hidroxil gyök. [www.biotek.com](http://www.biotek.com) alapján módosítva

Ezáltal a vazoreguláció, a sejtnövekedés, a programozott sejthalál, valamint az iszkémiás prekondicionálás fontos mediátorai. Továbbá kulcsszerepük van az immunválaszban, a patogének elleni küzdelemben [30].

Oxidatív stresszállapotokban azonban a túlsúlyba kerülő szabad gyökök károsítják a sejteket felépítő nukleinsavakat, lipideket, illetve fehérjéket. A nukleinsavak roncsolása révén a mutagenézis, a karcinogenezis és az öregedés folyamatának mediátorai. A lipidek közül a foszfolipidek különösen érzékenyek az oxidációra, a lipidperoxidáció fontos termékei a malondialdehid és a 4-hidroxi-2-nonenal. A fehérjék oxidációja az aminosavak oxidációján keresztül jön létre, melyek közül a cisztein és a metionin különösen érzékenyek az oxidatív hatásokra [30].

A kardiovaszkuláris rendszerben a kontraktilis fehérjék érintettsége strukturális és funkcionális változásokon keresztül szisztolés vagy diasztolés diszfunkcióhoz vezet. Az oxidatív hatás egyrészt közvetlenül érintheti a fehérjéket, másrészt pedig a kontraktilis rendszer működésének szabályozásában részt vevő enzimek oxidációja révén vezethet a proteinek kóros működéséhez [31]. A kontraktilis fehérjék közül a teljesség igénye nélkül kiemelendő az MHC, MLC-1, MLC-2, MyBPC, az aktin, az alfa-aktinin vagy a titin érintettsége, melyek eredményeként megváltozhat a miozin ATP-áz aktivitása, a kontraktilis erőgenerálás, a relaxáció folyamata, protein aggregátumok jöhetnek létre, végső soron az oxidáció a szarkomer struktúra megbomlásához, fehérje degradációhoz, kontraktilis diszfunkcióhoz vezet [32]. A szabad gyökök ezen felül különböző ROS-szenzitív enzimek, jórészt kinázok (pl.: protein kináz A, C, D, Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependens protein kináz II) működését is szabályozzák [31], befolyásolva ezzel ezen enzimek targetjeinek funkcióját.

## 1.7. Fehérje karboniláció

A fehérje oxidáció következtében különböző típusú módosulások jöhetnek létre, mint a tirozin nitráció, SH oxidáció, glutationiláció vagy a karboniláció [31]. A súlyos oxidatív stressz és az oxidatív károsodás okozta fehérje diszfunkció egyik igen gyakran használt biomarkere a fehérje karboniláció [33]. A karboniláció egy olyan irreverzibilis oxidatív módosulás, mely abban az esetben jön létre, ha reaktív aldehid vagy keton csoportok kötődnek a fehérjéket felépítő aminosavakhoz [34]. Primer karboniláció fém-katalizált oxidáció során jön létre, mely a prolin, lizin, arginin és treonin aminosavakat érinti [35], míg a szekunder karboniláció reaktív lipid aldehidek fehérjékhez történő kötődését jelenti [36, 37]. A fém-katalizált oxidáció vas(II) és  $H_2O_2$  közreműködésével jön létre a Fenton-reakció során, mely  $OH\cdot$  képződését eredményezi [38, 39]. Ez a kémiai reakció széles körben elterjedt a fehérje karboniláció *in vitro* körülmények közötti kivitelezésére és vizsgálatára [40]. Fiziológias körülmények között szabad vas gyakorlatilag nincs sem a szérumban, sem pedig az intracelluláris térben, ugyanis fehérjékhez kötött formában van jelen. Patológias körülmények között, például iszkémia hatására azonban szabad vas szabadulhat fel, és  $H_2O_2$ -dal reagálva  $OH\cdot$  képződését indukálja [38]. Ezt támasztják alá azok az adatok is, melyek a szerint a vaskelátor dezferroxamin vagy a hidroxil gyök-kötő dimetiltiourea protektív hatásúak, ugyanis ezek a vegyületek a Fenton-reakciót vagy annak végtermékét gátolják [38].

A fehérjék karbonilációja egyrészt módosíthatja az érintett fehérje funkcióját, fehérje-degradációt indukálhat, valamint szignalizációs folyamatokat is befolyásolhat [36]. Ez utóbbi során antioxidáns (pl.: glutation-S-transzferáz), valamint proinflammatorikus gének (pl.: tumor nekrozis faktor  $\alpha$ ) fokozott eszpressziójáról számoltak be [37]. A fehérje karboniláció jelentőségét mutatja, hogy szerepe van számos kórkép kialakulásában. Jelentősen emelkedett karbonilációt mutattak ki miokardiális infarktuson átesett és

halmozott kardiovaszkuláris rizikófaktorokkal rendelkező betegek szérumban fehérjéiben, az előbbi csoportban pozitív korreláció volt megfigyelhető a karbonil csoport tartalom és a nekroenzim kiáramlás, azaz a sejtkárosodás mértéke között [41]. Szívsebészeti beavatkozásokhoz is köthető a karbonil csoportok fokozott képződése [42], sőt újabb kardioplégikus oldatok kifejlesztése kapcsán egy fő szempont az extra- és intracelluláris vaskelátorok együttes alkalmazása a Fenton-reakció kivédése céljából [43]. Kimutatták a MHC karbonilációját és a fehérje következményes csökkent aktivációját diabéteszes kardiomiopátiában [44]. Több munkacsoport is beszámolt az aktin és a tropomiozin iszkémia/reperfúzió indukálta karbonilációjáról, mely összefüggést mutatott a bal kamra diszfunkció mértékével különböző modellekben [14, 25, 45]. Ezen két fehérje fokozott karbonilációját mutatták ki szívelégtelen betegek bal kamrai biopsziás mintáiban is, sőt szignifikáns korrelációt találtak az oxidatív károsodás és a kontraktilis diszfunkció mértéke között [46]. Arról azonban kevés információ áll rendelkezésre, hogy miként modulálja a fehérje karboniláció a kontraktilis rendszer működését a szívmuszkulációban.

## 2. Célkitűzések

Kísérleteink során a következő célkitűzéseket tettük:

1. Megvizsgálni a kontraktilis fehérjék karbonilációjának funkcionális hatásait a humán permeabilizált szívizomsejtek kontraktilis rendszerének működésére.
2. Feltérképezni egy szívinfarktusos egérmodellen a posztinfarktusos szívizom-átépülés celluláris és molekuláris résztvevőit, az infarktusos és az infarktus által közvetlenül nem érintett területeket külön-külön vizsgálva.
3. Tanulmányozni a fehérje karboniláció részvételét a miokardium remodeláció folyamatában.

### **3. Metodikák**

#### **3.1. Szívizomminták**

##### *3.1.1. Humán egészséges donor szívizomminták*

A humán bal kamrai szívizomminták transzplantáció során fel nem használt donor szívekből származtak (41 és 46 éves nő, 53 és 57 éves férfi). A donorok agyi aneurizma ruptúra és vérzéses stroke következtében haláloztak el, kardiális betegségre utaló leleteik, tüneteik nem voltak. A szívek eltávolítását megelőzően rövid ideig tartó dopamin, noradrenalin és mannizol kivételével egyéb terápiában nem részesültek. A szívizommintákat felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A humán szívizommintákon végzett kísérleteink a Helsink Deklarációban foglaltaknak teljes mértékben megfeleltek és a Magyar Egészségügyi Minisztérium által jóváhagyottak (No. 323-8/2005-1018EKU).

##### *3.1.2. A miokardiális infarktus egérmodellje*

###### **3.1.2.1. Experimentális szívinfarktus kialakítása**

Az infarktusus egérmodell kialakítása osztrák kollaborációs laboratóriumban valósult meg. 30 db, 16 hetes OF-1 nőtény egéren (Division of Laboratory Animal Science and Genetics, Core Unit of Biomedical Research, Medical University of Vienna, Himberg, Ausztria; testsúly:  $32,9 \pm 0,5$  g) intraperitoneális (i.p.) ketamin (100 mg/kg) és xilazin (12 mg/kg) alkalmazásával bevezetett általános anesztéziában invazív lélegeztetés (HSE Minivent; Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Németország) mellett bal oldali thoracotomiát végeztünk. A perikardium megnyitását követően a bal elülső leszálló koronária artériát (LAD) lekötöttük, majd a mellkast zártuk (MI,  $n=25$ ). A posztoperatív időszakban fájdalomcsillapító kezelést (buprenorfin, 0,1 mg/kg, ivóvízben) alkalmaztunk. Áloperált egészséges egerek szolgáltak kontroll csoportként ( $n=5$ ). Az állatkísérletek a Bécsi Orvostudományi Egyetem etikai irányelvei alapján valósultak meg (etikai engedély

száma: GZ: 66.009/0173-II/10b/2009). A 10 hetes követési időszakot 10 infarktuson átesett egér élte túl (10/25), a posztoperatív mortalitás ebből kalkulálva 60% volt. A korai operatív, első 48 órás mortalitás 44% volt (11/25), majd további 4 egér pusztult el a ligációt követő 48 óra és egy hét között (16%). A kontroll állatok mindegyike túlélte a 10 hetes periódust.

### 3.1.2.2. Szívtultrahang

A sebészeti beavatkozást követő tizedik héten szívtultrahang vizsgálatot (Vevo 770, RMV707B; Visualsonics, Torontó, Kanada) végeztünk általános anesztéziában (100 mg/kg ketamin, 12 mg/kg xilazin i.p.). A papilláris izmok szintjében felvett paraszternális rövid tengelyi metszeteken megmértük a szisztolés és diasztolés bal kamrai átmérőket, melyek segítségével a bal kamra szisztolés funkcióját jellemző ejekciós frakciót (EF) kalkuláltuk.

### 3.1.2.3. Az infarktus méretének becslése

Altatott kísérleti állatokból (100 mg/kg ketamin és 12 mg/kg xilazin i.p.) a dobogó szíveket eltávolítottuk, jéghideg (4 °C) Krebs-Henseleit-oldatban [118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11,1 mM glükóz; Merck, Darmstadt, Németország] mostuk, tömegüket megmértük. A szívek egy részét 4%-os formaldehidben fixáltuk a szövettani vizsgálatokhoz, míg másik részét a molekuláris esszékhöz és az izometriás erőmérésekhez előkészítve több részre osztottuk: elsőként a nagy ereket, illetve a pitvarokat különítettük el, ezt követően a jobb kamrát, majd a bal kamra infarktusos területét szeparáltuk az infarktus által nem érintett, inferior szegmentumtól. A mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az infarktus által érintett terület nagyságát Pfeiffer szerint Masson-trikróm festett bal kamrai metszeteken határoztuk meg [47]. Röviden, a formalin-fixált szíveket paraffinba ágyasztuk és mikrotóm segítségével 4 µm-es metszeteket készítettünk. A bázistól a csúcsig öt metszeten Masson-féle trikróm

festést alkalmaztunk. Image J szoftver (Image J, National Institute of Health, USA) segítségével megmértük a bal kamra területét és kalkuláltuk a totál bal kamrai területet. Az infarktus méretének meghatározásához az infarktus öt metszetben mért hosszát a teljes bal kamrai terület százalékában adtuk meg.

### **3.2. *In vitro* fehérje karboniláció Fenton-reakcióval**

*In vitro* fehérje karbonilációt Fenton reakcióval idéztünk elő. Az izolált, permeabilizált szívizomsejteket Fenton-reagens (relaxáló oldatban 50  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 6 mM aszkorbinsav és humán minták esetében 0-10<sup>5</sup>  $\mu$ M, egér szívizomsejteken 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) jelenlétében inkubáltuk 7 percig szobahőmérsékleten, a mechanikai és a biokémiai kísérletek során egyaránt. Az esetleges SH oxidációs hatások kiküszöbölése érdekében a minták egy részét 10 mM ditioneitróllal (DTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kezeltük, mely SH-reagensként az oxidált SH-csoportokat redukálja. A mechanikai mérések során további kombinált kezeléseket is alkalmaztunk.

### **3.3. Fehérje karboniláció kimutatása oxyblot módszerrel**

A fehérje karboniláció kimutatására preformált gyári kitet (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, Millipore, Billerica, MA, USA) használtunk. Módosított RIPA [radioimmunoassay; pH=8, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0,5% nátrium deoxikolat, 6% nátrium-dodecilszulfát (SDS), 1% proteáz inhibitor koktél; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] oldat segítségével előkészített fehérje homogenizátumok koncentrációját 3 mg/ml-re történő hígítással egységesítettük. A karbonil csoportokat derivatizáltuk, mely során a fehérjeoldatokat dinitrofenilhidrazin (DNPH) és 12%-os SDS jelenlétében 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd neutralizáló oldat és  $\beta$ -merkaptoetanol hozzáadásával állítottuk le a reakciót. A DNPH egy 4 nitrogén atomot tartalmazó, ciklusos aromás benzolgyűrűs vegyület, mely kémiai reakcióba lép a fehérjék

karbonil csoportjaival, melynek során hidrazonkötés jön létre, így azok specifikus jelölésére alkalmas. A derivatizált fehérjéket gélelektroforézist követően nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a gyári kitben található dinitrofenilhidrazon-ellenes és peroxidázzal kapcsolt specifikus szekunder antitestekkel jelöltük. A karboniláció-specifikus antitestek eltávolítását követően a membránokat anti-aktin (DAKO A/S, Glostrup, Denmark; hígítás: 1:1000 PBST-ben), anti- $\alpha$ -aktinin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; hígítás: 1:10000 PBST-ben) és anti-MHC (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA; hígítás: 1:10000 PBST-ben), valamint peroxidáz enzimmel konjugált másodlagos antitestekkel (anti-egér POD; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; hígítás: 1:20000 PBST-ben) jelöltük. Kemilumineszcens (ECL) módszerrel és autoradiográfiával tettük láthatóvá a jeleket, melyek intenzitását Image J szoftver segítségével számszerűsítettük. A karboniláció mértékét a fehérjék mennyiségére normalizáltuk és karbonilációs indexként fejeztük ki, ahol a kontroll minták karbonilációs indexét 1-nek tekintettük.

### **3.4. SH oxidáció vizsgálata**

#### *3.4.1. Ellman-reakció*

A humán szívizommintákon végzett kísérletek során az SH oxidáció mértékét Ellman-reakcióval határoztuk meg. A permeabilizált szívizomsejtek egy részét növekvő  $H_2O_2$  koncentrációjú ( $0-10^5 \mu M$ ) Fenton-reagenssel kezeltük. Pozitív és negatív kontrollként 2,2'-ditio-dipiridinnel (DTDP; 2,5 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és DTT-vel (10 mM) kezelt minták szolgáltak. A mintákat a kezeléseket követően SH-specifikus Ellman-reagens [5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoesav); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] jelenlétében inkubáltuk (15 perc, szobahő). A reagens a redukált SH csoportokhoz kötődve sárga színű terméket eredményez. Az oldatok abszorbanciáját 405 nm-en Novostar microplate reader-en mértük és arányosnak tekintettük a minták SH tartalmával.

Standardként ismert SH tartalmú N-acetil-cisztein-sorból (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) képzett kalibrációs görbét alkalmaztunk. Az oldatok fehérje koncentrációját bicinkoninsavas (BCA) módszerrel határoztuk meg borjú szérum albumint (BSA) használva standardként. Az egyes minták relatív SH tartalmát 1 mg fehérjére vonatkoztatva adtuk meg. Az Ellman-reakciót minden minta esetében háromszor ismételtük.

#### *3.4.2. SH-specifikus biotinizáció és Western immunoblot*

Az infarktusos egérmodell kapcsán a minták korlátozott mennyiségére való tekintettel más módszert alkalmaztunk az SH oxidáció vizsgálatára. RIPA oldatot használtunk a fehérje-homogenizátum készítéséhez. A fehérjeoldatokat két részre osztottuk: az egyik felét 10 mM DTT-vel kezeltük (30 perc), míg a másik rész kontrollként szolgált. A DTT kezelés az SH csoportok redukcióját célozta, míg a kontroll csoport a különböző helyről származó minták alap SH oxidációs státuszának feltérképezésére szolgált. Az SH szignál detektálására megfelelő körülmények közötti biotinizációt [dimetil-formamidban oldott biotin: (+)-biotinyliodoacetamidyl-3,6-dioxaoctanediamine; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA; 90 perc, 37 °C, sötétben], gélelektroforézist, majd blottolást követően streptavidin-peroxidáz rendszert (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK; hígítás: 1:100000 PBST-ben) alkalmaztunk. A fehérje mennyiséget az előző rendszer eltávolítását követően anti-aktin antitesttel (DAKO A/S, Glostrup, Denmark; hígítás: 1:1000 PBST-ben) és megfelelő másodlagos antitesttel (anti-egér POD; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; hígítás: 1:20000 PBST-ben) detektáltuk. Az aktin mennyiségére normalizálva a relatív SH tartalmat fejeztük ki, ahol a DTT-vel kezelt minták oxidációját 100%-nak tekintettük.

#### **3.5. Kardiális TnI foszforilációs státuszának vizsgálata**

A kísérletekhez használt fehérje homogenizátumok előkészítése a fentiekhez hasonlóan RIPA oldat felhasználásával történt. A fehérjeoldatot azonos mennyiségű 2x SDS

mintapufferben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 percig főztük. Gélelektroforézist követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, melyeket a szerin 22/23-as helyen (S22/23) vagy a treonin 143-as helyen (T143) foszforilált kardiális TnI ellenes antitestekkel [Abcam, Cambridge, UK; anti-P<sup>S22/S23</sup>-TnI, hígítás: 1:1000 0,1% Tween-20-tartalmú foszfát pufferben (PBST); anti-P<sup>T143</sup>-TnI, hígítás: 1:500 PBST-ben] jelöltük. A szignálokat tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitest (anti-nyúl; Millipore, Billerica, MA, USA; hígítás: 1:300 PBST-ben) segítségével detektáltuk. A fenti antitesteket a membránról eltávolítva, a fehérjéket foszforilációtól független kardiális TnI ellenes (Clone 19C7; Hytest Ltd., Finland; hígítás: 1:10000 PBST-ben) és peroxidáz konjugált másodlagos antitestekkel (anti-egér; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; hígítás: 1:20000 PBST-ben) jelöltük. Kemilumineszcens (ECL) módszerrel és autoradiográfiával tettük láthatóvá a jeleket, melyek intenzitását Image J szoftver segítségével számszerűsítettük. Egy normalizációs lépést követően a relatív fehérje foszforilációt ábrázoltuk, a kontroll csoport foszforilációját 100%-nak tekintettük.

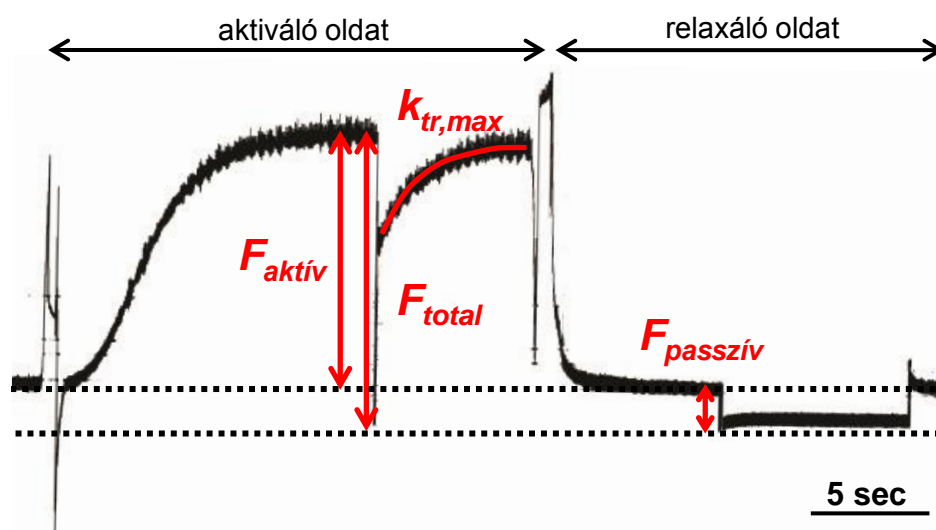
### **3.6. Rekombináns troponin komplexek karbonilációja**

Foszforilált (TnI-P) és nem foszforilált TnI-t (TnI), TnC-t és TnT-t tartalmazó humán rekombináns Tn komplexeket Fenton-kezelésnek vetettünk alá a fentieknek megfelelően azzal a céllal, hogy megvizsgáljuk, hogy a TnI foszforilációs állapota befolyásolja-e a Tn komplex fehérjéinek karbonilációját. A TnI foszforilációs státuszát foszforiláció-specifikus antitestekkel igazoltuk (Abcam, Cambridge, UK; anti-P<sup>S22/S23</sup>-TnI, hígítás: 1:1000 PBST-ben). A komplex fehérjéinek karbonilációját oxyblot esszével vizsgáltuk, a fehérjék mennyiségét Sypro ruby festéssel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) határoztuk meg. Normalizációt követően a fehérjék karbonilációs indexeit hasonlítottuk össze.

### 3.7. Izometriás erőmérések permeabilizált szívizomsejt preparátumokon

A humán és egér szívekből származó szívizomsejtek kontraktilis funkciójának vizsgálatára azonos módszert alkalmaztunk. Izometriás erőmérés során a kontraktilis rendszer működését jellemző paramétereket mértük, így a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiválta aktív erőt ( $F_{aktív}$ ), a  $\text{Ca}^{2+}$ -független passzív erőt ( $F_{passzív}$ ), a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét ( $pCa_{50}$ ), az aktin-miozin ciklus sebességét ( $k_{tr,max}$ ). Az erőmérés során használt oldatok mindegyike proteáz inhibitorokat [0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 40  $\mu\text{M}$  leupeptin és 10  $\mu\text{M}$  E-64] tartalmazott. Az előzőleg előkészített, fagyasztott bal kamrai szövetdarabokat izoláló oldatban [pH=7,0; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM KCl, 2 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 4 mM ATP, 10 mM imidazol] olvasztottuk fel, majd mechanikai izolációt követően a szívizomsejteket 0,5%-os triton X-100 detergens segítségével permeabilizáltuk. Ennek eredményeként a sejtek membránrendszerei átjárhatóvá váltak („kémiailag nyúzott” szívizomsejtek), biztosítva a kontraktilis funkciók kontrollált intracelluláris körülmények közötti vizsgálatának lehetőségét. Az egyedi szívizomsejteket mechanikai mérőrendszerhez rögzítettük két rovartű segítségével, melyek egy erőmérőhöz (Sensonor, Horten, Norvégia) és egy elektromágneses motorhoz (Aurora Scientific Inc., Aurora, Kanada) voltak csatolva. A kívánt, 1,9 vagy 2,3  $\mu\text{m}$ -es szarkomerhossz (SL) beállítását követően ismételt aktivációs-relaxációs ciklusokat alkalmaztunk. A kísérleteket 15 °C-on végeztük a permeabilizált preparátumok stabilitásának megőrzése érdekében. A mérőrendszerhez rögzített szívizomsejtet  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes relaxáló oldatból (pH=7,2; 10 mM BES; 37,11 mM KCl; 6,42 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 7 mM EGTA; 6,94 mM ATP; 15 mM kreatin-foszfát)  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú aktiváló oldatba (összetétele a relaxáló oldatével egyező, EGTA helyett Ca-EGTA-t tartalmaz) mozgattuk, melynek eredményeként  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúrákat váltottunk ki. Az oldatok  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációját negatív tízes alapú logaritmikus pCa egységekben fejeztük ki ( $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]=\text{pCa}$ ). A  $\text{Ca}^{2+}$ -kontraktúra kialakulása során

megfigyelhetjük, hogy a passzív előfeszítettségi állapotból indulva az izomerő folyamatosan fejlődik ki egy közel állandó, „steady-state” csúcs erőérték eléréséig. A csúcs erő kialakulása után a preparátum hosszát igen gyorsan (néhány ms-on belül) megváltoztatva (rövidítés majd nyújtás, „release-restretch”) elérhető az aktin-miozin hidak átmeneti felszakadása. Következésképpen az izomerő először megszűnik ( $F_{total}$ ), majd a  $Ca^{2+}$  jelenléte miatt igen gyorsan újragenerálódik. Az erő újratekintésének időbelisége egy exponenciális függvénnyel illeszthető, melynek időállandója alkalmas az aktin-miozin ciklussebesség ( $k_{tr,max}$ ) becslésére. A sejtben  $Ca^{2+}$ -mentes környezetben egy kevésbé gyors hosszváltoztatást eszközölve a  $F_{passzív}$  mérhető. Az  $F_{aktív}$  a totál és a passzív erők különbségéből adódik (3. ábra).



**3. ábra Maximális  $Ca^{2+}$ -kontraktúrát reprezentáló regisztrátum.** Az egyedi  $Ca^{2+}$ -kontraktúra során a szívizomsejtet  $Ca^{2+}$ -tartalmú közegbe mozgatva izometriás erő generálódik. A maximális „steady state” erőérték elérése után, egy gyors "release-restretch" manőver szolgál az erőregenerálódás sebességi állandójának ( $k_{tr,max}$ ) meghatározására. A manőver során az erő a maximális értékről nullára esik, lehetővé téve ezzel a totál erő meghatározását ( $F_{total}$ ), majd ismét elkezd növekedni. A szívizomsejtet ezután relaxáló  $Ca^{2+}$ -mentes oldatban eredeti hosszának 80%-ára rövidítve meghatározható a sejt passzív ereje ( $F_{passzív}$ ). Az izometriás aktív erőt ( $F_{aktív}$ ) a totál és a passzív erőértékek különbségéből nyertük.

Az erőértékeket az összehasonlíthatóság kedvéért a szívizomsejtek keresztmetszetének területére normalizáltuk, mely a preparátumok szélességének és magasságának mérésével elliptikus keresztmetszeti geometriát feltételezve kalkulálható. Különböző  $Ca^{2+}$ -

koncentrációjú oldatok alkalmazásával lehetővé vált a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés megszerkesztése egy módosított Hill-függvény segítségével. Az egyes erőértékeket a maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált aktív erőre normalizáltuk. A félmaximális erő kiváltásához szükséges  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció, a  $pCa_{50}$  érték jellemzi a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét.

### 3.7.1. Poszttranszlációs fehérje módosulások funkcionális hatásainak vizsgálata

A fehérje foszforiláció hatását *in vitro* PKA (borjú szív PKA katalitikus alegysége; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) alkalmazásával vizsgáltuk. 1 mg liofilizált PKA-t 60  $\mu\text{l}$  100 mM-os DTT-ben oldottuk, majd az oldatot 1 ml-re hígítottuk relaxáló oldattal. Az így előkészített oldatot 4 °C-on tároltuk, maximum öt napig használtuk. A 2,3  $\mu\text{m}$ -es szarkomerhosszra nyújtott szívizomsejteket 40 percig az enzim jelenlétében inkubáltuk, és a kezelés előtt és után a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggést rögzítettük. Az SH oxidáció reverzibilitását és hatásait SH-reagens DTT alkalmazásával tanulmányoztuk. 30 perces DTT kezelés (10 mM) előtt és után vizsgáltuk a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggést 2,3  $\mu\text{m}$ -es szarkomerhosszon.

Izolált, permeabilizált szívizomsejteket Fenton-reagens jelenlétében 7 percen keresztül 2,3  $\mu\text{m}$ -es szarkomerhosszon inkubáltuk. A sejtek egy részét ezt követően DTT-vel kezeltük (10 mM; 30 perc). A sejtek egy másik csoportján a foszforiláció és a karboniláció közötti interakciók vizsgálata céljából kombinált kezeléseket alkalmaztunk, így a Fenton-kezelést PKA előtt és után, illetve protein-foszfátáz-1 (PP1c) és -2A (PP2Ac) katalitikus alegysége jelenlétében történt inkubációt követően alkalmaztunk. A foszfátázokat kollaborációs partnerünk állította elő [48]. Az egyes kezeléseket előtt és után a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggéseket rögzítettük.

### 3.8. Adatfeldolgozás, statisztikai analízis

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

$$F = F_{aktív}[\text{Ca}^{2+}]^{n_{Hill}} / (Ca_{50}^{n_{Hill}} + [\text{Ca}^{2+}]^{n_{Hill}})$$

ahol  $F$  egy adott  $[\text{Ca}^{2+}]$ -hoz tartozó "steady-state" erőt, míg  $F_{aktív}$ ,  $n_{Hill}$  és  $Ca_{50}$  (vagy  $pCa_{50}$ ) sorrendben a maximális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -hoz tartozó aktív erőt, valamint a szigmoidális összefüggés meredekségét és középpontját jelölik.

A gyors hosszváltoztatási manővert követő erő-regenerálódást egyváltozós exponenciális függvénnyel illesztettük, meghatározva annak sebességi állandóját ( $k_{tr,max}$ ) a maximális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál:

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

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

A kísérletek során nyert adatok rendszerezését Microsoft Excel 2007 és 2010 program segítségével táblázatos formában valósítottuk meg. A disszertáció ábráit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA) program segítségével készítettem. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM (mintaközép hibája) formában tüntettem fel. A mérési eredményeket megfelelően megválasztott Student-féle kétmintás t-próba vagy egy-utas variancia-analízis (ANOVA) és Bonferroni posthoc teszt segítségével hasonlítottuk össze. Lineáris regresszió analízist alkalmaztunk a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységben bekövetkező változás ( $\Delta pCa_{50}$ ) és a fehérje karboniláció közötti összefüggés vizsgálatára. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a P érték kisebb volt 0,05-nél.

## 4. Eredmények

### 4.1. Humán szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek karbonilációja

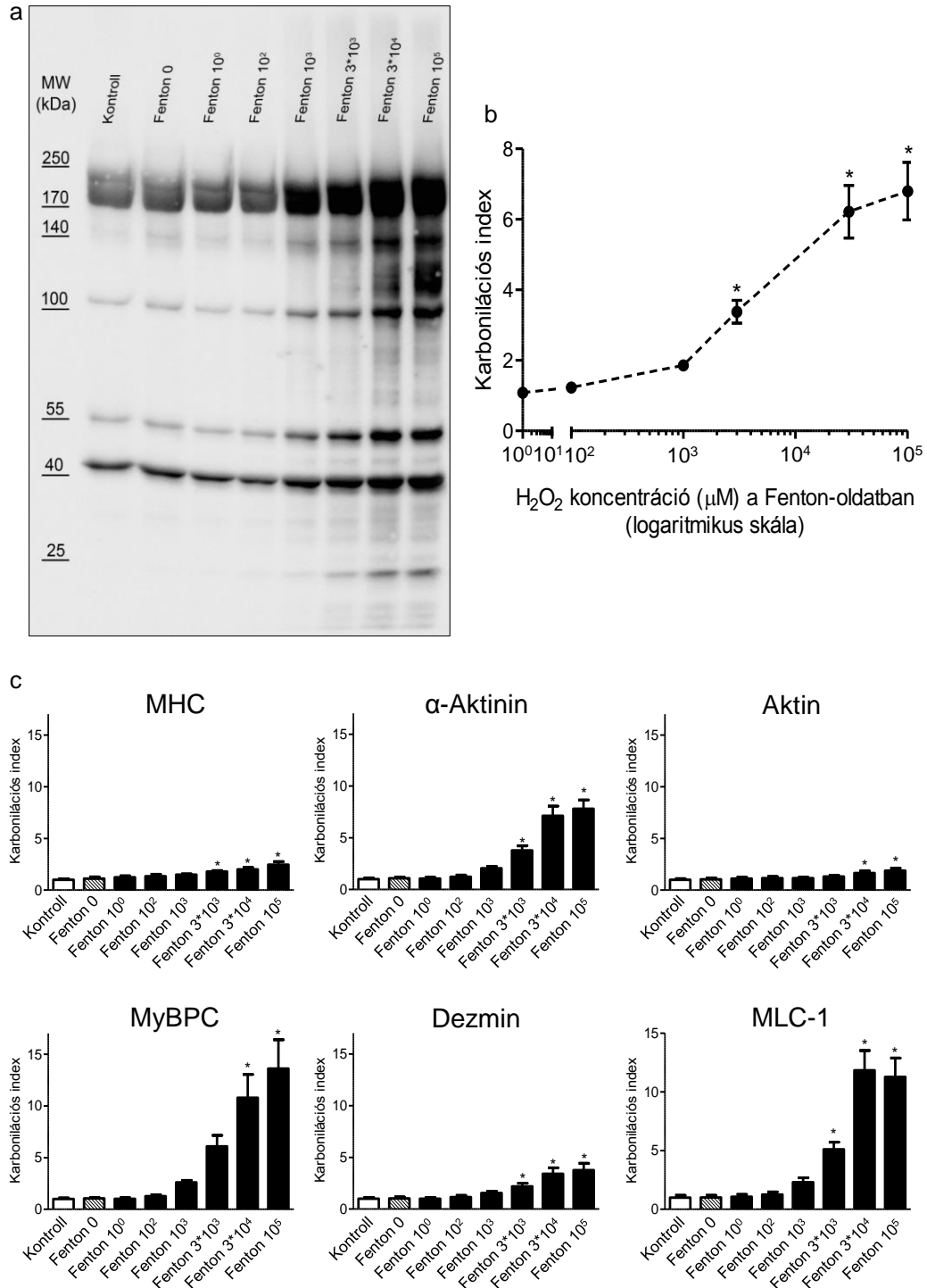
#### 4.1.1. Fenton-kezelés karbonilációt indukál

Humán szívizomsejteken Fenton-reakció segítségével *in vitro* modellrendszert alkalmaztunk a fehérje karboniláció kivitelezésére. Az oxyblot esszé során regisztrált fokozódó jelintenzitás jól tükrözi, hogy az emelkedő koncentrációban H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó Fenton-reagens hatására a humán permeabilizált szívizomsejtek fehérjéi fokozott karbonilációt mutatnak (4.a ábra).

A kontraktilis rendszert alkotó, fokozott karbonilációt mutató fehérjéket molekulaméret alapján azonosítottuk: MLC-1 (20 kDa), aktin (43 kDa), dezmin (55 kDa),  $\alpha$ -aktinin (100 kDa), MyBPC (140 kDa) és MHC (200 kDa). A kontraktilis fehérjék átlagos karbonilációs indexe a Fenton-reagensben található H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációjától függően szigmoid emelkedést mutatott (Kontroll: 1,00 $\pm$ 0,05; 0  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1,05 $\pm$ 0,06; 10<sup>0</sup>  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1,08 $\pm$ 0,06; 10<sup>2</sup>  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1,27 $\pm$ 0,07; 10<sup>3</sup>  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1,86 $\pm$ 0,11; 3\*10<sup>3</sup>  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 3,38 $\pm$ 0,32; 3\*10<sup>4</sup>  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 6,22 $\pm$ 0,75; 10<sup>5</sup>  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 6,80 $\pm$ 0,82; 4.b ábra). Egyes fehérjék (MLC-1, MyBPC és  $\alpha$ -aktinin) az átlagoshoz képest erősebb, míg más fehérjék (dezmin, aktin, MHC) gyengébb karbonilációt mutattak, jelezve a kontraktilis fehérjék eltérő érzékenységét a karbonilációs hatásokra (4.c ábra).

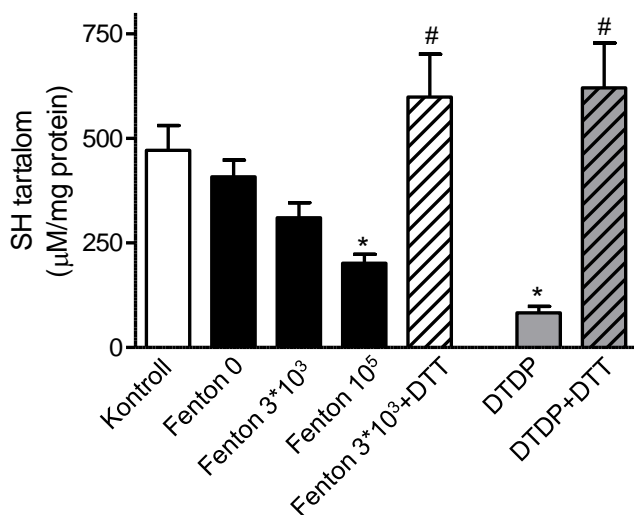
#### 4.1.2. Agresszív Fenton-kezelés SH oxidációt okoz

Ellman-reakciót használtunk, hogy megvizsgáljuk a Fenton-reakció indukálta SH oxidációs hatásokat. Ezen kísérleteink során DTDP szolgált pozitív kontrollként, míg DTT kezelést alkalmaztunk az SH oxidáció reverzibilitásának vizsgálatára.



**4. ábra Fenton-reakció hatására a humán permeabilizált szívizomsejtek kontraktilis fehérjéi karbonilálódnak.** Azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó homogenizátumokat *in vitro* Fenton-kezelések után SDS gélelektroforézisnek vetettük alá, majd oxyblot segítségével mutattuk ki a karboniláció mértékét. A reprezentatív ábrán a Fenton-reagensben található H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségének növekedésével párhuzamosan fokozódó jelintenzitás a miokardiális fehérjék szignifikáns karbonilációját jelzi (a). Az összes fehérje karbonilációját jellemző karbonilációs index jelentősen emelkedik (b). A fehérjéket molekulatömegük (MW) alapján azonosítottuk: MHC (miozin nehéz lánc, 200 kDa), MyBPC (miozinkötő C-fehérje, 140 kDa); α-aktinin (100 kDa), dezmin (55 kDa), aktin (43 kDa), MLC-1 (miozin könnyű lánc-1, 20 kDa). Az egyes fehérjék eltérő érzékenységet mutatnak a karbonilációval szemben (c) \* P<0,05 vs. Kontroll. Nomenklatura magyarázata: pl. Fenton 10<sup>3</sup> olyan Fenton-reagenst jelent, mely 10<sup>3</sup> μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmaz.

A Fenton-reakció lejátszódását követően az SH csoportok oxidációja következett be (kontroll:  $471,6 \pm 59,1 \mu\text{M}/\text{mg}$  protein; Fenton  $10^5$ :  $201,6 \pm 2,4 \mu\text{M}/\text{mg}$  protein;  $P < 0,05$ ), azonban csak extrém magas koncentrációban  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t tartalmazó reagensek alkalmazása hozott szignifikáns változást, míg az alacsonyabb  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációk esetében az SH oxidáció nem volt jelentős (Fenton 0:  $408,1 \pm 40,5 \mu\text{M}/\text{mg}$  protein; Fenton  $3 \cdot 10^3$ :  $310,4 \pm 36,1 \mu\text{M}/\text{mg}$  protein;  $P > 0,05$ ; 5. ábra). A belső kontrollként alkalmazott DTDP a vártan megfelelően tovább csökkentette a redukált SH tartalmat ( $83,1 \pm 15,3 \mu\text{M}/\text{mg}$  protein;  $P < 0,05$  vs. Kontroll), a DTT pedig bizonyította az SH oxidáció revertálhatóságát, mind DTDP ( $621,2 \pm 107,3 \mu\text{M}/\text{mg}$  protein), mind a Fenton-kezelést követően ( $599,3 \pm 102,1 \mu\text{M}/\text{mg}$  protein). A Fenton-reakció következményeként tehát a karboniláció mellett extrém magas  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációk alkalmazásával SH oxidációs hatások is kialakulnak (5. ábra).

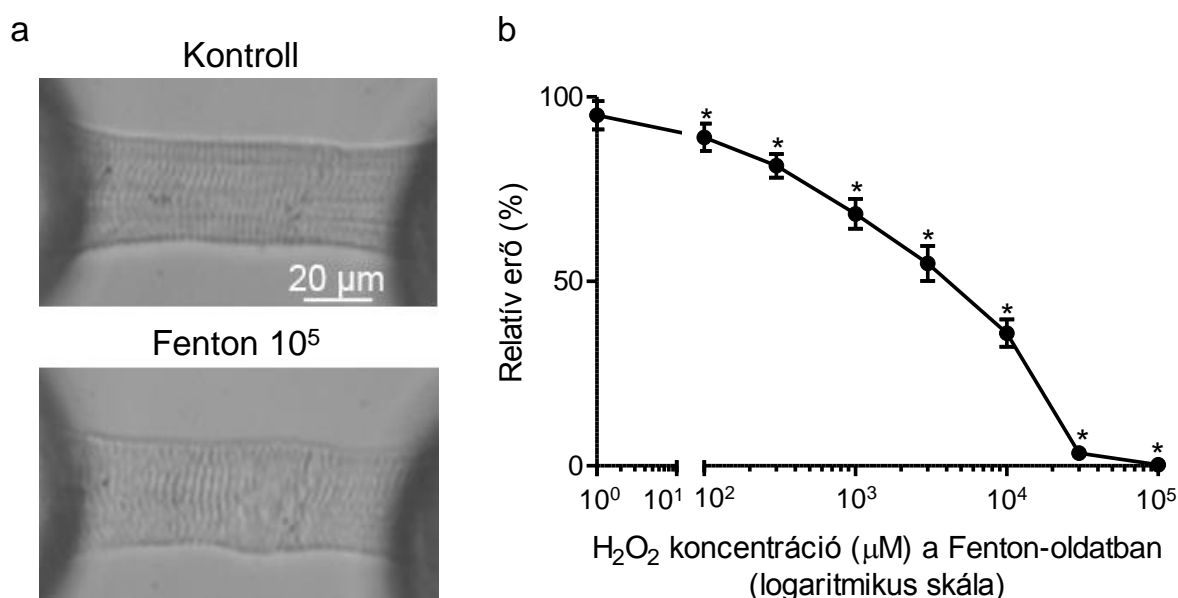


**5. ábra** A Fenton-reakció során keletkező szabad gyökök oxidálják a szulfhidril (SH) csoportokat. A Fenton-reagens, mely  $10^5 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot tartalmaz SH oxidációt idéz elő, melyet az Ellman-reakció segítségével kimutatott relatív SH tartalom csökkenése jelez. Az SH oxidáció revertálható az SH-reagens ditiotreitól (DTT, 10 mM) alkalmazásával. 2,2'-ditio-dipiridin (DTDP) és DTT a DTDP után belső kontrollként szolgál. \* $P < 0,05$  vs. Kontroll; # $P < 0,05$  vs. DTT előtt

#### 4.1.3. A fehérje karboniláció izometriás körülmények között csökkenti a kontraktilis erőt

A mechanikai mérőrendszerhez rögzített, izolált, permeabilizált humán szívizomsejteken ( $n=6$ ) a fentiekhez hasonlóan Fenton-kezelést alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk a kontraktilis fehérjék karbonilációjának funkcionális következményeit. Elsőként az

izometriás aktív erőre kifejtett koncentráció-függő hatást tanulmányoztuk (6. ábra). Kontroll kísérleteket végeztünk a preparátumok kísérlet közbeni stabilitásának vizsgálatára, mely során a szívizomsejteket ( $n=6$ ) a Fenton-reagens bázis oldataként alkalmazott izoláló oldattal kezeltük, és ismételt aktivációkat váltottunk ki. Ennek eredményeként a relatív erő 10 aktivációt követően  $87,4\pm 2,8\%$ -ra csökkent, mely nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. Az ismételt Fenton-kezelések során rögzítettük a szívizomsejtek fénymikroszkópos képét. A kísérletsorozat teljes hossza alatt sem következett be jelentős fénymikroszkóposan detektálható strukturális változás a szívizomsejtek szerkezetében (6.a ábra).



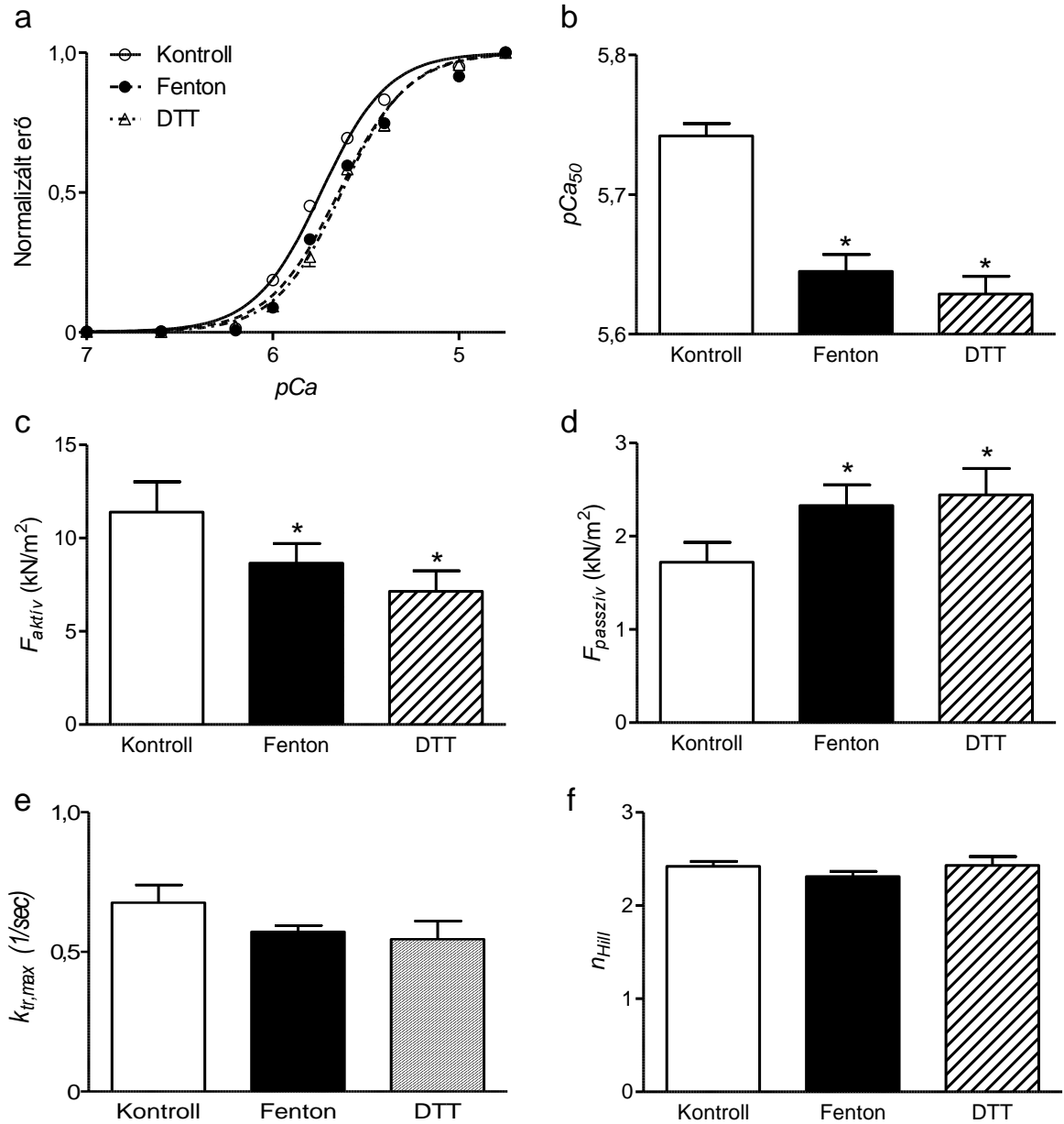
**6. ábra** A Fenton-reakció nem okoz strukturális változást, de csökkenti az aktív erőt. A Fenton-reakció nem eredményez fénymikroszkóposan látható morfológiai változást a mechanikai mérőrendszerhez rögzített, izolált szívizomsejtekben (a). A Fenton-reakció indukálta karboniláció az aktív erő koncentráció-függő csökkenését okozza ( $n=6$  szívizomsejt három humán szívből) (b). \* $P<0,05$  vs. első aktiváció

Ezzel szemben az  $F_{aktív}$  fokozatos csökkenését tapasztaltuk a fokozódó oxidatív hatásra, azaz a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációjának növekedésére a Fenton-reagensben, változatlan vas(II) és aszkorbinsav koncentráció mellett (Kontroll: 100,0%; Fenton 0:  $98,9\pm 3,3\%$ ; Fenton 10<sup>0</sup>:  $95,0\pm 3,9\%$ ; Fenton 10<sup>2</sup>:  $89,1\pm 3,7\%$ ; Fenton 10<sup>3</sup>:  $68,3\pm 4,1\%$ ; Fenton  $3\cdot 10^3$ :  $54,9\pm 4,7\%$ ;

Fenton  $10^4$ :  $36,0 \pm 3,7\%$ ; Fenton  $3 \cdot 10^4$ :  $3,5 \pm 1,6\%$ ; Fenton  $10^5$ :  $0,3 \pm 0,1\%$ ; 6.b ábra). Az  $F_{aktív}$ -ben bekövetkező változás összefüggésbe hozható a miofilamentáris fehérjék fokozódó karbonilációjával (4. és 6. ábra).

#### 4.1.4. A fehérje karboniláció a szívizomsejtek kontraktilis diszfunkciójához vezet

Az izolált humán szívizomsejtek egy másik csoportján ( $n=6$ )  $3 \cdot 10^3 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot tartalmazó Fenton-reagenst alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk, befolyásolja-e a karboniláció a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét ( $pCa_{50}$ ), az  $F_{aktív}$ -t és a  $F_{passzív}$ -t. Második lépésként DTT kezelést hajtottunk végre, az SH oxidáció funkcionális hatásainak tanulmányozására. A Fenton-reakció hatására a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének egyértelmű csökkenését tapasztaltuk, mely a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés jobbra tolódásában és a  $pCa_{50}$  érték szignifikáns csökkenésében mutatkozott meg [ $pCa_{50}(\text{Kontroll})$ :  $5,74 \pm 0,01$ ;  $pCa_{50}(\text{Fenton})$ :  $5,65 \pm 0,01$ ; 7.a és b ábra]. Ezen felül a kezelés csökkentette az  $F_{aktív}$ -t és jelentősen növelte a  $F_{passzív}$ -t [ $F_{aktív}(\text{Kontroll})$ :  $11,39 \pm 1,63 \text{ kN/m}^2$ ;  $F_{aktív}(\text{Fenton})$ :  $8,66 \pm 1,06 \text{ kN/m}^2$ ;  $F_{passzív}(\text{Kontroll})$ :  $1,72 \pm 0,21 \text{ kN/m}^2$ ;  $F_{passzív}(\text{Fenton})$ :  $2,33 \pm 0,22 \text{ kN/m}^2$ ] (7.c és d ábra). Az aktin-miozin ciklus sebességét jellemző konstans és a Hill-koefficiens nem változott a kezelés hatására [ $k_{tr,max}(\text{Kontroll})$ :  $0,68 \pm 0,06 \text{ 1/sec}$ ;  $k_{tr,max}(\text{Fenton})$ :  $0,57 \pm 0,02 \text{ 1/sec}$ ;  $n_{Hill}(\text{Kontroll})$ :  $2,42 \pm 0,05$ ;  $n_{Hill}(\text{Fenton})$ :  $2,31 \pm 0,06$ ] (7.e és f ábra). A DTT kezelés nem okozott változást a fenti paraméterek egyikében sem [ $pCa_{50}(\text{DTT})$ :  $5,63 \pm 0,01$ ;  $F_{aktív}(\text{DTT})$ :  $7,14 \pm 1,10 \text{ kN/m}^2$ ;  $F_{passzív}(\text{DTT})$ :  $2,44 \pm 0,28 \text{ kN/m}^2$ ;  $k_{tr,max}(\text{DTT})$ :  $0,55 \pm 0,07 \text{ 1/sec}$ ;  $n_{Hill}(\text{DTT})$ :  $2,43 \pm 0,10$ ;  $P > 0,05$  vs. Fenton;  $P < 0,05$  vs. Kontroll] (7. ábra).



**7. ábra** A karboniláció kontraktilis rendszer működésére kifejtett hatásai. A  $3 \cdot 10^3 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot tartalmazó Fenton-reagens (Fenton) hatására csökken a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége, ahogy azt a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés jobbra tolódása (a) és a  $p\text{Ca}_{50}$  érték csökkenése (b) jelzi. A karboniláció csökkenti az  $F_{aktiv}$ -t (c) és növeli a  $F_{passziv}$ -t (d). Az aktin-miozin ciklus sebessége (e) és a Hill-koefficiens (f) nem változott a kezelések hatására. A szekvenciálisan alkalmazott DTT kezelés egyik paramétert sem befolyásolja. A szórást (mintaközép hibája, SEM) jelző hibajelek azon esetekben kerültek feltüntetésre, ahol az nagyobb, mint az átlagot jelölő szimbólum mérete.  $n=6$  szívizomsejt három humán szívből \* $P < 0,05$  vs. Kontroll

#### 4.2. Posztinfarktusos szívizom-átépülés egér szívekben a szívizomsejtek szintjén

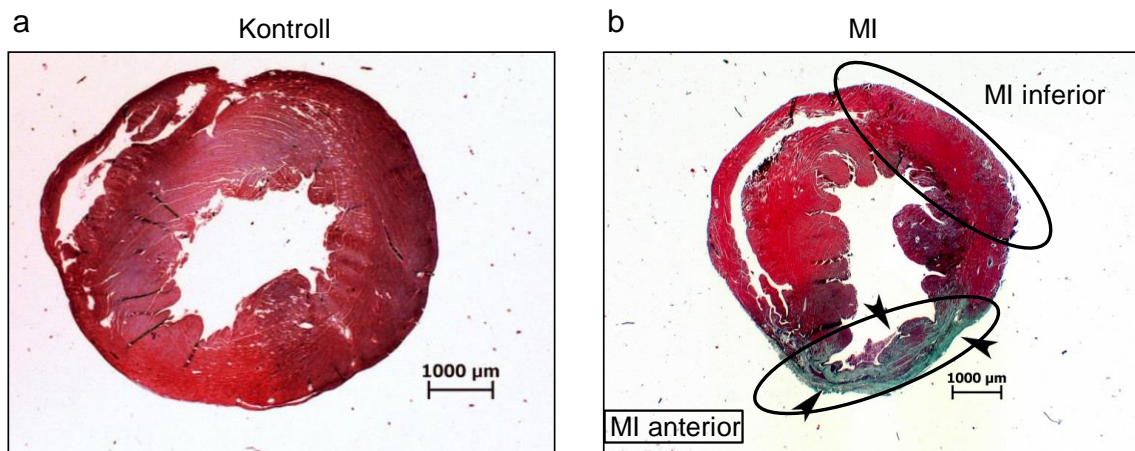
##### 4.2.1. Az infarktus mérete és globális bal kamra funkció

10 héttel a sebészi LAD ligációt követően az egerek a bécsi laboratóriumban szívultrahangos vizsgálaton estek át. A bal kamra szisztolés funkciója a kontroll

csoporthoz képest közel felére csökkent az infarktus hatására (2. táblázat). Ezt követően az eltávolított szívek Masson-trikróm festett metszetein (8. ábra) meghatároztuk az infarktusos terület nagyságát, mely átlagosan a bal kamra 50,3±5,7%-át tette ki, de felfedeztünk a heges területben túlélő miokardiális sejteket. A kontroll csoportra a bal kamra homogén festődése jellemző, infarktus jelenléte nélkül. Az 2. táblázat foglalja össze az állatok morfometriai adatait.

	Kontroll (n=5)	MI (n=8)
Testtömeg (g)	34,6 ± 1,3	37,0 ± 0,8
Szív tömege (mg)	242 ± 12	295 ± 25
Szívtömeg/testtömeg (mg/g)	7,0 ± 0,4	7,9 ± 0,5
Tüdőtömeg/testtömeg (mg/g)	7,9 ± 0,3	8,2 ± 0,3
Ejekciós frakció (%)	62,7 ± 1,3	34,9 ± 3,6*

2. táblázat A kontroll és infarktusos állatok morfometriai adatai és a bal kamra szisztolés funkcióját jellemző ejekciós frakció átlagos értékei (átlag±SEM; n=állatok száma; \*P<0,05 MI vs. Kontroll)



8. ábra Kontroll és infarktusos bal kamrai Masson-trikróm festett metszetek a papillaris izom szintjében. A kontroll szívek (a) homogén egyenletes piros festődése, az infarktusos szívek (b) (MI) inferior területéhez hasonlóan ép miokardiális szövetet jelez. Az infarktusos bal kamra anterior területére (nyilakkal jelölve) a miokardium elvékonyodása és a zölden festődő kötőszöveti elemek felszaporodása (hegeképződés) jellemző a posztinfarktusos remodelláció részeként. A hegszövetben túlélő kardiomiociták pirosan festődnek.

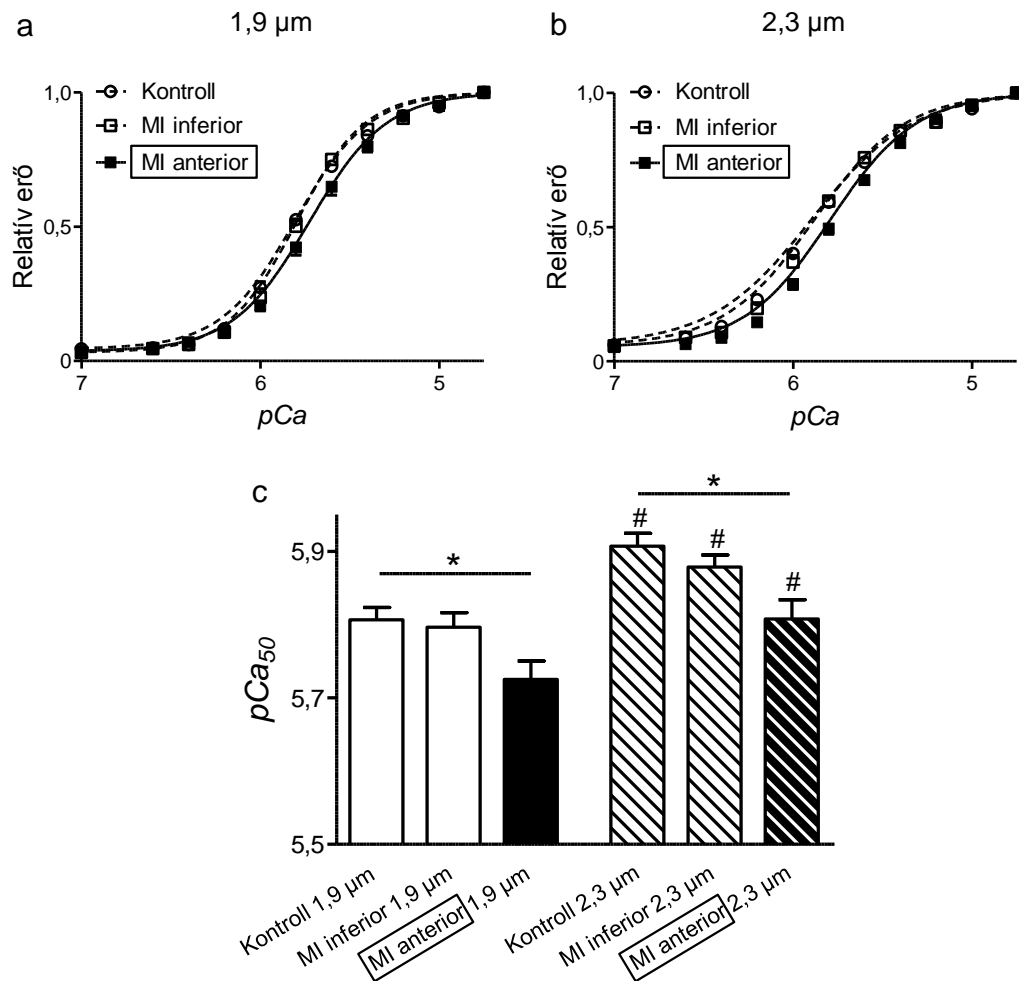
#### 4.2.2. Csökkent $Ca^{2+}$ -érzékenység miokardiális infarktus után

Izometriás erőméréseket végeztünk mindkét csoportból származó izolált, permeabilizált bal kamrai szívizomsejteken és meghatároztuk a kontraktilis rendszer aktív és passzív

erejét, a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, illetve jellemeztük az aktin-miozin ciklus sebességét (3. táblázat). Az infarktusos területen túlélő szívműködő sejtek kontraktilis rendszere alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységgel volt jellemezhető, mind az ellenoldali, nem infarcterülétes területről, mind a kontroll bal kamrából származó szívműködő sejtekhez képest. Ez a különbség az általunk vizsgált mindkét szarkomerhosszon (1,9  $\mu\text{m}$  és 2,3  $\mu\text{m}$ ) szignifikánsnak bizonyult. A kontraktilis rendszer hosszfüggő sajátosságai megtartottak maradtak az infarktusos bal kamrákban is, melyet az egyes paraméterek szarkomerhossz növelésre bekövetkező változásai mutatnak (9. ábra, 3. táblázat). Az egyes csoportokban mért  $F_{\text{aktív}}$ ,  $F_{\text{passzív}}$ ,  $k_{\text{tr,max}}$  és  $n_{\text{Hill}}$  értékekben, illetve a szívműködő sejtek struktúrájában nem mutatkozott különbség (3. táblázat).

SL	Kontroll (n=39)		MI inferior (n=10)		MI anterior (n=19)	
	1,9 $\mu\text{m}$	2,3 $\mu\text{m}$	1,9 $\mu\text{m}$	2,3 $\mu\text{m}$	1,9 $\mu\text{m}$	2,3 $\mu\text{m}$
$F_{\text{aktív}}$ ( $\text{kN/m}^2$ )	9,53 $\pm$ 0,55	15,66 $\pm$ 1,27*	11,52 $\pm$ 1,42	15,91 $\pm$ 2,26*	9,47 $\pm$ 0,90	14,62 $\pm$ 2,10*
$F_{\text{passzív}}$ ( $\text{kN/m}^2$ )	0,36 $\pm$ 0,04	2,23 $\pm$ 0,25*	0,60 $\pm$ 0,11	2,41 $\pm$ 0,52*	0,75 $\pm$ 0,12	2,48 $\pm$ 0,31*
$p\text{Ca}_{50}$	5,81 $\pm$ 0,02	5,91 $\pm$ 0,02*	5,80 $\pm$ 0,02	5,88 $\pm$ 0,02*	5,73 $\pm$ 0,03 <sup>#</sup>	5,81 $\pm$ 0,03 <sup>#</sup>
$n_{\text{Hill}}$	2,08 $\pm$ 0,06	1,63 $\pm$ 0,05	2,20 $\pm$ 0,17	1,71 $\pm$ 0,08	2,02 $\pm$ 0,08	1,76 $\pm$ 0,06
$k_{\text{tr,max}}$ (1/sec)	3,69 $\pm$ 0,15	3,80 $\pm$ 0,12	4,08 $\pm$ 0,40	4,31 $\pm$ 0,21	3,34 $\pm$ 0,20	3,32 $\pm$ 0,22

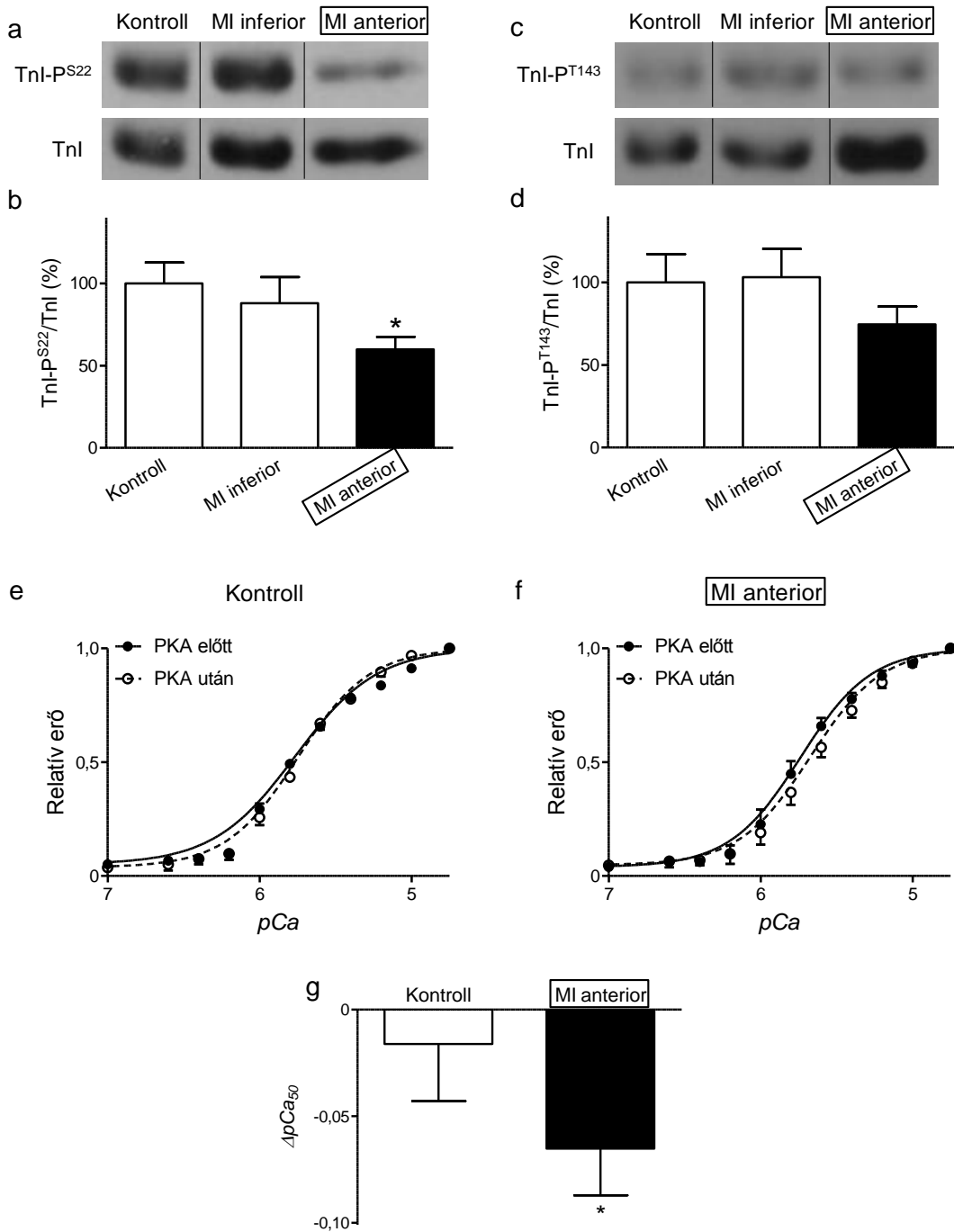
**3. táblázat A kontroll és infarktusos bal kamrából izolált szívműködő sejtek izometriás erőmérések során nyert mechanikai paraméterei (átlag $\pm$ SEM; n=szívműködő sejtek száma, melyek 5 kontroll és 8 infarktusos szívből származtak) \* $P < 0,05$  SL: 1,9  $\mu\text{m}$  vs. SL: 2,3  $\mu\text{m}$ ; <sup>#</sup> $P < 0,05$  MI anterior vs. Kontroll; SL – szarkomerhossz,  $F_{\text{aktív}}$  – izometriás aktív erő,  $F_{\text{passzív}}$  – passzív erő,  $p\text{Ca}_{50}$  – a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége,  $n_{\text{Hill}}$  – Hill-koefficiens,  $k_{\text{tr,max}}$  – aktin-miozin ciklus sebessége**



**9. ábra** A kontroll és infarktuszos bal kamrából izolált szívizomsejtek kontraktilis rendszerének  $Ca^{2+}$ -érzékenysége. Az MI anterior szívizomsejtek ( $n=19$ )  $Ca^{2+}$ -erő összefüggése jobbra helyezett a kontroll ( $n=39$ ) és az MI inferior ( $n=10$ ) területekről származó szívizomsejtekéhez képest mind 1,9  $\mu$ m-es (a), mind 2,3  $\mu$ m-es (b) szarkomerhosszon (SL) mérve. Ennek megfelelően az MI anterior szívizomsejtek átlagos  $pCa_{50}$  értéke szignifikánsan alacsonyabb, mely a kontraktilis rendszer csökkent  $Ca^{2+}$ -érzékenységét jelenti. Mindhárom csoportban megtartott a hosszfüggő  $Ca^{2+}$ -érzékenyítés mechanizmusa, melyet a szarkomerhossz növelésére bekövetkező  $Ca^{2+}$ -érzékenység fokozódás tükröz (c). \* $P<0,05$  MI anterior vs. Kontroll, # $P<0,05$  SL: 1,9  $\mu$ m vs SL: 2,3  $\mu$ m

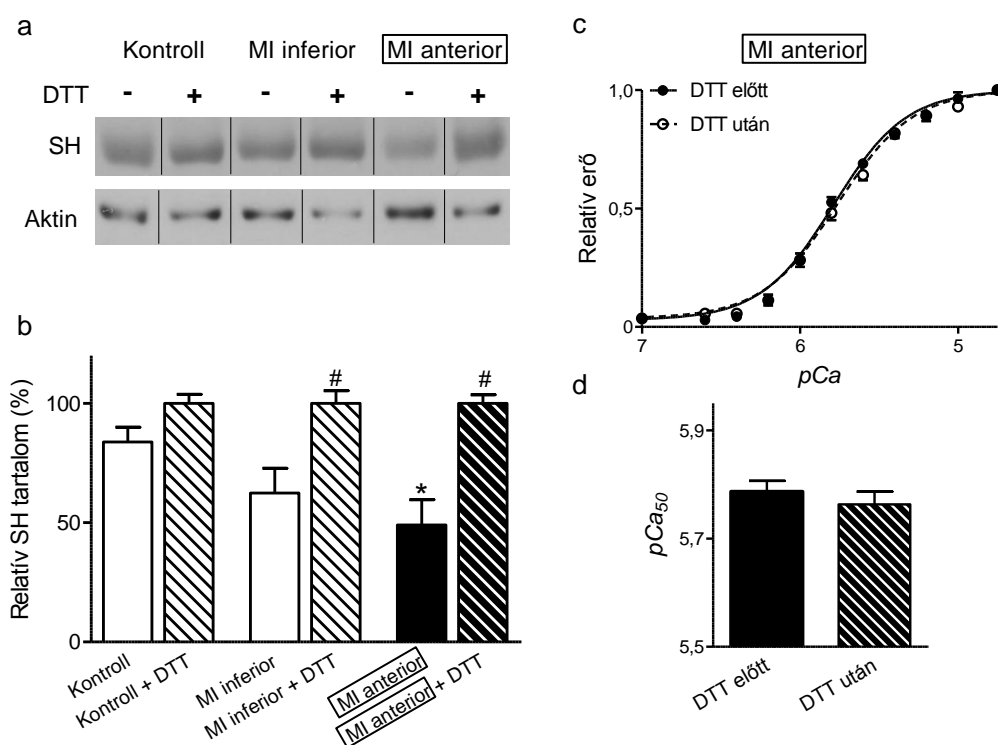
#### 4.2.3. Alacsonyabb TnI foszforiláció az infarktuszos területen

A csökkent  $Ca^{2+}$ -érzékenység háttérében álló lehetséges mechanizmusok feltérképezése kapcsán elsőként a TnI foszforilációs állapotát vizsgáltuk. Foszforiláció-specifikus antitestek segítségével Western blotlalt vizsgáltuk a TnI PKA- és PKC-specifikus foszforilációs helyeit.



**10. ábra TnI foszforiláció és a kontroll és infarktusos szívizomsejtek Ca<sup>2+</sup>-érzékenységének PKA függő változásai.** A TnI foszforiláció mértékének meghatározására Western immunoblot (a és c) során foszforilációtól független TnI ellenes (TnI) és PKA- (TnI-P<sup>S22</sup>) és PKC-specifikus (TnI-P<sup>T143</sup>) foszforilációra érzékeny antitestek használatával kapott jelek denzitometriai elemzése (b és d) történt meg. Az MI anterior területen alacsonyabb PKA-specifikus TnI-foszforilációt detektáltunk a kontrollhoz képest (a és b), míg a PKC-specifikus TnI foszforiláció hasonló a különböző területeken (c és d). A fehérje homogenizátumok 4-5 kontroll és 6 infarktusos szívből származtak, az esszéket 3-6-szor ismételtük. In vitro PKA kezelés a kontroll sejteken (n=4) nem okoz változást, míg az MI anterior szívizomsejtekben (n=5) tovább csökkenti a Ca<sup>2+</sup>-érzékenységet, ahogy azt az átlagos pCa<sub>50</sub> érték csökkenésének változása (ΔpCa<sub>50</sub>) is mutatja (e-g). \*P<0,05 MI anterior vs. Kontroll; #P<0,05 PKA előtt vs. PKA után

A PKC-specifikus treonin 143 hely foszforilációja hasonló mértékűnek adódott mindhárom csoportban. Ezzel ellentétben a PKA-specifikus 22-es szerin aminosav alacsonyabb szintű foszforilációját mutattuk ki az infarktusz területéről származó mintákban (10.a-d ábra). Ezzel összhangban, ezen szívizomsejtek *in vitro* PKA kezelése, mely a PKA-függő foszforilációs helyek fokozott foszforilációjához vezet, a  $Ca^{2+}$ -érzékenység kismértékű, bár statisztikailag szignifikáns csökkenését eredményezte, míg a kezelés a kontroll szívizomsejtekben nem idézett elő változást (10.e-g ábra).



**11. ábra Miofilamentáris fehérje SH oxidáció miokardiális infarktus után.** Western immunoblot esszé (a) eredményeinek denzitometriai elemzése (b) során az MI anterior szívizomsejtek aktinjának fokozott SH oxidációját detektáltuk a kontrollhoz képest. Az aktin-ellenes antitest segítségével meghatározott fehérje mennyiség (Aktin) normalizációs célokat szolgált. 10 mM DTT csökkenti az oxidált SH csoportok mennyiségét (DTT-kezelt minták relatív szignál intenzitása: 100%), habár nincs hatással az MI anterior szívizomsejtek (n=6) kontraktilis rendszerének  $Ca^{2+}$ -érzékenységére, melyet a  $Ca^{2+}$ -erő összefüggés változatlan pozíciója (c) és a hasonló pCa<sub>50</sub> értékek mutatnak (d). A fehérje homogenizátumok 4 kontroll és 7 infarktusz szívből származtak. \*P<0,05 MI anterior vs. Kontroll, #P<0,05 azonos terület DTT előtt vs. DTT után

#### 4.2.4. Fokozott SH oxidáció funkcionális következmények nélkül

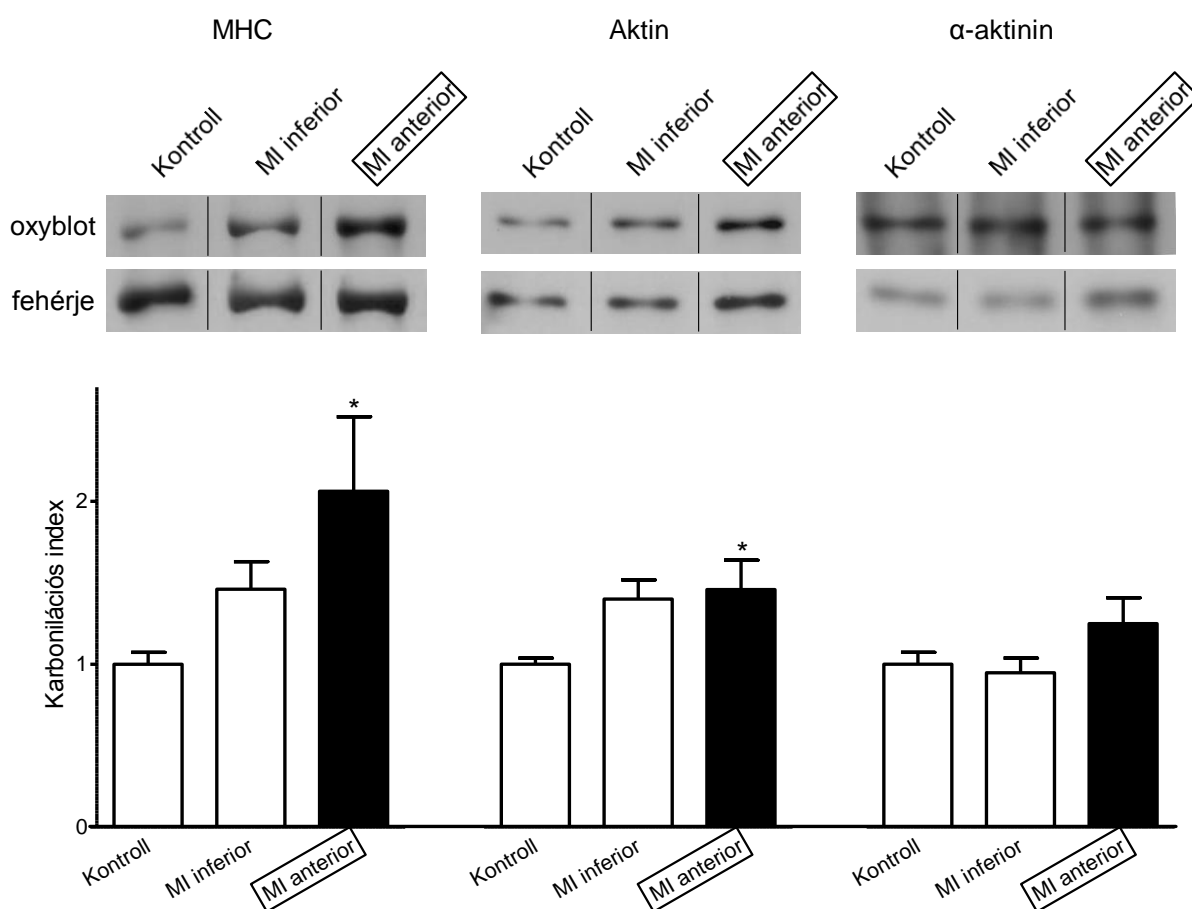
Következő lépésben az oxidatív fehérje módosulások szerepét vizsgáltuk az infarktus utáni szívizom átépülés részeként detektált alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység hátterében. Az aktin SH oxidációját, mint általános miofilamentum SH oxidációs markert használtuk, és biotin-streptavidin rendszert alkalmaztunk az SH oxidáció vizsgálatára. A redukált SH csoportok mennyiségének változásából következtettünk az SH oxidáció mértékére. Western immunoblot esszék eredményei alapján az infarktusos területről származó szívizomsejtek aktinja jelentősen kisebb mennyiségű redukált SH csoportot tartalmazott a kontrollhoz képest, ami ezen terület fokozott SH oxidációjára utal (Kontroll:  $83,8 \pm 6,2\%$ ; MI inferior:  $62,5 \pm 10,3\%$ ; MI anterior:  $49,1 \pm 10,6\%$ ; 11.a és b ábra). *In vitro* alkalmazott SH-reagens DTT hatására a redukált SH csoportok mennyisége szignifikánsan megemelkedett (100%), ami az SH oxidáció reverzibilitását bizonyítja. Ugyanakkor a DTT hatására az MI anterior szívizomsejtek kontraktilis rendszerének  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége nem változott ( $pCa_{50}$ (DTT előtt):  $5,79 \pm 0,02$ ;  $pCa_{50}$ (DTT után):  $5,76 \pm 0,02$ ;  $P > 0,05$ ; 11.c és d ábra).

#### 4.2.5. Intenzív karboniláció a szívinfarktust követő szívizom-átépülésben

Oxyblot esszé segítségével vizsgáltuk a karboniláció esetleges szerepét a posztinfarktusos szívizom-átépülés folyamatában, összehasonlítva a kontroll és infarcerált bal kamrákból származó miofilamentáris fehérje homogenizátumok relatív karbonilációját karbonilációs indexként kifejezve (a kontroll csoport karbonilációs indexét 1-nek tekintettük). Kísérleteink során az aktin (Kontroll:  $1,00 \pm 0,04$ ; MI inferior:  $1,40 \pm 0,12$ ; MI anterior:  $1,46 \pm 0,18^*$ ;  $P < 0,05$  vs. Kontroll) és az MHC karbonilációja (Kontroll:  $1,00 \pm 0,07$ ; MI inferior:  $1,46 \pm 0,17$ ; MI anterior:  $2,06 \pm 0,46^*$ ;  $P < 0,05$  vs. Kontroll) jelentősen magasabbnak adódott az infarktusos területről származó mintákban a kontrollhoz képest, míg az  $\alpha$ -aktinin (Kontroll:  $1,00 \pm 0,07$ ; MI inferior:  $0,95 \pm 0,09$ ; MI anterior:  $1,25 \pm 0,16$ ;  $P > 0,05$ ) és a

MyBPC (Kontroll:  $1,00 \pm 0,14$ ; MI inferior:  $0,82 \pm 0,11$ ; MI anterior:  $0,70 \pm 0,14$ ;  $P > 0,05$ )

esetében hasonló karbonilációs indexet kaptunk mindhárom csoportban (12. ábra).



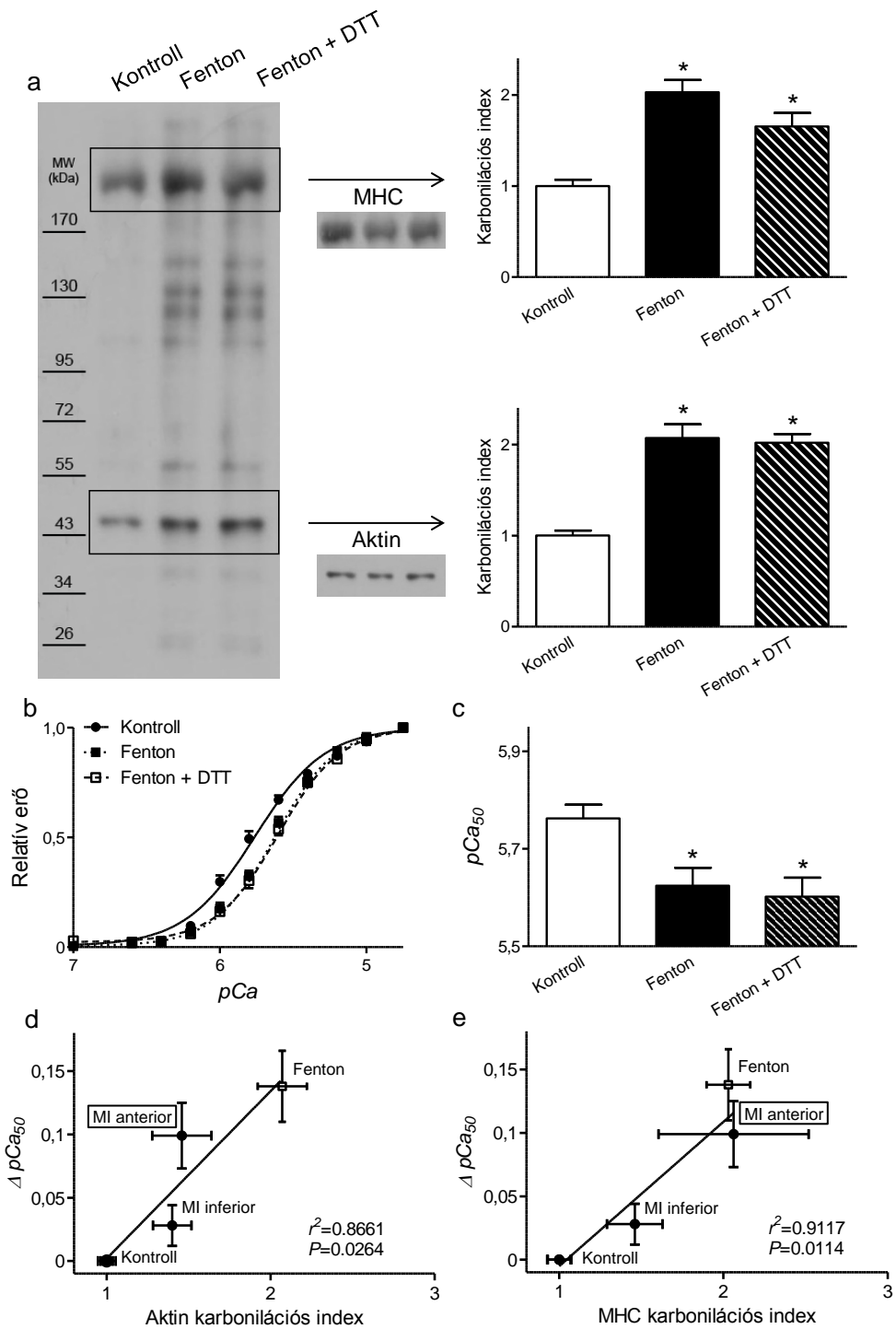
**12. ábra Kontraktilis fehérjék karbonilációja MI után.** Az oxyblot esszék az infarktusos területről származó szívműködő sejtekből a MHC és az aktin fokozott karbonilációját (oxyblot) igazolták a kontrollhoz képest. Az  $\alpha$ -aktinin karbonilációja hasonló mértékű mindhárom csoportban. A fehérjék mennyiségét MHC-, aktin-, illetve  $\alpha$ -aktinin-specifikus antitestekkel meghatározva (fehérje) a karbonilációs index számításához használtuk normalizációs céllal. A fehérje homogenizátumok 4 kontroll és 7 MI szívből származtak, az esszéket háromszor ismételtük. \* $P < 0,05$  MI anterior vs. Kontroll

#### 4.2.6. A karboniláció egér szívműködő sejteken is csökkenti a $Ca^{2+}$ -érzékenységet

*In vitro* Fenton-reakció segítségével vizsgáltuk az egér szívműködő sejteken is, hogy a miofilamentumok karbonilációja összefüggésben áll-e az alacsonyabb  $Ca^{2+}$ -érzékenységgel.  $H_2O_2$ , vas(II) és aszkorbinsav segítségével fokozott hidroxil gyök termelődés kapcsán idéztük elő a miofilamentumok karbonilációját. Az intenzív fehérje karboniláció mellett enyhe SH oxidációs hatásokat mutattunk ki (relatív SH tartalom:

Kontroll:  $100,0 \pm 1,4\%$ ; Fenton:  $77,8 \pm 3,5\%$ ), ezért a továbbiakban DTT kezelést alkalmaztunk az esetleges SH oxidáció kiküszöbölése érdekében.

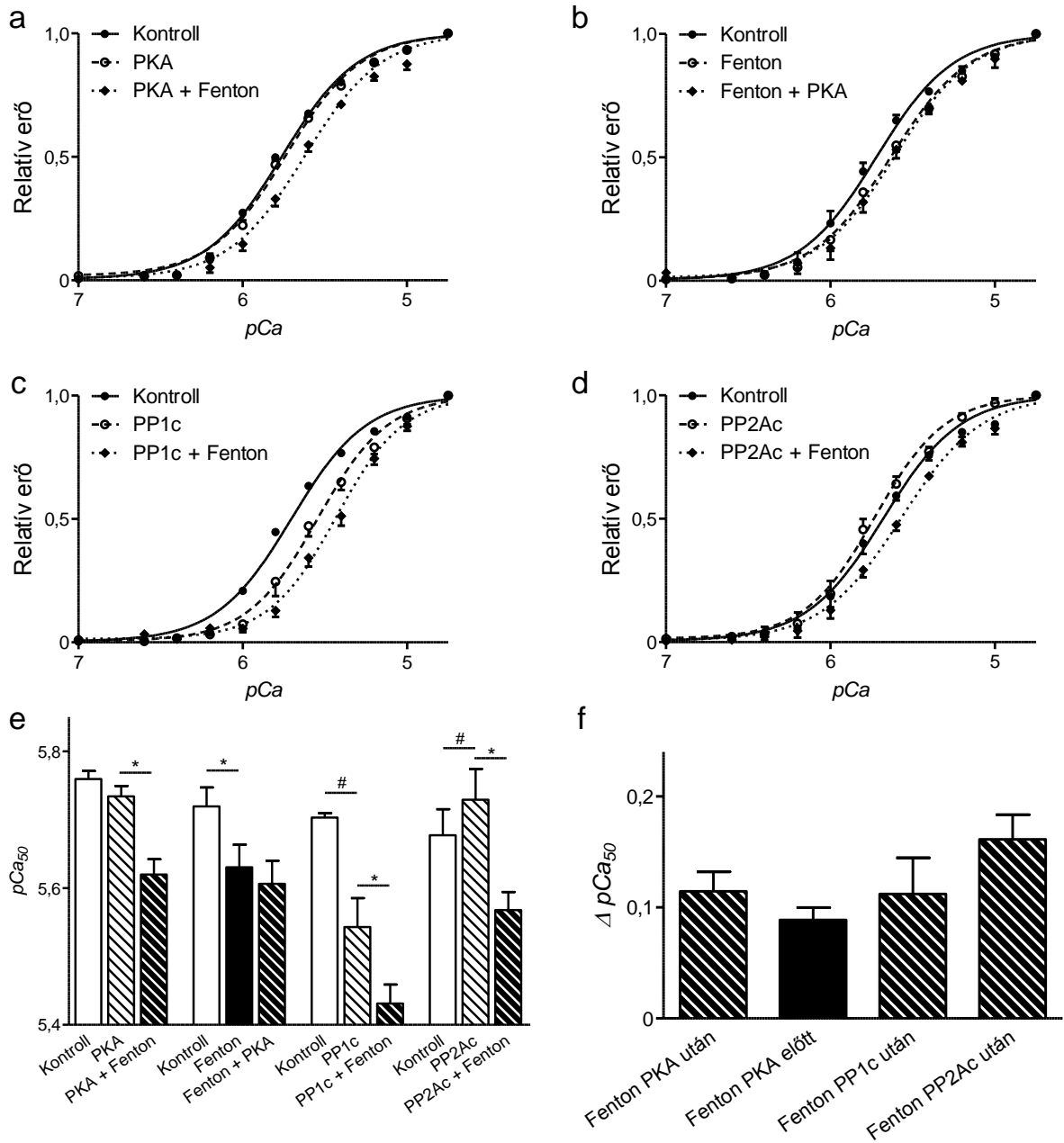
Az infarktusos egérmodell vizsgálata kapcsán nyert eredményekhez hasonlóan a Fenton-kezelést követően számos fehérje, többek között az aktin és a MHC fokozott karbonilációját regisztráltuk, melynek mértéke hasonló volt az infarktusos mintákban detektált értékekhez. Ezen hatást a következő lépésben végzett DTT kezelés nem befolyásolta (13.a ábra). A Fenton-reagenst a mechanikai mérőrendszerhez rögzített, izolált, permeabilizált kontroll szívműködésekre alkalmaztuk  $2,3 \mu\text{m}$ -es szarkomerhosszon. A kezelés szignifikánsan csökkentette a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét ( $pCa_{50}$ (Kontroll):  $5,76 \pm 0,03$ ;  $pCa_{50}$ (Fenton):  $5,62 \pm 0,04$ ) és az aktív erőt ( $\sim 40\%$ -kal), melyeket a továbbiakban alkalmazott DTT kezelés nem befolyásolt (13. b és c ábra). Ezen felül az infarktusos bal kamra két általunk vizsgált területét (MI anterior és inferior), valamint a Fenton-kezelést jellemző  $pCa_{50}$  érték kontrollhoz viszonyított csökkenése ( $\Delta pCa_{50}$ ) és a relatív aktin ( $P=0,0264$ ;  $r^2=0,8661$ ) és MHC karboniláció ( $P=0,0114$ ;  $r^2=0,9117$ ) között egy látszólagos lineáris összefüggést mutattunk ki (13.d és e ábra).



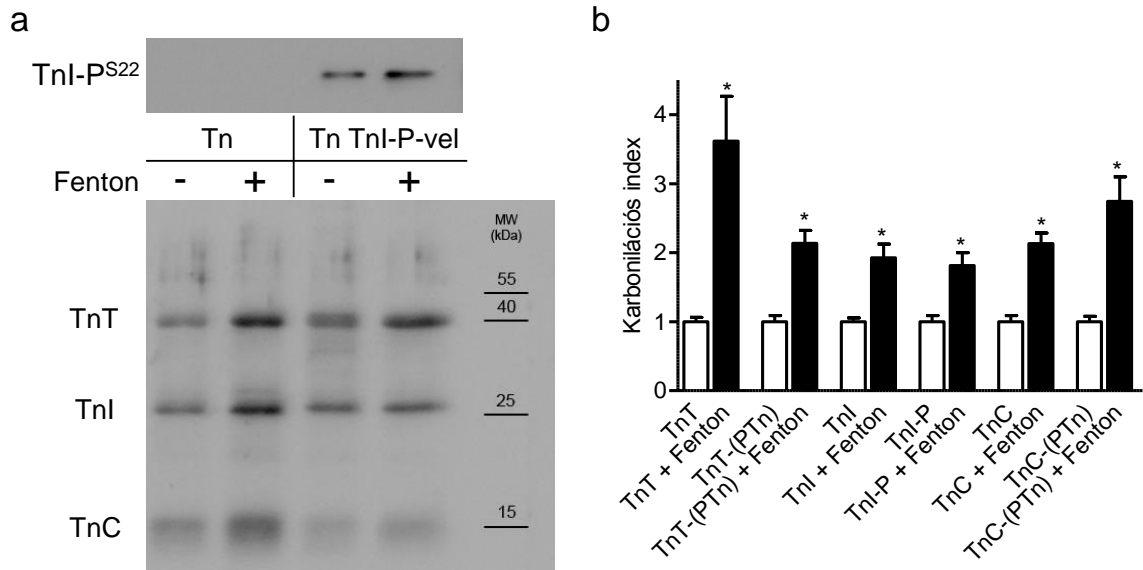
**13. ábra** A miofilamentáris fehérjék *in vitro* karbonilációja csökkenti a kontroll szívműködés kontraktilis rendszerének  $Ca^{2+}$ -érzékenységet. A Fenton-reakció hatására a szívműködésben számos kontraktilis fehérje karbonilációja fokozódik, többek között az aktin és a MHC (a). A karboniláció mértéke nem változik a DTT hatására (10 mM). A szívműködés 4 kontroll egér szívből származtak, a kísérleteket négyszer ismételtük. A karbonilációs jelet az aktin és a MHC mennyiségére normalizáltuk (MHC, Aktin), melyeket Western blottal határoztunk meg. A karboniláció hatására a kontroll szívműködés jellemező  $Ca^{2+}$ -erő összefüggés jobbra tolódása (b) és az átlagos pCa<sub>50</sub> érték csökkenése figyelhető meg (c). A következő lépésben végrehajtott DTT kezelés (Fenton+DTT) nem állítja vissza a  $Ca^{2+}$ -érzékenységet (n=7 szívműködés 3 kontroll szívből) (b és c). Pozitív korreláció mutatható ki a  $Ca^{2+}$ -érzékenység változása és az aktin (d) ( $P=0,0264$ ;  $r^2=0,8661$ ) valamint az MHC karbonilációjának mértéke ( $P=0,0114$ ;  $r^2=0,9117$ ) között mind az *in vivo*, mind az *in vitro* modellben (Fenton) (e). \* $P<0,05$  vs. Kontroll

#### 4.2.7. *A miofilamentumok karbonilációjának hatása független a foszforilációtól*

A fehérje foszforiláció és a karboniláció közötti esetleges interakciók felfedésére a Fenton-kezelés  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységre kifejtett hatásait vizsgáltuk különböző foszforilációs állapotokban, így PKA alkalmazása előtt és után, valamint fehérje foszfatázokkal (PP1c vagy PP2Ac) történt kezelést követően. Az előző eredményeinkkel összhangban, a PKA-kezelés nem módosította a kontroll szívizomsejtek kontraktilis rendszerének  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét [19], sem a hatásos Fenton-reakció előtt, sem pedig utána (14.a és b ábra). Ezzel szemben a PP1c csökkentette, míg a PP2Ac fokozta a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet (14.c és d ábra), előző irodalmi eredményekkel egybehangzóan [49, 50]. A Fenton-indukálta  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés mértéke hasonló volt a kináz és foszfatáz kezelésektől függetlenül (14.e és f ábra). Ezen eredmények azt mutatják, hogy a Fenton-kezelés  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységre kifejtett hatása független a kontraktilis fehérjék foszforiláltsági állapotától. Ezt a felfedezést tovább erősíti a foszforilált és defoszforilált alegységeket tartalmazó rekombináns Tn komplexek Fenton-reagenssel történő kezelése, mely a foszforilált és defoszforilált komplexek hasonló mértékű karbonilációjához vezetett (15. ábra), alátámasztva a fenti eredményeket.



**14. ábra** A karboniláció  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységre kifejtett hatása független a kontraktilis fehérjék aktuális foszforilációs állapotától. A szívizomsejteket a PKA katalitikus alegysége jelenlétében inkubálva nem változik a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége sem a Fenton-kezelés előtt (a és e) sem a Fenton-kezelés után (b és e), mely az előzőeknek megfelelően csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet. ( $n=6-5$  szívizomsejt 3 eger szívből). PP1c csökkenti (c és e), míg a PP2Ac növeli a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét (d és e). A foszfatázok után szekvenciálisan alkalmazott Fenton-kezelés mindkét esetben alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet eredményez ( $n=6-6$  szívizomsejt 3 eger szívből). A  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység karbonilációhoz köthető csökkenését mutatja a kezelést követően regisztrált alacsonyabb  $p\text{Ca}_{50}$  érték a kezelés előttihez viszonyítva (e). A  $p\text{Ca}_{50}$  érték csökkenésének mértéke minden esetben hasonló, a PKA és a foszfatáz kezelésektől függetlenül (f)  $^{\#}P<0,05$  Fenton előtt vs. Fenton után;  $^{\#}P<0,05$  PP1c vagy PP2Ac előtt vs. után



**15. ábra Rekombináns Tn komplexek karbonilációja.** A rekombináns Tn komplexek (Tn komplex foszforilált vagy defoszforilált TnI-t tartalmaz, melyet foszforiláció specifikus TnI- $P^{S22}$  antitestekkel igazoltunk) tagjai hasonló mértékű karbonilációt mutattak a Fenton-kezelés hatására, függetlenül a TnI foszforilációs állapotától (**a** és **b**). \* $P < 0,05$  Fenton előtt vs. Fenton után

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Kontraktilis fehérjék karbonilációja befolyásolja a humán szívizomsejtek kontraktilitását

Munkám első részében a fehérje karboniláció közvetlen hatásait vizsgáltuk a humán szívizomsejtek kontraktilis funkcióira. A fehérje karboniláció kiváltására Fenton-reakciót alkalmaztunk, mely hidroxil gyökök termelődését eredményezi. Kísérleti elrendezésünk, a permeabilizált szívizomsejtek alkalmazása lehetővé tette, hogy az izometriás erőgenerációt jellemző paraméterekben bekövetkező változás és a kontraktilis fehérjék karbonilációja közötti kapcsolatot feltárjuk. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy a kontraktilis proteinek karbonilációja a szívizomsejtek vizualizálható strukturális károsodása nélkül jelentősen befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis rendszerének működését, illetve annak szabályozását.

Különböző poszttranszlációs oxidatív fehérjemódosulások (pl. SH csoport oxidáció, fehérje nitroziláció, fehérje karboniláció, stb.) szerepéről számoltak már be korábban, melyek oxidatív stresszállapotok kapcsán kontraktilis diszfunkcióhoz vezethetnek [22]. A mechanizmust, ahogy az oxidatív hatások funkcionális károsodáshoz vezetnek, néhány esetben sikerült feltárni. Fontos megjegyezni, hogy a kontraktilis rendszer felépítésében résztvevő fehérjék mellett a  $Ca^{2+}$ -homeosztázis szereplőinek oxidatív károsodása szintén kontraktilis diszfunkcióhoz vezethet [51], azonban jelen tanulmányban a kísérleti elrendezésnek, a permeabilizált szívizomsejteknek köszönhetően lehetővé vált, hogy kizárólag a kontraktilis rendszerre koncentráljunk. Más munkacsoportok a kontraktilis rendszer érintettségével kapcsolatban szuperoxid anionok hatására az izometriás aktív erő koncentráció-függő csökkenését tapasztalták patkány jobb kamrai trabekulákon, míg ez az expozíció nem okozott változást a  $Ca^{2+}$ -érzékenységben [52]. Ehhez hasonlóan a peroxinitrit indukálta fehérje nitráció is kontraktilis diszfunkciót eredményezett mind

izolált patkány, mind humán szívizomsejteken [53, 54]. Laboratóriumunkban korábban igazolták, hogy az aktin és az MLC-1 fehérjék nagymértékű SH oxidációja komplex összefüggést mutat a kontraktilis rendszer működésével, csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált aktív erőt, a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet, valamint emeli a  $\text{Ca}^{2+}$ -független passzív erőt [55]. Mindezek mellett azonban gyakorlatilag nem rendelkezünk hasonló információról a humán szívizomsejtek karbonilációja és kontraktilis funkciója közötti összefüggésekről, habár ezen oxidatív módosulás szerepéről számoltak be már több kórképpel kapcsolatban [33]. Szerotonin-indukált jobb kamrai fehérje karboniláció szerepét mutatták ki a jobb szívfél elégtelenség patkány modelljében, mint fontos patofiziológiai faktort [56]. Ezen felül a miofibrilláris aktin karbonilációjáról számoltak be experimentális iszkémia/reperfúzió kapcsán, illetve  $\text{H}_2\text{O}_2$  expozíciót követően [25]. Ugyanezen munkacsoport a vékony filamentum felépítésében résztvevő tropomiozin karbonilációját detektálta sertés és kutya szívizommintákban koronária mikroembolizációt követően, sőt az oxidáció mértéke és a megfigyelt kontraktilis diszfunkció között korrelációt figyeltek meg [14]. Egy posztinfarktuszos egér modellben pedig további kontraktilis fehérjék, a MyBPC és a MHC karbonilációjára derült fény [57]. Továbbá miokardális infarktuson vagy koronária bypass műtéten átesett betegek szérumából is fokozottan karbonilált fehérjéket sikerült kimutatni [41, 42], ahogy szívelégtelen betegek biopsziás mintáiban a tropomiozin karbonilációját összefüggésbe hozták a kontraktilis funkció romlásával [46]. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a fehérje karboniláció egy jelentős oxidatív marker, mely patofiziológiai szerepet is játszik számos kóros folyamatban.

Ebben a kísérletsorozatban a kontraktilis fehérjék karbonilációját Fenton-reakció segítségével idéztük elő humán permeabilizált szívizomsejtekben. A reakció lejátszódására bizonyítékok állnak rendelkezésre humán szívelégtelen mintákban [58] és iszkémia/reperfúziós károsodás kapcsán [59]. A Fenton-reakció széles körben alkalmazott

*in vitro* körülmények között - mint modellrendszer - a hidroxil gyök termelés kiváltására vas(II) és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> felhasználásával [40, 60, 61]. Az általunk alkalmazott technika, az izolált permeabilizált szívizomsejteken végrehajtott kezelések lehetővé teszik a karboniláció kontraktilis rendszerre kifejtett hatásainak tanulmányozását, ugyanis a permeabilizált preparátumok esetén nem kell számolnunk a membrán komponensek, az intracelluláris organellek és a Ca<sup>2+</sup>-homeosztázis elemeinek változásaival és azok következményeivel [62].

Természetesen a hidroxil gyök nemcsak karbonilációt okozhat, ezen szabad gyökökkel kapcsolatban más típusú oxidatív módosulások szerepét sem zárhatjuk ki [40, 63]. Jelen tanulmányban az irodalmi adatok alapján is joggal felmerülő SH oxidációra fordítottunk figyelmet, és kizárólag a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot extrém magas koncentrációban tartalmazó Fenton-reagens alkalmazása esetén tapasztaltunk statisztikailag is szignifikáns mértékű SH oxidációt. Mérsékelt oxidatív hatások, azaz alacsonyabb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentráció esetén jelentős SH oxidáció nem következett be, illetve az SH-reagens DTT alkalmazása sem befolyásolta a Fenton indukálta mechanikai változásokat. Ezek az adatok alátámasztják azt a hipotézist, miszerint ezek a változások nem az SH oxidáció, hanem a karboniláció következményei. Ezt támogatja az a tény is, hogy a kontraktilis rendszer fehérjei fokozottan érzékenyek a karboniláció iránt. Az általunk alkalmazott emelkedő koncentrációk esetén fokozódó fehérje karbonilációt detektáltunk, ezzel párhuzamosan pedig a szívizomsejtek fokozatosan csökkenő izometriás erő generálására képesek. A kísérleteink során alkalmazott extrém koncentrációk és a következményesen termelődő szabad gyökök ilyen nagy mennyiségben kevésbé valószínű, hogy fiziológiai körülmények között előfordulnak a szervezetben [64]. Habár, *in vivo* lokálisan, bizonyos kompartmentekben nagy eséllyel termelődhetnek olyan mennyiségben hidroxil gyökök,

melyek karbonilációt indukálnak. Ez a szabad gyök ugyanis igen reaktív és azonnal reakcióba lép az első sejtkomponenssel, mellyel találkozik [64].

Ebben az *in vitro* kísérletsorozatban a hidroxil gyökök a szívizomsejtek közvetlen közelében termelődtek és módosították számos miofilamentáris fehérje szerkezetét, valamint a proteinek, végső soron a szívizomsejtek működését. Arra a kérdésre azonban nem kaptunk választ, hogy egyetlen fehérje vagy több miofilamentáris protein karbonilációja felelős a megfigyelt mechanikai változásokért. Az oxidatív fehérjemódosulások többnyire funkcióvesztés vagy funkciónyerés, illetve célzott fehérje degradáción, valamint a károsodott fehérjék akkumulációján keresztül vezethetnek a sejtfunkciók hanyatlásához [65]. Ezek a változások a szívizomsejtek kontraktilis fehérjerendszerét érintve vezetnek szisztolés és diasztolés diszfunkcióhoz oxidatív stresszállapotokban. Kísérleteink során a fehérje karboniláció csökkentette az izometriás aktív erőt és a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét. Ezen változások következtében csökken a miokardiális kontrakciók ereje és mindez szisztolés diszfunkcióhoz vezethet. Ezen felül a miofilamentumok karbonilációja növelte a  $\text{Ca}^{2+}$ -független passzív erőt, mely egy lehetséges molekuláris magyarázatként szolgálhat a szívizomsejtek diasztolés szívelégtelenség kapcsán megfigyelt fokozott rigiditásáért [66].

A  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenéséről, illetve kontraktilis diszfunkcióról számos olyan klinikai állapot kapcsán beszámoltak, melyek oxidatív stresszel járnak együtt. Így a miokardiális stunning során megfigyelhető alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység háttérében is oxidatív hatásokat feltételeznek [67, 68], habár a pontos mechanizmus, a pontos target sejtkomponens még nem ismert. Továbbá, egy posztinfarktusos egérmodellben kimutatták, hogy a hidroxil gyökfogó dimetiltiourea alkalmazásával kivédhető a bal kamra infarktus utáni kóros átépülése és a következményes bal kamra diszfunkció [69]. Jelen eredményeink azt sugallják, hogy a miofilamentumok karbonilációja egy lehetséges

összekötő kapocs lehet az oxidatív stressz és a csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység okozta kontraktilis diszfunkció között a fenti kórállapotokban.

## **5.2. A karboniláció jelentősége a kontraktilis rendszer posztinfarktusos remodellációjában**

Munkám második része a posztinfarktusos bal kamrai szívizom-átépülést tanulmányozta egy egérmodellen 10 héttel a bal elülső leszálló koronária artéria lekötésével okozott szívinfarktus után. A globális bal kamra diszfunkció hátterében vizsgáltuk az egyes bal kamrai szegmentumokból származó szívizomsejtek kontraktilis funkcióját, és ezáltal a régió-specifikus szívizom-átépülés tanulmányozása volt a célunk. Az infarktusos elülső, valamint az infarktus által közvetlenül nem érintett távoli, inferior bal kamrai területekről származó kardiomiocitákat elkülönítve vizsgáltuk. Az infarktusos területen a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének csökkenését és ezzel párhuzamosan kifejezett oxidatív hatásokra utaló kontraktilis fehérje módosulásokat (karboniláció, SH oxidáció) figyeltünk meg. Emellett kontroll egerekből származó szívizomsejteken a humán mintákhoz hasonlóan szelektív fehérje karbonilációval a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenését sikerült elérni, mely függetlennek bizonyult a miofilamentumok foszforilációs státuszától. Tovább vizsgálva a karboniláció és a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenése közötti kapcsolatot, egy látszólagosan lineáris összefüggést sikerült kimutatnunk a fehérje karboniláció és a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés mértéke között. Így ezen adataink is alátámasztják, hogy a miofilamentáris fehérje karboniláció képes a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének csökkentésére. Ez a változás a szívinfarktust követően a heges területen túlélő szívizomsejtekben kimutatható és hozzájárulhat a posztinfarktusos regionális bal kamra diszfunkcióhoz.

A posztinfarktusos szívizom-átépülés és a következményes bal kamra diszfunkció egy igen intenzíven kutatott terület a kardiovaszkuláris fiziológiában. Több tanulmány is

alátámasztotta, hogy a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének változása fontos szerepet játszik a szisztolés diszfunkció és a posztinfarktusos szívelégtelenség kialakulásában. A szakirodalomban különböző eredményeket találhatunk a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység változásának irányáról és mértékéről az infarktust követő szívizom-átépülés folyamatával kapcsolatban, jelenleg még nem született egységes álláspont a fenti kérdésben [10, 12, 18, 57, 70-74]. Ez az ellentmondásosság valószínűleg annak köszönhető, hogy az egyes kutatócsoportok különböző állatmodelleket vagy humán mintákat használnak, és a szívizom-átépülés folyamatának különböző időpontjaiban tanulmányozzák a jobb, illetve a bal kamra eltérő területeit. Ezek a tényezők mind magyarázhatják az eltérő eredményeket, másrészt viszont mozaikként felépítve segíthetnek megérteni a bal kamrai remodelláció folyamatát. A fenti tanulmányok elsősorban az infarktus által közvetlenül nem érintett bal, illetve jobb kamrai területekre koncentráltak, míg mi a jelen kutatásunk során mind az infarktusos, mind a távolabbi bal kamrai területeket vizsgáltuk.

10 héttel az infarktus után nem találtunk különbséget az egészséges kontroll és az infarktus által közvetlenül nem érintett területekről származó szívizomsejtek mechanikai paramétereiben. Ezzel szemben az infarktusos területen sikerült túlélő szívizomsejt csoportokat azonosítanunk, melyek csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységgel jellemezhetők. A megváltozott  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység ellenére a Frank-Starling mechanizmus molekuláris alapját képező hosszfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyítés, azaz a szarkomerhossz növelésére (1,9  $\mu\text{m}$ -ről 2,3  $\mu\text{m}$ -re) bekövetkező  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység fokozódás összehasonlítható mértékű volt ( $\Delta p\text{Ca}_{50} \sim 0,1$ ) minden általunk vizsgált csoportban, így megtartott volt az átépülésen keresztüleső bal kamra egészében. Ezeket a változásokat 10 héttel az infarktus után sikerült kimutatnunk, de nem zárhatjuk ki a mechanikai paraméterek további vagy más irányú változásainak lehetőségét a remodelláció korábbi vagy későbbi időpontjaiban.

A kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét a kontraktilis fehérjék, döntően a TnI és a MyBPC foszforilációs állapota határozza meg fiziológias körülmények között [72, 75]. Számos korábbi tanulmány, mely a posztinfarktusos bal kamrai szívműködés  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége és a TnI foszforilációja közötti összefüggéseket kutatta, kimutatta, hogy a csökkent PKA-dependens és a fokozott PKC-függő TnI foszforiláció következtében jön létre a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének növekedése [13], illetve csökkenése a szívinfarktust követően [12]. Ezt megvizsgálva a saját modellünkben az infarktusos területen a TnI csökkent PKA-függő foszforilációját tapasztaltuk, melyet a foszforiláció mértékének kimutatása mellett *in vitro* PKA kezeléssel is alátámasztottunk. Ez utóbbi ugyanis a  $\text{Ca}^{2+}$ -erő összefüggés további jobbra tolódását, a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység további csökkenését eredményezte az infarktusos területéről származó mintákban, azonban nem okozott változást az egészséges kontroll szívműködésben. Ezen eredményeink összhangban állnak más munkacsoportok eredményeivel, miszerint a PKA-függő TnI foszforiláció egyik fontos meghatározója a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységének [16, 76], bár ebben a tanulmányban azt láttuk, hogy sem a PKA-, sem a PKC-függő TnI foszforiláció közvetlenül nem felelős az infarktusos területéről származó szívműködésben megfigyelt alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységért, ami felveti más molekuláris mechanizmus szerepét.

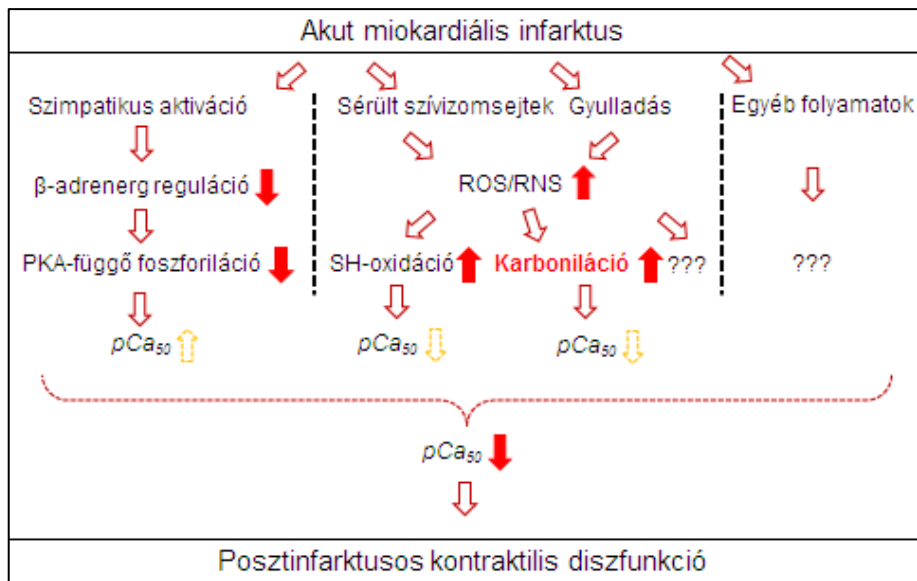
Mivel az oxidatív stressz egy ismert patofiziológiai faktor a posztinfarktusos miokardium remodellációban, az oxidatív fehérje módosulások szerepe joggal feltételezhető ezen folyamat során [5, 77]. A miofilamentáris fehérjéket több típusú oxidatív módosulás érintheti az infarktus kapcsán, többek között SH oxidáció [78], a lizin, arginin és prolin reziduumok karbonilációja [45] vagy a peroxinitrit mediálta nitráció [79]. Ezek közül az antioxidánsokkal revertálható SH oxidáció [55] és a humán mintákon kapott eredményeink alapján a karboniláció szerepe vetődött fel a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység

csökkenésében. Ezen adatok alapján megvizsgáltuk az SH oxidáció mértékét, mely fokozódott az infarktusos területről izolált szívműködő sejtekben. Korábbi eredményekkel összhangban ez a változás visszafordítható volt SH-reagens DTT *in vitro* alkalmazásával, azonban az SH oxidáció mértékének csökkentése nem járt együtt az alacsonyabb  $Ca^{2+}$ -érzékenység kontroll szintre történő emelkedésével. Ezen jelenség egy lehetséges magyarázatául szolgálhatnak korábbi adatok, melyek szerint az SH csoportok döntő részének oxidálódnia kell a funkcionális változások kialakulásához [55]. Feltételezzük, hogy az SH oxidáció mértéke nem éri el azt a szintet ebben a modellben, amely funkcionális változásokhoz vezetne. Így tehát az infarktusos területre jellemző alacsonyabb  $Ca^{2+}$ -érzékenység meghatározásában nem játszik központi szerepet az infarktusos területről származó mintákban detektálható kismértékű SH oxidáció.

A fehérje karboniláció, mint a súlyos oxidatív stressz markere számos tanulmányban felmerült a posztinfarktusos remodeláció résztvevőjeként [14, 25, 46]. Jelen tanulmányban az aktin és a MHC fokozott karbonilációját mutattuk ki az infarktusos szívműködő sejtekben, míg az infarktus által nem érintett területen a kontrollnak megfelelő karbonilációt detektáltunk 10 héttel a koronária ligációt követően. Mindezek felvetették a karboniláció esetleges patofiziológiai szerepét az infarktusos területen túlélő szívműködő sejtek átépülésében. Ezért *in vitro* kísérleteket végeztünk kontroll egér szívműködő sejteken is, melyek során hidroxil gyökök képződését indukálva sikerült az aktin és a MHC karbonilációját kiváltani. Az *in vitro* karboniláció a humán szívműködő sejteken tapasztaltakhoz hasonlóan csökkentette az izometriás aktív erőt, habár ez a változás nem mutatkozott meg az *in vivo* infarktusos egérmodellben, ahol a csökkent  $Ca^{2+}$ -érzékenységgel jellemezhető szívműködő sejtek izometriás ereje megtartott volt. Az irodalmi adatok a  $Ca^{2+}$ -érzékenységhez hasonlóan az aktív erő posztinfarktusos változását illetően sem egyértelműek [8, 10, 12]. Jelen esetben feltételezzük, hogy az ellentmondás egyik

lehetséges magyarázata az *in vitro* és *in vivo* körülmények között létrejövő eltérő mértékű miofibrilláris fehérje karbonilációban keresendő.

Eredményeink az irodalmi adatokkal összhangban azt tükrözik, hogy az eltérő típusú poszttranszlációs fehérje módosulások, mint a fehérje foszforiláció és a karboniláció jelentősen befolyásolják a kontraktilis rendszer működését, főként a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet. Továbbá számos adat áll rendelkezésre, miszerint a kontraktilis rendszer működésének szabályozásában résztvevő enzimek aktivitását a szabad gyökök okozta oxidatív változások is befolyásolják [31]. A továbbiakban ezért a karboniláció és a foszforilációs módosulás közötti összefüggések vizsgálatára tettünk kísérletet PKA és különböző foszfatázok alkalmazásával, s azt tapasztaltuk, hogy a fehérjék foszforilációs állapota nem befolyásolja a karboniláció hatására bekövetkező  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés mértékét. Kísérleteink során a PP1c csökkentette, míg a PP2Ac emelte a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet, irodalmi adatokkal összhangban [49, 50], melyek alapján mindez az MLC-2, illetve TnI defoszforilációján keresztül valósul meg. A foszforilációs státusz fenti változásai után szekvenciálisan provokált karboniláció hasonló mértékben csökkentette a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét, ami arra enged következtetni, hogy a fehérje karboniláció mechanikai hatásai függetlenek a fehérjék aktuális foszforilációs állapotától. Ezt az elképzelést tovább támogatták a rekombináns Tn komplexeken végrehajtott kísérleteink, ahol szintén hasonló karbonilációs hatásokat detektáltunk a Tn alegységekben, függetlenül a TnI PKA-függő foszforilációs státuszától. Következő lépésben a karboniláció és a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés mértéke között mutattunk ki pozitív korrelációt, az *in vitro* és az *in vivo* adatokat is felhasználva.



**16.ábra Összefoglalás: a posztinfarktusos szívműködés átépülés molekuláris résztvevői az infarktusos egérmódelben.** A szívinfarktust követő hosszas neurohumorális aktiváció és oxidatív folyamatok, kiemelten a fehérje karboniláció 10 héttel az infarktust követően a kontraktilis rendszer  $Ca^{2+}$ -érzékenységének csökkenéséhez vezetnek, mely hozzájárul a kontraktilis diszfunkció kialakulásához.

Összefoglalva tehát adataink arra utalnak, hogy az experimentális szívinfarktus kapcsán létrejövő fehérje karboniláció a kontraktilis rendszer  $Ca^{2+}$ -érzékenységének csökkenéséhez vezet az infarktusos területéről származó szívműködésben, sőt ez az irreverzibilis fehérje módosulás egyéb mechanizmusok, mint például a PKA-függő TnI foszforiláció ellenkező irányú hatásait is képes felülmúlni. Az infarktusos területen túlélő szívműködésben a miofibrillumok karbonilációja a posztinfarktusos kontraktilis diszfunkció egyik meghatározó tényezője lehet, de természetesen más mechanizmusok is szerepet kaphatnak ebben a folyamatban (16. ábra). Megtartott  $Ca^{2+}$ -homeosztázis mellett a  $Ca^{2+}$ -érzékenység csökkenése következtében az infarktusos területen túlélő miokardium hipokontraktilissá válhat, hozzájárulva ezzel a globális bal kamra diszfunkcióhoz.

## 6. Összefoglalás

A miokardiális infarktus és az infarktust követő szívizom-átépülés következtében kialakuló szívelégtelenség komoly népegészségügyi problémát jelent napjainkban. A folyamat háttérben álló molekuláris mechanizmusok feltérképezése hozzájárulhat a patofiziológia jobb megértéséhez, ezáltal esetlegesen új terápiás célpontok találásához. Az akut esemény és posztinfarktusos remodeláció egyaránt oxidatív stresszállapot, melyek során oxidatív poszttranszlációs fehérje módosulásokkal kell számolnunk.

Kísérleteink során humán szívizommintákat felhasználva tanulmányoztuk a miofilamentáris fehérje karboniláció kontraktilis rendszerre kifejtett hatásait, valamint a fehérje karboniláció posztinfarktusos szívizom-átépülésben betöltött szerepét vizsgáltuk egy infarktusos egérmodellben.

Vizsgálataink során az alábbi új megállapításokat tettük: 1) Az izolált szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek karbonilációja *in vitro* körülmények között a Fenton-reakció segítségével indukálható. 2) A miofilamentumok karbonilációja közvetlen hatással van a kontraktilis rendszer működésére, befolyásolva az izometriás aktív erőt, a szívizomsejtek passzív feszülését, illetve a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét. 3) Szívinfarktust követően csökken a kontraktilis rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége az infarktus által közvetlenül érintett bal kamrai területeken. 4) A posztinfarktusos  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység csökkenés háttérben a fehérje karboniláció meghatározó jelentőségű.

Eredményeink alapján a miofilamentáris fehérjék karbonilációja közvetlenül befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis rendszerének működését, jelentős szerepet játszik az infarktust követő bal kamrai szívizom-átépülés folyamatában, hozzájárulva ezzel a posztinfarktusos bal kamra diszfunkció kialakulásához.

## Summary

The epidemiological burden of myocardial infarction and the postinfarction remodeling-related heart failure is growing nowadays. Exploration of the underlying molecular mechanisms may contribute to the better understanding of the pathophysiology and thereby to the innovation of new therapeutical targets. Oxidative stress is one component of the acute event and the postinfarction remodeling resulting in oxidative posttranslational protein modifications.

During our experiments the direct effects of myofilament protein carbonylation on the contractile system were investigated in human myocardial tissue samples. On the other hand the role of protein carbonylation in the postinfarction remodeling was studied in a murine model of myocardial infarction.

During our investigations we made the following key observations: 1) Carbonylation of the contractile proteins in the isolated human cardiomyocytes could be induced by the *in vitro* Fenton-reaction. 2) Myofilament carbonylation affects directly the function of the contractile system, modifying the isometric active force, the passive stiffness of the cardiomyocytes and the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of force production. 3) Decreased  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of force production was detected in the infarcted area of the left ventricle. 4) Protein carbonylation is a key factor in the determination of the decreased  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of force production.

Our data indicate that myofilament protein carbonylation has direct effects on the function of the cardiomyocyte contractile system, it plays a central role in the left ventricular postinfarction remodeling and thereby contributes to the development of the postinfarction left ventricular dysfunction.

## 7. Rövidítésjegyzék

- ADP – adenzin-difoszfát  
ANOVA – variancia-analízis  
ATP – adenzin-trifoszfát  
BCA – bicinkoninsav  
BSA – borjú szérum albumin  
 $[Ca^{2+}]_{ic}$  – intracelluláris kalcium-koncentráció  
DNPH – dinitrofenilhidrazin  
DTDP – 2,2'-ditio-dipiridin  
DTT – ditiotreitól  
 $\Delta pCa_{50}$  – a kalcium-érzékenység változás mértéke  
ECL – megnövelt kemilumineszcencia  
EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav  
EF – ejekciós frakció  
EGTA – etilén-glikol-tetraecetsav  
EKG – elektrokardiogram  
 $F_{aktív}$  – maximális  $Ca^{2+}$ -aktiválta aktív izometriás erő  
 $F_{passzív}$  –  $Ca^{2+}$ -mentes környezetben mért passzív erő  
 $F_{totál}$  – totál erő ( $F_{aktív} + F_{passzív}$ )  
GPx – glutation-peroxidáz  
 $H_2O_2$  – hidrogén-peroxid  
i.p. – intraperitoneális  
 $k_{tr,max}$  – erő regenerálódás sebességi állandója  
LAD – bal elülső leszálló koronária artéria  
MHC – miozin nehéz lánc  
MI – miokardiális infarktus  
MLC-1 – esszenciális miozin könnyű lánc-1  
MLC-2 – regulatorikus miozin könnyű lánc-2  
MyBPC – miozinkötő C-fehérje  
MW – molekulatömeg  
NADPH – nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát  
 $n_{Hill}$  – a  $Ca^{2+}$ -erő összefüggés meredeksége  
NO – nitrogén-monoxid

OH• – hidroxil gyök  
ONOO<sup>-</sup> – peroxinitrit  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – szuperoxid gyök  
PBST – 0,1% Tween-20-tartalmú foszfát puffer  
pCa –  $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$   
*pCa*<sub>50</sub> – a kontraktilis rendszer kalcium-érzékenysége  
P<sub>i</sub> – inorganikus foszfát  
PKA – protein kináz A  
PKC – protein kináz C  
PMSF – fenil-metil-szulfonil-fluorid  
PP1c - protein-foszfátáz-1 katalitikus alegysége  
PP2Ac - protein-foszfátáz-2A katalitikus alegysége  
RAAS – renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer  
RIPA – radioimmun esszé  
ROS/RNS – reaktív oxigén/nitrogén szabad gyökök  
SDS – nátrium-dodecilszulfát  
SH – szulfhidril  
SL – szarkomerhossz  
S22/23 – 22/23. helyen található szerin aminosav a troponin I molekulában  
T143 – 143. helyen lévő treonin aminosav a troponin I molekulában  
Tn – troponin  
TnC – troponin C  
TnI – troponin I  
TnI-P – a troponin I foszforilált formája  
TnT – troponin T

## 8. Irodalomjegyzék

### 8.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van 't Hof A, Widimsky P, Zahger D (2012) ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 33 (20):2569-2619.
2. Janosi A, Ofner P, Branyickine Geczy G, Polgar P (2013) [Incidence of myocardial infarction in Hungary. Population study in five districts of Budapest and Szabolcs-Szatmar-Bereg county]. *Orv Hetil* 154 (28):1106-1110.
3. Yousef ZR, Redwood SR, Marber MS (2000) Postinfarction left ventricular remodelling: where are the theories and trials leading us? *Heart* 83 (1):76-80.
4. Sutton MG, Sharpe N (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101 (25):2981-2988.
5. Sun Y (2009) Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res* 81 (3):482-490.
6. Frangogiannis NG (2012) Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 110 (1):159-173.
7. Maczewski M, Mackiewicz U (2008) Effect of metoprolol and ivabradine on left ventricular remodelling and Ca<sup>2+</sup> handling in the post-infarction rat heart. *Cardiovasc Res* 79 (1):42-51.
8. Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Dos Remedios C, Duncker DJ, Borbely A, Papp Z, Paulus W,

Stienen GJ, Marston SB, van der Velden J (2008) Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil* 29 (6-8):189-201.

9. Opie LH (2004) Heart physiology from cell to circulation. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia.

10. Cazorla O, Szilagyi S, Le Guennec JY, Vassort G, Lacampagne A (2005) Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J* 19 (1):88-90.

11. Daniels MC, Naya T, Rundell VL, de Tombe PP (2007) Development of contractile dysfunction in rat heart failure: hierarchy of cellular events. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293 (1):R284-292.

12. Belin RJ, Sumandea MP, Kobayashi T, Walker LA, Rundell VL, Urboniene D, Yuzhakova M, Ruch SH, Geenen DL, Solaro RJ, de Tombe PP (2006) Left ventricular myofilament dysfunction in rat experimental hypertrophy and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (5):H2344-2353.

13. van der Velden J, Merkus D, Klarenbeek BR, James AT, Boontje NM, Dekkers DH, Stienen GJ, Lamers JM, Duncker DJ (2004) Alterations in myofilament function contribute to left ventricular dysfunction in pigs early after myocardial infarction. *Circ Res* 95 (11):e85-95.

14. Canton M, Skyschally A, Menabo R, Boengler K, Gres P, Schulz R, Haude M, Erbel R, Di Lisa F, Heusch G (2006) Oxidative modification of tropomyosin and myocardial dysfunction following coronary microembolization. *Eur Heart J* 27 (7):875-881.

15. Avner BS, Shioura KM, Scruggs SB, Grachoff M, Geenen DL, Helseth DL, Jr., Farjah M, Goldspink PH, Solaro RJ (2012) Myocardial infarction in mice alters sarcomeric function via post-translational protein modification. *Mol Cell Biochem* 363 (1-2):203-215.

16. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ (2003) Increased Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of the contractile

apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 57 (1):37-47.

17. Layland J, Solaro RJ, Shah AM (2005) Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* 66 (1):12-21.

18. Duncker DJ, Boontje NM, Merkus D, Versteilen A, Krysiak J, Mearini G, El-Armouche A, de Beer VJ, Lamers JM, Carrier L, Walker LA, Linke WA, Stienen GJ, van der Velden J (2009) Prevention of myofilament dysfunction by beta-blocker therapy in postinfarct remodeling. *Circ Heart Fail* 2 (3):233-242.

19. Czuriga D, Toth A, Pasztor ET, Balogh A, Bodnar A, Nizsaloczki E, Lionetti V, Recchia FA, Czuriga I, Edes I, Papp Z (2012) Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure. *Basic Res Cardiol* 107 (2):244.

20. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP (2007) Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res* 101 (2):195-204.

21. Heusch G, Schulz R A radical view on the contractile machinery in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 57 (3):310-312.

22. van der Velden J (2006) Functional significance of myofilament protein oxidation. *Eur Heart J* 27 (7):764-765.

23. Skyschally A, Gres P, van Caster P, van de Sand A, Boengler K, Schulz R, Heusch G (2008) Reduced calcium responsiveness characterizes contractile dysfunction following coronary microembolization. *Basic Res Cardiol* 103 (6):552-559.

24. Hori M, Nishida K (2009) Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 81 (3):457-464.

25. 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 (3):H870-877.
26. Pfeffer MA, Braunwald E (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81 (4):1161-1172.
27. Mughal W, Kirshenbaum LA (2011) Cell death signalling mechanisms in heart failure. *Exp Clin Cardiol* 16 (4):102-108.
28. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2011) Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301 (6):H2181-2190.
29. Madamanchi NR, Runge MS (2013) Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med* 61C:473-501.
30. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39 (1):44-84.
31. Steinberg SF (2013) Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circ Res* 112 (2):393-405.
32. Sumandea MP, Steinberg SF (2011) Redox signaling and cardiac sarcomeres. *J Biol Chem* 286 (12):9921-9927.
33. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9 (4):169-176.
34. Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA (2010) Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal* 12 (3):323-325.
35. Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ (2010) Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal* 12 (3):393-404.

36. Wong CM, Bansal G, Marcocci L, Suzuki YJ (2012) Proposed role of primary protein carbonylation in cell signaling. *Redox Rep* 17 (2):90-94.
37. Curtis JM, Hahn WS, Long EK, Burrill JS, Arriaga EA, Bernlohr DA (2012) Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol Metab* 23 (8):399-406.
38. Karwatowska-Prokopczuk E, Czarnowska E, Beresewicz A (1992) Iron availability and free radical induced injury in the isolated ischaemic/reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* 26 (1):58-66.
39. Obata T, Yamanaka Y (1996) Effect of iron (II) on the generation of hydroxyl free radicals in rat myocardium. *Biochem Pharmacol* 51 (10):1411-1413.
40. Voss P, Engels M, Strosova M, Grune T, Horakova L (2008) Protective effect of antioxidants against sarcoplasmic reticulum (SR) oxidation by Fenton reaction, however without prevention of Ca-pump activity. *Toxicol In Vitro* 22 (7):1726-1733.
41. Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, Gasparetto D, da Rosa CS, Spanevello RM, Ahmed M, Schmatz R, Schetinger MR, Morsch VM (2011) Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels* 26 (1):55-63.
42. Gonenc A, Hacisevki A, Griffiths HR, Torun M, Bakkaloglu B, Simsek B (2011) Free radical reaction products and antioxidant capacity in beating heart coronary artery surgery compared to conventional bypass. *Biochemistry (Mosc)* 76 (6):677-685.
43. Loganathan S, Radovits T, Hirschberg K, Korkmaz S, Koch A, Karck M, Szabo G (2010) Effects of Custodiol-N, a novel organ preservation solution, on ischemia/reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 139 (4):1048-1056.
44. Shao CH, Rozanski GJ, Nagai R, Stockdale FE, Patel KP, Wang M, Singh J, Mayhan WG, Bidasee KR (2010) Carbonylation of myosin heavy chains in rat heart during diabetes. *Biochem Pharmacol* 80 (2):205-217.

45. Powell SR, Gurzenda EM, Wahezi SE (2001) Actin is oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic Biol Med* 30 (10):1171-1176.
46. Canton M, Menazza S, Sheeran FL, Polverino de Laureto P, Di Lisa F, Pepe S (2011) Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 57 (3):300-309.
47. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44 (4):503-512.
48. Kiss A, Becsi B, Kolozsvari B, Komaromi I, Kover KE, Erdodi F (2013) Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibit protein phosphatase-1. *FEBS J* 280 (2):612-626.
49. van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PM, Hasenfuss G, Stienen GJ (2003) The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca<sup>2+</sup> -sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 57 (2):505-514.
50. Wijnker PJ, Boknik P, Gergs U, Muller FU, Neumann J, dos Remedios C, Schmitz W, Sindermann JR, Stienen GJ, van der Velden J, Kirchhefer U (2011) Protein phosphatase 2A affects myofilament contractility in non-failing but not in failing human myocardium. *J Muscle Res Cell Motil* 32 (3):221-233.
51. Saini HK, Dhalla NS (2005) Defective calcium handling in cardiomyocytes isolated from hearts subjected to ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 (5):H2260-2270.
52. MacFarlane NG, Miller DJ (1992) Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ Res* 70 (6):1217-1224.

53. Digerness SB, Harris KD, Kirklin JW, Urthaler F, Viera L, Beckman JS, Darley-USmar V (1999) Peroxynitrite irreversibly decreases diastolic and systolic function in cardiac muscle. *Free Radic Biol Med* 27 (11-12):1386-1392.
54. Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, Paulus WJ, van der Velden J, Stienen GJ, Papp Z (2005) Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res* 67 (2):225-233.
55. Hertelendi Z, Toth A, Borbely A, Galajda Z, van der Velden J, Stienen GJ, Edes I, Papp Z (2008) Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca<sup>2+</sup> sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal* 10 (7):1175-1184.
56. Liu L, Marcocci L, Wong CM, Park AM, Suzuki YJ (2008) Serotonin-mediated protein carbonylation in the right heart. *Free Radic Biol Med* 45 (6):847-854.
57. Rao VS, La Bonte LR, Xu Y, Yang Z, French BA, Guilford WH (2007) Alterations to myofibrillar protein function in nonischemic regions of the heart early after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (1):H654-659.
58. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, Takeshita A (2000) Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 86 (2):152-157.
59. Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB (1997) Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 29 (9):2571-2583.
60. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Utsumi H, Nakamura R, Egashira K, Takeshita A (2001) Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury. *Cardiovasc Res* 49 (1):103-109.

61. Babusikova E, Kaplan P, Lehotsky J, Jesenak M, Dobrota D (2004) Oxidative modification of rat cardiac mitochondrial membranes and myofibrils by hydroxyl radicals. *Gen Physiol Biophys* 23 (3):327-335.
62. Gao WD, Liu Y, Marban E (1996) Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation* 94 (10):2597-2604.
63. Robert V, Ayoub S, Berson G (1991) Effects of hydroxyl radicals on ATPase and protein structure of myofibrils from rat heart. *Am J Physiol* 261 (6 Pt 2):H1785-1790.
64. Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219 (1):1-14.
65. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA (2008) Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem* 283 (32):21837-21841.
66. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ (2005) Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111 (6):774-781.
67. Bolli R, Marban E (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 79 (2):609-634.
68. O'Brien JD, Ferguson JH, Howlett SE (2008) Effects of ischemia and reperfusion on isolated ventricular myocytes from young adult and aged Fischer 344 rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294 (5):H2174-2183.
69. Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, Utsumi H, Takeshita A (2000) Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 87 (5):392-398.

70. De Tombe PP, Wannenburg T, Fan D, Little WC (1996) Right ventricular contractile protein function in rats with left ventricular myocardial infarction. *Am J Physiol* 271 (1 Pt 2):H73-79.
71. Daniels MC, Keller RS, de Tombe PP (2001) Losartan prevents contractile dysfunction in rat myocardium after left ventricular myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 (5):H2150-2158.
72. Verduyn SC, Zaremba R, van der Velden J, Stienen GJ (2007) Effects of contractile protein phosphorylation on force development in permeabilized rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 102 (6):476-487.
73. Marston SB, de Tombe PP (2008) Troponin phosphorylation and myofilament Ca<sup>2+</sup>-sensitivity in heart failure: increased or decreased? *J Mol Cell Cardiol* 45 (5):603-607.
74. Ait Mou Y, Toth A, Cassan C, Czuriga D, de Tombe PP, Papp Z, Lacampagne A, Cazorla O (2011) Beneficial effects of SR33805 in failing myocardium. *Cardiovasc Res* 91 (3):412-419.
75. Cazorla O, Szilagyi S, Vignier N, Salazar G, Kramer E, Vassort G, Carrier L, Lacampagne A (2006) Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc Res* 69 (2):370-380.
76. Dyer EC, Jacques AM, Hoskins AC, Ward DG, Gallon CE, Messer AE, Kaski JP, Burch M, Kentish JC, Marston SB (2009) Functional analysis of a unique troponin c mutation, GLY159ASP, that causes familial dilated cardiomyopathy, studied in explanted heart muscle. *Circ Heart Fail* 2 (5):456-464.
77. Sirker A, Zhang M, Murdoch C, Shah AM (2007) Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure. *Am J Nephrol* 27 (6):649-660.
78. Eaton P, Byers HL, Leeds N, Ward MA, Shattock MJ (2002) Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 277 (12):9806-9811.

79. Wang P, Zweier JL (1996) Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 271 (46):29223-29230.

## 8.2. Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/30/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

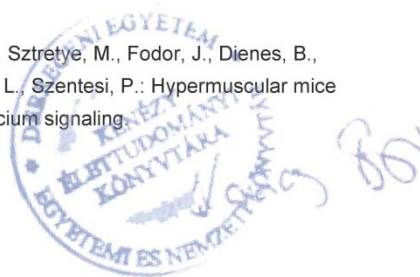
Jelölt: Balogh Ágnes  
Neptun kód: I8HS03  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10036795

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Balogh, Á.**, Tóth, A., Pásztorné Tóth, E., Nagy, L., Kovács, Á., Kalász, J., Contreras, G.A., Édes, I., Papp, Z.: Myofilament carbonylation modulates contractility in human cardiomyocytes. *Exp. Clin. Cardiol.* "accepted by publisher", 2014.  
IF:1.1 (2012)
2. **Balogh, Á.**, Santer, D., Pásztor, T.E., Tóth, A., Czuriga, D., Podesser, B.K., Trescher, K., Jaquet, K., Erdődi, F., Édes, I., Papp, Z.: Myofilament protein carbonylation contributes to the contractile dysfunction in the infarcted LV region of mouse hearts. *Cardiovasc. Res.* 101 (1), 108-119, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvt236>  
IF:5.94 (2012)

### További Közlemények

3. Bodnár, D., Geyer, N., Ruzsnavszky, O., Oláh, T., Hegyi, B., Sztretye, M., Fodor, J., Dienes, B., **Balogh, Á.**, Papp, Z., Szabó, L., Müller, G., Csernoch, L., Szentesi, P.: Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signaling. *J. Physiol.-London.* "accepted by publisher", 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261958>  
IF:4.38 (2012)



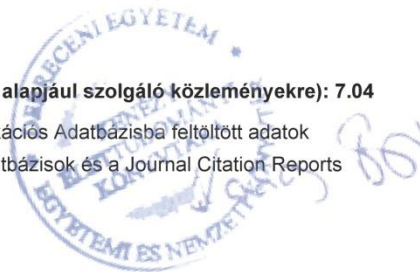
4. Vandewijngaert, S., Pokreisz, P., Hermans, H., Gillijns, H., Pellens, M., Bax, N.A.M., Coppiello, G., Oosterlinck, W., **Balogh, Á.**, Papp, Z., Bouten, C.V.C., Bartunek, J., D'hooge, J., Luttun, A., Verbeke, E., Herregods, M.C., Herijgers, P., Bloch, K.D., Janssens, S.: Increased Cardiac Myocyte PDE5 Levels in Human and Murine Pressure Overload Hypertrophy Contribute to Adverse LV Remodeling.  
*PLoS One.* 8 (3), e5884, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058841>  
IF:3.73 (2012)
5. Czuriga, D., Tóth, A., Pásztor, E.T., **Balogh, Á.**, Bodnár, A., Nizsalóczy, E., Lionetti, V., Recchia, F.A., Czuriga, I., Édes, I., Papp, Z.: Cell-to-cell variability in troponin I phosphorylation in a porcine model of pacing-induced heart failure.  
*Basic Res. Cardiol.* 107 (2), 13p., 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-012-0244-x>  
IF:5.904
6. Papp, Z., Czuriga, D., Balogh, L., **Balogh, Á.**, Borbély, A.: How cardiomyocytes make the heart old.  
*Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (13), 2515-2521, 2012.  
IF:2.69
7. Czuriga, D., Papp, Z., Czuriga, I., **Balogh, Á.**: Cardiac aging: A review.  
*Eur. Surg.* 43 (2), 69-77, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10353-011-0600-3>  
IF:0.283
8. Molnár, A., Borbély, A., Czuriga, D., Siket, M.Y., Szilágyi, S., Hertelendi, Z., Pásztorné T., E., **Balogh, Á.**, 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.* 284 (2), 1031-1039, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M807600200>  
IF:5.328

**A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora: 29.355**

**A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 7.04**

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

Debrecen, 2014.02.14



## **9. Tárgyszavak**

Ca<sup>2+</sup>-érzékenység

karboniláció

kontraktilis rendszer

posztinfarktusos remodeláció

miokardiális infarktus

szívizomsejt

## **Keywords**

Ca<sup>2+</sup>-sensitivity

carbonylation

contractile system

postinfarction remodeling

myocardial infarction

cardiomyocyte

## 10. Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Papp Zoltánnak az elmúlt évek során nyújtott szakmai és emberi támogatásáért, az útmutatásért, melyet a kísérletes munkában és a publikációk, valamint a disszertáció elkészítése során adott.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Édes Istvánnak, a Kardiológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy bekapcsolódjak az Intézetben zajló tudományos experimentális munkába.

Hálával tartozom a Klinikai Fiziológiai Tanszék minden jelenlegi és korábbi munkatársának, kiemelten Dr. Tóth Attilának, Pásztorné Tóth Enikőnek és Dr. Czuriga Dánielnek, akik munkájukkal és önzetlen segítségükkel hozzájárultak a terveim megvalósulásához. Köszönet illeti továbbá a Kardiológiai Intézet minden tagját, hogy a munkámat mindig segítették.

Köszönöm a bécsi kollaborációs laboratórium munkatársainak, Bruno Podessernek, David Santernek és Karola Treschernek a lehetőséget, hogy az intézetükben eltöltött hetek alatt betekintést nyerhettem az ott zajló munkába.

Végül, de nem utolsó sorban pedig szeretném megköszönni a családom, a Szüleim és a Férjem türelmét, támogatását, amelyekkel könnyebbé vált az akadályok leküzdése és céljaim elérése.



*„A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 sz. és a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.”*

## **11. Függelék**

A függelék az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomatait tartalmazza: