

dc_119_10

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

SEJTFELSZÍNI RECEPTOROK ÉS INTRACELLULÁRIS
JELÁTVITELI RENDSZEREK JELENTŐSÉGE A SZÍV
PUMPAFUNKCIÓJÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

SZOKODI ISTVÁN



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
KLINIKAI KÖZPONT
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
SZÍVGYÓGYÁSZATI KLINIKA
PÉCS, 2013

Tartalomjegyzék

1. Tudományterületi háttér	1
1.1. A szívizom-kontraktilitás regulációja: a téma jelentősége és újszerűsége	1
1.2. A szívizom-kontraktilitás klasszikus szabályozó mechanizmusai	2
1.2.1. A Frank-Starling-mechanizmus	2
1.2.2. A frekvencia-erőkifejtés összefüggése	3
1.2.3. Az adrenerg receptorok szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában	3
1.2.3.1. A β 1-AR-ok szerepe	3
1.2.3.2. Az α 1-AR-ok szerepe	4
1.3. A kardiokinek szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában	4
1.3.1. Adrenomedullin	5
1.3.2. Apelin	6
1.3.3. Prolaktin-releasing peptid	7
1.3.4. Endothelin-1	7
2. Célkitűzések	10
3. Módszerek	11
3.1. Kísérleti modellek	11
3.1.1. Kísérleti állatok	11
3.1.2. Direkt miokardiális géntranszfer in vivo	11
3.1.3. Bal kamrai nyomásterhelés modelljei	11
3.1.4. Szívizomsejtek ciklikus mechanikus feszítése	11
3.1.5. Felnőtt kamrai szívizomsejtek izolációja	12
3.2. Vizsgálati módszerek	12
3.2.1. Hemodinamikai mérések in vivo	12
3.2.2. Balkamra-funkció vizsgálata ex vivo	12
3.2.2.1. Balkamra-funkció vizsgálata izolált patkányszív-preparátumon	12
3.2.2.2. Balkamra-funkció vizsgálata izolált egérszív-preparátumon	12
3.2.3. Kontraktilitás vizsgálata izolált szívizomsejteken in vitro	13
3.2.4. Elektrofiziológiai vizsgálatok	13
3.2.5. Fluoreszcens vizsgálati módszerek	13
3.2.6. RNS meghatározási módszerek	13
3.2.7. Fehérje meghatározási módszerek	13
3.2.8. Statisztikai elemzés	14
4. Eredmények és megbeszélés	15
4.1. Az adrenomedullin szerepe szívizom-kontraktilitás regulációjában	15
4.2. Apelin szerepe szívizom-kontraktilitás szabályozásában	17
4.3. A PrRP szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában	20
4.4. Az ET-1 szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában	21
5. Az új tudományos eredmények összefoglalása	25
6. A kutatási eredmények gyakorlati jelentősége	27
7. Irodalomjegyzék	29
8. Saját közlemények	32
8.1. A Tézisek alapjául szolgáló közlemények	32
8.1.1. Eredeti közlemények	32

dc_119_10

8.1.2.	Összefoglaló közlemények.....	33
8.1.3.	Könyvfejezet.....	34
8.1.4.	Hozzászólás	34
8.2.	A PhD Értekezésben nem szereplő további közlemények	34
8.2.1.	Eredeti közlemények	34
8.2.2.	Proceedings folyóiratban ill. könyvben	36
8.3.	A PhD Értekezésben szereplő közlemények.....	36
8.3.1.	Eredeti közlemények	36
8.4.	Összesített tudományometriai adatok (lezárva: 2012. december 15.).....	37
9.	Köszönetnyilvánítás	39

Rövidítések jegyzéke

AM	adrenomedullin
Ang II	angiotenzin II
AR	adrenerg receptor
AT ₁ -receptor	angiotenzin II 1-es típusú receptor
AVP	arginin-vazopresszin
cAMP	adenozin-3',5'-monofoszfát
CGRP	kalcitonin gén eredetű peptid ("calcitonin gene-related peptide")
CRLR	kalcitoninreceptor-szerű receptor ("calcitonin receptor-like receptor")
DAG	diacilglicerol
dP/dt _{max}	bal kamrai nyomásgörbe idő szerinti első deriváltjának a maximális pozitív értéke
dP/dt _{min}	bal kamrai nyomásgörbe idő szerinti első deriváltjának a maximális negatív értéke
dTG	dupla transzgénikus patkánytörzs
EC ₅₀	félmaximális hatás
EGFR	epidermális növekedési faktor-receptor
ERK1/2	extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2
ET-1	endothelin-1
ET _A -receptor	endothelin A-típusú receptor
ET _B -receptor	endothelin B-típusú receptor
GPCR	G-proteinhez kapcsolt receptor
I1	inhibitor-1 fehérje
I _{Ca}	befelé irányuló Ca ²⁺ -áram
I _{Na}	feszültségfüggő Na ⁺ -áram
IP ₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
LacZ	β-galaktozidáz
MAPK	mitogén által aktivált proteinkináz
MEK1/2	MAPK-kináz 1/2
mitoK _{ATP}	mitokondriális ATP-függő K ⁺ -csatorna
MKK3/6	MAPK-kináz 3/6
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -cseremechanizmus
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -cseremechanizmus
NO	nitrogén-monoxid
NOS	NO-szintetáz
NOS1, nNOS	neuronális típusú NO-szintetáz
NOS2, iNOS	indukálható NO-szintetáz
NOS3, eNOS	endotheliális típusú NO-szintetáz
p90RSK	p90 riboszómális S6-kináz
PAMP	proAM N-terminális 20 peptid
PCR	polimeráz láncreakció

dc_119_10

PIP ₂	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PKA	proteinkináz-A
PKC	proteinkináz-C
PLC	foszfolipáz-C
PLN	foszfolamban
PP1	foszfoprotein-foszfataz-1
PrRP	prolaktin-releasing peptid
RAMP	receptor aktivitást módosító fehérje (“receptor activity modifying protein”)
RIA	radioimmunoassay
ROS	reaktív oxigén származékok
SD	Sprague-Dawley patkánytörzs
S.E.M.	mintaközép hibája (“standard error of mean”)
SERCA	SR Ca ²⁺ -ATPáz
SHR	spontán hipertenzív patkánytörzs
SL	szarkomerhossz
SR	szarkoplazmatikus retikulum
T	bal kamrai nyomásgörbe exponenciális csökkenésének időállandója
TGR(mREN-2)27	egér <i>REN-2</i> gént expresszáló transzgénikus patkánytörzs
WKY	Wistar-Kyoto patkánytörzs

1. Tudományterületi háttér

1.1. A szívizom-kontraktilitás regulációja: a téma jelentősége és újszerűsége

A szívizomsejtek összehúzódó képessége, ún. kontraktilitása alapvető szerepet játszik a szív pumpafunkciójának meghatározásában és ezáltal a vérkeringés optimális szinten tartásában. Az egészséges szív tág határok között képes megfelelni a szervezet metabolikus igényeinek, edzett egyének esetén a szív perctérfogata akár 6-szorosára is emelkedhet. Másrészt a pumpafunkció progresszív romlása keringési elégtelenséghez, kis- és nagyvérköri pangáshoz vezethet (Opie, 2004). A szívelégtelenség a vezető halálokok közé tartozik a fejlett világban. A tünetekkel járó szívelégtelenség prevalenciája 2%-os Európában (Mosterd és Hoes, 2007). A szívelégtelenség kimenetele összevethető számos daganatos megbetegedéssel, a hospitalizált betegek 4 éves túlélése csupán 50%-ra tehető (Stewart és mtsai, 2001). A krónikus szisztolés szívelégtelenség kezelése megoldatlan. A széles körben elérhető szívtámogató szerek rövidtávon ugyan javítják a balkamra-funkciót és csökkentik a klinikai tüneteket, azonban hosszú távú alkalmazásuk rontja a betegek túlélési esélyeit (Curfman, 1991; Landmesser és Drexler, 2007).

A szívizom-összehúzódások erejét a következő tényezők szabják meg: a Frank-Starling-mechanizmus, az erő kifejtés-frekvencia összefüggés, a szimpatikus idegrendszer aktivitása, valamint egyes keringő hormonok (Opie, 2004). Emellett valószínűsíthető egy további tényező létezése is. Az elmúlt másfél évtizedben számos endogén peptiderg rendszert írtak le a szívizomban, felvetve a lehetőségét, hogy fontos szerepet játszhatnak a szív parakrin/autokrin szintű szabályozási folyamataiban. Kiemelendő, hogy az emberi szervezetben fellelhető 367 G-proteinhez kapcsolt receptor (GPCR) alig több mint felénél azonosították a receptort aktiváló endogén transzmittert (Vassilatis és mtsai, 2003; Levoye és Jockers, 2008). Továbbá, a GPCR-ok jelátviteli folyamataiban alapvető szereppel bíró proteinkinázok családjának 518 tagja közül csupán tört részük esetében ismert a fiziológiai funkció (Manning és mtsai, 2002). Feltételezhető, hogy számos, ez idáig ismeretlen ligand-receptor rendszer vár felismerésre a szívben. A kontraktilitást szabályozó fiziológiai mechanizmusok feltárása új molekuláris célpontok azonosításához vezethet, melyek új lehetőségeket teremthetnek a szívelégtelenség kezelésében.

1.2. A szívízom-kontraktilitás klasszikus szabályozó mechanizmusai

A szívízom szinkronizált összehúzódását a szívízomsejteken végigterjedő elektromos depolarizáció, az akciós potenciál váltja ki. A depolarizáció során a plazmamembrán feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornáin keresztül a szívízomsejtekbe áramló Ca^{2+} (I_{Ca}) aktiválja a rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornákat és a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) jelentős mennyiségű Ca^{2+} szabadul fel. A szabad intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nagymértékű emelkedése elősegíti a Ca^{2+} kötődését a troponin-C-hez, mely megindítja a vastag és a vékony filamentumok kapcsolódását, kezdetét veszi a kontrakció. A relaxáció alapfeltétele, hogy a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kellő szintre csökkenjen. A szabad Ca^{2+} citoszólból történő gyors eltávolításáért elsődlegesen a SR Ca^{2+} -ATPáz (SERCA) felelős, mely a SR-ba pumpálja vissza a Ca^{2+} -ot (Bers, 2002). A kontraktilitásra, mint a szív inotrop állapotára is szokás hivatkozni. Molekuláris szinten emelkedett inotrop állapoton a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és a kontraktilis fehérjék, elő- és utóterheléstől független, fokozott kölcsönhatását értjük. Ennek hátterében a Ca^{2+} -tranziensek növekedése illetve a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} -érzékenységének fokozódása állhat. Fontos kiemelni, hogy a terhelési viszonyok illetve a szívfrekvencia megváltozásakor bekövetkező celluláris folyamatok nem különíthetők el élesen a kontraktilitás primer változásakor tapasztaltaktól (Opie, 2004).

1.2.1. A Frank-Starling-mechanizmus

A szívízom rendkívül fontos tulajdonsága, hogy ütésről ütésre képes összehangolni a kamrai telődést a szív pumpafunkciójával változó hemodinamikai viszonyok mellett. A 19. és 20. század fordulóján Frank békaszíven (Frank, 1895), míg Starling emlős szív-tüdő készítményen (Patterson és Starling, 1914) ismerte fel a fenti összefüggést, mely jelenségre kollektíven Frank-Starling-mechanizmusként hivatkozunk. E mechanizmus révén, adott kontraktilis állapot mellett a kamrai verővolumen (*i*) arányos a diasztolés telődés fokával (előterhelés), valamint (*ii*) a verővolumen fenntartható emelkedett artériás nyomással szemben (utóterhelés) az előterhelés fokozása révén (Opie, 2004; de Tombe és mtsai, 2010). Fiziológias körülmények között a szív a kamrafunkciós görbe (ún. Starling-görbe) felszálló szakaszán működik. Szívelégtelenségben a tágult szív a kamrafunkciós görbe csúcsán, ugyanakkor további hosszfüggő tartalékok hiányában kénytelen működni. A Frank-Starling-mechanizmus a miofilamentumok Ca^{2+} iránti érzékenységének hosszfüggő változásán alapul, a kontrakciós erő és az aktivátor Ca^{2+} -koncentráció közötti összefüggés felfelé és balra tolódik a szarkomerhossz növelésekor. Az izom nyújtásakor egyrészt fokozódik a troponin-C Ca^{2+} -érzékenysége, másrészt

nő a miofilamentumok közti kooperatív interakció hatékonysága (de Tombe és mtsai, 2010).

1.2.2. A frekvencia-erőkifejtés összefüggése

Bowditch békaizmon tett eredeti megfigyelése szerint, az ingerlési frekvencia növelése fokozta a kontrakciók erejét (Bowditch, 1878), mely jelenséget frekvencia-erőkifejtés összefüggésként illetve Treppe-hatásként tartanak számon. Az emlősfajok döntő hányadában az egészséges szív pozitív frekvencia-erőkifejtés összefüggést mutat, mely jelenség a nagyobb testű emlősök esetében kifejezettebb. A fizikai terhelés fokozódásakor ezen adaptív mechanizmus is hozzájárul a perctérfogat növekedéséhez (Opie, 2004; Endoh, 2008). A Frank-Starling-effektussal ellentétben, a pozitív frekvencia-erőkifejtés összefüggés hátterében a Ca^{2+} SR-beli fokozott felhalmozódása és a Ca^{2+} -tranziensek következményes növekedése áll. A frekvencia emelésekor egyrészt fokozódik a Ca^{2+} beáramlása a sejtekbe az L-típusú Ca^{2+} -csatornákon keresztül, másrészt az intracelluláris Na^{+} akkumulációja csökkenti a Ca^{2+} eltávolítását a $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus (NCX, " *$\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*") előreható működésének ("*forward*", Na^{+} be, Ca^{2+} ki) gátlása révén (Endoh, 2008).

1.2.3. Az adrenerg receptorok szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában

A szimpatikus idegrendszer alapvető szerepet játszik a perctérfogat szabályozásában vészhelyzetek során ("*fight-or-flight*" response, "harcolj vagy menekülj" reakció). A katekolaminok (noradrenalin, adrenalin) a szív adrenerg GPCR-ait (AR), döntően a β_1 -AR-okat aktiválva váltják ki komplex szívhatásaikat: fokozzák a szív kontrakciós erejét, gyorsítják a relaxációt és emelik a szívfrekvenciát (Xiao és mtsai, 2006). A β -AR-okhoz viszonyítva az α -AR-ok szerepe kevésbé tisztázott, feltehetőleg kóros állapotokban jutnak jelentősebb szerephez (Jensen és mtsai, 2011).

1.2.3.1. A β_1 -AR-ok szerepe

A szívizomsejtek β -AR-ai között a β_1 -AR altípus a domináns. A β_1 -AR a G_s -protein révén képes aktiválni az adenilátcikláz, mely az adenozintrifoszfátból (ATP) történő ciklikus adenzin-3',5'-monofoszfát (cAMP) átalakítást katalizálja. Az intracelluláris cAMP-szint emelkedése a proteinkináz-A (PKA) aktivációját váltja ki. A PKA szimultán képes fokozni számos fehérje foszforilációját (L-típusú Ca^{2+} -csatornák, foszfolamban, rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornák, troponin-I, miozinkötő

C-fehérje) (Xiao és mtsai, 2006). A β_1 -AR aktivációt követő pozitív inotrop hatás létrejöttében alapvető szerepet játszik az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek növekedése, melynek háttérében döntően a foszfolamban (PLN) fehérje PKA-függő foszforilációja áll. A PLN Ser-16 helyen történő foszforilációja megszünteti a SERCA gátlását és fokozza a Ca^{2+} visszavételét a SR-ba. A SR telítődése révén növekszik a felszabadítható Ca^{2+} mennyisége és másodlagosan fokozódik a szívizom kontraktilis ereje (MacLennan és Kranias, 2003). Ezt a folyamatot támogatja a plazmamembrán L-típusú Ca^{2+} -csatornáinak foszforilációja, az I_{CaL} amplitúdójának növekedése serkenti a SR rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornáin keresztül történő Ca^{2+} felszabadulást (Bers, 2007).

1.2.3.2. Az α_1 -AR-ok szerepe

Az α_1 -AR-ok stimulációja is képes befolyásolni a szív inotrop állapotát, azonban ez mind minőségileg, mind mennyiségileg eltér a β_1 -AR hatásától. Az α_1 -AR-ok által közvetített pozitív inotrop hatás szerényebb mértékű, döntően a miofilamentumok Ca^{2+} iránti érzékenysége fokozódik, az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek nem vagy csak mérsékelten növekednek (Endoh, 2008). Az α_1 -AR-ok a G_s -adenilátcikláz–cAMP–PKA jelátviteli rendszertől független mechanizmusokra hatnak. Tradicionális felfogás szerint, az α_{1A} -AR a $G_{q/11}$ -fehérjén keresztül képes a sejtmembránban található foszfolipáz-C (PLC) enzimet aktiválni, mely a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot inozitol-1,4,5-triszfoszfátra (IP_3) és diacilglicerolra (DAG) hasítja. A DAG a proteinkináz-C (PKC) enzimet aktiválja, mely számos intracelluláris fehérje foszforilációs állapotát képes befolyásolni (Terzic és mtsai, 1993). Az α_1 -AR stimuláció a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységét az intracelluláris pH (pH_i) alkalikus irányú eltolása, illetve a miofilamentumok foszforilációja révén fokozza (Terzic és mtsai, 1993). Felvetették a PKC szerepét ezen folyamatokban (Endoh és mtsai, 1993), ugyanakkor mások szerint az α_1 -AR stimuláció a miofilamentumok Ca^{2+} iránti érzékenységét a könnyű miozin láncok foszforilációja útján, a PKC-től függetlenül váltja ki (Andersen és mtsai, 2002).

1.3. A kardiokinek szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában

Egyre több adat szól a mellett, hogy a szívizmot felépítő sejtek közötti kommunikáció (szívizomsejt-szívizomsejt, endothelsejt-szívizomsejt, fibroblaszt-szívizomsejt interakció) fontos szerepet játszik a szív pumpafunkciójának szabályozásában. A szívizomzat sejtjei által szekretált fehérjék alapvető jelentőséggel bírnak ezen parakrin/autokrin szintű regulációban (Westerhof és mtsai, 2006; Kakkar és Lee, 2010). A vázizomból felszabaduló miokinek illetve a

zsírszövet által szecernált adipokinek mintájára, a szív által termelt és szekretált fehérjéket összefoglalóan kardiokineknek nevezték el (Doroudgar és Glembotski, 2011). A kardiokinek számát megközelítőleg hatvanra teszik jelenleg (Stastna és mtsai, 2010). A kardiokinek döntően a GPCR-ok családjához tartozó sejtfelszíni receptorokat aktiválva váltják ki biológiai hatásait. Az emberi szervezetben 367 GPCR található (Vassilatis és mtsai, 2003), ezek közül közelítőleg 200 receptor fejeződik ki a szívben (Salazar és mtsai, 2007). Fontos kiemelni, hogy a GPCR-ok alig több mint felénél azonosították a receptort aktiválni képes endogén ligandot (Levoye és Jockers, 2008), továbbá az ismert kardiokinek töredéke esetén tisztázott a pontos biológiai funkciójuk (Doroudgar és Glembotski, 2011). A jelen disszertációban bemutatott vizsgálatok célja az adrenomedullin, az apelin, az endothelin-1 és a prolaktin-releasing peptid szívizom-kontraktilitásra gyakorolt hatásának tisztázása volt.

1.3.1. Adrenomedullin

Új vasoaktív peptidek után kutatva, 1993-ban Kitamura és munkatársai egy rendkívül erőteljes hipotenzív hatással bíró peptidet izoláltak humán pheocromocytoma kivonatból (Kitamura és mtsai, 1993), melyet adrenomedullinnak (AM) neveztek el. A humán AM 52 aminosavból áll és egy hattagú gyűrű struktúrát tartalmaz. Az AM mérsékelt homológiát mutat a calcitonin gén eredetű peptiddel (CGRP, "*calcitonin gene-related peptide*"), ezért a peptidet a calcitonin/CGRP/amylin családhoz sorolták. Humán és patkány szövetek vizsgálata során jelentős AM expressziót találtak a mellékvese velőállományában, a szívben, a vesében, a tüdőben és a központi idegrendszer számos régiójában. Az egyes szervek AM expressziója szoros korrelációt mutat azok vaszkularizáltságával, mivel az érendothelium sejtei termelik legaktívabban ezt a fehérjét. Az AM mRNS szintekkel párhuzamosan, autoradiográfiás vizsgálatok specifikus AM-kötőhelyek létét igazolták a szervezetben (Ishimitsu és mtsai, 2006). Munkánk kezdetekor azonban nem volt tisztázott, hogy az AM hatásait specifikus AM-receptorok illetve CGRP-receptorok közvetítik-e (Ikeda és mtsai, 1996).

Az AM feltehetőleg szerepet játszik a szisztémás vérnyomás, a regionális véráramlás és a só-víz háztartás szabályozásában (Ishimitsu és mtsai, 2006). *In vivo* eredmények szerint az AM jelentősen emeli a perctérfogatot (Parkes, 1995), felvetve, hogy a perifériás rezisztencia csökkentése mellett a peptid a kamrai kontraktilitást direkt módon is befolyásolhatja. Az AM igen kifejezett kamrai génexpressziója (Sakata és mtsai, 1993), valamint specifikus kötőhelyeinek jelenléte (Owji és mtsai, 1995) egy autokrin/parakrin szintű

szabályozó kör létezésére utal a miokardiumban. Ezzel összhangban, kezdeti adataink szerint az AM dóziszfüggő pozitív inotrop hatást vált ki spontán verő izolált patkányszív-preparátumon (Szokodi és mtsai, 1996). A proAM hasításával keletkező proAM N-terminális 20 peptid (PAMP) potenciálisan szintén rendelkezhet direkt szívhatásokkal, mivel immunoreaktív PAMP (Kitamura és mtsai, 1994) és specifikus PAMP-kötőhelyek (Iwasaki és mtsai, 1996) létét igazolták patkányszívben.

Számos sejttípus mellett az AM szívizomsejtekben is növeli a cAMP-szintet (Ikeda és mtsai, 1996), felvetve az adenilátcikláz–cAMP–PKA jelpálya szerepét az AM pozitív inotrop hatásának a közvetítésében. Mindazonáltal, az AM inotrop hatásáért felelős jelátviteli mechanizmusok feltárása várat magára. Az AM potenciális kórtani szerepére utal, hogy a peptid plazmaszintje magasabb szívelégtelen betegekben (Jougasaki és mtsai, 1995; Jougasaki és mtsai, 1996). Immunhisztokémiai vizsgálatok szerint fokozott AM szintézis jellemzi az elégtelen funkciójú humán kamrai izomzatot (Jougasaki és mtsai, 1995), valamint a miokardium által szekretált AM hozzájárul az emelkedett plazmakoncentrációhoz szívelégtelenségben (Jougasaki és mtsai, 1996). Továbbá, a szívhipertrofia egyes állatmodelljeiben is erőteljesebb kamrai AM termelődést figyeltek meg (Shimokubo és mtsai, 1996). Azonban az AM bal kamrai expresszióját szabályozó mechanizmusok, illetve az aktiváció időbelisége munkánk kezdetekor nem volt ismert.

1.3.2. Apelin

Az APJ-receptort, az egyik legrégebbi árwareceptort, 1993-ban azonosították. A receptor az angiotenzin II (Ang II) 1-es típusú receptorának (AT₁-receptor) transzmembrán régiójával mutat hasonlóságot, azonban az Ang II nem kötődik hozzá (O'Dowd és mtsai, 1993). Tatemoto és munkatársai 1998-ban izoláltak marha gyomor kivonatból egy endogén peptidet, mely specifikusan kötődik az APJ-receptorhoz (Tatemoto és mtsai, 1998). A peptidet apelinnek nevezték el (APJ endogén ligand). Számos, 12 és 36 aminosav közötti fragmentumot találtak (apelin-12, apelin-13, apelin-17, apelin-36), melyek biológiailag aktívak (Tatemoto és mtsai, 1998). Az apelin és az APJ-receptor expressziója széleskörűen kimutatható a központi idegrendszerben, a vesékben, a hasnyálmirigyben, a zsírszövetben és az erek endotheliumában. A felfedezése óta eltelt időben kimutatták, hogy az apelin relaxálja az ereket, fokozza a diurézist, csökkenti a táplálékfelvételt, jótékonyan befolyásolja a cukor- és zsírsanyagcserét, antinociceptív illetve immunmodulátor effektussal bír (Barnes és mtsai, 2010). Az apelin prekursora, továbbá maga az APJ-receptor is jelentős mennyiségben fejeződik ki a szívben (O'Carroll és mtsai, 2000), ami arra utal, hogy a peptid autokrin/parakrin

módon befolyásolhatja a szív működését, azonban munkánk kezdetekor ismeretlen volt az apelin-APJ rendszer funkcionális jelentősége a miokardiumban. Továbbá, feltárára várt, hogy az apelin és az APJ-receptor expressziója miként változik a szívizomban patofiziológias viszonyok között.

1.3.3. Prolaktin-releasing peptid

A 31 illetve 20 aminosavból álló prolaktin-releasing peptidet (PrRP) 1998-ban izolálták marha hipotalamusz extraktumból, mint a hGR3/GPR10 árvareceptor potenciális ligandját (Hinuma és mtsai, 1998). Habár a peptidet eredetileg, mint a hipofízis elülső lebenyéből történő prolaktin szekréció lehetséges regulátorát azonosították, további vizsgálatok nem támasztották alá azt az elképzelést, hogy a PrRP klasszikus hipofiziotrop hormonként hatna. Mára bizonyossá vált, hogy a PrRP sokrétű biológiai hatással bír, többek közt befolyásolja a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely működését, a táplálékfelvételt, valamint a fájdalomérzést (Sun és mtsai, 2005; Onaka és mtsai, 2010). Felvetették továbbá, hogy a PrRP részt vehet a vérnyomás centrális szabályozásában (Samson és mtsai, 2000; Horiuchi és mtsai, 2002). A peptid centrális hatásaitól eltérően, nem ismert, hogy a PrRP perifériás kardiovaszkuláris hatásokkal is rendelkezik-e. Számos perifériás patkány szövetben sikerült specifikus PrRP kötőhelyek létét kimutatni, melyek közül a szívben észlelték a legmagasabb fokú kötődést (Sato és mtsai, 2000). Ezen megfigyelések felvetik, hogy a peptid direkt módon is hathat a szív működésére.

1.3.4. Endothelin-1

Yanagisawa és munkatársai 1988-ban izoláltak egy rendkívül erőteljes érszűkítő hatású peptidet sertés endothelsejt-kultúra felülszójából, melyet endothelinnek neveztek el. Az endothelin-1 (ET-1) 21 aminosavból áll és 2 intramolekuláris diszulfid hidat tartalmaz (Yanagisawa és mtsai, 1988). A szívben számos sejttípus, mint az endothelsejtek, vaszkuláris simaizomsejtek, szívizomsejtek és fibroblasztok, szekretálják a peptidet. Az ET-1 hatásait két GPCR, az ET_A- és az ET_B-receptorok közvetítik. Szívizomsejtek mindkét receptor altípust expresszálják, az ET_A-receptorok jelentős dominanciája mellett (85–90%). A peptid sokrétű biológiai effektussal rendelkezik a szívben. Az értónus szabályozásán túl, az ET-1 hatással van a szívizomsejtek növekedési folyamataira, a fibroblasztok proliferációjára, illetve a sejtek túlélésére (Kohan és mtsai, 2011). Továbbá, az ET-1 a szívizom-kontraktilitás erőteljes stimulátora (Sugden, 2003; Endoh, 2008). Számos adat utal arra, hogy az ET-1 inotrop hatását az ET_A-receptorok közvetítik, ugyanakkor az ET_B-receptorok szerepe nem tisztázott. Az ET-1 pozitív inotrop hatása hasonlóságot

mutat az α_1 -AR-ok effektusával: elsősorban a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége nő, az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek mérsékelten fokozódnak csupán (Yang és mtsai, 1999). Az ET-1 inotrop effektusát közvetítő pontos szubcelluláris mechanizmusok feltárára várnak. Az uralkodó nézet szerint, az ET_A -receptor a $\text{G}_{q/11}$ -fehérjén keresztül aktiválja a PLC–PKC kaszkádot. Az ET-1 pozitív inotrop hatásáért döntően a Na^+/H^+ cseremechanizmus (NHE, “ Na^+/H^+ exchanger”) PKC-függő aktivációja felelős. A fokozott NHE aktivitás egyrészt intracelluláris alkalizációhoz vezetve növelheti a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységét. Másrészt, intracelluláris Na^+ akkumuláció jöhet létre, mely indirekt módon fokozhatja a NCX fordított irányú működését (Na^+ ki, Ca^{2+} be), és így hozzájárulhat a sejtekbe történő megnövekedett Ca^{2+} beáramláshoz. A NCX mellett, az ET-1 az L-típusú Ca^{2+} -csatornák nyitása révén is elősegítheti az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek növekedését (Sugden, 2003).

Szívizomsejtekben az ET-1, a PLC–PKC kaszkád mellett, potens aktivátora a mitogén által aktivált proteinkinázoknak (MAPK-ok). Felvetették, hogy a MAPK-ok családjába tartozó extracelluláris jelek által regulált kinázok (ERK1 és ERK2, továbbiakban ERK1/2) és a p38-MAPK ellentétes szerepet játszik a szívhipertrófia és a szívelégtelenség kialakulásában (Rose és mtsai, 2010). A patológiás viszonyoktól eltérően, keveset tudunk a MAPK-ok fiziológiás szerepéről a szívben. A p38-MAPK aktivitás tartós fokozódása a kontrakciós erő csökkenéséhez vezet patkány izolált szívizomsejteken (Liao és mtsai, 2002). Ugyanakkor a p38-MAPK akut aktivációjának jelentősége a szív működés regulációjában tisztázásra vár. Továbbá, nem ismert, hogy az ERK1/2 direkt képes-e befolyásolni a szívizom kontraktilis állapotát intakt szíven.

Egymásnak ellentmondó eredmények születtek a miokardiumban termelődő nitrogén-monoxid (NO) szerepéről a szívizom-kontraktilitás szabályozásában. A NO-szintetáz (NOS) két izoformája, a neuronális típusú NOS (nNOS, NOS1) és az endothelialis típusú NOS (eNOS, NOS3), folyamatosan, alacsony szinten termeli az NO-t Ca^{2+} /kalmódulin-dependens módon a szívben. A harmadik izoforma, az indukálható NOS (iNOS, NOS2), kizárólag patofiziológiás viszonyok között (iszkémiás-reperfúziós károsodás, szívelégtelenség) expresszálódik. Számos tanulmány szerint, fiziológiás körülmények mellett az NO jelentősen gyengíti a β -AR inotrop választ *in vitro* és *in vivo*. Ugyanakkor más vizsgálatok szerint a NOS farmakológiai illetve genetikai inaktivációja nem fokozza a β -AR inotrop effektust (Ziolo és mtsai, 2008; Zhang és Casadei, 2011). Tisztázásra vár, hogy az ET-1 inotrop effektusát az NO képes-e módosítani.

A reaktív oxigén származékok (ROS, “*reactive oxygen species*”) termelődése jelentékenyen fokozódik a miokardiumban patofiziológiás állapotokban.

Az oxidatív stressz feltehetőleg hozzájárul a szívhipertrófia, az apoptózis és a nekrozis, valamint az intersticiális fibrózis kialakulásához, melyek összességében a szív pumpafunkciójának zavarához vezetnek (Giordano, 2005). A fokozott ROS produkció közvetlenül is ronthatja a kontraktilitást. A szabadgyök molekulák csökkenthetik a SERCA és az L-típusú Ca^{2+} -csatornák működését (Zima és Blatter, 2006). Továbbá, a kontraktilis fehérjék direkt oxidatív módosulása az erőgenerálás illetve a Ca^{2+} -érzékenység csökkenéséhez vezethet (Sumandea és Steinberg 2011). Kóros állapotoktól eltérően, a ROS fiziológiás szerepéről a szívizomban kevés adattal rendelkezünk. A közelmúltban mutatták ki, hogy szoros kapcsolat áll fenn a kontraktilitás, az oxidatív metabolizmus és a ROS termelődés között. Az összehúzódások frekvenciájának növelésekor szimultán fokozódott a szívizomsejtek oxigénfogyasztása és a ROS produkció (Heinzel és mtsai, 2006; Saitoh és mtsai, 2006). Feltárára vár, hogy a ROS termelődés fiziológiás viszonyok között miként befolyásolja a kontraktilitást intakt szíven.

Kísérletek serege bizonyítja, hogy az exogén ET-1 erőteljesen képes fokozni a szívizom-összehúzódások erejét (Endoh, 2008), ugyanakkor az endogén ET-1 szerepe a kontraktilitás regulációjában kevésbé ismert. A koronáriák perfúziós nyomásának növekedése esetén fokozódik a szívizom kontraktilitása és oxigénfogyasztása, melyet Gregg-effektusnak neveznek (Gregg, 1963). A Gregg-effektusért feltehetőleg a kapillárisok szintjén jelentkező térfogatváltozás felelős (Westerhof és mtsai, 2006). Nyitott kérdés, hogy a fokozott nyírófeszültség hatására az endotheliumból esetlegesen felszabaduló faktorok, mint az ET-1, szerepet játszanak-e a Gregg-effektus kialakításában. Ismert, hogy feszítés hatására hipertrofizálnak a szívizomsejtek (Kehat és Molkentin, 2010). A hipertrófiás válasz megértésében mérföldkőnek számított a felismerés, hogy a mechanikai ingerre növekedési faktorok (Ang II, ET-1) szabadulnak fel a kardiomiocitákból, melyek a receptoraikat aktiválva autokrin/parakrin módon indítják el a hipertrófiás folyamatot (Sadoshima és Izumo, 1997). Ezzel ellentétben nem ismert, hogy a lokálisan szekretált kardiokinek képesek-e befolyásolni a szívizom akut feszítésekor jelentkező Frank-Starling-választ.

2. Célkitűzések

1. Az adrenomedullin pozitív inotrop hatásának vizsgálata.

(i) Karakterizálni kívántuk az AM inotrop effektusát összevetve az ET-1 és a β -AR stimuláció hatásával. (ii) Vizsgáltuk az AM által kiváltott hatás specificitását. (iii) Tanulmányoztuk, hogy az AM overexpresszió miként hat a balkamra-funkcióra. (iv) Jellemeztük az AM inotrop hatását közvetítő intracelluláris jelátviteli mechanizmusokat. (v) Tanulmányoztuk a nyomásterhelés hatását az AM bal kamrai génexpressziójára.

2. Az apelin potenciális szívhatásainak vizsgálata.

(i) Célul tűztük ki az APJ-receptor lokalizációjának meghatározását szívizomsejteken. (ii) Karakterizálni kívántuk az apelin inotrop hatását izolált intakt szíven és izolált szívizomsejteken. (iii) Tanulmányoztuk az apelin hatását a Frank-Starling-válaszra. (iv) Vizsgáltuk az apelin inotrop hatásának specificitását. (v) Jellemeztük az apelin inotrop hatását közvetítő intracelluláris jelátviteli mechanizmusokat. (vi) Tanulmányoztuk az apelin hatását a sejtek közötti kommunikációra. (vii) Vizsgáltuk az apelin és APJ-receptor génexpressziójának változását mechanikai feszítés illetve nyomásterhelés hatására.

3. A prolaktin-releasing peptid potenciális szívhatásainak vizsgálata.

(i) Karakterizálni kívántuk a PrRP inotrop hatását izolált szíven. (ii) Jellemeztük a PrRP pozitív inotrop hatását közvetítő intracelluláris jelátviteli mechanizmusokat.

4. Az endothelin-1 pozitív inotrop hatásának vizsgálata.

(i) Vizsgálni kívántuk az ET_A- és az ET_B-receptorok szerepét az ET-1 inotrop hatásának közvetítésében. (ii) Karakterizáltuk az ET-1 inotrop hatását közvetítő intracelluláris jelátviteli mechanizmusokat. (iii) Tanulmányoztuk, hogy az endogén NO produkció miként hat az ET-1 inotrop effektusára. (iv) Fel kívántuk deríteni, hogy az endogén ROS termelődés képes-e befolyásolni az ET-1 inotrop hatását. (v) Vizsgáltuk az endogén ET-1 szerepét a Gregg-effektus közvetítésében. (vi) Meg kívántuk határozni az endogén ET-1 szerepét a Frank-Starling-válasz szabályozásában.

3. Módszerek

(A római számok a Tézisek alapjául szolgáló közlemények sorszámát jelölik. A közlemények listája a 8.1. fejezetben található.)

3.1. Kísérleti modellek

3.1.1. Kísérleti állatok

Vizsgálatainkat Sprague-Dawley (SD) (**I-VII, IX-XI, XIII-XVI**), spontán hipertenzív (SHR) (**II**), Wistar-Kyoto (WKY) (**II**), transzgénikus (mREN-2)27 (TGR(mREN-2)27) (**V**), és dupla transzgénikus (dTG) hím patkányokon végeztük (**II, XVI**). További kísérleteinkhez hím NMRI illetve C57 egereket használtunk (**VIII, XII**).

3.1.2. Direkt miokardiális géntranszfer *in vivo*

A patkány AM-t kódoló gént egy adenovírus vektorhoz kötötten (Ad5RSVrAM) injektáltuk SD patkányok szabad bal kamrai falába. Negatív kontrollként az Escherichia coli β -galaktozidáz (LacZ) génjének (Ad5RSVLacZ) befecskendezése szolgált (**IV**).

3.1.3. Bal kamrai nyomásterhelés modelljei

Akut, szubakut és tartós nyomásterhelés hatását vizsgáltuk a kardiomiokinek bal kamrai génexpressziójára. Akut nyomásterhelést arginin-vazopresszin (AVP) infúzió (0.05 μ g/kg/perc, i.v.) segítségével hoztunk létre 15 perc és 4 óra közötti időtartamra krónikusan kanulált, éber patkányokban (**V, VI**). Szubakut és tartós nyomásterhelést Ang II-vel váltottunk ki. Az Ang II-t (0.5 illetve 2.5 μ g/kg/perc) 12 órán illetve 1 héten keresztül infundáltuk szubkután beültetett ozmotikus minipumpák segítségével (**VII, IX**). A kontroll állatok a vivőanyag (0.9% NaCl, i.v.) infúzióját kapták. Nyomásterhelés krónikus modelljeiként hipertenzív transzgénikus TGR(mREN-2)27, dTG és SHR törzseket használtunk megfelelő kontrollok mellett (**II, V, XVI**).

3.1.4. Szívizomsejtek ciklikus mechanikus feszítése

In vitro modellen vizsgáltuk a tartós mechanikus feszítés hatását egyes kardiokinek expressziójára. Kamrai szívizomsejteket neonatális SD patkányokból nyertük standard enzimatikus emésztés módszerével. A sejteket Flexercell Strain Unit segítségével tettük ki mechanikus feszítésnek 1 és 24 óra közötti időtartamra (**II**).

3.1.5. Felnőtt kamrai szívizomsejtek izolációja

SD patkányokból nyertünk izolált kamrai szívizomsejteket standard enzimatisuk emésztéssel (II, X). Továbbá, posztinfarktusos szívelégtelenségben szenvedő SD patkányok bal kamrájának életképes területéből izoláltunk szívizomsejteket (X).

3.2. Vizsgálati módszerek

3.2.1. Hemodinamikai mérések *in vivo*

Az akut nyomásterhelés fokát a vérnyomás direkt módon történő mérésével követtük (V, VI). A szubakut és tartós nyomásterhelés esetén a vérnyomást telemetriás úton monitoroztuk (IX). A balkamra-funkciót transztorakális echokardiográfia segítségével vizsgáltuk (IV, IX, X).

3.2.2. Balkamra-funkció vizsgálata *ex vivo*

3.2.2.1. Balkamra-funkció vizsgálata izolált patkányszív-preparátumon

SD és dTG patkányok szívét Langendorff-szerint retrográd perfundáltuk, állandó áramlás mellett, módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferrel 37°C-on. Kísérleteinkben a kamrai kontraktilitás *ex vivo* megítélésére két módszert használtunk. A kontraktilis erő (kialakult izomerő, “*developed tension*”) változását a szív apikobazális elmozdulása révén követtük, a bal kamra csúcsához kapcsolt auxotóniás erőmérő segítségével (I-III, XI, XIII-XV). További vizsgálataink során egy folyadékkal töltött ballont helyeztünk a bal kamrába, és az izovolémiás összehúzódások változását követtük (II, IV, XVI). A szívek stabilizációját követően az egyes peptideket önmagukban illetve különböző receptor-blokkolók és jelátvivők gátlószerei jelenlétében adagoltuk. A kontroll kísérletekben az alkalmazott hatóanyagok vivőanyagát infundáltuk. A Frank-Starling-mechanizmust vizsgálándó, a stabilizációt követően lépcsőzetesen növeltük az intraventrikuláris ballon térfogatát míg el nem értük a maximális pulzusnyomást.

3.2.2.2. Balkamra-funkció vizsgálata izolált egérszív-preparátumon

Az egérszívek izolálásának menete és a Langendorff-szerinti retrográd perfúziója a patkányoknál ismertetett módon zajlott (3.2.2.1. fejezet) kisebb módosításokkal. A Gregg-effektus vizsgálata céljából, a bazális koronáriaáramlást 2.5-szeresére emeltük (VIII, XII).

3.2.3. Kontraktilitás vizsgálata izolált szívizomsejteken *in vitro*

Az izolált szívizomsejteket módosított Krebs-Henseleit pufferrel áramoltattuk 37°C-on 1 Hz-es stimuláció mellett. A kamrai szívizomsejtek mozgását digitalizáltuk és a szarkomerhossz (SL, “*sarcomere length*”) rövidülését Fourier analízis segítségével határoztuk meg (X).

3.2.4. Elektrofiziológiai vizsgálatok

Izolált pitvari preparátumon végeztünk intracelluláris akciós potenciál méréseket (III). A feszültség-aktiválta Ca^{2+} -áramot amfotericin B-perforált patch-clamp technika teljes-sejtes (“*whole-cell*”) konfigurációjában tanulmányoztuk izolált, felnőtt, kamrai szívizomsejteken (II). Az akciós potenciál sejtek közötti terjedési tulajdonságait neonatális patkány eredetű szívizomsejtek egyrétegű tenyészetén vizsgáltuk multielektród-array segítségével (X).

3.2.5. Fluoreszcens vizsgálati módszerek

Az izolált kamrai szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjának változását indo-1-AM illetve fluo-4-AM fluoreszcens indikátorok segítségével vizsgáltuk konfokális invertáló mikroszkóppal (X). Az intracelluláris pH-t karboxi-SNARF-1-AM fluoreszcens indikátorral követtük Tyrode-oldat használata mellett. A NHE aktivitását az NH_4Cl “prepulse” módszerrel vizsgáltuk (X). A ROS termelődés mértékét az etidium fluoreszcencia mérésével ítéltük meg konfokális mikroszkópia segítségével izolált patkányszív-preparátumból származó metszeteken (XV).

3.2.6. RNS meghatározási módszerek

A bal kamrai mintákban az mRNS expressziót Northern-blot analízis és kvantitatív valósidejű RT-PCR (TaqMan) technika segítségével vizsgáltuk (II, IV-IX, XVI).

3.2.7. Fehérje meghatározási módszerek

A kardiokinek bal kamrai immunoreaktív szintjét illetve egyes jelátvivők szintjét specifikus radioimmunoassay-k (RIA) segítségével határoztuk meg (III, V, VI, XVI). A jelátviteli fehérjék expressziójának illetve foszforilációs szintjének kimutatására Western-blot technikát alkalmaztunk (IV, XI, XIII, XV). Kinázok aktivitását specifikus kináz assay-k segítségével határoztuk meg (XIII). Egyes fehérjék elhelyezkedését immuncitokémia illetve immunhisztokémia révén vizsgáltuk konfokális mikroszkópiával (X).

3.2.8. Statisztikai elemzés

A kísérleti eredményeket átlag $\pm$ mintaközép hibája (*“standard error of mean”, S.E.M.*) formában mutatjuk be. Az adatokat az adott kísérleti elrendezésnek legmegfelelőbb statisztikai próbákkal (Student-féle t-próba, 1-utas ANOVA-t követő post hoc teszt, 2-utas ismétlődő ANOVA-t követő post hoc teszt) elemeztük SPSS program segítségével. Az átlagok közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a statisztikai próba során kapott P érték kisebb volt 0.05-nél.

4. Eredmények és megbeszélés

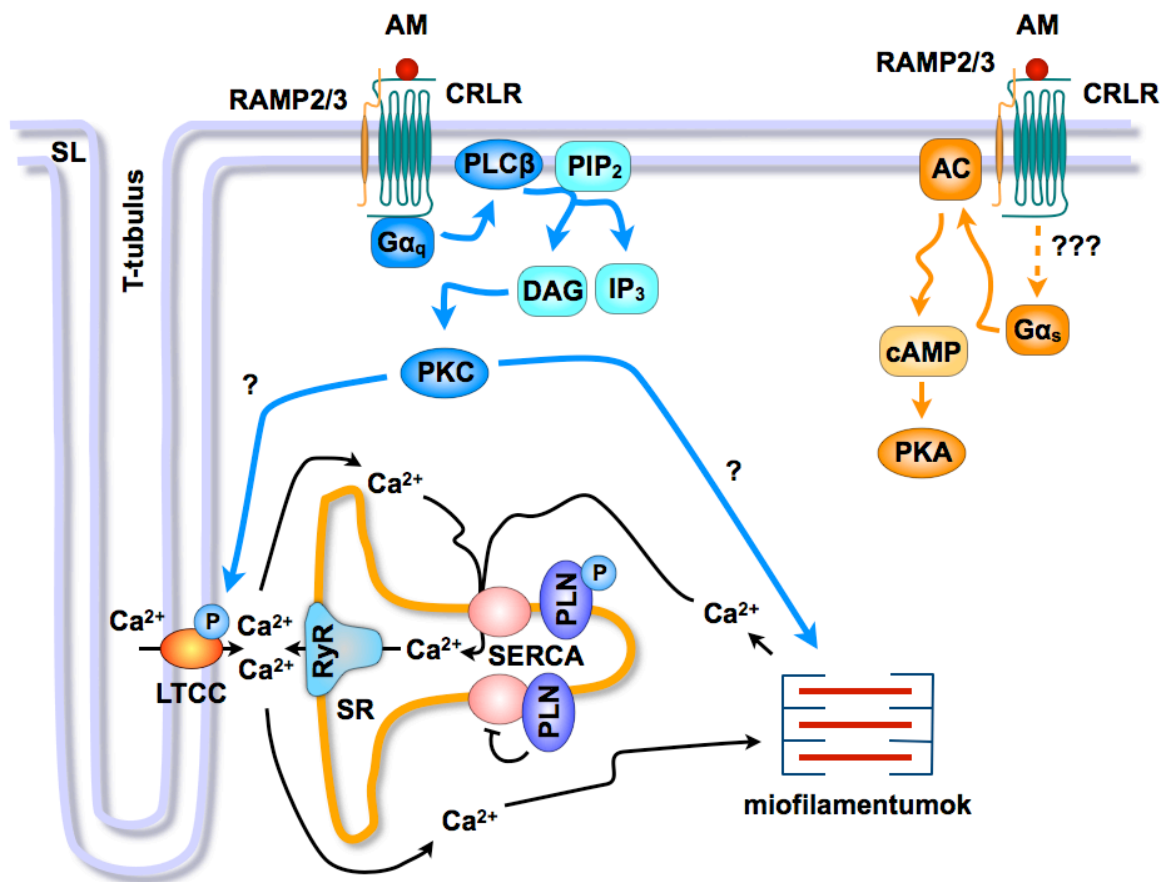
4.1. Az adrenomedullin szerepe szívizom-kontraktilitás regulációjában

(i) Megelőző eredményeink szerint az AM (0.03-1 nmol/L) dóziszfüggő módon fokozta a kamrai kontraktilitást spontán verő izolált patkányszíven (Szokodi és mtsai, 1996). Korábbi vizsgálatok feltárták, hogy az ET-1 a legpotensebb pozitív inotrop anyag izolált szívizomsejteken (Kelly és mtsai, 1990). Abból a célból, hogy megítélhessük az AM effektusának erősségét, összehasonlítottuk a két peptid pozitív inotrop hatását izolált patkányszív-preparátumon pitvari elektromos ingerlés mellett. Az AM és az ET-1 1 nmol/L-es koncentráció mellett jelentkező csúcshatása megegyezett. Továbbá, az AM 0.03 nmol/L dózis esetén azonos hatást hozott létre, mint az ET-1 0.08 nmol/L-es koncentrációnál (I). Kiemelendő, hogy az AM kontraktilitást fokozó hatása 64%-a volt a maximális β -AR stimulációval (izoproterenol, 10 μ mol/L) kiváltható válasznak. Az AM hatása extrém lassan fejlődött ki, a maximális effektus 25 perc után jelentkezett, szemben a kontrakciós erő β -AR stimulációkor bekövetkező rendkívül gyors, másodperceken belüli fokozódásával (II). Eredményeink arra utalnak, hogy az AM egyike a természetben előforduló legpotensebb endogén pozitív inotrop szubsztanciáknak. Továbbá, az effektus kifejlődésének lassú dinamikája felveti, hogy az AM, a rövid távú β -AR szabályozástól eltérően, hosszú távon képes befolyásolni a kamrai kontraktilitást (I-III).

(ii) Az AM inotrop hatásának specificitását vizsgálva megmutattuk, hogy a CGRP-receptor-antagonista CGRP[8-37] nem befolyásolja a peptid effektusát, valamint a CGRP (1-10 nmol/L) önmagában nem hat a kamrai kontraktilitásra. Továbbá kimutattuk, hogy a PAMP (10-100 nmol/L) nem képes érdemi inotrop hatást kiváltani. Eredményeink arra utalnak, hogy az AM inotrop effektusának közvetítésében CGRP- és PAMP-kötőhelyek nem vesznek részt (III).

(iii) Direkt miokardiális géntranszfer segítségével vizsgáltuk, hogy az AM bal kamrai expressziójának mesterséges növelése miként hat a szív kontraktilis állapotára. *In vivo* körülmények között az AM géntranszfer szignifikánsan javította a SD patkányok bal kamrai szisztolés funkcióját, növelte a frakcionális rövidülést és az ejekciós frakciót. Továbbá, izolált patkányszív-preparátumon az AM fokozott kifejeződése felerősítette a Frank-Starling-választ. A bal kamrai végdiasztolés nyomás emelésekor a kontraktilitás indexei (dp/dt_{max} , pulzusnyomás) szignifikánsan magasabbnak adódtak az Ad5RSVrAM csoportban az Ad5RSVLacZ csoporthoz képest. Ezzel szemben, a diasztolés funkciót jellemző paraméterek (dp/dt_{min} , τ) nem mutattak különbséget a két csoport között (IV).

(iv) Kísérleteinkben részletesen jellemeztük az AM pozitív inotrop hatását közvetítő intracelluláris mechanizmusokat. Megállapítottuk, hogy a peptid számos hatásától eltérően, az AM inotrop effektusa a klasszikus adenilátcikláz–cAMP–PKA jelátviteli úttól függetlenül alakul ki. Izolált patkányszív-preparátumon az AM nem fokozta a bal kamrai cAMP termelést, valamint a PKA gátlása nem volt képes kivédeni a peptid pozitív inotrop hatását (III) (1. ábra).



1. ábra: Az AM pozitív inotrop hatását közvetítő feltételezett mechanizmusok.

Eredményeink alapján a cAMP–PKA jelátviteli úttól függetlenül alakul ki az AM pozitív inotrop effektusa. Az AM hatásában szerepet játszanak az L-típusú Ca^{2+} -csatornák, a SR-ból történő Ca^{2+} -felszabadulás, valamint a PKC aktivációja. AC, adenilátcikláz; CRLR, kalcitoninreceptor-szerű receptor ("calcitonin receptor-like receptor"); DAG, diacilglicerol; IP_3 , inozitol-1,4,5-triszfózfát; LTCC, L-típusú Ca^{2+} -csatorna; PIP_2 , foszfátidilinozitol-4,5-biszfózfát; PKA, proteinkináz-A; PKC, proteinkináz-C; PLC, foszfolipáz-C; PLN, foszfolamban; RAMP, receptor aktivitást módosító fehérje ("receptor activity modifying protein"); RyR, rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatorna; SERCA, SR Ca^{2+} -ATPáz; SR, szarkoplazmatikus retikulum. (III, IV, XVII, XIX alapján)

Intakt szíven és izolált pitvari preparátumon nyert eredményeink szerint az AM az L-típusú Ca^{2+} -csatornákon keresztül fokozza az extracelluláris Ca^{2+} -beáramlást és serkenti a SR-ból történő Ca^{2+} -felszabadulást (III). Kimutattuk, hogy az AM bal kamrai overexpressziója fokozza a PKC ϵ és a PKC δ izoformák transzlokációját (IV). E megfigyeléseinkkel összhangban, izolált szívpreparátumon a PKC farmakológiai

gátlása szignifikáns módon csökkentette az exogén AM kontraktilitást fokozó effektusát (III) (1. ábra).

(v) Eredményeink elsőként bizonyították, hogy akut nyomásterhelés hatására az AM bal kamrai génexpressziója korai, tranziens aktivációt mutat SD patkányokban (V). Az AVP infúzió megkezdését követő 2 óra múlva szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az AM mRNS szintjében. Összevetésként, a B-típusú nátriuretikus peptid génexpressziója már 1 óra elteltével fokozódott modellünkben (VI). Ugyanakkor más gének expressziója, mint a pitvari nátriuretikus peptidet kódoló géné, csupán 6-12 óra múlva kezd emelkedni nyomásterhelést követően (VII, VIII, IX), míg a szívhipertrófia kifejlődéséhez minimum 6-7 nap szükséges (IX). További eredményeink arra utalnak, hogy az AM génexpressziójának fokozódása független a lokális Ang II és ET-1 felszabadulásától (VI). Kimutattuk továbbá, hogy TGR(mREN-2)27 patkányokban a tartós nyomásterhelés magasabb bal kamrai immunoreaktív-AM szintet eredményez, azonban ehhez nem társul a génexpresszió fokozódása. SD patkányoktól eltérően, a transzgénikus állatokban AVP infúzióval létrehozott akut nyomásterhelés nem növelte az AM bal kamrai génexpresszióját (V). Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az AM szerepet játszhat a szív adaptációs folyamataiban, mind akut, mind krónikus körülmények között.

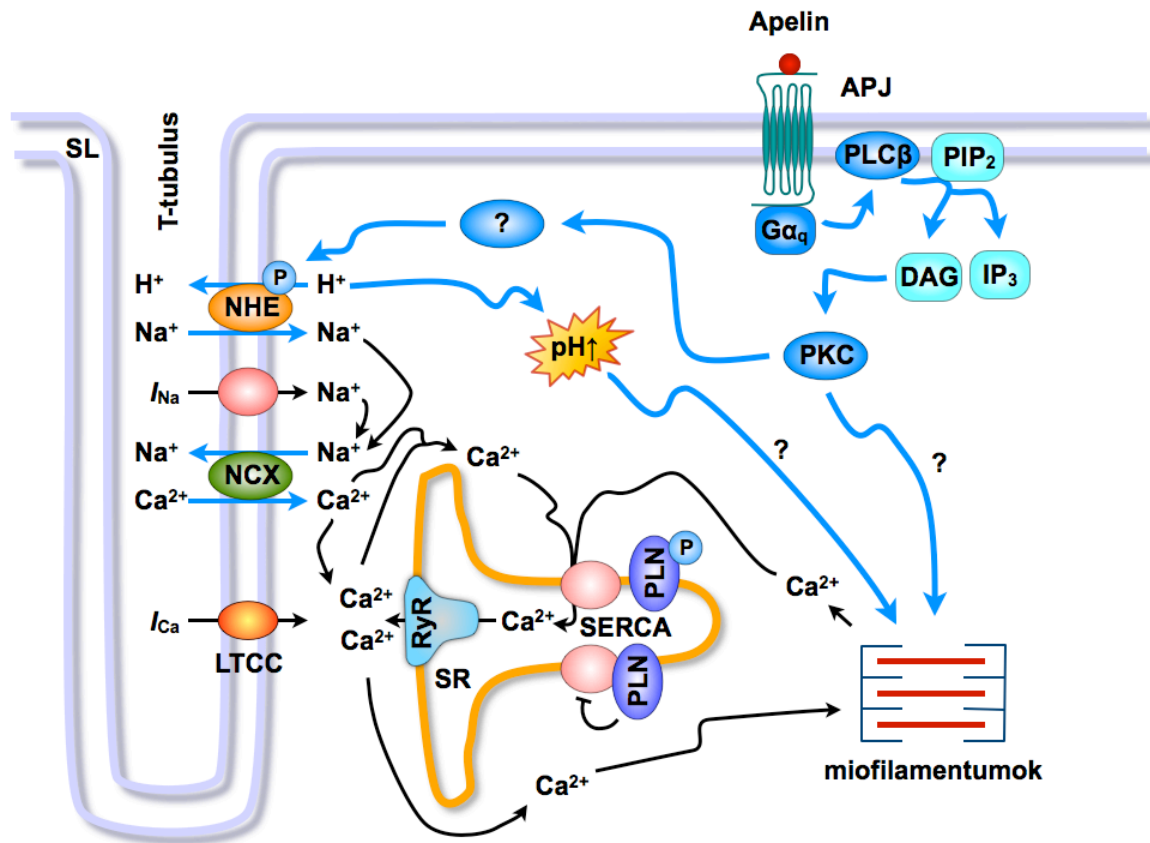
4.2. Apelin szerepe szívizom-kontraktilitás szabályozásában

(i) Vizsgálataink az irodalomban elsőként fedték fel az apelin-APJ rendszer funkcionális jelentőségét a miokardiumban (II). A peptid prekursora és az APJ-receptor magas expresszióval rendelkezik a szívben (O'Carroll és mtsai, 2000). Eredményeink szerint az APJ-receptor a T-tubulusoknak/Z-vonalaknak és az interkaláris lemezeknek megfelelő lokalizációt mutat patkány miokardiumban illetve izolált szívizomsejteken (X). Funkcionális vizsgálataink felderítették, hogy az apelin erőteljesen fokozza a kontrakciós erőt izolált patkányszív-preparátumon. Az apelin (0.01-10 nmol/L) maximális inotrop hatását 1 nmol/L-es dózis mellett észleltük, míg a félmáximális hatás (EC_{50}) 33 pmol/L-nél jelentkezett. A hatás kialakulásának dinamikája az AM és az ET-1 effektusához volt mérhető, szemben a β -AR stimulációt követő azonnali inotrop válasszal. Az apelin, az AM és az ET-1 összevethető módon fokozta a kontrakciós erőt. Az apelin csúcshatása 69%-a volt a β -AR-agonista izoproterenol (10 μ mol/L) maximális inotrop hatásának. Mindezen tények alapján az apelin a legpotensebb endogén pozitív inotrop anyagok közé tartozik (II).

(ii) Funkcionális vizsgálataink bizonyították, hogy az apelin fokozza a Frank-Starling-választ. Izolált patkányszív-preparátumon alacsony bal kamrai előterhelés

mellett (végdiasztolés nyomás=1-5 Hgmm) a $dP/dt_{\max}$ kontraktilitási index hasonlóan alakult apelin (1 nmol/L) jelenlétében illetve hiányában. Megemelt bal kamrai végdiasztolés nyomás mellett (10-15 Hgmm) a $dP/dt_{\max}$ szignifikánsan magasabb volt az apelinnel kezelt csoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezzel szemben, a diasztolés funkciót nem befolyásolta az apelin (II).

(iii) Kimutattuk, hogy az apelin (1-10 nmol/L) patkány eredetű, felnőtt, izolált szívizomsejteken átmenetileg növeli a SL-rövidülést. Megvizsgáltuk továbbá, hogy az apelin miként hat a kontraktilitásra patofiziológiás körülmények között. A bal elülső leszálló koronáriaág lekötésével miokardiális infarktust hoztunk létre, majd 8 héttel később echokardiográfiával igazoltuk a szívelégtelenség kifejlődését (ejekciós frakció $\leq 30\%$). A szívelégtelen állatok bal kamrájának életképes részéből izolált szívizomsejtek SL-rövidülése az egészséges sejtekhez hasonló tranziens növekedést mutatott apelin hatására (X).



2. ábra: Az apelin pozitív inotrop hatását közvetítő feltételezett mechanizmusok.

Az apelin effektusához jelentősen hozzájárul a PLC-PKC kaskád aktivációja, a NHE illetve a NCX fordított irányú fokozott működése. DAG, diacilglicerol; I_{Na} , Na^+ -áram; IP_3 , inozitol-1,4,5-triszfoszfát; LTCC, L-típusú Ca^{2+} -csatorna; NCX, Na^+ - Ca^{2+} -cseremechanizmus; NHE, Na^+ - H^+ -cseremechanizmus; PIP_2 , foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát; PKC, proteinkináz-C; PLC, foszfolipáz-C; PLN, foszfolamban; RyR, rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatorna; SERCA, SR Ca^{2+} -ATPáz; SR, szarkoplazmatikus retikulum. (II, X, XVII alapján)

(iv) A peptid inotrop hatásának specificitását vizsgálva megmutattuk, hogy izolált szíven az apelinre adott válasz kiváltásában az AT_1 -receptorok, az ET_A/ET_B -receptorok, a β -AR-ok, az α -AR-ok illetve az NO nem vesznek részt (II).

(v) Munkánk során részleteiben feltártuk az apelin inotrop hatását közvetítő intracelluláris mechanizmusokat. Intakt szíven kimutattuk, hogy a PLC-PKC kaszkád farmakológiai gátlása $\approx 70\%$ -kal gyengíti az apelin inotrop effektusát. Továbbá, a NHE szelektív gátlása szignifikánsan csökkentette az apelin inotrop válaszát *ex vivo* (II). Ezen eredményekkel összhangban, izolált szívizomsejteken az apelin növelte az intracelluláris pH-t. Továbbá, a NH_4Cl "pre-pulse" módszer segítségével bizonyítottuk, hogy az apelin fokozza a saveltávolítás sebességét a sejtekből, ami a NHE aktivitás növekedésére utal (X). A NHE aktivációja az intracelluláris Na^+ akkumulációjához vezetve indirekt fokozhatja a NCX fordított irányú működését, mely ily módon serkengetheti a sejtekbe történő Ca^{2+} -beáramlást. Eredményeink szerint a NCX fordított irányú működésének farmakológiai gátlása hatékonyan csökkentette az apelin inotrop hatását intakt szíveken (II). Ugyanakkor, izolált szívizomsejteken a peptid nem befolyásolta az intracelluláris Ca^{2+} -tranzienseket (X) illetve az I_{Ca} -ot (II). Mindezek fényében az apelin pozitív inotrop hatásának közvetítésében fontos szerepet játszhat az intracelluláris pH alkalikus irányba történő eltolódása és ezzel összefüggésben a miofilamentumok Ca^{2+} -szenzitivitásának fokozódása. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az apelin miként hat a Ca^{2+} -homeosztázisra intakt szíveken (2. ábra).

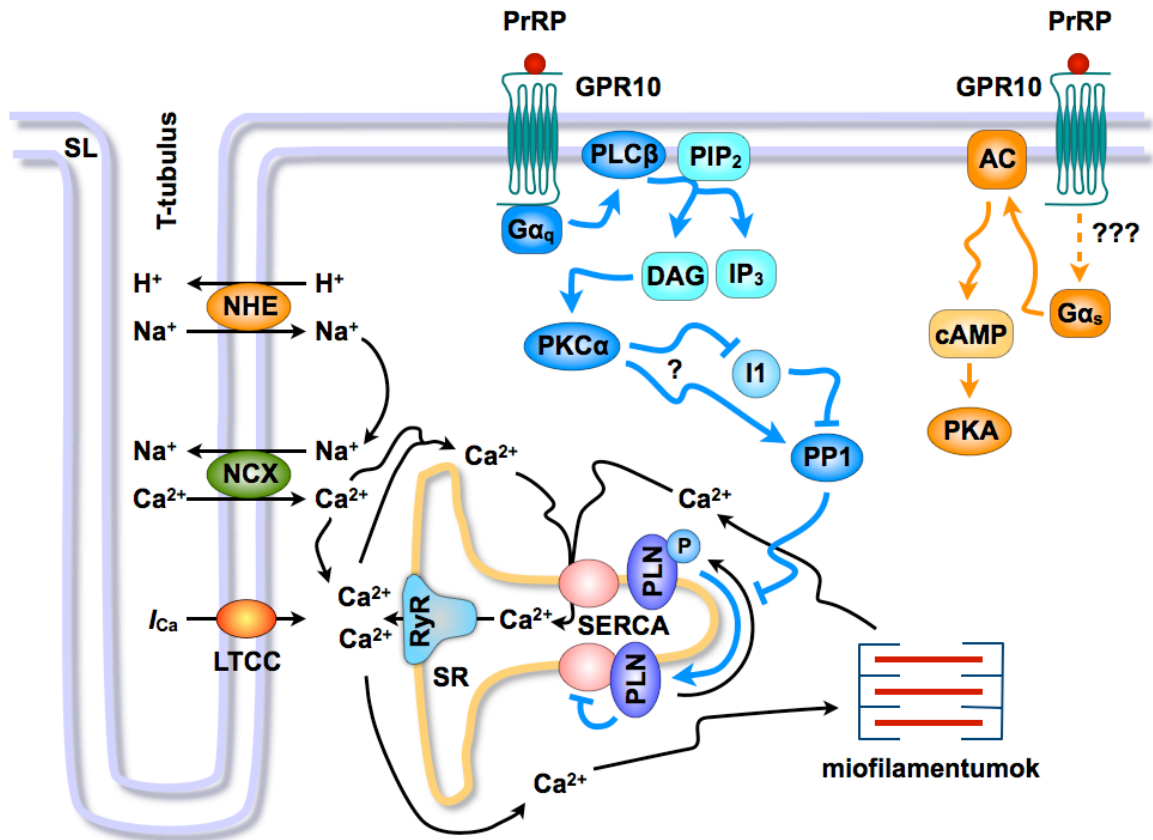
(vi) Multielektrod-array technika segítségével kimutattuk, hogy neonatális patkány szívizomsejtek egyrétegű tenyészetén az apelin fokozza a szívizomsejtek spontán tüzelési frekvenciáját, vezetési sebességét és csökkenti a mezőpotenciál időtartamát. Eredményeink arra utalnak, hogy az apelin képes befolyásolni a sejtek közötti kommunikációt (X).

(vii) *In vitro* és *in vivo* modellek használatával felderítettük, hogy az apelin-APJ rendszer elemeinek expressziója érzékenyen reagál a szívizomsejtek mechanikai túlterhelésére. Neonatális patkány kamrai szívizomsejtek 12-24 óráig tartó ciklikus mechanikai feszítése több, mint 50%-kal csökkentette az apelin mRNS szintjét, míg az APJ-receptor mRNS szintje 30%-kal mérséklődött. Továbbá, krónikus nyomásterhelés állatmodelljeiben, SHR és dTG patkányokban, az apelin bal kamrai génexpressziója 62%-kal illetve 33%-kal adódott alacsonyabbnak a kontrollokhoz viszonyítva, míg az APJ-receptor mRNS szintjében nem találtunk eltérést (II).

4.3. A PrRP szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában

(i) Elsőként mutattuk ki, hogy a PrRP szerepet játszhat a kardiovaszkuláris rendszer perifériás regulációjában. A PrRP-31 (1-100 nmol/L) dózisfüggő pozitív inotrop hatást váltott ki izolált patkányszíven. Az effektus 10 nmol/L-es PrRP dózissnál érte el a maximumát. A PrRP csúcshatása 16.5%-a volt a β -AR-agonista dobutamin (10 μ mol/L) maximális inotrop válaszána (12.9 $\pm$ 1.7% vs. 78.4 $\pm$ 11.9%). A kontraktilitás növekedése lépcsőzetesen alakult ki és a maximális hatás 15 percnél jelentkezett (XI).

(ii) A cAMP-n keresztül ható GPCR-agonisták inotrop hatását jelentősen korlátozzák a cAMP hidrolízisét végző foszfodiészterázok (Fischmeister és mtsai, 2006). Kimutattuk, hogy a foszfodiészterázok gátlása nem fokozza a PrRP inotrop hatását, ami arra enged következtetni, hogy a peptid nem az adenilátcikláz–cAMP–PKA jelpálya aktivációja révén befolyásolja a kontraktilitást (XI) (3. ábra).



3. ábra: A PrRP pozitív inotrop hatását befolyásoló feltételezett mechanizmusok.

A cAMP–PKA jelátviteli úttól független mechanizmusok hozzák létre a PrRP pozitív inotrop effektusát. A PrRP kontraktilitást növelő hatását a PKC α és a PP1 aktivációja ellensúlyozza, feltehetőleg a PLN defoszforilációja révén. AC, adenilátcikláz; DAG, diacilglicerol; I1, inhibitor-1 fehérje; IP₃, inozitol-1,4,5-triszfoszfát; LTCC, L-típusú Ca²⁺-csatorna; PIP₂, foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát; PKA, proteinkináz-A; PKC α , proteinkináz-C α ; PLC, foszfolipáz-C; PLN, foszfolamban; PP1, foszfoprotein-foszfataz-1; NCX, Na⁺-Ca²⁺-cseremechanizmus; NHE, Na⁺-H⁺-cseremechanizmus; RyR, rianodin-szenzitív Ca²⁺-csatorna; SERCA, SR Ca²⁺-ATPáz; SR, szarkoplazmatikus retikulum. (XI alapján)

(iii) Számos tanulmány bizonyította, hogy a PKC α tartós aktivációja negatívan hat a szív pumpafunkciójára (Liu és Molckentin, 2011). Eredményeink szerint a PKC α farmakológiai gátlása szignifikáns mértékben növelte a PrRP pozitív inotrop hatását valamint fokozta a PLN fehérje foszforilációját (**XI**) (3. ábra). A PKC α -hoz hasonlóan, a foszfoprotein-foszfatáz-1 (PP1) inaktivációja felerősítette a PrRP kontraktilitást fokozó hatását (**XI**). Feltételezhető, hogy a PrRP hatásának kialakulása során a PKC α a PP1 közvetítésével szabályozza a PLN foszforilációját (3. ábra). Tágabb kontextusban, a PKC α fontos homeosztatikus szerepet tölthet be a szívben a túlzott inotrop stimuláció ellensúlyozása révén.

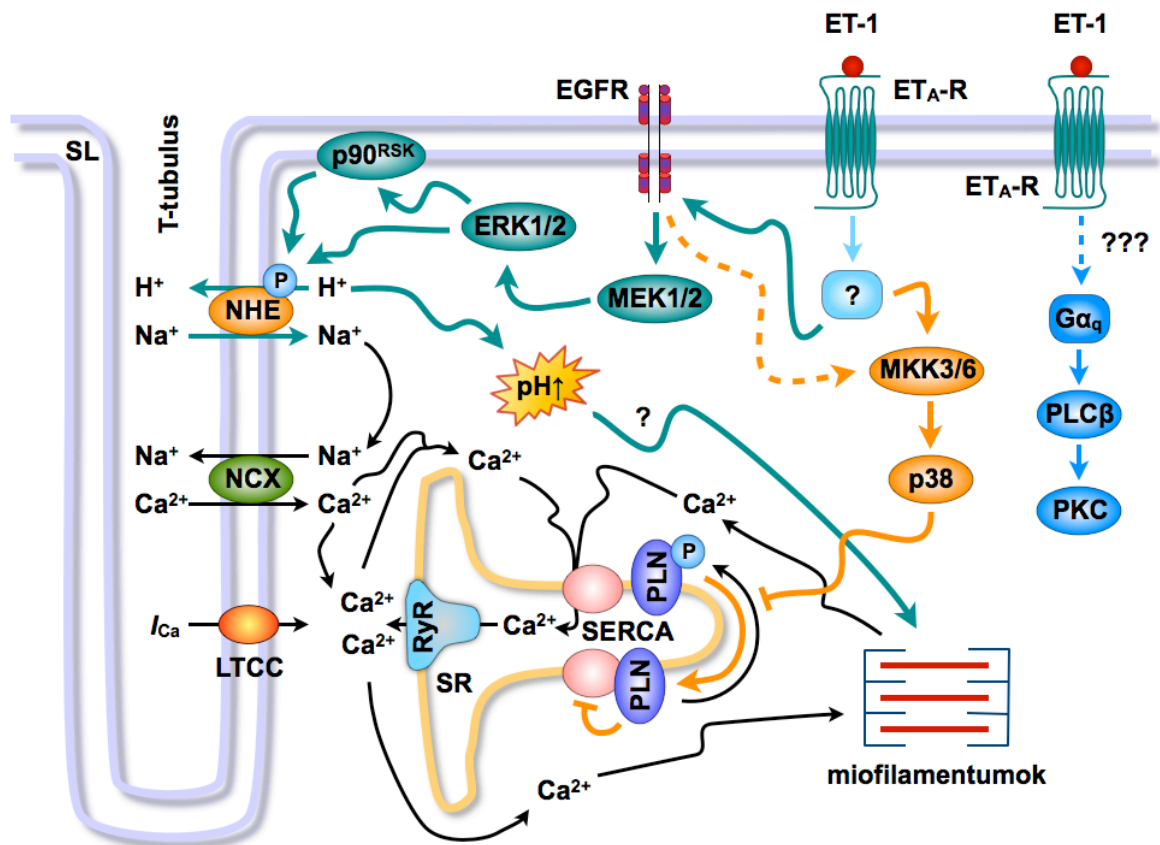
4.4. Az ET-1 szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában

(i) Ellentmondásos eredmények születtek az ET-1 kontraktilitásra kifejtett hatásáról egér eredetű izolált szívizomsejteken. Kimutattuk, hogy intakt egérszíven az ET-1 pozitív inotrop hatást vált ki (**XII**), mely összevethető a patkányszíven nyert adatainkkal (**I**). Továbbá, az ET_A-receptorok gátlása szignifikánsan gyengítette, míg az ET_B-receptorok blokkolása fokozta az ET-1 pozitív inotrop effektusát. Ezen kísérletek elsőként jelezték, hogy az értónus szabályozásához hasonlóan, az ET_A- és az ET_B-receptorok stimulációja ellentétes hatást gyakorol a szívizom kontraktilis erejére (**XII**).

(ii) Vizsgálataink során részletesen karakterizáltuk az ET-1 pozitív inotrop hatását közvetítő intracelluláris mechanizmusokat intakt patkányszív-preparátumon (4. ábra).

- A korábbi tanulmányok alapvető szerepet tulajdonítottak a PLC–PKC jelátviteli rendszernek az ET-1 inotrop hatásában (Sugden, 2003). Ezzel ellentétben kimutattuk, hogy a PLC és a PKC farmakológiai gátlása nem csökkenti az ET-1 inotrop effektusát. Továbbá, a kontraktilitás szempontjából releváns PKC izoformák (PKC α , δ , és ϵ) transzlokációja nem fokozódott a peptid hatására (**XIII**).
- A PLC–PKC jelátviteli útvonallal szemben vizsgálataink a MEK1/2–ERK1/2 kaszkád jelentőségére hívták fel a figyelmet. Kimutattuk, hogy az ET-1 aktiválja az ERK1/2-t, továbbá a MEK1/2 farmakológiai gátlása $\approx 60\%$ -kal csökkenti a peptid pozitív inotrop hatását. Eredményeink szolgáltatták az első bizonyítékot, hogy a MEK1/2–ERK1/2 jelpálya fontos szerepet tölt be a szívizom-kontraktilitás regulációjában intakt szíven (**XIII**).
- Kimutattuk, hogy az ET-1 képes kiváltani az epidermális növekedési faktor-receptor (EGFR) transzaktivációját. Továbbá, az EGFR tirozinkináz gátlása

kivédte az ET-1 által kiváltott EGFR transzaktivációt és ERK1/2 foszforilációt, valamint szignifikánsan gyengítette a peptid pozitív inotrop választ. Elsőként mutattak rá eredményeink, hogy az EGFR transzaktiváció közvetlen szerepet játszik a szívizom kontraktilis erejének szabályozásában a MEK1/2–ERK1/2 jelpálya befolyásolása révén (XIII).



4. ábra: Az ET-1 pozitív inotrop hatását közvetítő feltételezett mechanizmusok.

Eredményeink szerint az ERK1/2 és a p38-MAPK ellentétes szerepet tölt be a kontraktilitás akut szabályozásában. Az ET-1 pozitív inotrop hatását az EGFR–MEK1/2–ERK1/2–p90RSK–NHE1 jelpálya közvetíti. Ezzel szemben, a p38-MAPK szimultán aktivációja ellensúlyozni képes a kontrakciós erő növekedését a PLN defoszforilációja révén. A tradicionális felfogással szemben, a PLC–PKC jelátviteli útvonal nem játszik szerepet a peptid kontraktilitást fokozó effektusában. EGFR, epidermális növekedési faktor-receptor; ERK1/2, extracelluláris jelek által regulált kináz 1/2; LTCC, L-típusú Ca²⁺-csatorna; MEK1/2, MAPK-kináz 1/2; MKK3/6, MAPK-kináz 3/6; NCX, Na⁺–Ca²⁺-cseremechanizmus; NHE, Na⁺–H⁺-cseremechanizmus; p38, p38-MAPK; p90RSK, p90 riboszómális S6-kináz; PKC, proteinkináz-C; PLCβ, foszfolipáz-Cβ; PLN, foszfolamban; RyR, rianodin-szenzitív Ca²⁺-csatorna; SERCA, SR Ca²⁺-ATPáz; SR, szarkoplazmatikus retikulum. (XIII, XVIII alapján)

- Korábbi tanulmányokkal összhangban, a NHE1 gátlása csökkentette az ET-1 inotrop hatását. Ismert, hogy szívizomsejtekben az ERK1/2 és az egyik általa aktivált enzim, a p90 riboszómális S6-kináz (p90RSK), képes foszforilálni és aktiválni ET-1 hatására a NHE1-t (Moor és Fliegel, 1999). Vizsgálataink során az ET-1 fokozta a foszforilált p90RSK mennyiségét a membránfrakcióban. Kiemelendő, hogy az ET-1 hatását a p90RSK foszforilációjára az EGFR

valamint a MEK1/2 gátlása hasonló mértékben csökkentette. Mindezek fényében valószínűsíthető, hogy ET-1 stimuláció során az EGFR–MEK1/2–ERK1/2 jelátviteli rendszer a p90RSK révén szabályozza a NHE1 működését (XIII).

- Kimutattuk, hogy az ET-1 stimuláció szignifikánsan növeli a p38-MAPK aktivitását izolált szíven. Továbbá, a p38-MAPK gátlása erőteljesen fokozta az ET-1 inotrop effektusát. Adataink arra utalnak, hogy a p38-MAPK fiziológias aktivációja ellensúlyozni képes az ET-1 pozitív inotrop hatását a miokardiumban (XIII).
- Korábban a p38-MAPK-ról feltételezték, hogy a foszoprotein-foszfatazok révén képes elnyomni az ERK1/2 aktivációját izolált szívizomsejteken (Liu és Hofmann, 2004). Adataink ezzel szemben azt mutatták, hogy a p38-MAPK gátlása nem erősíti fel az ET-1 által kiváltott ERK1/2 foszforilációt intakt szíven, kizárva annak a lehetőségét, hogy az ERK1/2 és a p38-MAPK jelpálya között direkt kapcsolat létezne (XIII).
- Vizsgálataink fontos megfigyelése volt, hogy az ET-1 jelentősen növelte a PLN foszforilációját a Ser-16 pozícióban p38-MAPK gátlás esetén, míg a peptid önmagában nem befolyásolta azt. Kézenfekvő magyarázatnak tűnik, hogy a p38-MAPK a PLN fehérje defoszforilációja révén képes ellensúlyozni az ET-1 kontraktilitást növelő hatását (XIII).

(iii) Eredményeink elsőként igazolták, hogy az endogén NO produkció korlátozza az ET-1 kontraktilitást fokozó hatását (I). Izolált szívpreparátumon a NOS gátlás eltérő dinamikával befolyásolta a kontraktilis erőt (I) és a vaszkuláris tónust (XIV), az inotropia fokozódása lényegesen megelőzte a perfúziós nyomás növekedését. Emiatt valószínűtlen, hogy a kontraktilitásra kifejtett hatás másodlagosan, a perfúziós nyomás változása miatt (Gregg-hatás) lépett volna fel.

(iv) Kimutattuk, hogy intakt szíven az endogén módon termelődő ROS molekulák jelátvivőként részt vesznek a kontraktilitás akut regulációjában.

- Eredményeink szerint az ET-1 szignifikánsan fokozta a ROS produkciót. Kimutattuk, hogy gyökfogó illetve NAD(P)H-oxidáz-gátló jelenlétében párhuzamosan csökken az ET-1 által kiváltott ROS termelődés és a peptid pozitív inotrop hatása (XV).
- Ismert, hogy a NAD(P)H-oxidázok által termelt ROS a mitokondriális ATP-függő K^+ -csatornák ($mitoK_{ATP}$) nyitása révén további ROS felszabadulást válthat ki a mitokondriumokból (Kimura és mtsai, 2005). Kimutattuk, hogy a $mitoK_{ATP}$ -csatornák gátlása jelentősen gyengíti az ET-1 inotrop hatását, ugyanakkor a peptid továbbra is képes fokozni a ROS termelést. Adataink arra utalnak, hogy a $mitoK_{ATP}$ -csatornák a ROS-tól független mechanizmusokon keresztül

befolyásolják a kontraktilis erőt, továbbá az ET-1 inotrop effektusában döntően a NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS játszhat szerepet (**XV**).

- Az ERK1/2 aktivációról megállapítottuk, hogy döntően ROS-függő mechanizmusok révén jön létre. Gyökfogó illetve NAD(P)H-oxidáz inhibitor jelenlétében szignifikánsan csökkent az ET-1 által indukált ERK1/2 foszforiláció, ami arra enged következtetni, hogy a NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS az ERK1/2 aktiválása révén járul hozzá az ET-1 pozitív inotrop effektusához (**XV**).

(v) Intakt egérszíven a koronáriaáramlás emelése markánsan fokozta a szívizom kontrakciós erejét. Elsőként tártuk fel, hogy az endogén ET-1 kiemelt szerepet játszik a Gregg-effektus közvetítésében. Az exogén ET-1 peptiddel tett megfigyeléseinkkel összhangban az ET_A- és az ET_B-receptorok ellentétesen befolyásolták a kontraktilis erő fokozódását a koronáriaáramlás emelését követően. Míg az ET_A-receptorok gátlása gyengítette a kontraktilitás növekedését, addig az ET_B-receptorok blokkolása jelentősen fokozta a Gregg-effektust. Az ET-receptoroktól eltérően az AT₁-receptorok gátlása nem befolyásolta a kontraktilis erő növekedését (**XII**).

(vi) Eredményeink szerint a normotenzív SD és a hipertenzív dTG patkányok szíve adekvát Frank-Starling-választ mutatott az előterhelés lépcsőzetes emelésekor. Adott végdiasztolés nyomás mellett a kamrai kontraktilitás indexei szignifikánsan magasabbnak adódtak a dTG patkányok hipertrófiás szívéen. SD patkányok szívéen sem az ET_{A/B}-receptor-gátló bosentan, sem az AT₁-receptor-gátló CV-11974 nem befolyásolta a Frank-Starling-választ. Ezzel szemben, az előterhelés emelésekor a kontraktilitás növekedése elmaradt bosentan jelenlétében a dTG patkányszíveken a kontrollhoz képest. Az AT₁-receptorok gátlása a hipertrófiás szíveken sem volt hatással a Frank-Starling-görbére. A diasztolés funkciót a receptorblokkolók nem befolyásolták (**XVI**). Kimutattuk továbbá, hogy dTG patkányok bal kamrai mintáiban az immunoreaktív ET-1 szintje illetve az ET_A-receptor génexpressziója szignifikánsan magasabb volt az SD csoporthoz képest (**XVI**). Leírtuk továbbá, hogy a kamrai falfeszülés akut fokozódása során szignifikánsan nő az ET-1 bal kamrai génexpressziója *ex vivo* egérszíven (**VIII**). Hasonló módon, jelentősen emelkedett az ET-1 kifejeződése fokozott nyomásterhelésnek kitett bal kamrában *in vivo* patkánymodellben (**IX**). Összegezve, eredményeink elsőként igazolták, hogy hipertrófiás szívekben a lokális ET-1/ET_A-receptor rendszer aktivációja jelentékenyen hozzájárul a balkamra-funkció fenntartásához akut hemodinamikai terhelés során.

5. Az új tudományos eredmények összefoglalása

1. (i) Kimutattuk, hogy az AM egyike a természetben előforduló legpotensebb endogén pozitív inotrop szubsztanciáknak. Izolált patkányszíven az AM a szubnanomoláris koncentrációtartományban volt képes fokozni a kontraktilitást. Az AM csúcshatása összevethető volt az ET-1 effektusával, továbbá megközelítőleg 2/3-a volt a maximális β -AR stimulációval kiváltható válasznak. (ii) Kimutattuk, hogy az AM hatásának közvetítésében CGRP- és PAMP-kötőhelyek nem vesznek részt. (iii) Kimutattuk, hogy az AM átmeneti miokardiális overexpressziója fokozza a bal kamra szisztolés funkcióját *in vivo*, továbbá felerősíti a Frank-Starling-választ *ex vivo*. (iv) Megállapítottuk, hogy a peptid számos hatásától eltérően, az AM inotrop effektusa a cAMP-PKA jelátviteli úttól függetlenül alakul ki. Felderítettük, hogy az AM hatásában szerepet játszanak az L-típusú Ca^{2+} -csatornák, a SR-ból történő Ca^{2+} -felszabadulás, valamint a PKC ϵ és PKC δ aktivációja. (v) Kimutattuk, hogy akut nyomásterhelés hatására az AM bal kamrai génexpressziója korai, tranziens aktivációt mutat, valamint e válasz kiváltásában a lokálisan felszabaduló Ang II és ET-1 nem vesz részt.

2. (i) Vizsgálataink elsőként fedték fel az apelin-APJ rendszer funkcionális jelentőségét a miokardiumban. Eredményeink szerint az APJ-receptor a T-tubulusoknak/Z-vonalaknak és az interkaláris lemezeknek megfelelő lokalizációt mutat a szívizomban. Funkcionális vizsgálataink felderítették, hogy az apelin a legpotensebb endogén pozitív inotrop anyagok közé tartozik. Az apelin már szubnanomoláris koncentrációk mellett tartósan serkentette a kontraktilitást izolált patkányszív-preparátumon, a hatás nagysága összemérhető volt az AM és az ET-1 hatásával. (ii) Az apelin jelenlétében fokozódott a Frank-Starling-válasz *ex vivo*. (iii) Az apelin patkány eredetű izolált szívizomsejteken átmenetileg növelte a kontrakciós erőt, mely hatás szívelégtelen egyedekből izolált sejteken is megtartott volt. (iv) A peptid inotrop hatásának specificitását vizsgálva megmutattuk, hogy izolált szíven az apelinre adott válasz kiváltásában az AT $_1$ -receptorok, az ET $_A$ /ET $_B$ -receptorok, a β -AR-ok, az α -AR-ok illetve az NO nem vesznek részt. (v) Részleteiben feltártuk az apelin inotrop hatását közvetítő mechanizmusokat. Kimutattuk, hogy *ex vivo* az apelin effektusához jelentősen hozzájárul a PLC-PKC kaszkád aktivációja, a NHE illetve a NCX fordított irányú fokozott működése. Izolált kamrai szívizomsejteken az apelin inotrop hatásának hátterében feltehetőleg a miofilamentumok Ca^{2+} iránti érzékenységének növekedése állhat, mivel az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek nem fokozódtak. (vi) Eredményeink szerint az apelin hatással van az intercelluláris kommunikációra. Patkány eredetű,

neonatális szívizomsejt-tenyészetben kimutattuk, hogy az apelin fokozza a szívizomsejtek spontán tüzelési frekvenciáját, vezetési sebességét és csökkenti a mezőpotenciál időtartamát. (vii) Kimutattuk, hogy neonatális patkány kamrai szívizomsejtek ciklikus mechanikai feszítése során jelentősen csökken az apelin és az APJ-receptor mRNS szintje. Továbbá megmutattuk, hogy krónikus nyomásterhelés állatmodelljeiben mérséklődik az apelin bal kamrai génexpressziója, míg az APJ-receptor mRNS szintje nem változik.

3. (i) Elsőként mutattak rá vizsgálataink, hogy a PrRP szerepet játszhat a kardiovaszkuláris rendszer perifériás regulációjában. Kimutattuk, hogy a PrRP direkt, dóziszfüggő pozitív inotrop hatást vált ki izolált patkányszív-preparátumon. (ii) A PrRP kontraktilitást növelő hatását cAMP-től független mechanizmusok hozzák létre. Kimutattuk továbbá, hogy a PrRP inotrop effektusát a PKC α a és a PP1 aktivációja ellensúlyozza, feltehetőleg a PLN defoszforilációja révén.

4. (i) Felfedtük, hogy az értónus szabályozásához hasonlóan, az ET_A- és az ET_B-receptorok izgalma ellentétes hatást gyakorol a szívizom kontraktilis erejére. Az ET_A-receptorok közvetítik az ET-1 pozitív inotrop hatását, míg az ET_B-receptorok aktivációja elnyomja azt. (ii) Részletesen feltártuk az ET-1 pozitív inotrop hatását közvetítő mechanizmusokat izolált patkányszív-preparátumon. A tradicionális felfogással szemben, megfigyeléseink szerint a PLC–PKC jelátviteli útvonal nem játszik szerepet a peptid kontraktilitást fokozó effektusában. Kimutattuk, hogy az ERK1/2 és a p38-MAPK ellentétes szerepet tölt be a kontraktilitás akut szabályozásában. Eredményeink felfedték, hogy az ET-1 inotrop hatását az EGFR–MEK1/2–ERK1/2–p90RSK–NHE1 jelpálya közvetíti. Ezzel szemben, a p38-MAPK szimultán aktivációja ellensúlyozni képes a kontrakciós erő növekedését a PLN defoszforilációja révén. (iii) Igazoltuk, hogy az endogén NO produkció korlátozza az ET-1 kontraktilitást fokozó hatását. (iv) Kimutattuk, hogy az endogén módon termelődő ROS molekulák jelátvivőként részt vesznek a kontraktilitás akut regulációjában. A NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS feltehetően az ERK1/2 aktiválása révén járul hozzá az ET-1 pozitív inotrop effektusához. (v) Eredményeink szerint az endogén ET-1 kiemelt szerepet játszik a Gregg-effektus közvetítésében izolált egérszíven. Az exogén ET-1 peptiddel tett megfigyeléseinkkel összhangban az ET_A- és az ET_B-receptorok ellentétesen hatottak a kontraktilis erő fokozódására a koronáriaáramlás emelését követően. Míg az ET_A-receptorok gátlása gyengítette a kontraktilitás növekedését, addig az ET_B-receptorok blokkolása jelentősen fokozta a Gregg-effektust. (vi) Végezetül kimutattuk, hogy

hipertrófiás szívekben a lokális ET-1/ET_A-receptor rendszer aktivációja jelentősen hozzájárul a kamrafunkció fenntartásához akut hemodinamikai terhelés során a Frank-Starling-mechanizmus befolyásolása révén.

6. A kutatási eredmények gyakorlati jelentősége

A szívelégtelenség állapotában gyakran észlelhető a szívizom-kontraktilitás csökkenése. Ezen megfigyelés vezetett az ún. "hemodinamikai hipotézis" felállításához, mely szerint a kontraktilitás defektusa felelős a szívelégtelenség kialakulásáért és progressziójáért (Francis, 2001). E feltevés azt vetítette előre, hogy a kontraktilitást fokozó terápiák javítani fogják a szív pumpafunkcióját, a szívelégtelenség tüneteit, valamint csökkentik a mortalitást. A legelterjedtebb pozitív inotrop szerek, mint a β -AR-agonisták és a foszfodiészteráz-gátlók, esetében azonban nem igazolódott a hipotézis. Ugyan a cAMP-PKA jelpályát aktiváló szerek rövidtávon drámai módon javítják a balkamra-funkciót és csökkentik a klinikai tüneteket, hosszú távú alkalmazásuk rontja a betegek túlélési esélyeit (Curfman, 1991; Landmesser és Drexler, 2007). Ezen ágensek miokardiális iszkémiára hajlamosítanak, mivel emelik a szívfrekvenciát és a szívizom oxigénfogyasztását. Továbbá, súlyos ritmuszavarokat keltve hirtelen szívhalált okozhatnak (Packer, 1993). A szívizomsejtek apoptotikus és nekrotikus elhalásának fokozódása hozzájárul a szívelégtelenség progressziójához (Nakayama és mtsai, 2007). Azon mechanizmusok, melyek a kontraktilitást csupán aránytalanul magas energiaráfordítás mellett képesek növelni a megfelelő energetikai tartalékok hiányában működő, hanyatló pumpafunkciójú szíven, potenciálisan fokozhatják a szívizomsejtek elhalását, további teljesítmény veszteshez vezetve (Zhang és mtsai, 2010). Az általunk vizsgált AM és apelin hatásai figyelemre méltó kombinációt mutatnak, a pozitív inotrop effektus mellett fokozzák a koronáriaáramlást, csökkentik az elő- és utóterhelést, valamint direkt antiapoptotikus hatással bírnak (**XVII, XIX**) (Barnes és mtsai, 2010). Hasonló előnyös tulajdonságokkal a jelenleg elérhető gyógyszerek közül az ún. Ca²⁺-érzékenyítők rendelkeznek, melyek ígéretes lehetőséget jelentenek a szívelégtelenség kezelésében (Papp és mtsai, 2012). A kardiokinek intracelluláris jelátviteli útvonalainak vizsgálata során olyan mechanizmusokat azonosítottunk, melyek ismert módon befolyásolják a sejt túlélés folyamatait. Az ERK1/2 és a p38-MAPK aktivációja ellentétes hatást gyakorol a szívizomsejtek életképességére, míg az ERK1/2 védő hatású, addig a p38-MAPK szerepet játszik a stressz indukálta sejtkárosodás létrejöttében (Rose és mtsai, 2010). Ily módon, az ERK1/2 serkentése illetve a p38-MAPK gátlása a kontraktilitás növelése mellett sejtvédő

hatást is kifejthet. Kiemelendő ugyanakkor, hogy az EGFR–MEK1/2–ERK1/2 jelpálya abnormális aktivációja központi szerepet játszik a karcinogenezisben. Jelenleg folyó klinikai tanulmányokban a jelátviteli kaszkád egyes komponenseit gátló kis molekulású gyógszerjelöltek hatékonyságát vizsgálják különböző daganatos betegségekben (Friday és Idjei, 2008). Eredményeink felvetik, hogy az EGFR–MEK1/2–ERK1/2 jelátviteli út célzott gátlása csökkentheti a szív pumpafunkcióját. Az antioxidáns vegyületekkel folytatott HOPE és OPT-CHF klinikai tanulmányok csalódást okoztak, a ROS termelés csökkentése nem javította a szívelégtelenségben szenvedő betegek bálkamra-funkcióját (Yusuf és mtsai, 2000; Hare és mtsai, 2008). A ROS szerepének felismerése a szív kontraktilis erejének szabályozásában fízológias viszonyok között, magyarázatot adhat, számos egyéb tényező mellett, az antioxidáns vegyületekkel folytatott kezelés sikertelenségére (XVIII). Jelentős várakozás övezte az ET-receptor-gátlók klinikai tesztelését szívelégtelenségben. A REACH-1, ENCOR és HEAT randomizált klinikai tanulmányokban azonban az ET-receptor-antagonisták magas dózisú alkalmazása során a szívelégtelen betegek egy részénél a tünetek fokozódását tapasztalták (Mylona és Cleland, 1999; Abrahams, 2001; Lüscher és mtsai, 2002; Packer és mtsai, 2005). Hipertrófiás szíveken nyert eredményeink arra utalnak, hogy az endogén ET-1 fontos szerepet játszik a kamrafunkció fenntartásában. Fokozott hemodinamikai igénybevétel esetén a miokardium ET-receptorainak gátlása csökkentheti a hipertrófiás szívek adaptációs készségét a Frank-Starling-válasz módosítása révén (XX). Összegezve, felfedező kutatási eredményeink hozzájárulnak a szívizom-kontraktilitást szabályozó élettani mechanizmusok megismeréséhez. Továbbá, az azonosított molekuláris célpontok alapján új gyógszerjelöltek fejlesztése indulhat meg, melyek a szívelégtelenség kezelésének hatékony eszközeivé válhatnak.

7. Irodalomjegyzék

- Abrahams W. Progress in clinical trials: ENCOR. *Clin Cardiol.* 2001; 24: 481-483.
- Andersen GØ, Qvigstad E, Schiander I, Aass H, Osnes JB, Skomedal T. α_1 -AR-induced positive inotropic response in heart is dependent on myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H1471-H1480.
- Barnes G, Japp AG, Newby DE. Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart.* 2010; 96: 1011-1016.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002a; 415: 198-205.
- Bers DM. Going to cAMP just got more complicated. *J Physiol.* 2007; 583: 415-416.
- Bowditch HP. Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Verh Saechs Akad Wiss.* 1871; 23: 652-689.
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkentin JD. PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 2004; 10: 248-254.
- Curfman GD. Inotropic therapy for heart failure – an unfulfilled promise. *N Engl J Med.* 1991; 325: 1509-1510.
- de Tombe PP, Mateja RD, Tachampa K, Ait Mou Y, Farman GP, Irving TC. Myofilament length dependent activation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48: 851-858.
- Doroudgar S, Glembotski CC. The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. *Trends Mol Med.* 2011; 17: 207-214.
- Endoh M, Otomo J, Norota I, Takanashi M. Selective inhibition by phorbol 12,13-dibutyrate of the α_1 -receptor-mediated positive inotropic effect. *Int J Cardiol.* 1993; 40: 191-201.
- Endoh M. Cardiac Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} sensitizers. *Circ J.* 2008; 72: 1915-1925.
- Fischmeister R, Castro LRV, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevičius J, Leroy J, Vandecasteele G. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res.* 2006; 99: 816-828.
- Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.* 2001; 110 (suppl 7A): 37S-46S.
- Frank O. Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol.* 1895; 32: 370-447. [Chapman CB, Wasserman E. On the dynamics of cardiac muscle. *Am Heart J.* 1960; 58: 282-317, 467-478. Originally published, in German, in: *Zeitschrift für Biologie.* 1895; 32: 370-447.]
- Friday BB, Adjei AA. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 342-346.
- Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005; 115: 500-508.
- Gregg DE. Effect of coronary perfusion pressure or coronary flow on oxygen usage of the myocardium. *Circ Res.* 1963; 13: 497-500.
- Hare JM, Mangal B, Brown J, Fisher C, Freudenberger R, Colucci WS, Mann DL, Liu P, Givertz MM, Schwarz RP. Impact of oxypurinol in patients with symptomatic heart failure. Results of the OPT-CHF study. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51: 2301-2309.
- Heinzel FR, Luo Y, Dodoni G, Boengler K, Petrat F, Di Lisa, F, de Groot H, Schulz R, Heusch G. Formation of reactive oxygen species at increased contraction frequency in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2006; 71, 374-382.
- Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature.* 1998; 393: 272-276.
- Horiuchi J, Saigusa T, Sugiyama N, Kanba S, Nishida Y, Sato Y, Hinuma S, Arita J. Effects of prolactin-releasing peptide microinjection into the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity in rats. *Brain Res.* 2002; 958: 201-209.
- Ikeda U, Kanbe T, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Adrenomedullin augments inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *Circulation.* 1996; 94: 2560-2565.
- Ishimitsu T, Ono H, Minami J, Matsuoka H. Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders. *Pharmacol Ther.* 2006; 111: 909-927.
- Iwasaki H, Hirata Y, Iwashina M, Sato K, Marumo F. Specific binding sites for proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) in the rat. *Endocrinology.* 1996; 137: 3045-3050.
- Jensen BC, O'Connell TD, Simpson PC. Alpha-1-adrenergic receptors: targets for agonist drugs to treat heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 51: 518-528.
- Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JC Jr. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation.* 1995; 92: 286-289.
- Jougasaki M, Rodeheffer RJ, Redfield MM, Yamamoto K, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JC Jr. Cardiac secretion of adrenomedullin in human heart failure. *J Clin Invest.* 1996; 97: 2370-2376.
- Kakkar R, Lee RT. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ Res.* 2010; 106: 47-57.
- Kehat I, Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation.* 2010; 122: 2727-2735.

- Kelly RA, Eid H, Krämer BK, O'Neill M, Liang BT, Reers M, Smith TW. Endothelin enhances the responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Clin Invest.* 1990; 86: 1164-1171.
- Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Suzuki T, Maeta H, Abe Y. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension.* 2005; 45: 860-866.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 192: 553-560.
- Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, Washimine H, Ichiki Y, Kawamoto M, Minamino N, Matsuo H, Eto T. Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett.* 1994; 351: 35-37.
- Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev.* 2011; 91: 1-77.
- Landmesser U, Drexler H. Update on inotropic therapy in the management of acute heart failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2007; 9: 443-449.
- Levoye A, Jockers R. Alternative drug discovery approaches for orphan GPCRs. *Drug Discov Today.* 2008; 13: 52-58.
- Liao P, Wang SQ, Wang S, Zheng M, Zheng M, Zhang SJ, Cheng H, Wang Y, Xiao RP. p38 mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2002; 90: 190-196.
- Liu Q, Hofmann PA. Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H2204-H2212.
- Liu Q, Molkentin JD. Protein kinase C α as a heart failure therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 51: 474-478.
- Lüscher TF, Enseleit F, Pacher R, Mitrovic V, Schulze MR, Willenbrock R, Dietz R, Rousson V, Hürlimann D, Philipp S, Natter T, Noll G, Ruschitzka F. Hemodynamic and neurohumoral effects of selective endothelin A (ET_A) receptor blockade in chronic heart failure: the Heart Failure ET_A Receptor Blockade Trial (HEAT). *Circulation.* 2002; 106: 2666-2672.
- MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 566-577.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002; 298: 1912-1934.
- Moor AN, Fliegel L. Protein kinase-mediated regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Biol Chem.* 1999; 274: 22985-22992.
- Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007; 93: 1137-1146.
- Mylona P, Cleland JG. Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure: Cardio-net Editorial Team. *Eur J Heart Fail.* 1999; 1: 197-200.
- Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR, Molkentin JD. Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2431-2444.
- O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1492: 72-80.
- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene.* 1993; 136: 355-360.
- Onaka T, Takayanagi Y, Leng G. Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21: 287-293.
- Opie LH. Heart physiology: from cell to circulation. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA; 2004.
- Owji AA, Smith DM, Coppock HA, Morgan DGA, Bhogal R, Ghatel MA, Bloom SR. An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology.* 1995; 136: 2127-2134.
- Packer M. The search for the ideal positive inotropic agent. *N Engl J Med.* 1993; 329: 201-202.
- Packer M, McMurray J, Massie BM, Caspi A, Charlon V, Cohen-Solal A, Kiowski W, Kostuk W, Krum H, Levine B, Rizzon P, Soler J, Swedberg K, Anderson S, Demets DL. Clinical effects of endothelin receptor antagonism with bosentan in patients with severe chronic heart failure: results of a pilot study. *J Card Fail.* 2005; 11: 12-20.
- Papp Z, Édes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenperä M, Leppikangas H, Mebazaa A, Landoni G, Grossini E, Caimmi P, Morelli A, Guarracino F, Schwinger RH, Meyer S, Algotsson L, Wikström BG, Jörgensen K, Filippatos G, Parissis JT, González MJ, Parkhomenko A, Yilmaz MB, Kivikko M, Pollesello P, Follath F. Levosimendan: Molecular mechanisms and clinical implications: Consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol.* 2012; 159: 82-87.
- Parkes DG. Cardiovascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Am J Physiol.* 1995; 268: H2574-H2578.
- Patterson S, Starling EH. On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. *J Physiol.* 1914; 48: 357-379.

- Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev.* 2010; 90: 1507-1546.
- Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 551-571.
- Saitoh S, Zhang C, Tune JD, Potter B, Kiyooka T, Rogers PA, Knudson JD, Dick GM, Swafford A, Chilian WM. Hydrogen peroxide: a feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2614-2621.
- Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nakamura S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195: 921-927.
- Salazar NC, Chen J, Rockman HA. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1768: 1006-1018.
- Samson WK, Murphy TC, Resch ZT. A novel action of the newly described prolactin-releasing peptide: cardiovascular regulation. *Brain Res.* 2000; 858: 19-25.
- Satoh F, Smith DM, Gardiner JV, Mahmoodi M, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. Characterization and distribution of prolactin releasing peptide (PrRP) binding sites in the rat - evidence for a novel binding site subtype in cardiac and skeletal muscle. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 1787-1793.
- Shimokubo T, Sakata J, Kitamura K, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: changes in circulating and cardiac tissue concentration in Dahl salt-sensitive rats on a high-salt diet. *Clin Exp Hypertens.* 1996; 18: 949-961.
- Stastna M, Chimenti I, Marbán E, Van Eyk JE. Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. *Proteomics.* 2010; 10: 245-253.
- Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More malignant than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure in Scotland. *Eur J Heart Fail.* 2001; 3: 315-322.
- Sugden PH. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35: 871-886.
- Sumandea MP, Steinberg SF. Redox signaling and cardiac sarcomeres. *J Biol Chem.* 2011; 286: 9921-9927.
- Sun B, Fujiwara K, Adachi S, Inoue K. Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regul Pept.* 2005; 126: 27-33.
- Szokodi I, Kinnunen P, Ruskoaho H. Inotropic effect of adrenomedullin in the isolated perfused rat heart. *Acta Physiol Scand.* 1996; 156: 151-152.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 251: 471-476.
- Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM. Cardiac α_1 -adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev.* 1993; 45: 147-175.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100, 4903-4908.
- Westerhof N, Boer C, Lamberts RR, Sipkema P. Cross-talk between cardiac muscle and coronary vasculature. *Physiol Rev.* 2006; 86: 1263-1308.
- Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao M, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q. Subtype-specific α_1 - and β -adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 330-337.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988; 332: 411-415.
- Yang HT, Sakurai K, Sugawara H, Watanabe T, Norota I, Endoh M. Role of Na^+ - Ca^{2+} exchange in endothelin-1-induced increases in Ca^{2+} transient and contractility in rabbit ventricular myocytes: pharmacological analysis with KB-R7943. *Br J Pharmacol.* 1999; 126: 1785-1795.
- Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high risk patients. *N Engl J Med.* 2000; 342: 154-160.
- Zhang H, Chen X, Gao E, MacDonnell SM, Wang W, Kolpakov M, Nakayama H, Zhang X, Jaleel N, Harris DM, Li Y, Tang M, Berretta R, Leri A, Kajstura J, Sabri A, Koch WJ, Molkentin JD, Houser SR. Increasing cardiac contractility after myocardial infarction exacerbates cardiac injury and pump dysfunction. *Circ Res.* 2010; 107: 800-809.
- Zhang YH, Casadei B. Sub-cellular targeting of constitutive NOS in health and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52: 341-350.
- Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.* 2006; 71: 310-321.
- Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 45: 625-632.

8. Saját közlemények

(A közlemények felsorolása tematikusan, a Tézisekben bemutatottaknak megfelelően történt.)

8.1. A Tézisek alapjául szolgáló közlemények

8.1.1. Eredeti közlemények

- I. Kinnunen P, **Szokodi I**, Nicholls MG, Ruskoaho H. Impact of NO on ET-1 and adrenomedullin-induced inotropic responses - potentiation by combined administration.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000; 279: R569-R575.
¹IF: 2.765; ²CIT: 12
- II. **Szokodi I**, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuhola J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility.
Circ Res. 2002; 91: 434-440.
IF: 9.694; CIT: 241
- III. **Szokodi I**, Kinnunen P, Tavi P, Weckström M, Tóth M, Ruskoaho H. Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide.
Circulation. 1998; 97: 1062-1070.
IF: 9.173; CIT: 150
- IV. Leskinen H, Rauma-Pinola T, **Szokodi I**, Kerkelä R, Pikkarainen S, Uusimaa P, Hautala T, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Adaptive or maladaptive response to adenoviral adrenomedullin gene transfer is context-dependent in the heart.
J Gene Med. 2008; 10: 867-877.
IF: 3.141; CIT: 1
- V. Romppanen H, Marttila M, Magga J, Vuolteenaho O, Kinnunen P, **Szokodi I**, Ruskoaho H. Adrenomedullin gene expression in the rat heart is stimulated by acute pressure overload: blunted effect in experimental hypertension.
Endocrinology. 1997; 138: 2636-2639.
IF: 4.348; CIT: 53
- VI. Romppanen H, Puhakka J, Földes G, **Szokodi I**, Vuolteenaho O, Tokola H, Tóth M, Ruskoaho H. Endothelin-1- and angiotensin II-independent induction of adrenomedullin gene expression.
Hypertension. 2001; 37: 84-90.
IF: 5.364; CIT: 10
- VII. Skoumal R, **Szokodi I**, Aro J, Földes G, Göőz M, Seres L, Sármán B, Lakó-Futó Z, Papp L, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Involvement of endogenous ouabain-like compound in the cardiac hypertrophic process in vivo.
Life Sci. 2007; 80: 1303-1310.
IF: 2.257; CIT: 8

¹ IF: impakt faktor

² CIT: független hivatkozások száma

- VIII. Piuhola J, **Szokodi I**, Ruskoaho H. Endothelin-1 and angiotensin II contribute to BNP but not c-fos gene expression response to elevated load in isolated mice hearts.
Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2007; 1772: 338-344.
IF: 4.041; CIT: 3
- IX. Sármán B, Skoumal R, Leskinen H, Rysä J, Ilves M, Soini Y, Tuukkanen J, Pikkarainen S, Lakó-Futó Z, Sármán B, Papp L, deChâtel R, Tóth M, Ruskoaho H, **Szokodi I**. Nuclear factor- κ B signaling contributes to severe, but not moderate, angiotensin II-induced left ventricular remodeling.
J Hypertens. 2007; 25: 1927-1939.
IF: 4.364; CIT: 8
- X. Farkasfalvi K, Stagg MA, Siedlecka U, Lee J, Soppa GK, Marczin N, **Szokodi I**, Yacoub MH, Terracciano CM. Direct effects of apelin on cardiomyocyte contractility and electrophysiology.
Biochem Biophys Res Commun. 2007; 357: 889-895.
IF: 2.749; CIT: 52
- XI. Kónyi A, Skoumal R, Kubin AM, Füredi G, Perjés A, Farkasfalvi K, Sárszegi Z, Horkay F, Horváth IG, Tóth M, Ruskoaho H, **Szokodi I**. Prolactin-releasing peptide regulates cardiac contractility.
Regul Pept. 2010; 159: 9-13.
IF: 2.473; CIT: 1
- XII. Piuhola J, Mäkinen M, **Szokodi I**, Ruskoaho H. Dual role of endothelin-1 via ET_A and ET_B receptors in regulation of cardiac contractile function in mice.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 285: H112-H118.
IF: 3.658; CIT: 16
- XIII. **Szokodi I**, Kerkelä R, Kubin AM, Sármán B, Pikkarainen S, Kónyi A, Horváth IG, Papp L, Tóth M, Skoumal R, Ruskoaho H. Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility.
Circulation. 2008; 118: 1651-1658.
IF: 14.595; CIT: 10
- XIV. Kinnunen P, Piuhola J, Ruskoaho H, **Szokodi I**. Adrenomedullin reverses the pressor response to endothelin-1 independently of nitric oxide in rat coronary circulation.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 281: H1178-H1183.
IF: 3.232; CIT: 6
- XV. Kubin AM, Skoumal R, Tavi P, Kónyi A, Perjés Á, Leskinen H, Ruskoaho H, **Szokodi I**. Role of reactive oxygen species in the regulation of cardiac contractility.
J Mol Cell Cardiol. 2011; 50: 884-893.
IF: 5.166; CIT: 2
- XVI. Piuhola J, **Szokodi I**, Kinnunen P, Ilves M, deChâtel R, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Endothelin-1 contributes to the Frank-Starling response in hypertrophic rat hearts.
Hypertension. 2003; 41: 93-98.
IF: 5.630; CIT: 19

8.1.2. Összefoglaló közlemények

- XVII. **Szokodi I**. A szívizom-kontraktilitás peptiderg szabályozó mechanizmusai.
Cardiol Hung. 2004; 34: E106-E113.
IF: -; CIT: 1

- XVIII. Perjés A, Kubin AM, Kónyi A, Szabados S, Cziráki A, Skoumal R, Ruskoaho H, **Szokodi I**. Physiological regulation of cardiac contractility by endogenous reactive oxygen species.
Acta Physiol (Oxf). 2012 ;205: 26-40.
IF: 3.090; CIT: -

8.1.3. Könyvfejezet

- XIX. **Szokodi I**, Ruskoaho H. Adrenomedullin. In: Cardiovascular hormone systems: from molecular mechanisms to novel therapeutics, ed. Bader M, Wiley-VCHVerlag GmbH, Weinheim, Germany, 2008, 168-191. (ISBN: 978-3-527-31920-6)
IF: -; CIT: -

8.1.4. Hozzájárulás

- XX. **Szokodi I**, Piuholo J, Ruskoaho H. Endothelin receptor blockade and exacerbation of heart failure.
Circulation. 2003; 107: e211-e211.
IF: -; CIT: 4

8.2. A PhD Értekezésben nem szereplő további közlemények

8.2.1. Eredeti közlemények

1. Horkay F, **Szokodi I**, Merkely B, Tóth M, Solti F, Kékesi V, Juhász-Nagy S. Intraperikardiális endothelin infúzió aritmogén hatása.
Cardiol Hung. 1996; 1: 54-55.
IF: -; CIT: -
2. Gellér L, Merkely B, **Szokodi I**, Juhász-Nagy A, Tóth M, Horkay F. Electrophysiological effects of intrapericardial infusion of endothelin-1.
PACE. 1998; 21: 151-156.
IF: 1.301; CIT: 18
3. Selmei L, Antal M, Horkay F, Merkely B, **Szokodi I**, Biró L, Székely M, Jobbágy J, Szépvölgyi J, Tóth M. Enhanced accumulation of pericardial fluid ferritin in patients with coronary artery disease.
Coron Artery Dis. 2000; 11: 53-56.
IF: 1.028; CIT: 9
4. Földes G, Suo M, **Szokodi I**, Lakó-Futó Z, deChâtel R, Vuolteenaho O, Huttunen P, Ruskoaho H, Tóth M. Factors derived from adrenals are required for activation of cardiac gene expression in angiotensin II-induced hypertension.
Endocrinology. 2001; 142: 4256-4263.
IF: 4.971; CIT: 4
5. Hautala N, Tenhunen O, **Szokodi I**, Ruskoaho H. Direct left ventricular wall stretch activates GATA4 binding in perfused rat heart: involvement of autocrine/paracrine pathways.
Pflügers Archiv Eur J Physiol. 2002; 443: 362-369.
IF: 1.695; CIT: 20
6. Suo M, Hautala N, Földes G, **Szokodi I**, Tóth M, Leskinen H, Uusimaa P, Vuolteenaho O, Nemer M, Ruskoaho H. Posttranscriptional control of BNP gene expression in angiotensin II-induced hypertension.
Hypertension. 2002; 39: 803-808.
IF: 5.013; CIT: 16

7. Földes G, Horkay F, **Szokodi I**, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Sármán B, Seres L, Skoumal R, Lakó-Futó Z, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure.
Biochem Biophys Res Commun. 2003; 308: 480-485.
IF: 2.836; CIT: 128
8. Földes G, Horkay F, **Szokodi I**, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Sármán B, Seres L, Skoumal R, Ruskoaho H, Tóth M, deChâtel R. Apelin, az APJ árvareceptor endogén ligandja szívelégtelen betegek szívében és plazmájában.
Magy Belorv Arch. 2003; 57: 29-35.
IF: -; CIT: -
9. Lakó-Futó Z, **Szokodi I**, Sármán B, Földes G, Tokola H, Ilves M, Leskinen H, Vuolteenaho O, Skoumal R, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Evidence for a functional role of angiotensin II type 2 receptor in the cardiac hypertrophic process in vivo in the rat heart.
Circulation. 2003; 108: 2414-2422.
IF: 11.164; CIT: 26
10. Tenhunen O, Sármán B, Kerkelä R, **Szokodi I**, Papp L, Tóth M, Ruskoaho H. Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart.
J Biol Chem. 2004; 279: 24852-24860.
IF: 6.355; CIT: 33
11. Pemberton CJ, Tokola H, Bagi Z, Koller A, Pöntinen J, Ola A, Vuolteenaho O, **Szokodi I**, Ruskoaho H. Ghrelin induces vasoconstriction in the rat coronary vasculature without altering cardiac peptide secretion.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 287: H1522-H1529.
IF: 3.539; CIT: 33
12. Tenhunen O, **Szokodi I**, Ruskoaho H. Posttranscriptional activation of BNP gene expression in response to increased left ventricular wall stress: role of calcineurin and PKC.
Regul Pept. 2005; 128: 187-196.
IF: 2.272; CIT: 4
13. Luosujärvi H, Aro J, Tokola H, Leskinen H, Tenhunen O, Skoumal R, **Szokodi I**, Ruskoaho H, Rysä J. A novel p38 MAPK target dyxin is rapidly induced by mechanical load in the heart.
Blood Press. 2010; 19: 54-63.
IF: 1.256; CIT: 1
14. Skoumal R, Tóth M, Serpi R, Rysä J, Leskinen H, Ulvila J, Saiho T, Aro J, Ruskoaho H, **+Szokodi I**, **+Kerkelä R**. Parthenolide inhibits STAT3 signaling and attenuates angiotensin II-induced left ventricular hypertrophy via modulation of fibroblast activity.
J Mol Cell Cardiol. 2011;50(4):634-641.
IF: 5.166; CIT: 2
+megosztott utolsó szerzők
15. Vainio L, Perjes A, Ryti N, Magga J, Alakoski T, Serpi R, Kaikkonen L, Piihola J, **Szokodi I**, Ruskoaho H, Kerkelä R. Neuronostatin, a novel peptide encoded by somatostatin gene, regulates cardiac contractile function and cardiomyocyte survival.
J Biol Chem. 2012; 287: 4572-4580.
IF: 4.773; CIT: 1

8.2.2. Proceedings folyóiratban ill. könyvben

1. Horkay F, Laine M, **Szokodi I**, Leppäluoto J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhász-Nagy A, Tóth M. Human pericardial fluid contains the highest amount of endothelin of all mammalian fluids tested so far.
J Cardiovasc Pharmacol. 1995; 26(Suppl. 3): S502-S504.
IF: -; CIT: 13
2. Tóth M, Solti F, Merkely B, Kékesi V, Horkay F, **Szokodi I**, Juhász-Nagy A. Ventricular tachycardias induced by intracoronary administration of endothelin-1 in dogs.
J Cardiovasc Pharmacol. 1995; 26(Suppl. 3): S153-S155.
IF: -; CIT: 16
3. Kiss P, Horváth I, **Szokodi I**, Tóth P, Kékesi V, Juhász-Nagy A, Tóth M. Endothelin does not interact with angiotensin II in the coronary vascular bed of anesthetized dogs.
J Cardiovasc Pharmacol. 1998; 31(Suppl. 1): S103-S105.
IF: -; CIT: 3
4. Turbucz P, Horkay F, Karádi I, **Szokodi I**, Kiss P, deChâtel R, Tóth M. High pericardial fluid levels of endothelin are not caused by altered neutral endopeptidase activity in cardiac patients.
J Cardiovasc Pharmacol. 1998; 31(Suppl. 1): S287-S289.
IF: -; CIT: 2
5. Solti F, Tóth M, Merkely B, Kékesi V, Gellér L, **Szokodi I**, Horkay F, Juhász-Nagy A. Verapamil reduces the arrhythmogenic effect of endothelin.
J Cardiovasc Pharmacol. 1998; 31(Suppl. 1): S386-S387.
IF: -; CIT: 7
6. **Szokodi I**, Horkay F, Kiss P, Selmei L, Horvath I, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhász-Nagy A, Tóth M. Characterization of canine pericardial fluid endothelin-1 levels.
J Cardiovasc Pharmacol. 1998; 31(Suppl. 1): S399-S400.
IF: -; CIT: 4
7. Horkay F, **Szokodi I**, Merkely B, Solti F, Gellér L, Kiss P, Selmei L, Horváth I, Kékesi V, Juhász-Nagy A, Tóth M. Potential pathophysiologic role of endothelin-1 in canine pericardial fluid.
J Cardiovasc Pharmacol. 1998; 31(Suppl. 1): S401-S402.
IF: -; CIT: 5
8. Tóth M, Solti F, Merkely B, Kékesi V, **Szokodi I**, Horkay F, Juhász-Nagy A. Bradycardia increases the arrhythmogenic effect of endothelin.
J Cardiovasc Pharmacol. 1998; 31(Suppl. 1): S431-S433.
IF: -; CIT: 4
9. Horkay F, **Szokodi I**, Merkely B, Solti F, Kékesi V, Gellér L, Szabó T, Vecsey T, Juhász-Nagy S, Tóth M. Intraperikardiális endothelin infúzió kamrai arrythmiát okozó hatásának vizsgálata állatkísérletes modellen. In: Ritmuszavarok, eds. Polgár P, Tenczer J, Mekely B, Debrecen: Ritmosos Szívért Alapítvány, 1998. 327-333. (ISBN:963-03-4842-X)
IF: -; CIT: -

8.3. A PhD Értekezésben szereplő közlemények

8.3.1. Eredeti közlemények

1. Selmei L, **Szokodi I**, Horvát-Karajz K. A sensitive microplate-based kinetic assay for serum neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) activity.
Clin Chim Acta. 1996; 244: 111-116.
IF: 1.045; CIT: 7

2. **Szokodi I**, Kinnunen P, Ruskoaho H. Inotropic effect of adrenomedullin in the isolated perfused rat heart.
Acta Physiol Scand. 1996; 156: 151-152.
IF: 1.519; CIT: 57
3. **Szokodi I**, Horkay F, Kiss P, Selmeci L, Merkely B, Kékesi V, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, Ruskoaho H, Juhász-Nagy A, Tóth M. Characterization and stimuli for production of pericardial fluid atrial natriuretic peptide in dogs.
Life Sci. 1997; 61: 1349-1359.
IF: 2.275; CIT: 14
4. Horkay F, **Szokodi I**, Selmeci L, Merkely B, Kékesi V, Vecsey T, Laine M, Leppäluoto J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhász-Nagy A, Tóth M. Presence of immunoreactive endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in human pericardial fluid.
Life Sci. 1998; 62: 267-274.
IF: 1.937; CIT: 13
5. **Szokodi I**, Horkay F, Merkely B, Solti F, Geller L, Kiss P, Selmeci L, Kékesi V, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, Ruskoaho H, Juhász-Nagy A, Tóth M. Intrapericardial infusion of endothelin-1 induces ventricular arrhythmias in dogs.
Cardiovasc Res. 1998; 38: 356-364.
IF: 2.996; CIT: 15

8.4. Összesített tudományometriai adatok (lezárva: 2012. december 15.)

Összes közlemény

Közlemények száma:	50
Közlemények száma (absztraktok és hozzászólások nélkül):	48
Teljes cikk, nemzetközi folyóiratban:	35
Teljes cikk, magyar nyelvű folyóiratban:	2
Rövid közlemény, magyar nyelvű folyóiratban:	1
Könyvfejezet, idegen nyelvű:	1
Proceedings:	9
Hozzászólás, nemzetközi folyóiratban:	1
Idézett absztraktok:	1
Összegzett impakt faktor (teljes cikkek alapján):	146.881
Hivatkozások száma (összes közlemény alapján):	1291
Független hivatkozások száma (összes közlemény alapján):	1053
Hirsch-index (összes/független hivatkozások alapján):	20/15

Első és utolsó szerzős *in extenso* folyóiratcikkek

Közlemények száma:	13
Első szerzős közlemény:	7
Utolsó szerzős közlemény:	6
Összegzett impakt faktor:	63.743
Független hivatkozások száma:	507

A PhD Értekezésben szereplő közlemények

Közlemények száma:	5
Teljes cikk, nemzetközi folyóiratban:	5
Összegzett impakt faktor:	9.772
Független hivatkozások száma:	106

A PhD Értekezésben nem szereplő összes közlemény

Közlemények száma:	45
Közlemények száma (absztraktok és hozzászólások nélkül):	43
Teljes cikk, nemzetközi folyóiratban:	30
Teljes cikk, magyar nyelvű folyóiratban:	2
Rövid közlemény, magyar nyelvű folyóiratban:	1
Könyvfejezet, idegen nyelvű:	1
Proceedings:	9
Hozzászólás, nemzetközi folyóiratban:	1
Idézett absztraktok:	1
Összegzett impakt faktor (teljes cikkek alapján):	137.109
Független hivatkozások száma (összes közlemény alapján):	947

A PhD Értekezésben nem szereplő első és utolsó szerzős *in extenso* folyóiratcikkek

Közlemények száma:	10
Első szerzős közlemény:	4
Utolsó szerzős közlemény:	6
Összegzett impakt faktor:	56.953
Független hivatkozások száma:	421

Az 1999-től megjelent közlemények

Közlemények száma:	32
Közlemények száma (absztraktok és hozzászólások nélkül):	30
Teljes cikk, nemzetközi folyóiratban:	27
Teljes cikk, magyar nyelvű folyóiratban:	2
Könyvfejezet, idegen nyelvű:	1
Hozzászólás, nemzetközi folyóiratban:	1
Idézett absztraktok:	1
Összegzett impakt faktor (teljes cikkek alapján):	122.227
Független hivatkozások száma (összes közlemény alapján):	672

Az MTA Doktori Értekezés alapját képező közlemények

Közlemények száma:	20
Közlemények száma (hozzászólások nélkül):	19
Teljes cikk, nemzetközi folyóiratban:	17
Teljes cikk, magyar nyelvű folyóiratban:	1
Könyvfejezet, idegen nyelvű:	1
Hozzászólás, nemzetközi folyóiratban:	1
Összegzett impakt faktor (teljes cikkek alapján):	85.740
Független hivatkozások száma (összes közlemény alapján):	597

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni tanítómesteremnek, Dr. Tóth Miklósnak, aki PhD témavezetőként a kutatói pályán elindított, vezetett, és azóta is önzetlenül támogatja kutatómunkámat. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Heikki Ruskoahonak, a Magyar Tudományos Akadémia tiszteleti tagjának, hogy kreatív és inspiráló környezetet biztosított a posztdoktori éveimre a finnországi Ouluban, valamint töretlenül segíti immáron önálló kutatói pályafutásomat. Kettejük szerepe meghatározó volt a tudományos gondolkodásom alakulásában. A felbecsülhetetlen szakmai segítségük mellett köszönöm mindkettőjük barátságát.

Köszönöm néhai Dr. Juhász-Nagy Sándor, Dr. de Châtel Rudolf, Dr. Papp Lajos és Dr. Szabados Sándor professzor uraknak, hogy pályafutásom során intézeteikben - a SOTE Ér- és Szívsebészeti Klinika Kutatólaboratóriumában, a SOTE I. sz. Belgyógyászati Klinikáján, illetve a PTE Szívgyógyászati Klinikáján - lehetőséget biztosítottak számomra a kutatómunka folytatására. Köszönet illeti Doktori Programunk korábbi és jelenlegi irányítóit, Dr. Róth Erzsébet és Dr. Koller Ákos professzorokat, folyamatos támogatásukért.

Kiemelt köszönettel tartozom nagyszerű munkatársaimnak, Dr. Skoumal Rékának, néhai Dr. Farkasfalvi Klárának, Dr. Anna-Maria Kubinnak, Dr. Hanna Leskinennek, Dr. Kónyi Attilának, Dr. Pietari Kinnunennek, Dr. Jarkko Piuholanak, Dr. Hannu Romppanennek, Dr. Sármán Balázsnak, Dr. Földes Gábornak, Dr. Lakó-Futó Zoltánnak és Dr. Perjés Ábelnek, a közös munkáért, a tőlük kapott inspirációért, a barátságukért.

Köszönet illeti munkacsoportunk nemzetközi együttműködő partnereit, Pasi Tavit (A.I. Virtanen Institute for Molecular Sciences, Kuopio, Finnország), Risto Kerkelet (University of Oulu, Oulu, Finnország), illetve Marcin Nándort és Cesare Terraccianot (Imperial College London, Egyesült Királyság).

Külön köszönettel tartozom Dr. Horváth Ivánnak az élet minden területére kiterjedő önzetlen támogatásáért, barátságáért.

Megkülönböztetett köszönet jár családomnak. Édesanyámnak, édesapámnak, és húgomnak, akik szeretetükkel mindig támogattak. Feleségemnek és fiamnak a szerető légkörért, amellyel a mindennapokban körülvesznek, a hitért és támogatásért, amely meghatározó volt e munka létrejöttében.