

MTA DOKTORI TÉZISEK

A SZÍVSZÖVETI ÁTÉPÜLÉS JELÁTVITELI FOLYAMATAI

FÖLDES GÁBOR

SEMMELWEIS EGYETEM
VÁROSMAJORI SZÍV- ÉS
ÉRGYÓGYÁSZATI KLINIKA
BUDAPEST, 2018



Tartalomjegyzék

1.	Tudományterületi háttér.....	4
2.	Célkitűzések.....	7
3.	Módszerek.....	8
4.	Eredmények és megbeszélés.....	11
5.	Az új tudományos eredmények összefoglalása.....	23
6.	A kutatási eredmények gyakorlati jelentősége.....	24
7.	Irodalomjegyzék.....	25
8.	Saját közlemények.....	28
9.	Köszönetnyilvánítás.....	34

Rövidítések jegyzéke

ACE	angiotenzin konvertáló enzim
Ang II	angiotenzin II
ANP/ANF	pitvari nátriuretikus peptid/faktor
AR	adrenerg receptor
AT1-receptor	angiotenzin II 1-es típusú receptor
BMP4	csont morfogénikus protein 4
BNP	B-típusú nátriuretikus peptid
CRM1	exportin 1 („ <i>chromosomal maintenance 1</i> ”)
DCM	dilatatív cardiomyopathia
ECM	extracelluláris mátrix
EF	ejekciós frakció
EGFRK	epidermalis növekedési faktor-receptor kináz
EB	embrionális testecske („ <i>embryoid body</i> ”)
ER	endoplazmatikus retikulum
ERK1/2	extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2
ET1	endothelin-1
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GPCR	G-proteinhez kapcsolt receptor
GSK3	glikogén szintáz kináz 3
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HDAC	hiszton deacetiláz
hESC	humán embrionális őssejt („ <i>human embryonic stem cell</i> ”)
hiPSC	humán indukált pluripotens őssejt
hPSC	humán pluripotens őssejt
JNK	c-Jun N-terminális kináz
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MEK1/2	mitogén-aktivált protein kináz-kináz 1/2
mESC	egér embrionális őssejt
MI	myocardialis infarktus
mPTP	mitochondriális permeabilitás átmeneti pórusok
mRNS	hírvivő („ <i>messenger</i> ”) ribonukleinsav
NFAT	aktivált T-sejtek nukleáris faktora („ <i>nuclear factor of activated T cells</i> ”)
NLS	sejtmag lokalizációs szignál
NPC	sejtmag pórus komplex („ <i>nuclear pore complex</i> ”)
PDGF	trombocyta eredetű növekedési faktor
PE	phenylephrine
PSC	pluripotens őssejt
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	mintaközép hibája („ <i>standard error of mean</i> ”)
siRNS	kis interferáló („ <i>short interfering</i> ”) ribonukleinsav
STAT	(„ <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> ”)
T3	trijód-thyronin
TGF-β	transzformáló növekedési faktor β
TLDA	TaqMan alacsony denzitású array („ <i>TaqMan low density array</i> ”)
UPS	ubiquitin-proteaszóma rendszer
Wnt	Wingless/int gén-kapcsolt
α-AR	α-adrenerg receptor
β-AR	β-adrenerg receptor

1. Tudományterületi háttér

1.1. Szívizomsejtek szívelégtelenségben

Az emberi myocardium számos sejtípust tartalmaz, ezek közül a szívizomsejtek a myocardium kontraktilis rendszerét alkotják, számuk a felnőtt szív kamráiban 3 milliárdra tehető, térbeli elrendeződésük a szívszövet 3D struktúrájáért felelős. A sejtek számának csökkenése szívelégtelenséghez, a szív funkciójának romlásához vezet. A sejszám csökkenése jellemzően az alapbetegséghez, így például myocardialis infarktushoz társulhat vagy másodlagosan, a kiváltó sérüléstől függetlenül, kemoterápiához, a neurohormonális és gyulladásos válaszhoz kapcsolt apoptózis és nekrozis következményeként jelentkezik. A megmaradó életképes szívizomsejtek kontraktilis aktivitása elengedhetetlen ahhoz, hogy a szív perctérfogata ne csökkenjen a szövetkárosodást követően – az alacsonyabb sejszám, abnormális falfeszülés és szívfali geometria, valamint az extracelluláris mátrix átépülése ellenére sem. A túlélő szívizomsejtek ezt az átmeneti kompenzatórikus szerepüket egy adaptív hypertrophiás állapotba kerülve fejtik ki (Diez és mtsai, 2005). Az elégtelen szöveti perfúzióhoz és pangáshoz társuló tartós neurohormonális aktiválódás is hozzájárul a perctérfogat biztosításához. Ez a folyamat, valamint a megnövekedett gyulladásos és elégtelen metabolikus válaszkészség együttesen ugyanakkor a hypertrophiás sejtek csökkent kontraktilitásához vezet szívelégtelenségben (Opie és mtsai, 2006). A szívizomsejtek kóros működését szintén számos sejszintű folyamat kölcsönhatása eredményezi, így az intracelluláris jelátviteli utak, ionáramok, a sejtek közötti kommunikáció, organellum funkció, az oxidatív stressz, a károsított mitokondriális energetika, a megváltozott sejt morfológia, az újrainduló foetalis génprogram és a sejthalálzásért felelős jelátvitel közvetlen változásai (Rajabi és mtsai, 2007; Hertelendi és mtsai, 2009). Egyre világosabb, hogy ezek nem egymástól függetlenül értelmezendők, hanem az egymással szoros kölcsönhatásban lévő, különböző kóreltani folyamatok együttesen felelősek a kóros válasz felerősödéséért, a sejtek mechanikus funkciójának és végül életképességének romlásáért. A jelátviteli csomópontok és központi szabályozó elemek azonosítása és célzott gátlása ezért klinikailag is fontos, új terápiás lehetőség lehet, és a szívelégtelen sejtek számos tulajdonságát érdemben javíthatja.

1.1.1. A szívizomsejtek morfológiai változásai szívelégtelenségben

Az egészséges szívizomsejtek megnyúlt, pálca alakú, tipikusan 20-30 μ m széles, ~100 μ m hosszú és 30 μ m átmérőjű sejtek. A szívelégtelen sejtek ehhez képest megnagyobodottak. A morfológiai változások elsősorban az alapbetegségtől függenek: így például a hipertonia vagy aorta billentyű stenosis miatt megnőtt nyomással túlterhelt bal kamrából származó szívizomsejtek hosszúsága és szélessége egyaránt nagyobb az egészségesekhez képest.

1.1.2. Hibás génszabályozás

Szívelégtelenségben számos adaptív funkcionális változás figyelhető meg a felnőtt szívizomsejtekben, amelyek a foetalis szív kamrai sejtjeinek fiziológiás működésére emlékeztetnek. Ide sorolhatóak azok a metabolikus változások, amelyek során a zsírsav alapú anyagcsere helyett a szénhidrátok kerülnek túlsúlyba. Emellett a T-tubulusok és a

szarkoplazmatikus retikulum változásai, a megváltozott szarkolemmális ioncsatorna expressziók és a miozin nehézlánc expressziós és izoforma változásai szintén foetalis irányba tolódnak. Ezen folyamatokat kódoló expressziós aktivitások mindegyike a foetalis myocardiumban látott mintázatnak felel meg (Rajabi és mtsai, 2007). A foetalis génprogram aktiválódása a szívelégtelenség jelátviteli folyamatainak egyik jól jellemzett komponense, ez mind a humán szívelégtelen szöveti mintákban, mind a foetalis szívizomsejtekben látható expressziós profilból megállapítható (Razeghi és mtsai, 2001). A génprogram aktiválódása előnyös hatásokkal bír a sejtek túlélésére, elsősorban a károsodást követő kezdeti időszakban. A felnőtt és foetalis programok arányának megváltozása ugyanakkor a szívelégtelenség előrehaladtával számos működési zavarhoz vezet.

1.1.3. Csökkent életképesség és fokozott sejthalálozás

A szívizomsejtek számának csökkenése a myocardium károsodásának legfontosabb jellemzője szívelégtelenségben. Ez lehet a kiváltó betegség, így az akut koronária szindróma és infarktust okozó érelzáródás következménye, de indirekt módon, a sejthalálért felelős intracelluláris jelátvitel aktiválódása is eredményezheti (Abdelwahid és mtsai, 2016). Az infarktus és más akut myocardialis károsodások sejtnekrózist okoznak, elsősorban a sejtek intracelluláris ATP szintjében hirtelen bekövetkező csökkenés következtében. A nekrózis során a sejtmembrán károsodik és az intracelluláris tartalom kiáramlik a sejtközötti térbe, gyulladást és másodlagosan sejtkárosodást eredményezve a környező sejtekben. Ezzel ellentétben, a programozott sejthalál (apoptózis) energiaigényes folyamat, ahol a sejtek protein és kromatin állománya fragmentálódik - ez azonban nem vált ki másodlagos gyulladást. Az apoptózist mediáló jelátviteli utak összetettek, a kamrai szívizomsejtekben a folyamatok három nagy részre oszthatóak: az *extrinsic* útvonal, a mitokondriális (vagy *intrinsic*) útvonal és az *intrinsic* csoportba sorolható endoplazmatikus retikulum (ER)-stressz útvonal (Taylor és mtsai, 2008). A három útvonal egy közös kaskádöt indít be, amely során „öngyilkos” kaspáz enzimek aktiválódnak (Communal és mtsai, 2002). A sejtek túlélését és a sejtciklust szabályozó intracelluláris jelátvitelben MAP kinázok központi szerepet játszanak. A MAP kinázok fontosak a kardiális pathológiás folyamatokban (Molkentin és mtsai, 2001), kardioprotektív hatásuk nagyban függ a moduláló kinázok foszforiláltságától.

1.1.4. Sejthalál transzplantált sejtekben

A szívizomsejtek mitotikus osztódása ugyan bizonyított, például myocardialis infarktust követően, a szívszövet mitotikus kapacitása azonban nem elegendő ahhoz, hogy a sejtvésztestet megfelelően kompenzálja (Bergmann és mtsai, 2015). A sejtek plaszticitásának növelése megoldás lehet a veszteség ellensúlyozására: ez a mechanizmus emelheti az új szívizomsejtek számát ischémiát követően, fokozhatja a revaszkularizációt a sérült régióban és gátolhatja az infarktushoz társuló pathológiás remodelláció mértékét (Hamano és mtsai, 2002). Kiemelkedően fontos, hogy a sejthalálozás általános mechanizmusát és a kiváltó stimulusokat jobban megértsük, hogy a sejtek életképességének megtartása sikeres legyen a különböző kardiovaszkuláris pathológiás körülmények között (Laflamme és mtsai, 2007).

1.1.5. Megváltozott sejtmag transzport

A szívelégtelenséget legtöbbször hypertrophia előzi meg, amely egy olyan adaptív folyamat, amely során a szív fiziológiás kompenzatórikus válaszából pathológiás maladaptív válasz fejlődik ki. Az ilyen komplex változások szabályozása összefügghet azokkal a regulátor jelátviteli faktorokkal, amelyek a sejtmag és a citoplazma között transzportálódnak. Szívelégtelen sejtekben a sejtmag transzport működése megváltozik, ami a sejtmag pórusok remodellációjával jár együtt. Ennek során a sejtmagból az exportfolyamatok fokozódnak, de mindez a sejtmagba irányuló import csökkenésének terhére történik (Tarazon és mtsai, 2012). Szívhypertrophiában és szívelégtelenségben egyaránt központi szerepe van a sejtmagba transzporttal bejutó, a transzkripció folyamatok szabályozásáért felelős molekuláknak és ezek sejtmagbéli aktiválódásának (Chahine és mtsai, 2015).

1.2. Új humán szívizomsejtek őssejtekből, betegségmodellezés

A kísérletes kardiológia és egyben a kardiovaszkuláris sejterápia egy fontos mérföldkövét jelenti, hogy humán embrionális és indukált pluripotens őssejtvonalakból, új humán szívizomsejteket tudunk laboratóriumi körülmények között létrehozni. Humán PSC kardiovaszkuláris származékai jó lehetőséget jelenthetnek a betegségek (így például a hypertrophia) modellezésére, megfelelő autológ vagy allogén forrásai lehetnek a kardiális transzplantációs terápiáknak. Különösen a szívizomsejtek esetében igaz ez, amelyek esetében a felnőtt sejtek tartósan nehezen tenyésztethetők, vagy módosíthatóak in vitro sejt kultúrában, így a betegspecifikus humán indukált pluripotens őssejtekből differenciált szívizomsejtek (hiPSC-CM) létrehozása jelentős előrelépést jelent. Az őssejtek differenciáltatásához szükséges jelátviteli mechanizmusok ma már elég részletesen ismertek. A ma elterjedten alkalmazott szívizomsejt differenciációs technikák lényege, hogy az embriogenezis cardiomyogeneziséért felelős meso- és/vagy endodermális jelátvitelét „utánozzuk” sejt kultúrában. A létrehozott szívizomsejtek a legújabb differenciációs technikák alkalmazása mellett is sokat megőriznek az éretlen tulajdonságaikból (Földes és mtsai, 2008), felnőtt sejtekkel való összehasonlításukkor ezek a különbségek jelentősek lehetnek. A sejtek 2D sejt kultúrákban látott, a felnőtt sejtekhez viszonyított éretlensége problémát jelenthet olyan betegségekben, amelyek klinikai körülmények között csak későbbi életkorban jelentkeznek. Hiszen a felnőtt myocardium élettani jellemzőihez hasonlító tulajdonságokat, így az excitációs-kontrakciós kapcsolást (amely a T-tubulusok jelenlétét igényli), a pozitív kontrakciós erő/frekvencia kapcsolatot (amelyhez érett intracelluláris kalcium forgalom szükséges) és a jelenleginél hatékonyabb energiafelhasználást (ami egy oxidatív metabolizmus-függő folyamat) az eddigi legjobb differenciációs technikákkal sem sikerült megközelíteni. Számos módszertani megoldási lehetőség merült fel, amivel a sejtek érettségét fokozni lehet, hogy ezáltal a betegség pontosabb modelljét alkalmazhassuk. Ide sorolhatóak a krónikus sejt kultúrák, a pajzsmirigyhormon (T3) krónikus alkalmazása a sejtenyészítő médiumban (Lee és mtsai, 2010; Yang és mtsai, 2014), a sejt kultúra felszínek optimalizálása (Tallawi és mtsai, 2015), a különféle 3D sejt kultúrák (Schaaf és mtsai, 2011) és tartós elektromos, mechanikai vagy hidrodinamikai stimulálás (Ronaldson-Bouchard és mtsai, 2018).

2. Célkitűzések

1. A humán pluripotens őssejt eredetű szívműködő sejtek hypertrophiás válaszána vizsgálatá és felnőtt sejtekkel való összevetése
2. Az adrenerg jelátvitel jellemzése és szabályozása humán pluripotens őssejt eredetű szívműködő sejtekkben
3. Az immunosuppresszív szerek kardiovaszkuláris hatásának in vitro jellemzése
4. A sejtmag transzport szerepe a szívműködő sejtek hypertrophiájában
5. A hypertrophia jelátvitel vizsgálatá tumor-indukálta szívelégtelenségben
6. Automatizált toxicitási vizsgálatok humán szívműködő sejtekkkel

3. Módszerek

3.1. Humán pluripotens őssejt tenyészetek

A legtöbb kísérletet H7 hESC-sejtvonalon (*WiCell Research Institute Bank, Madison, USA*) és a ReproCell hiPSC-sejtvonalon vagy a *WiCell*-től vásárolt IMR 90-4 sejtvonalon végeztük. A humán PSC-eket differenciálatlan állapotban, dajkasejtektől mentes körülmények között, Matrigellel bevont lemezeken tartottuk, mTeSR1 médiumban.

3.2. Humán őssejt eredetű szívizomsejtek

Az *in vitro* kardiális differenciálódásnak három alkalmazási iránya lehet: kétdimenziós monolayer, háromdimenziós embrionális testecske, és a kettő eljárást egyesítő microcarrier-alapú, háromdimenziós sejt kultúrák. Az új, 2D konfluens őssejt monolayer protokollok alkalmazásával ma már „tisztá”, csak szívizomsejtet tartalmazó sejt kultúrák hozhatóak létre. Ezen protokollok fontos újítása, hogy a növekedési faktorok, morfogének, vagy szérum alkalmazása helyett, jól reprodukálható és szabályozható, a korai kardiális fejlődés jelátvitelét befolyásoló (Burridge és mtsai, 2015; Nosedá és mtsai, 2011) kis molekulákat alkalmazunk szekvenciális adagolásban.

3.3. Hypertrophiás stimulusok

A G-fehérjéhez kapcsolt jelátvitelű hypertrophiás agonisták hatásának jellemzésére, a sejtek inkubációját követően (1 óra), a tenyésztőlemezeken növesztett sejteket 48 órán át α -adrenerg agonista phenylephrinnel kezeltük (10 μ M). A sejteket egy független kísérletsorozatban angiotenzin II-vel (100 nM, 48 óra), endothelin-1-gyel (1, 10, és 100 nM, 24 óra) és β -adrenerg izoproterenollal (10 μ M, 48 óra) is kezeltük. A hPSC-CM sejteket ciklikus mechanikus nyújtásnak is kitettük (0.5 Hz, 10–25% sejtnyújtás, 24 óra). A hypertrophiát mediáló NFAT/calcineurin jelátvitel gátlására 200 nM dnNFATc1 vagy pGFP-VIVIT (Földes és mtsai, 2014) plazmiddal transzfektáltuk a hESC-CM sejteket. A kísérleteket sejt-permeábilis peptiddel 11R-VIVIT-tel is elvégeztük. A sejtek adrenerg válaszkészségét 10 μ M phenylephrine 48 órás adásával vizsgáltuk, a gátlószerek jelenlétében is. Az immunszuppresszáns kísérletekhez a H7 hESC-CM sejteket immunszuppresszáns szerekkel kezeltük: cyclosporin A, FK506, rapamycin, és 11R-VIVIT (Noguchi és mtsai, 2004) adásával 24 órán keresztül.

3.4. Immuncitokémia és vitális festések

A hypertrophiás tulajdonságok mikroszkópos jellemzésére kombinált immuncitokémiai és vitális festéseket alkalmaztunk. A sejteket automatizált mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.5. ADRA1A receptor overexpressziója hiPSC-CM sejtekben

Humán iPSC-CM sejteket ADRA1A-eYFP konstrukttal transzfektáltuk. A sejteket a transzfekció utáni napon phenylephrinnel vagy kontroll médiummal kezeltük 48 órán keresztül. ADRA1A sejtbeli lokalizációját monoklonális antitesttel mértük high content mikroszkóppal. A sejt méret mennyiségi meghatározására CellTracker Red CMTPX vitális festéket használtunk. Az ADRA1A és ANF mRNS szinteket kvantitatív PCR-rel mértük.

3.6. Sejthalálózás

Az élő sejtek festésére Vybrant FAM kaszpáz-3/7 apoptózis markert, BOBO-1/TOTO-3/Topro3 nekrozis markereket, Hoechst sejtmagfestést, és mitokondriális membrán potenciált mutató TMRM jelöléseket alkalmaztunk. Az antitest-alapú vizsgálatoknál anti-Ki67, anti-kaspáz-3, anti-NFAT1c, és anti-miozin nehézlánc α/β antitesteket használtunk. A nekrozis markerekből a BOBO-1 és a TOTO-3 jelölés fixálást követően is jól alkalmazható. A vizsgált szerek, így H_2O_2 (100 μM , 24 óra) és chelerythrine (CHE; 10 μM , 24 óra) toxicitását 3 nappal a sejtek szélesztését követően értékeltük.

3.7. Kvantitatív PCR - G protein kapcsolt receptorok és másodlagos jelátvitel

A kvantitatív PCR méréseket standard TaqMan Gene Expression Assay-kel és TLDA array kártyákkal végeztük el. A kvantitatív PCR-nél endogén, *housekeeping* kontroll génnek a GAPDH-t (FAM/MGB) választottuk (Arenas-Hernandez és mtsai, 2013). A G protein-kapcsolt receptorok expresszióját *SYBR green* PCR reakcióval határoztuk meg.

3.8. Foszfokináz assay

A hESC-CM és hiPSC-CM sejteket a hypertrophiás válasz kiváltására phenylephrinnel kezeltük. A foszfokinázok foszforilációs szintjeit a sejtek lizátumából határoztuk meg humán foszfokináz antitest array (Proteome Profiler) alkalmazásával. A biológiailag releváns kináz-interakciókat Ingenuity Pathways Analysis szoftver segítségével térképeztük fel.

3.9. Kinázgátlás

Kísérleteinkben a protein kináz gátlók hPSC-CM sejtnövekedést gátló hatását vizsgáltuk. A BioMol Screen-Well Kinase Inhibitor Library használatával a bazális és phenylephrine-indukálta változásokat közvetítő számos protein kináz szerepét is megvizsgáltuk a szívizomsejtek hypertrophiás változóiban.

3.10. High content mikroszkópia a szívizomsejt hypertrophia vizsgálatában

A szívizomsejtek mérésére automatizált mikroszkópok is alkalmazhatóak, ezeken egyszerre mérhetőek az egyes sejtkompartmentekben az immunfluoreszcens aktivitások; csoportonként több ezer sejt részletes adatai is meghatározhatóak rövid idő alatt. A hESC-CM és hiPSC-CM sejtek hypertrophiás válaszát ArrayScan VTi 2D automata mikroszkóppal (Cellomics, ThermoFisher Scientific) és a konfokális Opera LX, illetve Opera Phenix mikroszkópokkal (PerkinElmer) határoztuk meg. 2D képképzés: Az automatizált mikroszkópia és képfeldolgozás előnye, hogy specifikus algoritmusokat használhatunk az információk gyűjtésére és csoportosítására, így morfológiai assay-eket (pl. szarkomer struktúra, sejtméret), sejtkompartmentek önálló jellemzésére szolgáló assay-eket (pl. transzkripciós faktor nukleáris transzlokációja, sejtmag festés önálló vizsgálata). 3D képképzéshez és az optikai szelekteléshez konfokális nagyfelbontású mikroszkópot alkalmaztunk.

3.11. High content mikroszkópia a sejthalálózás vizsgálatában

A high content képalkotás hasznosnak bizonyul a nem specifikus válaszok és mellékhatások, így a gyógyszer toxicitás korai kiszűrésében is. A mitokondriális membránpotenciál, kaszpáz aktiválódás, sejtesztés, sejtmag átépülés és a sejtmembrán permeabilitásának növekedése alapján meghatározhatjuk a korai és késői apoptózis és nekrozis formákat.

3.12. Kolóniaképzés hESC-CM sejtekkel

A hESC-CM sejt kultúrából enzimátikus úton önálló sejteket szeparáltunk, azokból átlagosan 6000 sejtet szélesztettünk 96 lyukú tenyésztőedénybe a mérésekhez. A sejtek számát és kolóniaképző tulajdonságát miozin nehézlánc és Hoechst festésekkel, immunocitokémiával határoztuk meg 0, 2, 4, 6, 8, 10 nap után. Az egyes kolóniáknál a miozin-nehézlánc-pozitív kolóniákban kvantifikáltuk a sejtmagok számát.

3.13. In vivo vizsgálatok

Juvenilis Wistar Han patkányokat 10^8 AH-130 hepatoma sejtrel inokuláltuk intraperitoneálisan, a tumornövekedést 5, 7, 9, 11 és 13 napig követtük. A tumor növekedése a 8./9. napig volt exponenciális. A sham állatokban 7., 11. és 13. napon végeztünk funkcionális vizsgálatokat, így a kardiális funkció és a táplálék- és folyadékfelvétel mérését. Az állatokat β 1-blokkoló bisoprolollal, ACE-gátló imidaprillal, aldosteron-gátló spironolactonnal, vagy placeboval kezeltük. A betegség előrehaladtával a hepatomával beoltott állatokban súlyos cachexia fejlődik ki, amely progresszív testsúlyvesztésben nyilvánul meg. A hepatoma csoportokban ezért a tumor inokulációt megelőzően és a vizsgálat végén szintén meghatároztuk az állatok testtömegét, szöveti összetételét, lokomotoros aktivitását, kardiális funkcióját, és a táplálék- és folyadékfelvételét. A biomarkerek szintjét a levett plazmamintákból határoztuk meg. A proteozóma és kaszpáz aktivitásokat homogenizált kamrai szövetből fluorimetriás módszerekkel mértük. A kamrai protein és génexpressziókat Western blot és PCR reakciókkal mértük. A szív szöveti átépülés és fibrózis kimutatására hisztológiai vizsgálatokat is végeztünk.

3.14. Neonatális szívizomsejtek

A neonatális patkány szívizomsejteket spironolactonnal, bisoprolollal, SB415286-vel, aldosteronnal vagy isoproterenollal kezeltük. A kezelés 5. napján a sejteket mikroszkóp alatt vizsgáltuk, majd további vizsgálatokra feldolgoztuk.

3.15. Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat Graph Pad 5.0 és 7.0 (Graph Pad Inc., CA, USA) programokkal végeztük. A folyamatos változókat normál eloszlásnál átlag \pm mintaközép hibája (*standard error of mean*, SEM) formában, a nem normál eloszlásnál medián és interkvartilis tartománnyal, a kategorikus változókat db / % formátumban adtuk meg. Az adatokat az adott kísérleti elrendezésnek megfelelő statisztikai próbákkal (Student-féle t-próba, egyutas ANOVA-t követő Tukey/Dunnett post hoc tesztek vagy Mann-Whitney U teszttel) elemeztük. 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. Sejthalálozás

4.1.1. A patkány neonatalis szívizomsejtek és a humán PSC-CM sejthalálozásának összehasonlítása

A differenciálódás és a sejthalálozás jelátviteli közötti átfedések és kölcsönhatások vizsgálata igazolta, hogy a kaszpáz3 egyaránt fontos a kardiovaszkuláris rendszer kialakulásában és a kardiális működés fenntartásában (Abdelwahid és mtsai, 2016). Kimutattuk, hogy a sejtkárosító hatású chelerythrine aktiválja a kaszpáz3-at: a fluoreszcens jel növekedése mind a hESC-CM sejtekben, mind a neonatális patkány szívizomsejtekben jól reprodukálhatóan mérhető volt. A kaszpáz-3 aktiválódását a sejtek morfológiai változásai követik, így a sejtmembrán károsodása és a sejt zsugorodása. A sejtszám csökkenése mindkét sejttypusban szintén megfigyelhető; így 10 μ M chelerythrine kísérletes alkalmazása a kaszpáz3 aktiválódását, sejtszám csökkenését és mérsékelt nekrozist eredményezett mindkét vizsgált sejttypusban. A patkány (P) és humán (H) sejtek összehasonlítása azonban számos különbséget is feltárt a sejtek között, így érdemi eltérés volt a kaszpáz aktivitásban és ezzel párhuzamosan a sejtvesztés mértékében is. A nekrozis mértéke a két sejttypusban ugyanakkor nem tért el egymástól. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a humán ESC-CM a chelerythrine kezelésre kevésbé érzékeny, a látott apoptózis nem fordult nekrotikus folyamattá ezekben a sejtekben. A korai apoptotikus események során jól megfigyelhető a sejthalálozást mediáló molekulák citoplazmabeli és sejtmagbéli transzlokációja. Ennek következtében az effektor kaszpázok aktiválódnak és a sejtmag DNS állománya károsodik (Wan és mtsai, 2008). A szívizomsejt apoptózisában a mitokondriális károsodás központi jelentőségű, hiszen az intracelluláris ATP raktárak kiürülnek, ez pedig az apoptózist nekrozis irányába tolja el. Az alkalmazott koncentrációban a korai hESC-CM sejtek kevésbé voltak érzékenyek, mint a patkány szívizomsejtek, amit a magasabb sejtszám és a mérsékelt apoptózis jelzett - változatlan nekrozis arány mellett. A differenciáció után tartósan (65 napig) kultúrában tartott hESC-CM sejtekben kapott válasz azonban megegyezett a patkány sejtekben látott maximális válasszal. Az éretlen szívizomsejtek jellemzően rezisztensek voltak oxidatív stresszre, ami magyarázhatja a korai hESC-CM kultúrák alacsony válaszkésztségét chelerythrinere.

Eredményeink alapján állítható, hogy a *high content* alapú kardiotoxicitás assay-k megbízhatóak és jól reprodukálhatóak. Összességében a markerek kombinált alkalmazása mind fixált, mind élő szívizomsejteken pontos képet ad az egyes toxikus szerek időbeli hatásairól, azonban az egyes (állati eredetű, illetve humán) sejttypusok eltérő válaszkésztségét az egyes szerek kardiotoxikus hatásának vizsgálatánál figyelembe kell vennünk. Az őssejt eredetű szívizomsejtek előnyösek az ilyen vizsgálatok elvégzésére, elsősorban a hosszú élettartamuk miatt. A gyógyszeriparban ezért sok helyen a CHO és HEK sejtek helyett, specifikusabb alkalmazásukra is lehetőség van a kardiovaszkuláris és toxikológiai vizsgálatokban. Ugyan az állati eredetű, felnőtt vagy neonatális szívizomsejteket ez a technológia egyelőre nem váltja ki teljesen, de kihasználva a humán sejtek eltérő fenotípusát,

általuk egy klinikailag fontosabb és megbízhatóbb kardiotoxicitási vizsgálat válik lehetővé. Ezáltal számos, késői fázisú humán vizsgálatra alkalmatlan vegyület már az in vivo vizsgálatok előtt azonosítható.

4.1.2. Kardiotoxikus szerek vizsgálata hPSC eredetű szívimomsejteken

A kidolgozott őssejt-alapú kardiális toxicitás assay-k klinikai alkalmazása is lehetséges. Ennek igazolására az onkológiai terápiában használt szerek hatásait vizsgáltuk hPSC-eredetű szívimomsejteken. Kimutattuk, hogy a humán iPSC eredetű szívimomsejtekben a kemoterápiában alkalmazott antraciklin (doxorubicin) kezelés hatására a kaszpázok aktiválódása fokozódik, megtartott mitokondriális membránpotenciál mellett is. Észlelésünknek a kemoterápiás szerek kardiotoxikus hatásainak jobb megértésében, ezáltal azok kivédésében lehet fontos szerepe. Ezek által módosított tumor jelátviteli útvonalak azonban a szívimomsejtekben is központi szabályozó szerepet töltenek be, ezért a gyakran sejtprotektív útvonalak gátlása mitokondriális dysfunkciót, energiaháztartási zavart és sejthalálózást okoz.

4.1.3. Immunoszuppresszív szerek a szívimomsejtek halálózásában

Az immunoszuppresszáns gyógyszer család több tagja alkalmazásra kerül a sejterápiában és kardiális transzplantációban. Megvizsgáltuk ezért e gyógyszerek sejthalálózást befolyásoló aktivitását. A sejthalálózás kiváltására a hESC-CM sejt kultúrákat chelerythrine-nel kezeltük ismét; a sejthalálózást aktív kaszpáz3, BOBO-1 nekrozis marker immunfluoreszcens detektálásával, valamint a sejtmag átépülés leírásával kvantifikáltuk. A hESC-CM sejtek az energiefelhasználásuk, morfológiájuk, génexpressziós és protein expressziós profiljuk akapján a felnőtt kamrai sejtekhez hasonló érettséget nem érnek el a differenciáció végére. Ez az eltérés egyben egy természetes rezisztenciát jelenthet a cyclosporin A indukálta válaszokra. Kísérleteinkben sem az FK506, sem a 11R-VIVIT, amely a calcineurin/NFAT kapcsolat specifikusabb gátlószere, nem fokozta a sejthalálózást. Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy a calcineurin/NFAT gátlás nem jelent közvetlen toxikus ártalmat a hESC-CM sejt kultúrában. Kimutattuk emellett, hogy a CsA, FK506 és a 11R-VIVIT részlegesen gátolják a chelerythrine-indukálta kaszpáz3 aktivációját hESC-CM sejtekben. A calcineurin gátlása közvetlenül is javíthatja a sejtek életképességét, erre a 11R-VIVIT-specifikus NFAT gátló hatása utal. Azt azonban nem lehet kizárni, hogy további mechanizmusok is állhatnak az észlelt védőhatások hátterében. Így a mitokondriális permeabilitási pórus nyitásának gátlása (cyclosporin A) (Alfaro és mtsai, 2008) és az mTOR gátlása (FK506) (Romano és mtsai, 2010). A rapamycin részleges védőhatása szintén igazolható volt chelerythrine-kezelt szívimomsejtekben, ami arra utal, hogy az mTOR gátlása oxidatív stresszben pozitív hatású lehet. Ez egybeváág mások korábbi vizsgálati eredményeivel is, ahol a rapamycin protektív hatását írták le ischaemia-reperfúzió során egérben, illetve egér felnőtt szívimomsejtekben (Khan és mtsai, 2006).

Levonható az a következtetés ezek alapján, hogy az allogén sejtek transzplantációjakor myocardialis infarktust követően, amikor a lokális ischemia és oxidatív stressz káros lehet a beültetett sejtek számára, az immunszuppresszív szerek javíthatják a beültetett kardiális graft sejteinek életképességét. A hESC-CM sejtekkel végzett transzplantációs vizsgálatokban a cyclosporin A, az általunk is alkalmazott dózisban, javította a sejtek túlélését (Laflamme és mtsai, 2007; Pearl és mtsai, 2011).

4.2. Sejtmag transzport

A részletes állatkísérletes eredmények, valamint az emberi myocardium közvetlen vizsgálata olyan összefüggéseket írt le a hypertrophiás szabályozó hálózatok komplexitásáról, és az egyes elemek többszörös átfedéséről (Ryall és mtsai, 2012), amelyek a gyógyszerfejlesztési lépések megtervezését kifejezetten nehezíti teszik. Ezen sejtszintű párhuzamos folyamatok egyik központi, de kevésbé vizsgált eleme a sejtmag transzport szabályozása. A nukleáris transzport integráló csomópontja lehet azoknak a jelátviteli utaknak, amelyek végül a hypertrophiás gének aktiválódásához vezetnek, így a sejtmag transzporttal, mint egy potenciális terápiás gyógyszerfejlesztési célponttal számolhatunk.

A hypertrophiát mediáló mechanizmusok és folyamatok időbeli lefutásának tisztázására α -adrenerg agonista phenylephrinet használtunk, amely a G_{α_q} -mediálta patológiás hypertrophia egyik ismert stimulusa (Davies és mtsai, 1994; Geng és mtsai, 1999). A felnőtt patkányból izolált szívizomsejteket 48 órán át kezeltük, ennek következtében a sejtméret, a sejtmagméret és az ANF expresszió jelentősen megnőtt a kontrollhoz képest. Emellett egy in vivo ischemiás szívelégtelenség modellben a patkányok infarktust követő 16. héten (kifejlődött szívelégtelenségben) ennél még kifejezettebb ANF választ is kaptunk. A phenylephrinre adott válasz hasonlóan alakul: megnövekedett CRM1 export protein szintek, csökkenő import protein expressziók, az import folyamatért felelős receptorok átépülése, valamint a fluoreszcensen jelölt NLS (*nuclear localization signal*)-kapcsolt szubsztrát csökkent felvétele sorolható fel. A neonatalis patkány szívizomsejtekben phenylephrine vagy angiotenzin II hatására, illetve a celluláris kalcium szintek direkt csökkentése nyomán a sejtmag importfolyamata gátlódik. Ennek kapcsán megfigyelhető a nukleáris pórusok átépülése, és az ennek következtében megváltozott egyensúly a hypertrophiás fenotípus kialakulásának egy korai lépését jelenti. Vizsgálataink azt igazolták, hogy ez a jelátvitel másodlagos hírvívő útvonalak aktiválódásához kötött, nem pedig egy direkt expressziós változáshoz. Azt találtuk, hogy a HDAC faktorok foszforilálódását és a sejtmagból való kikerülésüket (exportjukat) követően a hypertrophiás, többek között a MEF2 transzkripciós faktor-mediálta génprogram aktiválódik.

Az őssejt-alapú vizsgálataink szerint (Földes és mtsai, 2011) ezért kis molekulájú, HDAC II (McKinsey és mtsai, 2007; Heineke és mtsai, 2006) vagy p38 MAPK (Földes és mtsai, 2011) gátlószereket választottunk, hogy a különböző jelátviteli utak szerepét tisztázzuk a phenylephrine-indukálta hypertrophiás válaszban. A p38 MAPK gátlás szabályozó szerepét

egyaránt igazoltuk siRNS csendesítés alkalmazásával és egy domináns negatív konstruktum overexpressziójával. Kísérleteinkben a p38 gátlószer mind a sejtméretet, mind az ANF expressziót csökkentették, és ezzel párhuzamosan a nukleáris importot is gátolták.

Kimutattuk, hogy a jelátviteli utak gátlása trichostatin A (HDAC II-gátló) vagy SB202409 (p38 gátló) vegyületekkel normalizálja a nukleáris pórus expresszióját, visszaállítja a nukleáris import megfelelő alapértékét és a transzport receptorok újraeloszlását visszafordítja. A sejtmag-cytoplazma közötti aktív kommunikációs kapcsolat fenntartása szükséges a megnövekedett nukleáris exporthoz, így ez csak a sejtmag import gátlásának terhére történhet meg. A csökkent kapacitás így modulálná a MEF2-függő és az NFAT-mediálta transzkripció folyamatokat és végül a szívizomsejtek hypertrophiás fenotípusának kialakulását is.

A sejtmagtranszport rendszerének átépülése és funkciójának megváltozása a szívelégtelenség korai hypertrophiás fázisában megfigyelhető volt, már 4 héttel az átépülést kiváltó myocardialis infarktust követően. Hasonlóképpen, ez a válasz más modellekben, így phenylephrine-indukálta hypertrophiában is kimutatható volt. Az exportin/crm1-függő sejtmag export gátlása leptomycin B-vel meggátolja, sőt visszafordítja a hypertrophiás folyamatot. Kérdés marad azonban, hogy a crm1-függő export hosszútávú gátlása mennyiben befolyásolja a kardiális funkciót. A sejtmagexport elsősorban onkológiai céllal kifejlesztett, új szelektív gátlószerrei (SINE) már rendelkezésünkre állnak, ezek vizsgálata érdekes új klinikai lehetőség lehetne szívelégtelenségben is (Bossuyt, 2015). Az ilyen gátlószerekkel a sejtmagtranszportot lehetne közvetlenül befolyásolni, nem pedig a transzportált faktorokat.

4.3. Össejt eredetű szívizomsejtek differenciációja és jellemzése

A szívizomsejtek differenciáltatásához használt protokollok jelentősen fejlődtek az elmúlt évtizedben; a jelenleg alkalmazott metodikával ma már >95% tisztaságú szívizomsejt kultúra hozható létre. A monolayer technikánál (Aggarwal és mtsai, 2014) ugyan a GSK3β gátlószer indukálják a kardiális differenciációt, de a teljes hatáshoz az endogén BMP4 és Activin/NODAL/TGFβ jelátvitel aktiválására is szükség van. Látható, hogy az in vitro alkalmazott szignálok kifejezetten hasonlítanak az in vivo embrionális fejlődés központi szignáljaira. A differenciáció során a pluripotens őssejtek az in vivo mintához hasonlóan T (brachyury)-pozitív(+), MESP1+, NKX2-5+, MEF2C+, TBX5+, és végül myosin nehézlánc (MYH6+ / MYH7+) populációs fázisokon mennek keresztül. Az ezért felelős génhálózatok aktivitása szintén megfeleltethető az in vivo génmintázatnak.

A felnőtt szívizomsejtekhez képest az őssejt eredetű szívizomsejtek mérete relatíve kicsi (20 μm), formájuk változó. Ezek a szívizomsejtek képesek spontán kontrakcióra, az összehúzódások frekvenciája magasabb a késői sejt kultúrákban. A strukturális érésre más bizonyítékot is találunk a tartós sejt kultúrában: ezekben a sejtekben már nem csak szabálytalan myofibrillum, hanem rendezett szarkomer rendszer is látható. Ugyanakkor a sejteknek mindössze néhány százaléka ilyen érettebb forma, a sejtek jelentős többsége

megőriz valamiféle éretlen struktúrát még a késői kultúrákban is. Elektrofiziológiai vizsgálatokkal több szívizomsejt populáció is elkülöníthető a sejt-kultúrában. Kamrai, pitvari, és nodalis/pacemaker sejtek egyaránt megtalálhatóak (Lee és mtsai, 2017). A szívizomsejtek differenciálása során egy fontos lépést jelent annak meghatározása, hogy a létrehozott sejtek milyen üregi specificitást mutatnak, a kamrai, pitvari, pacemaker sejtek hogyan különíthetők el a populációban. Az elkülönítésnek fontos terápiás jelentősége lehet, hiszen a kamrai sejtek transzplantációja az ischemiás szívbetegség kezelésében játszhat szerepet, míg a nodális sejtek bejuttatása a ritmus- és vezetési zavarok sejtterápiás megoldását jelenthetik. A differenciált hPSC eredetű kultúrában a kamrai sejtek dominálnak, a pitvari szívizomsejtek ~15–20%-ot, míg a nodális sejtek ~5%-ot tesznek ki. Az egyes altípusok elkülönítésére struktúrális, elektrofiziológiai és molekuláris markerek állnak rendelkezésre (Kane és mtsai, 2017). A fenotipizálás pontosításával a célzottabb, kamra-specifikus differenciáció is rutinszerűvé válhat.

4.3.1. Beteg-specifikus szívizomsejtek

Az elmúlt évek új fontos iránya a humán pluripotens őssejtekből képzett kardiovaszkuláris sejtek (szívizomsejtek, endothelsejtek és simaizomsejtek) korai gyógyszervizsgálatokra és a szívbetegségek *in vitro* modellezésére való alkalmazása. A humán embrionális őssejtekből differenciált sejtek (hESC-CM) és az indukált pluripotens őssejtekből képzett sejtek (hiPSC-CM) betegség- és beteg-specifikus genotípussal és fenotípussal bírnak (Park és mtsai, 2008). A humán indukált pluripotens őssejteket alkalmazó betegségmodellezés alapja az, hogy a betegek testi sejtjeiből (leggyakrabban: a perifériás vér lymphocytái és bőr fibroblasztok) transzkripciós faktorok kívülről való bejuttatásával embrionális állapotba visszaprogramozott őssejteket (iPSC) hozunk létre. Ezt követően az iPSC sejtekből a betegség által érintett sejtípusokat differenciáltatunk és ezeken vizsgáljuk a kardiovaszkuláris betegség megjelenését vagy egyes sejt szintű jellemzőit. A humán pluripotens őssejt vonalak a laboratóriumban korlátlan ideig szaporíthatóak és a tenyésztési körülmények megváltoztatásával képesek a szervezetet felépítő sejtípusok létrehozására. E tulajdonságaik alapján jó modellként szolgálnak az öröklött monogénes és számos szerzett kardiális megbetegedés mechanizmusának kutatására. Új tesztrendszerként alkalmazhatók a kardiális toxikológiai vizsgálatokban és a jövőben a sejt-alapú terápiák sejtforrásául szolgálhatnak. Nagy előnyük, hogy nem csak az egészséges sejtek élettanát lehet kutatni a segítségükkel, hanem, ha az őssejt vonalak létrehozásához betegekből származó sejteket használunk, akkor számos betegség is vizsgálhatóvá válik.

4.4. A humán szívizomsejtek hipertrófiás válaszkészségének vizsgálata *in vitro*

Első őssejtmodelljeink azt igazolták, hogy a hESC-CM sejtek egyaránt képesek az ismert patológiás és fiziológiás hypertrophiás stimulusokra választ adni (Földes és mtsai, 2011). Adrenerg stimulus hatására a hESC eredetű szívizomsejtekben az ANF génexpressziója jelentősen fokozódik, a sejtek teljes fehérjetartalma megnő; összességében egy érettebb, a felnőtt kamrai sejtekre sokban hasonlító sejt jön létre. Egy mechanikus stimulust, a ciklikus

feszítést alkalmazva, hasonló változásokat regisztráltunk sejtek hypertrophiás válaszában, így a sejt méretében és szarkomer struktúrájának elrendeződésében.

4.4.1. Intracelluláris kinázok mediátor szerepe a szívműködés hypertrophiájában

A hypertrophiás hatás létrejöttében számos MAP kináz és ezek közül leginkább a p38 MAP kináz mediáló szerepe igazolható. A p38 MAP kináz gátlása (SB202190 gátlószerrel) egyaránt gátolta a bazális sejtnövekedést és a phenylephrine-indukálta hypertrophiát is. Emellett a HDAC II, ERK, JNK, CAMK II, mTOR, calcineurin, és calcineurin/FKBP gátlása is csökkentette a phenylephrine-indukálta sejtméret növekedését. A kiválasztott p38 MAP kináz szerepének jellemzésére kis molekulású p38 MAP kináz gátlószereket, siRNS-t vagy domináns-negatív p38 adenovirust alkalmaztunk, ezekkel a phenylephrine hypertrophiás hatása kivédhető volt. A p38 rendszer előzetes gátlásával az előkezelt sejtekben a hypertrophiás hatást sikerült teljesen megszüntetni. A MAP kináz kináz 3 (MKK3) a sejtméretet, az ANF génexpresszióját, a szarkomer és citoskeleton elrendeződését fokozta, ezáltal a sejtek hypertrophiájához vezetett. A kinázhatás egy érdekes eleme volt, hogy bár az embrionális sejtek mononukleárisak, a p38 aktivitás hatására mégis binukleáris sejtek jöttek létre, amely tulajdonság már a felnőtt szívműködés sajátossága.

4.4.2. A humán ESC és iPSC eredetű szívműködés eltérő hypertrophiás válaszána vizsgálata

A hiPSC rendszer alkalmazásával a genetikai hátterű szívbetegségek modellezése az elmúlt években sokkal pontosabbá vált. Ugyanakkor a kutatók a modellek korlátaira is felhívták már a figyelmet, különösen a hiPSC és a hESC közötti esetleges különbségek hangsúlyozásával (Ma és mtsai, 2014). Alapvető fontosságú annak tisztázása, hogy a hiPSC és hESC kultúrák mennyiben különböznek egymástól. Ezért vizsgálatainkat több őssejtvonalra kiterjesztettük, és az újonnan kifejlesztett, automatizált in vitro assay-k alkalmazásával az eddigi MAP kinázokon kívül új intracelluláris jelátviteli célpontokat is vizsgáltunk.

Az α -adrenerg receptorok központi szerepet játszanak a sejtméret regulálásában, ideértve a hypertrophiás és proliferatív folyamatokat. Ezért alapvető fontosságú volt, hogy az újonnan létrehozott hESC-CM és hiPSC-CM sejteket az α 1AR mintázatuk alapján is megvizsgáljuk. Eredményeink azt igazolták, hogy a klasszikus α 1AR agonista phenylephrine hatékonyan aktivál számos hypertrophiás változót, így a sejtméretet, sejtvolument, ANF mRNS szinteket, szarkomer elrendeződést és a sejt protein/DNS arányát (Földes és mtsai, 2011). Míg a felsorolt változások mindegyikét észleltük a különböző őssejtvonalakból származtatott hESC-CM sejteken, addig meglepetésre a hiPSC eredetű szívműködés phenylephrine-re nem reagáltak. A phenylephrine hatás feltűnő hiánya egyaránt független volt a sejtek differenciálathoz alkalmazott kiindulási hiPSC vonalaktól, a sejt kultúra feltételektől, az újraprogramozás és differenciálathoz módjától.

Évtizedek óta ismert, hogy a legtöbb fajban, a felnőtt szívben dominánsan expresszáldó G-protein kapcsolt α -adrenerg receptor az α_1 -AR (Bruckner és mtsai, 1985) katekolaminokkal (receptor agonistákkal) való stimulálása pathológiás hypertrophiát eredményez (Zhong és mtsai, 1999). Az eddigi modellrendszerek ezért az α_1 AR aktiválásával kapott válaszokra fókuszálnak, hogy a hypertrophiás jelátviteli folyamatokat és az azokat befolyásoló esetleges terápiás faktorokat jobban megismerhessük. Az ADRA1A altípus mRNS szintje azonban szövetenként és sejtípusonként is eltérő lehet (Stewart és mtsai, 1994); az alkalmazható agonisták, amelyek az egyes sejtekben hatékonyan módosíthatják az ADRA1A mRNS szinteket, szintén különbözőek lehetnek. A humán szívtranszplantációkor eltávolított szívekből izolált szívizomsejteken elvégzett méréseink azt igazolták, hogy az α_1 AR (ADRA1A gén) a felnőtt szívszövet és kamrai szívizomsejtek dominánsan expresszáldó receptor altípusa. Ugyanakkor az összejtől differenciált szívizomsejtekben ez a receptortípus nem mutatható ki. ADRA1A mRNS alacsony expressziója ugyan mérhető volt a differenciálatlan hESC és hiPSC összejtekben, de a szívizomsejt és fibroblaszt irányú differenciálódás kezdetén ennek szintje gyorsan mérhetetlenül alacsonyra csökken. Szoros párhuzamosságot találtunk az összejtek pluripotencia génjeinek csendesedése és az ADRA1A receptor kikapcsolódása között; ez a folyamat független volt a használt sejtvonaltól és az újraprogramozás módjától is. Ennek igazolására hESC (HUES7) sejteket differenciálttunk fibroblasztokká és szívizomsejteké, majd a differenciált sejtek újraprogramozásával új hiPSC vonalat hoztunk létre, amelyet aztán ismét fibroblasztokká és szívizomsejteké alakítottunk (hESC→fibroblaszt→hiPSC→szívizomsejt). Így egy olyan „zárt” rendszert hoztunk létre, amelyben az így generált, azonos genotípusú differenciálatlan összejteket és az azokból differenciált kardiális sejteket hasonlítottuk össze. A α_1 -AR csendesedése mind a hESC-CM, mind a hESC eredetű hiPSC-CM sejteken megfigyelhető volt. A további α -adrenerg receptor altípusok vizsgálatával azt is igazoltuk, hogy a differenciálódás során egy egyedi, nem pedig az ontológiás ADRA1A receptor altípus aktiválódik. Az aktiválódás eltolódik egy domináns ADRA1B altípus irányába mind a hiPSC-CM, mind a hESC-CM sejtekben. Ez a párhuzamos aktiválódás ugyanakkor szintén nem magyarázza a két sejtípus eltérő válaszkészségét és egyelőre megválaszolatlan maradt az eredeti kérdés, hogy a hESC-CM-ben mérhető hypertrophiás válaszkészség és a hiPSC-CM-ben látható válasz hiánya milyen egyéb jelátviteli utak részvételének eredménye.

Az ADRA1A receptort overexpresszáltattuk a szívizomsejtekben, remélve, hogy a receptor „pótlása” a válaszkészséget növeli. A tény, hogy ez a beavatkozás és a magas receptor expresszió nem növelte a phenylephrine hypertrophiás hatását arra utalhat, hogy a jelátvitel későbbi lépcsőinek defektusa, illetve valamely sejt szintű elem aktív gátló beavatkozása is közrejátszhat a phenylephrine hatás elmaradásában. Az α_1 AR-mediálta hypertrophia intracelluláris válaszának következő elemeit a G proteinek jelentik; az agonista receptorhoz való kötődésekor a G α_q protein aktiválódik a G $\beta\gamma$ proteinek disszociációját követően.

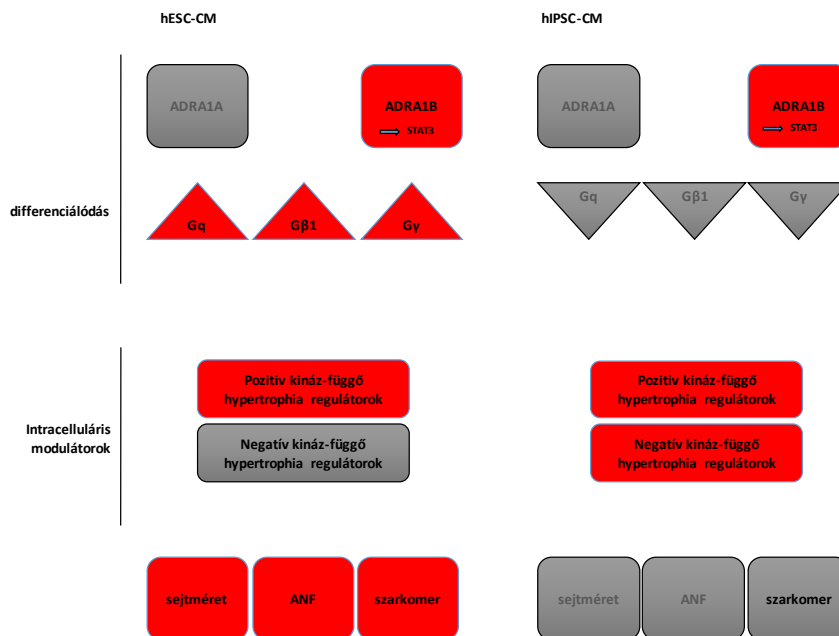
A G α_q , G β , és G γ proteinek szintje a differenciálatlan hESC és hiPSC kultúrákban egymáshoz hasonló volt (és a felnőtt szívizomsejtekkel is megegyező), a differenciálódás során egyértelmű

különbségeket találtunk. A hESC differenciálódása *Gq*, *Gβ1*, és *Gy2* mRNS szintek fokozott expresszióját eredményezte, ugyanakkor a hiPSC sejtek differenciálódása során ezek expressziója változatlan maradt vagy akár csökkent is. Ez egy olyan érdemi különbség a két őssejt-típus között, amely a hypertrophiás válasz elmaradásához feltétlenül hozzájárulhat. Fontos azonban, hogy más G-protein kapcsolt hypertrophiás faktorok (endothelin-1 és angiotenzin II) az egyes sejt-típusokban csak minimális sejt-méret növekedést okoznak, de az ANF és a BNP expresszióját jelentősen növelik, még a hiPSC-CM sejtekben is. Ez arra utal, hogy a G protein kapcsolt receptor jelátvitel nem teljesen inaktív ezekben a sejtekben.

2D és 3D *high content* mikroszkópos analízissel azt vizsgáltuk ezt követően, hogy a hypertrophiás jelátviteli utak hESC-CM és hiPSC-CM sejtekben hogyan kapcsolódnak össze, és mennyiben befolyásolják a phenylephrine-indukálta kinázok foszforiláltságát. Számos hypertrophiás paraméter esetében a kinázgátlók negatív hatása igazolódott. Ide sorolhatóak a p38-MAPK, ERK1/2, és mTOR inhibitorok a hESC-CM sejtekben (Földes és mtsai, 2011). Más gátlószerek, így például a GSK3β és EGFRK-re hatóak hasonlóan növelték a sejt-méretet és felületet, ami arra utal, hogy egy tonikus/bazális gátlás akadályozza a sejt-növekedést. Ez együttesen egy kifejezettebb tonikus gátlást jelent az ADRA1B hypertrophiás válasza hiPSC-CM sejtekben. A phenylephrine-függő kináz foszforiláció kimutatására proteom mérést alkalmaztunk. A mérésorozat elsősorban az src kinázcsalád aktiválódását mutatta mindkét sejt-típusban. Az src nem-receptor tirozin kináz csoport szerepét korábban a G protein-függő receptor internalizációban, valamint sejtproliferációban, sejt-váz átépülésben igazolták (Laflamme és mtsai, 2007). Az adatokat az Ingenuity Pathway Analysis algoritmusával értékeltük: ez az ADRA1B aktiválódását és az általa indukált hypertrophiás választ egy EGFR/Src/GSK3β/STAT3 kinázhálózat moduláló szerepével kapcsolta össze. Ebből a hálózatból a STAT3 egyike azoknak a faktoroknak, amelyek már korábban bizonyítottan az ADRA1B jelátvitelhez kapcsolódnak (Han és mtsai, 2008). Ez a megfigyelés megfelel annak a korábbi vizsgálati eredménynek is, amely szerint az Src-függő ADRA1 jelátvitel és az EGF jelátvitel kardiális hypertrophiában összekapcsolódik (Li és mtsai, 2011; Zitron és mtsai, 2008; Asakura és mtsai, 2002).

Ezt támogatja saját megfigyelésünk is, miszerint a STAT3 gátlása közvetlenül csökkentette a bazális és phenylephrine által indukált sejt-méret növekedést a hESC-CM sejtekben, valamint a bazális sejt-méretet a hiPSC-CM sejtekben. A STAT3 aktiváló interleukin6 (IL6) a phenylephrine-indukálta sejt-méret növekedést szignifikánsan fokozta. Azt találtuk, hogy a phenylephrine a STAT3 nukleáris transzlokációt jelentősen fokozta, de a hiPSC-CM sejt-méretét a phenylephrine csak IL6 jelenlétében tudta növelni. A phenylephrine hatására bekövetkező transzlokáció és ezt követően az EGFRK/GSK3β STAT3-n szimultán aktiválódása okozza a sejt-méret végleges változását. Egy kombinált kinázgátlást használtunk, hogy meghatározzuk a hiPSC-CM-ben látott antihypertrophiás hatásért felelős legfontosabb faktorokat és kombinációjukat. A mérés igazolta, hogy az EGFRK/GSK3β gátlószerek kombinációja, együtt a CAMKII inhibitorokkal optimális összeállítás lehet a sejt-méret

növelésére. Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a hiPSC-CM sejtekben az α_1 AR stimulálását követően észlelt hiányzó válasz elsősorban a tonikus antihypertrophiás jelátvitel (így az EGFRK, GSK3 β , CamKII) aktiváltságára vezethető vissza.



1. ábra: Sematikus összefoglaló a pluripotens őssejt eredetű szívizomsejtek (hiPSC-CM és hESC-EC) adrenerg stimulusokra adott eltérő hypertrophiás válaszkészségéről. Pirossal jelölve az aktív/aktiválódó komponensek, szürkével az inaktív, csendesített jelátviteli elemek.

Eredményeink alapján a hiPSC-CM és a hESC-CM sejtek számos tulajdonságukban eltérnek egymástól, a különbségekért a több ponton eltérő szabályozó mechanizmusok felelősek, ideértve a receptorok expresszióját és a kinázok hatásmechanizmusát. A humán pluripotens őssejtekből képzett szívizomsejtek terápiás szövetpótlásra, gyógyszervizsgálatokra és a szívbetegségek modellezésére való alkalmazása új lehetőséggé vált az elmúlt évtizedben. Az *in vitro* sejtmódellem alkalmas lehet a kardiális hypertrophia jelátviteli mechanizmusainak vizsgálatára. A hypertrophiás vizsgálataink azt mutatják, hogy a humán pluripotens őssejt eredetű szívizomsejtek alkalmasak lehetnek a humán szívbetegségek, így a szívmeagnagyobbodás és szívszöveti átépülés modellezésére *in vitro* körülmények között. Olyan új intracelluláris jelátviteli utakat írtunk le, amely utak befolyásolása terápiás jelentőségű is lehet és a létrehozott sejtek érettségét is fokozhatja. Az itt alkalmazott szívizomsejt modellek arra is lehetőséget teremtettek, hogy a genetikai hátterű szívbetegségben szenvedő betegek sejtjeiből újraprogramozott, beteg-specifikus hiPSC sejteket hozzunk létre. Ugyanakkor azt találtuk, hogy az őssejtekből képzett szívizomsejtek hypertrophiájáért felelős intracelluláris jelátviteli utak, a látszólagos hasonlóságok ellenére, eltérnek a felnőtt kamrai szívizomsejtétől. Az eltérésnek a gyógyszerfejlesztésben lehet fontos szerepe, hiszen a pluripotens őssejtekből származtatott szívizomsejtek válaszkészsége jelentősen különbözhet számos helyzetben.

4.5. Szívizomsejt proliferáció

Noha van a szívnek saját regenerációs kapacitása, de ez igen limitált és az infarktushoz társuló jelentős szívizomzat károsodás pótlására nem elegendő. Az egyik megoldási lehetőség új exogén szívszövet létrehozása és növekedésének kontrollált serkentése. Az őssejtekből érett humán szívizomsejtek képzése, majd azok proliferációjának stimulálása egy olyan kombinált terápiás stratégia lehet, amelyet a sérült szívizomzat regenerációjában is alkalmazhatunk. Az embrionális őssejtből és hiPSC-ből képzett szívizomsejtek is képesek osztódni. A differenciáltatás utáni korai szakaszban a sejtek nagy százaléka még proliferál. A tartósan fenntartott sejt kultúrában, a proliferáló sejtek aránya jelentősen csökken, mivel a sejtek kilépnek a sejt ciklusból és G0 fázisba kerülnek - párhuzamosan a rendezett szarkomer struktúrák kialakulásával (Földes és mtsai, 2011). A sejtek morfológiája kezdetben valóban szabálytalan, de tartós sejt kultúrában és a külső mechanikai behatásokra ez rendeződik. A létrejött klónok és a sejt szám több időpontban történt mérésével azt találtuk, hogy átlagosan 10 napra tehető a sejt szám megkettőződéséhez szükséges idő.

4.6. In vivo vizsgálatok

A tumoros és myocardialis jelátviteli szabályozásokban fellelhető párhuzamosságokat eddig már több vizsgálat igazolta. A szívszöveti átépülés és az onkogén jelátvitel többszörös átfedését a mi in vivo vizsgálataink is megerősítették. Patkányokban az AH-130 hepatoma modellt alkalmaztuk a sejthalálozásban és a myocardialis átépülésben szereplő jelátvitel vizsgálatára. A betegség előrehaladtával a hepatomával beoltott állatokban cachexia fejlődött ki, amely étvágytalanságban, testsúlycsökkenésben és a zsírszövet megfogyásában nyilvánult meg. A súlycsökkenés az egyes szerveknél is bekövetkezett, így a szív és bal kamra tömege a testsúly fogyásával párhuzamosan csökkent. Az AH-130 állatokban ez a kardiális funkció romlását is eredményezte. Ebben a modellben határoztuk meg a szívelégtelenség kezelésére rutinszerűen használt klinikai gyógyszerek kardiális hatását, elsősorban a szívizomszövet csökkenésére és az állatok mortalitására fókuszálva. Célunk annak tisztázása volt, hogy a szívelégtelenség standard terápiájában alkalmazott gyógyszerek közül melyiknek lehet szerepe az átépülés és funkció javításában. Kísérleteinkben a szelektív β_1 -gátló bisoprolol, az aldosteron-gátló spironolacton, és egy ACE-gátló, az imidapril kardiális funkcióra kifejtett hatását vizsgáltuk. Az imidapril hatástalannak bizonyult, de a bisoprolol és spironolacton nemcsak kivédte a funkció romlását, de az AH130 patkányok túlélését is javította.

A bisoprolol és spironolacton a bal kamrai tömegvesztését is kivédte, de az imidaprilnak nem volt hatása az atrophias folyamatra. A szívizomszövet vesztéssel egyidejűleg a plazma troponin I és T szintek is megnöttek, ami a szívszövetben zajló nekrosis jelének tekinthető. Az apoptotikus útvonalak aktiválódását a megnövekedett kaszpáz3 szintek igazolták. A bisoprolol és a spironolacton csökkentette a cachexiához társuló kaszpáz szint növekedést a myocardiumban. Az UPS emelkedett aktivitása az AH130 patkányok szívében a tumor implantáció 11. napjától kezdve kimutatható volt. A bisoprolol és spironolacton kezelés csökkent tripszin-szerű aktivitást eredményezett a hepatomás állatokban. Ezzel ellentétben a peptidil-

glutamil peptid hidrolizáló aktivitás megnövekedett az imidapril csoportban a placeboval kezelt állatokhoz képest; az imidapril szintén növelte a proteoszómák kimotripszin-szerű aktivitását.

A myocardialis szövetvesztéshez kapcsolódóan a miozin nehézlánc protein szintjében is kifejezett csökkenés volt kimutatható a tumoros állatokban: mRNS szinten mind az α -MHC, mind a β -MHC csökkenő expressziót mutatott. Spironolacton és bisoprolol adása a MHC szintek csökkenését kivédte. Az imidaprilnak ilyen hatása nem volt. Ezek a hatások, együttesen a GSK-3 α és GSK-3 β foszforilációjában látott csökkenéssel, a protein szintézist reguláló mTORC1 csökkent aktivitását eredményezhetik. In vivo, a bal kamra tömegének csökkenéséért összességében több mechanizmus is felelőssé tehető. A megnövekedett UPS aktivitás, fokozott (kaspáz-mediálta) apoptózis, nekrosis (emelkedett troponin szintek) és autofágia (emelkedett LC-3 II/I arány és csökkent p62 szintek). A β 1 gátlószer, így a bisoprolol valamint az aldosteron antagonistá spironolacton dózis-függő preventív hatását igazoltuk. Velük ellentétben az ACE-gátló imidapril nem javította a túlélést. Bisoprolol adásával a testsúly, étvágy, szövetek tömege és zsírszövet mennyisége megtartott maradt; az állatok lokomotoros aktivitása és kardiális funkciója szintén javult. A bal kamra súlyvesztését a bisoprolol és spironolacton egyaránt kivédte.

Azt feltételeztük, hogy a spironolacton és a bisoprolol kardiális atrophiat csökkentő, kedvező hatását direkt vagy indirekt módon elsősorban a szívizomsejteken fejtheti ki. Elképzelésünk bizonyítására 5 napos szérumentes tenyésztést követően neonatalis patkány szívizomsejteket kezeltünk isoprenalinnal és a klinikai szerekkel. Az isoprenalin hatására az α - és β MHC mRNS szintek csökkentek. Ezt a hatást a bisoprolol, a metoprolol és a GSK3-gátló SB425286 kivédte. A spironolacton és aldosteron nem befolyásolta a szívizomsejtek MHC expressziós profilját, sem a GSK3 α/β foszforilációját szérumentes sejt kultúrában, ami arra utal, hogy hatásukat elsősorban mégsem a szívizomsejteken fejtik ki, hanem például fibroblasztokon (Messaoudi és mtsai, 2012). Emellett a bisoprolol indukálta a GSK3 α/β foszforilációt (=gátlást) a kontroll és isoprenalin stimulált neonatalis szívizomsejtekben, rámutatva, hogy a β adrenerg jelátvitel a cachectikus szarkomer protein vesztésben közvetlen szerepet játszik.

4.7. Immunoszuppressziós szerek pleiotrop hatásai

A szívtranszplantációban alkalmazott (és a humán őssejt-származékokból szövetépítéssel készült kardiális konstruktumok esetében is szükségessé válhat) főbb immunoszuppresszáns szerek, így a cyclosporin A, a tacrolimus és a rapamycin pleiotrop hatását is igazoltuk. Ezek a klinikai szerek az immunválasz modulálása mellett számos kardiális jelátviteli utat befolyásolnak, így a szívizomsejt hypertrophia és proliferáció folyamatait is módosították.

A gyógyszereket klinikai terápiás dózisban adva a sejtenyészethez, azok jelentősen gátolták a hESC-CM populáció proliferációs aktivitását. A két mechanizmus gátlása együttesen az embrionális szívizomsejtek számának jelentős csökkenését eredményezte. A CsA és FK506 antiproliferatív hatása valószínűsíthetően független az NFAT jelátviteltől, mert a VIVIT

gátlásnak nem volt közvetlen hatása a hESC-CM proliferációjára. Sem a domináns-negatív NFAT vektor alkalmazása, sem a GFP-VIVIT overexpresszálása nem változtatta meg a sejtek proliferációs aktivitását, ami arra utal, hogy a calcineurin jelátvitel az NFAT-tól független módon képes a sejtosztódást befolyásolni. A calcineurin/NFAT kapcsolat gátlása VIVIT-tel, de a calcineurin egyéb hatásai nélkül, egy lehetőség arra, hogy a hESC derivátumok transzplantációját érdemben javítsuk – úgy, hogy a sejtek proliferációját azonban ne gátoljuk. A rapamycin antiproliferatív hatása a hESC-CM sejteken is igazolható volt. Az általunk vizsgált immunszuppresszáns szerek (CsA, FK506, rapamycin és a GFP-VIVIT fúziós protein) további pleiotropiás hatásai közé sorolható, hogy gátolják a phenylephrine által kiváltott szívizomsejt hypertrophiát. Kimutattuk, hogy az immunszuppresszív hatású cyclosporin A, FK506 és rapamycin szignifikánsan csökkenti a phenylephrine-indukálta hypertrophia mértékét is, amely a hypertrophiás és viabilitási jelátviteli utak átfedését igazolta ismét (Földes és mtsai, 2011). A hypertrophiában igazoltan szerepet játszó NFAT transzkripciós faktor direkt jelátviteli szerepét is megvizsgáltuk. Az NFAT jelátvitel gátlása 11R-VIVIT-tel, a GFP-VIVIT overexpressziójával és a domináns negatív NFAT1c forma expressziójával egyaránt gátolja a hESC-CM hypertrophia kialakulását.

Ezen megfigyelések klinikai jelentősége tisztázásra vár. Fontos kérdés egyfelől, hogy a szükséges immunszuppresszív kezelés mellett hogyan csökkenthető a sejterápia során a sejtpusztulás mértéke ischemiás környezetben, hogyan javítható a sejtek integrációja és növelhető egyben a transzplantált kardiovaszkuláris konstruktum mérete. A nagy mennyiségben létrehozott sejtek emellett a közepes és párhuzamos nagyteljesítményű gyógyszerterasztelések alapját is képezhetik, amelynek során például kalcium jelet, kontraktilitást, citotoxicitást és jelátviteli utakat lehet meghatározni az egyes kezeléseket követően (Mioulane és mtsai, 2012; Stoehr és mtsai, 2014). A humán szívizomsejtekben zajló biológiai folyamatok szimultán vizsgálata, így a sejthalálozás, sejtnövekedés, sejtciklus változásai, a gyógyszerfejlesztés és kardiovaszkuláris biológia fontos új, eddig nem hozzáférhető elemét jelenti. Az őssejt eredetű kardiovaszkuláris sejtek alkalmasak lehetnek így számos állatkísérletes modell kiváltására és azoknál pontosabb humán élettani válaszok és betegségek modellezésére.

5. Az új tudományos eredmények összefoglalása

1. Elsőként alkalmaztunk humán pluripotens őssejtekből differenciált szívizomsejteket a hypertrophia jelátvitelének vizsgálatára. Eredményeink szerint a létrehozott sejtek alkalmasak a humán hypertrophiás jelátvitel vizsgálatára és új terápiás célpontok azonosítására.
2. High content mikroszkóp-alapú kardiotoxicitás assay-eket dolgoztunk ki a kardiotoxikus szerek hatásának vizsgálatára, amelyekkel a humán sejtípusok válaszkészségét lehet meghatározni. A markerek kombinált alkalmazásával pontos képet kaphatunk az egyes szerek időbeli toxikus és funkcionális hatásairól humán szívizomsejteken.
3. Eredményeink bizonyítják, hogy a szívizomsejtek eltérő válaszkészsége az adrenerg jelátviteli rendszer komplex, többszintű különbségeire vezethető vissza. Az őssejtekből létrehozott humán szívizomsejtek több eltérést is mutatnak a felnőtt kamrai szívizomsejtekkel összehasonlítva.
4. Kimutattuk, hogy a felnőtt kamrai szívizomsejtek domináns ADRA1A receptora helyett az őssejt eredetű sejtek az ADRA1B izoformát expresszálják. Míg a humán embrionális őssejtből differenciált sejtek adrenerg válaszkészsége megtartott marad, addig az adrenerg stimulusokra a hiPSC eredetű szívizomsejtek nem reagálnak. A sejtek közötti különbségért és az alacsony válaszkészségért egy többszintű szabályozórendszer felelős a két sejtípusban. Eltérő aktivitású több G-protein és protein kináz is, így például az EGFRK-src-GSK3b-HDACII-STAT3 hálózat. Mindezt figyelembe véve kombinált kináz gátlók alkalmazásával a tonikus anti-hypertrophiás hatás megszüntethető, és ezáltal a sejtek mérete és hypertrophiás génexpressziós aktivitása megnövelhető.
5. Kimutattuk, hogy a szívizomsejtek hypertrophiás válaszkészségéért a sejtmagtranszport megváltozott jelátviteli folyamatai és az import/export változásai felelősek. A folyamatok mediálásában a mitogén aktivált kinázok játszanak szerepet.
6. In vivo és in vitro modellben igazoltuk, hogy a szívizomzat és a szívizomsejtek átépüléséért felelős jelátviteli folyamatok több ponton átfedést mutatnak a tumoros szöveti folyamatok szabályozásával. Az adrenerg és aldosteron-függő klinikai terápiák a tumor-indukálta szívszöveti atrophíát és szívizomsejt átépülést gátolják.

6. A kutatási eredmények gyakorlati jelentősége

A humán iPS sejtekből a betegségben érintett sejtípusok hozhatóak létre, ma már rutinszerűen. Ezek a sejtek az elmúlt években hozzájárultak a kardiovaszkuláris betegségek molekuláris hátterének pontosabb megértéséhez. Eredményeink igazolták az alkalmazott eljárás számos előnyét és egyben rávilágítottak több kardiális megbetegedésben, így a hypertrophia esetében is a módszer jelenleg még fennálló korlátaira. Ennek az új és dinamikus fejlődő kutatási területnek a felhasználhatósága ma még sok szempontból valóban kérdéses. A humán pluripotens őssejtvonalak képesek a szervezetet felépítő sejtípusok létrehozására laboratóriumi körülmények között. E tulajdonságuk alapján jó modellként szolgálnak öröklött monogénes és számos szerzett kardiális megbetegedés mechanizmusának megválaszolására, emellett új tesztrendszerként alkalmazhatók toxikológiai vizsgálatokban és a jövőben a sejt-alapú terápiák sejtforrásául szolgálhatnak kardiovaszkuláris megbetegedésekben. Nagy előnyük továbbá, hogy általuk nem csak az egészséges sejtek élettanát lehet kutatni, hanem a beteg- és betegség-specifikus sejtek is vizsgálhatóvá váltak. Ennek különleges fontossága van azokon a területeken, ahol az állatmodellek, illetve a betegből származó primer sejttenyészetek eddig nem hoztak áttörést.

7. Irodalomjegyzék

Abdelwahid E, Kalvelyte A, Stulpinas A és mtsai. Stem cell death and survival in heart regeneration and repair. *Apoptosis* 2016;21,252-268.

Aggarwal P, Turner A, Matter A és mtsai. RNA expression profiling of human iPSC-derived cardiomyocytes in a cardiac hypertrophy model. *PLoS One* 2014;9,e108051.

Alfaro MP, Pagni M, Vincent A és mtsai. The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105,18366-18371.

Arenas-Hernandez M és Vega-Sanchez R. Housekeeping gene expression stability in reproductive tissues after mitogen stimulation. *BMC Res Notes* 2013;6,285.

Asakura M, Kitakaze M, Takashima S és mtsai. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 2002;8,35-40.

Bergmann O, Zdunek S, Felker A és mtsai. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 2015;161,1566-1575.

Bossuyt J. Nuclear remodelling: a consequence of nucleocytoplasmic traffic run amok? *Cardiovasc Res* 2015;105,6-7.

Bruckner R, Mugge A, Scholz H. Existence and functional role of alpha 1-adrenoceptors in the mammalian heart. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17,639-645.

Burrige PW, Holmstrom A, Wu JC. Chemically Defined Culture and Cardiomyocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Hum Genet* 2015;87,21.3.1-15.

Chahine MN, Mioulane M, Sikkell MB és mtsai. Nuclear pore rearrangements and nuclear trafficking in cardiomyocytes from rat and human failing hearts. *Cardiovasc Res* 2015;105,31-43.

Communal C, Sumandea M, de TP és mtsai. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99,6252-6.

Davies CH, Davia K, Bennett JG és mtsai. Reduced contraction of isolated human ventricular myocytes in ischaemic cardiomyopathy. *Circulation* 1994;90,1397.

Diez J, Gonzalez A, Lopez B és mtsai. Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;2, 209-216.

Földes G, Harding SE, Ali NN. Cardiomyocytes from embryonic stem cells: towards human therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8,1473-1483.

Földes G, Mioulane M, Kodagoda T és mtsai. Immunosuppressive agents modulate function, growth, and survival of cardiomyocytes and endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2014;23,467-476.

Földes G, Mioulane M, Wright JS és mtsai. Modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte growth: a testbed for studying human cardiac hypertrophy? *J Mol Cell Cardiol* 2011;50,367-376.

Geng YJ, Ishikawa Y, Vatner DE és mtsai. Apoptosis of cardiac myocytes in Galpha transgenic mice. *Circ Res* 1999;84,34-42.

Hamano K, Li TS, Kobayashi T és mtsai. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 2002;73,1210-1215.

Han C, Bowen WC, Michalopoulos GK és mtsai. Alpha-1 adrenergic receptor transactivates signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) through activation of Src and epidermal growth factor receptor (EGFR) in hepatocytes. *J Cell Physiol* 2008;216,486-497.

Heineke J és Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7,589-600.

Hertelendi Z, Toth A, Borbely A és mtsai. The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2009;13,2200-2209.

Kane C és Terracciano CMN. Concise Review: Criteria for Chamber-Specific Categorization of Human Cardiac Myocytes Derived from Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 2017;35,1881-1897.

Khan S, Salloum F, Das A és mtsai. Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41,256-264.

Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV és mtsai. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007;25,1015-1024.

Lee JH, Protze SI, Laksman Z és mtsai. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell* 2017;21,179-194.

Lee YK, Ng KM, Chan YC és mtsai. Triiodothyronine promotes cardiac differentiation and maturation of embryonic stem cells via the classical genomic pathway. *Mol Endocrinol* 2010;24,1728-1736.

Li Y, Zhang H, Liao W és mtsai. Transactivated EGFR mediates alpha(1)-AR-induced STAT3 activation and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301,H1941-H1951.

Ma H, Morey R, O'Neil RC és mtsai. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 2014;511,177-183.

McKinsey TA és Kass DA. Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6,617-635.

Messaoudi S, Azibani F, Delcayre C és mtsai. Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol* 2012;350,266-272.

Mioulane M, Földes G, Ali NN és mtsai. Development of high content imaging methods for cell death detection in human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 2012;5,593-604.

Molkentin JD és Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 2001;63,391-426.

Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T és mtsai. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 2004;10,305-309.

Nosedá M, Peterkin T, Simoes FC és mtsai. Cardiopoietic factors: extracellular signals for cardiac lineage commitment. *Circ Res* 2011;108,129-152.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ és mtsai. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006; ;367,356-367.

Park IH, Arora N, Huo H és mtsai. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008;134,877-886.

Pearl JI, Lee AS, Leveson-Gower DB és mtsai. Short-term immunosuppression promotes engraftment of embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2011;8,309-317.

Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P és mtsai. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev* 2007;12,331-343.

Razeghi P, Young ME, Alcorn JL és mtsai. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation* 2001;104,2923-2931.

Romano S, Di PA, Sorrentino A és mtsai. FK506 binding proteins as targets in anticancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2010;10,651-656.

Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K és mtsai. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* 2018;556,239-243.

Ryall KA, Holland DO, Delaney KA és mtsai. Network reconstruction and systems analysis of cardiac myocyte hypertrophy signaling. *J Biol Chem* 2012;287,42259-42268.

Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M és mtsai. Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One* 2011;6,e26397.

Stewart AF, Rokosh DG, Bailey BA és mtsai. Cloning of the rat alpha 1C-adrenergic receptor from cardiac myocytes. alpha 1C, alpha 1B, and alpha 1D mRNAs are present in cardiac myocytes but not in cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1994;75,796-802.

Stoehr A, Neuber C, Baldauf C és mtsai. Automated analysis of contractile force and Ca²⁺ transients in engineered heart tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;306,H1353-H1363.

Tallawi M, Rai R, Boccaccini AR és mtsai. Effect of substrate mechanics on cardiomyocyte maturation and growth. *Tissue Eng Part B Rev* 2015;21,157-165.

Tarazon E, Rivera M, Rosello-Lleti E és mtsai. Heart failure induces significant changes in nuclear pore complex of human cardiomyocytes. *PLoS One* 2012;7,e48957.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9,231-241..

Wan KF, Chan SL, Sukumaran SK és mtsai. Chelerythrine induces apoptosis through a Bax/Bak-independent mitochondrial mechanism. *J Biol Chem* 2008;283,8423-8433.

Yang X, Rodriguez M, Pabon L és mtsai. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 2014;72,296-304.

Zhong H és Minneman KP. Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 1999;375,261-276.

Zitron E, Gunth M, Scherer D és mtsai. Kir2.x inward rectifier potassium channels are differentially regulated by adrenergic alpha1A receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44,84-94.

8. Saját közlemények

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

8.1.1. Eredeti közlemények

- I. Chahine MN, Mioulane M, Sikkell MB, O'Gara P, Dos Remedios CG, Pierce GN, Lyon AR, **Földes G***, *Harding SE**. Nuclear pore rearrangements and nuclear trafficking in cardiomyocytes from rat and human failing hearts. *Cardiovasc Res* 2015;105:31-43.
IF: 5.465
 - II. **Földes G**, Matsa E, Kriston-Vizi J, Leja T, Amisten S, Kolker L, Kodagoda T, Dolatshad NF, Mioulane M, Vauchez K, Arányi T, Ketteler R, Schneider MD, Denning C, Harding SE. Aberrant α -adrenergic hypertrophic response in cardiomyocytes from human induced pluripotent cells. *Stem Cells Reports* 2014;3:905-914.
IF: 5.365
 - III. **Földes G**, Mioulane M, Kodagoda T, Lendvai Z, Iqbal A, Ali NN, Schneider MD, Harding SE. Immunosuppressive agents modulate function, growth, and survival of cardiomyocytes and endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2014; 23:467-476.
IF: 3.727
 - IV. Springer J, Tschirner A, Haghikia A, von Haehling S, Lal H, Grzesiak A, Kaschina E, Palus S, Pötsch M, von Websky K, Hocher B, Latouche C, Jaisser F, Morawietz L, Coats AJ, Beadle J, Argiles JM, Thum T, **Földes G**, Doehner W, Hilfiker-Kleiner D, Force T, Anker SD. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *Eur Heart J* 2014;35:932-941.
IF: 15.203
 - V. **Földes G**, Mioulane M. High-content imaging and analysis of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Methods in Molecular Biology. Imaging and Tracking Stem Cells: Methods. Springer* 2013;1052:29-39.
IF: 1.29
 - VI. Mioulane M, **Földes G**, Ali NN, Schneider MD, Harding SE. Development of high content imaging methods for cell death detection in human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 2012;5:593-604.
IF: 3.062
 - VII. **Földes G**, Mioulane M, Wright JS, Liu AQ, Novak P, Merkely B, Gorelik J, Schneider MD, Ali NN, Harding SE. Modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte growth: a testbed for studying human cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:367-376.
IF: 5.166
 - VIII. **Földes G**, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Sármán B, Seres L, Skoumal R, 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 Comm.* 2003;308:480-485.
IF: 2.836
- #### 8.1.2. Összefoglaló közlemények
- IX. Abdelwahid E, Kalvelyte A, Aurimas Stulpinas A, Guarita-Souza LC, Athayde Teixeira de Carvalho K, **Földes G**. Stem cell death and survival in heart regeneration and repair. *Apoptosis* 2016;21:252-268.
IF: 3.833

- X. Dolatshad NF, Hellen N, Jabbour R, Harding SE, **Földes G**. G-Protein coupled receptor signalling in pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells: implications for disease modelling. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:76.
IF: 3.19

- XI. **Földes G**, Harding SE, Ali NN. Cardiomyocytes from embryonic stem cells: towards human therapy. *Expert Opin Biol Therapy*. 2008;8(10):1473-1483.
IF: 3.475

8.1.3. Könyvfejezet

- XII. Kriston-Vizi J, Harding SE, **Földes G**: Structural Toxicity: Hypertrophy Models of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. Chapter 14. 271-291. In: Clements M; Roquemore L (eds): *Stem Cell-Derived Models in Toxicity. Methods in Pharmacology and Toxicology*. Humana Press. New York, 2017;14:271-291.
- XIII. Kosztin A, Gara E, Harding SE, **Földes G**: Stem Cell Therapy to Treat Heart Failure. Chapter BMED: 04239. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. 2014;1-18.
- XIV. **Földes G**, Mioulane M. Differentiation and use of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. in *Stem Cells And Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications In Disease And Injury*. Springer. part II /7. 2012;77-80. In: Hayat MA (ed): *Stem Cells and Cancer Stem Cells. Volume 9. Therapeutic Applications in Disease and Injury*. Springer Netherlands. Dordrecht, 2013.
- XV. **Földes G**; Harding SE: 5.32. Stem Cell Therapy to Treat Heart Failure. In: Moo-Young M (ed): *Comprehensive Biotechnology*. 2nd edition. Elsevier B.V. Pergamon. Amsterdam-Oxford-Waltham, 2011;5(157):407-423

8.2. A PhD értekezésben nem szereplő további közlemények

8.2.1. Eredeti közlemények

- XVI. Karhu ST, Välimäki MJ, Jumppanen M, Kinnunen SM, Pohjolainen L, Leigh RS, Auno S, Földes G, Boije Af Gennäs G, Yli-Kauhaluoma J, Ruskoaho H, Talman V. Stem cells are the **most** sensitive screening tool to identify toxicity of GATA4-targeted novel small-molecule compounds. *Arch Toxicol* 2018;92(9):2897-2911.
IF: 5.728
- XVII. Kosztin A, Széplaki G, Kovács A, **Földes G**, Szokodi I, Nagy KV, Kutyifa V, Fórizs É, Végh EM, Geller L, Becker D, Aradi D, Merkely B. Impact of CT-apelin and NT-proBNP on identifying non-responders to cardiac resynchronization therapy. *Biomarkers* 2017;22:279-286.
IF: 1.976
- XVIII. Williams DJ, Archer R, Archibald P, Bantounas I, Baptista R, Barker R, Barry J, Bietrix F, Blair N, Braybrook J, Campbell J, Canham M, Chandra A, **Földes G**, Gilmanshin R, Girard M, Gorjup E, Hewitt Z, Hourd P, Hyllner J, Jesson H, Kee J, Kerby J, Kotsopoulou N, Kowalski S, Leidel C, Marshall D, Masi L, McCall M, McCann C, Medcalf N, Moore H, Ozawa H, Pan D, Parmar M, Plant AL, Reinwald Y, Sebastian S, Stacey G, Thomas RJ, Thomas D, Thurman-Newell J, Turner M, Vitillo L, Wall I, Wilson A, Wolfrum J, Yang Y, Zimmerman H. Comparability: manufacturing, characterization and controls, report of a UK Regenerative Medicine Platform Pluripotent Stem Cell Platform Workshop, Trinity Hall, Cambridge, 14-15 September 2015. *Regen Med* 2016;11:483-492.
IF: 2.868

- XIX. Ebner N, **Földes G**, Schomburg L, Renko K, Springer J, Jankowska EA, Sharma R, Genth-Zotz S, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. Lipopolysaccharide responsiveness is an independent predictor of death in patients with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2015;87:48-53.
IF: 4.874
- XX. Jacquet L, Neueder A, **Földes G**, Karagiannis P, Hobbs C, Jolinon N, Mioulane M, Sakai T, Harding SE, Ilic D. Three Huntington's disease specific mutation-carrying human embryonic stem cell lines have stable number of CAG repeats upon in vitro differentiation into cardiomyocytes. *PLoS One* 2015;10:e126860.
IF: 3.057
- XXI. Merkely B*, Gara E*, Lendvai Z, Skopál J, Leja T, Zhou W, Kosztin A, Várady G, Mioulane M, Bagyura Z, Németh T, Harding SE, **Földes G**. Signalling via PI3K/FOXO1A pathway modulates formation and survival of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cells Dev* 2015;24:869-878.
IF: 3.777
- XXII. Reed DM, **Földes G**, Kirkby NS, Ahmetaj-Shala B, Mataragka S, Mohamed NA, Francis C, Gara E, Harding SE, Mitchell JA. Morphology and vasoactive hormone profiles from endothelial cells derived from stem cells of different sources. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 455:172-177.
IF: 2.371
- XXIII. Reed DM, **Földes G**, Gatheral T, Paschalaki KE, Lendvai Z, Bagyura Z, Nemeth T, Skopal J, Merkely B, Telcian AG, Gogsadze L, Edwards MR, Gough P, Bertin J, Johnston SL, Harding SE, Mitchell JA. Pathogen sensing pathways in human embryonic stem cell derived-endothelial cells: Role of NOD1 receptors. *PLoS One*. 2014;9:e91119.
IF: 3.234
- XXIV. Ebner N, **Földes G**, Szabo T, Tacke M, Fülster S, Sandek A, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. Assessment of serum cotinine in patients with chronic heart failure: self-reported versus objective smoking behaviour. *Clin Res Cardiol*. 2013;102(2):95-101.
IF: 4.167
- XXV. Reed DM, **Földes G**, Harding SE, Mitchell JA. Stem cell derived endothelial cells for cardiovascular disease: a therapeutic perspective. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75(4): 897-906.
IF: 3.688
- XXVI. **Földes G**, Liu A, Badiger B, Paul-Clark M, Moreno L, Lendvai Z, Wright JS, Ali NN, Harding SE, Mitchell JA. Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells. *PLoS One*. 2010; 5: e10501.
IF: 4.411
- XXVII. Sheikh Abdul Kadir SH, Ali NN, Mioulane M, Brito-Martins M, Abu-Hayyeh S, **Földes G**, Moshkov AV, Williamson C, Harding SE, Gorelik J. Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model to study fetal arrhythmia related to maternal disease. *J Cell Mol Med*. 2009;13:3730-41.
IF: 5.228
- XXVIII. Okonko DO, Grzeslo A, Witkowski T, Mandal AK, Slater RM, Roughton M, **Földes G**, Thum T, Majda J, Banasiak W, Missouriis C, Poole-Wilson PA, Anker SD, Ponikowski P. Effect of intravenous iron sucrose on exercise tolerance in anemic and nonanemic patients with symptomatic chronic heart failure and iron deficiency FERRIC-HF: a randomized, controlled, observer-blinded trial. *JACC* 2008; 51: 103-112.

IF: 11.438

- XXIX. **Földes G**, von Haehling S, Okonko DO, Jankowska EA, Poole-Wilson PA, Anker SD. Fluvastatin reduces increased blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2008; 124: 80-85. **IF: 3.121**
- XXX. Skoumal R, Szokodi I, Aro J, **Földes G**, Gööz 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 Sciences*. 2007; 80:1303-1310.
IF: 2.257
- XXXI. **Földes G**, Vajda S, Lakó-Futó Z, Sármán B, Skoumal R, Ilves M, deChâtel R, Karádi I, Tóth M, Ruskoaho H, Leprán I. Distinct modulation of angiotensin II-induced early left ventricular hypertrophic gene programming by dietary fat type. *J Lipid Res*. 2006;47:1219-26.
IF: 4.357
- XXXII. Ruzicska É, **Földes G**, Lakó-Futó Z, Sármán B, Wellmann J, Szenási G, Tulassay Z, Ruskoaho H, Tóth M, Somogyi A. Cardiac gene expression of natriuretic substances is altered in streptozotocin-induced diabetes during angiotensin II-induced pressure overload. *J Hypertens*. 2004;22:1191-1200.
IF: 4.871
- XXXIII. Lakó-Futó Z, Szokodi I, Sármán B, **Földes G**, Tokola H, Ilves M, 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
- XXXIV. Szokodi I, Tavi P, **Földes G**, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuholta 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
- XXXV. 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**
- XXXVI. CHART Program, **Földes G**, *együtműködőként*. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *Eur Heart J*. 2017;38:648-660.
- 8.2.2. Összefoglaló közlemények**
- XXXVII. **Földes G**. Stem cells in rhythmology: Short communication. *Interv Med Appl Sci* 2011;3:110-112.
- XXXVIII. **Földes G**, von Haehling S, Jankowska EA, Anker SD. Targeting the Toll-system in cardiovascular sciences. *Recent Patents on Inflammation and Allergy*. 2007;1:57-67.
- XXXIX. **Földes G**, von Haehling S, Anker SD. Toll-like receptor modulation in cardiovascular disease: a target for intervention? *Expert Opin Invest Drugs*. 2006;15(8): 857-871.
IF: 3.174
- XL. Ebner N, **Földes G**, Schomburg L, Renko K, Springer J, Jankowska EA, Sharma R, Genth-Zotz S, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. Importance of selenium status

in patients with chronic heart failure. *Perspectives in Science* 2015; 3(1-4):34-35. *extended abstract*.

8.2.3. Könyvfejezet

- XLII. Gara E; Xia Z; Bishop J; **Földes G**: Isolation, Expansion and Application of Human Mesenchymal Stem Cells. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64149-1. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2017. Paper 641491.16 p.

8.2.4. Magyar nyelvű közlemények

- XLII. Gara E, Merkely B, **Földes G**. Össejtek és érrendszeri megbetegedések. Hogyan készítsünk ereket? *Élet és Tudomány* 2013; 68(15): 470-471.
- XLIII. **Földes G**. Toll receptorok a szív- és érrendszerben. *Orvosképzés* 2007; 82(3): 115-123.
- XLIV. **Földes G**, Tóth M. [Role of novel G-protein-coupled receptors and their ligands in the cardiovascular system]. *Orv Hetil* 2004; 145(11): 561-566.
- XLV. **Földes G**, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Sármán B, Seres L, Skoumal R, Ruskoaho H, Tóth M, deChatel R. Apelin, az APJ árvareceptor endogén ligandja szívelégtelen betegek szívében és plazmájában. *Magy Belorv Arch* 2003; 56(2): 75-81.

8.2.5. Hozzászólás

- XLVI. Heart Failure: Molecules, Mechanisms and Therapeutic Targets - No.274: 68-72 *Novartis Foundation*. Wiley, London. 2006.
- XLVII. **Földes G**, Anker SD, von Haehling S. Letter to the Editor: Atorvastatin modulates Th1/Th2 response in patients with chronic heart failure. *J Card Failure*. 2009;15:551.
- XLVIII. Gara E, Molnár AA, Merkely B, Földes G. Assessing the therapeutic readiness of stem cells for cardiovascular repair. *Expert Opin Biol Ther* 2017;17: 911-914.
IF: 3.974

8.3. Összesített tudományometriai adatok

Földes Gábor tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2018.09.05.)				
Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikkek²	38	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	27	1159	1367
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	2	0	0
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	1	2	4
összefoglaló közlemény	---	7	49	62
rövid közlemény	---	1	0	0
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	6	---	---	---
idegen nyelvű	---	6	2	2
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	44	1212	1435
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	44	---	1212	1435
V. További tudományos művek	3	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektorátsági folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	3	1	1
VI. Idézett absztraktok⁵	4	---	5	6
Idézettség száma¹	---	---	1218	1442
Hirsch index⁶	17	---	---	---
g index⁶	36	---	---	---
Speciális tudományometriai adatok	Szám	Összes hivatkozás		
Első szerzős folyóiratcikkek száma ^{2a}	15	407		
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma ^{2a}	3	25		
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002 -) teljes tudományos folyóiratcikkek	34	916		
Az utolsó 10 év (2008-2018) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	24	637		
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	439	30,44%		
További, az MTMT-ben nyilvántartott idézetek száma, amelyek nem szerepelnek a WOS és/vagy Scopus rendszerben	43			
Jelentés, guideline	0	0		
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0		
*Az MTMT nem tudja szolgáltatni a megosztott első és megosztott utolsó szerzőség adatokat. Ezeket a kérelmezőnek a doktori eljárás folyamán a 3. sz. adatlapon kell feltüntetnie.				
Megjegyzések:				
¹ kizárólag a WOS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott idézetek száma az egyéb adatbázisokból, egyéb típusú idézőkből, valamint disszertációkból az MTMT-be feltöltött, azonosítószámmal rendelkező idézők nélkül				
² lektorált, tudományos folyóiratban				
³ a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja				
⁴ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben				
⁵ nem idézett absztrakt itt nem kerül az összesítésbe				
⁶ a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli összes idézővel számolva				
⁷ közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények idézettsége külön értékelendő, és nem számítható be az összesített idézetek közé				

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Merkely Bélának az önzetlen támogatását. Neki köszönhetem azt a különleges lehetőséget, hogy megálmodta és segítségével 2009-ben létrehozhattuk és azóta sikeresen működtethetjük az őssejtlaboratóriumunkat. Köszönöm azt a töretlen bizalmát és lelkesedését, hogy az itt létrehozott őssejtek közvetlenül is a szívbetegség gyógyulását fogják szolgálni.

Köszönettel tartozom szakmai és emberi támogatásáért PhD témavezetőmnek és mentoromnak, Tóth Miklósnak, aki sok évvel a posztgraduális tanulmányaim befejezése után, most is folyamatosan segítségemre van.

Kiemelt köszönettel tartozom nagyszerű munkatársaimnak, Gara Editnek, Skopál Juditnak, Radovits Tamásnak, Molnár Andrea Ágnesnek, Kékesi Violetának, Nemes Annamáriának, Husvéth-Tóth Máriának, Kosztin Annamáriának, Berecz Tündének, Apáti Ágotának.

Köszönetemet szeretném kifejezni Heikki Ruskoahonak, a Magyar Tudományos Akadémia tiszteleti tagjának és Szokodi Istvánnak, hogy bevezettek a kardiovaszkuláris kutatásokba és világszínvonalú és egyben fantasztikus vidám környezetet biztosítottak számomra a finnországi Ouluban sok éven keresztül, és azóta is segítik a már önálló kutatói pályafutásomat. Köszönöm az Ouluban végzett közös munkáért Risto Kerkela, Sampsa Pikkarainen, Heikki Tokola, Jaana Rysa, Kati Lampinen és Marja Arbelius segítségét.

Köszönöm korábbi munkahelyemnek, a SE I. Belgyógyászati Klinikájának és számos munkatársamnak, és mindenekelőtt Járai Zoltánnak, Máthé Domokosnak, Lakó-Futó Zoltánnak, Skoumal Rékának, Sármán Baláznak a közös munkát és barátságukat. Néhai deChâtel Rudolfnak köszönhetem, hogy az alapkutatást és klinikai munkát az ott töltött évek alatt még kezdő orvosként is összekapcsolhattam.

Köszönöm Spät Andrásnak és Várnai Péternek, TDK témavezetőimnek, hogy bevezettek a kutatómunkába, nagy örömmel gondolok ma is a Puskin utcai Élettani Intézetben és a laborban töltött évekre.

A pluripotens őssejtekről mindent a National Heart and Lung Institute-ban tanultam meg. Köszönöm az intézet és az Imperial College számos munkatársának, de elsősorban Sian Hardingnak a támogatást és inspirációt. Köszönöm londoni kollégáim, Maxime Mioulane, Anna Randi, Peter O’Gara, Daniel Reed, Nicola Hellen, Thusharika Kodagoda, Nadire Ali, Jane Mitchell, Cesare Terracciano, Carolina Pinto Ricardo, Katerina Lawlor, Dusko Ilic (King’s College London), Michael D. Schneider és Kriston-Vizi János (University College London) segítségét. Köszönetet mondok Stefan D Ankernak, Stephan von Haehlingnek, Thomas Thumnak, Obi D Okonkonak, Jochen Springernek az évtizedes együttműködésért.

A dolgozat az elmúlt több mint 10 év kutatómunkáján alapul, köszönöm az Országos Tudományos Kutatási Alap, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, a British Heart Foundation, a Medical Research Council és a Fondation Leducq pénzügyi támogatását.

Köszönöm feleségemnek, Kálmán Juditnak és szüleimnek, Földes Ivánnak és Zsuzsának, hogy mindig mindenben mellettem állnak és hogy időközben ilyen jól kitanulták az őssejtkutatás részleteit. A dolgozatom kevésbé színes ábráit Földes Daninak és Lolának ajánlom további feldolgozásra.