

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A MYOFIBRILLÁRIS FEHÉRJÉK SZULFHIDRIL OXIDÁCIÓJÁHOZ KÖTHETŐ KONTRAKTILIS HATÁSOK HUMÁN SZÍVIZOMSEJTEKEN

Dr. Hertelendi Zita

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



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

Debrecen

2008

1. Bevezetés

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

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

fehérjék SH oxidációjának és az aktin-miozin ciklus károsodott Ca^{2+} -regulációjának összefüggéseit humán szívizomban.

1.1. Szabadgyökök és a hatásukra kialakuló oxidatív és nitrozatív stressz

A sejtekben az intermedier anyagcsere során, illetve enzimatikus és nem enzimatikus úton tökéletlenül redukált oxigénszármazékok keletkeznek. Ezek rendkívül reaktívak és egy vagy több párosítatlan spinű elektront tartalmaznak, vagyis szabadgyökök. Az oxigént tartalmazó szabadgyököket reaktív oxigén szabadgyököknek (ROS-nek), míg a nitrogént tartalmazókat reaktív nitrogén szabadgyököknek (RNS-nek) nevezi a szakirodalom. Az emlős sejtekben az élettani folyamatok során ROS termelődése elsősorban a mitokondriumokban zajló oxidatív foszforilációhoz, és a normális celluláris aerob metabolizmushoz kötött. Szabadgyököket termelnek a mitokondriális elektron transzportlánc enzimei: a xantin-oxidáz, a NADPH-oxidáz, a nitrogén-monoxid-szintáz, a citokróm p450, továbbá cikooxygenáz izoenzimek, a lipoxigenázok, és a monooxygenázok. A ROS-k és származékaik károsíthatják a sejtek működését, ezért a sejtek a szabadgyökök szintjét szabályozó többszörös antioxidáns védelemmel rendelkeznek. Ilyen antioxidáns védelmet biztosít a sejtekben a szuperoxid-diszmutáz rendszer, a kataláz, a glutation-peroxidáz rendszer, a tioredoxin és a ROS-t termelő folyamatok nagyfokú kompartmentalizációja. Nem enzimatikus úton történő szabadgyök eliminációban az antioxidáns hatású anyagok játszanak jelentős szerepet. Kiemelkedő fontosságú ezek közül a C-vitamin, E-vitamin, A-vitamin, ubikinon, fehérjék szulfhidril csoportjai, valamint a glutation.

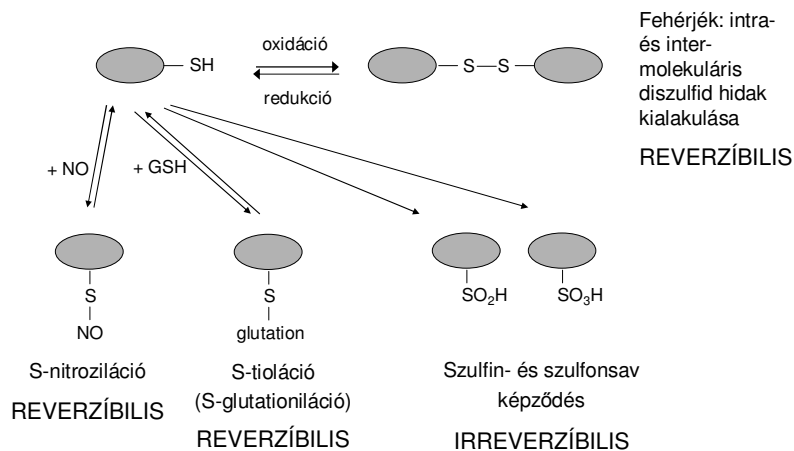
Az élő szervezetben folyamatosan termelődő ROS-et a sejtek védekező mechanizmusait képező antioxidáns molekulák, enzimek folyamatosan inaktíválják, eliminálják. Kóros körülmények között ezen antioxidáns rendszerek elégtelenül működhetnek, vagy a ROS fokozott mértékben termelődhetnek, mely meghaladhatja az antioxidáns rendszerek kapacitását. Ezáltal a különböző makromolekulák oxidációja jön létre, ami a sejtek funkcionális és morfológiai károsodásához vezet. Ezt a jelenséget oxidatív stressznek nevezzük. Oxidatív stressz során nukleinsavak, proteinek, szénhidrátok, lipid molekulák károsodnak. A fehérjék oxidációja aminosav oldalláncaik módosulását, keresztkötött protein aggregátumok kialakulását, valamint a polipeptid lánc hasítását eredményezi. Az aminosav oldallánccok módosulásai közül legfontosabbak a cisztein oldallánccok SH oxidációja, a lizin, arginin és prolin aminosavak karbonilációja és a tirozin

oldaláncok nitrálódása. A makromolekulák oxidatív stressz hatására kialakuló változásai mutagenezist, karcinogenezist, metabolikus folyamatok megváltozását, fehérje inaktivációt eredményezhetnek. Jelenleg az oxidatív stressznek számos betegség és kórfolyamat pathogenezisében ismert központi szerepe. Ilyenek a ischaemiás-reperfúziós károsodás, a szívelégtelenség, az atherosclerosis, daganatos megbetegedések, az Alzheimer-kór, az öregedés folyamata, az apoptózis és a szívizom hypertrophia kifejlődése.

1.2. Szulfhidril csoportok és jelentőségük

Az intracelluláris fehérjék cisztein oldalláncain jelen levő szulfhidril (tiol, SH) csoportoknak sokrétű szerepük van az eukarióta sejtekben. Proteinek SH csoportjai központi szerepet töltenek be katalitikus folyamatokban, elektron transzferben, fehérjék struktúrájának kialakításában és számos enzim aktív helyén található cisztein. Ugyanakkor sok SH csoportnak nincs metabolikus funkciója, viszont részt vesznek az antioxidáns védelemben és az intracelluláris redox állapot fenntartásában.

Fehérjék SH csoportjai kifejezetten érzékenyek bizonyultak mind oxigén, mind nitrogén tartalmú szabadgyökökkel szemben. Fehérjék SH csoportjai oxidatív hatásra többféleképpen alakulhatnak át. Proteinek (P) SH csoportjai egymással reagálva intra- és intermolekuláris diszulfid hidak (PSSP) kialakulását eredményezik. Ezen reakció nagyon fontos tulajdonsága, hogy reverzibilis, akárcsak a vegyes diszulfidok kialakulása, az S-tioláció. Ez utóbbi során kis molekulatömegű tiolok (cisztein, homocisztein, glutation stb.) kapcsolódnak a fehérjék SH csoportjaihoz. Jelentőségénél fogva kiemelhető ezek közül a glutation kapcsolódása, az S-glutationiláció (PSSG). Reverzibilis a NO és a fehérje SH csoportja közötti reakció következtében megvalósuló S-nitroziláció (PSNO) is. Továbbá lehetséges a SH csoportok irreverzibilis oxidációja is szulfinsavvá (PSO₂H) vagy szulfonsavvá (PSO₃H) (1. ábra).



1. ábra. Fehérjék szulfhidril csoportjainak lehetséges oxidatív módosulásai

Jelenlegi tudásunk szerint a cisztein oldalláncok oxidatív poszttranszlációs módosításának élettani és kóreltani szerepe egyaránt van. Mindeztidáig több enzim esetében mutatták ki kritikus cisztein oldalláncának oxidációján keresztül megvalósuló redox regulációját. Ezek között találunk transzkripcióban, transzlációban, degradációban, metabolikus folyamatokban részt vevő enzimeket egyaránt. Szulfhidril csoportoknak továbbá szerepet tulajdonítanak a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában is. Az oxidatív hatásokra igen érzékeny SH csoportok módosulása oxidatív stressz során valószínűleg az elsők között következik be. Ezáltal a sejtek oxidatív ágensekkel szembeni védelmében fontos szerepet töltenek be. Jelenleg kevés adatunk van arra vonatkozóan, hogy oxidatív stressz során a proteinek SH oxidációja specifikusan történik-e, és ezt a specificitást mi eredményezi.

A SH oxidációt több betegségek kialakulásával és kórfolyamattal hozták összefüggésbe. Myocardialis fehérjék ischaemiás-reperfúziós károsodás alatti SH oxidációjáról is beszámoltak. A szakirodalomban kutatva kevés adatot találtunk a myofibrilláris fehérjéket érő SH oxidáció és a kontraktilitás összefüggésének vizsgálatát illetően, és nem rendelkezünk ismeretekkel ennek humán vonatkozásaival kapcsolatban.

1.3. Peroxinitrit

A peroxinitrit (ONOO^-) egy erőlyes oxidálószer, mely szuperoxid-anionból és NO-ból irreverzibilis úton keletkezik. A peroxinitrit alkalikus közegben stabil anionként viselkedik,

azonban féléletideje jelentősen lerövidül semleges pH-n. A peroxinitrit a fehérjékkel elsősorban tirozin oldalláncokon reagál, nitrotirozin képződését eredményezve. A peroxinitrit kisebb affinitással, de proteinek SH csoportjaival is reakcióba léphet, oxidálva ezeket. A peroxinitrit által indukált nitrotirozin képződést kiterjedten vizsgálták és ennek eredményeképpen jelentőségéről egyre több adattal rendelkezünk. Ezzel szemben korlátozott ismereteink vannak a peroxinitrit SH csoportokon kifejtett hatásáról. Több tanulmányban leírták a peroxinitrit kontraktilis mechanikát károsító hatását, melyet összefüggésbe hoztak ischaemiás-reperfúziós károsodás, szívelégtelenség során kialakuló és proinflammatorikus citokinek által indukált myocardialis diszfunkcióval.

1.4. Ischaemiás-reperfúziós károsodás és szívelégtelenség

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

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

Számos egymástól független laboratóriumban *in vitro* és *in vivo* állatkísérletekben bizonyították, hogy a reperfúzió alatt jelentős oxigén-szabadgyök képződéssel kell számolni. A képződő szabadgyökök mennyiségét arányosnak találták az ischaemia súlyosságával. A pontos pathomechanizmus, illetve a szabadgyökök hozzájárulása a kontraktilis depresszió kialakulásához egyelőre még részleteiben nem tisztázott. Feltételezhető továbbá, hogy a ROS a kontraktilis fehérjék szelektív károsítása útján hozzájárulhatnak a myofilamentáris rendszer Ca^{2+} -érzékenységének csökkenéséhez. Ezen mechanizmusban egyes szulfhidril csoportok oxidációjának szerepét is gyanítják. Ezen túl több tanulmányban a peroxinitritet az

ischaemiás-reperfúziós károsodás során megfigyelt myocardialis dysfunkció kialakulásában jelentős tényezőnek tekintik.

A szívelégtelenség egy olyan komplex kórkép szerteágazó etiológiával, melyet romló szívízomfunkcióval és a szervezet számára elégtelen perctérfogattal jellemezhetünk. Kialakulásában a szívízom kóros átépülése, megváltozott hemodinamika, a neurohumorális rendszer aktivációja, citokinek fokozott termelődése és az endothel kóros működése mellett feltehetően az oxidatív és nitrozatív károsodásoknak is szerepe van. Ismeretlen azonban, hogy az oxidatív elváltozások, különös tekintettel az SH oxidációra, milyen mechanizmuson keresztül és milyen mértékben járulnak hozzá a szívelégtelenség kialakulásához, és hogyan károsítják a kontraktilis rendszer fehérjéit.

1.5. Antioxidánsok alkalmazásával kapott eredmények

Oxidatív stresszel kapcsolatos kutatások alapján komoly lehetőségeket láttak egyes cardiovascularis kórállapotok antioxidáns terápiájában. Sajnos az ehhez fűzött remények csak részben igazolódtak. Az alapkutatásban és a klinikumban is az antioxidánsok preventív és terápiás jelleggel történő adásával kapcsolatos eredmények a sok biztató megfigyelés ellenére sem egységesek. Több kutató laboratórium vizsgálta ischaemiás-reperfúziós károsodás *in vivo* és *in vitro* modelljeiben különböző redukálószeres hatását. A kapott szerteágazó eredmények okai lehettek a különböző kísérleti állatfajok, az ischaemia időtartama, az ez alatt fennálló kollaterális vérkeringés, az antioxidáns alkalmazásának időpontja és módja, és a cardioprotekció vizsgálatának különböző végpontjai. Különböző betegszámú klinikai tanulmányokban vizsgálták N-acetil-L-ciszteint (NAC), E- és C-vitamin hatását. Az eddigi vizsgálatok között egyaránt találunk pozitív, negatív és semleges eredménnyel zárultakat. A nagy klinikai tanulmányok a komoly erőfeszítések ellenére sem tisztázták még az antioxidánsok adásának cardiovascularis betegségek terápiájában betöltött szerepét és módját. A leírt állat kísérletek és humán vizsgálatok tapasztalatai mutatják, hogy az oxidatív károsodás reverziójának és prevenciójának kérdését a szervezet szintjén rendkívül komplex tényezők együttese határozza meg.

1.6. Célkitűzések

Tudományos kutatásainkban célul tűztük ki:

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

2. Módszerek

2.1. Etikai vonatkozások

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

2.2. Mechanikai mérések izolált szívizomsejteken

A szívizomsejteket a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt humán szívizom minták felolvasztása után mechanikus úton izoláltuk. A membránjaitól megfosztott szívizomsejteket szilikon ragasztó segítségével rögzítettük a mechanikai mérőrendszeren. Az erőmérések során használt Ca^{2+} -mentes relaxáló oldat (pCa 9) és a Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatok (pCa 7-4,5) összetételét Fabiato szerint (1979) számítottuk. Az izometriás kontraktilis erőt a szívizomsejt relaxáló oldatból Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatba történő átvitelét követően mértük. Az izometriás csúcserő ($F_{\text{totál}}$) kifejlődése után meghatároztuk az aktin-miozin ciklus sebességére jellemző kinetikai paramétert (k_{tr}). Az ún. passzív erőkomponenst ($F_{\text{passzív}}$) a Ca^{2+} kontraktúrák után relaxáló oldatban mértük. A Ca^{2+} -aktivált izometriás erőt (F_0) a következő képlet szerint számoltuk: $F_0 = F_{\text{totál}} - F_{\text{passzív}}$. A kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének (pCa₅₀) meghatározására a

szubmaximális Ca^{2+} koncentrációknál mért erőértékeket a maximális aktivációnál kapott erőértékekre (F_{\max}) normalizáltuk.

Kísérleteinkben oxidálószerként a ditiotipiridint (DTDP) és peroxinitritet alkalmaztuk. Redukálószerként a ditiotreitolt (DTT), a redukált glutationt (GSH) és az N-acetil-L-ciszteint (NAC) használtuk méréseink során.

2.3. Biokémiai módszerek

A vizsgált kontraktilis változások biokémiai hátterének tisztázásához többféle módszert alkalmaztunk. A kontraktilis fehérjék szulfhidril tartalmának kvantitatív változásait az SH specifikus Ellman reagenssel vizsgáltuk. A myofibrilláris fehérjék biotinizációjával és Western blot analízisével az egyes fehérjék szintjén bekövetkező változásokat detektáltuk. A kontraktilis változásokért felelős SH-oxidált fehérjék azonosítása érdekében a biotinizált myofibrilláris fehérjékből a miozin könnyű lánc 1-et (MLC1) és a cardiális troponin I-t (cTnI) immunprecipitációval választottuk el. A mechanikai és biokémiai méréseinkből származó adatok megbízható összevethetősége érdekében hasonló kísérleti körülmények (hőmérséklet, inkubációk időtartama) megteremtésére törekedtünk a különböző módszerek alkalmazása során. Továbbá a mechanikai és biokémiai kísérleteinkben ugyanolyan módon előállított izolált, permeabilizált szívizomsejteket tartalmazó homogenizátumot használtuk.

3. Eredmények

3.1. Myofibrilláris fehérjék SH oxidációjának kontraktilis következményei

Humán kamrai szívizomsejteken tanulmányoztuk a SH oxidáció aktív és passzív erőre, valamint az aktin-miozin ciklus keresztkötési kinetikáját jellemző k_{tr} paraméterre gyakorolt hatását ismételt izometriás Ca^{2+} -kontraktúrák kiváltásával. DTDP egyre növekvő koncentrációinak hatására a Ca^{2+} -aktivált maximális erő csökkenését tapasztaltuk. Az itt alkalmazott legmagasabb DTDP koncentráció (10 mM) az erőt gyakorlatilag nullára csökkentette. Ezt követően szekvenciálisan használt 10 mM DTT az F_o -t a kontroll érték 77,6%-ra hozta vissza, bizonyítva a DTDP által kiváltott kontraktilis funkció károsodás reverzibilis voltát. Érdekes, hogy sem az erő csökkenését, sem a növekedését nem kísérte a szívizomsejtek harántcsíkjának mikroszkóp alatt látható változása. Megfigyeltük,

hogy a DTT önmagában, előzetes oxidálószerrel történő kezelés nélkül, nem befolyásolta szignifikánsan a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt.

Ezt követően meg akartunk bizonyosodni, hogy a kialakult kontraktilis változások hátterében a SH csoportok oxidációja áll. Ehhez összehasonlítottuk DTDP emelkedő koncentrációinak a Ca^{2+} -aktivált maximális erőre és a kontraktilis fehérjék SH tartalmára gyakorolt hatását. A SH csoportok redox állapotának változását myocita homogenizátumokban SH specifikus Ellman reagenssel határoztuk meg. Ezen kísérletek szerint a DTDP növekvő koncentrációi által kiváltott erő csökkenést a fehérjék SH csoportjainak paralell oxidációja kísérte. Az erő nagymértékű csökkenése azonban csak alacsonyabb SH tartalom mellett következett be. Ellman reagenssel történő meghatározás alapján a DTT képes volt a SH csoportokat teljes mértékben revertálni. A DTT önmagában alkalmazva a fehérjék redox státuszában sem idézett elő számottevő változást.

Következő lépésként a SH oxidáció myofibrilláris mechanikára gyakorolt hatását részleteiben vizsgáltuk. Ehhez 2,5 mM DTDP koncentrációt alkalmaztunk, mely a DTDP koncentráció-hatás görbéje alapján közel felére csökkentette a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt. DTDP hatására a Ca^{2+} -érzékenység csökkenését találtuk, vagyis a Ca^{2+} -erő görbe jobbra tolódott ($\Delta p\text{Ca}_{50} = 0,22 \pm 0,02$; $p < 0,01$ vs. kontroll). 10 mM DTT szekvenciális alkalmazása DTDP-t követően revertálta a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt és a Ca^{2+} -érzékenységet egyaránt. Az önmagában alkalmazott DTT kezelés nem befolyásolta sem az aktív erőt, sem a Ca^{2+} -érzékenységet. A relaxáló oldatban meghatározott passzív erő DTDP hatására kissé fokozódott, majd ezután végzett DTT inkubációt követően ezen magasabb értéken maradt. Az aktin-miozin ciklus kinetikáját maximális Ca^{2+} -koncentrációnál jellemző $k_{\text{tr,max}}$ paraméter 2,5 mM DTDP hatására $1,07 \pm 0,04$ 1/s értékről $0,8 \pm 0,05$ 1/s-ra csökkent. Szekvenciálisan alkalmazott DTT ezen paraméter teljes reverzióját eredményezte ($k_{\text{tr,max}} = 1,11 \pm 0,05$ 1/s). DTT önmagában a keresztkötési kinetikát sem változtatta meg.

Megvizsgáltuk a DTDP által kiváltott SH oxidáció egyéb redukálószerekkel, a fiziológiásnak tekinthető GSH-nal és a mindennapos gyógyászatban használt NAC-nel, történő reverzióját. A DTT-vel szemben, 2,5 mM DTDP alkalmazását követően 10 mM GSH és NAC csak részlegesen volt képes revertálni az oxidáció által okozott SH tartalom csökkenését Ellman reakciók alapján. A szabad SH csoportok mennyisége a kontrollhoz képest 2,5 mM DTDP-t követően $14 \pm 2\%$ volt, 2,5 mM DTDP + 10 mM GSH után $34 \pm 8\%$, 2,5 mM DTDP + 10 mM NAC után pedig $30 \pm 4\%$ ($p < 0,05$ vs. 2,5 mM DTDP mindkét esetben). Azonban ezen redukálószerek 100 mM koncentrációban alkalmazva

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

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

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

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

A 26 kDa-nál elhelyezkedő fehérje azonosságát illetően elsősorban a cardiális troponin I (cTnI) és a miozin könnyűlánc 1 (MLC1) jött szóba. Ezen fehérjék azonosításához immunprecipitációt végeztünk. A cTnI és a MLC1 elválasztása a többi fehérjétől sikeres volt, az összes DTDP koncentrációnak megfelelően kapott sávok a cTnI és MLC1 kezelésektől

független jelenlétére utaltak. Azonban mikor ezen precipitált fehérjét a SH szelektív biotiláció alapján mutattuk ki, a cTnI igen alacsony (0,1 mM) DTDP koncentrációnál bekövetkező teljes oxidációját tapasztaltuk. Ugyanakkor a MLC1 esetében kapott mintázat teljes egészében hasonlított a kérdéses 26 kDa-os fehérjénél látott jelintenzitás csökkenéshez. Így ez a kísérlet a MLC1-et a SH oxidációval szemben aránylag magasabb rezisztenciát mutató fehérjeként azonosította, melynek oxidációja a myofibrilláris mechanikára befolyással lehet.

A 45 kDa tömegű fehérje, mely az MLC1-hez hasonló oxidációs érzékenységet mutatott, Western blot és ezüstoffestés alapján aktinnak bizonyult. A 130 és 54 kDa tömegű fehérjét molekulatömegük alapján miozin kötő C proteinnek és dezminnek valószínűsítettük.

3.3. SH oxidáció szerepe a peroxinitrit által kiváltott kontraktilis dysfunkcióban

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

Ezt követően részletesen vizsgáltuk a közel félmaximális erőcsökkenést eredményező $50 \mu\text{M}$ peroxinitrit kontraktilis paraméterekre gyakorolt hatását. A Ca^{2+} -aktivált maximális erő $56 \pm 4\%$ -ra csökkent $50 \mu\text{M}$ peroxinitrit kezelés hatására, míg a passzív erő és a keresztköti kinetika nem változott szignifikáns mértékben. SH specifikus redukálószereket alkalmaztunk, hogy becsülni tudjuk az SH oxidáció hozzájárulását a peroxinitrit okozta erőcsökkenéshez. 10 mM DTT és 10 mM NAC peroxinitrittel történő inkubációt követően részleges, de szignifikáns mértékű reverziót váltott ki a kontraktilis erőt illetően. Az F_0 DTT-t követően $69 \pm 4\%$ -ra, NAC után pedig $71 \pm 7\%$ -ra nőtt ($p < 0,05$ vs. peroxinitrit mindkét esetben). Ezek alapján a peroxinitrit kontraktilis erőt csökkentő hatása legalább ennek a

redukálószerrel revertálható hányadnak megfelelő mértékben tekinthető az SH oxidáció következményének más fehérje módosító hatásai mellett. A DTT és NAC a passzív erőt nem változtatta jelentős mértékben. A $k_{tr,max}$ esetében mindkét redukálószer kismértékű emelkedést okozott. Az aktin-miozin ciklus sebességében kisfokú csökkenést kezelések nélkül (kontroll kísérletekben) is tapasztaltunk, feltehetően a preparátumok leromlásának következtében.

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

4. Megbeszélés

A disszertáció alapjául szolgáló kutatásainkban a Ca^{2+} -regulált kontraktilis erő és a myofilamentáris fehérjék SH oxidációja közötti összefüggést vizsgáltuk. Eredményeink alapján a kontraktilis proteinek SH oxidációjának messzemenő hatásai vannak a myocardialis kontraktilitásra. A fehérjék SH oxidációja így nem csak a sejtek elsővonalbeli antioxidáns védelmének gyengülését jelenti, hanem veszélyeztetheti a kontraktilis funkciót is. Munkánk során azonosítottuk a myofilamentáris fehérjék egy csoportját, így az MLC1-et és az aktint, melyek oxidációja lassítja az aktin-miozin ciklus kinetikáját, valamint csökkenti a Ca^{2+} -aktivált maximális erőt és a Ca^{2+} -érzékenységet. Az *in vitro* kiváltott SH oxidációt és

mechanikai következményeit megfelelően választott és alkalmazott redukálószerrel reverzibilisnek találtuk, mely az SH oxidációval összekapcsolt kórállapotokban új terápiás célpont lehet. Legjobb tudomásunk szerint ez az első tanulmány, mely az oxidatív károsodás SH függő komponensét és ennek a Ca^{2+} -regulált erőre gyakorolt hatását humán szívműzaton vizsgálta.

A DTDP által kialakított SH tartalom csökkenésével a Ca^{2+} -aktivált maximális erő, a Ca^{2+} -érzékenység és az aktin-miozin ciklus sebessége is csökkent. Figyelemre méltó, hogy a kontraktilis paraméterekben kialakult változások az SH státusz visszaállításával revertálhatóak voltak, mely a kettő közötti szoros összefüggést jelzi.

Meg kell azonban jegyezzük, hogy a SH oxidációt kiváltó ágens kémiai természetétől, a módosított myofilamentáris fehérjéktől és fajtól függően más mechanikai változások is kifejlődhetnek. Így például patkány nyúzott izomrostokon a Ca^{2+} -érzékenység fokozódását tapasztalták DTDP hatására. A közelmúltban közölték rágcsálók szív-preparátumaival végzett kísérleteket, melyek szerint a tiol csoportokkal reagáló HNO (nitroxil) Ca^{2+} -aktivált maximális erő növekedését eredményezte. Meg kell említsük, hogy utóbbi kísérletekben a SH oxidált fehérjék szintje alacsony volt, és a mechanikai változásokért csak az igen reaktív SH csoportokon keresztül megvalósuló redox folyamatok lehettek felelősek.

A szívműzsejteket önmagában, előzetes oxidálószer kezelés nélkül DTT-nek kitéve, sem a kontraktilis erőben, sem a SH tartalomban nem találtunk változást. Ezen eredmények egybevágóak azon korábbi állatkísérletes adatokkal, mely szerint a kontraktilis fehérjék SH csoportjai fiziológias körülmények között elsősorban redukált állapotban vannak.

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

Munkánk során célunk volt különböző redukálószeres SH specifikus mechanikai változásokra kifejtett hatását és revertáló képességét is megvizsgálni. Redukálószeres

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

Összehasonlítva a DTDP Ca^{2+} -aktivált erőre és a SH oxidációra gyakorolt koncentráció-függő hatását meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a fehérjék SH csoportjainak legalább 50%-ban oxidálódnia kell szignifikáns erőcsökkenés kialakulásához. A legkifejezettebb erőcsökkenést okozó DTDP koncentrációknál (1-10 mM) két kontraktilis protein (26 kDa és 45 kDa) teljes SH oxidációjára hívták fel a figyelmet biokémiai meghatározásaink. Ezen myocardiális mechanikára kritikus hatással bíró fehérjéknek megkíséreltük az azonosítását. Immunprecipitációval MLC1-ként azonosítottuk a 26 kDa molekulatömegű fehérjét. A 45 kDa-nál futó fehérjét molekulatömeg és nagy mennyiségben megfigyelt előfordulása alapján aktinként határoztuk meg. Ezek az eredmények a szakirodalmi adatokkal is összhangban vannak. Jelenlegi feltételezések szerint a MLC1-nek meghatározó szerepe van a miozin motor finom hangolásán keresztül az erő generálásra és a keresztkötési kinetikára. Továbbá állatkísérletes modellekben több bizonyíték létezik az aktin ischaemia-reperfúzió alatti oxidációjával kapcsolatban. Vizsgálataink alapján más fehérjék oxidációjának is kiemelt szerepe lehet az erő generálásra, mint pl. a miozin kötő protein C-nek, vagy a dezminnek. A cTnI proteolitikus fragmentációja más mechanizmusokkal együtt a stunning legvalószínűbb mechanizmusának tűnik jelenleg. Ezzel szemben vizsgálataink alapján a cTnI SH oxidációjának szerepe a myofibrilláris dysfunkcióban kevésbé valószínű.

Ebben a munkában célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a peroxinitrit által kiváltott mechanikai változások SH dependens komponensét, valamint a peroxinitrit hatásait összehasonlítsuk a SH specifikus DTDP hatásaival. 50 μM peroxinitrit alkalmazása közel 50%-os kontraktilis erőcsökkenést eredményezett, melyet követően DTT-t és NAC-t szekvenciálisan adva a F_0 -t részlegesen, de szignifikáns mértékben növelni tudtuk. Peroxinitrit adását követően alkalmazott redukálószerrel kiváltott reverzió alapján a peroxinitrit SH oxidáló hatása körülbelül 20%-ban tehető felelőssé az F_0 csökkenésben. Összességében tehát úgy tűnik, hogy a peroxinitrit mediált mechanikai változások kisebb

része tulajdonítható SH oxidációnak, míg nagyobb hányada az egyéb protein módosulások, elsősorban nitrotirozin képződés számlájára írható.

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

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

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

Ismert, hogy a SH oxidáló ágensek a tiol csoportokkal sokféleképpen léphetnek reakcióba, inter- és intramolekuláris diszulfid hidak, valamint vegyes diszulfidok kialakulását eredményezve. Így például a DTDP a proteinek között és a proteineken belül diszulfid hidakat alakíthat ki. Ezen kívül önmaga ketté hasadva az egyik fele a fehérje ciszteinjéhez kötődhet, míg a másik fele tiopiridon formájában felszabadul. A DTT alacsony redox potenciáljának köszönhetően a fehérjék diszulfid kötéseit és a vegyes diszulfidokat is hatékonyan képes redukálni. A gyengébb redukálószerként ismert GSH és NAC hatékonysága kísérleteinkben elmaradt a DTT-től. Ismert, hogy az antioxidánsokkal folytatott humán nagy klinikai tanulmányok eredményei szintén ellentmondásosak. Ugyanakkor a NAC humán alkalmazásával nem egy vizsgálat pozitív eredménnyel zárult. A humán klinikai tanulmányok

változatos eredményei és izolált szívműködéseken végzett kísérleteink is az antioxidánsok és az alkalmazási körülményeik megfelelő megválasztására hívja fel a figyelmet.

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

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

1. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, van der Velden J, Stienen GJ, Édes I, Papp Z. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(7):1175-84.

impakt faktor: 5,484

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

impakt faktor: 6,807

Az értekezéshez fel nem használt *in extenso* közlemények

1. Kaheinen P, Pollesello P, **Hertelendi Z**, Borbély A, Szilágyi S, Nissinen E, Haikala H, Papp Z. Positive inotropic effect of levosimendan is correlated to its stereoselective Ca²⁺ sensitizing effect but not to stereoselective phosphodiesterase inhibition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006; 98(1):74-8.

impakt faktor: 1,788

2. Birinyi P, Tóth A, Jóna I, Acsai K, Almássy J, Nagy N, Prorok J, Gherasim I, Papp Z, **Hertelendi Z**, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp F, Papp JG, Varró A, Nánási PP, Magyar J. The Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca²⁺ transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2008; 78(3):476-84.

impakt faktor: 6,127

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

impakt faktor:5,581

Idézhető absztraktok

1. Barta J, Tóth A, **Hertelendi Z**, Édes I, Jacquet K, Reidlich A, Papp Z. Protection of Calpain-1 induced cTnI degradation by PKA phosphorylation in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 34:A7.

2. Barta J, Tóth A, **Hertelendi Z**, Édes I, Jacquet K, Reidlich A, Papp Z. The effects of missense mutations on Calpain-1 induced cTnI degradation. *Cardiol Hung.* 2002; Suppl.1:89.

3. **Hertelendi Z**, Tóth A, Jenei Cs, Édes I, Jacquet K, Papp Z. A myocardium ischaemiás károsodása következtében felszabaduló troponin degradációs termékek vizsgálata *Cardiol. Hung.* 2005; 35:A20.

4. **Hertelendi Z**, Tóth A, Jenei Cs, Édes I, Jacquet K, Papp Z. Troponin I degradation products released into the bloodstream during myocardial ischaemic injury. *J Muscle Res Cell Motil.* 2005; 26:81.

5. Borbély A, **Hertelendi Z**, Tóth A, Szilágyi Sz, Édes I, Varró A, Papp JGy, Papp Z. Contractile alterations in isolated human cardiomyocytes following oxidative protein modifications. *J Muscle Res Cell Motil* 2005; 26:81.

6. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Contractile protein oxidation and its mechanical consequence in the human myocardium. *Cardiol Hung* 2006; 36:A20.

7. **Hertelendi Z**, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, Vaszily M, Édes I, Papp Z. Possible molecular determinants of altered myocardial function during oxidative stress. *Eur J Heart Failure.* 2006; 5S1:371.

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

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

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

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

12. Papp Z, **Hertelendi Z**, Szilágyi Sz, Édes I, Pollesello P. Mechanisms of action of the Ca²⁺-sensitizer levosimendan. *Acta Physiol.* 2007; 191:13.

13. **Hertelendi Z**, Toth A, Borbely A, Galajda Z, Vaszily M, Edes I, Papp Z. Sulfhydryl group oxidation of myofilament proteins reduces contractile force and its Ca²⁺-sensitivity of human left ventricular cardiomyocytes. *Eur Heart J.* 2007; 28:433-434.

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

Előadások

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

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

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

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

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

Poszterek

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

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

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

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

5. **Hertelendi Z**, Toth A, Borbely A, Galajda Z, Vaszily M, Edes I, Papp Z. Sulfhydryl group oxidation of myofilament proteins reduces contractile force and its Ca²⁺-sensitivity of human left ventricular cardiomyocytes. European Society of Cardiology Congress, Vienna, 2007. szeptember

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