

dc_119_10

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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 alapjai.....	2
1.3. A szívizom-kontraktilitás klasszikus szabályozó mechanizmusai.....	4
1.3.1. A Frank-Starling-mechanizmus	5
1.3.2. A Gregg-effektus	6
1.3.3. A frekvencia-erőkifejtés összefüggése	7
1.3.4. Az adrenerg receptorok szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában	8
1.3.4.1. A β -adrenoceptorok szerepe.....	8
1.3.4.2. Az α 1-adrenoceptorok szerepe.....	9
1.4. A kardiokinek szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában	10
1.4.1. Adrenomedullin	11
1.4.1.1. Az AM szerkezete, szintézise és szöveti eloszlása	11
1.4.1.2. Az AM receptorai	11
1.4.1.3. Az AM élettani hatásai	12
1.4.1.4. Az AM hatása a szívizom-kontraktilitásra	12
1.4.1.5. Az AM potenciális jelátviteli mechanizmusai	12
1.4.1.6. A kamrai AM expresszió patológiás viszonyok mellett	13
1.4.2. Apelin	13
1.4.2.1. Az apelin felfedezése, szintézise és szöveti eloszlása.....	13
1.4.2.2. Az apelin élettani hatásai	14
1.4.3. Prolaktin-releasing peptid.....	14
1.4.4. Endothelin-1	15
1.4.4.1. Az ET-1 felfedezése, szerkezete és szintézise.....	15
1.4.4.2. Az ET-1 receptorai.....	16
1.4.4.3. Az ET-1 hatása a szívizom-kontraktilitásra.....	16
1.4.4.4. Az ET-1 potenciális jelátviteli mechanizmusai	16
1.4.4.5. Az endogén ET-1 szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában	19
2. Célkitűzések	20
3. Módszerek	21
3.1. Kísérleti modellek.....	21
3.1.1. Kísérleti állatok.....	21
3.1.2. Direkt miokardiális géntranszfer in vivo.....	21
3.1.3. Bal kamrai nyomásterhelés modelljei.....	21
3.1.4. Felnőtt kamrai szívizomsejtek izolációja	22
3.1.5. Szívizomsejtek ciklikus mechanikai feszítése	22
3.2. Vizsgálati módszerek	23
3.2.1. Hemodinamikai mérések in vivo	23
3.2.1.1. Vérnyomás monitorozása.....	23
3.2.1.2. Balkamra-funkció vizsgálata in vivo.....	23
3.2.2. Balkamra-funkció vizsgálata ex vivo	23
3.2.2.1. Balkamra-funkció vizsgálata izolált patkányszív-preparátumon	23
3.2.2.2. Balkamra-funkció vizsgálata izolált egérszív-preparátumon	25
3.2.3. Kontraktilitás vizsgálata izolált szívizomsejteken in vitro.....	25

3.2.4.	Elektrofiziológiai vizsgálatok.....	26
3.2.4.1.	<i>Elektrofiziológiai vizsgálatok izolált pitvari preparátumon.....</i>	26
3.2.4.2.	<i>Patch-clamp mérések.....</i>	27
3.2.4.3.	<i>Multielektród-array.....</i>	27
3.2.5.	Fluoreszcens vizsgálati módszerek.....	28
3.2.5.1.	<i>Intracelluláris Ca²⁺-koncentráció mérése.....</i>	28
3.2.5.2.	<i>Intracelluláris pH és NHE aktivitás mérése.....</i>	28
3.2.5.3.	<i>Intracelluláris ROS termelődés mérése.....</i>	28
3.2.6.	Western-blot analízis.....	29
3.2.7.	p38-MAPK assay.....	29
3.2.8.	RNS meghatározási módszerek.....	30
3.2.8.1.	<i>Northern-blot analízis.....</i>	30
3.2.8.2.	<i>Kvantitatív RT-PCR analízis.....</i>	30
3.2.9.	Radioimmunoassay.....	30
3.2.10.	Immuncitokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok.....	30
3.2.11.	Statisztikai elemzés.....	31
4.	Eredmények és megbeszélés.....	32
4.1.	Az adrenomedullin szerepe szívizom-kontraktilitás szabályozásában.....	32
4.1.1.	Az AM pozitív inotrop hatása ex vivo.....	32
4.1.2.	AM overexpresszió hatása a balkamra-funkcióra.....	34
4.1.2.1.	<i>Adenovírus-mediálta AM géntranszfer.....</i>	34
4.1.2.2.	<i>AM overexpresszió hatása a pumpafunkcióra in vivo.....</i>	34
4.1.2.3.	<i>AM overexpresszió hatása a bal kamrai kontraktilitásra ex vivo.....</i>	36
4.1.3.	Az AM pozitív inotrop hatását közvetítő jelátviteli folyamatok.....	37
4.1.3.1.	<i>A cAMP–PKA jelátviteli út szerepe.....</i>	37
4.1.3.2.	<i>Az AM és az intracelluláris Ca²⁺ homeosztázis.....</i>	38
4.1.3.3.	<i>AM overexpresszió hatása egyes jelátviteli utak aktivációjára.....</i>	41
4.1.4.	Nyomásterhelés hatása az AM bal kamrai génextpressziójára in vivo.....	43
4.1.5.	AM: a szívizom-kontraktilitás regulátora.....	48
4.2.	Apelin szerepe szívizom-kontraktilitás szabályozásában.....	53
4.2.1.	Az APJ-receptor lokalizációja.....	53
4.2.2.	Az apelin pozitív inotrop hatása izolált patkányszív-preparátumon.....	53
4.2.3.	Az apelin hatása a Frank-Starling-válaszra.....	55
4.2.4.	Az apelin hatása a kontraktilitásra izolált szívizomsejteken.....	55
4.2.5.	Az apelin pozitív inotrop hatásának specificitása.....	57
4.2.6.	Az apelin pozitív inotrop hatását közvetítő jelátviteli folyamatok.....	58
4.2.6.1.	<i>A PLC–PKC jelátviteli út szerepe.....</i>	58
4.2.6.2.	<i>A NHE és a NCX szerepe.....</i>	59
4.2.6.3.	<i>Az apelin hatása a Ca²⁺- és K⁺-áramokra.....</i>	60
4.2.6.4.	<i>Az apelin hatása az intracelluláris Ca²⁺-tranziensekre.....</i>	61
4.2.7.	Az apelin hatása a sejtek közötti kommunikációra.....	62
4.2.8.	A mechanikai túlterhelés hatása az apelin és az APJ-receptor génextpressziójára in vitro és in vivo körülmények között.....	63
4.2.9.	Apelin: a szívizom-kontraktilitás regulátora.....	65
4.3.	A prolaktin-releasing peptid szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában.....	69
4.3.1.	A PrRP pozitív inotrop hatása izolált patkányszív-preparátumon.....	69
4.3.2.	A PrRP pozitív inotrop hatásának jelátviteli folyamatai.....	69

4.3.2.1.	<i>A cAMP–PKA jelátviteli út szerepe</i>	69
4.3.2.2.	<i>A PP1 és a PP2A proteinfoszfátázok szerepe</i>	70
4.3.2.3.	<i>A PKCα szerepe</i>	71
4.3.3.	<i>PrRP: a szívizom-kontraktilitás potenciális új szabályozója</i>	72
4.4.	<i>Az endothelin-1 szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában</i>	75
4.4.1.	<i>Az ETA- és az ETB-receptorok szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében</i>	75
4.4.2.	<i>A nitrogén-monoxid szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának szabályozásában</i>	76
4.4.3.	<i>A MAPK-ok szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának regulációjában</i>	77
4.4.3.1.	<i>Az ERK1/2 szerepe</i>	77
4.4.3.2.	<i>A PLC–PKC jelátviteli út szerepe</i>	78
4.4.3.3.	<i>Az EGFR-transzaktiváció szerepe</i>	80
4.4.3.4.	<i>Az ERK1/2 potenciális célpontjai</i>	81
4.4.3.5.	<i>A p38-MAPK szerepe</i>	82
4.4.3.6.	<i>Az ERK1/2 és a p38-MAPK szignalizáció egymásra hatása</i>	83
4.4.3.7.	<i>A p38-MAPK potenciális célpontjai</i>	83
4.4.3.8.	<i>Az ET-1 hatása a vaszkuláris tónusra</i>	84
4.4.3.9.	<i>ERK1/2 és p38-MAPK: a kontraktilitás prominens modulátorai</i>	84
4.4.4.	<i>A ROS szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának szabályozásában</i>	89
4.4.4.1.	<i>Az ET-1 hatása az intracelluláris ROS termelődésre</i>	89
4.4.4.2.	<i>A ROS szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében</i>	90
4.4.4.3.	<i>A NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében</i>	90
4.4.4.4.	<i>A mitoKATP-csatornák szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásában</i>	91
4.4.4.5.	<i>A ROS produkció és az ERK1/2 aktiváció kapcsolata</i>	92
4.4.4.6.	<i>Az ET-1 hatása a vaszkuláris tónusra</i>	93
4.4.4.7.	<i>A ROS jelátviteli szerepe a kontraktilitás regulációjában</i>	93
4.4.5.	<i>Az endogén ET-1 szerepe a Gregg-effektus szabályozásában</i>	95
4.4.6.	<i>Az endogén ET-1 szerepe a Frank-Starling-válasz szabályozásában</i>	97
5.	Az új tudományos eredmények összefoglalása	104
6.	A kutatási eredmények gyakorlati jelentősége	106
7.	Irodalomjegyzék	108
8.	Saját közlemények	125
8.1.	<i>Az Értekezés alapjául szolgáló közlemények</i>	125
8.1.1.	<i>Eredeti közlemények</i>	125
8.1.2.	<i>Összefoglaló közlemények</i>	126
8.1.3.	<i>Könyvfejezet</i>	127
8.1.4.	<i>Hozzászólás</i>	127
8.2.	<i>A PhD Értekezésben nem szereplő további közlemények</i>	127
8.2.1.	<i>Eredeti közlemények</i>	127
8.2.2.	<i>Proceedings folyóiratban ill. könyvben</i>	129
8.3.	<i>A PhD Értekezésben szereplő közlemények</i>	129
8.3.1.	<i>Eredeti közlemények</i>	129
8.4.	<i>Összesített tudományometriai adatok (lezárva: 2012. december 15.)</i>	130
9.	Köszönetnyilvánítás	132

Rövidítések jegyzéke

AM	adrenomedullin
Ang II	angiotenzin II
ANP	pitvari nátriuretikus peptid
AR	adrenerg receptor
AT ₁ -receptor	angiotenzin II 1-es típusú receptor
AVP	arginin-vazopresszin
BK _{Ca}	mitokondriális Ca ²⁺ által aktivált K ⁺ -csatorna
BNP	B-típusú nátriuretikus peptid
cAMP	adenozin-3',5'-monofoszfát
CGRP	kalcitonin gén eredetű peptid ("calcitonin gene-related peptide")
CRLR	kalcitoninreceptor-szerű receptor ("calcitonin receptor-like receptor")
cTnC	szívizom-specifikus troponin-C
cTnI	szívizom-specifikus troponin-I
cTnT	szívizom-specifikus troponin-T
DAG	diacilglicerol
DP	bal kamrai pulzusnyomás
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
EF	ejekciós frakció
EGFR	epidermális növekedési faktor-receptor
ERK1/2	extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2
ESPVR	végzsiztolás nyomás-térfogat összefüggés ("end-systolic pressure-volume relationship")
ET-1	endothelin-1
ET _A -receptor	endothelin A-típusú receptor
ET _B -receptor	endothelin B-típusú receptor
FS	frakcionális rövidülés
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GPCR	G-proteinhez kapcsolt receptor
HB-EGF	heparin-kötő EGF ("heparin-binding EGF")
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
I1	inhibitor-1 fehérje
I _{Ca}	befelé irányuló Ca ²⁺ -áram
I _{K,sus}	tartós kifelé irányuló K ⁺ -áram
I _{Na}	feszültségfüggő Na ⁺ -áram
I _{to}	tranzien kifelé irányuló K ⁺ -áram
IP ₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
ir-	immunoreaktív
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LacZ	β-galaktozidáz
LVEDD	bal kamrai végdiasztolés átmérő
LVEDP	bal kamrai végdiasztolés nyomás
LVESD	bal kamrai végzsiztolés átmérő

dc_119_10

LVESP	bal kamrai végszisztolés nyomás
MAPK	mitogén által aktivált proteinkináz
MEA	multielektrod-array
MEK1/2	MAPK-kináz 1/2
MIA	5-(<i>N</i> -metil- <i>N</i> -izobutil)-amilorid
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
O ₂ ⁻	szuperoxid
p90RSK	p90 riboszómális S6-kináz
PAMP	proAM N-terminális 20 peptid
PBS	foszfát puffer oldat
PCR	polimeráz láncreakció
PIP ₂	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PKA	proteinkináz-A
PKC	proteinkináz-C
PLC	foszfolipáz-C
PLN	foszfolamban
PP1	foszfoprotein-foszfataz-1
PP2A	foszfoprotein-foszfataz-2A
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
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SR	szarkoplazmatikus retikulum
T	bal kamrai nyomásgörbe exponenciális csökkenésének időállandója
T _{F580/640}	SNARF-1 F580/640 fluoreszcencia hányados csökkenésének időállandója
TGR(mREN-2)27	egér <i>REN-2</i> gént expresszáló transzgénikus patkánytörzs
V _{max}	maximális ballon volumen
WKY	Wistar-Kyoto patkánytörzs

1. Tudományterületi háttér

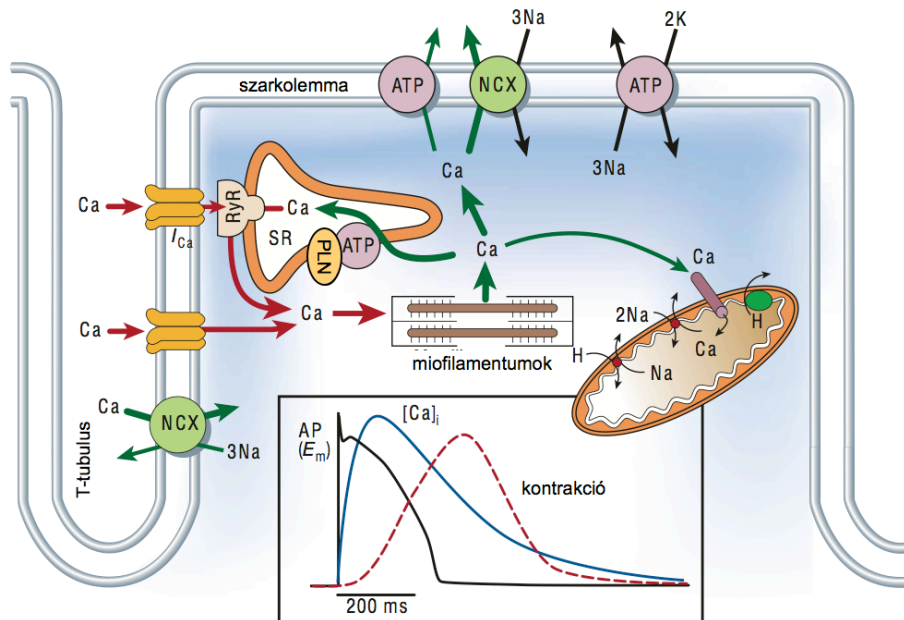
1.1. A szívizom-kontraktilitás regulációja a téma jelentősége és újszerűsége

A szívizomsejtek összehúzódnak 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, mely így legkevesebb 15 millió embert érint (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 drámai módon javítják a balkamra-funkciót és csökkentik a klinikai tüneteket, azonban hosszú távú alkalmazásuk rontja a betegek túlélési esélyeit (Curfman, 1991; Landmesser és Drexler, 2007).

Eddigi ismereteink szerint a szívizom-összehúzódások erejét alapvetően a következő tényezők szabják meg: a Frank-Starling-mechanizmus, az erő kifejtés-frekvencia összefüggés, a szimpatikus idegrendszer aktivitása, valamint egyes keringő hormonok. Egyre több bizonyíték szól azonban a mellett, hogy egy további tényező is fontos szerepet tölthet be a szív pumpafunkciójának regulációjában. Az elmúlt másfél évtizedben számos endogén peptiderg rendszert írtak le a szívizomban, felvetve annak a lehetőségét, hogy ezen peptidek fontos szerepet játszhatnak a szív parakrin/autokrin szintű szabályozási folyamataiban. Fontos kiemelni, hogy az emberi szervezetben fellelhető 367 G-proteinhez kapcsolt receptor (GPCR) alig több mint felénél ismert jelenleg a receptort aktiválni képes endogén transzmitter (Vassilatis és mtsai, 2003; Levoye és Jockers, 2008). Továbbá, a GPCR-ok jelátviteli folyamataiban alapvető szerepet játszó proteinkinázok családjának 518 tagjából, tört részük esetében ismert csupán a fiziológiás szerepük (Manning és mtsai, 2002). Feltételezhető, hogy számos, ez idáig ismeretlen ligand-receptor rendszer vár felismerésre a szívben. A szívizom-kontraktilitást szabályozó fiziológiás mechanizmusok feltárása új molekuláris célpontok azonosításához vezethet, melyek potenciálisan új lehetőségeket teremthetnek a szívelégtelenség kezelésében.

1.2. A szívizom-kontraktilitás alapjai

A szívizomsejtek összehúzódását a plazmamembrán szabályos ütemben bekövetkező potenciálváltozása, az akciós potenciál indítja el. Az extracelluláris térből a depolarizáció során Ca^{2+} áramlik a szívizomsejtekbe, mely az intracelluláris Ca^{2+} -raktárakból jelentős mennyiségű Ca^{2+} felszabadulását váltja ki. A nyugalmi, diasztolés szabad intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 10^{-7} mol/L-ről közelítőleg 10^{-6} mol/L-re emelkedik, mely megindítja a kontrakció folyamatát. Majd a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gyors csökkenését követően a szívizomsejtek relaxálnak (Fabiato, 1983; Bers, 2002a; Opie, 2004). A szívizomban lezajló elektromos változások, az intracelluláris Ca^{2+} -tranziens alakulása és a mechanikai kontrakció/relaxáció között fennálló szoros időbeni összefüggéseket az 1. ábra mutatja be. Végül soron a szívizomsejtek kontrakciós erejét a Ca^{2+} -tranziensek jellemzői és a kontraktilis fehéjék Ca^{2+} iránti érzékenysége szabja meg.



1. ábra: A kamrai szívizomsejtek Ca^{2+} -homeosztázisa.

A piros nyilak a kontrakciót kiváltó Ca^{2+} -mozgásokat, míg a zöld nyilak a relaxációt megalapozó, a szabad Ca^{2+} citoszólból történő eltávolításáért felelős mechanizmusokat jelzik. A fiókábra az akciós potenciál (AP), az intracelluláris Ca^{2+} -szint változása és a kontrakció létrejöttének időbeliségét mutatja. ATP, ATPáz; NCX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus; PLN, foszfolamban; RyR, rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatorna; SR, szarkoplazmatikus retikulum. (Bers, 2002a alapján módosítva)

A plazmamembrán depolarizációja során a sejtbe irányuló Ca^{2+} -áramért (I_{Ca}) a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák, döntően az L-típusú Ca^{2+} -csatornák, nyitása felelős. Ezen csatornák a plazmamembrán transzverzális tubulusain (T-tubulus) találhatóak. A miofilamentumokat körülölelő szarkoplazmatikus retikulum (SR) a sejtek fő Ca^{2+} -raktára. A SR terminális ciszternáin helyezkednek el a SR rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornái. Az L-

típusú Ca^{2+} -csatornák és a rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornák szoros funkcionális kapcsolatban állnak, az I_{Ca} aktiválja a SR Ca^{2+} -csatornáit, melyeken keresztül jelentős mennyiségű Ca^{2+} szabadul fel a SR-ből (Fabiato, 1983). A citoplazmában a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nagymértékű emelkedése megindítja a vastag és a vékony filamentumok kapcsolódását, kezdetét veszi a kontrakció. Az erőgenerálás mértékét nagyban megszabja a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és időtartama. A relaxáció alapfeltétele, hogy a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kellő szintre csökkenjen. Számos mechanizmus szolgálja a szabad Ca^{2+} eltávolítását a citoszólból. Ezek közül a legjelentősebbek: (i) a SR Ca^{2+} -ATPáz (SERCA), mely a SR-ba pumpálja vissza a Ca^{2+} -ot; (ii) a szarkolemmális $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus (NCX, "Na⁺/Ca²⁺ exchanger") és (iii) a szarkolemmális Ca^{2+} -ATPáz, melyek a sejten kívüli térbe juttatják a Ca^{2+} -ot; végezetül (iv) a mitokondriális Ca^{2+} -uniporter, mely révén a Ca^{2+} a mitokondriumokba kerül. Ezen mechanizmusok közül a SERCA játsza a legfontosabb szerepet, a Ca^{2+} eltávolításáért fajtól függően 70-92%-ban felelős (Bers, 2002a). A SERCA működését a foszfolamban (PLN) fehérje szabályozza. Defoszforilált állapotában a PLN kötődik a SERCA-hoz és gátolja a Ca^{2+} -pumpa aktivitását. A PLN foszforilációja megszünteti a SERCA gátlását és fokozza a Ca^{2+} visszavételét a SR-ba. Fontos megjegyezni, hogy a relaxáció kifejezetten energiaigényes folyamat, mivel a citoszólból a Ca^{2+} -ot jelentős koncentrációgradienssel szemben kell eltávolítani, az extracelluláris tér Ca^{2+} -koncentrációja $2\text{-}3 \times 10^{-3}$ mol/L, míg a SR-ban 5×10^{-4} mol/L az uralkodó koncentráció (MacLennan és Kranias, 2003).

A szívizomsejtek kontraktilis fehérjéi a vastag és vékony miofilamentumok. A vastag filamentumok miozin nehéz láncokból, kisebb részben egyéb fehérjékből (miozin könnyű láncok, miozinkötő C-fehérje) állnak. A vékony filamentumok vázát az aktin fehérjékből szerveződő dupla helikális struktúra adja. A miofilamentumok kötegei alkotják a miofibrillumokat. A miofibrillumok funkcionális egységei a hosszirányban ismétlődő szarkomerek. Az izomkontrakció mechanizmusára felállított ún. "csúszó filamentum" modell ("sliding filament" model) értelmében, a vastag és a vékony filamentumok közötti ciklikus interakció a miofibrilláris erőgenerálás alapja. A folyamat során a miozin, mint a szív molekuláris motorfehérjéje, alakítja át az ATP hidrolíziséből származó kémiai energiát mechanikai munkává minden egyes szívverés alkalmával. A kontrakció szabályozásában alapvető szerepet játszanak a tropomiozin és troponin fehérjék. Az aktinszálak közötti barázdában helyet foglaló tropomiozin nyugalmi állapotban elfedi az aktin miozinkötő helyeit. A szívizom kontraktilis fehérjéi közül a troponin komplex egyik alegysége, a szívizom-specifikus troponin-C (cTnC), képes megkötni a szabad Ca^{2+} -ot, ez a tulajdonsága emeli a miofilamentumok Ca^{2+} -szenzorává. A troponin komplex a vékony filamentumok vázához a troponin-T (cTnT), a tropomiozint kötő egység, révén kapcsolódik. Végül a troponin-I (cTnI) alegység az aktin-miozin interakciót gátló struktúra. A szabad Ca^{2+} kötődése a cTnC-hez konformációs változást hoz létre a troponin komplexben, melynek következtében a tropomiozin mélyebbre kerül az aktinszál

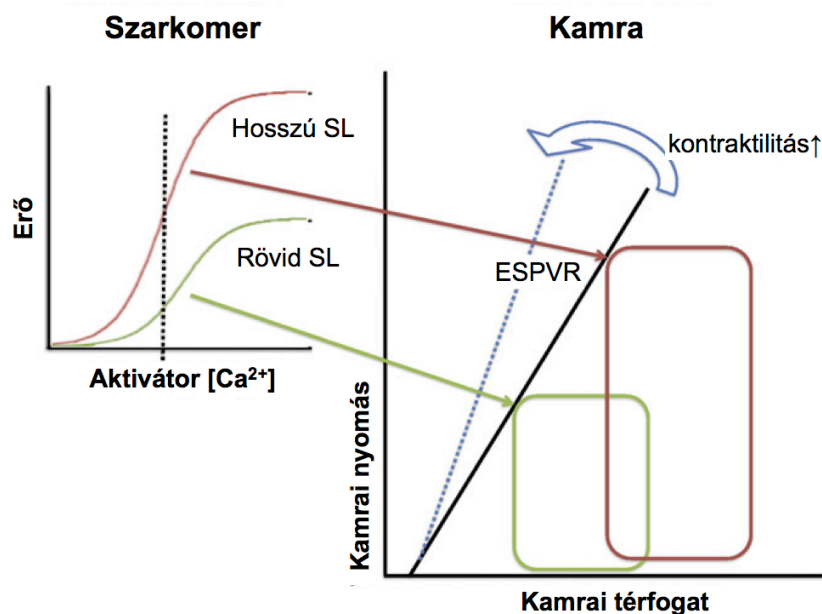
barázdájában, lehetővé téve a miozinefejek és az aktin filamentumok közötti interakciót, a keresztkötések kialakulását. A miozin aktin iránti affinitása a ciklus folyamán erős ingadozást mutat, mely a ciklicitás molekuláris alapja. Míg nyugalmi állapotban a miozin MgADP-t és anorganikus foszfátot (P_i) köt, addig az izomműködés aktivációja során a keresztkötésekről disszociál a P_i , amelyet a miozinefej erőt generáló konformációs változása követ. Ennek eredményeként a vékony és a vastag filamentumok elcsúsznak egymás mellett, kezdetét veszi a rövidülés. Ezt követően az MgATP az MgADP-t leszorítva kötődik a miozinhoz, a miozinefejek disszociálnak az aktinról. Miután a miozin újfent hidrolizálja az MgATP-t, a miozin újabb kötőhelyen kapcsolódik az aktinhoz. Konstans MgATP-koncentráció mellett mindaddig folytatódik az aktin-miozin ciklus, míg az aktivátor Ca^{2+} kellően magas koncentrációban van jelen (Solaro és Rarick, 1998; Maughan, 2005).

1.3. A szívizom-kontraktilitás klasszikus szabályozó mechanizmusai

A szívizom-összehúzóerők ereje tág határok között változhat. A kontrakciós erő nagyságát számos, párhuzamosan ható tényező bonyolult interakciója szabja meg. E tényezők közé tartozik a nyugalmi rosthosszúság, a szívfrekvencia, a szimpatikus idegrendszer aktivitása, valamint egyes keringő hormonok, illetve a szívben lokálisan termelődő autokrin/parakrin faktorok ingerhatása. A kontraktilitás primer fokozódásán a kontrakciók sebességének növekedését, és ezáltal magasabb csúcsfeszülés illetve csúcsnyomás elérését értjük változatlan előterhelés (*“preload”*), utóterhelés (*“afterload”*) illetve szívfrekvencia mellett. A kontraktilitásra, mint a szív inotrop állapotára is szokás hivatkozni (Opie, 2004). A szisztolés és diasztolés funkció számos indexe származtatható a kamrai nyomás és térfogat egyidejű meghatározása révén készített nyomás-térfogat hurkok analízisével. Számos paraméter mellett, a végszisztolés nyomás-térfogat összefüggés (ESPVR, *“end-systolic pressure-volume relationship”*) vizsgálatával jellemezhető a kontraktilitás, változó elő- és utóterhelés mellett, *in vivo* viszonyok között. A kontraktilitás fokozódása az ESPVR meredekségének növekedését vonja magával, így módon azonos végdiasztolés térfogat mellett a végszisztolés nyomást a szív kontraktilis állapota határozza meg (2. ábra) (de Tombe és mtsai, 2010). Molekuláris szinten az emelkedett inotrop állapotban a $[Ca^{2+}]_i$ és a kontraktilis fehérjék, elő- és utóterheléstől független, fokozott kölcsönhatását értjük. Ennek hátterében a Ca^{2+} -tranziensek növekedése illetve a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} iránti érzékenységének fokozódása áll. Fontos kiemelni ugyanakkor, hogy a terhelési viszonyok illetve a szívfrekvencia megváltozásakor bekövetkező celluláris folyamatok nem különíthetők el élesen a kontraktilitás primer változásakor tapasztaltaktól (Opie, 2004).

1.3.1. A Frank-Starling-mechanizmus

A szívizom 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).



2. ábra: A Frank-Starling-mechanizmus és a miofilamentumok hosszfüggő aktivációja.

Adott kontraktilis állapot mellett szoros összefüggés áll fenn a kamrai végszisztolés nyomás és a végszisztolés térfogat között (ESPVR, "end-systolic pressure-volume relationship"). A kontraktilitás fokozódása az ESPVR meredekségének növekedését vonja magával. A kamrai töltőtérfogat emelkedése (vörössel ábrázolt nyomás-térfogat hurok) a végszisztolés nyomás növekedésével jár, ami lehetővé teszi, hogy (*i*) adott szisztolés nyomás mellett emelkedjen a verőtérfogat, illetve (*ii*) megtartott maradjon a verőtérfogat emelkedett szisztolés nyomással szemben. A Frank-Starling-mechanizmus alapja a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységének módosulása a szarkomerhossz (SL) változása esetén. A kontrakciós erő és az aktivátor Ca^{2+} -koncentráció közötti összefüggés felfelé és balra tolódik a SL növelésekor (zöld: rövid SL; vörös: hosszú SL), a miofilamentumok szintjén jelentkező fokozott erőgenerálás magasabb kamrai nyomást eredményez magasabb végszisztolés térfogat mellett (vörös nyomás-térfogat hurok). (de Tombe és mtsai, 2010 alapján módosítva)

A szívben a kamrafunkciós görbe (ún. Starling-görbe) csúcspontja 2.2-2.3 μm szarkomerhossznál figyelhető meg, a Starling-görbe felszálló ága ezen pontig tart. A 2.2-2.3 μm szarkomerhossz esetén éri el a miozin és az aktin közötti kölcsönhatás a maximumát. E felett és ez alatt az aktin-miozin interakció határfoka csökken. A vázizomtól eltérően, a szívizom esetén a szarkomerhossz ritkán haladja meg a 2.4 μm -t, ugyanis a

szívizom masszív elasztikus apparátusa (extracelluláris kollagén, intracelluláris titin óriásmolekulák) védő szerepet játszik a miofilamentumok túlnyújtásával szemben. Fiziológias körülmények között a szív a Starling-görbe felszálló szakaszán működik. Szívelégtelenségben a tágult szív a kamrafunkciós görbe csúcsán, ugyanakkor további hosszfüggő tartalékok hiányában kénytelen működni (Opie, 2004).

A Frank-Starling-mechanizmus a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységének hosszfüggő változásán alapul, a kontrakciós erő és az aktivátor Ca^{2+} -koncentráció közötti összefüggés felfelé és balra tolódik a szarkomerhossz növelésekor (2. ábra). Az izom megnyújtásakor egyrészt fokozódik a cTnC Ca^{2+} iránti érzékenysége, másrészt nő a miofilamentumok közti kooperatív interakció hatékonysága (Allen és Kentish, 1985; Campbell, 1997; Fuchs és Martyn, 2005; de Tombe és mtsai, 2010). Számos hipotézis született annak magyarázatára, hogy a szarkomerek szintjén milyen változások közvetítik a miofilamentumok hosszfüggő aktivációját. Felvetették, hogy nyújtás hatására a vékony és vastag filamentumok közti oldalirányú tér (*“lattice spacing”*) csökkenése váltja ki a Ca^{2+} -érzékenység fokozódását (McDonald és Moss, 1995). Ettől eltérően, mások a vastag filamentumokat lehorgonyzó óriásfehérje, a titin, szerepét vetették fel. Mivel a fehérje rendelkezik mind aktin, mind miozin kötőhelyekkel, elképzelhető, hogy a titin feszülése befolyásolhatja az aktin-miozin interakciót (Linke, 2008). Habár a pontos mechanizmust nem ismerjük, bizonyítást nyert, hogy a jelenség nem az aktin-miozin ciklus egyes átmeneteinek kinetikai változásával, hanem az egyes aktin-miozin keresztkötések számának növekedésével magyarázható (Édes és mtsai, 2007). A szívizom feszítésekor fellépő azonnali választ a kontrakciós erő további, lassú fokozódása követi, melyet Anrep-effektusként tartanak számon (von Anrep, 1912). A gyors komponenstől eltérően, a lassú fázis hátterében a Ca^{2+} -tranziensek növekedése áll (Kentish és Wrzosek, 1998), melyért feltehetőleg a szarkolemmális Na^+/H^+ -cseremechanizmus (NHE, *“ Na^+/H^+ exchanger”*) és a NCX fordított irányú működése felelős (Cingolani és mtsai, 2011).

1.3.2. A Gregg-effektus

A koronáriák perfúziós nyomásának növekedése esetén fokozódik a szív kontraktilitása és oxigénfogyasztása, melyre Gregg-effektusként hivatkozunk (Gregg, 1963). Kezdeti elképzelések szerint a perfúziós nyomás emelkedése a rosthosszúság növekedésével jár (kerti öntözőcső effektus, *“garden hose effect”*), mely a Frank-Starling-mechanizmus révén váltja ki a kontrakciós erő fokozódását (Arnold és mtsai, 1968). Kimutatták azonban, hogy papilláris izmon a Gregg-effektus jelentékenyebb, mint a Frank-Starling-válasz (Schouten és mtsai, 1992). Kiemelendő, hogy a Gregg-effektus ineffektív áramlási autoreguláció mellett jut szerephez, az autoreguláció tartományán belül a perfúziós nyomás növelése minimális hatást gyakorol a kontrakciók erejére (Bai és mtsai, 1994). A jelenlegi feltételezések szerint, a Gregg-effektusért döntően a kapillárisok szintjén

jelentkező térfogatváltozás felelős (Dijkman és mtsai, 1998). A perfúziós nyomás emelkedése a szívizomsejtek membránjának deformálódását váltja ki, mely a stretch-aktivált inocsatornák aktivációja révén fokozza a $[Ca^{2+}]_i$ -t és a kontrakciós erőt (Lamberts és mtsai, 2002; Westerhof és mtsai, 2006). Nyitott kérdés, hogy a fokozott nyírófeszültség hatására az endotheliumból esetlegesen felszabaduló faktorok szerepet játszanak-e a Gregg-effektus kialakításában (Ramaciotti és mtsai, 1993; Dijkman és mtsai, 1997).

1.3.3. 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). Szívelégtelenségben e mechanizmus kimerül, illetve egyenesen negatív frekvencia-erőkifejtés összefüggés tapasztalható mind *in vitro* (Pieske és mtsai, 1995), mind *in vivo* körülmények között (Hasenfuss és mtsai, 1994). Megjegyzendő, hogy a többi emlősfajtól eltérően a patkányok és az egerek szíve minimális pozitív (Georgakopoulos és Kass, 2001) illetve negatív Treppe-effektust mutat (Simor és mtsai, 1997; Tanaka és mtsai, 2005) a kísérleti körülmények függvényében.

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+} sejtekbe történő beáramlása az L-típusú Ca^{2+} -csatornákon keresztül, másrészt az intracelluláris Na^+ akkumulációja csökkenti a Ca^{2+} eltávolítását a NCX előreható működésének ("forward", Na^+ be, Ca^{2+} ki) gátlása révén (Endoh, 2008). A negatív Treppe-effektus egér és patkányszív esetében feltehetőleg az akciós potenciál speciális karakterisztikájának köszönhető. Más fajokhoz (nyúl, tengerimalac, etc) képest, az akciós potenciál extrémén rövid és túszerű. A frekvencia növelése a NCX előreható működésének és így a Ca^{2+} -kiáramlásnak kedvez (Bers, 2002b; Tanaka és mtsai, 2005).

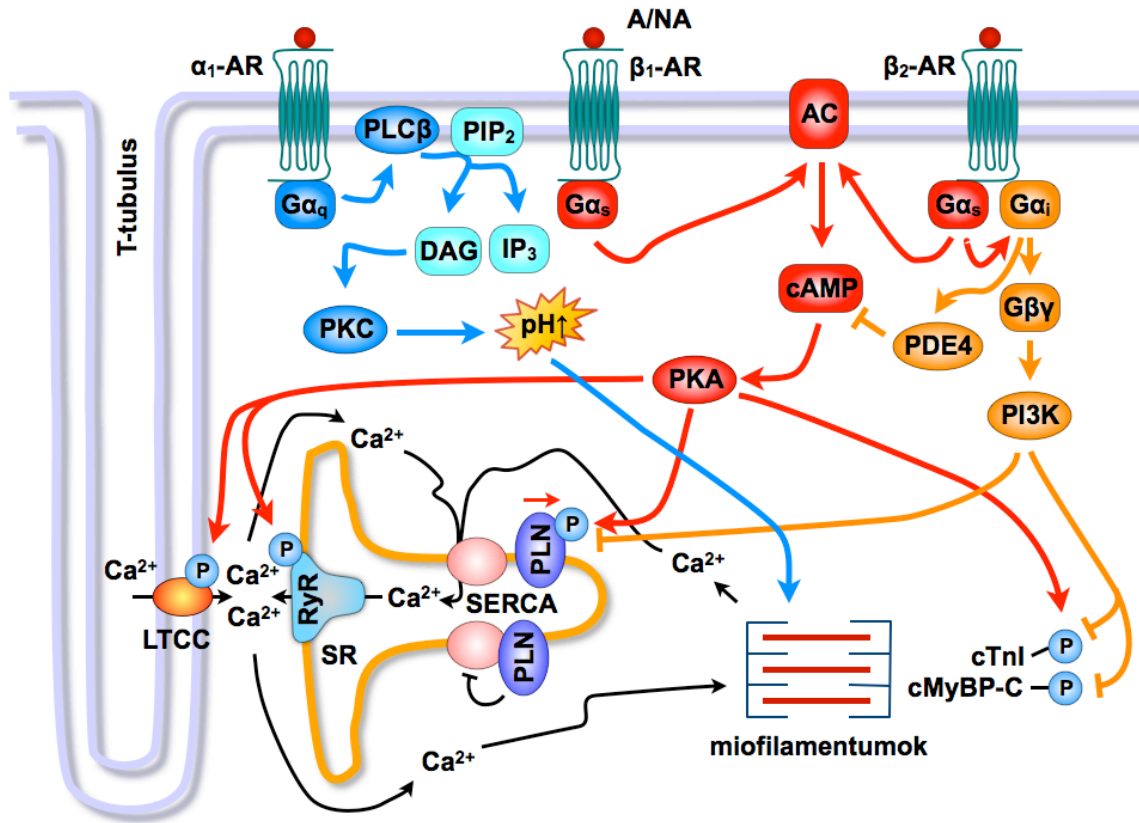
1.3.4. Az adrenerg receptorok szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában

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

1.3.4.1. A β -adrenoceptorok 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 ATP-ből történő ciklikus adenosin-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, PLN, rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornák, cTnI, miozinkötő C-fehérje) (Dzimiri, 1999; Bers, 2002a; Xiao és mtsai, 2006). A β_1 -AR aktivációt követő pozitív inotrop hatás létrejöttében alapvető szerepet játszik az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek növekedése, melynek a háttérben döntően a PLN fehérje PKA-függő foszforilációja áll (Luo és mtsai, 1994; Kiss és mtsai, 1997). 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) (3. ábra). Felvetették továbbá, hogy az auxotóniás kontrakciót végző szívizomban a cTnI foszforilációja is hozzájárul az összehúzóerő erejének fokozódásához, azonban ennek pontos mechanizmusa még nem ismert (Layland és mtsai, 2004; Takimoto és mtsai, 2004). A pozitív lusitrop hatás háttérében is összetett folyamatok állnak. A PLN foszforilációja következtében, a SERCA fokozott működése az aktivátor Ca^{2+} SR-ba történő gyorsult visszavételét eredményezi (Luo és mtsai, 1994). Továbbá ismert, hogy a cTnI PKA-függő foszforilációja révén csökken a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége (Wolska és mtsai, 2002) (3. ábra). A β_1 -AR-ok mellett a β_2 -AR-ok is megtalálhatóak a szívben, melyek a teljes β -AR populáció 20-30%-át teszik ki. Kiemelendő, hogy a β_2 -AR altípus a serkentő G_s mellett a gátló hatású G_i fehérjét is aktiválja (Xiao és mtsai, 2006). Ezzel összefüggésben, a β_2 -AR jelátvitelre jellemző, hogy az adenilátcikláz–cAMP–PKA aktiváció térben és időben korlátozott. Az L-típusú Ca^{2+} -csatornák foszforilációján túl

egyéb fehérjék (pl. PLN) foszforilációja nem tapasztalható, a pozitív inotrop hatás mérsékeltebb, ahhoz pozitív lusitrop hatás nem társul (Jo és mtsai, 2002; Xiao és mtsai, 2006) (3. ábra).



3. ábra: A β - és α -AR-ok inotrop hatását közvetítő jelátviteli mechanizmusok.

AC, adenilátcikláz; cMyBP-C, szívizom-specifikus miozinkötő C-fehérje; cTnI, szívizom-specifikus troponin-I; DAG, diacilglicerol; IP₃, inozitol-1,4,5-triszfoszfát; LTCC, L-típusú Ca²⁺-csatorna; PDE4, foszfodiészteráz-4; PI3K, foszfatidilinozitol-3-kináz; PIP₂, foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát; PKA, proteinkináz-A; PKC, proteinkináz-C; PLC, foszfolipáz-C; PLN, foszfolamban; RyR, rianodin-szenzitív Ca²⁺-csatorna; SERCA, SR Ca²⁺-ATPáz; SR, szarkoplazmatikus retikulum.

1.3.4.2. Az α_1 -adrenoceptorok 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 hatástól. Az α_1 -AR-ok által közvetített pozitív inotrop hatás szerényebb mértékű, döntően a miofilamentumok Ca²⁺ iránti érzékenysége fokozódik, az intracelluláris Ca²⁺-tranziensek nem vagy csak mérsékelten növekednek (Endoh és Blinks, 1988; Puceat és mtsai, 1990; Terzic és mtsai, 1992; Terzic és mtsai, 1993; Endoh, 2008). Az α_1 -AR-ok közül az α_{1A} - és az α_{1B} -AR altípusok jelenlétét mutatták ki emlősszívben, az egerektől az emberig bezárólag (Brodde és Michel, 1999; Jensen és mtsai, 2009). Az α_{1A} - és az α_{1B} -AR altípusok ellentétes hatást gyakorolnak a kontraktilitásra: az α_{1A} -AR-ok izgalma pozitív inotrop hatással jár, melyet az α_{1B} -AR-ok ellensúlyozni igyekeznek (Gambassi és mtsai, 1998). 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 aktiválni a sejtmembránban található foszfolipáz-C (PLC) enzimet, mely a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP_2) 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+} iránti érzékenységét részben az intracelluláris pH (pH_i) alkalikus irányú eltolása (Gambassi és mtsai, 1992; Terzic és mtsai, 1992), részben a miofilamentumok foszforilációja (Terzic és mtsai, 1993) révén fokozza. Felvetették a PKC szerepét ezen folyamatokban (Endoh és mtsai, 1993) (3. ábra), ugyanakkor mások szerint az α_1 -AR stimuláció a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységét a könnyű miozin láncok foszforilációja útján, a PKC-től függetlenül váltja ki (Andersen és mtsai, 2002). Az α_{1A} -AR-tól eltérően, az α_{1B} -AR altípus a G_o -fehérjén keresztül fejti ki a hatását (O-Uchi és mtsai, 2008). A pontos mechanizmus, mely révén az α_{1B} -AR-ok ellensúlyozni képesek α_{1A} -AR-ok hatását a szívizom-kontraktilitásra, nem tisztázott.

1.4. 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 (Winegrad, 1997; Brutsaert, 2003; Prabhu, 2004; Westerhof és mtsai, 2006; Kakkar és Lee, 2010). A vázizomból felszabaduló miokinek (Pedersen és mtsai, 2007) illetve a zsírszövet által szecernált adipokinek (Walsh, 2009) mintájára, a szívizom által termelt és szekretált fehérjéket összefoglalóan kardiokineknek nevezték el (Doroudgar és Glembotski, 2011). A kardiokinek számát megközelítőleg hatvanra teszik jelenleg (Frost és Engelhardt, 2007; Belmont és mtsai, 2008; Stastna és mtsai, 2010). A kardiokinek döntően a GPCR-ok családjához tartozó sejtfelszíni receptorokat aktiválva váltják ki biológiai hatásukat. Az emberi szervezetben 367 GPCR található (Vassilatis és mtsai, 2003), ezek közül közelítőleg 200 receptor fejeződik ki a szívben (Hakak és mtsai, 2003; Salazar és mtsai, 2007). Fontos kiemelni, hogy a GPCR-ok alig több mint felénél azonosították a receptort aktiválni képes endogén ligandot (Vassilatis és mtsai, 2003; Levoye és Jockers, 2008), továbbá az ismert kardiokinek töredéke esetén tisztázott, hogy pontosan milyen biológiai funkcióval bírnak (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.

1.4.1. Adrenomedullin

1.4.1.1. Az AM szerkezete, szintézise és szöveti eloszlása

Új vazóaktív peptidek után kutatva, 1993-ban Kitamura és munkatársai egy rendkívül erőteljes hipotenzív hatással bíró peptidet izoláltak humán pheocromocytoma kivonatból (Kitamura és mtsai, 1993a), melyet adrenomedullinnak (AM) neveztek el. A humán AM 52 aminosavból áll és egy hattagú gyűrű struktúrát tartalmaz. A patkány AM 2 aminosavval rövidebb és további 6 aminosavban tér el a humán peptidtől (Samson, 1999; Hinson és mtsai, 2000; Ishimitsu és mtsai, 2006; Yanagawa és Nagaya, 2007). Az AM mérsékelt homológiát mutat a kalcitonin gén eredetű peptiddel (CGRP, "*calcitonin gene-related peptide*"), ezért a peptidet a kalcitonin/CGRP/amylin családkhoz sorolták (Hinson és mtsai, 2000). A humán preproAM 185 aminosavból áll, az N-terminális szakasz 21 aminosavból álló szignál peptidjének lehasításával jön létre a 164 aminosavat tartalmazó prohormon (Kitamura és mtsai, 1993b). A proAM további hasításával keletkezik a 20 aminosavból álló proAM N-terminális 20 peptid (PAMP, "*proadrenomedullin N-terminal 20 peptide*"), mely önálló biológiai hatásokkal rendelkezik (Kitamura és mtsai, 1994). Végezetül, a 93. és 94. illetve a 148. és 149. pozíciók közötti hasítással jön létre az érett AM (Kitamura és mtsai, 1993b). Humán és patkány szövetek vizsgálata során jelentős AM expressziót találtak a mellékvese velőállományában, szívben, vesében, tüdőben és a központi idegrendszer számos régiójában (Sakata és mtsai, 1993; Ichiki és mtsai, 1994; Sakata és mtsai, 1994; Isumi és mtsai, 1998). Az egyes szervek AM expressziója szoros korrelációt mutat azok vaszkularizáltságával, mivel az érendothelium sejtjei termelik legaktívabban ezt a fehérjét (Sugo és mtsai, 1994a; Sugo és mtsai, 1994b; Isumi és mtsai, 1998).

1.4.1.2. Az AM receptorai

Az AM mRNS szintekkel párhuzamosan, autoradiográfiás vizsgálatok specifikus AM kötőhelyek létét igazolták a szervezetben (Eguchi és mtsai, 1994; Owji és mtsai, 1995). Munkánk kezdetekor nagyfokú bizonytalanság övezte, hogy az AM milyen receptoron keresztül váltja ki a hatását. Számos tanulmány szerint CGRP[8-37]-tel, egy CGRP-receptor antagonistával, az AM egyes biológiai hatásai kivédhetőek voltak (Eguchi és mtsai, 1994; Entzeroth és mtsai, 1995; Ikeda és mtsai, 1996), felvetve annak a lehetőségét, hogy az AM specifikus CGRP-receptorokon keresztül hat. Specifikus AM-receptorok után kutatva, a GPCR-ok működésének új paradigmáját ismerték fel. A CRLR ("*calcitonin receptor-like receptor*") árvareceptor képes kötni mind az AM-t, mind a CGRP-t. A kötődés specificitását egy, a receptorhoz kapcsolódó, úgynevezett receptor aktivitást módosító fehérje (RAMP, "*receptor activity modifying protein*") határozza meg. A CRLR/RAMP-1 komplex CGRP receptorként funkcionál, míg a CRLR és a RAMP-2 illetve a RAMP-3 kombinációjához specifikusan az AM képes kötődni (McLatchie és mtsai, 1998;

Gibbons és mtsai, 2007). Továbbá, AM-receptorként működhet az L1 és az RDC-1 árvareceptor is (Kapas és mtsai, 1995a; Kapas és mtsai, 1995b; Hanze és mtsai, 1997; Autelitano, 1998).

1.4.1.3. Az AM élettani hatásai

Az AM és specifikus kötőhelyeinek szöveti eloszlását tekintetbe véve valószínűsíthető, hogy a peptid autokrin/parakrin módon hatva fontos szerepet játszhat a szisztémás vérnyomás, a regionális véráramlás és a só-víz háztartás szabályozásában (Samson, 1999; Hinson és mtsai, 2000). Az AM intravénás infúziója potens, hosszan tartó hipotenzív hatást vált ki (Kitamura és mtsai, 1993a; Parkes, 1995; Parkes és May, 1997). Mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között, a peptid egyike a legerőteljesebb koronária dilatátoroknak (Entzeroth és mtsai, 1995; Parkes és May, 1997; Yoshimoto és mtsai, 1998; Terata és mtsai, 2000; De Matteo és May, 2003). Az AM intrarenális adminisztrációja során jelentősen fokozódik a vese artériák véráramlása, a nátriurézis valamint a diurézis (Ebara és mtsai, 1994; Jougasaki és mtsai, 1995a; Hirata és mtsai, 1995). Mindezen effektusokat kiegészítik az AM központi idegrendszeri hatásai, a peptid csökkenti mind a víz-, mind a sófelvételt (Murphy és Samson, 1995; Samson és Murphy, 1997).

1.4.1.4. Az AM hatása a szívizom-kontraktilitásra

Az AM intravénás adását a perctérfogat jelentős mérvű emelkedése követi (Ishiyama és mtsai, 1993; He és mtsai, 1995; Parkes, 1995; Parkes és May, 1997; Charles és mtsai, 1997), felvetve, hogy a perifériás rezisztencia csökkenéséből adódó bal kamrai utóterhelés redukciója 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 váltott ki spontán verő izolált patkányszíven (Szokodi és mtsai, 1996).

1.4.1.5. Az AM potenciális jelátviteli mechanizmusai

Ismert, hogy az AM számos sejttípus esetén, mint vaszkuláris simaizomsejtek (Eguchi és mtsai, 1994; Ishizaka és mtsai, 1994), érendothelsejtek (Shimekake és mtsai, 1995) és mesangialis sejtek (Chini és mtsai, 1995), képes fokozni az intracelluláris cAMP szintet. Összhangban ezen megfigyelésekkel, az AM szívizomsejtekben is növeli a cAMP szintet (Ikeda és mtsai, 1996; Sato és mtsai, 1997), felvetve a lehetőségét, hogy az AM pozitív inotrop hatásának a közvetítésében szerepet játszhat az adenilátcikláz-cAMP-PKA

jelátvivő rendszer aktivációja, mely a kamrai kontraktilitás egyik kulcs regulátora (Bers, 2002a). Mindazonáltal, a peptid inotrop hatásáért felelős jelátviteli mechanizmusok feltárása várat magára.

1.4.1.6. A kamrai AM expresszió patológiás viszonyok mellett

Az AM potenciális kórtani szerepére utal, hogy a peptid plazmaszintje magasabb szívelégtelen betegekben (Jougasaki és mtsai, 1995b; Nishikimi és mtsai, 1995; Kato és mtsai, 1996; Jougasaki és mtsai, 1996). Immunhisztokémiai vizsgálatok szerint fokozott AM szintézis jellemzi az elégtelen funkciójú humán kamrai izomzatot (Jougasaki és mtsai, 1995b), valamint a miokardium által szekretált AM feltehetőleg hozzájárul az emelkedett plazmakoncentrációhoz szívelégtelenségben (Jougasaki és mtsai, 1996). Továbbá, a szívhipertrófia egyes állatmodelljeiben is erőteljesebb kamrai AM termelődést figyeltek meg (Shimokubo és mtsai, 1995; Shimokubo és mtsai, 1996; Ishiyama és mtsai, 1997). Azonban az AM bal kamrai expresszióját szabályozó mechanizmusok, illetve az aktiváció időbelisége nem ismert.

1.4.2. Apelin

1.4.2.1. Az apelin felfedezése, szintézise és szöveti eloszlása

Az APJ-receptort, az egyik legrégebbi árvareceptort, O'Dowd és munkatársai 1993-ban azonosították. A humán APJ-receptort kódoló gén a 11-es kromoszóma hosszú karján (q12.1) helyezkedik el. A receptor az angiotenzin II (Ang II) 1-es típusú receptorának (AT₁-receptor) transzmembrán régiójával 54 %-os hasonlóságot mutat, 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 endogen ligand).

A humán apelin gén, mely a 77 aminosavból álló preproapelin kódozza, az X kromoszómán (q25–26.1) található. A prepeptid C-terminális utolsó 23 aminosavból álló szakasza teljes mértékben megegyezik az ezidáig vizsgált emlős fajokban, valamint enyhe homológiát mutat az Ang II-vel. A preproapelin C-terminális szakaszának enzimatisz hidrolízise révén alakulnak ki a rövidebb, biológiailag aktív formák, mint az apelin-36, az apelin-17, az apelin-13, és az apelin-12 (Tatemoto és mtsai, 1998; Lee és mtsai, 2000). A felsorolt változatok mind képesek kötődni az APJ-receptorhoz, a rövidebb fragmentumok erőteljesebb biológiai hatással rendelkeznek. A 12 aminosavnál rövidebb formák azonban már nem képesek biológiai választ kiváltani (Tatemoto és mtsai, 2001).

Az apelin és az APJ-receptor expressziója széleskörűen kimutatható a központi idegrendszerben, a szívben, a tüdőben, a vesékben, a hasnyálmirigyben és a

zsírszövetben (Lee és mtsai, 2000; O'Carroll és mtsai, 2000; Hosoya és mtsai, 2000; Kawamata és mtsai, 2001; Boucher és mtsai, 2005).

1.4.2.2. Az apelin élettani hatásai

A szöveti eloszlásának megfelelően, az apelin szerteágazó biológiai hatásokkal rendelkezik. A felfedezése óta eltelt időben kimutatták, hogy az apelin fokozza a diurézist (De Mota és mtsai, 2004), csökkenti a táplálékfelvételt, előnyösen befolyásolja a cukor- és zsírsanyagcserét (Castan-Laurell és mtsai, 2011), antinociceptív (Xu és mtsai, 2009) illetve immunmodulátor effektussal bír (Horiuchi és mtsai, 2003; Leeper és mtsai, 2009).

Az apelinnel kapcsolatos kutatások korán felvetették, hogy a peptid szerepet játszhat az értónus szabályozásában. Immunhisztológiai módszerekkel igazolták az apelin és az APJ-receptor jelenlétét különböző kaliberű artériákban és vénákban, az erek endothelsejtjei mellett a peptid és a receptora kisebb mértékben a vaszkuláris simaizomsejtekben is megtalálható (Kleinz és Davenport, 2004?; Kleinz és mtsai, 2005). Az apelin intravénás adása átmeneti vérnyomásesést váltott ki patkányokban (Lee és mtsai, 2000; Tatemoto és mtsai, 2001). A peptid vazodilatátor hatását feltehetőleg a NO közvetíti, mivel az effektus kivédhető volt L-NAME adásával, mely a NO-szintetáz (NOS) gátolja (Tatemoto és mtsai, 2001). Megjegyzendő, hogy az apelin vazokonstriktor hatást indukált humán vena saphenán illetve arteria mammarián, amennyiben az ereket megfosztották az endotheliumuktól (Katugampola és mtsai, 2001; Maguire és mtsai, 2009).

Az apelin prekürzora (Lee és mtsai, 2000; O'Carroll és mtsai, 2000; Kawamata és mtsai, 2001), továbbá maga az APJ-receptor is jelentős mennyiségben expresszálódik a szívben (O'Carroll és mtsai, 2000; Hosoya 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, feltárásra várt, hogy az APJ-receptor illetve az apelin expressziója miként változik a szívizomban patofiziológias viszonyok között.

1.4.3. Prolaktin-releasing peptid

A prolaktin-releasing peptidet (PrRP) 1998-ban izolálták Hinuma és munkatársai marha hipotalamusz extraktumból, mint a hGR3/GPR10 árvareceptor potenciális ligandját (Hinuma és mtsai, 1998). A marha prepropeptid 98 aminosavból áll, melyből a 31 illetve 20 aminosavból álló érett peptidek (PrRP-31 és PrRP-20) képződnek. A marha PrRP-31 a humán, patkány illetve egér eredetű peptiddel 90, 83 illetve 80%-os azonosságot mutat (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 hormonnaként hatna (Samson és mtsai, 2000; Sun és mtsai, 2005). Mára bizonyossá vált, hogy a PrRP sokrétű biológiai hatással bír (Sun és mtsai, 2005; Onaka és mtsai, 2010), többek közt befolyásolja a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely működését (Maruyama és mtsai, 2001), a táplálékfelvételt (Takayanagi és mtsai, 2008), valamint a fájdalomérzést (Laurent és mtsai, 2005). Felvetették továbbá, hogy a PrRP részt vehet a vérnyomás centrális szabályozásában. Éber patkányokban a PrRP intracerebro-ventrikuláris adagolása mellett szignifikánsan emelkedett az artériás középnyomás (Samson és mtsai, 2000). A PrRP kaudális ventrolaterális nyúltvelői területeken alkalmazott mikroinjekciója dóziszfüggő módon növelte az artériás középnyomást, a szívfrekvenciát, valamint a renális szimpatikus idegek aktivitását (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 (Satoh és mtsai, 2000). Ezen megfigyelések felvetik, hogy a peptid direkt módon is befolyásolhatja a szív működését.

1.4.4. Endothelin-1

1.4.4.1. Az ET-1 felfedezése, szerkezete és szintézise

Az 1980-as évek közepén ismerték fel, hogy az endothelium eredetű relaxáló faktor (EDRF, "*endothelium-derived relaxing factor*") (Moncada és mtsai, 1976; Furchgott és Zawadzki, 1980) mellett az érendothelsejtek vazokonstriktor természetű faktorokat is termelnek (EDCF, "*endothelium-derived constricting factor*") (Rubányi és Vanhoutte, 1985; Hickey és mtsai, 1985; O'Brien és mtsai, 1987), melyek révén az endothelium parakrin módon képes befolyásolni az értónust (Rubanyi, 2011). Az ismeretlen vazoaktív faktort Yanagisawa és munkatársai 1988-ban azonosították. Sertés eredetű endothelsejt-kultúra felülűszojából izoláltak egy rendkívül erőteljes érszűkítő hatású peptidet, melyet endothelinnek neveztek el (Yanagisawa és mtsai, 1988). A peptid 21 aminosavból áll és 2 intramolekuláris diszulfid hidat tartalmaz. Az eredetileg izolált endothelin-1 (ET-1) mellett további két izoformát azonosítottak, az ET-2 és az ET-3 az ET-1-hez képest 2 illetve 6 aminosavban tér el (Inoue és mtsai, 1989). A humán ET-1 génje a 6-os kromoszómán helyezkedik el. A 203 aminosavból álló prepro-ET-1-ről furin-szerű endopeptidáz hasítja le a big-endothelint (Kedzierski és Yanagisawa, 2001). A biológiailag inaktív, 37-41 aminosavat tartalmazó intermediereket az endothelin konvertáló enzim alakítja át érett ET-1 molekulává (Xu és mtsai, 1994).

1.4.4.2. Az ET-1 receptorai

A szívben számos sejttípus, mint az endothelsejtek, vaszkuláris simaizomsejtek, szívizomsejtek és fibroblasztok, szekretálják az ET-1-et. A peptid hatásait két GPCR, az ET_A- és az ET_B-receptorok közvetítik (Kedzierski és Yanagisawa, 2001). Szívizomsejtek mindkét receptor altípust expresszálják, az ET_A-receptorok jelentős dominanciája mellett (85–90%) (Molenaar és mtsai, 1993).

1.4.4.3. Az ET-1 hatása a szívizom-kontraktilitásra

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 (Kedzierski és Yanagisawa, 2001; Kohan és mtsai, 2011). Továbbá, az ET-1 a szívizom-kontraktilitás erőteljes stimulátora (Sugden, 2003; Brunner és mtsai, 2006; Endoh, 2008). A vizsgált emlősfajok zömében az ET-1 pozitív inotrop hatást váltott ki, így patkány (Kelly és mtsai, 1990; Krämer és mtsai, 1991), nyúl (Li és mtsai, 1991; Takanashi és Endoh, 1991; Wang és mtsai, 2000; Chu és Endoh, 2005), tengerimalac (Ishikawa és mtsai, 1988), macska (Cingolani és mtsai, 2006; De Giusti és mtsai, 2008), kutya (Chu és mtsai, 2003; Czóbel és mtsai, 2009) és emberi miokardiumban illetve izolált szívizomsejtekben (Schomisch-Moravec és mtsai, 1989; Pieske és mtsai, 1999; MacCarthy és mtsai, 2000; Goldberg és mtsai, 2000). Egér szívizomsejteken ugyanakkor ellentmondásos a peptid hatása, egyes szerzők szerint az ET-1 pozitív (Pi és mtsai, 2002), mások szerint negatív inotrop effektust hozott létre (Sakurai és mtsai, 2002; Nishimaru és mtsai, 2007; Nishimaru és mtsai, 2008). Felnőtt egérszíven azonban nem ismert, hogy az ET-1 miként befolyásolja a kontraktilitást. Számos adat utal arra, hogy az ET-1 inotrop hatását az ET_A-receptorok közvetítik (Goldberg és mtsai, 2000; Takeuchi és mtsai, 2001; De Giusti és mtsai, 2008), ugyanakkor az ET_B-receptorok szerepe nem tisztázott.

1.4.4.4. Az ET-1 potenciális jelátviteli mechanizmusai

1.4.4.4.1. A PLC-PKC jelátviteli út

Az ET-1 pozitív inotrop hatása hasonlóságot mutat az α_1 -AR-ok effektusával: elsősorban a miofilamentumok Ca²⁺-érzékenysége nő, az intracelluláris Ca²⁺-tranziensek mérsékelten fokozódnak csupán (Yang és mtsai, 1999; Talukder és mtsai, 2001). Az ET-1 inotrop effektusát közvetítő pontos szubcelluláris mechanizmusok feltárára várnak. Az ET-1 jelátvitelére magas fokú komplexitás jellemző. Klasszikus módon, az ET_A-receptor a G_{q/11}-fehérjén keresztül képes aktiválni a PLC–PKC kaszkádot szívizomsejtekben (Sugden, 2003; Brunner és mtsai, 2006). Számos vizsgálat szerint az ET-1 pozitív inotrop hatásáért döntően a NHE PKC-függő aktivációja felelős (Krämer és mtsai, 1991; Chu és mtsai,

2003; Zolk és mtsai, 2004) A fokozott NHE aktivitás intracelluláris alkalizációhoz vezethet, mely növeli a miofilamentumok Ca^{2+} -mal szembeni érzékenységét (Krämer és mtsai, 1991; Goldberg és mtsai, 2000). Másrészt, a NHE aktivációja révén 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 (Yang és mtsai, 1999; Perez és mtsai, 2001). A NCX mellett, az ET-1 az L-típusú Ca^{2+} -csatornák nyitása révén is elősegítheti az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek növekedését (Watanabe és Endoh, 1999).

1.4.4.4.2. Az ERK1/2 és a p38-MAPK jelátviteli út

Szívizomsejtekben az ET-1, a PLC–PKC kaszkád mellett, potens aktivátora a mitogén által aktivált proteinkinázoknak (MAPK-ok) (Sugden, 2003; Schorlemmer és mtsai, 2008). Felvetették, hogy a MAPK-ok családjába tartozó extracelluláris szignál által regulált kinázok (ERK1 és ERK2, továbbiakban ERK1/2) és a p38-MAPK szerepet játszik a szívhipertrófia és a szívelégtelenség kialakulásában (Bueno és Molckentin, 2002; Fuller és mtsai, 2008; Rose és mtsai, 2010). Kezdetben, mind az ERK1/2-ről, mind a p38-MAPK-ról úgy tartották, hogy serkentik a szívizomsejtek növekedését GPCR stimuláció (Ang II, ET-1) hatására (Clerk és mtsai, 1998). Azonban transzgénikus állatmodelleken nyert adatok szerint a MAPK-ok eltérő feladatot töltenek be a hipertrófiás válaszban. Az ERK1/2-t foszforiláló MAPK-kináz 1 (MEK1) aktivált formájának szívizom-specifikus overexpressziója mérsékelt fokú koncentrikus bal kamrai hipertrófiát eredményez, az állatok hosszú távon sem mutatnak hajlamot a szívelégtelenség kialakulására (Bueno és mtsai, 2000). Ezzel szemben, a p38-MAPK-t aktiváló MAPK-kinázok, az MKK3 illetve az MKK6, domináns negatív mutáns változatát expresszáló egerekben a miokardiális p38-MAPK jelátvitel krónikus gátlása progresszív szívhipertrófiához, majd szívelégtelenséghez vezetett. Az eredmények arra utalnak, hogy a p38-MAPK gátolja a szívizomsejtek növekedési folyamatait *in vivo* körülmények között (Braz és mtsai, 2003). A patológiás viszonyoktól eltérően, keveset tudunk a MAPK-ok fiziológiai szerepéről a szívben. Az MKK3bE overexpressziója esetén, a tartósan fokozott p38-MAPK aktivitás a kontrakciós erő csökkenéséhez vezetett patkány eredetű izolált szívizomsejteken (Liao és mtsai, 2002). Ugyanakkor a p38-MAPK akut aktivációjának jelentősége a szív működés szabályozásában tisztázásra vár. Továbbá, nem ismert, hogy az ERK1/2 direkt képes-e befolyásolni a szívizom kontraktilis állapotát intakt szíven.

1.4.4.4.3. A nitrogén-monoxid szerepe

A nitrogén-monoxid molekula a kardiovaszkuláris rendszer fontos regulátora mind élettani, mind patofiziológiai állapotokban (Pacher és mtsai, 2007). Az NO központi szerepet tölt be az értónus szabályozásában, mivel az NO közvetíti az endotheliumfüggő vazodilatációt

(Furchgott és Zawadzki, 1980; Palmer és mtsai, 1987). ET-1 stimuláció során az érsimaizomsejtek ET_A -receptorai vazokonstriktor hatást közvetítenek (Cannan és mtsai, 1995), míg az érendothelsejtek felszínén található ET_B -receptorok izgalma NO felszabadulást vált ki, mely az érszűkítő effektus ellen hat (Lerman és mtsai, 1992; Wang és mtsai, 1994).

A miokardiumban termelődő NO fontos szerepet játszik a szívizom-kontraktilitás szabályozásában (Kelly és mtsai, 1996; Massion és mtsai, 2003; Ziolo és mtsai, 2008). Az NO szintézisét a NOS enzimek végzik, miközben L-argininből L-citrullint hoznak létre. A NOS két izoformája, a neuronális típusú NOS (nNOS, NOS1) (Xu és mtsai, 1999) és az endothelialis típusú NOS (eNOS, NOS3) (Seki és mtsai, 1996), folyamatosan, alacsony szinten termeli az NO-t Ca^{2+} /kalmodulin-dependens módon a szívben (Ziolo és mtsai, 2008; Zhang és Casadei, 2012). A harmadik izoforma, az indukálható NOS (iNOS, NOS2), kizárólag patofiziológias viszonyok között (iszkémiás-reperfúziós károsodás, szívelégtelenség) expresszálódik. Az iNOS nagy mennyiségű NO-t képes termelni Ca^{2+} -independens módon (De Belder és mtsai, 1993).

Fiziológias körülmények mellett az NO termelődés jelentősen gyengítette a β -AR inotrop választ *in vitro* (Balligand és mtsai, 1993; Ebihara és Karmazyn, 1996; Gyurko és mtsai, 2000; Godecke és mtsai, 2001) és *in vivo* (Keaney és mtsai, 1996). Ugyanakkor más vizsgálatok szerint a NOS farmakológiai illetve genetikai inaktivációja nem fokozta a β -AR inotrop effektust (Vandecasteele és mtsai, 1999; Martin és mtsai, 2006). Habár a fent ismertetett módon, az NO képes ellensúlyozni az ET-1 vazokonstriktor hatását (Lerman és mtsai, 1992; Wang és mtsai, 1994), tisztázásra vár, hogy a peptid inotrop effektusát az NO képes-e módosítani.

1.4.4.4. A reaktív oxigén származékok szerepe

A normál aerob anyagcsere folyamán a szívben reaktív oxigén származékok (ROS, "reactive oxygen species") képződnek, mint a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2). Fiziológias viszonyok között a ROS termelődést az antioxidáns molekulák hatékonyan képesek ellensúlyozni (Giordano, 2005). Patofiziológias állapotokban, mint krónikus szívelégtelenségben, azonban a ROS termelődése jelentősen fokozódik. Ismert, hogy az oxidatív stressz számos kóros folyamatot indít el, hozzájárul a szívhipertrófia, az apoptotikus és nekrotikus sejtelhalás, valamint az intersticiális fibrózis kialakulásához, melyek összességében a szív pumpafunkciójának zavarához vezetnek (Sawyer és mtsai, 2002; Giordano, 2005; Zimmet és Hare, 2006; Murdoch és mtsai, 2006). A fokozott ROS produkció közvetlenül is ronthatja a kontraktilitást, a szabadgyök molekulák csökkenthetik a SERCA (Xu és mtsai, 1997; Li és mtsai, 2006; Tang és mtsai, 2010) és az L-típusú Ca^{2+} -csatornák működését, a cisztein molekulák tiolcsoportjainak (-SH) oxidációja révén (Gill és mtsai, 1995; Fearon és mtsai, 1999; Zima és Blatter, 2006).

Továbbá, a kontraktilis fehérjék direkt oxidatív módosulása (Borbély és mtsai, 2005; Kanski és mtsai, 2005; Rao és mtsai, 2007; Hertelendi és mtsai, 2008; Snook és mtsai, 2008; Canton és mtsai, 2011), valamint a foszforilációjukat irányító kinázok aktivitásának ROS-függő változása (Solaro, 2008; Sumandea és Steinberg 2011), szintén az erőgenerálás illetve a Ca^{2+} -érzékenység csökkenéséhez vezethet.

Kóros állapotoktól eltérően, a ROS fiziológias 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 összehúzódnások frekvenciájának növelésekor szimultán fokozódott a szívizomsejtek oxigénfogyasztása és a ROS produkció (Heinzel és mtsai, 2006; Saitoh és mtsai, 2006). Ugyanakkor számos ellentmondónak tűnő eredmény is napvilágot látott a ROS szerepével kapcsolatban. Egyes tanulmányok szerint a szabadgyök molekulák nem befolyásolják a kontraktilitást (Wenzel és mtsai, 2010), gyengítik (Mak és Newton, 2001; Dong és mtsai, 2006), vagy egyenesen fokozzák a kontrakciós erőt (Sand és mtsai, 2003; Cingolani és mtsai, 2006; De Giusti és mtsai, 2008). A zömében izolált szívizomsejteken nyert eredményektől eltérően, nem ismert, hogy a ROS termelődés miként befolyásolja a kontraktilitást fiziológias viszonyok között intakt szíven.

1.4.4.5. Az endogén ET-1 szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában

Kísérletek serege bizonyítja, hogy az exogén ET-1 erőteljesen képes fokozni a szívizom-összehúzódnások erejét (Sugden, 2003; Brunner és mtsai, 2006; Endoh, 2008), ugyanakkor az endogén ET-1 szerepe a kontraktilitás regulációjában kevésbé ismert. Izolált szívmodellben a koronáriaáramlás növelése során gyűjtött effluent egy második izompreparátumhoz adva, fokozta annak kontraktilitását (Ramaciotti és mtsai, 1993). Felvetették, hogy az endotheliumból felszabaduló kardioaktív faktor az ET-1 peptiddel azonos (McClellan és mtsai, 1994). Számos adat utal arra, hogy a Gregg-effektus hátterében a kapillárisok szintjén jelentkező fokozott nyírófeszültség a felelős (Dijkman és mtsai, 1998). Nem tisztázott azonban, hogy az endogén ET-1 szerepet játszik-e a Gregg-effektus létrejöttében.

Ismert, hogy a szívizomsejtek feszítés hatására hipertrofizálnak (Kehat és Molkenstein, 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 mtsai, 1993; Yamazaki és mtsai, 1996; 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 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 az 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

Terjedelmi korlátok miatt a módszerek ismertetését a legszükségesebb információkra szűkítettem, a technikai részletek a megfelelő közleményekben találhatóak meg.

3.1. Kísérleti modellek

3.1.1. Kísérleti állatok

Vizsgálataink alanyaiként hím patkányok szolgáltak a következő törzsekből: Sprague-Dawley (SD), spontán hipertenzív (SHR), Wistar-Kyoto (WKY), transzgénikus (mREN-2)²⁷ (TGR(mREN-2)²⁷), és dupla transzgénikus (dTG) patkányok. További kísérleteinkhez hím NMRI illetve C57 egereket használtunk. Az állatokkal kapcsolatos részletekről az adott publikációk adnak bővebb felvilágosítást. Valamennyi kísérleti eljárás és vizsgálat megfelelt a Helsinki Nyilatkozatban foglalt ajánlásoknak és eleget tett az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998 (XII. 31.) sz. kormányrendelet előírásainak, valamint a US National Institutes of Health "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85-23, Revised 1996)" ajánlásának. A kísérleti protokollokat a PTE állatkísérletekkel foglalkozó Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága, az Animal Use and Care Committee of University of Oulu (Oulu, Finnország), valamint az Ethical Review Committee of the Harefield Heart Science Center (Harefield, UK) engedélyezte.

3.1.2. Direkt miokardiális géntranszfer *in vivo*

Kísérleteinkben a patkány AM-t kódoló gént egy adenovírus vektorhoz kötöttük (Ad5RSVrAM) (Rauma-Pinola és mtsai, 2006), negatív kontrollként az *Escherichia coli* β -galaktozidáz (LacZ) génje (Ad5RSVLacZ) szolgált (Davidson és mtsai, 1994). Az SD patkányokat ketamin (50 mg/kg, i.p.) és domitor (250 μ g/kg, i.p.) kombinációjával altattuk el, mellkasnyitást követően az Ad5RSVrAM-t illetve az Ad5RSVLacZ-t (5×10^8 infekciós egység 100 μ L-ben) a bal kamra szabad falába injektáltuk. A kísérletek végén, a hemodinamikai vizsgálatokat követően, az állatok szívét eltávolítottuk, a bal kamra tömegét lemértük, majd a későbbi szövettani, biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatoknak megfelelő előkészítés után a kamrai mintákat lefagyasztottuk, és a feldolgozásig -70 °C-on tároltuk.

3.1.3. Bal kamrai nyomásterhelés modelljei

Akut nyomásterhelés hatását a kardiomiokinek bal kamrai expressziójára krónikusan kanulált, éber patkányokban vizsgáltuk, a korábban leírtaknak megfelelően (Magga és mtsai, 1997). Nyomásterhelést arginin-vazopresszin (AVP) (0.05 μ g/kg/perc, i.v.) segítségével hoztunk létre 15 perc, 30 perc, 1 óra, 2 óra és 4 óra időtartamra. A kontroll állatok a vivőanyag (0.9% NaCl, i.v.) infúzióját kapták. Szubakut és tartós nyomásterhelést

Ang II-vel váltottunk ki. Az Ang II-t (0.5 illetve 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{perc}$) illetve a vivőanyagát (0.9% NaCl) 12 órán illetve 1 héten keresztül infundáltuk szubkután beültetett ozmotikus minipumpák (Alzet 2001-es és 2002-es modell, Scanbur BK AB, Sollentuna, Svédország) segítségével. Nyomásterhelés krónikus modelljeiként hipertenzív transzgénikus TGR(mREN-2)27, dTG és SHR törzseket használtunk megfelelő kontrollok mellett. A TGR(mREN-2)27 patkányok az egér *Ren-2* renint kódoló gént (Mullins és mtsai, 1990), a dTG patkányok a humán angiotenzinogént és a humán renint kódoló géneket expresszálják fokozott módon (Bohlender és mtsai, 1997). A kísérletek végén az állatok szívét eltávolítottuk, a bal kamra tömegét lemértük, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a későbbi biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséig $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

3.1.4. Felnőtt kamrai szívizomsejtek izolációja

Izolált kamrai szívizomsejteket SD patkányokból nyertünk standard enzimatikus emésztéssel, a korábban leírtaknak megfelelően (Terracciano és MacLeod, 1997; Szokodi és mtsai, 2002). Az egészséges állatok mellett posztinfarktuszos szívelégtelenségben szenvedő SD patkányok szívéből is izoláltunk szívizomsejteket. Mély altatásban mellkasnyitást végeztünk, majd lekötöttük a bal elülső leszálló koronáriaágat. A szívelégtelenség kialakulását echokardiográfiás vizsgálattal igazoltuk az operációt követő 8. héten. A szívizomsejteket a bal kamra életképes területéből izoláltuk. A szeparálást követően a sejteket szobahőmérsékleten ($21\text{-}24\text{ }^\circ\text{C}$) tartottuk, a kísérletekre (kontraktilitás mérése, elektrofiziológiai és fluoreszcens vizsgálatok) 1-8 órán belül került sor.

3.1.5. Szívizomsejtek ciklikus mechanikai feszítése

In vitro modellen vizsgáltuk a tartós mechanikai feszítés hatását az apelin és az APJ-receptor expressziójára. Kamrai szívizomsejteket 2-4 napos SD patkányokból nyertük standard enzimatikus emésztés módszerével (Tokola és mtsai, 1994). A sejteket kollagén I-vel bevont flexibilis lemezre (Bioflex, Flexcell Int., McKeesport, PA, USA) helyeztük $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ denzitás mellett, majd egy éjszakán át 10%-os főtális szarvasmarha szérumot tartalmazó DMEM/F12-médiumban tenyésztettük. Következő nap szérummentes változatra cseréltük a médiomot, majd 24 óra elteltével a sejteket mechanikus feszítésnek tettük ki 1, 4, 12 és 24 óra időtartamra. A rugalmas tenyésztőlemezhez kitapadt sejteket számítógép vezérelte vákuumszívó (Flexercell Strain Unit FX-3000, Flexcell Int.) segítségével feszítettük (Liang és Gardner, 1999). A vákuum 2 másodperces ciklusonként változott, mely hatására a szívizomsejtek 10-25%-kal nyúltak meg maximálisan. A kísérletek végeztével a sejteket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd a későbbi molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséig $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

3.2. Vizsgálati módszerek

3.2.1. Hemodinamikai mérések *in vivo*

3.2.1.1. Vérnyomás monitorozása

Az akut nyomásterhelés fokát a vérnyomás direkt módon történő mérésével követtük. A krónikusan kanülált állatokban a jobb femorális artérián keresztül az aorta abdominális szakaszába helyezett katétert egy nyomásmérő transzducerrel kötöttük össze (MP-15, Micron Instruments, Los Angeles, CA, USA), az artériás középnyomást és a szívfrekvenciát egy Grass poligráf (7DA, Grass Instruments, Quincey, MA, USA) révén rögzítettük (Rompanen és mtsai, 1997). A szubakut és tartós nyomásterhelés követésére egy érzékelővel és jeladóval rendelkező katétert helyeztünk az aorta abdominális szakaszába (TA11PA-C40, DataSciences, Minneapolis, MN, USA), és a vérnyomást telemetriás úton monitoroztuk (Sármán és mtsai, 2007).

3.2.1.2. Balkamra-funkció vizsgálata *in vivo*

Az állatokat ketamin (50 mg/kg, i.p.) és xylazin (10 mg/kg, i.p.) kombinációjával szedáltuk. A balkamra-funkciót transztorakális echokardiográfia segítségével vizsgáltuk (Acuson Ultrasound System, Sequoia 512-es illetve 256-os modell; 15-MHz-es lineáris transzducer, 15L8). Az M-módban készített felvételek alapján határoztuk meg a bal kamrai végszisztolés átmérőt (*“left ventricular end-systolic dimension”, LVESD*), a végdiasztolés átmérőt (*“left ventricular end-diastolic dimension”, LVEDD*), az interventrikuláris szeptum és a bal kamra hátsó falának vastagságát. A bal kamrai frakcionális rövidülést (FS) és ejekciós frakciót (EF) a kamrai dimenziók alapján számítottuk ki az alábbi formulák szerint: $FS (\%) = [(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \times 100$; $EF (\%) = [(LVEDD)^3 - (LVESD)^3] / LVEDD^3 \times 100$ (Sármán és mtsai, 2007; Farkasfalvi és mtsai, 2007; Leskinen és mtsai, 2008).

3.2.2. Balkamra-funkció vizsgálata *ex vivo*

3.2.2.1. Balkamra-funkció vizsgálata izolált patkányszív-preparátumon

Kísérleteink során 7-8 hetes hím SD és dTG patkányokat használtunk. Dekapitáció és mellkasnyitás után az állatok szívét kimetszettük, az aortát kanüláltuk, a szívet felhelyeztük egy perfúziós rendszerre, majd Langendorff-szerint retrográd perfúziót indítottunk. A szíveket módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferrel perfundáltuk (pH=7.4, 95% oxigén és 5% szén-dioxid elegyével kiegyensúlyozva 37°C-on). Az oldat összetétele a következő volt (mmol/L-ben kifejezve): NaCl 113.8, NaHCO₃ 22.0, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.1, CaCl₂ 2.5, és glükóz 11.0. A konstans sebességű perfúziót perisztaltikus pumpa (Minipuls 3, 312-es modell, Gilson, Villiers, Franciaország) biztosította. Az SD patkányszíveket 5.5 mL/perc sebességgel perfundáltuk, a hipertrófiás

dTG szívek esetén a perfúziós rátát a bal kamra tömegének megfelelően korrigáltuk. A perfúziós nyomás esetleges változását nyomásmérő transzducerrel mértük (MP-15-ös modell, Micron Instruments, Los Angeles, CA, USA), a nyomásmérő kanüljét az aortakanül oldalágával kötöttük össze. Pitvari ingerléssel (Grass stimulátor, S88-as modell, 11 V, 0.5 ms) tartottuk fenn az állandó (≈ 300 ütés/perc) szívfrekvenciát. Az ismertett kísérleti elrendezésben a retrográd perfúzió során az aortabillentyűk záródnak, a perfuzátum a koszorúserekbe áramlik. A koronáriakeringést ily módon fenntartva, a balkamra-funkció több órán keresztül stabil marad, ideális körülményeket teremtve a kontraktilitás vizsgálatára. Továbbá, az izolált szívpreparátum használata révén kiküszöbölhetőek az idegi, humorális illetve szisztémás hemodinamikai hatások.

Kísérleteinkben a kamrai kontraktilitás *ex vivo* megítélésére két módszert használtunk. A vizsgálatok zömében a kontraktilis erő változását a szív apikobazális elmozdulása révén követtük. A bal kamra csúcsához egy az erőt és az elmozdulást detektáló transzducert (*“force-displacement transducer”*, FT03-as modell, Grass Instruments) kapcsoltunk, mely az auxotóniás kontrakciók követésére alkalmas. E rendszerben a kialakult izomerő (*“developed tension”*) változását vizsgáltuk. A kísérleteket 2 g kezdeti előterhelés mellett végeztük. Ezen kísérleti modellben a kontrakciós erőt, szívfrekvenciát és perfúziós nyomást egy Grass poligráf (7DA) segítségével regisztráltuk.

További vizsgálataink során egy folyadékkal töltött ballont helyeztünk a bal kamrába, melyet egy nyomásmérő transzducerhez kötöttünk (Isotec, Hugo Sachs Elektronik, Németország) és ily módon az izovolémiás összehúzódások változását követtük. Az alábbi paramétereket mértük illetve származtattuk: bal kamrai végszisztolés nyomás (LVESP), végdiasztolés nyomás (LVEDP), pulzusnyomás (DP, ahol $DP = LVESP - LVEDP$), a bal kamrai nyomásgörbe idő szerinti első deriváltjának a maximális pozitív és negatív értékei (dP/dt_{max} illetve dP/dt_{min}), a bal kamrai nyomásgörbe exponenciális csökkenésének időállandója (τ). Az analóg jeleket digitalizáltuk 1 kHz mintavételi frekvencia mellett. Az adatokat PC kompatibilis számítógépen tároltuk, a Ponemah szoftver (Gould Instrument System Inc., Ohio, USA) segítségével rögzítettük és elemeztük.

A retrográd perfúzió megkezdését követően a szívek stabilizálódtak (40-60 perc), majd egy 5 perces kontroll periódus után megkezdjük a kísérleti anyagokkal történő perfúziót. A vizsgált peptidek (AM, apelin, PrRP, ET-1) a Phoenix Europe GmbH-től illetve a Peninsula Laboratories Europe-től származtak, a gátlószereket részben adományként kaptuk (Dr. M. Clozel, Hoffmann-La Roche Ltd. és Actelion Ltd.; Dr. R. Tracey, Pfizer Global Research and Development; Dr. J. Pünter, Sanofi-Aventis; Dr. H. Toguchi, Takeda Chemical Industries Ltd.; és Dr. K. Yokota, Nippon Organon K.K.); részben a Calbiochem-Novabiochem Co., a Merck Chemicals Ltd., és a Sigma-Aldrich Co. termékei voltak. Az egyes peptideket önmagukban illetve különböző receptorblokkolók és jelátvivők

gátlószerei jelenlétében adagoltuk. A kontroll kísérletekben az alkalmazott hatóanyagok vivőanyagát infundáltuk. Az ágenseket egy infúziós pumpa (Secan PSA 55-ös modell, Skyelectronics S.A., Grenoble, Franciaország) segítségével juttattuk a perfuzátumba az aortakanül oldalágán keresztül. Az egyes peptidok inotrop hatásának eltérő időbeli lefutását figyelembe véve, az infúziós periódus 10 és 30 perc között változott. A kísérletek végén a bal kamrát folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a későbbi biokémiai vizsgálatok elvégzéséig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A Frank-Starling-mechanizmust vizsgálándó, a stabilizációt követően az intraventrikuláris ballon térfogatát $10\text{ }\mu\text{L}$ -es lépésekben növeltük. A hemodinamikai paramétereket a térfogat minden egyes emelését követően 1 percen belül rögzítettük, amint a szív elérte az új egyensúlyi állapotát. Egyes kísérletekben a stabilizációs periódust követően 10 percig előkezeltük a szíveket a megfelelő ágensekkel, majd az infúzió folytatása mellett lépésről lépésre növeltük a kamrai ballon térfogatát. A maximális ballon volumenként (V_{\max}) azt az értéket definiáltuk, amely mellett a csúcs pulzusnyomást észleltük. Hipertrofizált és nem hipertrofizált szíveken a szisztolés és a diasztolés funkciót azonos végdiasztolés nyomás mellett (LVEDP=3 mmHg) illetve a V_{\max} 50%-os értékénél vetettük össze (Strömer és mtsai, 1997).

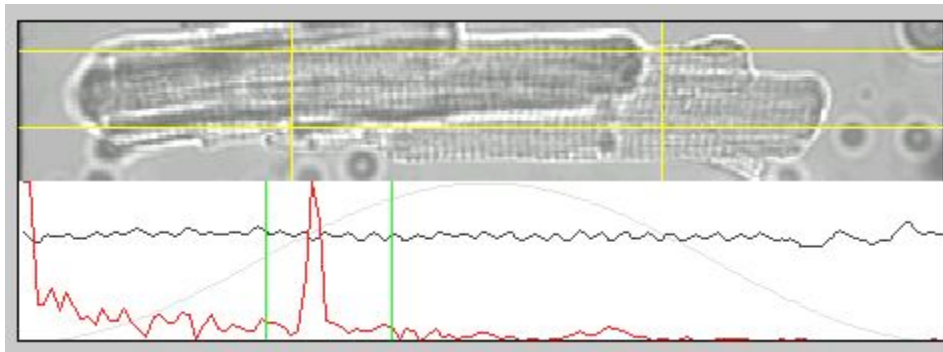
3.2.2.2. Balkamra-funkció vizsgálata izolált egérszív-preparátumon

Kísérleteinkhez 10-13 hetes hím NMRI illetve C57 egértörzseket használtunk. Az egérszívek izolálásának menete és a Langendorff-szerinti retrográd perfúziója a patkányoknál ismertetett módon zajlott (3.2.2.1. fejezet). Az egérszíveket 2.0 mL/perc sebességgel perfundáltuk, a szívfrekvenciát pitvari ingerlés révén ≈ 400 ütés/percen tartottuk. Az egyes ET-receptorok szerepét tanulmányozandó, a stabilizációt (50 perc) követően 10 percig előkezeltük a szíveket az egyes receptorblokkolókkal, majd az ET-1 jelenlétében folytattuk a perfúziót további 20 percig. A Gregg-effektus vizsgálata céljából, a bazális koronáriaáramlást $4, 5$ illetve 6 mL/percre növeltük. További kísérleteinkben 10 perces ET-receptor-antagonista előkezelést követően emeltük meg a koronáriaáramlást 5 mL/percre és folytattuk a perfúziót a gátlószerek jelenlétében 30 percig. Végezetül e modellben vizsgáltuk, hogy a koronáriaáramlás tartós emelése 2 órás időtartamra miként befolyásolja az ET-1 kamrai expresszióját. A kísérletek végén a bal kamrát folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a későbbi molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

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 egy mérőkádban, melyet egy invertáló mikroszkóp (Nikon TE 200) tárgyasztalára helyeztünk. Az oldat összetétele a következő volt (mmol/L-ben

kifejezve): NaCl 120.0, NaHCO₃ 25.0, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄•7H₂O 0.94, CaCl₂ 1, és glükóz 11.5 (pH 7.4). A szívizomsejtekről egy iCCD-kamera (Ionoptix Myocam CCD 100M, Ionoptix Co., Milton, MA, USA) segítségével 240 Hz-es mintavételi sebesség mellett készítettünk felvételeket. A kamrai szívizomsejtek mozgását digitalizáltuk és a szarkomerhossz (SL, “sarcomere length”) rövidülését Fourier analízis segítségével határoztuk meg az Ionwizard™ szoftver (Ionoptix Co.) használatával. A mérés alapja a szarkomerek mintázatának változása. A vastag filamentumok optikai denzitása magas, ezzel szemben a vékony filamentumok transzparenssek. Ily módon a szomszédos Z-vonalak közötti távolság csökkenése a kontrakció során detektálhatóvá válik (Delbridge és Roos, 1997) (4. ábra).



4. ábra: A szarkomerhossz-rövidülés mérése izolált kamrai szívizomsejten.

Az ábra felső részén izolált kamrai szívizomsejtről készített felvétel látható. A sárga téglalappal jelzett területen történt a szarkomerek mintázatának Fourier-transzformációja. Az ábra alsó részén látható piros csúcs a mintavételi területen bekövetkezett átlagos SL-rövidülésnek felel meg (Ionwizard™ szoftver, Ionoptix Co., CA, USA).

3.2.4. Elektrofiziológiai vizsgálatok

3.2.4.1. Elektrofiziológiai vizsgálatok izolált pitvari preparátumon

Az AM elektrofiziológiai hatásait izolált pitvari preparátumon vizsgáltuk. A bal pitvarokat hím SD patkányokból nyertük a korábban leírtaknak megfelelően (Tavi és mtsai, 1996). Kimetszést követően a pitvarokat állandó hőmérsékletű (37°C) szervfürdőbe helyeztük és Krebs-Henseleit bikarbonát pufferrel áramoltattuk egy perisztaltikus pumpa segítségével (7553–85-ös modell, Cole-Parmer Instrument, USA) 3 mL/perc sebesség mellett. A membránpotenciál méréséhez üveg mikropipettákat használtunk, melyeket K-acetátot (2 mol/L) és KCl-ot (5 mmol/L) tartalmazó oldattal töltöttünk fel (pH 7.0). A mikropipetták elektromos ellenállása 70-120 MΩ volt. A pitvari preparátum spontán aktivitást nem mutatott, elektromos ingerlést egy Grass stimulátorral (S44-es modell, küszöbfezültség felett 50%-kal, 1 ms) végeztünk. Az elektromos jeleket egy intracelluláris erősítő (Dagan 8100–1-es modell) segítségével erősítettük fel, és egy DAT rekorderen (Biologic DTR-1800-

as modell) tároltuk. Az adatokat DT VEE (Data Translation Inc) és MATLAB (The Math Inc Natick) szoftverek használatával elemeztük. A mintavételi frekvencia 3 kHz volt.

3.2.4.2. Patch-clamp mérések

Az apelin hatását a feszültség-aktiválta Ca^{2+} - és K^{+} -áramokra patch-clamp módszerrel tanulmányoztuk. Kísérleteinket amfotericin B-perforált patch-clamp technika teljes-sejtes ("whole-cell") konfigurációjában végeztük izolált, felnőtt, patkány kamrai szívizomsejteken (Rae és mtsai, 1991). Vékony, bórszilikát üveg kapillárisokból (Clark Electromedical, UK) készítettük a mérésekhez használt mikropipettákat, melyek elektromos ellenállása 1,8-2,5 M Ω volt. A méréseket Axopatch-1D CV4-1/100 (Axon Instruments, USA) patch-clamp erősítőből és Digidata 1200 interfészből (Axon Instruments) álló rendszerrel végeztük pClamp™ 7.0 szoftver (Axon Instruments) használatával. A kísérleteket 30°C-on folytattuk.

A kifelé irányuló K^{+} -áram mérése során alkalmazott külső oldat összetétele a következő volt (mmol/L-ben): NaCl 140, KCl 4, CaCl_2 1, MgCl_2 1, glükóz 10, HEPES 10 (pH 7.4). A Na^{+} -, a Ca^{2+} -, és a befelé egyenirányító K^{+} -áramot 30 $\mu\text{mol/L}$ TTX, 0.3 mmol/L CdCl_2 , és 4 mmol/L CsCl segítségével blokkoltuk. A pipetta oldata a következőket tartalmazta (mmol/L-ben): KCl 155 és HEPES 10 (pH 7.2). A Ca^{2+} -áram mérése során a sejteket a következő oldattal áramoltattuk (mmol/L-ben): NaCl 145, CsCl 4, CaCl_2 1.5, MgCl_2 1, glükóz 10, HEPES 10, és 30 $\mu\text{mol/L}$ TTX (pH 7.4). A pipetta oldatának az összetétele a következő volt (mmol/L-ben): CsCl 155 és HEPES 10 (pH 7.2). Az amfotericin B koncentrációja a pipetta oldatában 200 $\mu\text{g/mL}$ volt.

Kísérleteinkben az L-típusú Ca^{2+} -áramot 200 ms-ig tartó -40 mV és +40 mV közötti feszültséglépcsőkkel váltottuk ki -60 mV tartópotenciáltól 20 mV-os lépésekben. A kifelé irányuló K^{+} -áramot 400 ms-ig tartó -40 mV és +80 mV közötti feszültséglépcsőkkel váltottuk ki -60 mV tartópotenciáltól 10 mV-os lépésekben. A kifelé irányuló K^{+} -áram két komponensét különböztettük meg, a tranziens kifelé irányuló K^{+} -áramot ("transient outward current", I_{to}), valamint az inaktiváció jeleit nem mutató, tartós K^{+} -áramot ("sustained K^{+} current", $I_{K,sus}$). Az I_{to} -t a kifelé irányuló csúcs K^{+} -áram és a 400 ms-os feszültséglépcső végén jelentkező kifelé folyó K^{+} -áram különbségeként definiáltuk. Az $I_{K,sus}$ -t a 400 ms-os feszültséglépcső végén mérhető áramként határoztuk meg. További technikai részletek az eredeti közleményben lelhetők fel (Szokodi és mtsai, 2002).

3.2.4.3. Multielektród-array

Az apelin elektrofiziológiai hatásait multielektród-array (MEA) (Multi Channel Systems, Reutlingen, Németország) segítségével vizsgáltuk (Meiry és mtsai, 2001). Újszülött SD patkányokból nyert szívizomsejteket MEA lemezre helyeztük és 37°C-on tenyésztettük, az egybefüggő, egyrétegű állapot eléréséig. A spontán elektromos aktivitást, a vezetési sebességet és a mezőpotenciál jellemzőit rögzítettük. Minden elektródnál a lokális

aktivációs időt a Matlab™ interfész (7.0.1 verzió, Mathworks Inc, Németország) és a MEA-Tools szoftver (2.8 verzió, U. Egert, University of Freiburg, Németország) segítségével határoztuk meg. Az akciós potenciál első deriváltja, a mezőpotenciál, időtartamát és alakját a Clampfit™ szoftverrel (Axon Instruments) elemeztük.

3.2.5. Fluoreszcens vizsgálati módszerek

3.2.5.1. Intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése

Az apelin hatását az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációra két különböző fluoreszcens indikátor segítségével vizsgáltuk (indo-1-AM, fluo-4-AM; Invitrogen, UK) konfokális invertáló mikroszkóppal. A mérések során a fluoreszcenciás háttérintenzitást levontuk a kapott jelből. Az indo-1 AM esetén a kibocsátott fluoreszcencia alapján az F405/485 hányados segítségével kalkuláltuk az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ot. A fluo-4-AM esetén az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ot a korábban közölteknek megfelelően számítottuk (Huser és mtsai, 1998). A csúcs amplitúdót, a csúcsig eltelt időt ("time-to-peak", T_{peak}), valamint az 50%-os illetve 90%-os csökkenés idejét (T_{50} , T_{90}) határoztuk meg az Ionwizard™ szoftver (Ionoptix Co.) segítségével.

3.2.5.2. Intracelluláris pH és NHE aktivitás mérése

Az apelin hatását az intracelluláris pH-ra karboxi-SNARF-1 AM (Invitrogen, UK) fluoreszcens indikátor segítségével vizsgáltuk konfokális invertáló mikroszkóppal. A szívizomsejteket normál Tyrode-oldattal áramoltattuk 37°C-on, az oldat összetétele a következő volt (mmol/L-ben kifejezve): NaCl 140.0, KCl 6.0, MgCl_2 1.0, CaCl_2 1.0, glükóz 10.0, és HEPES 10.0 (pH 7.4). A sejteket 10 $\mu\text{mol/L}$ karboxi-SNARF-1 AM jelenlétében inkubáltuk, és az 580 nm-es és a 640 nm-es hullámhosszon emittált fluoreszcenciát mértük. Az intracelluláris pH-t az F580/640 hányados alapján határoztuk meg, ismert pH-jú oldatokkal készített kalibrációs egyenes segítségével. A NHE aktivitását NH_4Cl "prepulse" módszerrel vizsgáltuk (Boyarsky és mtsai, 1988). Röviden, a kamrai szívizomsejteket normál Tyrode-oldattal áramoltattuk, majd 5 percig 15 mmol/L NH_4Cl -nak tettük ki őket, majd visszaváltottunk a normál Tyrode-oldatra 10 percre. Ezt követően a savterhelést és a kimosást megismételtük az előzőeknek megfelelően illetve apelin jelenlétében. A sejtek savtávolítási sebességét a kimosási fázis alatti SNARF-1 F580/640 fluoreszcencia hányados csökkenésének időállandójával ($T_{\text{F580/640}}$) jellemeztük (pClamp™ 9.0 szoftver, Axon Instruments), mely a NHE aktivitás indexe.

3.2.5.3. Intracelluláris ROS termelődés mérése

Az ET-1 hatását a ROS termelődésre izolált patkányszív-preparátumon vizsgáltuk. A ROS termelődés mértékét az etidium fluoreszcencia mérésével ítéltük meg konfokális mikroszkópia segítségével, a korábban leírtaknak megfelelően (Sovershaev és mtsai,

2006). Kísérleteink során a vizsgált ágenseket dihidroetidium ($10 \mu\text{mol/L}$) jelenlétében adagoltuk 10 percre, melyet egy 5 perces kimosási fázis követett. A sejtekbe bejutott dihidroetidiumot az intracellulárisan termelődő ROS etidiummá oxidálja, mely a DNS-hez kapcsolódik. A dihidroetidium etidiummá történő oxidációja és a fluoreszcencia következményes fokozódása egyenes arányban áll a ROS, elsősorban a O_2^- , mennyiségével (Kevin és mtsai, 2003). A kísérletek végeztével a bal kamrát Tissue-Tec O.C.T. anyagba (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Hollandia) ágyaztuk, majd lefagyasztottuk (-70°C). A mikroszkópiához $20 \mu\text{m}$ -es kriometszeteket készítettünk. Az etidium fluoreszcenciát Olympus Fluoview 1000 konfokális invertáló mikroszkóppal vizsgáltuk. Az etidiumot 488 nm -en ingereltük, a festék által kibocsátott fényt az $560\text{-}660 \text{ nm}$ közötti tartományban mértük. Minden egyes hisztológiai mintából egy $635 \times 635 \mu\text{m}$ -es (1024×1024 pixel) területet választottunk ki véletlenszerűen. A felvételeket Fluoview 1.04a szoftverrel (Olympus Optical Co., Japán) elemeztük. Felvételenként 5-10 véletlenszerűen kiválasztott sejtmag fluoreszcens intenzitását mértük le a háttér levonása mellett.

3.2.6. Western-blot analízis

Bal kamrai szövetmintákat proteázgátlókat tartalmazó lízispufferben homogenizáltuk, majd a vizsgálandó célfehérjéknek megfelelően a teljes fehérjefrakciót illetve a citoszól- és a membránfrakciót elválasztottuk. A fehérjemintákat ($30 \mu\text{g}$) nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) megfuttattuk, majd nitrocellulóz membránra vittük át. A nem-specifikus kötődés gátlását követően a membránokat a megfelelő elsődleges ellenanyagok jelenlétében inkubáltuk egy éjszakán át. A primer antitestek kötődését peroxidázzal kapcsolt másodlagos antitestekkel mutattuk ki. A fehérjeszinteket erősített kemilumineszcens módszerrel detektáltuk. A felhasznált elsődleges antitestek a következők voltak: anti-foszfo-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-p38-MAPK, és anti-foszfo-p90 riboszómális S6-kináz (Cell Signaling Technology Inc., Hitchin, Hertfordshire, UK), anti-foszfo-p38-MAPK (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA), anti-epidermális növekedési faktor-receptor, anti-foszfo-(Ser16)-PLN (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), és anti-foszfo-tirozin (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), valamint izoforma specifikus PKC ellenanyagok (anti-PKC α , δ és ϵ) (Sigma, Saint Louis, Mo, USA).

3.2.7. p38-MAPK assay

Bal kamrai szövetmintákat proteázgátlókat tartalmazó lízispufferben homogenizáltuk. A p38-MAPK aktivitásának meghatározásához szubsztrátként az ATF-2 fehérje szolgált. A fehérjemintákat ($250 \mu\text{g}$) immobilizált foszfo-p38-MAPK elleni antitesttel inkubáltuk 4 óráig. A nyert pelletet újra szuszpenzióba vittük, majd $200 \mu\text{mol/L}$ ATP-t és $2 \mu\text{g}$ ATF-2 fúziós fehérjét (Cell Signaling Technology Inc., Hitchin, Hertfordshire, UK) adtunk az

elegyhez. A reakciót 30°C-on 30 percig folytattuk. A mintákat ezután forraltuk, centrifugáltuk, majd immunblot technikával meghatároztuk a foszfo-ATF-2 szintjét.

3.2.8. RNS meghatározási módszerek

3.2.8.1. Northern-blot analízis

A bal kamrai mintákból a guanidintiocianát-CsCl módszer segítségével nyertünk teljes RNS-t. 20 µg RNS-mintát nylon membránra (Hybond-N, Amersham, Arlington Heights, IL, USA) vittünk fel Northern-blot analízis céljából. A mérésekhez teljes hosszúságú patkány pitvari nátriuretikus peptid (ANP) cDNS próbát (Dr P. L. Davies adománya, Queen's University, Kingston, Kanada), 390 bázispár hosszúságú patkány B-típusú nátriuretikus peptid (BNP) cDNS próbát (Dr. K. Nakao adománya, Kyoto University School of Medicine, Kyoto, Japán), polimeráz láncreakció (PCR) révén felerősített patkány AM cDNS próbát (287-736 közötti nukleotidok), teljes hosszúságú patkány gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) cDNS próbát, és patkány 18S riboszómális RNS-hez készített cDNS próbát használtunk. A cDNS próbákat megjelöltük, a membránokat hibridizáltuk, mostuk, majd kvantifikáltuk a korábban leírtaknak megfelelően (Lakó-Futó és mtsai, 2003).

3.2.8.2. Kvantitatív RT-PCR analízis

A bal kamrai mintákból izolált 0.5 µg RNS-ből szintetizáltunk cDNS-t (First-Strand cDNA Synthesis Kit, Amersham). Patkány angiotenzinkonvertáz, AT₁-receptor, c-fos, ET-1, ET_A-receptor és 18S RNS szintjét kvantitatív valósídejű RT-PCR (TaqMan) segítségével mértük meg (ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a korábban leírtaknak megfelelően (Lakó-Futó és mtsai, 2003). A felhasznált primerek és próbák szekvenciáját az eredeti közlemények tartalmazzák.

3.2.9. Radioimmunoassay

Az immunoreaktív AM (ir-AM) és az immunoreaktív ET-1 (ir-ET-1) szintjét a bal kamrai szövetkivonatokban specifikus radioimmunoassay-k (RIA) segítségével határoztuk meg (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Németország). Az AM és az ET-1 esetében a RIA érzékenysége 1 fmol/cső illetve 0.3 fmol/cső volt. Az intra- és interassay eltérés <10% illetve <15% volt. Továbbá, az Amersham által forgalmazott RIA kiset használva határoztuk meg a bal kamrai szövetmintákban a cAMP-szintet.

3.2.10. Immuncitokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

Immuncitokémiai és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk az APJ-receptor lokalizációjának megállapítására. Izolált patkány kamrai szívizomsejteket lamininral fedett

sejtenyésző lemezekre ülepítettük sejt kultúra médiumban. Patkányszívekből 10 µm-es metszeteket készítettünk kriosztáttal, melyeket polilizinnel fedett tárgylemezekre helyeztünk. Az izolált szívizomsejteket és a kriometszeteket acetonnal fixáltuk -20°C-on, foszfát pufferrel (PBS) mostuk, majd 2 órán át az elsődleges antitestekkel inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az APJ-receptor két különböző régiója ellen termeltetett ellenanyagot használtunk, az egyik a receptor C-terminális régióját (nyúl anti-APJ-receptor IgG, Phoenix Pharmaceuticals Inc., CA, USA, 1:100 hígítás), míg a másik a citoplazmás hurok régiót (nyúl anti-APJ-receptor affinitás kromatográfia segítségével tisztított IgG, Neuromics, MS, USA, 1:1000 hígítás) ismeri fel. A metszeteket PBS-sel mostuk, majd AlexaFluor596-konjugált nyúl elleni IgG-vel (Invitrogen, UK) inkubáltuk 1 órán át, ismét PBS-sel mostuk, majd a sejtmagokat DAPI-val jelöltük (Invitrogen, UK). Végezetül Leica TCS SP konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems, UK) készítettük felvételeket.

A direkt miokardiális géntranszfer (3.1.2. fejezet) hatékonyságának és szöveti kiterjedésének megítélésére X-gal festést végeztünk. A bal kamrai szeleteket 4%-os paraformaldehidet tartalmazó PBS-oldattal fixáltuk szobahőmérsékleten 10 percig, majd X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) festék (1 mg/mL) jelenlétében inkubáltuk 37°C-on 3 óra időtartamig. A mintákat Tissue-Tec O.C.T. anyagba (Sakura Finetek Europe) ágyasztuk, majd lefagyasztottuk (-70°C). A metszeteket hematoxilín-eozinnal ellenfestettük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Az X-gal a laktóz egyik analógja, amit a LacZ képes bontani. Az enzim hiányában színtelen, jelenlétében azonban egy kék bomlástermék keletkezik.

3.2.11. Statisztikai elemzés

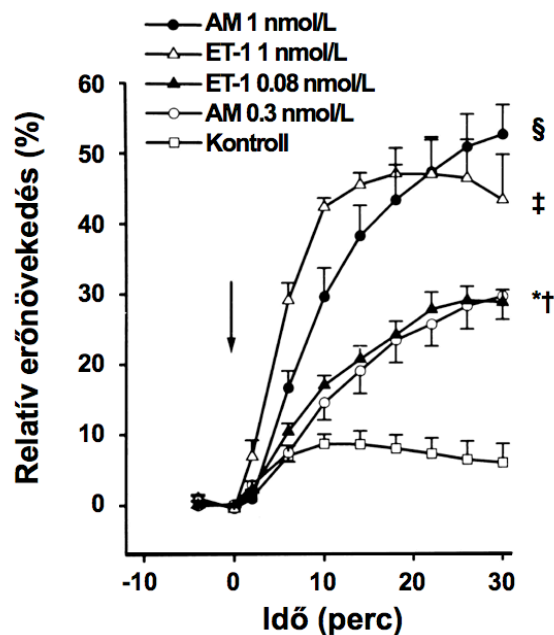
A kísérleti eredményeket átlag±mintaközép hibája (*“standard error of mean”*, S.E.M.) formában mutatjuk be. Az adatokat az adott kísérleti elrendezésnek legmegfelelőbb statisztikai próbákkal (Student-féle t-próba, 1-utas ANOVA-t követő post hoc teszt, 2-utas ismétlődő ANOVA-t követő post hoc teszt) elemeztük 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 szabályozásában

4.1.1. Az AM pozitív inotrop hatása ex vivo

Korábbi eredményeink szerint az AM 0.03-1 nmol/L koncentráció tartományban dóziszfüggő pozitív inotrop hatást hozott létre spontán verő izolált patkányszíven (Szokodi és mtsai, 1996). Jelen vizsgálatainkat pitvari elektromos ingerlés mellett végeztük, hogy kivédjünk bárminemű, másodlagos frekvenciafüggő változást a kontraktilitásban. A szívpreparátum kellően stabil volt, a kontroll kísérletek során az oldószer 30 perces infúziója nem befolyásolta a kontrakciós erőt (5. ábra). Az AM (0.03 és 1 nmol/L) dóziszfüggő módon fokozta a kamrai kontraktilitást (5. ábra). Összehasonlítottuk az AM és az ET-1 hatását, melyet a legpotensebb pozitív inotrop anyagnak tartottak (Kelly és mtsai, 1990). Az AM és az ET-1 1 nmol/L-es koncentráció mellett jelentkező csúcshatása megegyezett. Továbbá, az AM 0.03 nmol/L mellett azonos hatást hozott létre, mint az ET-1 0.08 nmol/L-es koncentrációnál (5. ábra).

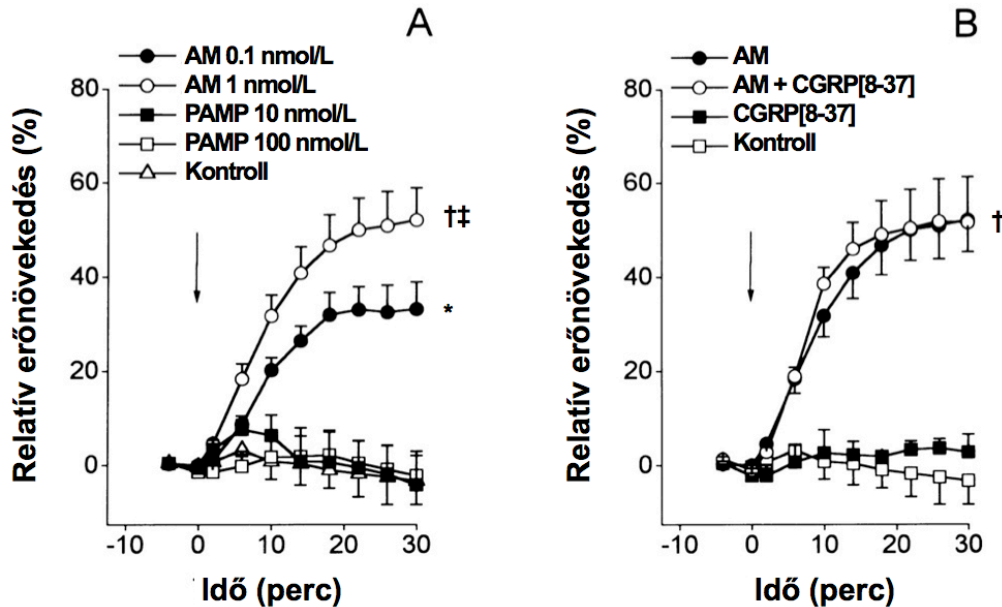


5. ábra: Az AM hatása a szívizom-kontraktilitásra izolált patkányszíven.

Az AM és az ET-1 dóziszfüggő módon fokozta a kontrakciós erőt. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja be (átlag±S.E.M., n=6-9 szív csoportonként). Az adatokat kétutas ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.001$ AM (0.03 nmol/L) vs. kontroll; † $P < 0.001$ ET-1 (0.08 nmol/L) vs. kontroll; ‡ $P < 0.001$ vs. kontroll és $P < 0.01$ vs. ET-1 (0.08 nmol/L); § $P < 0.001$ vs. kontroll és $P < 0.001$ vs. AM (0.03 nmol/L). (Kinnunen és mtsai, 2000 alapján)

Az AM pozitív inotrop hatása 64%-a volt az izoproterenollal (10 μ mol/L) kiváltott maximális β -AR válasznak, ugyanakkor annál 10000-szer alacsonyabb koncentráció mellett jött létre (22B. ábra). Az AM hatása extrém lassan fejlődött ki, a maximális effektus 25.4 ± 1.3 perc

után jelentkezett, míg az ET-1 inotrop effektusa átlagosan 15.7 ± 2.7 percnél érte el a maximumát ($P < 0.01$, AM vs. ET-1; 5. ábra). A hatások kialakulásának dinamikája szöges ellentétben állt a kontrakciós erő β -AR stimulációkor bekövetkező rendkívül gyors, másodperceken belüli fokozódásával (22B. ábra).



6. ábra: Az AM inotrop hatásának specificitása izolált patkányszíven.

(A) Az AM dóziszfüggő módon fokozta a kontrakciós erőt, míg a PAMP nem volt hatással az inotropiára. (B) A CGRP-receptor-antagonista CGRP[8-37] (100 nmol/L) nem befolyásolta az AM (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja be (átlag \pm S.E.M., $n=4-7$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.01$, † $P < 0.001$ vs. kontroll; ‡ $P < 0.05$ vs. AM (0.1 nmol/L). (Szokodi és mtsai, 1998 alapján)

A továbbiakban az AM hatásának specificitását vizsgáltuk. Kísérleteink idején még nem volt ismert, hogy az AM milyen receptoron keresztül fejti ki a hatását, ennek megfelelően specifikus AM-receptor antagonisták sem állt rendelkezésre. Az AM homológiát mutat a CGRP-vel (Kitamura és mtsai, 1993a; Szokodi és Ruskoaho, 2008). Továbbá, CGRP[8-37]-tel, egy CGRP-receptor-antagonistával, az AM egyes biológiai hatásai kivédhetőek (Eguchi és mtsai, 1994; Entzeroth és mtsai, 1995; Ikeda és mtsai, 1996). Eredményeink szerint a CGRP[8-37] 100 nmol/L koncentráció mellett nem befolyásolta az AM pozitív inotrop hatását ($P = \text{NS}$; 6B. ábra). Megjegyzendő, hogy más szerzők adataival összhangban (Holman és mtsai, 1986; Ishikawa és mtsai, 1988), a CGRP (1-10 nmol/L) önmagában nem volt hatással a kamrai kontraktilitásra ($P = \text{NS}$). A következőkben a proadrenomedullin N-terminális 20 peptid, a PAMP hatását vizsgáltuk. Immunoreaktív PAMP (Kitamura és mtsai, 1994) és specifikus PAMP kötőhelyek (Iwasaki és mtsai, 1996) létét igazolták patkányszíven, felvetve a lehetőségét, hogy a PAMP hatással lehet a szívizom kontraktilis erejére. Kísérleteinkben a PAMP (10 és 100 nmol/L) nem befolyásolta szignifikánsan a kontraktilitást ($P = \text{NS}$; 6A. ábra).

4.1.2. AM overexpresszió hatása a balkamra-funkcióra

Az AM hatása a kontraktilitásra ellentmondásos. A korábbiakban ismertetett, izolált patkányszíven nyert adatainkkal szemben, patkány eredetű izolált szívizomsejteken a peptid bifázisos hatást mutatott (Mittra és mtsai, 2004; Mittra és Bourreau, 2006), míg nyúl (Ikenouchi és mtsai, 1997) és humán eredetű izolált kamrai szívizomsejteken (Mukherjee és mtsai, 2002) az AM csökkentette a kontrakciós erőt. Végezetül, mások nem tapasztaltak változást a kontraktilitásban AM hatására patkány papilláris izmon (Stangl és mtsai, 2000), illetve humán kamrai trabekulákon folytatott kísérletekben (Saetrum Opgaard és mtsai, 2000). A változatos eredmények értelmezhetőségét nehezíti, hogy azokat különféle fajokon, eltérő modelleken, változó kísérleti körülmények között nyerték. A továbbiakban új megközelítést alkalmaztunk, megvizsgáltuk, hogy az AM bal kamrai expressziójának mesterséges növelése miként hat a miokardium kontraktilis állapotára *in vivo* és *ex vivo* körülmények között.

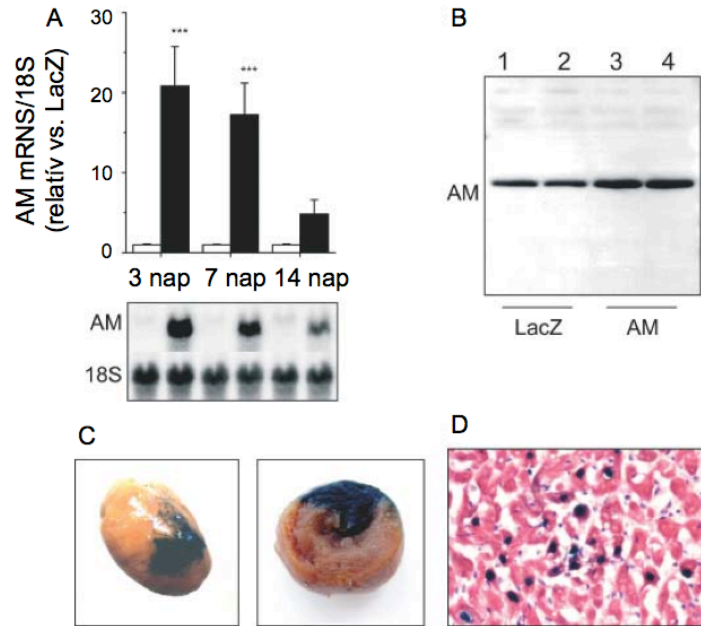
4.1.2.1. Adenovírus-mediálta AM géntranszfer

Az AM-t kódoló gént egy adenovírus vektorhoz kötötten (Ad5RSVrAM) injektáltuk egészséges SD patkányok szabad bal kamrai falába. Negatív kontrollként a LacZ gént hordozó Ad5RSVLacZ konstruktum szolgált. A bal kamrai minták Northern-blot analízise szerint, a legmagasabb dózis mellett (Ad5RSVrAM: 5×10^8 infekciós egység 100 μ L-ben) az AM génexpressziója 3 napnál 20.9-szeres ($P < 0.001$), egy hétnél 17.2-szeres ($P < 0.001$) növekedést mutatott a kontrollhoz viszonyítva, majd két hét után visszatért a bazális szintre (7A. ábra). Western-blot analízissel igazoltuk, hogy az AM fehérje expressziója is fokozódott (7B. ábra). A jobb kamrában, a bal illetve jobb pitvarban az AM génexpressziója nem változott (közlésre nem került adatok). Az adenovírus géntranszfer hatékonyságát és lokalizációját X-gal festéssel demonstráltuk a kontroll, LacZ-vel injektált szíveken (7C-D. ábra).

4.1.2.2. AM overexpresszió hatása a pumpafunkcióra *in vivo*

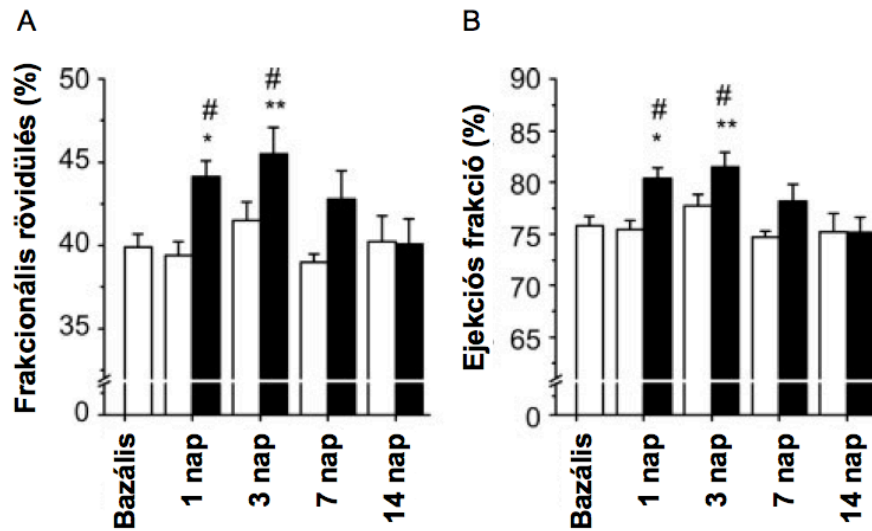
A fokozott AM expresszió hatását a bal kamrai szisztolés funkcióra echokardiográfiával vizsgáltuk *in vivo* körülmények között. Az AM géntranszfert követő 3. napon a frakcionális rövidülés 14%-kal ($P < 0.05$), az ejekciós frakció 8%-kal ($P < 0.05$) nőtt a LacZ kontrollhoz viszonyítva (8. ábra). A bal kamra falvastagsága illetve átmérője nem változott (közlésre nem került adatok).

dc_119_10



7. ábra: Fokozott bal kamrai AM expresszió direkt géntranszfer segítségével.

(A) Northern-blot technikával vizsgáltuk a bal kamrai AM génexpressziót adenovírus által közvetített LacZ (Ad5RSVLacZ) (nyitott oszlopok) vagy AM (Ad5RSVrAM) (tömör oszlopok) intramiokardiális géntranszferét követően. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=5-11 állat csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. *** $P < 0.001$ vs. Ad5RSVLacZ. (B) A bal kamrai mintákban az AM fehérje szintjét Western-blot technikával mértük. (C) X-gal festés mutatja a géntranszfer kiterjedését LacZ injekciót követően. (D) A hisztológiai metszet a géntranszfer hatékonyságát demonstrálja LacZ injekciót követően (hematoxin-eozin és X-gal festés). (Leskinen és mtsai, 2008 alapján)

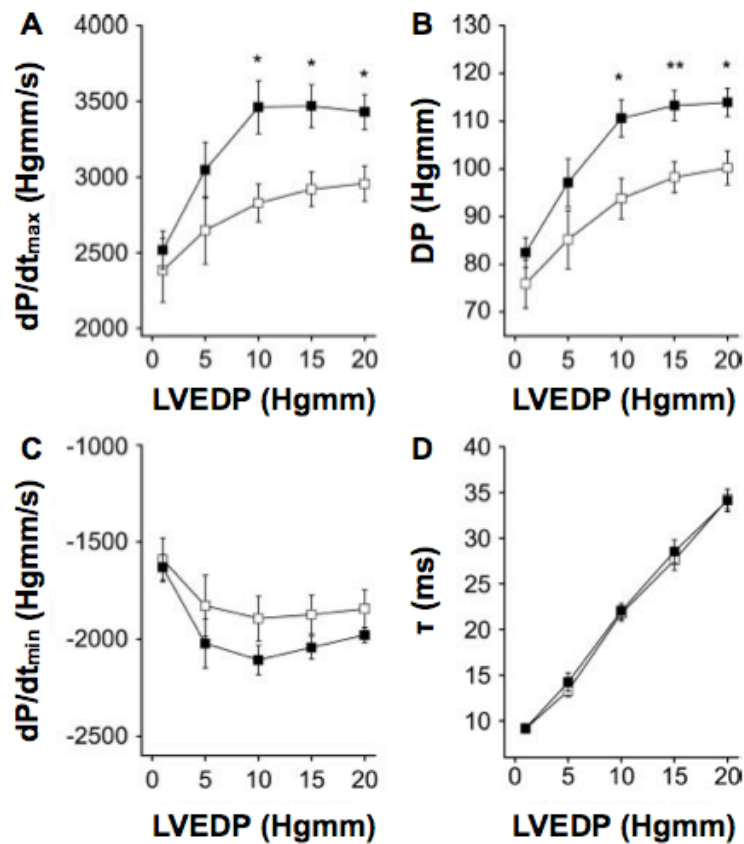


8. ábra: Fokozott bal kamrai AM expresszió hatása a pumpafunkcióra.

Echokardiográfiával vizsgáltuk a balkamra-funkciót adenovírus által közvetített LacZ (Ad5RSVLacZ) (nyitott oszlopok) vagy AM (Ad5RSVrAM) (tömör oszlopok) intramiokardiális géntranszferét követően. (A) Frakcionális rövidülés változása. (B) Ejekciós frakció változása. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=5-11 állat csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. alapérték; # $P < 0.05$ vs. Ad5RSVLacZ. (Leskinen és mtsai, 2008 alapján)

4.1.2.3. AM overexpresszió hatása a bal kamrai kontraktilitásra *ex vivo*

Az esetleges szisztémás hemodinamikai illetve neurohumorális hatásokat kivédendő, izolált patkányszív-preparátumon vizsgáltuk az AM géntranszfer hatását a Frank-Starling-válaszra. Amikor a bal kamrai végdiasztolés nyomást 10, 15 illetve 20 Hgmm-re emeltük, a dP/dt_{max} kontraktilitási index 22%-kal ($P<0.05$), 19%-kal ($P<0.05$) és 16%-kal ($P<0.05$) volt magasabb az Ad5RSVrAM csoportban az Ad5RSVLacZ csoporthoz képest (9A. ábra). A pulzusnyomás értékei hasonló módon változtak (9B. ábra). Ezzel szemben, a diasztolés funkciót jellemző paraméterek (dP/dt_{min} , τ) nem mutattak különbséget a két csoport között (9C-D. ábra). Összességében, az AM géntranszfer szignifikánsan fokozta a szisztolés funkciót, míg a diasztolés funkciót nem befolyásolta egészséges patkányszíven.



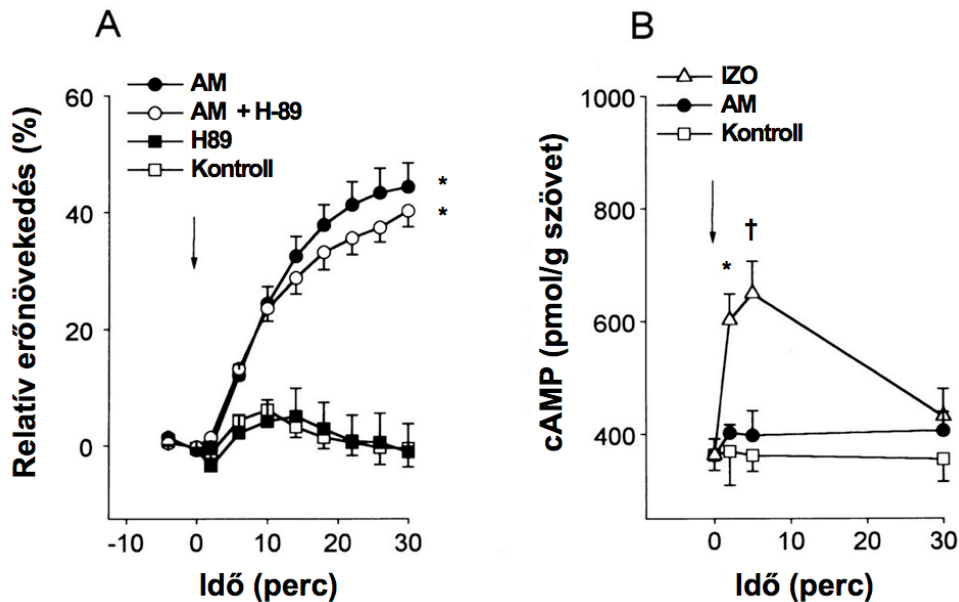
9. ábra: Fokozott bal kamrai AM expresszió hatása a szisztolés és a diasztolés funkcióra izolált patkányszív-preparátumon.

A kamrafunkciót 3 nappal az adenovírus által közvetített LacZ (Ad5RSVLacZ) (nyitott szimbólum) vagy AM (Ad5RSVrAM) (tömör szimbólum) intramiokardiális géntranszferét követően vizsgáltuk. Az ábra a végdiasztolés nyomás (LVEDP) emelése mellett tapasztalt változásokat demonstrálja: **(A)** dP/dt_{max} ; **(B)** pulzusnyomás (DP); **(C)** dP/dt_{min} ; **(D)** a nyomásgörbe exponenciális csökkenésének időállandója (τ). Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=5-6 állat csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Ad5RSVLacZ. (Leskinen és mtsai, 2008 alapján)

4.1.3. Az AM pozitív inotrop hatását közvetítő jelátviteli folyamatok

4.1.3.1. A cAMP–PKA jelátviteli út szerepe

A további kísérleteinkben az AM pozitív inotrop hatását közvetítő intracelluláris jelátviteli rendszerek szerepét vizsgáltuk. Az AM számos sejtípus mellett (Eguchi és mtsai, 1994; Ishizaka és mtsai, 1994; Shimekake és mtsai, 1995) szívizomsejtekben (Ikeda és mtsai, 1996; Sato és mtsai, 1997) is képes fokozni az intracelluláris cAMP szintet. E megfigyelések felvetették, hogy az AM pozitív inotrop hatásának a közvetítésében szerepet játszhat az adenilátcikláz–cAMP–PKA jelátvivő rendszer aktivációja, mely a kamrai kontraktilitás egyik legmeghatározóbb regulátora (Bers, 2002a). Kísérleteink során azonban a specifikus PKA-gátló H-89 (100 nmol/L) (Chijiva és mtsai, 1990) nem befolyásolta az AM (1 nmol/L) pozitív inotrop effektusát ($P=NS$; 10A. ábra). A gátlószer önmagában sem volt hatással a bazális kontraktilitásra ($P=NS$; 10A. ábra).



10. ábra: A cAMP–PKA jelpálya nem játszik szerepet az AM inotrop hatásának közvetítésében.

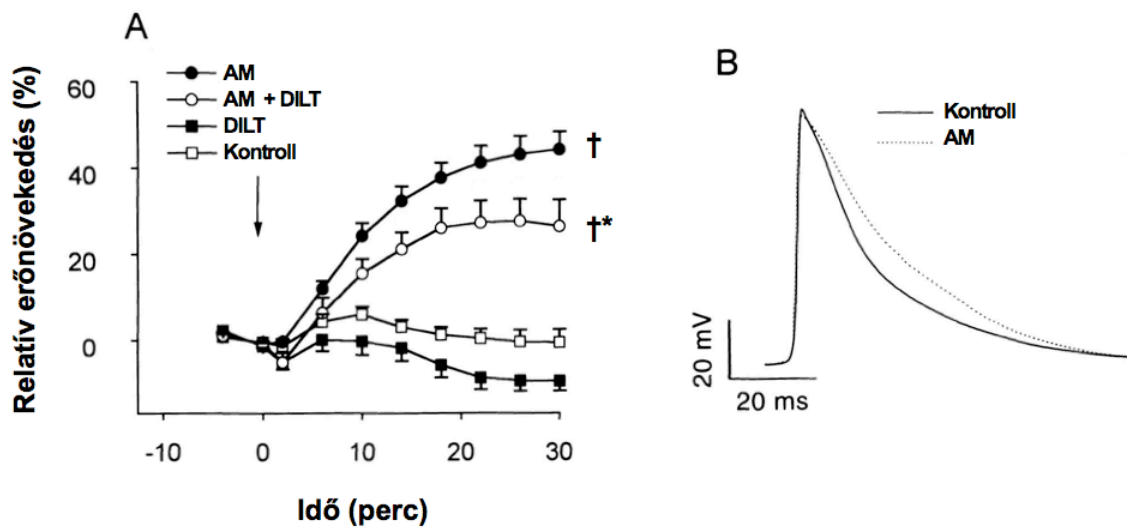
(A) A PKA gátló H-89 (100 nmol/L) nem befolyásolta az AM (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja be (átlag±S.E.M., n=6-10 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P<0.001$ vs. kontroll. (B) A pozitív kontrollként használt β -AR-agonista izoproterenol (IZO, 1 μ mol/L) markáns hatásával szemben, az AM (1 nmol/L) nem növelte a bal kamrai cAMP szintet (átlag±S.E.M., n=4-8 szív csoportonként). A bazális cAMP szint 362±4 pmol/g szövet volt (n=14). Az adatokat Student-féle kétmintás t -próbával vizsgáltuk. * $P<0.05$, † $P<0.01$ vs. kontroll. (Szokodi és mtsai, 1998 alapján)

A továbbiakban arra kerestünk választ, hogy az AM fokozza-e a perfundált patkányszívек bal kamrai cAMP szintjét. Korábbi észlelésekkel összhangban (Ishikawa és mtsai, 1988), a pozitív kontrollként használt, nem szelektív β -AR-agonista izoproterenol (1 μ mol/L) 62±13%-kal (n=6, $P<0.05$) illetve 79±16%-kal (n=4; $P<0.01$) növelte a cAMP szintet 2 és 5 perces stimulációt követően. Ezzel szemben, az AM egyik vizsgált

időpontban sem emelte a szöveti cAMP szintet szignifikánsan ($P=NS$; 10B. ábra). Ezen adatok tanúsága szerint a cAMP-PKA jelátviteli út nem hozható összefüggésbe az AM inotrop hatásával.

4.1.3.2. Az AM és az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az AM miként befolyásolja az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázist. A depolarizáció során a plazmamembrán feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornáin keresztül a szívizomsejtekbe áramló Ca^{2+} aktiválja a rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornákat és a szarkoplazmatikus retikulumból jelentős mennyiségű Ca^{2+} szabadul fel. A citoplazmában kialakuló nagymértékű Ca^{2+} -szint emelkedés elősegíti a Ca^{2+} kötődését a cTnC-hez, mely megindítja a kontrakció folyamatát (Fabiato, 1983; Bers, 2002a). Az L-típusú Ca^{2+} -csatornák szerepét tisztázandó, diltiázzemmel végeztünk kísérleteket. Az L-típusú Ca^{2+} -csatorna-gátló 1 $\mu\text{mol/L}$ dózis mellett nem befolyásolta a kontraktilitást ($P=NS$; 11A. ábra). A diltiázem 40%-kal csökkentette az AM inotrop hatását a 30 perces infúziós periódus végén ($P<0.01$; 11A. ábra).



11. ábra: Az L-típusú Ca^{2+} -csatornák szerepe az AM pozitív inotrop hatásának közvetítésében. (A) Az L-típusú Ca^{2+} -csatorna-gátló diltiázem (DILT, 1 $\mu\text{mol/L}$) gyengítette az AM (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., $n=6-10$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. † $P<0.001$ vs. kontroll; * $P<0.05$ vs. AM. (B) Az AM (1 nmol/L) hatása az akciós potenciálra patkány pitvari preparátumon. Minden vizsgált sejt esetén 10 akciós potenciált átlagoltunk a kontroll ($n=17$) illetve az AM csoportban ($n=6$). (Szokodi és mtsai, 1998 alapján)

Amennyiben az AM befolyásolja az L-típusú Ca^{2+} -csatornák működését, feltételezhető az akciós potenciál módosulása is. A kérdés eldöntésére intracelluláris akciós potenciál méréseket végeztünk patkány izolált bal pitvari preparátumon (Tavi és mtsai, 1996). Az elektrofiziológiai vizsgálatok szempontjából előnyösnek tekinthető, hogy

az izolált pitvar nem mutat spontán aktivitást, továbbá a pitvari akciós potenciál jelentősen rövidebb, mint a kamrai, így a feltételezett változások könnyebben detektálhatóak. Megfelelőnek ítéltük a mérést, amennyiben a nyugalmi potenciál legalább -70 mV volt, valamint az akciós potenciál túllövése elérte a 10 mV-ot. Az akciós potenciál alakja megváltozott AM (1 nmol/L) jelenlétében. Az akciós potenciál időtartama szignifikánsan nőtt 15, 30, 60 és 90%-os repolarizációs szintek mellett (1. táblázat). A 11B. ábra tanúsága szerint, az akciós potenciál időtartama a legnagyobb mértékben 10 és -50 mV membránfeszültség között nőtt. A nyugalmi potenciál, a túllövés és az akciós potenciál emelkedésének maximális sebessége nem változott szignifikánsan (1. táblázat). Az AM akciós potenciált nyújtó hatása összhangban van az L-típusú Ca^{2+} -áram platófázis alatti fokozódásával (Varró és Papp, 1992).

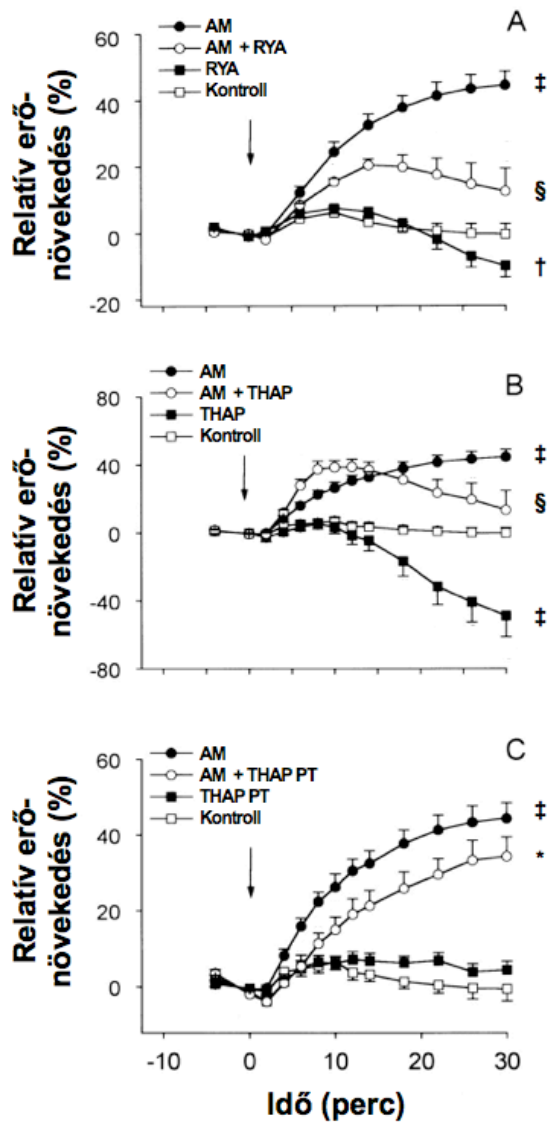
1. táblázat: Az AM hatása az akciós potenciál paramétereire izolált bal pitvaron

Paraméterek	Kontroll	Adrenomedullin (1 nmol/L)
Nyugalmi potenciál, mV	-75.6±0.18	-75.0±0.5
Akciós potenciál amplitúdója, mV	87.9±0.37	89.5±0.7
Túllövés, mV	14.0±0.6	14.5±4.5
Emelkedés maximális sebessége, V/s	121.1±4.0	121.0±2.1
Akciós potenciál időtartama a repolarizáció 15%-os szintjén, ms	7.3±0.2	9.9±0.2†
Akciós potenciál időtartama a repolarizáció 30%-os szintjén, ms	11.4±0.3	15.5±0.3†
Akciós potenciál időtartama a repolarizáció 60%-os szintjén, ms	22.7±0.65	32.8±0.5‡
Akciós potenciál időtartama a repolarizáció 90%-os szintjén, ms	59.5±1.7	67.4±0.8*
Vizsgált sejtek száma	17	6

Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel. Az adatokat Student-féle kétmintás *t*-próbával vizsgáltuk. **P*<0.05, †*P*<0.01 ‡*P*<0.001 vs. kontroll. (Szokodi és mtsai, 1998 alapján)

A szarkoplazmatikus retikulum funkcióját elsőként rianodin segítségével vizsgáltuk, mely a használt 3 nmol/L dózis mellett növeli a rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornák nyitási valószínűségét és Ca^{2+} -szivárgást kiváltva csökkenti a SR Ca^{2+} -tartalmát (Meissner, 1986; Rousseau és mtsai, 1987).

dc_119_10



12. ábra: A szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} homeosztázisát befolyásoló szerek hatása az AM pozitív inotrop effektusára.

(A) A szarkoplazmatikus retikulum rianodin-szenzitív Ca^{2+} -csatornáit aktiváló rianodin (RYA, 3 nmol/L) szignifikánsan csökkentette az AM (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását. (B) A SERCA működését gátló thapsigargin (THAP, 30 nmol/L) eltérően befolyásolta az AM hatásának korai és késői fázisát. (C) Thapsigargin előkezelés (THAP PT, részleteket lásd a szövegben) gyengítette az AM hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., n=6-10 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.05$, § $P < 0.001$ vs. AM; † $P < 0.01$, ‡ $P < 0.001$ vs. kontroll. (Szokodi és mtsai, 1998 alapján)

A rianodin enyhén csökkentette a bazális kontraktilitást az infúziós periódus végén ($P < 0.01$; 12A. ábra). Ugyanakkor, az AM (1 nmol/L) hatásának mind a kezdeti, mind a plató fázisát markánsan gyengítette a rianodin ($P < 0.001$; 12A. ábra). A citoplazmából az aktivátor Ca^{2+} a SERCA segítségével jut vissza az intracelluláris Ca^{2+} -raktárba. A SR Ca^{2+} -tartalma határozza meg a soron következő depolarizáció során a Ca^{2+} -indukálta Ca^{2+} -felszabadulás mértékét (Bers, 2002a; MacLennan és Kranias, 2003). A továbbiakban thapsigarginnal végeztünk kísérleteket, mely specifikusan gátolja a SERCA működését (Thastrup és mtsai, 1990; Lytton és mtsai, 1991). A thapsigargin (30 nmol/L) kezelés

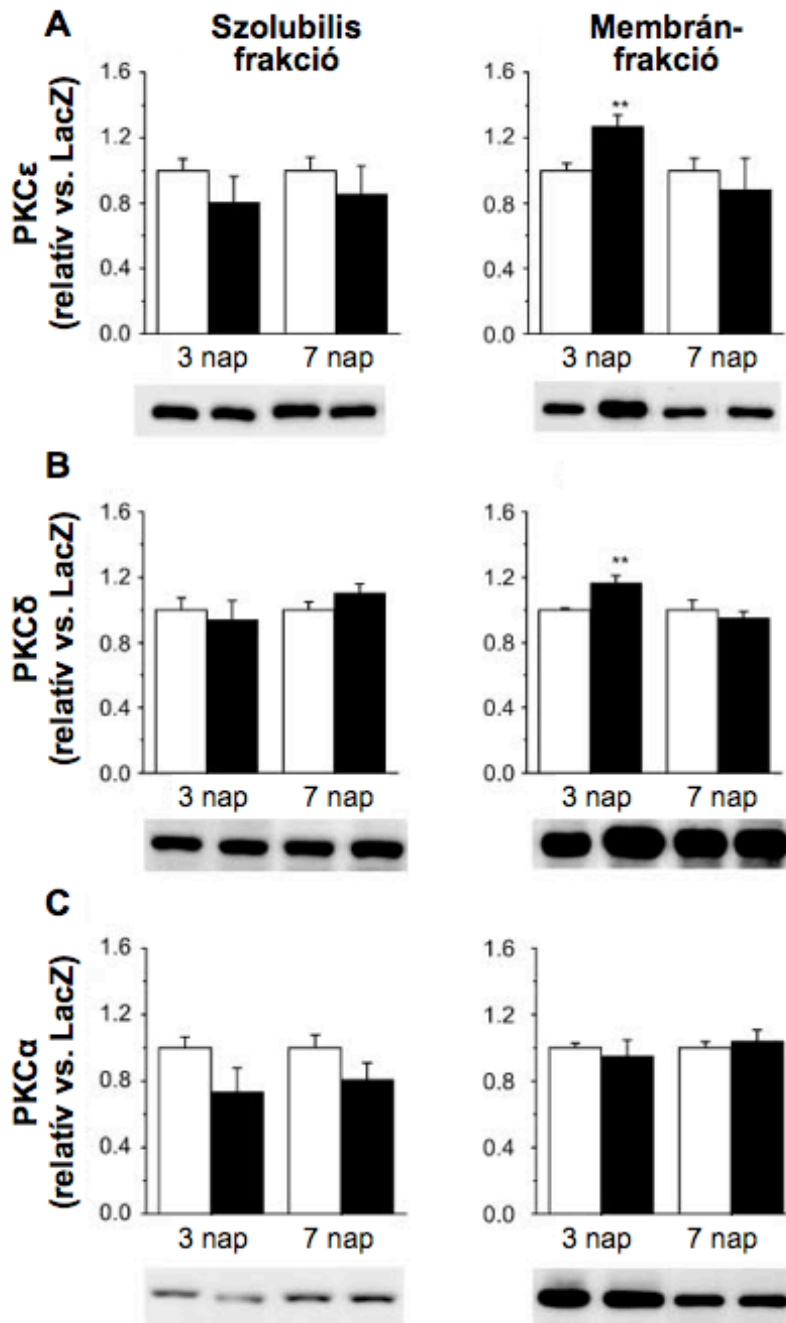
második felében folyamatosan hanyatlott a kontraktilitás ($P < 0.001$; 12B. ábra). Thapsigargin adminisztráció mellett az AM (1 nmol/L) inotrop hatásának kezdeti fázisa szignifikánsan nőtt, majd a továbbiakban csökkenést mutatott (12B. ábra). Megjegyzendő, hogy a csökkenő tendencia dacára, markáns különbség maradt fenn a két csoport között mindvégig ($P < 0.001$, AM plusz thapsigargin vs. thapsigargin; 12B. ábra). A következőkben módosítottuk a protokollt. A szíveket 10 percig előkezeltük thapsigarginnal (30 nmol/L), majd egy 10 perces kontroll periódus után kezdtük meg az AM (1 nmol/L) illetve az oldószer alkalmazását. A thapsigargin előkezelés önmagában enyhén csökkentette a bazális kontraktilitást ($-16.7 \pm 2.2\%$, $P < 0.05$), összhangban a SR Ca^{2+} -tartalmának csökkenésével. A továbbiakban stabil maradt a kontrakciós erő a kontroll kísérletekben (12C. ábra). A SERCA gátlóval történt előkezelés szignifikánsan gyengítette az AM pozitív inotrop hatását ($P < 0.05$; 12C. ábra). A SR funkcióját befolyásoló farmakológiai ágensek feltehetőleg másodlagosan, a SR Ca^{2+} -tartalmának a módosítása révén gyakoroltak hatást az AM inotrop válaszára.

4.1.3.3. AM overexpresszió hatása egyes jelátviteli utak aktivációjára

Miután kizártuk a cAMP–PKA útvonal szerepét (ld. 4.1.3.1. fejezet), további potenciális jelátviteli mechanizmusokat kerestünk. E célból Western-blot analízissel vizsgáltuk egyes jelátvivők aktivációját az Ad5RSVrAM géntranszfert követő 3. napon vett bal kamrai mintákban. A szívizomsejtekben zajló folyamatok szabályozásában központi szerepet játszanak a PKC enzimsalád tagjai. PKC aktiváció során az enzim jellemző módon a citoplazmából a membránfrakcióba transzlokálódik (Nishizuka, 1995; Palaniyandi és mtsai, 2009). A direkt AM géntranszfer fokozta a PKC ϵ (30%, $P < 0.01$) és a PKC δ (20%, $P < 0.01$) izoforma transzlokációját, ezzel szemben a PKC α sejten belüli eloszlása nem változott (13. ábra). E megfigyeléseinkkel összhangban, izolált szívpreparátumon a széles spektrumú proteinkináz-inhibitor staurosporine (10 nmol/L) (Hidaka és Kobayashi, 1992) 62.5%-kal ($P < 0.001$) csökkentette az exogén AM (1 nmol/L) inotrop hatását. Hasonló módon, a specifikus PKC-inhibitor GF-109203X (90 nmol/L) (Toullec és mtsai, 1991) 62.2%-kal ($P < 0.001$) gyengítette az AM-ra adott választ (nem közölt eredmények).

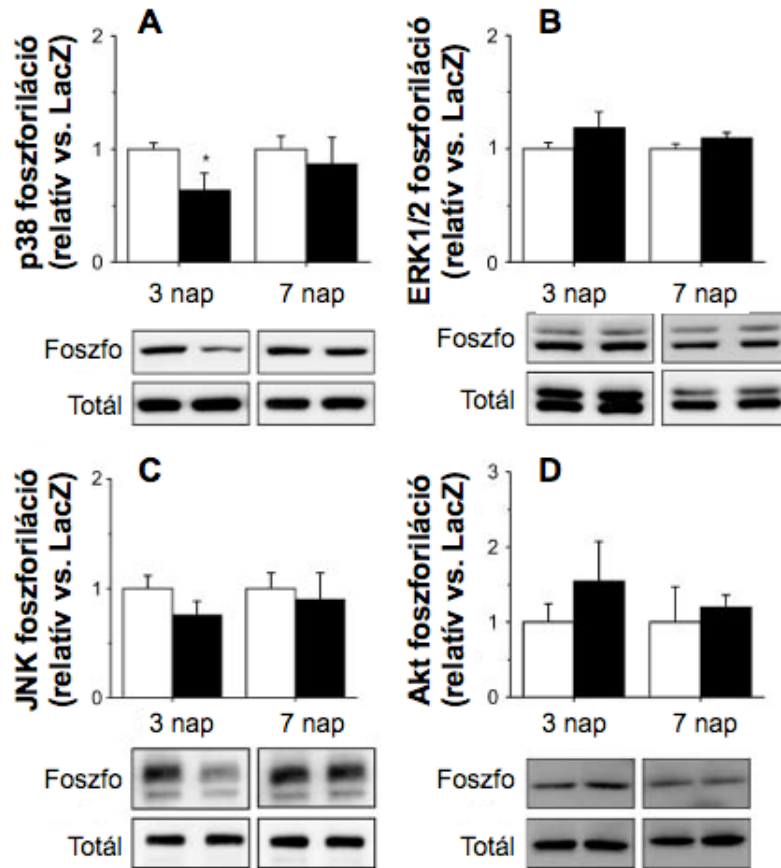
A következőkben megvizsgáltuk, hogy az Ad5RSVrAM géntranszfer miként befolyásolja további proteinkinázok aktivitását, melyet a foszforiláltsági szintjükben bekövetkező változás meghatározásával jellemeztünk. A p38-MAPK foszforilációja 36%-kal csökkent ($P < 0.05$; 14A. ábra), míg az ERK1/2 illetve a c-Jun N-terminális kináz (JNK) foszforilációja nem változott szignifikánsan (14B-C. ábra). Az AM géntranszfer nem befolyásolta az Akt bal kamrai foszforilációját (14D. ábra).

dc_119_10



13. ábra: Az AM overexpresszió hatása a PKC izoenzimek transzlokációjára.

A PKC izoenzimek a citoplazmából a membránfrakcióba történő transzlokációját Western-blot technikával vizsgáltuk adenovírus által közvetített LacZ (Ad5RSVLacZ) (nyitott oszlopok) vagy AM (Ad5RSVrAM) (tömör oszlopok) intramiokardiális géntranszferét követően. **(A)** PKCε; **(B)** PKCδ; és **(C)** PKCα. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=5-11 állat csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. ** $P < 0.01$ vs. Ad5RSVLacZ. (Leskinen és mtsai, 2008 alapján)



14. ábra: Az AM overexpresszió hatása a MAPK-ok és az Akt aktivációjára.

A MAPK-ok és az Akt foszforilációját Western-blot technikával vizsgáltuk adenovírus által közvetített LacZ (Ad5RSVLacZ) (nyitott oszlopok) vagy AM (Ad5RSVrAM) (tömör oszlopok) intramiokardiális géntranszferét követően. **(A)** p38-MAPK; **(B)** ERK1/2; **(C)** JNK; és **(D)** Akt. Az összesített eredmények esetén a foszforilált változatok mennyiségét az adott kináz teljes mennyiségére vonatkoztatva tüntettük fel (átlag \pm S.E.M., n=5-11 állat csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.05$ vs. Ad5RSVLacZ. (Leskinen és mtsai, 2008 alapján)

4.1.4. Nyomásterhelés hatása az AM bal kamrai génexpressziójára *in vivo*

Krónikusan kanulált, éber SD patkányokban i.v. AVP infúzióval hoztunk létre akut nyomásterhelést 15 perc és 4 óra közötti időtartamra. Az AVP hatására az artériás középnyomás gyorsan emelkedett, 15 percnél érte el a maximumát és mindvégig magas szinten maradt (2. táblázat). A vérnyomás emelkedésével párhuzamosan a szívfrekvencia szignifikánsan csökkent (3. táblázat). A vivőanyag (0.9%-os NaCl) i.v. infúziója sem a vérnyomást, sem a szívfrekvenciát nem befolyásolta (2-3. táblázat).

A bal kamrai AM génexpresszió gyorsan növekedett az AVP infúzió hatására. Az AM mRNS-szint szignifikáns emelkedést mutatott 2 és 4 óránál, mind az endokardiális, mind az epikardiális rétegben (15. és 16A-B. ábra). Ezzel szemben, az AVP infúzió nem fokozta az ir-AM szintjét a kontroll csoporthoz képest (16A-B. ábra).

2. táblázat: AVP infúzió hatása a vérnyomásra éber patkányokban

Artériás középnyomás (Hgmm)							
Kezelés	n	0 perc	15 perc	3 perc	1 óra	2 óra	4 óra
Vivőanyag	10	120±2	125±7	125±2	124±2	114±2	117±4
AVP	10	120±2	159±3†	154±3†	150±3†	142±2†	132±2†
L	6	111±6	107±5	100±6	99±5	97±9*	
L+AVP	6	121±3	158±4†	151±5†	148±4†	146±5†	
B	6	111±6	109±7	108±4	106±5	104±5*	
B+AVP	6	117±8	157±7†	151±7†	145±5†	133±6†	
L+B	6	114±3	98±5	95±4*	95±4*	94±4*	
L+B+AVP	6	121±1	179±2†	160±3†	155±3†	152±3†	

AVP: arginin vazopresszin, L: losartan, B: bosentan. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel. Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Student-Newman-Keul-féle post hoc teszttel vizsgáltuk. *P<0.05, †P<0.001 vs. 0 perces érték. (Rompanen és mtsai, 2001 alapján)

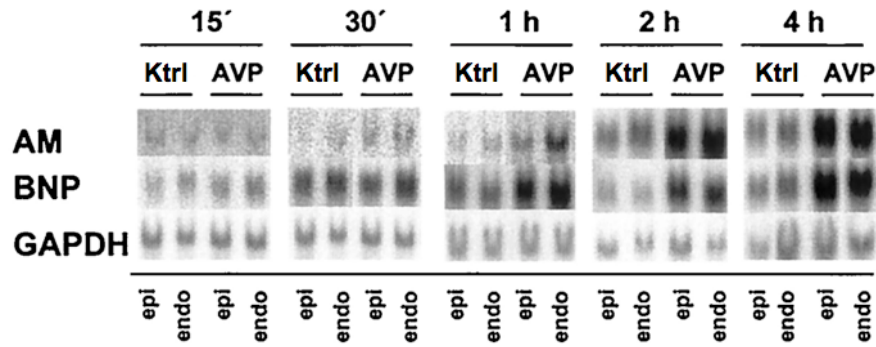
3. táblázat: AVP infúzió hatása a szívfrekvenciára éber patkányokban

Szívfrekvencia (ütés/perc)							
Kezelés	n	0 perc	15 perc	3 perc	1 óra	2 óra	4 óra
Vivőanyag	10	382±6	370±7	374±7	374±6	383±8	402±6
AVP	10	377±5	293±5†	288±5†	281±6†	272±2†	277±9†
L	6	390±22	423±16	422±29	401±17	385±16	
L+AVP	6	420±25	293±15†	290±9†	285±10†	277±9†	
B	6	393±10	397±16	403±15	407±17	391±7	
B+AVP	6	403±15	294±11†	291±8†	276±8†	262±9†	
L+B	6	376±13	423±16	433±12	428±14	426±13	
L+B+AVP	6	380±3	295±6†	288±6†	282±7†	271±8†	

AVP: arginin vazopresszin, L: losartan, B: bosentan. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel. Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Student-Newman-Keul-féle post hoc teszttel vizsgáltuk. †P<0.001 vs. 0 perces érték. (Rompanen és mtsai, 2001 alapján)

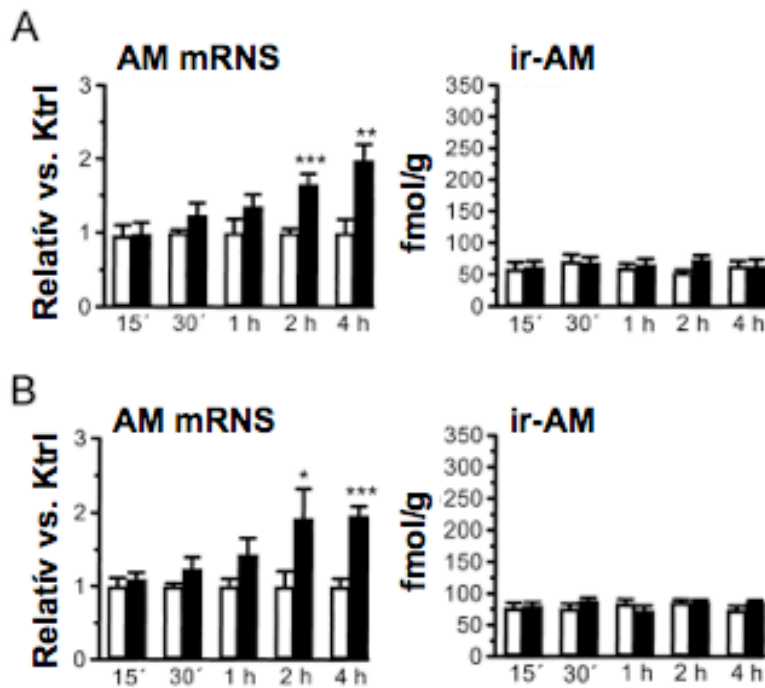
A modellünkben összevetettük az AM és a BNP expressziójának változását, mivel utóbbi peptidet tartják a hemodinamikai túlterhelés egyik legkorábbi, szívizomsejt-specifikus markerének (Magga és mtsai, 1997). A BNP bal kamrai génexpressziója már 1 órától fokozódott (15. és 17A-B. ábra), az ir-BNP szintje 2 és 4 óránál mutatott szignifikáns emelkedést (17A-B. ábra). Ugyanakkor más gének expressziója, mint az ANP-t kódoló géné, csupán 6-12 óra múlva kezd emelkedni nyomásterhelést követően.

dc_119_10



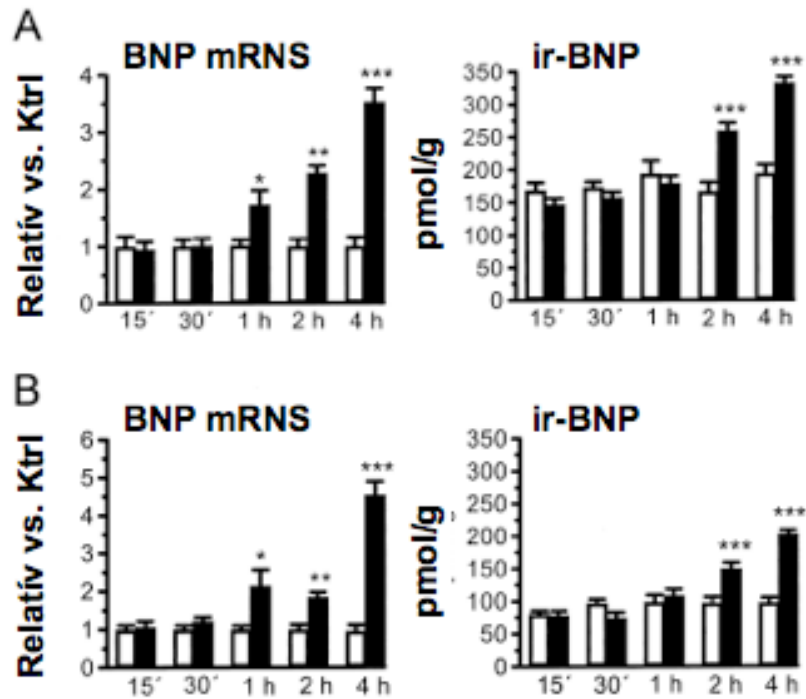
15. ábra: Akut nyomásterhelés hatása az AM és a BNP bal kamrai génexpressziójára.

AVP infúzióval hoztunk létre bal kamrai nyomásterhelést 15 perc és 4 óra közötti időtartamra. Az AM és a BNP mRNA szintjeit Northern-blot technikával vizsgáltuk a bal kamrák epikardiális (epi) és endokardiális (endo) területéből származó mintákban. Minden egyes sáv 20 µg totál RNS-t tartalmaz. A patkány AM és BNP cDNS próbák segítségével egy 1.4 kb ill. 0.9 kb méretű mRNA-t azonosítottunk. Referenciaként a GAPDH mRNA szintjét határoztuk meg. Ktrl, 0.9%-os NaCl infúzió. (Rompanen és mtsai, 2001 alapján)



16. ábra: Akut nyomásterhelés hatása az AM bal kamrai expressziójára.

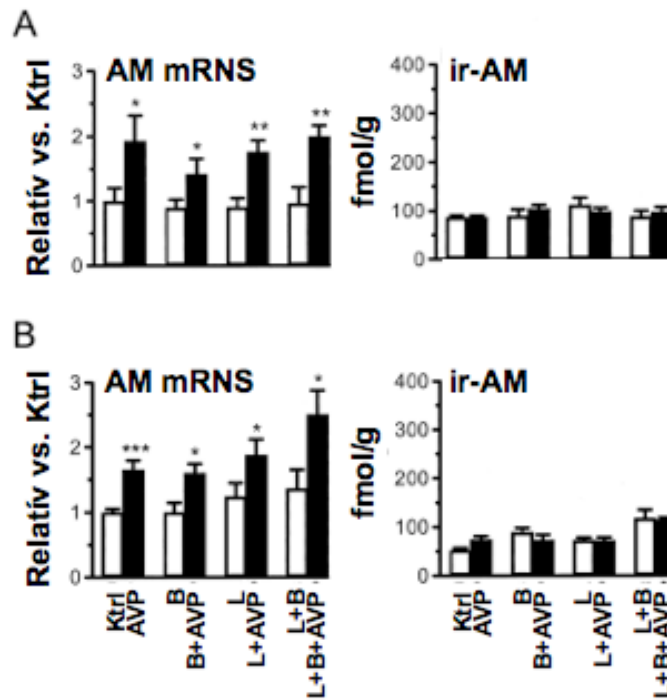
AVP infúzió hatása a bal kamrai endokardiális (A) és epikardiális (B) AM mRNA illetve ir-AM szintekre. Az AM mRNA szintjét a GAPDH mRNA szintje segítségével normalizáltuk (Northern-blot). Kontroll (Ktrl), nyitott oszlopok; AVP, tömör oszlopok. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=6-10 állat csoportonként). Az adatokat Student-féle t-próbával vizsgáltuk. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, AVP vs. Ktrl. (Rompanen és mtsai, 2001 alapján)



17. ábra: Akut nyomásterhelés hatása a BNP bal kamrai expressziójára.

AVP infúzió hatása a bal kamrai endokardiális (A) és epikardiális (B) BNP mRNS illetve ir-BNP szintekre. A BNP mRNS szintjét a GAPDH mRNS szintje segítségével normalizáltuk (Northern-blot). Kontroll (Ktrl), nyitott oszlopok; AVP, tömör oszlopok. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=6-10 állat csoportonként). Az adatokat Student-féle t-próbával vizsgáltuk. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, AVP vs. Ktrl. (Rompanen és mtsai, 2001 alapján)

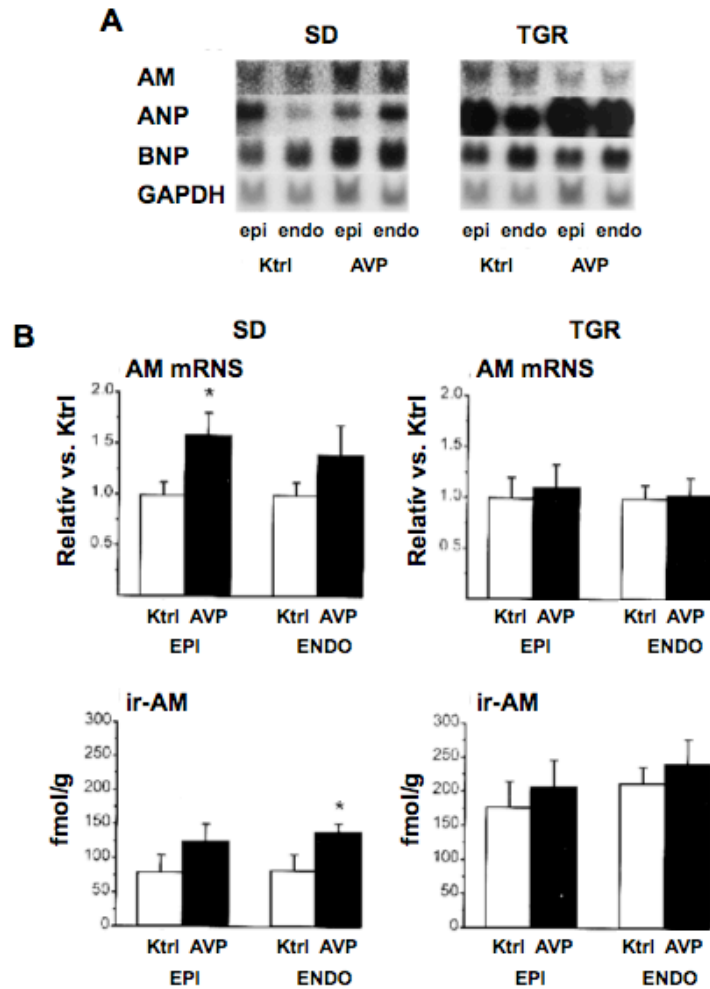
A miokardiumban lokálisan termelődő Ang II és ET-1 fontos szerepet játszik a hipertrófiás folyamat irányításában nyomásterhelés során (Sadoshima és Izumo, 1997). Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az endogén Ang II és az ET-1 mennyiben járul hozzá az AM génexpressziójának fent ismertetett fokozódásához. A kérdés tisztázása céljából a 2 órás AVP infúziót megelőzően előkezeltük az állatokat az AT₁-receptor-antagonista losartannal illetve az ET_A/ET_B-receptor-antagonista bosentannal. A korábbi észlelésekkel összhangban (Magga és mtsai, 1997), a losartan és a bosentan 10 mg/kg i.v. bólus injekciója szignifikánsan csökkentette a vérnyomást, ugyanakkor az AVP vérnyomásemelő hatását nem befolyásolta (2. táblázat), azaz a nyomásterhelés foka összevethető volt a csoportok között. A losartan, a bosentan illetve a kombinációjuk nem volt hatással a bazális bal kamrai AM mRNS és ir-AM szintekre (18A-B. ábra). Továbbá, az antagonistákkal történt előkezelés nem befolyásolta az AM génexpressziójának fokozódását az AVP infúzió során (18A-B. ábra).



18. ábra: Lokális faktorok szerepe az akut nyomásterhelés által indukált AM expresszióra.

2 órás AVP infúzió hatása a bal kamrai endokardiális (A) és epikardiális (B) AM mRNS illetve ir-AM szintekre. Az állatokat előkezeltük az ET_A/ET_B -receptor-antagonista bosentannal, az AT_1 -receptor-antagonista losartannal ill. a kettő kombinációjával. Az AM mRNS szintjét a GAPDH mRNS szintje segítségével normalizáltuk (Northern-blot). Kontroll (Ktrl), nyitott oszlopok; AVP, tömör oszlopok. Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=6-10 állat csoportonként). Az adatokat Student-féle t-próbával vizsgáltuk. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, AVP, B+AVP, L+AVP, B+L+AVP vs. Ktrl; . (Romppanen és mtsai, 2001 alapján)

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy krónikus nyomásterhelés miként hat az AM bal kamrai expressziójára. Hím 12 hetes TGR(mREN-2)27 patkányok artériás középnyomása jelentősen magasabb volt, mint a kontroll SD patkányoké (180 ± 11 vs. 138 ± 7 , $P<0.001$). A tartós nyomásterheléssel összhangban a transzgénikus állatok bal kamrai hipertrofizáltak, a bal kamra tömeg-testtömeg hányados a következőképpen alakult az azonos korú kontrollokhoz viszonyítva: 2.7 ± 0.1 vs. 1.7 ± 0.1 mg/g (n=8, $P<0.001$). A hipertónia és a hipertrófia dacára a TGR(mREN-2)27 patkányok bal kamrai AM expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést az SD patkányokhoz képest (19A. ábra). Ezzel szemben, a kamrai ir-AM-szint jelentősen magasabb volt a transzgénikus állatokban, az endokardiumban 2.2-szeres ($P<0.05$), az epikardiumban 2.6-szeres emelkedést detektáltunk ($P<0.05$). Ezt követően akut nyomásterhelést hoztunk létre mindkét patkánytörzsben 2 órás i.v. AVP infúzió révén. Az AVP hatására a vérnyomás maximálisan 30%-kal emelkedett az SD patkányokban ($P<0.05$), míg a TGR(mREN-2)27 patkányok vérnyomása 28%-kal nőtt tovább ($P<0.05$). Az SD patkányokban a bal kamrai AM génexpresszió szignifikánsan fokozódott az AVP hatására, ettől eltérően a TGR(mREN-2)27 patkányokban hasonló változást nem tapasztaltunk (19B. ábra).



19. ábra: Nyomásterhelés hatása az AM bal kamrai expressziójára.

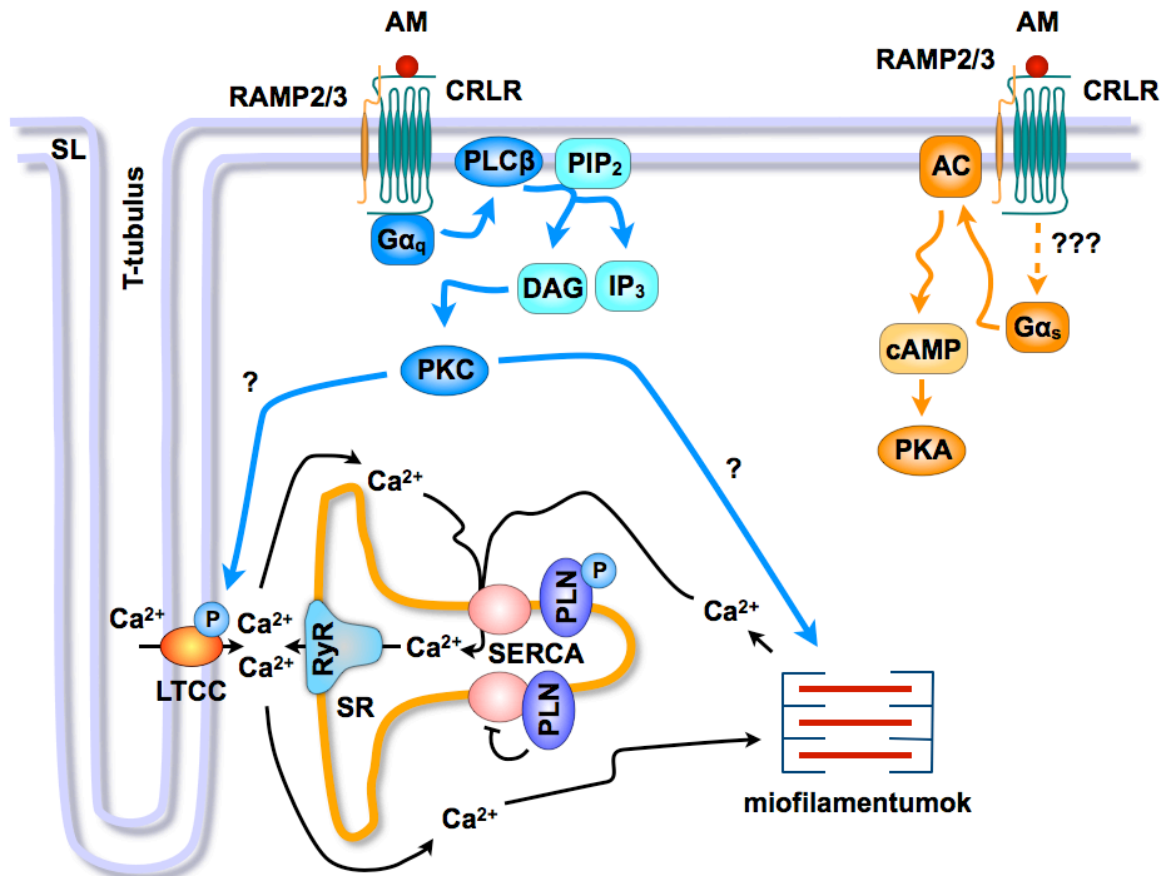
(A) 2 órás AVP infúzió hatása a bal kamrai endokardiális (endo) és epikardiális (epi) AM, ANP, BNP és GAPDH génextpressziójára SD és TGR patkányokban. (B) 2 órás AVP infúzió hatása a bal kamrai endokardiális (endo) és epikardiális (epi) AM mRNS illetve ir-AM szintekre. Az AM mRNS szintjét a GAPDH mRNS szintje segítségével normalizáltuk (Northern-blot). Kontroll (Ktrl), nyitott oszlopok; AVP, tömör oszlopok. Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=8 állat csoportonként). Az adatokat Student-féle t-próbával vizsgáltuk. * $P < 0.05$, AVP vs. Ktrl. (Romppanen és mtsai, 1997 alapján)

4.1.5. AM: a szívizom-kontraktilitás regulátora

Kimutattuk, hogy az AM egyike a természetben előforduló legpotensebb endogén pozitív inotrop szubsztanciáknak. Eredményeink tanúsága szerint az AM a szubnanomoláris koncentrációtartományban képes fokozni a kontraktilitást izolált patkányszív-modellen. Kiemelendő, hogy az AM hatása összevethető az ET-1 effektusával, melyet a legpotensebb pozitív inotrop anyagnak tartottak számon korábban (Kelly és mtsai, 1990). Továbbá, az AM kontraktilitást fokozó hatása megközelítőleg 2/3-a a maximális β -AR stimulációval kiváltható válasznak. Az effektus kifejlődésének lassú dinamikája felveti, hogy az AM, a rövid távú β -AR szabályozástól eltérően, hosszú távon képes befolyásolni a kamrai kontraktilitást.

Az izolált patkányszív-modellen nyert eredményeinkkel (Szokodi és mtsai, 1996; Szokodi és mtsai, 1998; Kinnunen és mtsai, 2000; Szokodi és mtsai, 2002) összhangban, az AM fokozta a kontraktilitást izolált patkány papilláris izmon (Ihara és mtsai, 2000), valamint humán pitvari és kamrai trabekulákon (Bisping és mtsai, 2007). Ugyanakkor, a peptid patkány eredetű izolált szívizomsejteken kettős hatást váltott ki, a kezdeti kontraktilitás fokozódást negatív inotrop hatás követte hosszabb inkubáció (>1 óra) során (Mittra és mtsai, 2004; Mittra és Bourreau, 2006). Nyúl (Ikenouchi és mtsai, 1997) és humán eredetű izolált kamrai szívizomsejteken (Mukherjee és mtsai, 2002) az AM csökkentette a kontrakciós erőt. Továbbá, egyes tanulmányokban az AM nem befolyásolta a kontraktilitást (Stangl és mtsai, 2000; Saetrum Opgaard és mtsai, 2000). Az *in vitro* és *ex vivo* modelleken nyert változatos eredményekkel szemben az *in vivo* adatok meglepően következetesek. Számos tanulmány vizsgálta az AM szisztémás infúziója során fellépő komplex hemodinamikai változásokat fiziológias körülmények között. A patkányokon (He és mtsai, 1995), juhokon (Parkes, 1995; Parkes és May, 1997; Charles és mtsai, 1997) és kutyákon (Lainchbury és mtsai, 2000a) végzett kísérletek során csökkent a perifériás vaszkuláris rezisztencia, ezzel párhuzamosan nőtt a szívfrekvencia, a verővolumen és a perctérfogat. A humán klinikai vizsgálatok is hasonló eltérésekről számoltak be (Lainchbury és mtsai, 2000b; Nagaya és mtsai, 2000). Nagaya és mtsai nyomás-térfogat görbék analízise segítségével vizsgálták az AM direkt hatását a kontraktilitásra mérsékelten csökkent bal kamrai szisztolés funkciójú betegeken (EF: 40-50%). Eredményeik szerint a peptid fokozta a bal kamrai végszisztolés elastance-t, mely a kamrai kontraktilitás elő- és utóterheléstől független indexe (Nagaya és mtsai, 2002). Ezen adatok alapján az AM verővolument növelő hatásához feltehetőleg mind az utóterhelés csökkenése, mind a kamrai kontraktilitás fokozódása hozzájárul. Az AM átmeneti bal kamrai overexpressziója révén nyert adataink is alátámasztják, hogy a peptid direkt pozitív inotrop hatást képes kiváltani *in vivo* és *ex vivo* körülmények között.

Munkánk során részleteiben feltártuk az AM pozitív inotrop hatásáért felelős mechanizmusokat. Eredményeink szerint az AM specifikus receptorán keresztül hat, függetlenül a CGRP- és a PAMP-kötőhelyektől. Továbbá, az AM effektusának közvetítésében nem játszik szerepet a klasszikus adenilátcikláz-cAMP-PKA rendszer. Izolált patkányszív-preparátumon az AM nem fokozta a bal kamrai cAMP termelést, valamint a PKA gátlás nem volt képes kivédeni a peptid pozitív inotrop hatását (Szokodi és mtsai, 1998). Megjegyzendő, hogy az adenilátcikláz illetve a PKA farmakológiai úton történő gátlása részlegesen gyengítette az AM szuprafiziológias koncentráció mellett (10-100 nmol/L) fellépő inotrop effektusát patkány eredetű izolált kamrai szívizomsejteken (Mittra és Bourreau, 2006) és papilláris izompreparátumon (Ihara és mtsai, 2000).



20. 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; IP₃, inozitol-1,4,5-triszfoszfát; LTCC, L-típusú Ca^{2+} -csatorna; PIP₂, foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát; 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. (Szokodi és mtsai, 1998; Szokodi, 2004; Szokodi és Ruskoaho, 2008; Leskinen és mtsai, 2008 alapján)

Eredményeink szerint az AM az L-típusú Ca^{2+} -csatornák keresztül fokozza az extracelluláris Ca^{2+} beáramlást és serkenti a SR-ból történő Ca^{2+} -felszabadulást a szívben (Szokodi és mtsai, 1998). Mindezzel összhangban, az AM fokozta az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját kamrai szívizomsejteken (Mitra és mtsai, 2004; Mitra és Bourreau, 2006). Ismert, hogy a PKA mellett a PKC aktivációja is erőteljesen képes befolyásolni a szív kontraktilis állapotát (Dorn és Force, 2005). Intenzív kutatások tárgyát képezi annak tisztázása, hogy az egyes PKC izoenzimek miként vesznek részt a kontraktilitás szabályozásában. Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a PKC ϵ (Baudet és mtsai, 2001; Kang és Walker, 2005) és a PKC δ (Kang és Walker, 2005) izoenzimek aktivációja során nő a kontrakciós erő, míg a PKC α a kontraktilitás negatív regulátora (Hahn és mtsai, 2003; Braz és mtsai, 2004; Hambleton és mtsai, 2006; Liu és Molkenin, 2011). Kísérleteinkben az AM átmeneti bal kamrai overexpressziója szignifikánsan fokozta

a PKC ϵ és a PKC δ izoformák transzlokációját a citoplazmából a membránfrakcióba, míg a PKC α esetén hasonló változást nem észleltünk (Leskinen és mtsai, 2008). E megfigyeléseinkkel összhangban, izolált szívpreparátumon a PKC farmakológiai gátlása szignifikáns módon csökkentette az exogén AM kontraktilitást fokozó effektusát. Eredményeink felvetik, hogy az AM inotrop hatásának közvetítésében szerephez juthat a PKC ϵ és a PKC δ . Megjegyzendő, hogy a p38-MAPK foszforilációja csökkent az AM géntranszfert követően (Leskinen és mtsai, 2008). Mivel a p38-MAPK aktivációja csökkenti a kontraktilitást (Liao és mtsai, 2002), az enzim működésének mérséklődése hozzájárulhat az AM pozitív inotrop hatásának a kialakulásához.

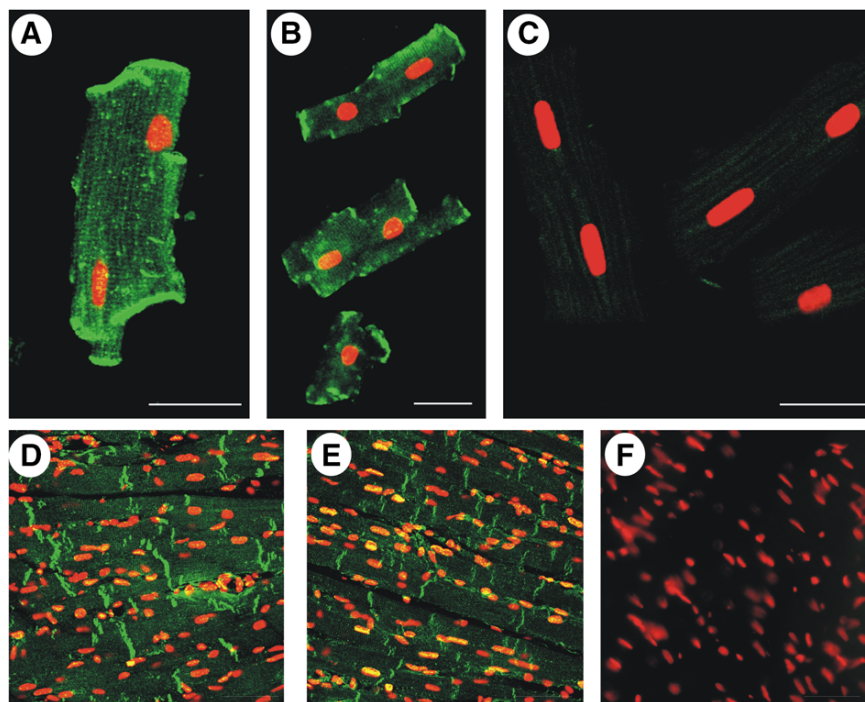
Elsőként mutattuk ki, hogy akut nyomásterhelés hatására az AM bal kamrai génextpressziója korai, tranziens aktivációt mutat (Romppanen és mtsai, 1997). A terhelés megkezdését követő 2 óra múlva már szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az AM mRNS szintjében (Romppanen és mtsai, 2001). Összevetésként, a BNP génextpressziója 1 óra elteltével fokozódott modellünkben, mely egyike a legkorábban aktiválódó géneknek a bal kamrában (Magga és mtsai, 1997). Ugyanakkor más gének expressziója, mint az ANP-t kódoló géne, csupán 6-12 óra múlva kezd emelkedni nyomásterhelést követően (Lakó-Futó és mtsai, 2003; Piuholo és mtsai, 2007; Skoumal és mtsai, 2007), míg a manifeszt szívhipertrófia kifejlődéséhez minimum 6-7 nap szükséges (Sármán és mtsai, 2007; Skoumal és mtsai, 2011). További eredményeink arra utalnak, hogy az AM génextpressziójának fokozódása független a lokális Ang II-től és ET-1-től. Akut nyomásterheléstől eltérően, tartós nyomásterhelés esetén a bal kamrában magasabb ir-AM szintet találtunk, azonban ehhez nem társult az AM génextpressziójának fokozódása (Romppanen és mtsai, 1997). Összhangban ezen megfigyeléseinkkel, krónikus szívelégtelenségben a peptid bal kamrai termelődése jelentősen emelkedik (Jougasaki és mtsai, 1997; Morimoto és mtsai, 1999; Nishikimi és mtsai, 2003a), ami arra utal, hogy az AM szerepet játszhat a szív adaptációs folyamataiban, mind akut, mind krónikus körülmények között. Az első humán és experimentális vizsgálatok eredményei szerint szívelégtelenségben a peptid intravénás infúziója kedvező hemodinamikai változásokat hoz létre, csökken a perifériás rezisztencia és jelentősen emelkedik a perctérfogat (Rademaker és mtsai, 1997; Lainchbury és mtsai, 1999; Nagaya és mtsai, 2000; Nishikimi és mtsai, 2003b). Kiemelendő, hogy az AM rövid időtartamú infúziója iszkémiás szívbetegekben a kontraktilitást a szívizom oxigénfogyasztásának növelése nélkül képes fokozni (Nagaya és mtsai, 2002). Felmerül, hogy az AM, mely a cAMP-PKA jelpályától függetlenül fejt ki hatását (Szokodi és mtsai, 1998), nem meríti ki a szív metabolikus tartalékait szívelégtelenségben, miként a β -AR-agonisták illetve a foszfodiészteráz-gátlók teszik (Dzimiri, 1999). Az AM az előnyös hemodinamikai hatásain túl, csökkenti az apoptotikus sejtelhalást, a szívhipertrófiát és az intersticiális fibrózist, valamint fokozza az angiogenezist a miokardiumban (Szokodi, 2004; Nagaya és mtsai, 2005; Yanagawa és Nagaya, 2007; Szokodi és Ruskoaho, 2008). Mindezek tükrében, a szívelégtelenség

kezelésének új, perspektivikus lehetőségeként merül fel az AM. Vizsgálataink ugyanakkor rávilágítottak, hogy az AM hatása kontextusfüggő: míg az AM géntranszfer csökkentette a nyomásterhelést követő bal kamrai hipertrófia kialakulását, addig a posztinfarktusos bal kamrai remodellációt kifejezetten rontotta (Leskinen és mtsai, 2008). További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az AM milyen mechanizmusok révén képes adaptív illetve maladaptív válaszokat kiváltani, illetve ennek fényében a peptid hatásai miként aknázhatóak ki a legelőnyösebb módon különböző patofiziológias viszonyok között.

4.2. Apelin szerepe szívizom-kontraktilitás szabályozásában

4.2.1. Az APJ-receptor lokalizációja

Konfokális immunfluoreszcens mikroszkópia segítségével vizsgáltuk az APJ-receptor pontos celluláris lokalizációját. Vizsgálataink megerősítették, hogy izolált patkány szívizomsejtek illetve a miokardium expresszálja az APJ-receptort (Kleinz és mtsai, 2005). Az APJ-receptorra jellemző immunreaktivitást észleltünk a T-tubulusok/Z-vonalak transzverzális lefutásának megfelelően. Emellett, az interkaláris lemezek (*“intercalated discs”*) is specifikus festődést mutattak (21. ábra).



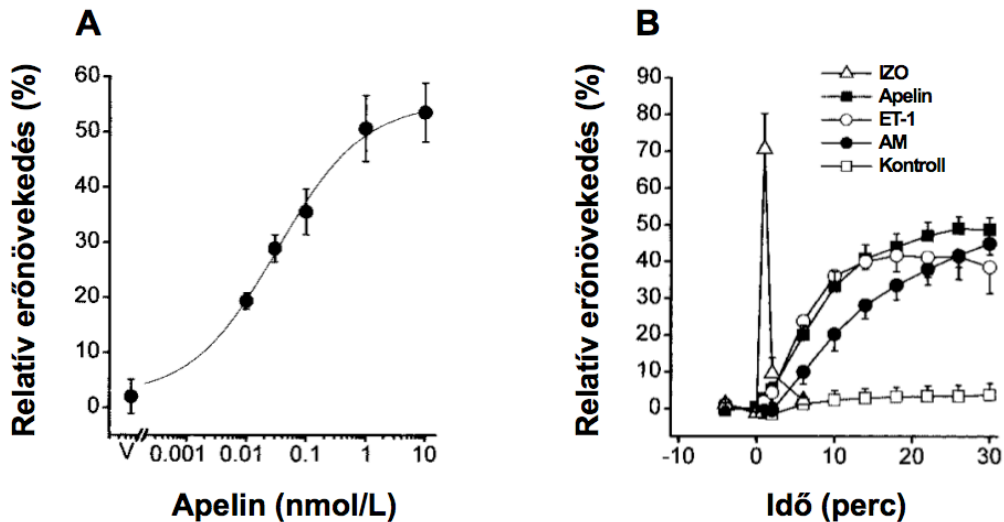
21. ábra: Az APJ-receptor lokalizációja.

A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken az APJ-receptor (zöld) lokalizációja látható patkány izolált szívizomsejteken (A-C), valamint szívizom metszeteken (D-F). Két különböző ellenanyagot használtunk, az egyik az APJ-receptor C-terminális régióját (A,C), míg a másik a citoplazmás hurok régiót ismeri fel (B,E). A két ellenanyag használata mellett azonos mintázat látható, az APJ-receptor a T-tubulusoknak/Z-vonalaknak és az interkaláris lemezeknek megfelelő lokalizációt mutat. A másodlagos ellenanyagok segítségével készült kontrollokon nem látható jelölődés. A sejtmagokat DAPI-val festettük (vörös). (Farkasfalvi és mtsai, 2007 alapján)

4.2.2. Az apelin pozitív inotrop hatása izolált patkányszív-preparátumon

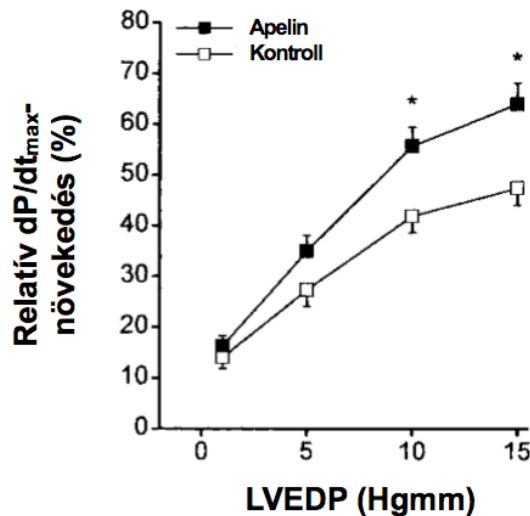
Az apelin 30 perces infúziója (0.01-10 nmol/L) dóziszfüggő pozitív inotrop hatást hozott létre izolált patkányszív-preparátumon (22A. ábra). A peptid maximális inotrop effektusát 1 nmol/L, míg a félmaximális hatást (EC_{50}) 33 pmol/L koncentráció mellett észleltük.

dc_119_10



22. ábra: Az apelin hatása a szívizom-kontraktilitásra izolált patkányszíven.

(A) Az apelin (0.01-10 nmol/L) dóziszfüggő módon növelte a szívizom kontrakciós erejét *ex vivo*. (B) Az apelin (1 nmol/L), az ET-1 (1 nmol/L), az AM (1 nmol/L), és a β -AR-agonista izoproterenol (10 μ mol/L) inotrop hatásának időbeli lefutása. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja be (átlag \pm S.E.M., n=5-7 szív csoportonként). (Szokodi és mtsai, 2002 alapján)



23. ábra: Az apelin hatása a Frank-Starling-válaszra izolált patkányszíven.

Az apelin (1 nmol/L) hatása a Frank-Starling-válaszra: a panel a végdiasztolés nyomás (LVEDP) emelése mellett tapasztalt dP/dt_{max} -változást demonstrálja. A bazális dP/dt_{max} 1273 \pm 52 Hgmm/s volt, a csoportok között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja be (átlag \pm S.E.M., n=5-7 szív csoportonként). Az adatokat Student-féle kétmintás *t*-próbával vizsgáltuk. * P <0.05 vs. kontroll. (Szokodi és mtsai, 2002 alapján)

Az apelin fokozatosan növelte a kontrakciós erőt, a maximális válasz 24 perc után jelentkezett (22B. ábra). A hatás kialakulásának dinamikája az AM és az ET-1 effektusához volt mérhető, szemben a β -AR stimulációt követő azonnali hatással (22B. ábra). Az apelin, az AM és az ET-1 összevethető módon fokozta a kontrakciós erőt. Az apelin csúcshatása 69%-a volt az izoproterenol (10 μ mol/L) maximális inotrop

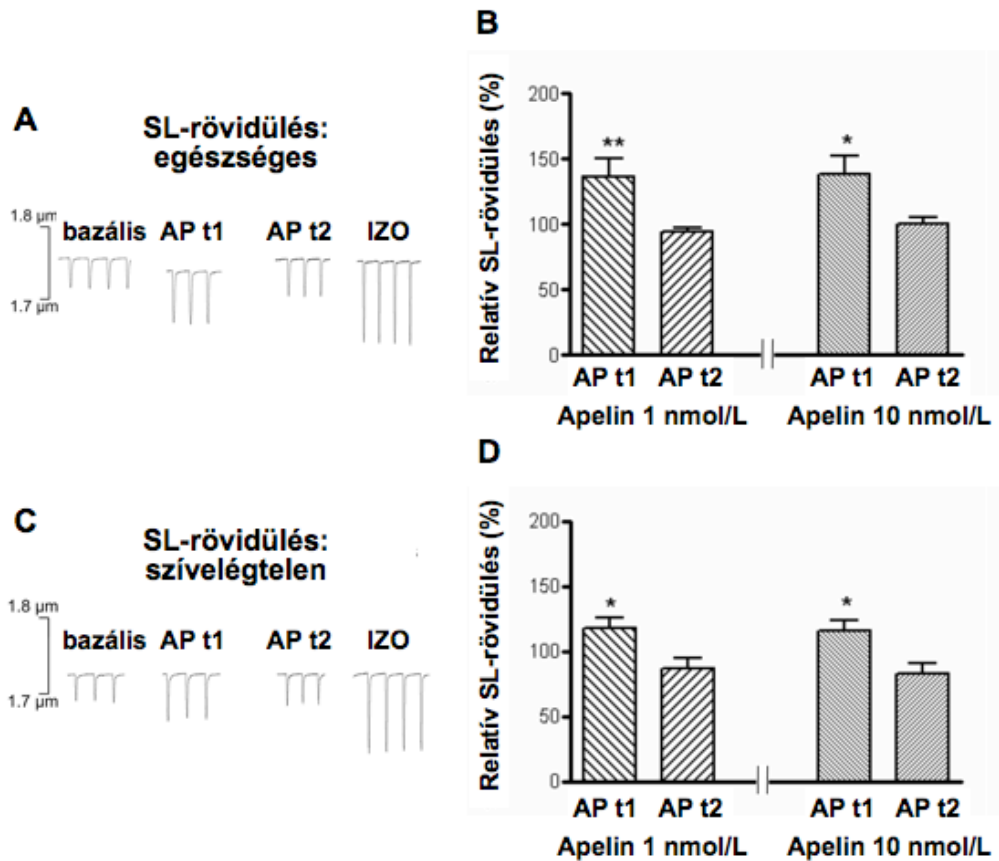
effektusának (22B. ábra). Az apelin (1 nmol/L) nem befolyásolta az összehúzódások időbeliségét, a maximális kontrakcióig (apelin előtt és után: 57.0 ± 2.6 vs. 56.3 ± 2.4 ms; $P=NS$) illetve az 50%-os relaxációig (40.9 ± 1.0 vs. 39.8 ± 0.6 ms; $P=NS$) eltelt időt. Az apelin tág határok között (0.01-1 nmol/L) változatlanul hagyta a nyugalmi feszülést (2.0 ± 0.01 g), a legmagasabb dózis mellett (10 nmol/L) volt tapasztalható enyhe emelkedés (2.2 ± 0.03 g; $P < 0.05$). Kísérleti viszonyaink között az apelin (0.03-10 nmol/L) enyhén csökkentette a perfúziós nyomást (1 nmol/L apelin előtt és után: 32.4 ± 1.6 vs. 30.6 ± 1.4 Hgmm; $P < 0.001$).

4.2.3. Az apelin hatása a Frank-Starling-válaszra

A következőkben megvizsgáltuk, hogy izolált patkányszív-preparátumon az apelin miként befolyásolja a Frank-Starling-választ. Alacsony végdiasztolés nyomás mellett (1-5 Hgmm) a dP/dt_{max} hasonló volt apelin (1 nmol/L) jelenlétében illetve hiányában. Amikor a bal kamrai végdiasztolés nyomást 10 illetve 15 Hgmm-re emeltük, a dP/dt_{max} 33%-kal ($P < 0.05$) és 35%-kal ($P < 0.05$) volt magasabb az apelinnel kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva (23. ábra). Ezzel szemben, a diasztolés funkciót nem befolyásolta az apelin. A dP/dt_{min} (-832 ± 40 vs. -806 ± 32 Hgmm/s; $P=NS$), a 60%-os relaxációig eltelt idő (48.6 ± 5.8 vs. 50.3 ± 2.4 ms; $P=NS$), a 90%-os relaxációig eltelt idő (64.2 ± 6.1 vs. 66.5 ± 3.1 ms; $P=NS$), illetve a τ (50.7 ± 3.2 vs. 51.2 ± 2.7 ms; $P=NS$) nem különbözött szignifikánsan a kontroll és az apelin csoportban 15 Hgmm-es végdiasztolés nyomás mellett.

4.2.4. Az apelin hatása a kontraktilitásra izolált szívizomsejteken

Az apelin 1 nmol/L és 10 nmol/L koncentráció mellett szignifikánsan növelte az izolált, felnőtt, patkány szívizomsejtek SL-rövidülését. A maximális hatás 1 perccel (AP t1) az apelin adagolás megkezdését követően lépett fel, mely 1-2 percig tartott, majd a SL-rövidülés visszatért a kiindulási értékre és nem változott az apelin adagolás további fázisa (AP t2) alatt (24A. ábra). A kontroll állapotot 100%-nak véve, a maximális változás a SL-rövidülésben 1 nmol/L-nél $136 \pm 13\%$ volt ($n=14$; $P < 0.001$), míg 10 nmol/L-nél $138 \pm 14\%$ volt ($n=14$; $P < 0.05$; 24A-B. ábra). A vizsgálat végén a sejteket izoproterenollal (30 nmol/L) kezeltük, mely mintegy 250 %-kal növelte a SL-rövidülést (24A. ábra), demonstrálva, hogy a sejtek jelentős kontraktilis tartalékkal rendelkeztek.



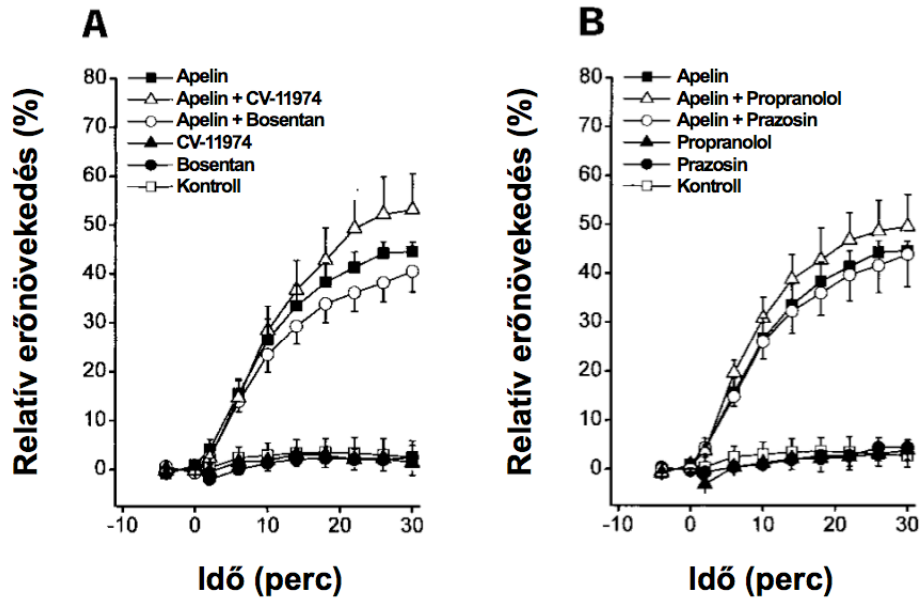
24. ábra: Az apelin hatása izolált szívizomsejtek kontraktilitására.

Az apelin szarkomerhossz-rövidülésre kifejtett hatása látható egészséges (A, B) és szívelégtelen patkányokból származó szívizomsejteken (C, D). A reprezentatív regisztrátumok a SL-rövidülést alap állapotban (bazális), az apelin (10 nmol/L) alkalmazását követően 1 perccel (AP t1) és 8 perccel (AP t2), illetve izoproterenol (IZO, 30 nmol/L) adását követően mutatják. Az oszlop diagrammok az apelin 1 és 10 nmol/L koncentráció mellett gyakorolt hatását összegzik a SL-rövidülésre. Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=12-14). Az adatokat páros t-tesztel vizsgáltuk. * P <0.05, ** P <0.001. (Farkasfalvi és mtsai, 2007 alapján)

A fiziológias állapotban tapasztaltak után megvizsgáltuk, hogy az apelin miként hat a kontraktilitásra patofiziológias körülmények között. A bal elülső leszálló koronáriaág lekötésével hoztunk létre miokardiális infarktust, majd 8 héttel később echokardiográfiával igazoltuk a szívelégtelenség kifejlődését (ejekciós frakció \leq 30%). A szívelégtelen állatok bal kamrájának életképes részéből izolált szívizomsejtek SL-rövidülése alap állapotban szignifikánsan kisebb volt az egészséges sejtekhez viszonyítva (Δ 0.121 \pm 0.03 μm , n=24, P <0.001), ugyanakkor apelin hatására ezen sejtek SL-rövidülése is hasonló, tranziens növekedést mutatott (1 nmol/L apelin: 117 \pm 8.3 %, n=12, P <0.05; 10 nmol/L apelin: 116 \pm 7.7 %, n=12, P <0.05), ahogy ez a 24. ábra C és D részén látható. Fontos kiemelni, hogy az apelinre adott maximális válaszban nem találtunk szignifikáns különbséget az egészséges és a szívelégtelen szívekből származó sejtek között (P =NS).

4.2.5. Az apelin pozitív inotrop hatásának specificitása

A következőkben az apelin inotrop válaszána specificitását vizsgáltuk egészséges patkányok szívéen. Mivel az APJ-receptor és az AT₁-receptor között homológia áll fenn (O'Dowd és mtsai, 1993), megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy az apelin hatását az AT₁-receptorok közvetítik. Az AT₁-receptor-antagonista CV-11974 (10 nmol/L) (Magga és mtsai, 1997) nem módosította az 1 nmol/L apelinre adott inotrop effektust ($P=NS$; 25A. ábra).



25. ábra: Az apelin inotrop hatásának specificitása izolált patkányszív-preparátumon.

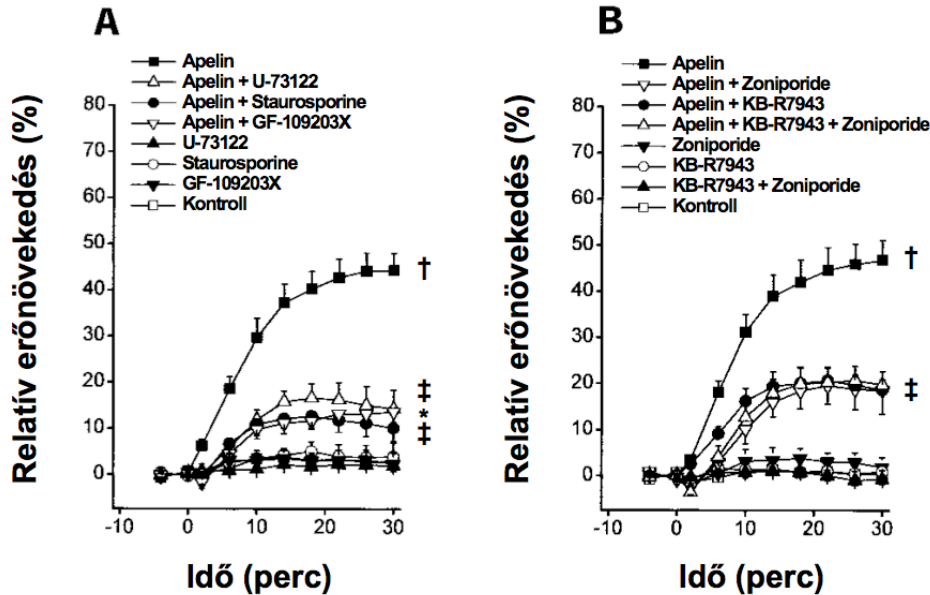
(A) Az AT₁-receptor-gátló CV-11974 (10 nmol/L), az ET_A/ET_B-receptor-gátló bosentan (1 μmol/L), (B) a β-AR-blokkoló propranolol (1 μmol/L) illetve az α-AR-blokkoló prazosin (0.1 μmol/L) nem befolyásolta az apelin (1 nmol/L) pozitív inotrop válaszáat. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=4-6 szív csoportonként). (Szokodi és mtsai, 2002 alapján)

Továbbiakban az apelin hatását az ET_A/ET_B-receptor-antagonista bosentan (1 μmol/L) (Kinnunen és mtsai, 2000), a β-AR-blokkoló propranolol (1 μmol/L) (Talosí és Kranias, 1992) és az α-AR-blokkoló prazosin (0.1 μmol/L) (Talosí és Kranias, 1992) jelenlétében vizsgáltuk. A 25. ábrán illusztrált módon, a gátlószerek egyike sem befolyásolta az apelinre adott inotrop válaszáat. A gátlószerek önmagukban nem voltak hatással a bazális kontraktilitásra (25. ábra). Az apelin vazodilatátor hatásának közvetítésében fontos szerepet játszik az NO (Tatemoto és mtsai, 2001). Mivel az NO alacsony koncentráció mellett képes fokozni a kontraktilitást (Kojda és mtsai, 1996), elképzelhető, hogy az NO hozzájárul az apelin pozitív inotrop hatásához. A hipotézissel ellentétben a NOS gátló L-NAME (300 μmol/L) (Pabla és Curtis, 1996) nem módosította az apelinre adott válaszáat (43.3±2.1% vs. 46.3±1.9%, apelin plusz L-NAME vs. apelin, n=4-4; $P=NS$).

4.2.6. Az apelin pozitív inotrop hatását közvetítő jelátviteli folyamatok

4.2.6.1. A PLC–PKC jelátviteli út szerepe

A szívizomsejtek celluláris folyamatainak a szabályozásában fontos mechanizmust testesít meg a PLC β -indukálta foszfatidil-inozitol hidrolízis és az azt követő PKC aktiváció (Nishizuka, 1995; Palaniyandi és mtsai, 2009).



26. ábra: A PLC, PKC, NHE és NCX szerepe az apelin pozitív inotrop hatásának közvetítésében.

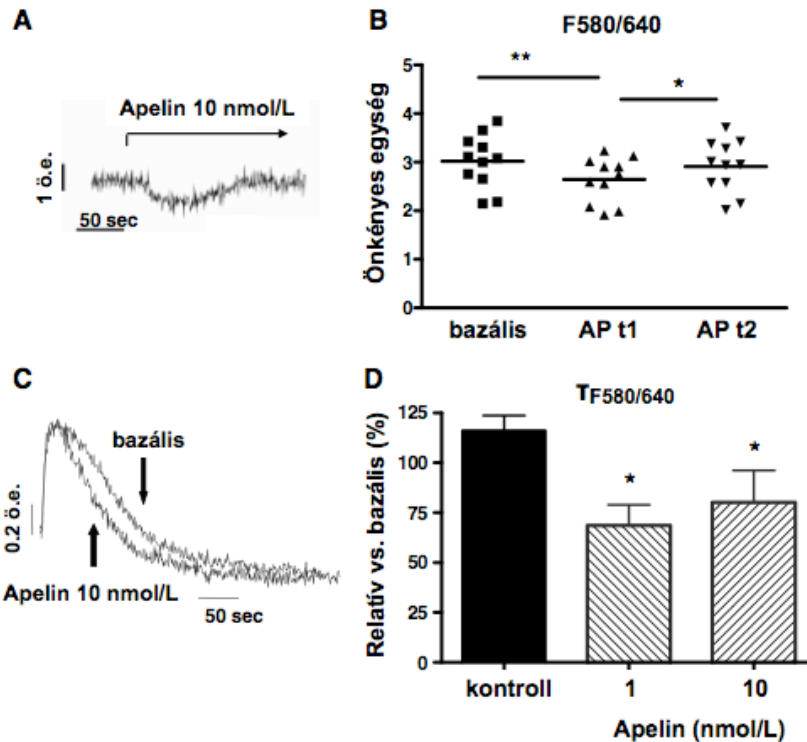
(A) A PLC-gátló U-73122 (100 nmol/L), a PKC-inhibitor staurosporine (10 nmol/L) és GF-109203X (90 nmol/L), (B) a NHE-inhibitor zoniporide (1 μ mol/L) és a NCX fordított irányú működését gátló KB-R7943 (250 nmol/L) szignifikánsan gyengítette az apelin (1 nmol/L) pozitív inotrop effektusát izolált patkányszív-preparátumon. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., n=4-8 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. † P <0.001 vs. kontroll; * P <0.01, ‡ P <0.001 vs. apelin. (Szokodi és mtsai, 2002 alapján)

A PLC szerepét tisztázandó, a PLC-gátló U-73122-vel végeztünk kísérleteket (Fulton és mtsai, 1996). Az U-73122 (100 nmol/L) önmagában nem befolyásolta a kontrakciós erőt (P =NS, 26A. ábra). Az U-73122 szignifikánsan gyengítette az apelin (1 nmol/L) inotrop hatását, a kísérlet végén a csökkenés 68%-ot tett ki (P <0.001; 26A. ábra). A PKC részvételét a széles spektrumú proteinkináz-inhibitor staurosporine (Hidaka és Kobayashi, 1992) és a specifikus PKC-inhibitor GF-109203X (Toullec és mtsai, 1991) segítségével vizsgáltuk. Az apelin (1 nmol/L) inotrop hatását a staurosporine (10 nmol/L) 77%-kal (P <0.001; 26A. ábra), a GF-109203X (90 nmol/L) 70%-kal (P <0.01; 26A. ábra) csökkentette. A staurosporine illetve a GF-109203X önmagában adva nem volt hatással a bazális kontraktilitásra (P =NS, 26A. ábra).

4.2.6.2. A NHE és a NCX szerepe

A NHE potenciális szerepét először a nem specifikus NHE-inhibitor 5-(*N*-metil-*N*-izobutil)-amilorid (MIA) (Moffat és Karmazyn, 1993) segítségével vizsgáltuk. A MIA (1 $\mu\text{mol/L}$) egyedül nem befolyásolta érdemben a kontrakciós erőt ($-0.7\pm 2.0\%$ vs. $2.9\pm 1.9\%$, MIA vs. kontroll, $n=4-6$; $P=\text{NS}$). Az apelin (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását a MIA 55%-kal gyengítette ($19.8\pm 4.6\%$ vs. $44.2\pm 3.8\%$, apelin plusz MIA vs. apelin, $n=6-8$; $P<0.001$). A szelektív NHE-inhibitor zoniporide (1 $\mu\text{mol/L}$) (Knight és mtsai, 2001) 60%-kal csökkentette az apelinre adott inotrop választ ($P<0.001$; 26B. ábra). A zoniporide önmagában nem változtatta meg a kontraktilitást ($P=\text{NS}$; 26B. ábra). A NHE aktiváció az intracelluláris Na^+ akkumulációt elősegítve indirekt módon fokozhatja a NCX fordított irányú működését (Na^+ ki, Ca^{2+} be), mely így hozzájárulhat a sejtbe történő megnövekedett Ca^{2+} -beáramláshoz (Kentis, 1999). A NCX szerepét KB-R7943-mal vizsgáltuk, mely szelektíven gátolja a NCX fordított irányú működését (Iwamoto és mtsai, 1996; Yang és mtsai, 1999). A KB-R7943 (250 nmol/L) nem volt hatással a bazális kontraktilitásra ($P=\text{NS}$; 26B. ábra). Ugyanakkor, a KB-R7943 maximálisan 60%-kal redukálta az apelin pozitív inotrop hatását ($P<0.001$; 26B. ábra). Végezetül megvizsgáltuk, hogy miként változik az apelin hatása a NHE és a NCX egyidejű gátlása esetén. Zoniporide (1 $\mu\text{mol/L}$) és KB-R7943 (250 nmol/L) együttes adása 58%-kal csökkentette az apelin inotrop effektusát ($P<0.001$; 26B. ábra). A gátlószerek kombinált adás mellett sem befolyásolták szignifikáns módon a kontrakciós erőt ($P=\text{NS}$; 26B. ábra).

A farmakológiai gátlószerek segítségével nyert közvetett adataink szerint az apelin hatással van a NHE aktivitására izolált patkányszív-preparátumon. Következő lépésben az apelin intracelluláris pH-ra és NHE aktivitásra kifejtett direkt hatását vizsgáltuk izolált, felnőtt, patkány kamrai szívizomsejteken. Az intracelluláris pH-t a SNARF-1 fluoreszcens indikátor segítségével követtük. Apelin (10 nmol/L) hatására a SNARF-1 fluoreszcencia hányados (F580/640) csökkenését találtuk (kontroll: 3.01 ± 0.1 egység, $n=11$; 10 nmol/L apelin: 2.64 ± 0.1 egység, $n=11$, $P<0.01$; 27A-B. ábra), ami a pH_i emelkedését mutatja. A pH_i változása is átmeneti volt csakúgy, mint a kontraktilitás növekedése. A NHE aktivitását a NH_4Cl "pre-pulse" módszerrel vizsgáltuk (Boyarsky és mtsai, 1988). A szívizomsejteket 15 mmol/L NH_4Cl -nak tettük ki 5 percen keresztül és szimultán mértük a SNARF-1 fluoreszcencia változását. Majd 10 perces kimosást követően megismételtük a fenti mérést apelin (1 és 10 nmol/L) jelenlétében illetve hiányában. Az apelin mindkét koncentráció mellett szignifikánsan csökkentette a $\text{TF}_{580/640}$ -t ($n=11$, $P<0.05$; 27C-D. ábra), azaz fokozta a sejtekből a saveltávolítás sebességét, ami a NHE aktivitás növekedésére utal.

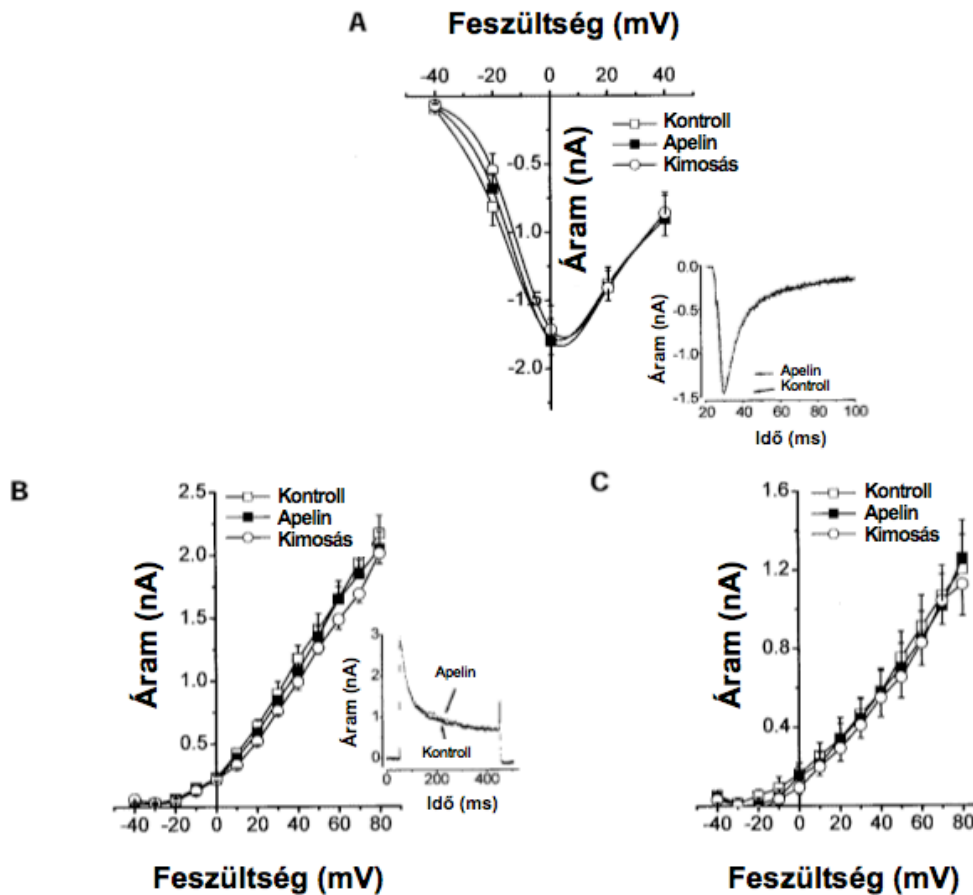


27. ábra: Az apelin hatása az intracelluláris pH-ra és a NHE aktivitásra izolált, felnőtt, patkány szívizomsejteken.

(A, B) Az apelin (10 nmol/L) átmenetileg csökkentette a SNARF fluoreszcencia hányadosát (F580/640) Tyrode-oldatban, ami a pH emelkedésére utal. Az AP t1 a maximális hatást, az AP t2 több perces apelin szuperfúziót követő időpontot jelöli. (C, D) Apelin jelenlétében a pH gyorsabban állt helyre NH₄Cl (15 mmol/L) terhelést követően. A D panel a SNARF-1 fluoreszcencia hányados (F580/640) csökkenésének időállandóját ($\tau_{F580/640}$) mutatja az első NH₄Cl "pre-pulse" értékeihez viszonyítva. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=5-7). Az adatokat páros *t*-tesztel illetve egyutas ANOVA-t követő Tukey post hoc teszttel vizsgáltuk. **P*<0.05, ***P*<0.001. (Farkasfalvi és mtsai, 2007 alapján)

4.2.6.3. Az apelin hatása a Ca²⁺- és K⁺-áramokra

A PKC számos ioncsatorna működését képes befolyásolni (Kamp és Hell, 2000). Megvizsgáltuk, hogy az apelin miként hat a feszültség-aktivált Ca²⁺- és K⁺-áramokra. Kísérleteinket amfotericin B-perforált patch-clamp technika segítségével végeztük izolált, felnőtt, patkány kamrai szívizomsejteken. A 28. ábra az L-típusú Ca²⁺-áram, valamint a kifelé irányuló tranziens és tartós K⁺-áram (I_{to} , $I_{K,sus}$) feszültség-áram összefüggését demonstrálja. Az apelin (10 nmol/L) nem változtatta meg egyik vizsgált áramot (I_{Ca} , I_{to} , és $I_{K,sus}$) sem (28. ábra).

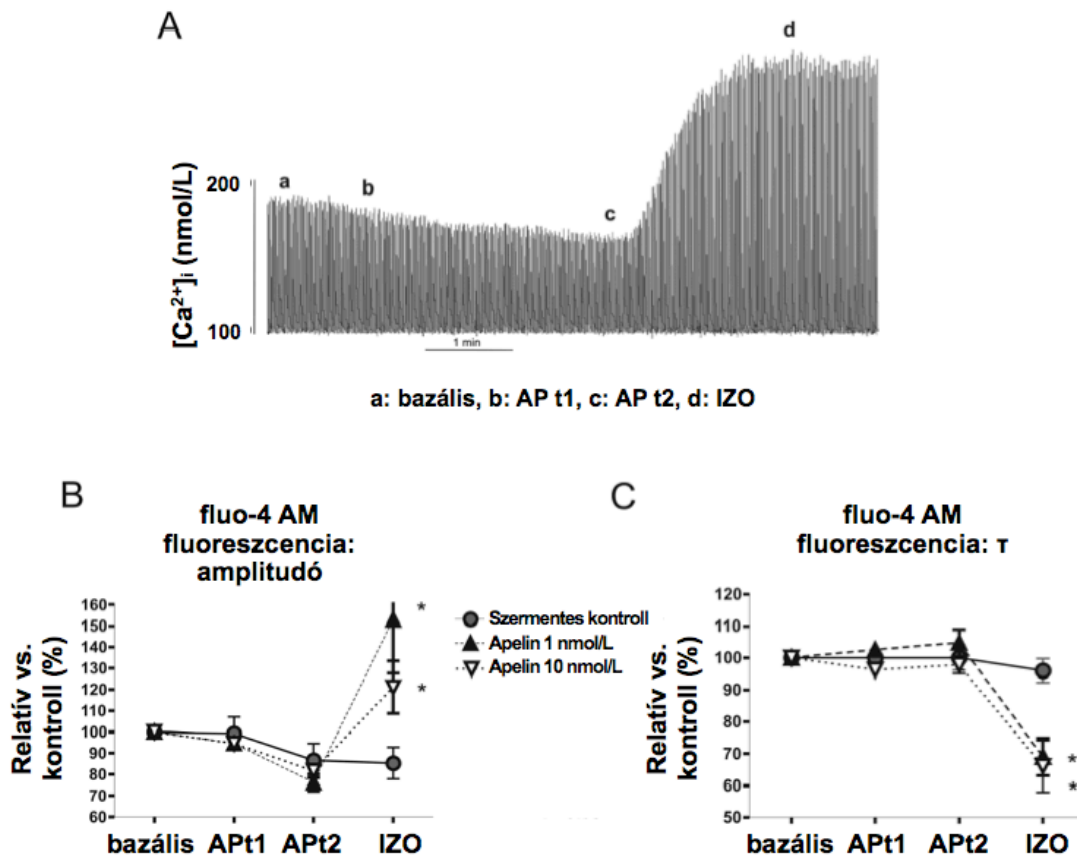


28. ábra: Az apelin hatása a feszültség-aktivált Ca^{2+} - és K^{+} -áramokra izolált, felnőtt, patkány szívizomsejteken.

(A) Az L-típusú Ca^{2+} -áram (I_{Ca}) feszültség-áram összefüggése apelin (10 nmol/L) jelenlétében illetve hiányában. Az I_{Ca} -ot 200 ms-ig tartó -40 mV és +40 mV közötti feszültséglépcsőkkel váltottuk ki -60 mV tartópotenciáltól 20 mV-os lépésekben. A fiókára az eredeti méréseket ábrázolja az apelin szuperfúzió előtt és után (-60 mV-tól 0 mV-ig). (B) A transziens kifelé irányuló K^{+} -áram (I_{to}), és (C) a tartós kifelé irányuló K^{+} -áram ($I_{\text{K,sus}}$) feszültség-áram összefüggése apelin (10 nmol/L) jelenlétében illetve hiányában. Az áramot 400 ms-ig tartó -40 mV és +80 mV közötti feszültséglépcsőkkel váltottuk ki -60 mV tartópotenciáltól 10 mV-os lépésekben. A fiókára az eredeti méréseket ábrázolja az apelin szuperfúzió előtt és után (-60 mV-tól +80 mV-ig). Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=4). (Szokodi és mtsai, 2002 alapján)

4.2.6.4. Az apelin hatása az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensekre

Az apelin hatásmechanizmusának felderítését az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérésével folytattuk izolált szívizomsejteken. A Ca^{2+} -szenzitív fluoreszcens indikátor indo-1 segítségével végzett kísérletek szerint az apelin nem befolyásolta sem a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját (1 nmol/L apelin: AP t1: $98.2\pm 19\%$, AP t2: $91.4\pm 25\%$, n=5, $P=\text{NS}$; 10 nmol/L apelin: AP t1: $97.8\pm 16\%$; AP t2: $89.6\pm 28\%$, n=10, $P=\text{NS}$; AP t1 és t2: 1 és 8 perces apelin szuperfúzió), sem azok időbeli lefolyását. A pozitív kontrollként használt izoproterenol (30 nmol/L) erőteljesen növelte a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját (közlésre nem került adatok).



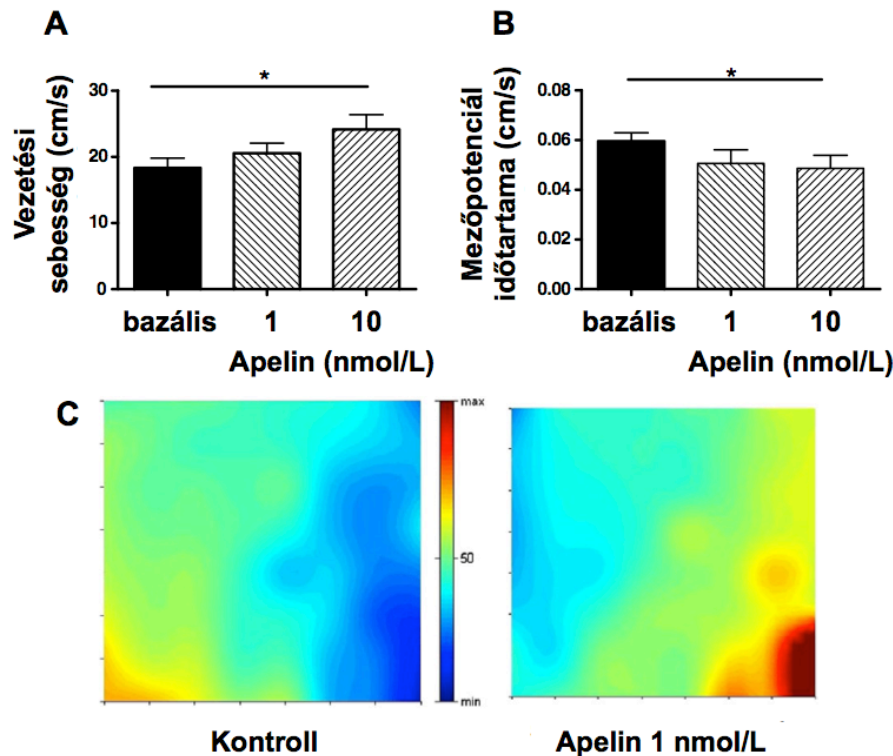
29. ábra: Az apelin hatása az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensekre izolált szívizomsejteken.

(A) A reprezentatív fluo-4-AM fluoreszcens indikátorral végzett mérés szerint, az izoproterenoltól (IZO, 30 nmol/L) eltérően, az apelin (10 nmol/L) nem befolyásolta a Ca^{2+} -tranzienseket. Az összesített eredmények szerint az apelin nem változtatta meg a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját (B), illetve a Ca^{2+} -tranziens csökkenésének időállandóját (τ) (C). Az AP t1 az 1 perces, az AP t2 a 8 perces apelin szuperfúziót jelöli. Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=14-15). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Tukey post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.05$. (Farkasfalvi és mtsai, 2007 alapján)

Kizárandó, hogy az indo-1 mérések zaj tartományába esett volna az apelin esetleges effektusa, a kísérleteket megismételtük fluo-4-AM indikátorral, melynek kedvezőbb a jel-zaj aránya. Hasonlóan a korábbi mérésekhez, az apelin most sem befolyásolta a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját (1 nmol/L apelin: AP t1: 93.79 \pm 2.0%, n=15; 10 nmol/L apelin: AP t1: 94.47 \pm 3.0%, n=14), illetve azok időbeli lefutását (29. ábra). Jelentős β -AR választ kaptunk fluo-4-AM indikátor használata esetén is (29. ábra). Ezen eredmények szerint izolált szívizomsejteken az apelin átmeneti pozitív inotrop hatását nem a $[Ca^{2+}]_i$ változása közvetíti.

4.2.7. Az apelin hatása a sejtek közötti kommunikációra

Az apelin elektrofiziológiai hatásait neonatális patkány eredetű szívizomsejtek egyrétegű tenyészetén vizsgáltuk multielektrod-array technika segítségével (Meiry és mtsai, 2001). A spontán aktivitást mutató sejtenyészeten a mezőpotenciált regisztráltuk.



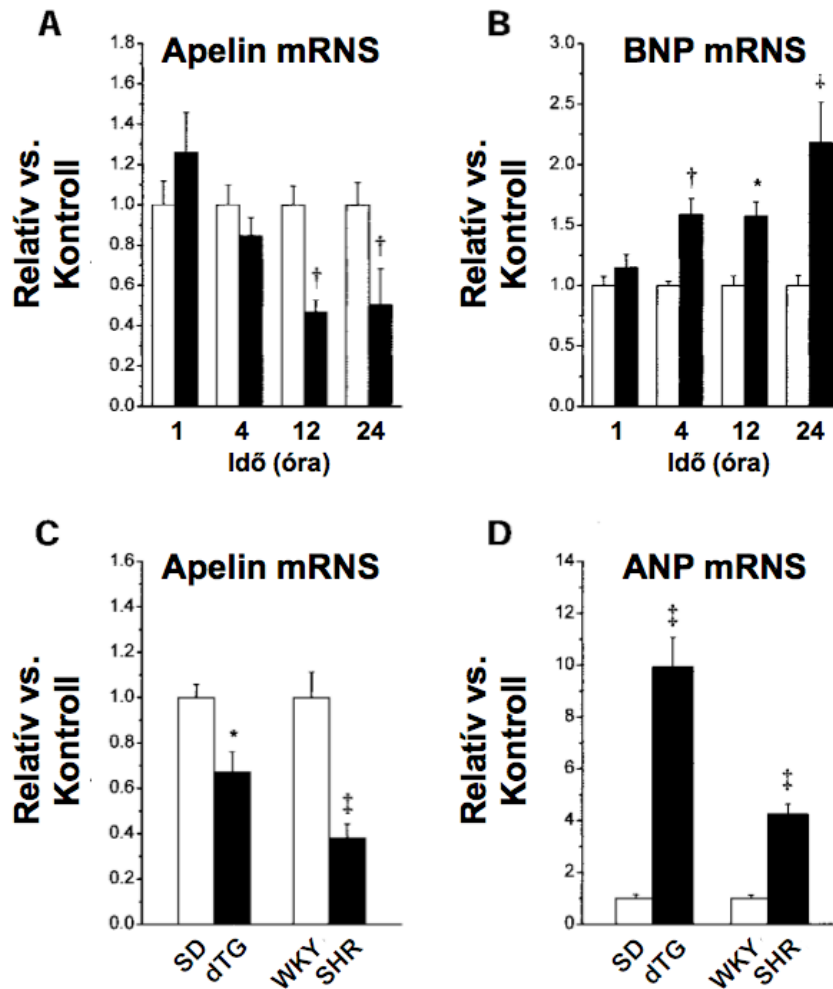
30. ábra: Az apelin hatása a sejtek közötti kommunikációra.

Újszülött patkány eredetű szívizomsejtek tenyészetén az apelin 2 perces szuperfúziója **(A)** növelte a vezetési sebességet; és **(B)** csökkentette a mezőpotenciál időtartamát. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=13-15). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Tukey post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.05$. **(C)** A lokális aktivációs idők segítségével készített színtérkép szerint az aktivációs mintázat reverzibilisen módosult apelin hatására, a peptid megváltoztatta az aktiváció irányát. (Farkasfalvi és mtsai, 2007 alapján)

Apelin jelenlétében szignifikánsan nőtt a vezetési sebesség (kontroll: 18.34 ± 1.4 cm/s; apelin 10 nmol/L: 24.1 ± 2.2 cm/s, $n=15$, $P < 0.05$; 30A. ábra) és csökkent a mezőpotenciál időtartama (apelin 1 nmol/L: 0.05 ± 0.005 s, $n=13$; apelin 10 nmol/L: 0.048 ± 0.005 s, $n=15$, $P < 0.05$; 30B. ábra). A lokális aktivációs idők segítségével készített színtérkép szerint az aktivációs mintázat reverzibilisen módosult apelin hatására (30C. ábra). A sejtenyészet aktivációs térképét 3 dimenziós formátumban is rekonstruáltuk, az animáció az eredeti cikket megjelentető folyóirat honlapján tekinthető meg (Farkasfalvi és mtsai, 2007). A "Normal Tyrode_3D.avi" file egy tipikus aktivációs mintázatot mutat be kontroll (azaz apelin mentes) körülmények között. Az "Apelin_3D.avi" file demonstrálja, hogy az apelin (10 nmol/L) megváltoztatta a sejtenyészetben az aktiváció irányát, mely hatás kimosás után megszűnt.

4.2.8. A mechanikai túlterhelés hatása az apelin és az APJ-receptor génexpressziójára *in vitro* és *in vivo* körülmények között

További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az apelint és az APJ-receptort kódoló gének expressziója miként változik mechanikai feszítés hatására szívizomsejt tenyészetén *in vitro*, illetve a miokardiumban bal kamrai nyomásterhelést követően *in vivo*.



31. ábra: A mechanikai túlterhelés hatása az apelin génexpressziójára.

A ciklikus mechanikai feszítés hatása az apelin (A) és a BNP (B) génexpressziójára újszülött, patkány szívizomsejtek tenyészetében. Az apelin (C) és az ANP (D) bal kamrai génexpressziója SD, dTG, WKY, és SHR állatokban. Az apelin génexpresszióját kvantitatív, valósídejű RT-PCR-rel, a BNP és az ANP expresszióját Northern-blot analízissel határoztuk meg. A peptidok mRNS értékeit a 18S RNS-re normalizálva adtuk meg. Az eredményeket átlag±S.E.M. formában tüntettük fel (n=6-7). Az adatokat Student-féle kétmintás *t*-próbával vizsgáltuk. **P*<0.05, †*P*<0.01, és ‡*P*<0.001 vs. kontroll. (Szokodi és mtsai, 2002 alapján)

Neonatalis patkányok kamráiból származó sejtek kvantitatív, valósídejű RT-PCR (TaqMan) vizsgálata szerint az apelint és receptorát dominánsan a szívizomsejtek expresszálják. Az apelin és az APJ-receptor génexpressziója szívizomsejtek tenyészetében illetve egyéb, nem szívizomsejteket (elsősorban fibroblasztokat) tartalmazó tenyészetben az alábbiak szerint alakult: 3.73 ± 0.43 vs. 0.27 ± 0.13 (*P*<0.05, önkényes egység, 18S RNS-re normalizálva) és 4.64 ± 0.65 vs. 0.02 ± 0.01 (*P*<0.05). A szívizomsejtek 12-24 óráig tartó ciklikus mechanikai feszítése több, mint 50%-kal csökkentette az apelin mRNS szintjét (*P*<0.01; 31A. ábra), míg az APJ-receptor mRNS szintje 30%-kal mérséklődött (*P*<0.01). Ezzel szemben, a pozitív kontrollként használt BNP expressziója időfüggő növekedést mutatott (31B. ábra), a korábbi eredményeknek megfelelően (Liang és Gardner, 1999).

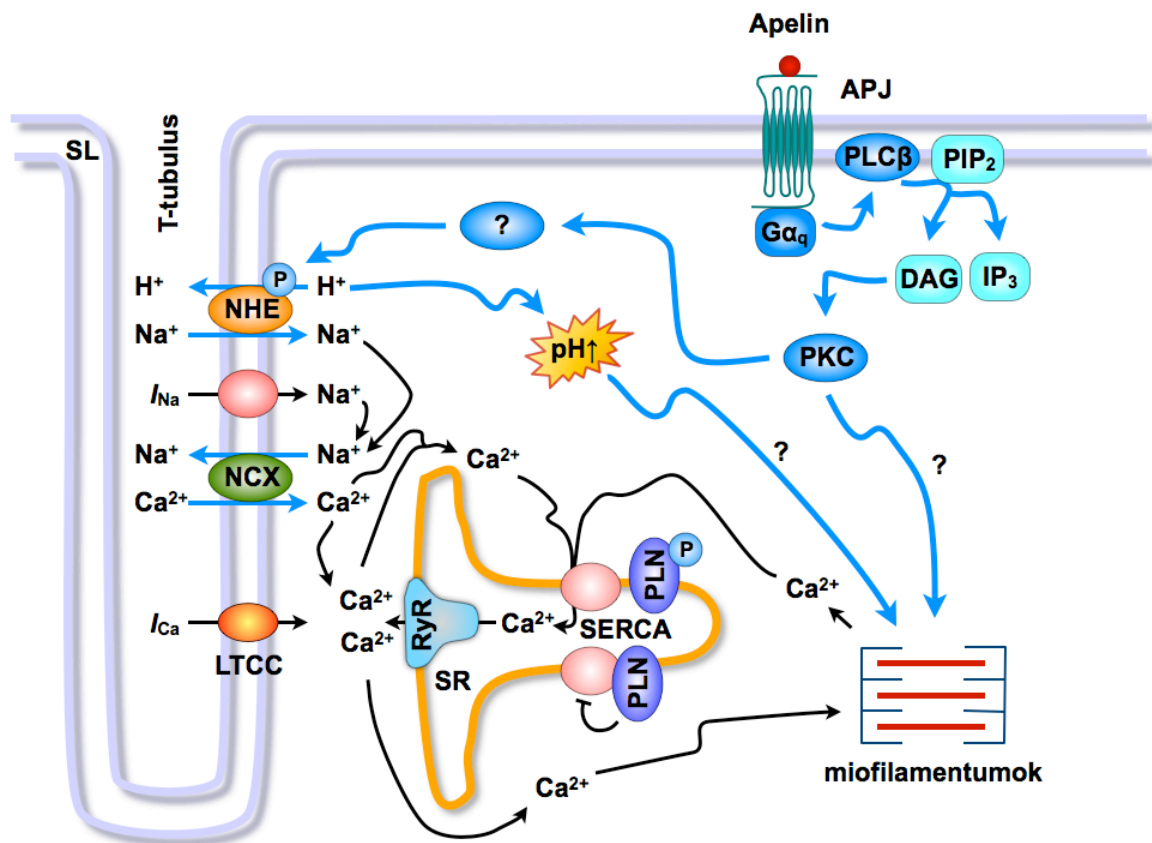
A krónikus bal kamrai nyomásterhelés hatását az apelin és az APJ-receptor géneexpressziójára két különböző állatmodellben vizsgáltuk, dupla transzgénikus dTG patkányokban (Bohlender és mtsai, 1997) és spontán hipertenzív patkányokban. A tartósan fennálló hipertóniának megfelelően jelentős bal kamrai hipertrófiát találtunk, a bal kamra tömeg-testtömeg hányados a következőképpen alakult az azonos korú kontroll egyedekhez viszonyítva: 4.11 ± 0.15 vs. 2.76 ± 0.08 mg/g ($P < 0.001$; dTG vs. SD) és 2.92 ± 0.10 vs. 1.66 ± 0.10 mg/g, ($P < 0.001$; SHR vs. WKY). Az apelin bal kamrai mRNS szintje a dTG patkányokban 33%-kal ($P < 0.05$; dTG vs. SD; 31C. ábra), a SHR törzsben 62%-kal volt alacsonyabb a kontrollokhöz képest ($P < 0.001$; SHR vs. WKY; 31C. ábra). Az APJ-receptor mRNS szintje ugyanakkor változatlan maradt. Az apelin expressziós változásaival szemben, a hipertrófia marker ANP mRNS szintje 9.9-szeresére és 4.2-szeresére emelkedett a dTG és a SHR modellben a kontrollokhöz viszonyítva ($P < 0.001$; 31D. ábra).

4.2.9. Apelin: a szívizom-kontraktilitás regulátora

Vizsgálataink elsőként fedték fel az apelin-APJ rendszer funkcionális jelentőségét a miokardiumban (Szokodi és mtsai, 2002). A peptid prekuzora (Lee és mtsai, 2000; O'Carroll és mtsai, 2000; Kawamata és mtsai, 2001) és az APJ-receptor magas expresszióval rendelkezik a szívben (O'Carroll és mtsai, 2000; Hosoya 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 (Farkasfalvi és mtsai, 2007). Funkcionális vizsgálataink felderítették, hogy az apelin erőteljesen fokozza a kontrakciós erőt izolált patkányszív-preparátumon (Szokodi és mtsai, 2002) illetve izolált szívizomsejteken (Farkasfalvi és mtsai, 2007). Mivel az apelin a szubnanomoláris koncentrációtartományban képes serkenteni a kontraktilitást, valamint a hatása összemérhető az AM és az ET-1 effektusával *ex vivo* (Szokodi és mtsai, 2002), az apelin a legpotensebb endogén pozitív inotrop anyagok közé tartozik. Eredményeinkkel összhangban, az apelin növelte a bal kamrai kontraktilitást *in vivo* patkányokban (Berry és mtsai, 2004) és egerekben (Ashley és mtsai, 2005), valamint fokozta a kontrakciós erőt izolált patkány szívizomsejteken (Wang és mtsai, 2008a) és humán pitvari izomrostokon (Maguire és mtsai, 2009).

Kísérletein során számos intracelluláris mechanizmust azonosítottunk, melyek szerepet játszanak az apelin pozitív inotrop hatásának közvetítésében (32. ábra). Intakt patkányszíven kimutattuk, hogy a PLC és a PKC aktivációja fontos szerepet játszik az apelin inotrop effektusában, mivel ezen enzimek farmakológiai úton történő gátlása jelentősen csökkentette az apelin hatását a kontraktilitásra. Eredményeink szerint, a NHE gátlása szintén gyengítette az apelinre adott választ izolált szívpreparátumon (Szokodi és mtsai, 2002). Továbbá, izolált szívizomsejteken kimutattuk, hogy az apelin növelte a pH_i -t

és a NHE aktivitását (Farkasfalvi és mtsai, 2007). Ismert, hogy a pH_i alkalikus irányba történő eltolódása során fokozódik a miofilamentumok Ca^{2+} iránti szenzitivitása (Kohmoto és mtsai, 1990). Emellett a NHE aktivációja az intracelluláris Na^+ akkumulációjához vezetve indirekt fokozhatja a NCX fordított irányú működését, mely ily módon hozzájárulhat a sejtekbe történő megnövekedett Ca^{2+} -beáramláshoz (Kentish, 1999). Kísérleteinkben a NCX fordított irányú működésének farmakológiai gátlása hatékonyan csökkentette az apelin inotrop hatását. Továbbá, a NHE és a NCX egyidejű blokkolása sem volt képes tovább gyengíteni az apelinre adott választ (Szokodi és mtsai, 2002), ami arra utal, hogy a két antiport rendszer egyazon jelátviteli út proximális és disztális komponensei. Izolált kamrai szívizomsejteken az apelin hatása az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensekre ellentmondásos. Saját eredményeink szerint, az apelin nem befolyásolta a Ca^{2+} -tranzienseket (Farkasfalvi és mtsai, 2007), míg mások a Ca^{2+} -tranziensek mérsékelt növekedését, valamint a NCX és a SERCA fokozott aktivitását találták (Wang és mtsai, 2008a).



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

Az apelin hatásához jelentősen hozzájárul a PLC–PKC kaszkád 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 , foszfátidilinozitol-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. (Szokodi és mtsai, 2002; Szokodi, 2004; Farkasfalvi és mtsai, 2007 alapján)

Izolált kutya szívizomsejteken az apelin fokozta a feszültségfüggő Na^+ -áramot (I_{Na}) (Chamberland és mtsai, 2010), mely szintén hozzájárulhat a NCX aktivációjához. A PKC számos intracelluláris fehérje foszforilációs állapotát képes befolyásolni (Terzic és mtsai, 1993). Jelenleg még nem kellőképpen tisztázott, hogy az apelin alkalmazásakor fellépő PKC aktiváció mely disztális jelátvivők funkcióját szabályozza. Ugyan számos adat utal arra, hogy a PKC fokozza a NHE aktivitását, az enzim azonban önmagában nem képes foszforilálni a NHE-t (Avkiran és Haworth, 2003). Az apelin hatását az I_{Na} növekedésére PKC-függőnek találták (Chamberland és mtsai, 2010). További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az apelin pozitív inotrop hatásának kialakulásáért mennyiben játszik szerepet a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységének fokozódása illetve az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek növekedése.

Az elektromos ingerület sejtek között továbbításáért felelős interkaláris lemezek kifejezett APJ-receptor expressziót mutatnak, felvetve, hogy az apelin befolyásolhatja az intercelluláris kommunikációt. Patkány, neonatális szívizomsejtenyészeten, multielektrod-array technika segítségével végzett vizsgálataink igazolták, hogy az apelin fokozza a szívizomsejtek spontán tüzelési frekvenciáját, vezetési sebességét és csökkenti a mezőpotenciál időtartamát (Farkasfalvi és mtsai, 2007). Magyarazatul szolgálhat az apelin alkalmazásakor tapasztalt I_{Na} növekedése, ami gyorsítja az akciós potenciál korai szakaszát és így fokozza a sejtek ingerelhetőségét (Chamberland és mtsai, 2010). Mindezen eredmények fiziológiai illetve patofiziológiai jelentőségének megítélése további kísérleteket igényel.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a szívizom túlterhelése miként hat az apelin és az APJ-receptor génexpressziójára. Kimutattuk, hogy *in vitro*, neonatális patkány eredetű szívizomsejtek 12-24 óráig tartó ciklikus mechanikai feszítése jelentősen csökkentette a peptid és receptora mRNS szintjét. *In vivo*, krónikus nyomásterhelés állatmodelljeiben, SHR és dTG patkányokban, az apelin bal kamrai génexpressziója alacsonyabb volt a kontrollokhoz képest, míg az APJ-receptor mRNS szintjében nem találtunk eltérést (Szokodi és mtsai, 2002). Dahl hipertenzív patkányokban, dekompenzált szívelégtelenség fázisában, mind az apelin, mind az APJ-receptor bal kamrai expressziója drámai módon csökkent, mely kivédhető volt AT_1 -receptor-antagonista alkalmazásával (Iwanaga és mtsai, 2006). Végstádiumú szívelégtelenség miatt explantált humán szívek vizsgálata az APJ-receptor bal kamrai expressziójának szignifikáns csökkenését mutatta idiopátiás dilatatív kardiomiopátiában, míg iszkémiás eredetű kardiomiopátiában nem változott a kontroll szívekhez viszonyítva. Ugyanakkor, az apelin expressziója mindkét kardiomiopátiás csoportban szignifikánsan emelkedett (Földes és mtsai, 2003). Annak tisztázására, hogy a leírt változások mennyiben tekinthetők adaptív illetve maladaptív válaszoknak, segítséget nyújthatnak a funkcióvesztést (*loss-of-function*) eredményező mutációk állatmodelljei. Az apelin génhiányos hím *Apelin*^{-y} és nőstény *Apelin*^{-/-} egerekben öregedés során (6-12 hónap) a balkamra-funkció jelentősen beszűkült, mely exogén

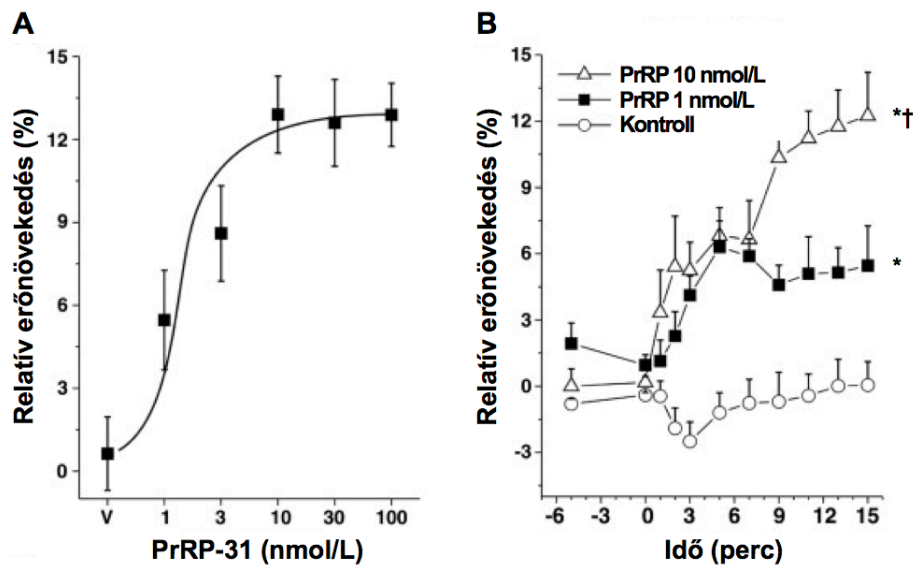
apelin adásával korrigálható volt (Kuba és mtsai, 2007). Mások eredményei szerint, 3-4 hónapos *Apelin*^{-/-} és *Apelin*^{-y} illetve APJ-receptor génhiányos egerek (*APJ*^{-/-}) balkamra-funkciója mérsékelten romlott *in vivo*, ugyanakkor az ezen állatokból izolált szívizomsejtek kontraktilitása jelentősen csökkent (Charo és mtsai, 2009). Továbbá, vad típusú egyedekhez képest az *Apelin*^{-y} egerekben nyomásterhelés hatására súlyosabb fokú szívelégtelenség fejlődött ki (Kuba és mtsai, 2007). Ezen észlelések tovább erősítik a hipotézist, hogy az endogén apelin-APJ rendszer fontos szerepet játszhat a balkamra-funkció fenntartásában kóros viszonyok között (Barnes és mtsai, 2010).

Mivel az APJ-receptor expressziója jelentős csökkenést mutat egyes patofiziológias modellekben, fontos kérdés, hogy az apelinre adott válaszok mennyiben módosulnak ezen kórállapotokban. Posztinfarktusos szívelégtelenségben az exogén apelin infúziója hasonló mértékben fokozta a balkamra-funkciót, mint egészséges patkányokban (Berry és mtsai, 2004). Jobb kamrai trabekulák vizsgálata során az apelinre adott pozitív inotrop válasz egyenesen nagyobbak adódott szívelégtelen egyedek esetén (Dai és mtsai, 2006). Eredményeink szerint, egészséges illetve posztinfarktusos szívelégtelen állatokból származó szívizomsejtek összevethető módon reagáltak apelinre (Farkasfalvi és mtsai, 2007). Végezetül, szívelégtelen betegekben, a jelenleg elérhető optimális gyógyszeres kezelés mellett, az apelin akut i.v. infúziója növelte a perctérfogatot, valamint csökkentette a vérnyomást és a perifériás vaszkuláris rezisztenciát. A változások mértéke hasonló volt szívbeteg és egészséges kontrollok esetében (Japp és mtsai, 2010). Összességében elmondható, hogy szívelégtelenség állapotában az exogén módon adott apelin kontraktilitást fokozó hatása illetve az egyéb kedvező hemodinamikai effektusai megtartottak.

4.3. A prolaktin-releasing peptid szerepe a szívizom-kontraktilitás szabályozásában

4.3.1. A PrRP pozitív inotrop hatása izolált patkányszív-preparátumon

A PrRP-31 (1-100 nmol/L) dóziszfüggő pozitív inotrop hatást váltott ki izolált patkányszív-preparátumon (33A. ábra). Az effektus 10 nmol/L-es PrRP dózisinál érte el a maximumát. A PrRP csúcshatása 16.5%-a volt a β -AR-agonista dobutamin (10 μ mol/L) maximális inotrop válaszához (12.9 \pm 1.7% vs. 78.4 \pm 11.9%). Amint az 33B. ábrán látható, a kontraktilitás növekedése lépcsőzetesen alakult ki és a maximális hatás 15 percnél jelentkezett.



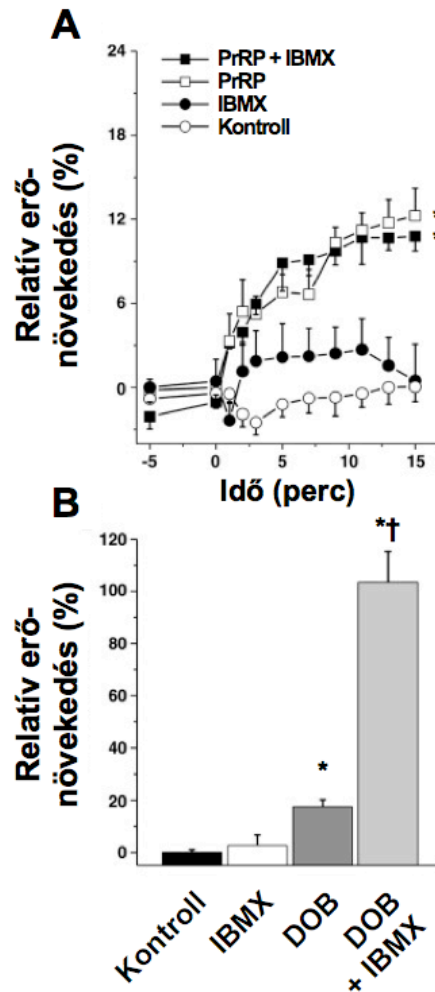
33. ábra: A PrRP hatása a szívizom-kontraktilitásra.

(A) A PrRP-31 (1-100 nmol/L) dóziszfüggő módon fokozta a kontrakciós erőt izolált patkányszív-preparátumon. (B) A PrRP pozitív inotrop hatásának időbeli lefutása. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., n=4-6 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * P <0.001 vs. kontroll; † P <0.001 vs. 1 nmol/L PrRP. (Kónyi és mtsai, 2010 alapján)

4.3.2. A PrRP pozitív inotrop hatásának jelátviteli folyamatai

4.3.2.1. A cAMP-PKA jelátviteli út szerepe

Következő kísérleteinkben a PrRP inotrop hatásának jelátviteli mechanizmusait kívántuk azonosítani. Elsőként a cAMP-PKA útvonal szerepét vizsgáltuk. A cAMP lebomlását gátló foszfodiészteráz-inhibitor IBMX (10 μ mol/L) nem befolyásolta a PrRP (10 nmol/L) inotrop hatását (P =NS; 34A. ábra), míg a dobutamin (250 nmol/L) inotrop effektusát markánsan felerősítette (P <0.001; 34B. ábra). Adataink arra utalnak, hogy a PrRP kontraktilitást növelő hatását cAMP-től független mechanizmusok hozzák létre.



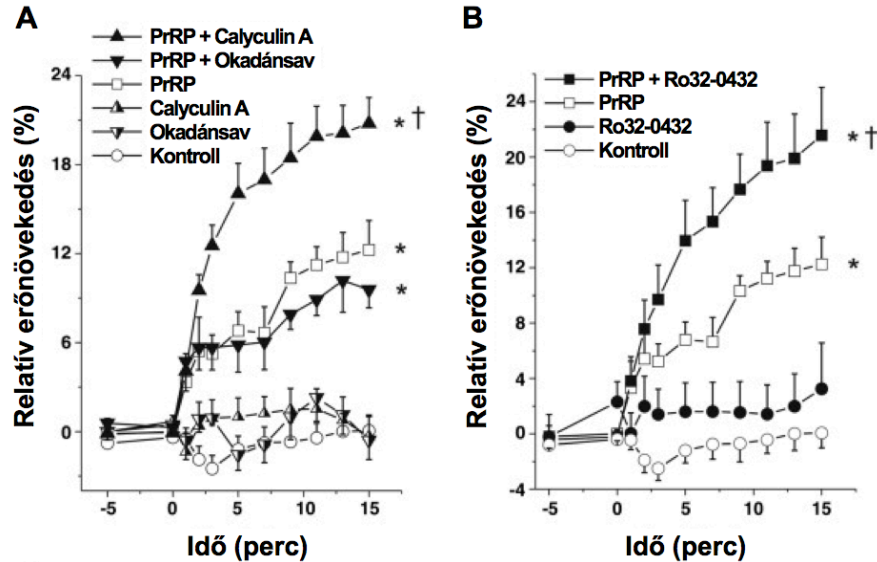
34. ábra: cAMP-függő mechanizmusok szerepe a PrRP inotrop hatásának közvetítésében.

(A) A foszfodiészteráz-inhibitor IBMX (10 $\mu\text{mol/L}$) nem fokozta a PrRP (10 nmol/L) inotrop hatását izolált patkányszív-preparátumon. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., $n=4-8$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P<0.001$ vs. kontroll. (B) A dobutamin (DOB, 250 nmol/L) inotrop hatását az IBMX jelentősen növelte. Az összesített eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel ($n=4-8$ szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P<0.001$ vs. kontroll; † $P<0.001$ vs. dobutamin. (Kónyi és mtsai, 2010 alapján)

4.3.2.2. A PP1 és a PP2A proteínfoszfatázok szerepe

A kontraktilis apparátus elemeinek reverzibilis foszforilációja alapvető szerepet játszik a kontraktilitás szabályozásában. A fehérjék foszforiláltsági állapotát a proteinkinázok és a foszfoprotein-foszfatázok közötti egyensúly határozza meg. A foszfoprotein-foszfatáz-1 (PP1) és a foszfoprotein-foszfatáz-2A (PP2A) szerepének tisztázása céljából specifikus inhibitorokat használtunk. A calyculin A 1 nmol/L -es dózis mellett egyaránt gátolja a PP1-et és a PP2A-t, míg az okadánsav 10 nmol/L -es dózis mellett csak a PP2A-t blokkolja (Herzig és Neumann, 2000). Amikor a PrRP-t (10 nmol/L) calyculin A (1 nmol/L) jelenlétében alkalmaztuk, a peptid inotrop hatása jelentősen növekedett ($P<0.001$; 35A. ábra). Ezzel szemben, az okadánsav (10 nmol/L) nem befolyásolta a peptid inotrop

hatását ($P=NS$; 35A. ábra). Megjegyzendő, hogy a PP1 gátlás hasonló mértékben fokozta a kontraktilitást számos további PrRP dózis mellett (1, 3 és 30 nmol/L). Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a PrRP inotrop hatását a PP1 aktivációja ellensúlyozza, míg a PP2 nincs hatással a folyamatra.



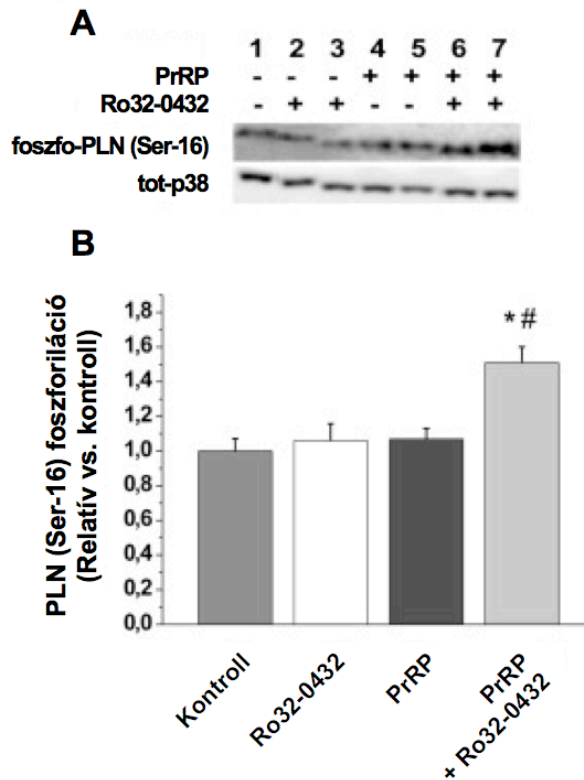
35. ábra: A PP1 és a PKC α elnyomja a PrRP pozitív inotrop hatását.

(A-B) A PP1/PP2A-inhibitor calyculin A (1 nmol/L), a PP2A-inhibitor okadánsav (10 nmol/L) (A), és a PKC α -inhibitor Ro32-0432 (100 nmol/L) (B) hatása a PrRP (10 nmol/L) inotrop effektusára izolált patkányszív-preparátumon. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., n=4-8 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P<0.001$ vs. kontroll; † $P<0.001$ vs. PrRP. (Kónyi és mtsai, 2010 alapján)

4.3.2.3. A PKC α szerepe

A PKC α szívizom-specifikus overexpressziója a PP1 aktivitását fokozva csökkenti a kontraktilitást (Braz és mtsai, 2004). Kísérleteink további részében azt vizsgáltuk, hogy a PKC α képes-e modulálni a PrRP akut inotrop hatását. A PKC α -inhibitor Ro32-0432 (100 nmol/L) (Hambleton és mtsai, 2006) szignifikáns mértékben növelte a PrRP pozitív inotrop effektusát ($P<0.001$; 36B. ábra). A PKC α overexpressziója esetén csökkent PLN foszforilációt figyeltek meg a transzgenikus egerek szívében (Braz és mtsai, 2004). Ezzel összhangban, Ro32-0432 jelenlétében a PrRP szignifikáns mértékben növelte a PLN foszforilációját a Ser-16 foszforilációs helyen ($P<0.01$), míg a peptid önmagában nem módosította a PLN foszforiláció mértékét (36. ábra). A megfigyeléseink arra utalnak, hogy a PKC α gátlása a PLN foszforilációjának fokozása révén növeli a PrRP inotrop hatását.

dc_119_10



36. ábra: A PrRP fokozza a foszfolamban foszforilációt PKC α -gátlás mellett.

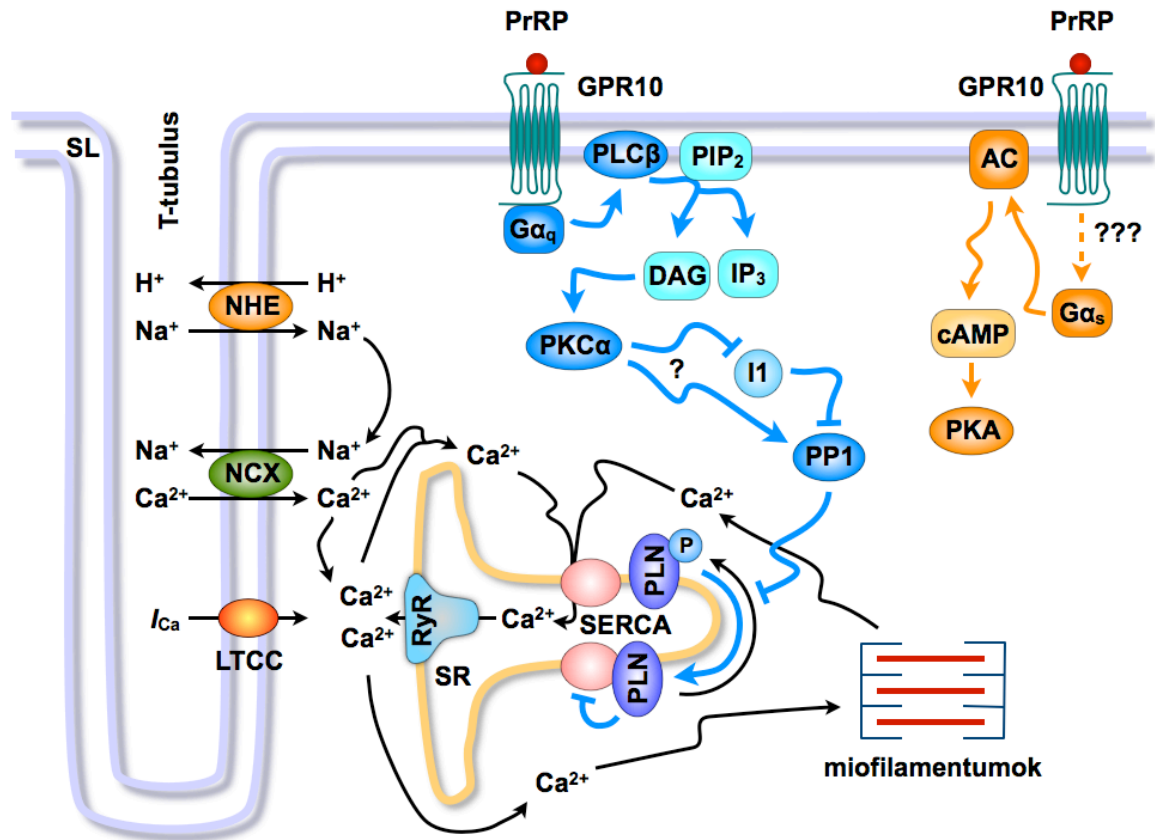
Az izolált patkányszíveket PrRP-vel (10 nmol/L) kezeltük a PKC α -gátló Ro32-0432 (100 nmol/L) jelenlétében illetve hiányában. **(A)** A reprezentatív Western-blot a kezelések hatását mutatja a PLN Ser-16 foszforilációs hely (PLN Ser-16) foszforilációjára bal kamrai mintákban. A p38-MAPK elleni antitesttel ellenőriztük, hogy azonos mennyiségű fehérjét vittünk fel a blottra. **(B)** Az összesített eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=3-4 szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * P <0.05 vs. kontroll; # P <0.01 vs. PrRP. (Kónyi és mtsai, 2010 alapján)

4.3.3. PrRP: a szívizom-kontraktilitás potenciális új szabályozója

A közelmúltban vetették fel, hogy a GPR10 árvareceptor ligandja, a PrRP részt vehet a vérnyomás centrális szabályozásában (Samson és mtsai, 2000; Horiuchi és mtsai, 2002). Vizsgálataink szerint a PrRP direkt, dóziszfüggő pozitív inotrop hatást vált ki izolált patkányszív-preparátumon (Kónyi és mtsai, 2010). Eredményeink elsőként mutatnak rá, hogy a PrRP szerepet játszhat a kardiovaszkuláris rendszer perifériás regulációjában.

Mivel a PrRP mérsékelten fokozta a kamrai kontraktilitást, feltételeztük, hogy a peptid ellenszabályozó mechanizmusokat is aktivál, melyek gyengítik a PrRP pozitív inotrop hatását. A cAMP-n keresztül ható GPCR-agonisták inotrop hatását jelentősen korlátozzák a cAMP hidrolízisét végző foszfodiészterázok (Fischmeister és mtsai, 2006). Saját kísérleti rendszerünkben a foszfodiészteráz-gátló IBMX határozottan fokozta a β_1 -AR-agonista dobutamin hatását. Ezzel szemben a PrRP inotrop hatása változatlan maradt IBMX jelenlétében, ami arra enged következtetni, hogy a peptid nem az adenilátcikláz

-cAMP-PKA jelátviteli rendszer aktivációja révén befolyásolja a kontraktilitást (Kónyi és mtsai, 2010).



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

A cAMP-PKA jelátviteli úttól független mechanizmusok hozzájárulnak a PrRP pozitív inotrop hatásához. 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-foszfatáz-1; NCX, Na⁺-Ca²⁺-cseremechanizmus; NHE, Na⁺-H⁺-cseremechanizmus; RyR, rianodin-szenzitív Ca²⁺-csatorna; SERCA, SR Ca²⁺-ATPáz; SR, szarkoplazmatikus retikulum. (Kónyi és mtsai, 2010 alapján)

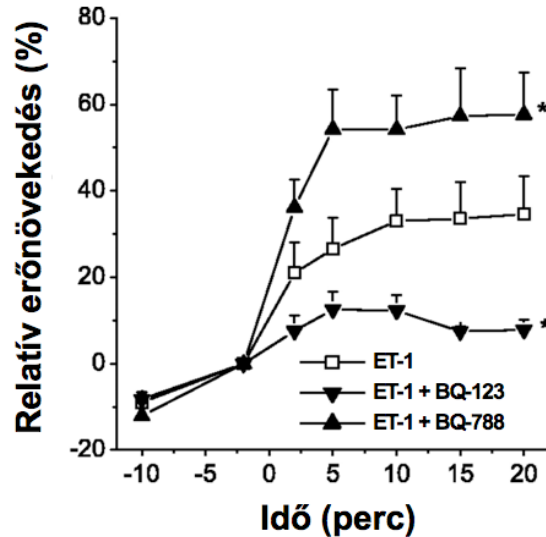
Számos tanulmány bizonyította, hogy a PKC α patológiás körülmények közötti aktivációja negatívan hat a szív pumpafunkciójára (Hahn és mtsai, 2003; Braz és mtsai, 2004; Hambleton és mtsai, 2006; Liu és Molquentin, 2011). Ezzel szemben, a PKC α jelentősége a kontraktilis erő akut szabályozásában fiziológiai viszonyok között kevésbé ismert. Eredményeink szerint a PKC α farmakológiai gátlása szignifikáns mértékben növelte a PrRP pozitív inotrop hatását valamint fokozta a PLN fehérje foszforilációját (Kónyi és mtsai, 2010). A PLN a kontraktilitás szabályozásának egyik kulcsfehérjeje (MacLennan és Kranias, 2003). Kísérleteinkben a PKC α -inhibíció esetén a fokozott PLN foszforiláció a Ser-16 pozícióban feltehetőleg megszünteti a SERCA gátlását és serkenti a Ca²⁺ visszavételét a SR-ba. A SR telítődése révén növekszik a felszabadítható Ca²⁺ mennyisége és másodlagosan fokozódik a szívizom kontraktilis ereje (MacLennan és

Kranias, 2003). Tisztázásra vár, hogy a PKC α milyen mechanizmuson keresztül szabályozza a PLN foszforiláltsági szintjét. A PKC α gátláshoz hasonlóan, a PrRP inotrop hatását a PP1 inaktivációja is szignifikánsan fokozta (Kónyi és mtsai, 2010). Ismert, hogy a PKC α krónikus aktivációja, az inhibitor-1 fehérje (I1) révén, a PP1 működését serkentve csökkenti a PLN foszforilációját transzgenikus egerek szívében (Braz és mtsai, 2004). Ily módon feltételezhető, hogy a PrRP pozitív inotrop hatásának kialakulása során a PKC α a PP1 közvetítésével szabályozza a PLN foszforilációját (37. ábra). A Ca²⁺-homeosztázis szabályozásán túl, a PKC α direkt módon is képes módosítani a miofilamentumok működését. Sejtmembránjuktól megfosztott patkány szívizomsejtek esetében a PKC α csökkentette a miofilamentumok Ca²⁺-érzékenységet és erőgenerálási képességét (Belin és mtsai, 2007). Ugyanakkor, humán kamrai szívizomsejteken a PKC α hozzájárult a kontraktilis erő fenntartásához (Molnár és mtsai, 2008). További kísérletekre van szükség annak eldöntéséhez, hogy a PrRP vajon képes-e befolyásolni a miofilamentumok működését. Eredményeinket tágabb kontextusba helyezve, a PKC α fontos homeosztatisz szerepet tölthet be a szívben a túlzott inotrop stimuláció ellensúlyozása révén.

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

4.4.1. Az ET_A- és az ET_B-receptorok szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében

Az ET-1 potens pozitív inotrop hatást vált ki számos emlősfajban (Brunner és mtsai, 2006). Ezzel szemben ellentmondásos megfigyelések születtek egér szívizomsejteken, egyes szerzők szerint az ET-1 pozitív (Pi és mtsai, 2002), mások szerint negatív inotrop effektussal bírt (Sakurai és mtsai, 2002). C57 egértörzset vizsgálva, eredményeink szerint az ET-1 (1 nmol/L) fokozta az izolált szívpreparátumon a kontrakciós erőt (38. ábra). Az inotrop hatás összevethető volt a patkányszíven nyert adatainkkal (5. ábra). Izolált egérszíven az ET_A-receptor-antagonista BQ-123 (100 nmol/L) szignifikánsan gyengítette, míg az ET_B-receptor-antagonista BQ-788 (100 nmol/L) fokozta az ET-1 inotrop hatását (38. ábra). Korábbi észlelésekkel összhangban (Kedzierski és Yanagisawa, 2001), az ET_A-receptorok gátlása mérsékelte az ET-1 koronáriákat szűkítő hatását (perfúziós nyomás a kezelés előtt vs. kezelés után: ET-1: 59±7 vs. 119±10 Hgmm; ET-1+BQ-123: 58±10 vs. 83±9 Hgmm; $P<0.05$), míg az ET_B-receptorok gátlása esetén fokozódott a vazokonstriktió (ET-1+BQ-788: 67±7 vs. 142±19 Hgmm; $P<0.05$). Összességében, az értónus szabályozásához hasonlóan, az ET_A- és az ET_B-receptorok stimulációja ellentétes hatást gyakorol a szívizom kontraktilis erejére (Piuholá és mtsai, 2003a).

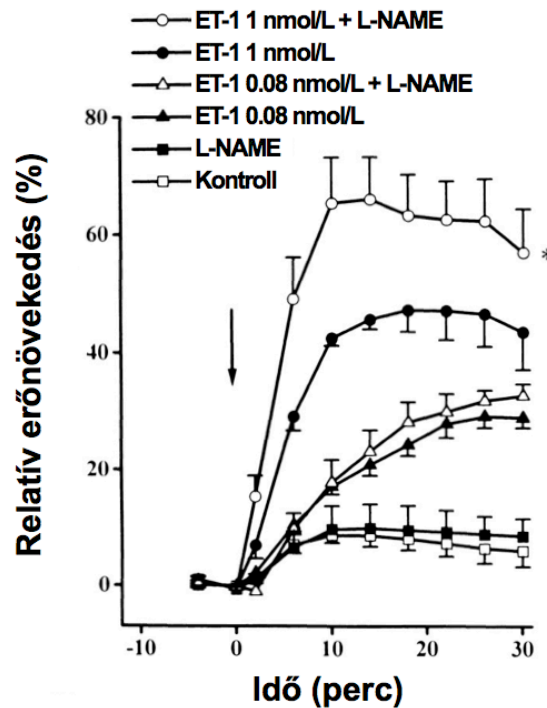


38. ábra: Az ET_A- és az ET_B-receptorok relatív szerepe az ET-1 inotrop hatásában.

Izolált egérszív-preparátumon az ET_A-receptor-antagonista BQ-123 (100 nmol/L) szignifikánsan gyengítette, míg az ET_B-receptor-antagonista BQ-788 (100 nmol/L) fokozta az ET-1 (1 nmol/L) hatását. A receptorblokkolók infúzióját 10 perccel az ET-1 adást megelőzve indítottuk. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag±S.E.M., n=5 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P<0.05$ vs. ET-1. (Piuholá és mtsai, 2003a alapján)

4.4.2. A nitrogén-monoxid szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának szabályozásában

Az értónus szabályozása során, az endothelsejtek ET_B -receptorai az NO termelés fokozásával ellensúlyozzák (Lerman és mtsai, 1992; Wang és mtsai, 1994) a vaszkuláris simaizomsejtek ET_A -receptorai által közvetített vazokonstriktor hatást (Cannan és mtsai, 1995). Kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy az NO miként befolyásolja az ET-1 pozitív inotrop hatását. A NOS-inhibitor L-NAME (300 $\mu\text{mol/L}$) (Bredt és Snyder, 1994; Pabla és Curtis, 1996) önmagában nem volt hatással az izolált patkányszívek kontraktilis erejére (39. ábra). Ezzel szemben, az ET-1 (1 nmol/L) pozitív inotrop effektusát markánsan fokozta az inhibitor ($P < 0.01$; 39. ábra). Alacsonyabb dózisu ET-1 (0.08 nmol/L) hatását a NOS gátló nem módosította szignifikánsan ($P = \text{NS}$; 39. ábra).



39. ábra: Az NO szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának szabályozásában.

Izolált patkányszív-preparátumon a NOS-inhibitor L-NAME (300 $\mu\text{mol/L}$) szignifikánsan növelte az ET-1 (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., n=6-9 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.01$ vs. ET-1 (az infúzió első 15 perce). (Kinnunen és mtsai, 2000 alapján)

Az ET-1 (1 nmol/L) mérsékelten növelte a koronária perfúziós nyomást (31.4 \pm 0.6 Hgmm-ről 36.9 \pm 1.7 Hgmm-re, $P < 0.001$). L-NAME erőteljesen fokozta az ET-1 konstriktor hatását. Megjegyzendő, hogy a szívizom-kontraktilitás változásától eltérően, a perfúziós nyomás csupán 10 perc után kezdett emelkedni és a maximumát 30 percnél érte el (33.0 \pm 0.8 Hgmm-ről 60.4 \pm 6.4 Hgmm-re, $P < 0.001$).

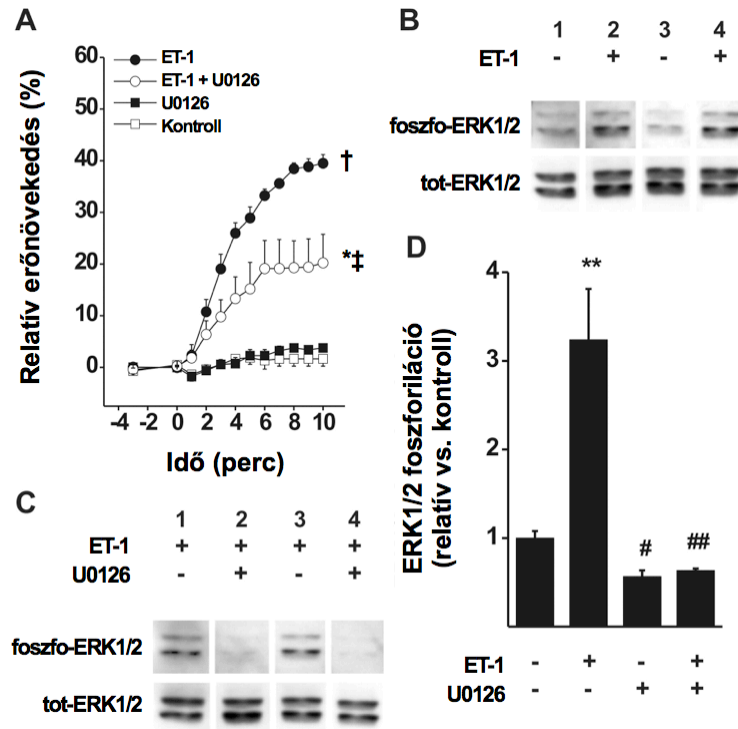
Az NO fontos szerepet játszik a szívizom-kontraktilitás szabályozásában (Massion és mtsai, 2003; Ziolo és mtsai, 2008). Számos tanulmány igazolta, hogy a NOS farmakológiai gátlása fokozza a β -AR inotrop választ (Balligand és mtsai, 1993; Keaney és mtsai, 1996). Eredményeink elsőként igazolták, hogy az NO korlátozza az ET-1 kontraktilitást fokozó hatását (Kinnunen és mtsai, 2000). *Ex vivo*, izolált szívpreparátumon a NOS gátlás eltérő dinamikával befolyásolta a kontraktilis erőt (Kinnunen és mtsai, 2000) és a vaszkuláris tónust (Kinnunen és mtsai, 2001), emiatt valószínűtlen, hogy a kontraktilitásra kifejtett hatás másodlagosan, a perfúziós nyomás változása miatt (Gregg-hatás) lépett volna fel. Eredményeinkkel összhangban, a NOS farmakológiai gátlása *in vivo* kísérleti viszonyok között ET-1-függő módon növelte a bal kamrai kontraktilitást (Czóbel és mtsai, 2009). Ellentmondásos az egyes NOS izoformák szerepe a kontrakciós erő szabályozásában. Az érfalban jelentős eNOS expressziót mutatnak az endothelsejtek (Pollock és mtsai, 1993), míg a nNOS elsősorban a simaizomsejtekben van jelen (Boulanger és mtsai, 1998; Webb és mtsai, 2006). Emellett, mindkét izoforma a szívizomsejtekben is expresszálódik (Balligand és mtsai, 1993; Feron és mtsai, 1996; Xu és mtsai, 1999; Barouch és mtsai, 2002). Számos vizsgálat szerint az eNOS-t kódoló gén kiütése (eNOS^{-/-}) esetén erőteljesebb β -AR inotrop válasz váltható ki (Gyurko és mtsai, 2000; Godecke és mtsai, 2001; Barouch és mtsai, 2002; Wang és mtsai, 2008b), míg mások nem észleltek fokozott effektust (Vandecasteele és mtsai, 1999; Martin és mtsai, 2006). A nNOS farmakológiai illetve genetikai úton történő inaktivációja (nNOS^{-/-}) során fokozott (Ashley és mtsai, 2002), változatlan (Martin és mtsai, 2006), illetve gyengült β -AR pozitív inotrop hatást írtak le (Barouch és mtsai, 2002). Mivel a kísérleteinkben használt L-NAME mind az eNOS-t, mind a nNOS-t gátolja, szelektív gátlószerekkel végzett további vizsgálatokra van szükség, hogy tisztázzuk az eNOS és a nNOS relatív szerepét az ET-1 hatásának modulációjában.

4.4.3. A MAPK-ok szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának regulációjában

4.4.3.1. Az ERK1/2 szerepe

Izolált patkányszív-preparátumon az ET-1 10 perces infúziója (1 nmol/L) 40 \pm 2%-kal növelte a kontraktilis erőt (40A. ábra). Western-blot analízis segítségével vizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az ET-1 az ERK1/2 foszforiláltsági állapotát intakt szíven. A korábbi, neonatális patkány szívizomsejt-kultúrán nyert eredményekkel összhangban (Bogoyevitch és mtsai, 1993; Bogoyevitch és mtsai, 1994; Clerk és mtsai, 1998) az ET-1 szignifikánsan növelte a foszfo-ERK1/2 bal kamrai szintjét (40B. ábra). A következőkben azt kívántuk tisztázni, hogy az ERK1/2 aktivációja mennyiben járul hozzá az ET-1 inotrop hatásához. Kísérleteinkben U0126-ot alkalmaztunk, mely az ERK1/2-öt aktiváló MEK1/2-nek a potens inhibitora (Favata és mtsai, 1998). Az U0126 (1.5 μ mol/L) kivédte az ET-1-indukálta ERK1/2 foszforilációt (40C-D. ábra), valamint 57%-kal csökkentette az ET-1 inotrop

hatását (40A. ábra; $P < 0.001$). Az U0126 önmagában nem volt hatással a kontraktilitásra (40A. ábra; $P = \text{NS}$).



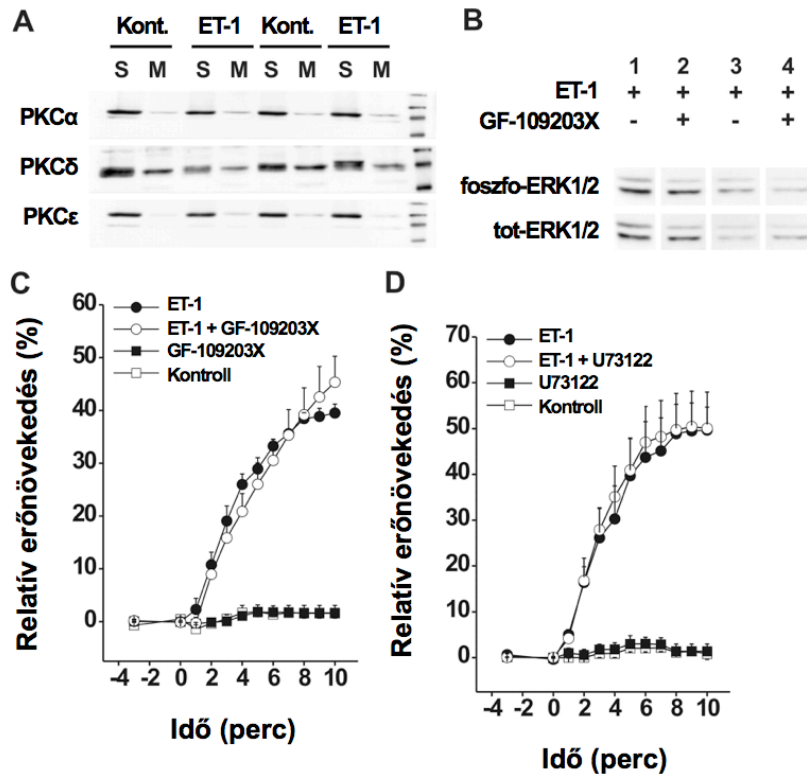
40. ábra: Az ERK1/2 szerepet játszik az ET-1 pozitív inotrop hatásának a közvetítésében.

(A) Izolált patkányszívben az ET-1 (1 nmol/L) 10 perces infúziója növelte a kontraktilis erőt, melyet a MEK1/2-inhibitor U0126 (1.5 $\mu\text{mol/L}$) szignifikánsan gyengített. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., $n=4-6$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.05$, † $P < 0.001$ vs. kontroll és U0126; ‡ $P < 0.001$ vs. ET-1. (B-D) ERK 1/2 foszforiláció megjelenítése Western-blot technikával. Az ET-1 növelte a bal kamrai minták foszfo-ERK1/2 (foszfo-ERK1/2) szintjét (B és D), amelyet az U0126 gátolt (C és D). Az összesített eredmények esetén a foszfo-ERK1/2 és a totál ERK1/2 (tot-ERK1/2) hányadosát tüntettük fel (átlag \pm S.E.M., $n=4$ szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. ** $P < 0.01$ vs. kontroll; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. ET-1. (Szokodi és mtsai, 2008 alapján)

4.4.3.2. A PLC–PKC jelátviteli út szerepe

Az ET_A-receptor a G α_{q11} -fehérjén keresztül képes aktiválni a PLC–PKC kaszkádot szívizomsejtekben (Sugden, 2003; Brunner és mtsai, 2006). A PKC-nek a korábbi tanulmányok alapvető szerepet tulajdonítottak az ET-1 pozitív inotrop hatásának a közvetítésében (Krämer és mtsai, 1991; Chu és mtsai, 2003; Zolk és mtsai, 2004). Továbbá ismert, hogy szívizomsejt-kultúrán az ET-1 PKC-függő módon stimulálta az ERK1/2 foszforilációt (Bogoyevitch és mtsai, 1994). Patkány bal kamrai szövetminták Western-blot analízise szerint, az ET-1 (1 nmol/L) 10 perces infúziója nem serkentette a vizsgált PKC-izomformák (PKC α , PKC δ , és PKC ϵ) transzlokációját a citoplazmából a membránfrakcióba (41A. ábra). Annak eldöntésére, hogy a PKC mennyiben járul hozzá az ET-1 hatásához, a specifikus PKC-inhibitor GF-109203X-et (Toullec és mtsai, 1991)

alkalmaztuk. A GF-109203X (90 nmol/L) nem csökkentette az ET-1 hatását az ERK1/2 foszforilációra (41B. ábra), sőt mi több, nem befolyásolta az ET-1 pozitív inotrop effektusát sem ($P=NS$; 41C. ábra). Ezzel szemben, a PKC-t direkt aktiválni képes PMA (40 nmol/L) pozitív inotrop hatását markánsan gyengítette a GF-109203X ($6.4\pm 1.6\%$ vs. $29.2\pm 4.9\%$, PMA plusz GF-109203X vs. PMA; $n=4$; $P<0.01$). A PKC gátláshoz hasonlóan, a potens PLC-gátló U-7312213 (100 nmol/L) (Fulton és mtsai, 1996) sem volt képes befolyásolni az ET-1 hatását a kontrakciós erőre ($P=NS$; 41D. ábra). Ezen megfigyeléseink arra utalnak, hogy az ET-1 kontraktilitást fokozó hatása független a PLC–PKC jelátviteli útvonaltól.

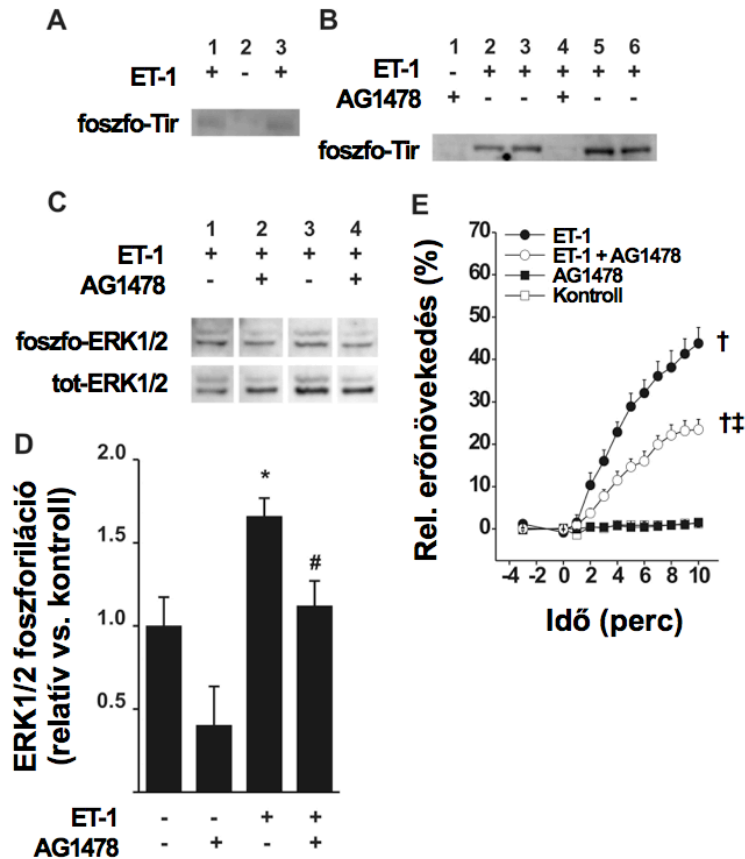


41. ábra: A PKC nem játszik szerepet az ET-1 pozitív inotrop hatásának a közvetítésében.

(A) Immunoblot analízisünk szerint, izolált patkányszíveken az ET-1 (1 nmol/L) nem fokozta a PKCα, a PKCδ, és a PKCε izoformák transzlokációját. (B) Western-blot analízis szerint, a PKC-inhibitor GF-109203X (90 nmol/L) nem védte ki az ET-1 hatását az ERK1/2 foszforilációra. (C-D) GF-109203X (C) és a PLC-inhibitor U-73122 (100 nmol/L) (D) nem befolyásolta az ET-1 pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag±S.E.M., $n=4-6$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. S: szolubilis citoplazma-frakció; M: membránfrakció; Kont: kontroll; Tot: totál. (Szokodi és mtsai, 2008 alapján)

4.4.3.3. Az EGFR-transzaktiváció szerepe

Ismert, hogy egyes GPCR-agonisták hipertrófiás hatását az epidermális növekedési faktor-receptor (EGFR) transzaktivációja közvetíti, következményes MAPK aktivációval szívizomsejteken (Thomas és mtsai, 2002). Elsőként arra kerestünk választ, hogy az ET-1 képes-e transzaktiválni az EGFR-t intakt szíven.



42. ábra: Az EGFR-transzaktiváció szerepet játszik az ET-1 pozitív inotrop hatásában.

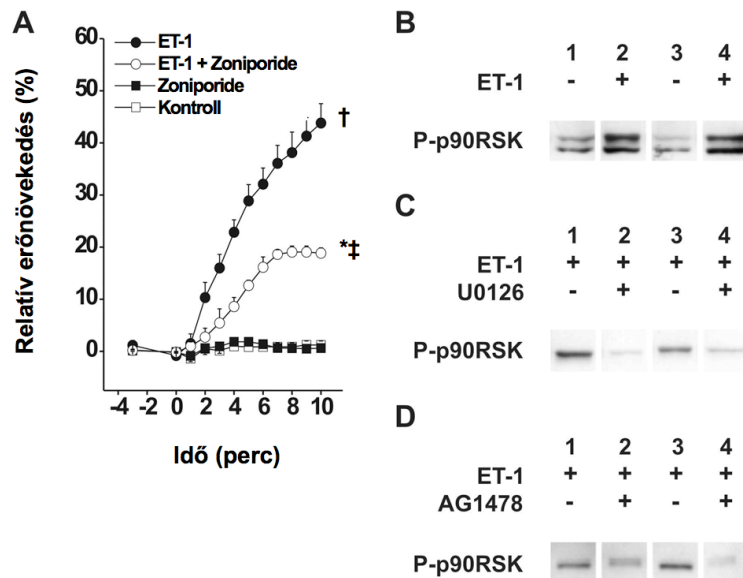
(A-B) Immunblot analízis szerint az izolált patkányszívek bal kamrai mintáiban az ET-1 (1 nmol/L) fokozta az EGFR tirozin foszforilációját (foszfo-Tir) (A), melyet az EGFR tirozinkináz gátló AG1478 (1 μ mol/L) kivédett (B). (C-D) Western-blot analízis szerint az AG1478 csökkentette az ET-1 hatását az ERK1/2 foszforilációra. Az összesített eredmények esetén a foszfo-ERK1/2 és a totál ERK1/2 (tot-ERK1/2) hányadosát tüntettük fel (átlag \pm S.E.M., n=3-6 szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * P <0.05 vs. kontroll; # P <0.05 vs. ET-1. (E) Az AG1478 szignifikánsan gyengítette az ET-1 pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., n=4-6 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. † P <0.001 vs. kontroll és AG1478; ‡ P <0.001 vs. ET-1. (Szokodi és mtsai, 2008 alapján)

Immunprecipitációt végeztünk EGFR ellenes antitesttel, majd az immunprecipitátumot foszfortirozin ellenes antitesttel immunblottoltuk, hogy meghatározzuk az EGFR foszforiláció mértékét. Az ET-1 (1 nmol/L) fokozta az EGFR tirozin foszforilációját a bal kamrai mintákon (42A. ábra), mely EGFR-transzaktivációra utal. Az EGFR tirozinkináz gátló AG1478 (1 μ mol/L) (Thomas és mtsai, 2002) kivédte az ET-1 kiváltotta EGFR tirozin foszforilációt (42B. ábra). Továbbá, az AG1478 szignifikáns mértékben csökkentette az

ET-1 indukálta ERK1/2 foszforilációt (42C-D. ábra), amely felveti, hogy az EGFR-transzaktiváció szükséges a MEK1/2–ERK1/2 kaszkád aktivációjához. Végezetül, az AG1478 46%-kal gyengítette az ET-1 pozitív inotrop választ ($P<0.001$; 42E. ábra). Az AG1478 önmagában nem befolyásolta a kontraktilitást ($P=NS$; 42E. ábra).

4.4.3.4. Az ERK1/2 potenciális célpontjai

Számos tanulmány bizonyította, hogy az ET-1 inotrop hatásához hozzájárul a NHE aktivációja (Krämer és mtsai, 1991; Wang és mtsai, 2000; Takeuchi és mtsai, 2001; Chu és mtsai, 2003; Zolk és mtsai, 2004). A korábbi eredményekkel összhangban, a szelektív NHE1-inhibitor zoniporide (1 $\mu\text{mol/L}$) (Knight és mtsai, 2001) szignifikáns mértékben, 57%-kal csökkentette az ET-1 inotrop hatását ($P<0.001$), míg önmagában adva nem volt hatással a kontrakciók erejére ($P=NS$; 43A. ábra).



43. ábra: A NHE1 szerepet játszik az ET-1 pozitív inotrop hatásának a közvetítésében.

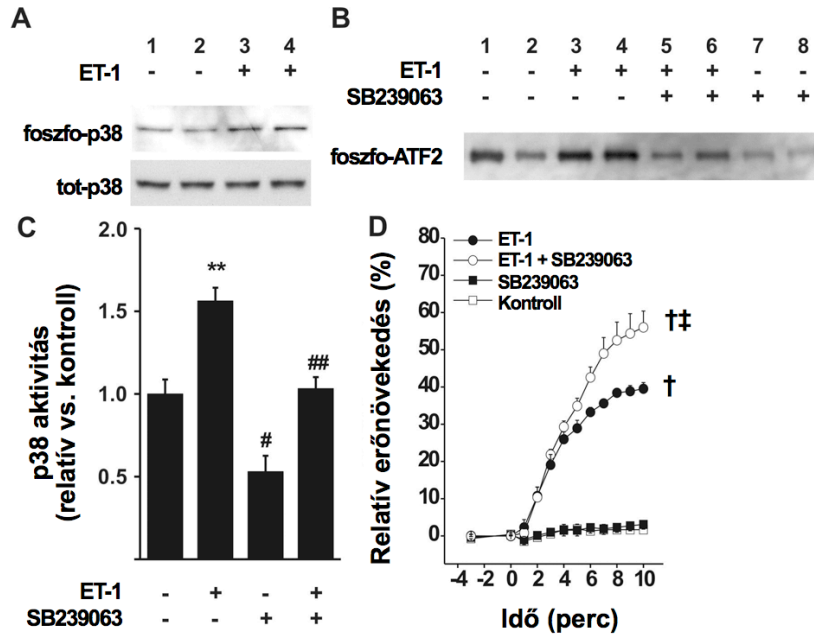
(A) A NHE1 inhibitor zoniporide (1 $\mu\text{mol/L}$) szignifikánsan gyengítette az ET-1 (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását izolált patkányszív-preparátumon. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., n=4-6 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P<0.01$, † $P<0.001$ vs. kontroll és zoniporide; ‡ $P<0.001$ vs. ET-1. (B-D) Western-blot analízis szerint az ET-1 fokozta a p90RSK bal kamrai foszforilációját (P-p90RSK) a membránfrakcióban (B), melyet az U0126 (C) és az AG1478 (D) kivédett. (Szokodi és mtsai, 2008 alapján)

Korábban kimutatták, 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). Amint a 43B. ábrán látható, az ET-1 fokozta a p90RSK foszforilációját a membránfrakcióban. Lényeges megjegyezni, hogy mind az U0126, mind az AG1478, szignifikáns mértékben csökkentette az ET-1 által kiváltott

p90RSK foszforilációt (43C-D. ábra), mely arra utal, hogy a p90RSK által aktivált NHE1 az EGFR–ERK1/2 jelátviteli rendszer disztális elemeként működhet.

4.4.3.5. A p38-MAPK szerepe

Korábban, szívizomsejt-kultúrán kimutatták, hogy az ET-1 jelentősen képes fokozni a p38-MAPK foszforilációját (Clerk és mtsai, 1998). Kísérleteinkben intakt szíven az ET-1 (1 nmol/L) 10 perces infúziója növelte a foszfo-p38-MAPK szintjét (44A. ábra).



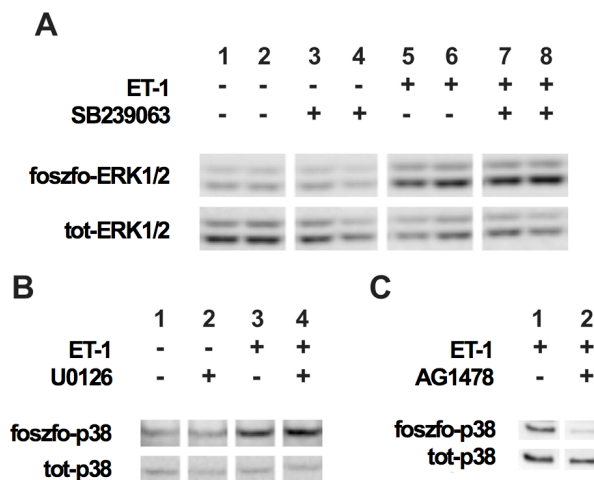
44. ábra: A p38-MAPK ellensúlyozni képes az ET-1 pozitív inotrop hatását.

(A) Western-blot analízis szerint, izolált patkányshíveken az ET-1 (1 nmol/L) fokozta a p38-MAPK foszforilációját. (B-C) Immunkomplex kináz assay-ben ATF-2-öt használtunk szubsztrátumként. A p38-MAPK-inhibitor SB239063 (3 μ mol/L) csökkentette az ET-1 hatását a p38-MAPK aktivitására. Az összesített eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=4 szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. ** P <0.01 vs. kontroll; # P <0.05, ## P <0.01 vs. ET-1. (D) Az SB239063 szignifikánsan fokozta az ET-1 pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., n=4-6 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. † P <0.001 vs. kontroll és SB239063; ‡ P <0.05 vs. ET-1. (Szokodi és mtsai, 2008 alapján)

A p38-MAPK szerepének tisztázására a potens, szelektív p38-MAPK-gátló SB239063-at használtuk (Barone és mtsai, 2001). Az inhibitor a p38-MAPK katalitikus aktivitását befolyásolja, ezért egy kináz assay segítségével igyekeztünk demonstrálni a vegyület gátló hatását saját kísérleti körülményeink között. Az immunkomplex kináz assay szerint az ET-1 növelte a p38-MAPK szubsztrátum ATF-2 foszforilációját, melyet az SB239063 (3 μ mol/L) kivédett (44B-C. ábra). Továbbá, az SB239063 szignifikánsan, 42%-kal fokozta az ET-1 inotrop hatását (P <0.05; 44D. ábra). Az inhibitor önmagában nem volt hatással a kontraktilitásra (P =NS; 44D. ábra).

4.4.3.6. Az ERK1/2 és a p38-MAPK szignalizáció egymásra hatása

Korábbi vizsgálatok szerint a p38-MAPK proteinfoszfatázokon keresztül gyengítheti az ERK1/2 foszforilációját (Liu és Hofmann, 2004). Intakt szíven a p38-MAPK gátlása SB239063-mal nem fokozta az ET-1 indukálta ERK1/2 foszforilációt (45A. ábra). Hasonló módon, az U0126 nem befolyásolta a p38-MAPK foszforilációját (45B. ábra). Megjegyzendő, hogy az AG1478 szignifikánsan csökkentette az ET-1 hatását a bal kamrai p38-MAPK foszforilációra (45C. ábra), amellet, hogy az ERK1/2 foszforilációját is befolyásolta (45D. ábra). Adataink arra utalnak, hogy az ERK1/2 és a p38-MAPK jelátvivők nem hatnak egymás aktivációjára. Ugyanakkor, az EGFR-transzaktiváció mindkét útvonal stimulációjában részt vesz.

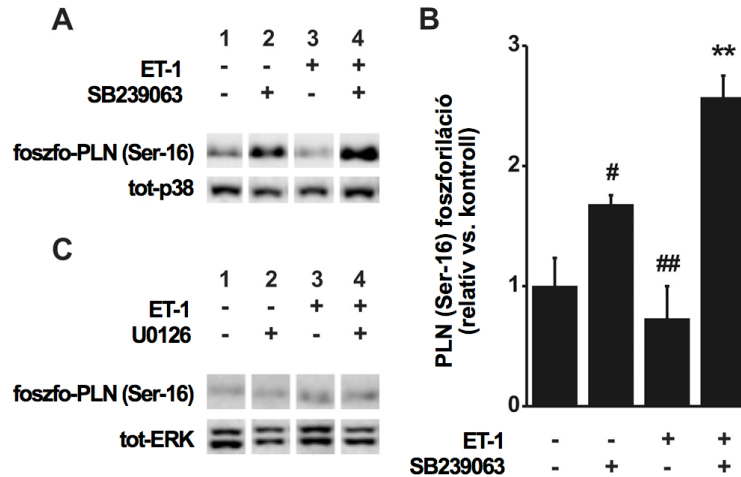


45. ábra: Az ERK1/2 és a p38-MAPK szignalizáció kapcsolata.

(A) Western-blot analízis szerint, izolált szíveken a p38-MAPK-t gátló SB239063 (3 $\mu\text{mol/L}$) nem befolyásolta az ET-1 (1 nmol/L) hatását az ERK1/2 foszforilációra. (B) Az ERK1/2 farmakológiai gátlása U0126 (1.5 $\mu\text{mol/L}$) révén nem módosította a foszfo-p38-MAPK szinteket. (C) Az EGFR-t gátló AG1478 (1 $\mu\text{mol/L}$) szignifikánsan csökkentette az ET-1 indukálta bal kamrai p38-MAPK foszforilációt. (Szokodi és mtsai, 2008 alapján)

4.4.3.7. A p38-MAPK potenciális célpontjai

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a p38-MAPK miként befolyásolja a PLN foszforilációját, mely a kontraktilitás egyik alapvető regulátora (MacLennan és Kranias, 2003). A p38-MAPK-t gátló SB239063 (3 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében az ET-1 (1 nmol/L) szignifikáns mértékben növelte a PLN foszforilációját a Ser-16 foszforilációs helyen, míg a peptid önmagában nem befolyásolta azt (46A-B. ábra). SB239063 egyedüli adagolásakor nem tapasztaltunk szignifikáns PLN foszforilációt ($P=0.115$; 46B. ábra). Továbbá, a MEK1/2-t gátló U0126 (1.5 $\mu\text{mol/L}$) nem módosította a PLN foszforiláltsági szintjét (46C. ábra). Adataink arra engednek következtetni, hogy a p38-MAPK gátlása a PLN foszforiláció fokozása révén képes felerősíteni az ET-1 pozitív inotrop hatását a szívizomban.



46. ábra: A p38-MAPK aktivációja szabályozza a foszfolamban foszforiláltsági szintjét.

(A) Western-blot analízis eredményei szerint a p38-MAPK-t gátló SB239063 (3 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében az ET-1 (1 nmol/L) szignifikánsan fokozta a PLN bal kamrai foszforilációját a Ser-16 foszforilációs helyen. (B) Az összesített eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=3-5 szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. ** $P<0.01$ vs. kontroll; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs. ET-1+SB239063. (C) Az U0126 (1.5 $\mu\text{mol/L}$) nem befolyásolta a PLN foszforilációját. (Szokodi és mtsai, 2008 alapján)

4.4.3.8. Az ET-1 hatása a vaszkuláris tónusra

Kiemelendő, hogy a kontraktilitásra gyakorolt hatástól eltérően, az ERK1/2 és a p38-MAPK gátlása nem befolyásolta az ET-1 vazokonstriktor effektusát (perfúziós nyomás a kezelés előtt vs. kezelés után: ET-1: 32.0 ± 1.8 vs. 38.8 ± 3.3 Hgmm, $20.6\pm 3.4\%$ -os növekedés; ET-1 plusz U0126: $16.8\pm 2.7\%$ -os növekedés; ET-1 plusz SB239063: $18.7\pm 3.8\%$ -os növekedés; $P=\text{NS}$). Korábbi megfigyelésekkel összhangban (McNair és mtsai, 2004), a PKC inhibitor GF-109203X és a PLC inhibitor U-73122 szignifikáns módon gyengítette az ET-1-okozta konstriktor hatást (ET-1: 32.4 ± 1.0 vs. 40.3 ± 2.0 Hgmm, $23.9\pm 2.8\%$ -os növekedés; ET-1 plusz GF-109203X: $6.0\pm 1.4\%$ -os növekedés, $P<0.001$; ET-1 plusz U-73122: $13.8\pm 1.1\%$ -os növekedés, $P<0.01$). Az egyéb inhibitorok nem rendelkeztek érdemi hatással ($P=\text{NS}$).

4.4.3.9. ERK1/2 és p38-MAPK: a kontraktilitás prominens modulátorai

Tradicionalis nézet szerint az ET-1 kötődése az ET_A-receptorokhoz aktiválja a G $\alpha_{q/11}$ -fehérjét, mely a PLC–PKC kaskádöt működésbe hozva növeli a szívizomsejtek kontraktilis erejét (Krämer és mtsai, 1991; Chu és mtsai, 2003; Zolk és mtsai, 2004; Sugden, 2003; Brunner és mtsai, 2006). Izolált patkányszíven tett megfigyeléseink nem támogatják ezt az elképzelést. A PLC és a PKC gátlása nem csökkentette az ET-1 inotrop effektusát. Továbbá, a kontraktilitás szempontjából releváns PKC izoformák (PKC α , δ , és ϵ) transzlokációja nem változott a peptid hatására (Szokodi és mtsai, 2008).

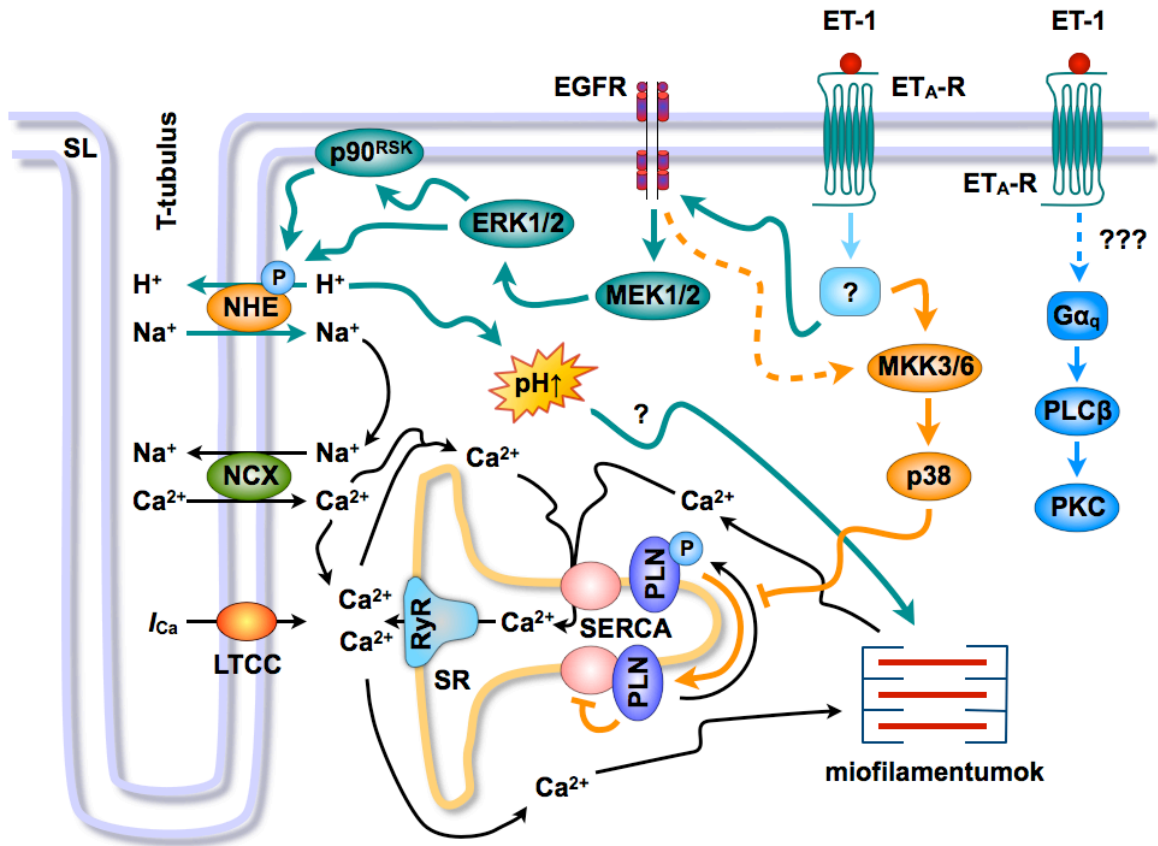
Eredményeink a PLC–PKC jelátviteli útvonallal szemben, a MEK1/2–ERK1/2 kaszkád jelentőségére hívták fel a figyelmet (47. ábra). A MEK1/2–ERK1/2 jelátviteli rendszer alapvető szerepet tölt be a szívizom stresszel szembeni adaptációjában (Bueno és Molckentin, 2002; Rose és mtsai, 2010). Az iszkémia-reperfúzió okozta károsodást az ERK1/2 aktiváció az apoptózis csökkentése révén enyhíti *in vivo* (Lips és mtsai, 2004). Továbbá, az aktivált MEK1 szívizom-specifikus overexpressziója mérsékelt fokú koncentrikus bal kamrai hipertrófiát és fokozott pumpafunkciót eredményez, az állatok hosszú távon sem mutatnak szívelégtelenségre utaló jeleket (Bueno és mtsai, 2000). Összhangban ezen észlelésekkel, a Raf-1 domináns negatív formájának expressziója a szívben gátolja az ERK1/2 aktivációját nyomásterhelés során, ami súlyos fokú szívelégtelenség kialakulásával jár, csökkent szívhipertrófia és fokozott apoptózis mellett (Harris és mtsai, 2004). A közelmúltban az ERK1/2 szerepét közvetlenül vizsgálták ERK1 (*Erk1^{-/-}*) illetve ERK2 génhányos egerekben (*Erk2^{+/-}*). Tartós bal kamrai nyomásterhelés e modellekben ugyan nem befolyásolta a hipertrófia fokát, mégis súlyos szívelégtelenséget eredményezett markáns apoptózis kíséretében (Purcell és mtsai, 2007). Habár az említett transzgénikus állatokban a szisztolés funkció következetesen érintett volt, az ERK1/2 direkt szerepét a kontraktilitás regulációjában nem vetették fel. Intakt patkányszíven nyert eredményeink szerint, az ET-1 aktiválta az ERK1/2-t, továbbá a MEK1/2 farmakológiai gátlása jelentősen csökkentette a peptid pozitív inotrop hatását. Adataink bizonyítékul szolgáltak, hogy az ERK1/2 a sejttúlélés folyamatainak szabályozása mellett fontos szerepet tölt be a szívizom-kontraktilitás regulációjában is (Szokodi és mtsai, 2008).

Számos GPCR agonista az EGFR-transzaktiváció mechanizmusán keresztül képes aktiválni az ERK1/2-t (Thomas és mtsai, 2002). A GPCR stimuláció aktiválja a metalloproteinázokat, melyek a proheparin-kötő EGF-ből (*proheparin-binding EGF*, pro-HB-EGF) hasítják le a HB-EGF molekulát. Az extracellulárisan felszabaduló HB-EGF aktiválja az EGFR-t, mely a Ras–Raf1–MEK1/2 kaszkádon keresztül serkenti az ERK1/2 foszforilációját (Wetzker és Böhmer, 2003). A HB-EGF-hasítás illetve az EGFR-transzaktiváció gátlása csökkentette a GPCR agonisták okozta bal kamrai hipertrófiát és szisztolés funkciózavart *in vivo* (Asakura és mtsai, 2002). Másrészt, a HB-EGF-et kódoló gén célzott deléciója súlyos kamrai dilatációval és a pumpafunkció romlásával járt (Iwamoto és mtsai, 2003). Továbbá, az EGFR-t gátló daganatellenes szer, az erlotinib, bal kamrai tágulatot és szisztolés diszfunkciót provokált krónikus β -AR stimuláció során (Noma és mtsai, 2007). Eredményeink elsőként mutattak rá, hogy az EGFR-transzaktiváció közvetlen szerepet játszik a szívizom-kontraktilitás szabályozásában. Kísérleteinkben az ET-1 fokozta az EGFR-transzaktivációt, mely folyamat farmakológiai gátlása csökkentette az ET-1 hatását az ERK1/2 foszforilációra és a kontraktilitásra. Összegezve, megfigyeléseink szerint az EGFR-transzaktiváció a MEK1/2–ERK1/2 jelpálya befolyásolása révén serkenti a szívizom-kontraktilitást (Szokodi és mtsai, 2008).

Korábbi tanulmányokkal összhangban (Krämer és mtsai, 1991; Wang és mtsai, 2000; Takeuchi és mtsai, 2001; Chu és mtsai, 2003; Zolk és mtsai, 2004), a NHE gátlása részlegesen csökkentette az ET-1 inotrop hatását. Az ERK1/2 közvetlenül (Moor és Fliegel, 1999), illetve a p90RSK-n keresztül (Takahashi és mtsai, 1999) képes fokozni a NHE C-terminális regulátoros doménjének a foszforilációját. Vizsgálataink során az ET-1 fokozta a foszforilált p90RSK mennyiségét a membránfrakcióban. Kiemelendő, hogy az ET-1 hatását a p90RSK foszforilációra az EGFR illetve a MEK1/2 gátlása hasonló mértékben csökkentette. Mindezek fényében valószínűsíthető, hogy ET-1 stimuláció során az EGFR–ERK1/2 jelátviteli rendszer a p90RSK révén szabályozza a NHE1 működését (47. ábra) (Szokodi és mtsai, 2008).

A p38-MAPK aktivációját a szívben számos patológiás folyamattal hozták összefüggésbe, mint a szívizomsejtek hipertrófiája, az extracelluláris mátrix átépülése illetve a sejthalál szabályozása (Rose és mtsai, 2010). Ezzel szemben, kevés adattal rendelkezünk a p38-MAPK fiziológias szerepéről. Az MKK3bE enzim overexpressziója fokozta a p38-MAPK aktivitást, valamint csökkentette a kontrakciós erőt patkány eredetű izolált szívizomsejteken. Ennek megfelelően, az endogén p38-MAPK aktivitás farmakológiai gátlásával pozitív inotrop hatást váltottak ki (Liao és mtsai, 2002). Jelen kísérleteinkben az ET-1 stimuláció szignifikánsan növelte a p38-MAPK aktivitását intakt szíven. SB239063, az enzim specifikus gátlószere, erőteljesen növelte az ET-1 inotrop hatását, míg a gátlószer önmagában nem befolyásolta a kontraktilis erőt. Adataink arra utalnak, hogy az izolált szív modellben a p38-MAPK bazális aktivitása nem elegendő a kontraktilitás módosításához, azonban az enzim fiziológias aktivációja ellensúlyozni képes az ET-1 pozitív inotrop hatását (Szokodi és mtsai, 2008). Eredményeink összhangban állnak egér eredetű izolált szívizomsejteken tett megfigyelésekkel, melyek szerint a p38-MAPK farmakológiai gátlása erőteljesen fokozta a β_2 -AR stimulációkor fellépő kontraktilitás fokozódást (Zheng és mtsai, 2000).

Annak dacára, hogy számos vizsgálat jutott arra a következtetésre, hogy a p38-MAPK a kontraktilitás fontos szabályozója lehet (Zheng és mtsai, 2000; Liao és mtsai, 2002; Bellahcene és mtsai, 2006), az effektus háttérében álló molekuláris mechanizmusok nagyrészt tisztázatlanok. Korábban a p38-MAPK-ról feltételezték, hogy a proteinfoszfatazok révén képes elnyomni az ERK1/2 aktivációját izolált szívizomsejteken (Liu és Hofmann, 2004). Adataink ezzel szemben azt mutatták, hogy a p38-MAPK gátlása nem erősítette 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 (Szokodi és mtsai, 2008).



47. 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. (Szokodi és mtsai, 2008 ; Perjés és mtsai, 2012 alapján)

Az adenzin A₁-receptorok izgalma a p38-MAPK-on keresztül képes tompítani a β-AR stimuláció hatását a PLN foszforilációjára (Liu és Hofmann, 2003). Vizsgálataink fontos megfigyelése volt, hogy az ET-1 jelentősen növelte a PLN foszforilációját a Ser-16 pozícióban p38-MAPK gátlása esetén (Szokodi és mtsai, 2008). A PLN foszforiláció felfüggeszti a SERCA2a gátlását, a SR-ban raktározott Ca²⁺ mennyisége emelkedik, mely másodlagosan a kontraktilis erő növekedéséhez vezet (MacLennan és Kranias, 2003). Kézenfekvő magyarázatnak tűnik, hogy a p38-MAPK a PLN fehérje defoszforilációja révén képes ellensúlyozni az ET-1 kontraktilitást növelő hatását (47. ábra). A közelmúltban számoltak be arról, hogy az MKK6bE transzgenikus egerekben a p38α-MAPK krónikus aktivációja gyengült szarkomerfunkcióval párosul, melyért feltehetőleg az α-tropomiozin csökkent foszforilációja felelős (Vahebi és mtsai, 2007). További vizsgálatok

szükségesek annak tisztázására, hogy a p38-MAPK akutan is képes-e befolyásolni a miofilamentumok működését.

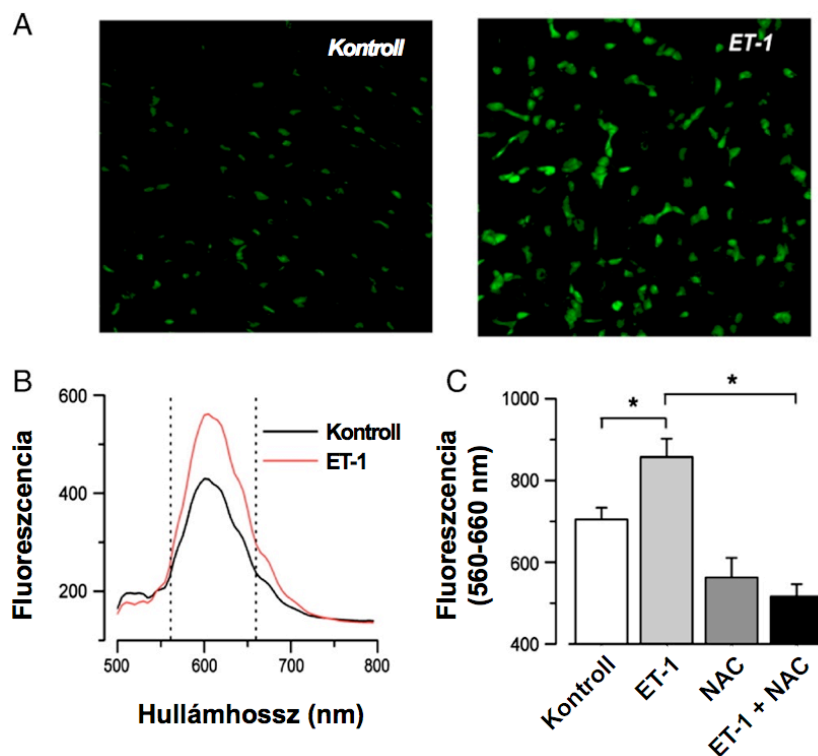
Fiziológias viszonyok között a p38-MAPK dinamikus, átmeneti aktivációja jelentős védő szerepet tölthet be a szívben a túlzott inotrop stimulusok ellensúlyozása révén. A p38 α -MAPK, az MKK3 illetve az MKK6 domináns negatív mutáns változatát kifejező egerekben a miokardiális p38-MAPK jelátvitel krónikus gátlása során feltehetőleg elvész ez a védő mechanizmus, mely hozzájárulhat a transzgénikus modellekben a szívelégtelenség spontán kifejlődéséhez (Braz és mtsai, 2003). Ezzel ellentétben, a p38-MAPK hosszan fennálló, jelentős aktivációja a romló kontraktilitás miatt szintén szívelégtelenséghez vezethet, mint azt az MKK3bE vagy az MKK6bE szívizom-specifikus expressziója esetén tapasztalták (Liao és mtsai, 2001). Ezért a kamrafunkció a p38-MAPK aktivitás normalizálásával javulhat a károsodott szívben.

Összegezve, vizsgálataink igazolták, hogy az ERK1/2 és a p38-MAPK fontos szerepet tölt be a kontraktilitás akut szabályozásában felnőtt patkányszívben. Eredményeink felfedték, hogy a MAPK-ok ellentétes hatást gyakorolnak a kontraktilis erőre. Míg az ERK1/2 az ET-1 inotrop effektusát közvetíti, addig a p38-MAPK szimultán aktivációja ellensúlyozza a kontrakciós erő növekedését. Kimutattuk, hogy az ERK1/2-t az EGFR aktiválja, míg az ERK1/2 feltehetőleg a p90RSK–NHE1 útvonalon keresztül fokozza a kontraktilitást. Továbbá, a p38-MAPK a SERCA funkcióját szabályozó PLN defoszforilációja révén csökkentheti a kamrai kontrakciós erőt. Eredményeink felvetik, hogy a MEK1/2–ERK1/2 jelátviteli rendszer aktiválása, illetve a p38-MAPK gátlása a szívizom-kontraktilitás fokozásának új útjait jelenthetik (47. ábra).

4.4.4. A ROS szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának szabályozásában

4.4.4.1. Az ET-1 hatása az intracelluláris ROS termelődésre

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az ET-1 fokozza a reaktív oxigén származékok termelődését patkány, egér és macska eredetű szívizomsejteken (Tanaka és mtsai, 2001; Cingolani és mtsai, 2006; Dong és mtsai, 2006; De Giusti és mtsai, 2008). Elsőként arra kerestünk választ, hogy az ET-1 miként hat a ROS termelődésre izolált patkányszív-preparátumon. A dihidroetidium etidiummá történő ROS-függő oxidációját vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkópia segítségével fagyasztott bal kamrai metszeteken (Sovershaev és mtsai, 2006). Azok a szívek, melyeket előzetesen 1 nmol/L ET-1-gyel kezeltünk dihidroetidium (10 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében, szignifikánsan intenzívebb etidium fluoreszcenciát mutattak, mint a kontroll szívek ($P < 0.01$; 48A-C. ábra). Továbbá, az antioxidáns N-acetilcisztein (500 $\mu\text{mol/L}$) (Cheng és mtsai, 1999) kivédte az ET-1 hatását az etidium fluoreszcenciára ($P < 0.01$). A gyökfogó vegyület önmagában történő alkalmazásakor mérsékelten csökkent a bazális fluoreszcens intenzitás ($P < 0.05$; 48C. ábra).

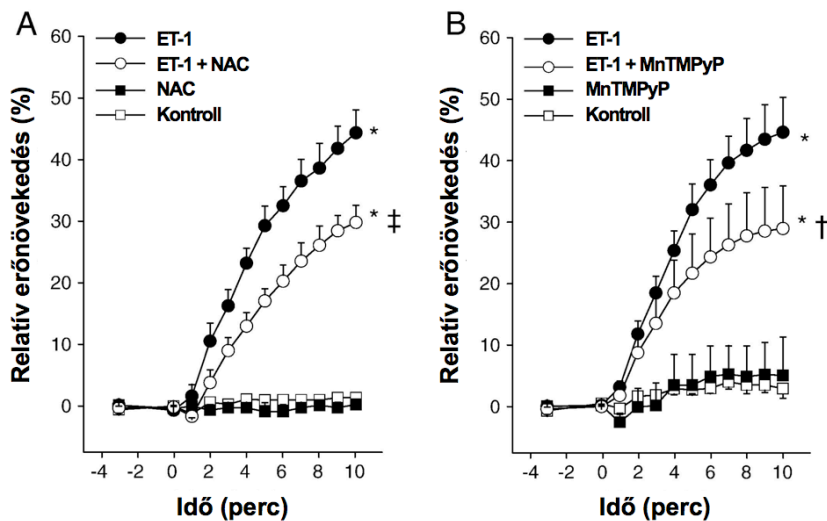


48. ábra: Az ET-1 fokozza a ROS termelődést izolált patkányszíven.

(A) A ROS termelődés mértékét az etidium fluoreszcencia méréssel ítéltük meg konfokális mikroszkópia segítségével. A reprezentatív képeken látható, hogy a dihidroetidiummal (10 $\mu\text{mol/L}$) jelölt, ET-1-gyel (1 nmol/L) kezelt szív erőteljesebb etidium fluoreszcenciát mutat, mint a kontroll. (B) A metszeteket 488 nm-en ingereltük, a festék által kibocsátott fényt az 560-660 nm közötti tartományban mértük, melyet a szaggatott vonalak közötti terület mutat. (C) Az antioxidáns N-acetilcisztein (500 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében az ET-1 nem volt képes fokozni az etidium fluoreszcenciát. A sejtmagokban mért etidium fluoreszcencia (560-660 nm) átlagolt eredményeit átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=4 szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.01$. (Kubin és mtsai, 2011 alapján)

4.4.4.2. A ROS szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében

A további kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az ET-1-okozta fokozott ROS termelődés miként befolyásolja a peptid inotrop hatását. Izolált patkányszív preparátumon az ET-1 (1 nmol/L) 10 perces infúziója $44 \pm 4\%$ -kal növelte a kontraktilis erőt (49A. ábra). Az antioxidáns N-acetilcisztein (500 $\mu\text{mol/L}$) 33%-kal ($P < 0.001$; 49A. ábra), a SOD-mimetikum MnTMPyP (10 $\mu\text{mol/L}$) (Amin és mtsai, 2001) 35%-kal csökkentette az ET-1 inotrop hatását ($P < 0.05$; 49B. ábra). Az N-acetilcisztein és az MnTMPyP önmagában nem volt hatással a bazális kontraktilitásra ($P = \text{NS}$; 49A-B. ábra)

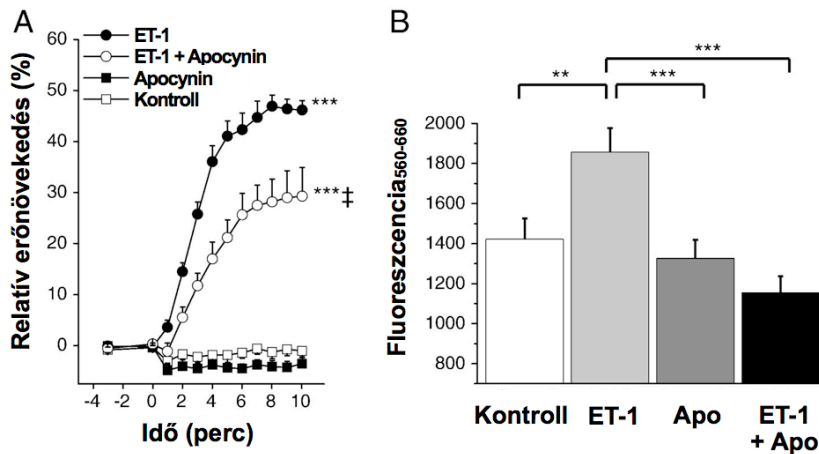


49. ábra: A ROS termelődés fokozódása hozzájárul az ET-1 pozitív inotrop hatásához.

(A-B) Izolált patkányszív-preparátumon az antioxidáns N-acetilcisztein (NAC, 500 $\mu\text{mol/L}$) (A) és a SOD-mimetikum MnTMPyP (10 $\mu\text{mol/L}$) (B) szignifikánsan csökkentette az ET-1 (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M.; $n=3-7$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. * $P < 0.001$ vs. kontroll és NAC (A) ill. MnTMPyP (B); † $P < 0.05$, ‡ $P < 0.001$ vs. ET-1. (Kubin és mtsai, 2011 alapján)

4.4.4.3. A NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében

A szívizomban a $\text{O}_2^{\cdot-}$ fontos forrásai a NAD(P)H-oxidázok (Geiszt, 2006; Maejima és mtsai, 2011; Santos és mtsai, 2011). Korábban kimutatták, hogy az ET-1 képes aktiválni a NAD(P)H-oxidázt patkány eredetű szívizomsejt-tenyészetben (Yang és mtsai, 2005). A NAD(P)H-oxidázt gátló apocynin (100 $\mu\text{mol/L}$) (Dong és mtsai, 2006) 36%-kal csökkentette az ET-1 pozitív inotrop hatását ($P < 0.001$; 50A. ábra). Az inhibitor önmagában nem befolyásolta a kontraktilis erőt ($P = \text{NS}$; 50A. ábra). Konfokális vizsgálataink szerint az apocynin kivédte az ET-1-okozta növekedést az etidium fluoreszcenciában ($P < 0.001$), míg a gátlószer egyedül nem volt hatással a fluoreszcens intenzitásra ($P = \text{NS}$; 50B. ábra).

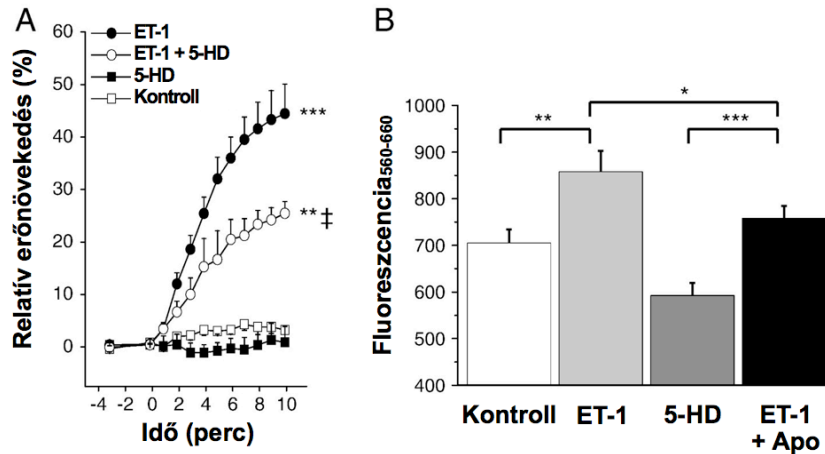


50. ábra: A NAD(P)H-oxidázok által termelt reaktív oxigén gyökök szerepet játszanak az ET-1 pozitív inotrop hatásában.

(A) Izolált patkányszív-preparátumon a NAD(P)H-oxidázt gátló apocynin (Apo, 100 $\mu\text{mol/L}$) gyengítette az ET-1 (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M.; n=6-9 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. *** P <0.001 vs. kontroll és apocynin; † P <0.001 vs. ET-1. (B) Az apocynin kivédte az ET-1 által indukált ROS termelődést. A sejtmagokban mért etidium fluoreszcencia (560-660 nm) átlagolt eredményeit átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=3-4 szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. ** P <0.01, *** P <0.001. (Kubin és mtsai, 2011 alapján)

4.4.4.4. A mitoK_{ATP}-csatornák szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásában

Ismert, hogy a mitokondriális ATP-függő K⁺-csatornák (mitoK_{ATP}) nyitásakor fokozódik a mitokondriális ROS termelés a miokardiumban (Pain és mtsai, 2000; Forbes és mtsai, 2001). A következőkben arra kerestünk választ, hogy ezen csatornák működése mennyiben befolyásolja az ET-1 inotrop hatását. A mitoK_{ATP}-csatornák nyitását gátló 5-HD (200 $\mu\text{mol/L}$) (Pain és mtsai, 2000) infúziója nem gyakorolt hatást a kontraktilis erőre (P =NS; 51A. ábra). Ugyanakkor, az 5-HD 43%-kal csökkentette az ET-1 hatását a 10 perces időpontban (P <0.001; 51A. ábra). Konfokális vizsgálataink alapján az 5-HD önmagában adva mérsékelte a fluoreszcens intenzitást (P <0.05), azonban az ET-1 az 5-HD jelenlétében is képes volt növelni az etidium fluoreszcenciát (P <0.05; 51B. ábra). A mitoK_{ATP}-csatornák mellett egyéb K⁺-csatornák jelentőségét is vizsgáltuk. A mitokondriális Ca²⁺ által aktivált K⁺-csatornák (BK_{Ca}) funkcióját paxillin (Cao és mtsai, 2005), míg a szarkolemmális ATP-függő K⁺-csatornák szerepét HMR-1098 (Gok és mtsai, 2006) segítségével kívántuk tisztázni. A paxillin (1 $\mu\text{mol/L}$) egyedül nem hatott a kontraktilitásra (P =NS), azonban az ET-1 inotrop effektusát szignifikáns módon, 41%-kal gyengítette (P <0.01). Ezzel szemben, a HMR-1098 (3 $\mu\text{mol/L}$) nem módosította az ET-1 hatását (P =NS). Eredményeink arra utalnak, hogy a mitoK_{ATP}-csatornák és a BK_{Ca}-csatornák nyitása szükséges a teljes inotrop válasz létrejöttéhez, azonban e hatás feltehetően független a mitokondriális ROS termelődéstől.

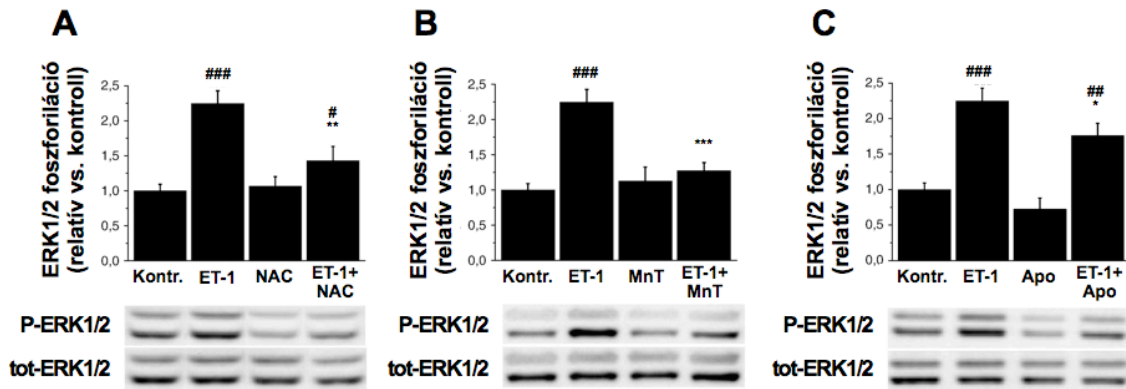


51. ábra: A mitoKATP-csatornák szerepe az ET-1 pozitív inotrop hatásában.

(A) Izolált patkányszív-preparátumon a mitoK_{ATP}-csatornák nyitását gátló 5-HD (200 μ mol/L) gyengítette az ET-1 (1 nmol/L) pozitív inotrop hatását. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M.; n=4-8 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. ** P <0.01, *** P <0.001 vs. kontroll és 5-HD; † P <0.01 vs. ET-1. (B) Az 5-HD nem volt képes kivédeni az ET-1 által indukált ROS termelődést. A sejtmagokban mért etidium fluoreszcencia (560-660 nm) átlagolt eredményeit átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=4 szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001. (Kubin és mtsai, 2011 alapján)

4.4.4.5. A ROS produkció és az ERK1/2 aktiváció kapcsolata

A 4.4.3.1. fejezetben ismertettük, hogy az ET-1 inotrop hatásának közvetítésében kiemelt szerepet játszik az ERK1/2. Szívizomsejt-kultúrán nyert adatok szerint az ERK1/2 foszforiláció redox-érzékeny (Tanaka és mtsai, 2001; Clerk és Sugden, 2006), ezért tisztázni kívántuk, hogy az enzim aktivációjában intakt szív esetében mekkora súllyal vesznek részt ROS-függő mechanizmusok. Az ET-1 (1 nmol/L) 10 perces infúziója erőteljesen emelte a bal kamrai foszfo-ERK1/2 szintet (P <0.001; 52A. ábra). Az ET-1-okozta ERK1/2 foszforiláció szignifikáns módon csökkent N-acetilciszteinnel (500 μ mol/L) (P <0.01), MnTMPyP-vel (10 μ mol/L) (P <0.001) illetve apocyninnal (100 μ mol/L) (P <0.05) történt kezelés során (52A-C. ábra). Az inhibitorok önmagukban nem befolyásoltak az ERK foszforiláltsági szintjét (P =NS; 52A-C. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy az ET-1 stimuláció során a termelődő szabadgyökök az ERK1/2 útvonal aktivációján keresztül fokozhatják a kontraktilis erőt.



52. ábra: Az ERK1/2 ROS-függő aktivációja.

(A-C) Western-blot analízis szerint az antioxidáns N-acetilcisztein (NAC, 500 μ mol/L) (A), a SOD-mimetikum MnTMPyP (MnT, 10 μ mol/L) (B) és a NAD(P)H-oxidáz-gátló apocynin (Apo, 100 μ mol/L) (C) szignifikánsan csökkentette az ET-1 indukálta ERK1/2 foszforilációt a bal kamrai mintákban. Az összesített eredmények esetén a foszfo-ERK1/2 (P-ERK1/2) és a totál ERK1/2 (tot-ERK1/2) hányadosát tüntettük fel (átlag \pm S.E.M.; n=4-9 szív csoportonként). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő LSD post hoc teszttel vizsgáltuk. # P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001 vs. kontroll; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs. ET-1. (Kubin és mtsai, 2011 alapján)

4.4.4.6. Az ET-1 hatása a vaszkuláris tónusra

Az izolált szívpreparátumon az ET-1 (1 nmol/L) 10 perces infúziója enyhén növelte a perfúziós nyomást (30.5 \pm 0.5-ről 35.3 \pm 1.4 Hgmm-re, 16.5%-os növekedés; P <0.05). Az 5-HD gyengítette (4.4%-os növekedés; P <0.05), míg a paxillin szignifikáns módon fokozta az ET-1 koronáriszűkítő hatását (32.0%-os növekedés; P <0.05). Az N-acetilcisztein, az MnTMPyP, az apocynin és a HMR-1098 nem befolyásolta érdemben az ET-1 hatását a perfúziós nyomásra (P =NS).

4.4.4.7. A ROS jelátviteli szerepe a kontraktilitás regulációjában

Tanulmányok sorozata igazolta, hogy a túlzott ROS termelés hozzájárul a szív szisztolés funkciózavarához iszkémiás-reperfúziós szívizom-károsodás során (Bollí és mtsai, 1989; Perez és mtsai, 1998; Asimakis és mtsai, 2002; Adlam és mtsai, 2005; Murphy és Steenbergen, 2008) és krónikus szívelégtelenség állapotában (Saavedra és mtsai, 2002; Grieve és mtsai, 2006; Giordano, 2005; Murdoch és mtsai, 2006). Másrészt, a ROS produkció kontrollált, átmeneti, mérsékelt fokozása védő hatást fejt ki a soron következő iszkémiás-reperfúziós inzultussal szemben (Chen és mtsai, 1995; Forbes és mtsai, 2001; Murphy és Steenbergen, 2008). Ettől eltérően, a ROS fiziológias szerepe a szívizomban kevésbé ismert. Eredményeink szerint a szabadgyök molekulák jelátvivőként részt vesznek a kontraktilitás akut regulációjában. Izolált patkányszíven az ET-1 fokozta a dihidroetidium etidiummá történő oxidációját (Kubin és mtsai, 2011), mely a O₂⁻ termelésről ad alapvetően felvilágosítást (Sovershaev és mtsai, 2006). Az antioxidáns N-acetilcisztein kivédte az ET-1 hatását a ROS termelésre. Továbbá, az N-acetilcisztein és a

SOD-mimetikum MnTMPyP szignifikánsan gyengítette az ET-1 pozitív inotrop hatását (Kubin és mtsai, 2011). Korábbi megfigyelések szerint, az exogén ET-1 kontraktilis erőt fokozó hatása szinte teljes mértékben kivédhető volt antioxidánsokkal macska eredetű szívizomsejteken (Cingolani és mtsai, 2006; De Giusti és mtsai, 2008). Ugyanezt a modellt használva kimutatták, hogy az Ang II adása fokozta az endogén ET-1 felszabadulását, mely a ROS termelődést stimulálva növelte a sejtek kontraktilis erejét (Cingolani és mtsai, 2006). A szívizomban a $O_2^{\cdot-}$ fontos forrásai a NAD(P)H-oxidázok (Geiszt, 2006; Maejima és mtsai, 2011; Santos és mtsai, 2011). Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ET-1 inotrop effektusában a NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS játszhat szerepet, mivel a NAD(P)H-oxidázt gátló apocynin párhuzamosan csökkentette az ET-1 hatását a kontraktilitásra és a ROS termelődésre (Kubin és mtsai, 2011). Az intakt patkányszíven nyert adatainkkal összhangban, a NAD(P)H-oxidáz farmakológiai gátlása kivédte az ET-1 inotrop hatását macskaszívből izolált kamrai izomsejteken (De Giusti és mtsai, 2008).

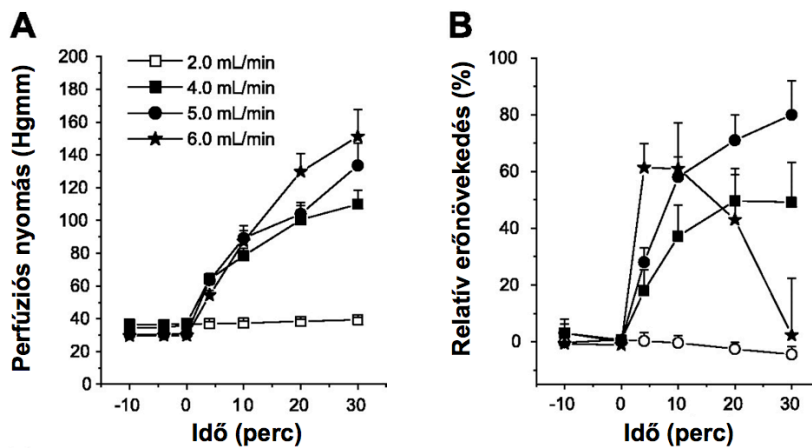
Ismert, hogy a NAD(P)H-oxidázok által termelt ROS a $mitoK_{ATP}$ -csatornák nyitása révén további ROS felszabadulását stimulálhatja a mitokondriumokból (Kimura és mtsai, 2005). A $mitoK_{ATP}$ -csatornák fontos védő szerepet játszanak a szívizomban az iszkémiás-reperfúziós károsodással szemben (Pain és mtsai, 2000; Forbes és mtsai, 2001; Murphy és Steenbergen, 2008). Ugyanakkor, ezen csatornák fiziológias funkciója kevésbé tisztázott. Izolált patkányszíven a $mitoK_{ATP}$ -csatornák nyitását gátló 5-HD jelentősen gyengítette az ET-1 pozitív inotrop hatását, ugyanakkor a peptid az 5-HD jelenlétében is képes volt szignifikáns módon fokozni a ROS termelést. Adataink arra utalnak, hogy a $mitoK_{ATP}$ -csatornák a ROS-tól független mechanizmusokon keresztül befolyásolják a kontraktilis erőt (Kubin és mtsai, 2011). Izolált kamrai izomsejteken a nem szelektív K_{ATP} -csatorna gátló glibenklamid kivédte az ET-1 hatását mind a kontraktilitásra, mind a $O_2^{\cdot-}$ termelésre. Ugyanakkor, az 5-HD csupán az ET-1 pozitív inotrop effektusát gyengítette, a ROS produkciót nem befolyásolta szignifikáns módon (De Giusti és mtsai, 2008). A közelmúltban demonstrálták, hogy a $mitoK_{ATP}$ -csatornák gátlása esetén a szív nem volt képes megfelelően reagálni különféle típusú inotrop stimulusokra (dobutamin, ouabain és magas perfuzátum Ca^{2+} -koncentráció) (Garlid és mtsai, 2006). Azt feltételezték, hogy a $mitoK_{ATP}$ -csatornák nyitásakor a mitokondrium belseje felé irányuló K^+ -áram megakadályozza a mitokondriális mátrix stressz okozta zsugorodását, valamint a külső és a belső membrán közötti tér expanzióját. Mindez fontos a mitokondrium és a citoplazma közötti hatékony energiatranszfer fenntartásában (Garlid és mtsai, 2006). A mitokondriális mátrix felé irányuló K^+ -áramok fontosságára utal azon megfigyelésünk is, hogy a mitokondriális BK_{Ca} -csatornát gátló paxillin szignifikánsan gyengítette az ET-1 inotrop hatását, míg a szarkolemmális ATP-függő K^+ -csatornák gátlása nem befolyásolta azt (Kubin és mtsai, 2011).

A korábban ismertetettek szerint a MEK1/2–ERK1/2–p90RSK–NHE kaszkád alapvető szerepet tölt be az ET-1 pozitív inotrop hatásának közvetítésében (Szokodi és mtsai, 2008). Jelen adataink arra engednek következtetni, hogy az ERK1/2 aktivációja döntően ROS-érzékeny, mivel az N-acetilcisztein, az MnTMPyP és az apocynin is szignifikánsan csökkentette az ET-1-indukálta ERK1/2 foszforilációt (Kubin és mtsai, 2011). Korábbi eredményeink szerint az ET-1 az EGFR transzaktiváció révén váltja ki az ERK1/2 jelátviteli aktivációját (Szokodi és mtsai, 2008). A ROS termelődés fokozódása inaktíválhatja a protein-tirozin foszfatázokat és így módon emelkedhet az EGFR tirozin foszforilációja. Az aktivált EGFR a Ras jelátvitelén keresztül aktiválhatja a MEK1/2–ERK1/2 kaszkádot (Wetzker és Böhmer, 2003; Clerk és Sugden 2006). Továbbá, a szabadgyökök közvetlenül is aktiválhatják a Ras-t a redox-érzékeny ciszteinek (elsősorban a Cys118) módosítása révén (Pimentel és mtsai, 2006; Clerk és Sugden, 2006; Perjés és mtsai, 2012). További kísérletek szükségesek annak tisztázására, hogy az ERK1/2 aktivációja milyen ROS-függő mechanizmusokon keresztül jön létre.

Számos kísérletes eredmény támogatja azt a hipotézist, hogy az endogén ROS termelődés fontos regulátora lehet a szívizom-kontraktilitásnak fiziológiás viszonyok között. Az endogén ROS produkció fokozódása befolyásolja az ET-1 (Cingolani és mtsai, 2006; De Giusti és mtsai, 2008; Kubin és mtsai, 2011) és a β -AR stimuláció pozitív inotrop effektusát (Mak és Newton, 2001; Kubin és mtsai, 2011; Andersson és mtsai, 2011), az Ang II (Palomeque és mtsai, 2006), a leptin (Dong és mtsai, 2006), és a TGF- β_1 negatív inotrop hatását (Li és mtsai, 2008). Az antioxidáns vegyületekkel folytatott klinikai tanulmányok ezidáig csalódást okoztak, a ROS termelődés csökkentése nem javította a szív pumpafunkcióját szívelégtelenségben (Yusuf és mtsai, 2000; Devaraj és Jialal, 2005; Hare és mtsai, 2008). A ROS szerepének felismerése a szív kontraktilis erejének szabályozásában fiziológiás viszonyok között, magyarázatot adhat, számos egyéb tényező mellett, az antioxidáns vegyületekkel folytatott kezelés sikertelenségére. A fiziológiás folyamatok alaposabb megismerése hatékonyabb terápiák kifejlesztéséhez vezethet el (Perjés és mtsai, 2012).

4.4.5. Az endogén ET-1 szerepe a Gregg-effektus szabályozásában

A következő kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy az endogén ET-1 és az Ang II szerepet játszik-e a kontraktilitás akut szabályozásában. NMRI egértörzset vizsgálva, izolált szíven a 2 mL/perces bazális koronáriaáramlás 4, 5 illetve 6 mL/percre történő növelése a 53A. ábrán bemutatottak szerint emelte a perfúziós nyomást. Az áramlás 5 mL/percre történő emelése fokozta a legnagyobb mértékben a kamrai kontraktilitást (53B. ábra), ezért ezt a stimulust alkalmaztuk a további vizsgálataink során.

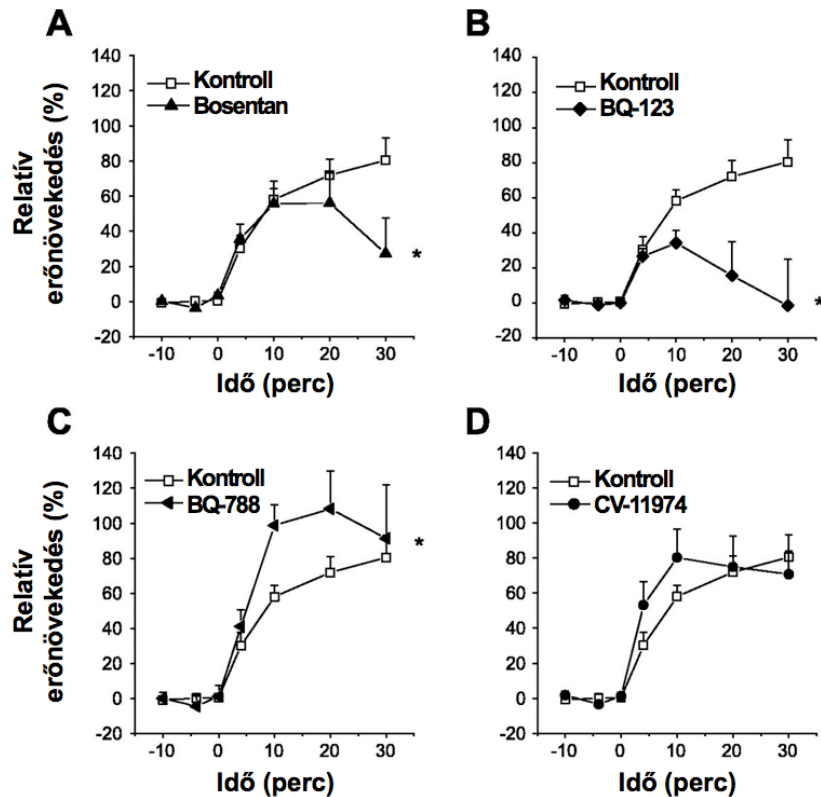
**53. ábra: A Gregg-effektus izolált egérszíven.**

A perfúziós nyomás (A) és a kontraktilis erő változása (B) a koronáriaáramlás 2 mL/percről 4, 5, illetve 6 mL/percre történő emelésekor. Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formátumban adtuk meg (n=5-13 szív csoportonként). (Piuholá és mtsai, 2003a alapján)

A bazális áramlás mellett az ET_A/ET_B-receptor-gátló bosentan (1 μ mol/L), az ET_A-receptor-gátló BQ-123 (100 nmol/L), az ET_B-receptor-gátló BQ-788 (100 nmol/L), és az AT₁-receptor-antagonista CV-11974 (10 nmol/L) nem befolyásolta a kontraktilitást. A koronáriaáramlás 2 mL/percről 5 mL/percre történő emelése 80 \pm 12%-kal (P <0.001) növelte a kontrakciók erejét (54. ábra). Az ET_A/ET_B-receptor-antagonista 34%-kal (P <0.05) gyengítette az áramlás fokozására adott kontraktilis választ (54A. ábra). Az ET_A-receptorok gátlása 56%-kal (P <0.05) csökkentette, míg az ET_B-receptorok blokkolása 35%-kal (P <0.05) fokozta a Gregg-effektust (54B-C. ábra). Az ET-receptoroktól eltérően az AT₁-receptorok gátlása nem befolyásolta a kontraktilis erő növekedését (P =NS; 54D. ábra). A perfúziós nyomás 99 \pm 5 Hgmm-re nőtt a koronáriaáramlás 5 mL/percre történő emelése során (P <0.001). A perfúziós nyomás hasonló módon növekedett a különböző receptorblokkolók adagolásakor, egyedül az ET_B-receptor-antagonista alkalmazásakor tapasztaltunk enyhe, átmeneti emelkedést (P <0.05).

Összefoglalva, kísérleteinkben kimutattuk, hogy az endogén ET-1 kiemelt szerepet játszik a Gregg-effektus közvetítésében izolált egérszíven. Eredményeink szerint az ET_A- és az ET_B-receptorok ellentétesen befolyásolták a kontraktilis erőt. Míg az ET_A-receptorok gátlása esetén elmaradt a koronáriaáramlás emelését követő kontrakciós erő fokozódás, addig az ET_B-receptorok blokkolása jelentősen fokozta a Gregg-effektust (Piuholá és mtsai, 2003a). Jelen adataink egybecsengenek az exogén ET-1 adagolása során tapasztaltakkal az ET-receptorok kettős szerepét illetően (4.4.1. fejezet). Az ET-1-től eltérően, az Ang II az AT₁-receptorokon keresztül nem befolyásolta a Gregg-effektus kialakulását. Az érendothelium ET_B-receptorainak stimulációja NO felszabadulást vált ki (Hirata és mtsai, 1993). A 4.4.2. fejezetben ismertettük, hogy a NOS farmakológiai úton történő gátlása felerősíti az ET-1 pozitív inotrop effektusát. Elképzelhető, hogy a Gregg-hatást az ET_B-receptorok az NO termelés fokozása révén befolyásolják. Az ET_B-

receptorok hozzájárulnak az ET-1 plazmából történő eltávolításához (Fukuroda és mtsai, 1994). Az ET_B-receptorok blokkolása fokozhatja az ET-1 kötődését az ET_A-receptorokhoz, mely ily módon növelheti a Gregg-effektust.

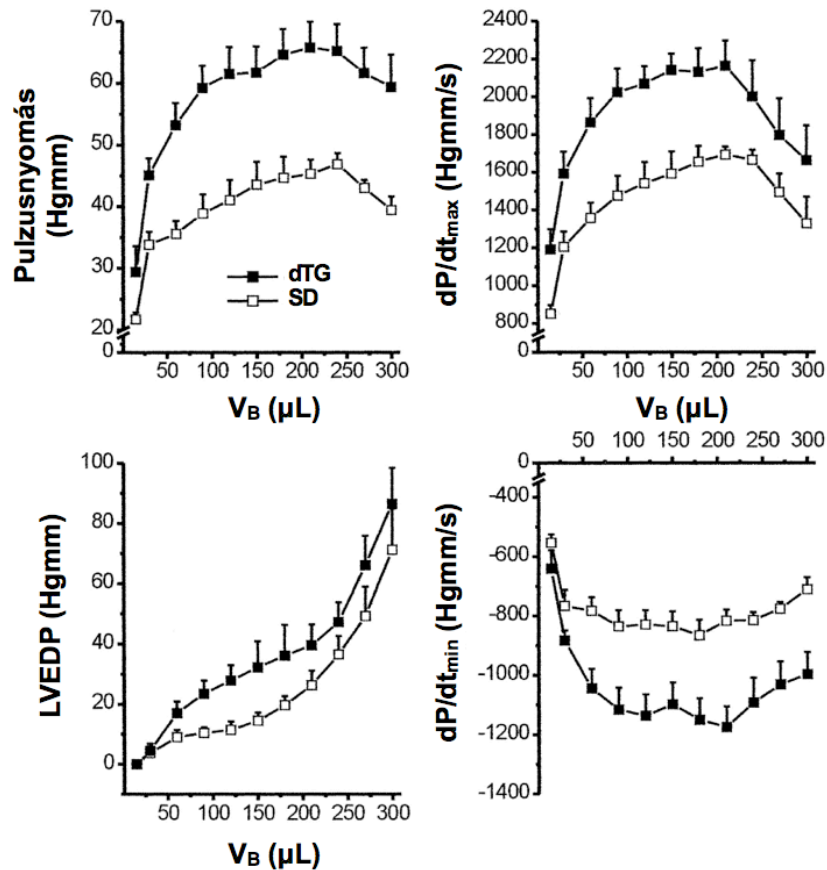


54. ábra: Az endogén ET-1 szerepe a Gregg-effektus létrehozásában.

Izolált egérszív preparátumon a koronáriaáramlást 2mL/percről 5 mL/percre növeltük, a kontraktilis erő változását **(A)** az ET_A/ET_B-receptor-antagonista-gátló bosentan (1 μmol/L); **(B)** az ET_A-receptor-gátló BQ-123 (100 nmol/L); **(C)** az ET_B-receptor-gátló BQ-788 (100 nmol/L); és **(D)** az AT₁-receptor-antagonista CV-11974 (10 nmol/L) jelenlétében vizsgáltuk. Az antagonisták infúzióját 10 perccel az áramlás megemlése előtt indítottuk. Az ábra a kontrakciós erő változását az alapértékekhez viszonyítva mutatja (átlag±S.E.M., n=5-12 szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. **P*<0.05 vs. kontroll. (Piuholá és mtsai, 2003a alapján)

4.4.6. Az endogén ET-1 szerepe a Frank-Starling-válasz szabályozásában

A következőkben tisztázni kívántuk, hogy az endogén ET-1 és az Ang II szerepet játszik-e a Frank-Starling-válasz kialakításában fiziológias illetve patológias viszonyok között. Vizsgálatainkat hipertenzív dTG és normotenzív SD patkányok szíven végeztük *ex vivo*.



55. ábra: Frank-Starling-válasz SD és dTG patkányszív-preparátumon.

Izolált szívpreparátumon az intraventriculáris ballon térfogatának (V_B) lépcsőzetes növelése során követték a pulzusnyomás, a dP/dt_{max} , a dP/dt_{min} , és a bal kamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP) változását. Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel ($n=7-8$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-val vizsgáltuk. Minden vizsgált paraméter szignifikáns különbséget ($P<0.01$) mutatott a két csoport között. (Piuhola és mtsai, 2003b alapján)

A tartósan fennálló hipertónia következtében jelentős bal kamrai hipertrófiát találtunk a dTG patkányokban, a bal kamra tömeg-testtömeg hányados 4.37 ± 0.06 mg/g volt, szemben a kontroll SD patkányok 2.83 ± 0.03 mg/g értékével ($P<0.001$). A dTG törzs egyedeinek bal kamrai mintáiban a hipertrófia markerének tekintett ANP és a protoonkogén c-fos génexpressziója 9.2-szeresére ($P<0.001$) illetve 1.6-szeresére ($P<0.05$) emelkedett a kontrollokhöz viszonyítva.

A standard Langendorff-technika szerint izolált szívek bal kamrájába egy folyadékkal töltött ballont helyeztünk, melynek volumenét lépcsőzetesen emelve fokozott előterhelésnek tettük ki a szíveket. Eredményeink szerint mind az SD, mind a dTG patkányok szíve adekvát Frank-Starling-választ mutatott (55. ábra). Továbbá, adott végdiasztolés nyomás mellett (LVEDP=3 Hgmm) a kamrai kontraktilitás indexei – a pulzusnyomás és a dP/dt_{max} – szignifikánsan magasabbak voltak a dTG patkányok hipertrófiás szívéén. Hasonló eltérést tapasztaltunk a két patkánytörzs szívei között, ha a kontraktilitást a maximális pulzusnyomást kiváltó ballontérfogat, a V_{max} 50%-os értékénél hasonlítottuk össze (4. táblázat). A koncentrikus bal kamrai hipertrófiának megfelelően, a

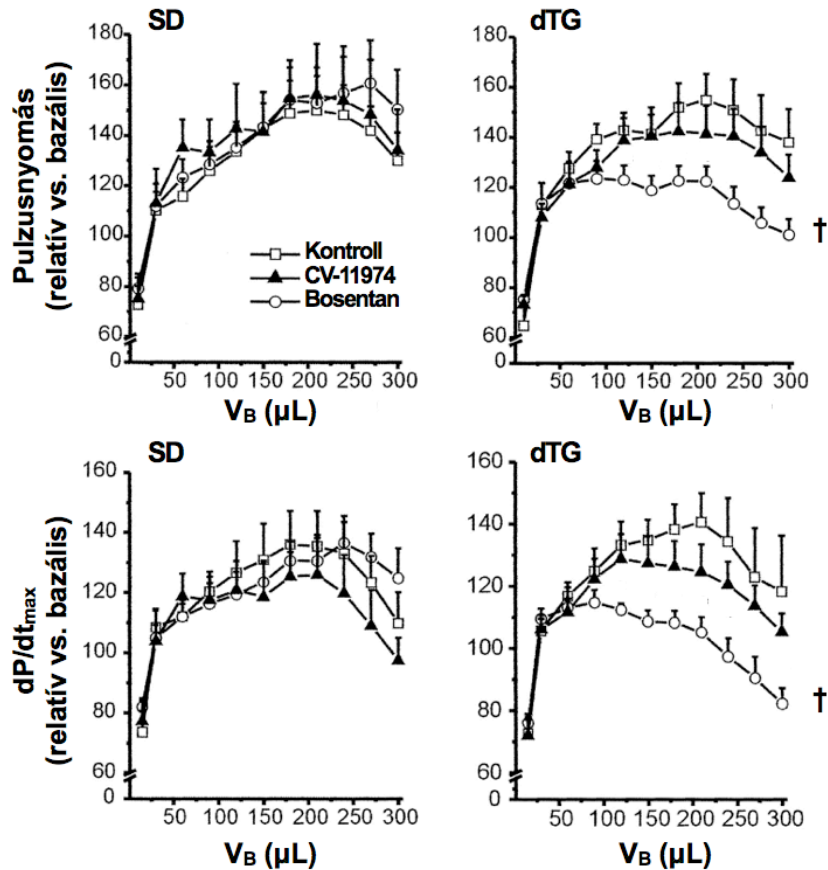
dTG törzs esetén a V_{max} értéke $186 \pm 18 \mu\text{L}$ volt az SD törzs $234 \pm 22 \mu\text{L}$ -es értékéhez viszonyítva ($P=0.05$).

4. táblázat: SD és dTG patkányok izolált szívpreparátumainak hemodinamikai paramétereit

	SD	dTG
Hemodinamikai paraméterek (LVEDP=3 Hgmm)		
Pulzusnyomás (Hgmm)	29.6 ± 1.8	$44.5 \pm 1.9 \ddagger$
dP/dt _{max} (Hgmm/s)	1216 ± 61	$1578 \pm 69 \ddagger$
dP/dt _{min} (Hgmm/s)	-684 ± 34	$-899 \pm 34 \ddagger$
Hemodinamikai paraméterek ($V_B=50\% V_{max}$)		
Pulzusnyomás (Hgmm)	38.8 ± 2.8	$59.8 \pm 4.1 \ddagger$
dP/dt _{max} (Hgmm/s)	1450 ± 102	$1934 \pm 151^*$
dP/dt _{min} (Hgmm/s)	-820 ± 53	$-1105 \pm 79^*$
LVEDP (Hgmm)	11.9 ± 1.8	$23.7 \pm 4.4^*$

Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel (n=7-8 szív csoportonként). Az adatokat Student-féle kétmintás t-próbával vizsgáltuk. LVEDP, bal kamrai végdiasztolés nyomás; V_{max} , bal kamrai ballon térfogat mely mellett a maximális pulzusnyomás észlelhető. * $P<0.05$, † $P<0.01$, ‡ $P<0.001$ vs. SD. (Piuholá és mtsai, 2003b alapján)

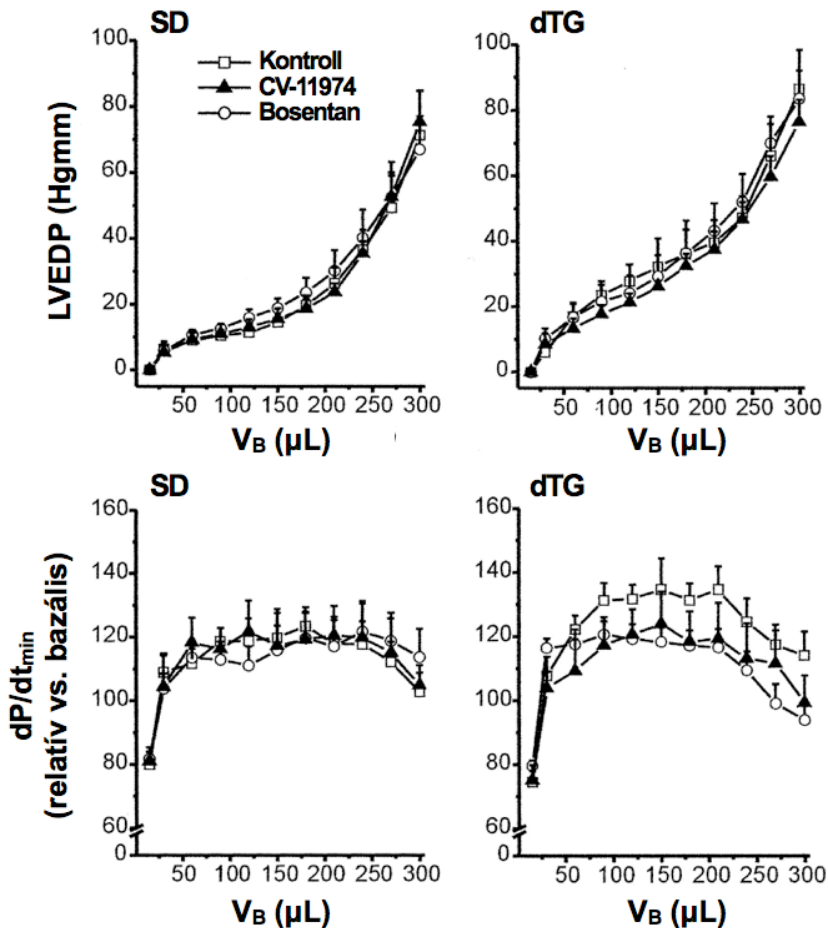
Az endogén ET-1 és Ang II esetleges szerepét a Frank-Starling-válasz módosításában az ET_A/ET_B-receptor-gátló bosentan (1 $\mu\text{mol/L}$) és az AT₁-receptor-gátló CV-11974 (10 nmol/L) segítségével vizsgáltuk. A SD patkányok egészséges szíven az antagonisták nem befolyásolták a Frank-Starling-választ ($P=\text{NS}$; 56. ábra). Ezzel szemben, az izolált dTG patkányszíveken az előterhelés emelésekor a pulzusnyomás növekedése 53%-kal ($P<0.01$), míg a dP/dt_{max} javulása 61%-kal ($P<0.01$) adódott alacsonyabbnak bosentan jelenlétében (56. ábra). A CV-11974 a hipertrófiás szíveken sem volt hatással a Frank-Starling-görbére (56. ábra). A bosentan és a CV-11974 nem befolyásolta a diasztolés funkciót, mind a ballontérfogat–végdiasztolés nyomás összefüggése, mind az előterhelés–dP/dt_{min} összefüggése változatlan maradt (57. ábra).



56. ábra: Az endogén ET-1 szerepe a Frank-Starling-válasz létrehozásában.

Izolált patkányszíven az intraventrális ballon térfogatának (V_B) lépcsőzetes növelése folyamán követtük a pulzusnyomás és a dP/dt_{max} változását. A SD és dTG patkányok szíven az endogén ET-1 illetve Ang II szerepét az ET_A/ET_B -receptor-gátló bosentan ($1 \mu\text{mol/L}$) illetve az AT_1 -receptor-antagonista CV-11974 (10 nmol/L) segítségével vizsgáltuk. Az ábra a kontraktilitási indexek változását az alapértékekhez (LVEDP=3 Hgmm) viszonyítva mutatja (átlag \pm S.E.M., $n=5-8$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. † $P<0.05$ vs. kontroll. (Piuholá és mtsai, 2003b alapján)

Fontos megjegyezni, hogy a receptorblokkolók 30 perces infúziója nyugalmi előterhelés mellett (LVEDP=3 Hgmm) nem volt hatással a kontraktilitásra sem az izolált dTG, sem a SD patkányszíveken. Az 5.8 mL/g/perc koronáriaáramlás mellett a perfúziós nyomás 30 ± 1 és 54 ± 2 Hgmm ($P<0.001$) volt a SD illetve a dTG patkányok szívein. A dTG modell esetében tapasztalt magasabb perfúziós nyomás oka feltehetőleg a szív ereinek a tartós hipertónia miatt létrejövő funkcionális és morfológiai elváltozásai (Feigl, 1983). A receptorantagonisták nem befolyásolták a perfúziós nyomást, kizárva annak a lehetőségét, hogy a Frank-Starling-válasz az értónus változása miatt módosulna.



57. ábra: A diasztolés funkció változása az előterhelés emelése során.

Izolált patkányszíven az intraventrális ballon térfogatának (V_B) lépcsőzetes növelése folyamán követtük a végdiasztolés nyomás (LVEDP) és a dP/dt_{min} változását. A SD és dTG patkányok szíven az endogén ET-1 illetve Ang II szerepét az ET_A/ET_B -receptor-gátló bosentan ($1 \mu\text{mol/L}$) illetve az AT_1 -receptor-antagonista CV-11974 (10 nmol/L) segítségével vizsgáltuk. A dP/dt_{min} változását az alapértékekhez (LVEDP=3 Hgmm) viszonyítva adtuk meg. Az eredményeket átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel ($n=5-8$ szív csoportonként). Az adatokat kétutas, ismételt ANOVA-t követő Bonferroni post hoc teszttel vizsgáltuk. (Piuholá és mtsai, 2003b alapján)

A következőkben összehasonlítottuk a két peptiderg rendszer elemeinek bal kamrai expresszióját a patkánytörzsekben. Az ET-1 mRNS szintjében nem találtunk szignifikáns különbséget, ugyanakkor az immunoreaktív ET-1 szintje 25%-kal volt magasabb a dTG törzshöz képest ($P<0.05$). A dTG patkányokban az ET_A -receptor bal kamrai génexpressziója 82%-kal haladta meg a SD patkányokban mért szintet ($P<0.05$). Az AT_1 -receptor mRNS szintje 29%-kal volt alacsonyabb a transzgenikus állatokban ($P<0.01$), míg az angiotenzinkonvertáz génexpressziója nem tért el egymástól a két törzs bal kamrai mintáiban ($P=NS$).

Eredményeink elsőként igazolták, hogy hipertrófiás szívekben a lokális ET-1/ ET_A -receptor rendszer aktivációja jelentősen hozzájárul a kamrafunkció fenntartásához akut hemodinamikai terhelés során. Kísérletes és klinikai vizsgálatok alapján fontos szerepet tulajdonítottak az ET-1-nek a szívhipertrófia és szívelégtelenség kialakulásában

(Clozel és mtsai, 1993; Kedzierski és Yanagisawa, 2001; Brunner és mtsai, 2006). Az ET-1 és az ET_A-receptor bal kamrai expressziója fokozódott experimentális (Sakai és mtsai, 1996b; Iwanaga és mtsai, 1998) és humán szívelégtelenségben (Pieske és mtsai, 1999). Az ET-1 kondicionális, szívizom-specifikus overexpressziója szívelégtelenséghez és a halálozás növekedéséhez vezetett (Yang és mtsai, 2004). Szívelégtelenség különböző állatmodelljeiben az ET_A- illetve ET_{A/B}-receptor-antagonisták csökkentették az endothelium funkciózavarát (Bauersachs és mtsai, 2000), előnyös hemodinamikai választ váltottak ki (Sakai és mtsai, 1996a; Moe és mtsai, 1998; Mulder és mtsai, 2000), valamint javították a kamrai remodelációt (Sakai és mtsai, 1996a; Mulder és mtsai, 2000) és a túlélést (Sakai és mtsai, 1996a; Mulder és mtsai, 1997; Iwanaga és mtsai, 1998). Ezen megfigyelések alapján komoly várakozás övezte az ET-receptor-antagonisták klinikai tesztelését (Spieker és mtsai, 2001). A kezdetben közzétett tanulmányok kedvező hemodinamikai változásokról számoltak be rövidtávú alkalmazás esetén (Sütsch és mtsai, 1998; Wenzel és mtsai, 1998; Cowburn és mtsai, 1998; Spieker és mtsai, 2000). Azonban a REACH-1 (Research on Endothelin Antagonism in Chronic Heart Failure), az ENCOR (Enrasentan Cooperative Randomized Evaluation) és a HEAT (Heart Failure Endothelin A Receptor Blockade Trial) randomizált tanulmány szerint magas dózisú bosentan, enrasentan (ET_A/ET_B-receptor-antagonista) ill. darusentan (ET_A-receptor-antagonista) adminisztrációja során a szívelégtelen betegek egy részénél a tünetek fokozódását tapasztalták (Mylona és Cleland, 1999; Abrahams, 2001; Lüscher és mtsai, 2002; Packer és mtsai, 2005). Kísérletes szívelégtelenségben mások észlelései (Sakai és mtsai, 1996b), és hipertrófiás szíveken nyert saját eredményeink (Piuholá és mtsai, 2003b), arra utalnak, hogy az endogén ET-1 fontos szerepet játszik a kamrafunkció fenntartásában. A patkánymodelleken szerzett eredmények extrapolálhatósága a humán viszonyokra kérdéses, mégis támpontot nyújthatnak a klinikai tanulmányokban tett megfigyelések megértéséhez. Hipotézisünk szerint, az ET-receptor-antagonisták a hemodinamikai terhelés függvényében javíthatják illetve ronthatják a kamrafunkciót. Nyugalmi viszonyok között az ET-receptor-antagonisták a perifériás rezisztenciát csökkentve javíthatják a szív teljesítményét. Ugyanakkor, fokozott hemodinamikai igénybevétel esetén a miokardium ET-receptorainak a gátlása csökkentheti a hipertrófiás szívek adaptációs készségét a Frank-Starling-válasz befolyásolása révén (Szokodi és mtsai, 2003). Nyomásterhelésnek kitett egerekben, súlyos kamratágulat és pumpafunkció-zavar jön létre, az ET-1-et kódoló gén kondicionális, szívizom-specifikus delécióna esetén (Zhao és mtsai, 2006). Eredményeink szerint, a kamrai falfeszülés akut fokozódása során szignifikánsan növekedett az ET-1 bal kamrai génexpressziója *ex vivo* egérszíven (Piuholá és mtsai, 2007). Hasonló módon, a nyomásterhelésnek kitett bal kamrában jelentősen emelkedett az ET-1 expressziója *in vivo* patkánymodellben (Sármán és mtsai, 2007). Feltételezésünk szerint az ET-1 kamrai szintézisének fokozódása szerepet játszhat a hemodinamikai túlterheléssel szembeni védelemben. Megjegyzendő, hogy az ET_A/ET_B-receptor-

antagonista bosentannal ellentétben az AT₁-receptor antagonistá CV-11974 nem befolyásolta a Frank-Starling-mechanizmust (Piuholá és mtsai, 2003b), ami egyezik a klinikai tapasztalattal, mely szerint a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer farmakológiai blokádja jól tolerálható és jelentősen javítja a szívelégtelenségben szenvedők prognózisát (Dahlöf és mtsai, 2002; McMurray és mtsai, 2003).

5. Az új tudományos eredmények összefoglalása

1. (i) Kimutattuk, hogy az AM egyike a természetben előforduló legpotensebb endogén pozitív inotrop szubsztanciáknak. Az AM a szubnanomoláris koncentrációtartományban volt képes fokozni a kontraktilitást izolált patkányszíven. 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, tranzienst 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 effektusával. (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 AT₁-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 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 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 befolyásolták a kontraktilis erő fokozódását a koronária-áramlás 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 szívizom-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 teljesítményvesztéshez 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 rendelkeznek (Szokodi, 2004; Szokodi és Ruskoaho, 2008; Barnes és mtsai, 2010). Hasonló előnyös tulajdonságokkal a jelenleg elérhető gyógyszerek közül az ún. Ca^{2+} -érzékenyítők bírnak, melyek ígéretes lehetőséget jelentenek a szívelégtelenség kezelésében (Papp és mtsai, 2012). A tanulmányozott kardiokinek kontraktilitást szabályozó 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 sejt károsodás 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 kaskád abnormális aktivációja központi szerepet játszik a karcinogenezisben. Jelenleg folyó klinikai tanulmányokban a jelpálya egyes komponenseit gátló kis molekulású gyógyszerek hatékonyságát vizsgálják különböző daganatos betegségekben (Friday és Idjei, 2008). Eredményeink felvetik, hogy az EGFR-MEK1/2-ERK1/2 jelátviteli út célzott gátlása ronthatja a szív pumpafunkcióját. Az antioxidáns vegyületekkel folytatott HOPE és OPT-CHF klinikai tanulmányok csalódást okoztak, a ROS termelődés csökkentése nem

javította a szívelégtelenségben szenvedő betegek bal kamrai funkcióját (Yusuf és mtsai, 2000; Hare és mtsai, 2008). A ROS szerepének felismerése a szív kontraktilis erejének szabályozásában fiziológias viszonyok között, magyarázatot adhat, számos egyéb tényező mellett, az antioxidáns vegyületekkel folytatott kezelés sikertelenségére (Perjés és mtsai, 2012). Jelentős várakozás övezte az ET-receptor-antagonisták 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 befolyásolása révén (Szokodi és mtsai, 2003). Összegezve, felfedező kutatási eredményeink hozzájárulnak a szívizom-kontraktilitást szabályozó fiziológias mechanizmusok megismeréséhez. Továbbá, az azonosított molekuláris célpontok alapján új gyógyszerjelöltek 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.
- Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, Sammut IA. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia–reperfusion injury. *FASEB J.* 2005; 19: 1088-1095.
- Allen DG, Kentish JC. The cellular basis of the length–tension relation in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17: 821-840.
- Amin JK, Xiao L, Pimental DR, Pagano PJ, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 131-139.
- 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.
- Andersson DC, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang SJ, Katz A, Westerblad H. Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the beta-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J Physiol.* 2011; 589: 1791-1801.
- Arnold G, Kosche F, Miessner E, Neitzert A, Lochner W. The importance of the perfusion pressure in the coronary arteries for the contractility and the oxygen consumption of the heart. *Pflugers Arch.* 1968; 299: 339-356.
- Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, Asanuma H, Sanada S, Matsumura Y, Takeda H, Beppu S, Tada M, Hori M, Higashiyama S. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med.* 2002; 8: 35-40.
- Ashley EA, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation.* 2002; 105: 3011-3016.
- Ashley EA, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A, Deng A, Eichhorn J, Mahajan R, Agrawal R, Greve J, Robbins R, Patterson AJ, Bernstein D, Quertermous T. The endogenous peptide apelin potentially improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res.* 2005; 65: 73-82.
- Asimakis GK, Lick S, Patterson C. Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2^{+/-} but not SOD1^{+/-} mouse hearts. *Circulation.* 2002; 105: 981-986.
- Autelitano DJ. Cardiac expression of genes encoding putative adrenomedullin/calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 250: 689-693.
- Avkiran M, Haworth RS. Regulatory effects of G protein-coupled receptors on cardiac sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger activity: signalling and significance. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 942-952.
- Bai XJ, Iwamoto T, Williams AG Jr, Fan WL, Downey HF. Coronary pressure-flow autoregulation protects myocardium from pressure-induced changes in oxygen consumption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994; 266: H2359-H2368.
- Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 347-351.
- Barnes G, Japp AG, Newby DE. Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart.* 2010; 96: 1011-1016.
- Barone FC, Irving EA, Ray AM, Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger AM, White RF, McVey MJ, Legos JJ, Erhardt JA, Nelson AH, Ohlstein EH, Hunter AJ, Ward K, Smith BR, Adams JL, Parsons AA. SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296: 312-321.
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.* 2002; 416: 337-339.
- Baudet S, Weisser J, Janssen AP, Beulich K, Bieligg U, Pieske B, Noireaud J, Janssen PM, Hasenfuss G, Prestle J. Increased basal contractility of cardiomyocytes overexpressing protein kinase C epsilon and blunted positive inotropic response to endothelin-1. *Cardiovasc Res.* 2001; 50: 486-494.
- Bauersachs J, Fraccarollo D, Galuppo P, Widder J, Ertl G. Endothelin-receptor blockade improves endothelial vasomotor dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000; 47: 142-149.
- Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res.* 2007; 101: 195-204.
- Bellahcene M, Jacquet S, Cao XB, Tanno M, Haworth RS, Layland J, Kabir AM, Gaestel M, Davis RJ, Flavell RA, Shah AM, Avkiran M, Marber MS. Activation of p38 mitogen activated protein kinase contributes to the early cardiodepressant action of tumor necrosis factor. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 545-555.
- Belmont PJ, Tadimalla A, Chen WJ, Martindale JJ, Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Sussman MA, Glembotski CC. Coordination of growth and endoplasmic reticulum stress signaling by regulator of calcineurin 1 (RCAN1), a novel ATF6-inducible gene. *J Biol Chem.* 2008; 283: 14012-14021.
- Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, Burdick J, Morine KJ, Gardner TJ, Woo YJ. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation.* 2004; 110 (Suppl II): II187-II193.

- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002a; 415: 198-205.
- Bers DM. Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference? *J Mol Cell Cardiol*. 2002b; 34: 369-373.
- Bers DM. Going to cAMP just got more complicated. *J Physiol*. 2007; 583: 415-416.
- Bisping E, Tenderich G, Barckhausen P, Stumme B, Bruns S, von Lewinski D, Pieske B. Atrial myocardium is the predominant inotropic target of adrenomedullin in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H3001-H3007.
- Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH. Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 1993; 317: 271-275.
- Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, Sugden PH. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem*. 1994; 269: 1110-1119.
- Bohlender J, Menard J, Luft FC, Ganten D. Dose effects of human renin in rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension*. 1997; 29: 1031-1038.
- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, DuBose CM, Lai EK, Roberts R, McCay PB. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 4695-4699.
- Borbély A, Tóth A, Édes I, Virág L, Papp JG, Varró A, Paulus WJ, van der Velden J, Stienen GJM, Papp Z. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res*. 2005; 67: 225-233.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1998; 83: 1271-1278.
- Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigné C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpené C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P, Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*. 2005; 146: 1764-1771.
- Bowditch HP. Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Verh Saechs Akad Wiss*. 1871; 23: 652-689.
- Boyersky G, Ganz MB, Sterzel RB, Boron WF. pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO₃⁻. *Am J Physiol*. 1988; 255: C844-C856.
- Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai YS, Parsons S, Braunwart J, Glascock BJ, Klevitsky R, Kimball TF, Hewett TE, Molkentin JD. Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1475-1486.
- 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.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63: 175-195.
- Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*. 1999; 51: 651-690.
- Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther*. 2006; 111: 508-531.
- Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev*. 2003; 83: 59-115.
- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*. 2000; 19: 6341-6350.
- Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*. 2002; 91: 776-781.
- Campbell K. Rate constant of muscle force redevelopment reflects cooperative activation as well as cross-bridge kinetics. *Biophys J*. 1997; 72: 254-262.
- Cannan CR, Burnett JC Jr., Brandt RR, Lerman A. Endothelin at pathophysiological concentrations mediates coronary vasoconstriction via the endothelin-A receptor. *Circulation*. 1995; 92: 3312-3317.
- Canton M, Menazza S, Sheeran FL, Poverino de Laureto P, Di Lisa F, Pepe S. Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57: 300-309.
- Cao CM, Xia Q, Gao Q, Chen M, Wong TM. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 312: 644-650.
- Castan-Laurell I, Dray C, Attane C, Duparc T, Knauf C, Valet P. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*. 2011; 40: 1-9.
- Chamberland C, Barajas-Martinez H, Haufe V, Fecteau MH, Delabre JF, Burashnikov A, Antzelevitch C, Lesur O, Chraïbi A, Sarret P, Dumaine R. Modulation of canine cardiac sodium current by Apelin. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48: 694-701.

- Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM, Cooper GJ, Coy DH, Jing NY, Nicholls MG. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of adrenomedullin in conscious sheep. *Am J Physiol*. 1997; 272: R2040-R2047.
- Charo DN, Ho M, Fajardo G, Kawana M, Kundu RK, Sheikh AY, Finsterbach TP, Leeper NJ, Ernst KV, Chen MM, Ho YD, Chun HJ, Bernstein D, Ashley EA, Quertermous T. Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H1904-H1913.
- Chen W, Gabel S, Steenbergen C, Murphy E. A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ Res*. 1995; 77: 424-429.
- Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Wang DL, Chen JJ. Reactive oxygen species modulate endothelin-1-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 1999; 41: 654-662.
- Chijiva T, Mishima A, Hagivara M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*. 1990; 265: 5267-5272.
- Chini EN, Choi E, Grande JP, Burnett JC, Dousa TP. Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 215: 868-873.
- Chu L, Takahashi R, Norota I, Miyamoto T, Takeishi Y, Ishii K, Kubota I, Endoh M. Signal transduction and Ca²⁺ signaling in contractile regulation induced by crosstalk between endothelin-1 and norepinephrine in dog ventricular myocardium. *Circ Res*. 2003; 92: 1024-1032.
- Chu L, Endoh M. Wortmannin inhibits the myofilament Ca²⁺ sensitization induced by endothelin-1. *Eur J Pharmacol*. 2005; 507: 135-143.
- Cingolani HE, Ennis IL, Aiello EA, Pérez NG. Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2011; 462: 29-38.
- Cingolani HE, Villa-Abrille MC, Cornelli M, Nolly A, Ennis IL, Garciarena C, Suburo AM, Torbidoni V, Correa MV, Camiliónde Hurtado MC, Aiello EA. The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species. *Hypertension*. 2006; 47: 727-734.
- Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol*. 1998; 142: 523-535.
- Clerk A, Sugden PH. Ras: the stress and the strain. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41: 595-600.
- Clozel M, Breu V, Burri K, Cassal JM, Fischli W, Gray GA, Hirth G, Löffler BM, Müller M, Neidhart W. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature*. 1993; 365: 759-761.
- Cowburn PJ, Cleland JG, McArthur JD, MacLean MR, McMurray JJ, Dargie HJ. Short-term hemodynamic effects of BQ-123, a selective endothelin ET_A-receptor antagonist, in chronic heart failure. *Lancet*. 1998; 352: 201-202.
- Curfman GD. Inotropic therapy for heart failure – an unfulfilled promise. *N Engl J Med*. 1991; 325: 1509-1510.
- Czóbel M, Kaszaki J, Molnár G, Nagy S, Boros M. Nonspecific inhibition of nitric oxide synthesis evokes endothelin-dependent increases in myocardial contractility. *Nitric Oxide*. 2009; 21: 201-209.
- Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002; 359: 995-1003.
- Dai T, Ramirez-Correa G, Gao WD. Apelin increases contractility in failing cardiac muscle. *Eur J Pharmacol*. 2006; 553: 222-228.
- Davidson BL, Doran SE, Shewach DS, Latta JM, Hartman JW, Roessler BJ. Expression of Escherichia coli beta-galactosidase and rat HPRT in the CNS of Macaca mulatta following adenoviral mediated gene transfer. *Exp Neurol*. 1994; 125: 258-267.
- De Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Bucknall CA, Salas Martin JF, Moncada S. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet*. 1993; 341: 84-85.
- De Giusti VC, Correa MV, Villa-Abrille MC, Beltrano C, Yeves AM, de Cingolani GE, Cingolani HE, Aiello EA. The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species. *Life Sci*. 2008; 83: 264-271.
- Delbridge LM, Roos KP. Optical methods to evaluate the contractile function of unloaded isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; 29: 11-25.
- De Matteo R, May CN. Direct coronary vasodilator action of adrenomedullin is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 2003; 140: 1414-1420.
- De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortés C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 10464-10469.
- 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.
- Devaraj S, Jialal I. Failure of vitamin E in clinical trials: is gamma-tocopherol the answer? *Nutr Rev*. 2005; 63: 290-293.

- Dijkman MA, Heslinga JW, Sipkema P, Westerhof N. Perfusion-induced changes in cardiac contractility and oxygen consumption are not endothelium-dependent. *Cardiovasc Res.* 1997; 33: 593-600.
- Dijkman MA, Heslinga JW, Sipkema P, Westerhof N. Perfusion-induced changes in cardiac contractility depend on capillary perfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1998; 274: H405-H410.
- Dong F, Zhang X, Ren J. Leptin regulates cardiomyocyte contractile function through endothelin-1 receptor-NADPH oxidase pathway. *Hypertension.* 2006; 47: 222-229.
- Doroudgar S, Glembotski CC. The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. *Trends Mol Med.* 2011; 17: 207-214.
- Dorn GW II, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 2005; 115: 527-537.
- Dzimiri N. Regulation of beta-adrenoceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacol Rev.* 1999; 51: 465-501.
- Ebara T, Miura K, Okumura M, Matsuura T, Kim S, Yukimura T, Iwao H. Effect of adrenomedullin on renal hemodynamics and functions in dogs. *Eur J Pharmacol.* 1994; 263: 69-73.
- Ebihara Y, Karmazyn M. Inhibition of beta- but not alpha 1-mediated adrenergic responses in isolated hearts and cardiomyocytes by nitric oxide and 8-bromo cyclic GMP. *Cardiovasc Res.* 1996; 32: 622-629.
- Édes IF, Czuriga D, Csanyi G, Chlopicki S, Recchia FA, Borbely A, Galajda Z, Edes I, van der velden J, Stienen GJM, Papp Z. The rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine and porcine cardiomyocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293: R20-R29.
- Eguchi S, Hirata Y, Kano H, Sato K, Watanabe Y, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S, Marumo F. Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1994; 340: 226-230.
- 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.
- Endoh M, Blinks JR. Actions of sympathomimetic amines on the Ca^{2+} transients and contractions of rabbit myocardium: Reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca^{2+} mediated through α - and β -adrenoceptors. *Circ Res.* 1988; 62: 247-265.
- Entzeroth M, Doods HN, Wieland HA, Wiene W. Adrenomedullin mediates vasodilation via CGRP1 receptors. *Life Sci.* 1995; 56: 19-25.
- Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983; 245: C1-14.
- 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.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273: 18623-18632.
- Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, Ball SG, Varadi G, Peers C. Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca^{2+} channel α_1C subunits by redox agents and hypoxia. *J Physiol.* 1999; 514: 629-637.
- Feigl EO. Coronary physiology. *Physiol Rev.* 1983; 63: 1-205.
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996; 271: 22810-22814.
- 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.
- Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res.* 2001; 88: 802-809.
- Földes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Sárman 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.
- 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.
- Frost RJ, Engelhardt S. A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. *Circulation.* 2007; 116: 1768-1775.
- Fuchs F, Martyn DA. Length-dependent Ca^{2+} activation in cardiac muscle: some remaining questions. *J Muscle Res Cell Motil.* 2005; 26: 199-212.

- Fuller SJ, Sivarajah K, Sugden PH. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 44: 831-854.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376.
- Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 199: 1461-1465.
- Fulton D, McGiff JC, Quilley J. Role of phospholipase C and phospholipase A2 in the nitric oxide-induced vasodilator effect of bradykinin in the rat perfused heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 278: 518-526.
- Gambassi G, Spurgeon HA, Lakatta EG, Blank PS, Capogrossi MC. Different effects of α - and β -adrenergic stimulation on cytosolic pH and myofilament responsiveness to Ca²⁺ in cardiac myocytes. *Circ Res.* 1992; 71: 870-882.
- Gambassi G, Spurgeon HA, Ziman BD, Lakatta EG, Capogrossi MC. Opposing effects of α_1 -adrenergic receptor subtypes on Ca²⁺ and pH homeostasis in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1998; 274: H1152-H1162.
- Garlid KD, Puddu PE, Pasdois P, Costa ADT, Beauvoit B, Criniti A, Tariosse L, Diolez P, Dos Santos P. Inhibition of cardiac contractility by 5-hydroxydecanoate and tetraphenylphosphonium ion: a possible role of mitoK_{ATP} in response to inotropic stress. *Am J Phys Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H152-H160.
- Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res.* 2006; 71: 289-299.
- Georgakopoulos D, Kass D. Minimal force-frequency modulation of inotropy and relaxation of in situ murine heart. *J Physiol.* 2001; 534: 535-545.
- Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron KM. Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *Mol Endocrinol.* 2007; 21: 783-796.
- Gill JS, McKenna WJ, Camm AJ. Free radicals irreversibly decrease Ca²⁺ currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* 1995; 292: 337-340.
- Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005; 115: 500-508.
- Godecke A, Heinicke T, Kamkin A, Kiseleva I, Strasser RH, Decking UK, Stumpe T, Isenberg G, Schrader J. Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *J Physiol.* 2001; 532: 195-204.
- Gok S, Vural K, Sekuri C, Onur R, Tezcan A, IZANLI A. Effects of the blockade of cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels on arrhythmias and coronary flow in ischemia-reperfusion model in isolated rat hearts. *Vascul Pharmacol.* 2006; 44: 197-205.
- Goldberg AT, Bond BR, Mukherjee R, New RB, Zellner JL, Crawford FA, Spinale FG. Endothelin receptor pathway in human left ventricular myocytes: relation to contractility. *Ann Thorac Surg.* 2000; 69: 711-715.
- Gregg DE. Effect of coronary perfusion pressure or coronary flow on oxygen usage of the myocardium. *Circ Res.* 1963; 13: 497-500.
- Grieve DJ, Byrne JA, Siva A, Layland J, Johar S, Cave AC, Shah AM. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 817-826.
- Gyurko R, Kuhlencordt P, Fishman MC, Huang PL. Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278: H971-H981.
- Hahn HS, Marreez Y, Odley A, Sterbling A, Yussman MG, Hilty KC, Bodi I, Liggett SB, Schwartz A, Dorn GW II. PKC- α negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circ Res.* 2003; 93: 1111-1119.
- Hakak Y, Shrestha D, Goegel MC, Behan DP, Chalmers DT. Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues. *FEBS Lett.* 2003; 550: 11-17.
- Hambleton M, Hahn H, Plegler ST, Kuhn MC, Kleivitsky R, Carr AN, Kimball TF, Hewett TE, Dorn GW II, Koch WJ, Molkentin JD. Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Ca/ β enhances cardiac contractility and attenuates heart failure. *Circulation.* 2006; 114: 574-582.
- Hanze J, Dittrich K, Dotsch J, Rascher W. Molecular cloning of a novel human receptor gene with homology to the rat adrenomedullin receptor and high expression in heart and immune system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240: 183-188.
- Hare JM, Mangal B, Brown J, Fisher C, Freudenberg 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.
- Harris IS, Zhang S, Treskov I, Kovacs A, Weinheimer C, Muslin AJ. Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation.* 2004; 110: 718-723.
- Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann HP, Astheimer K, Pieske B, Just H. Influence of the force-frequency relation on hemodynamics and left ventricular function in patients with nonfailing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 1994; 15: 164-170.
- He H, Bessho H, Fujisawa Y, Horiuchi K, Tomohiro A, Kita T, Aki Y, Kimura S, Tamaki T, Abe Y. Effects of a synthetic rat adrenomedullin on regional hemodynamics in rats. *Eur J Pharmacol.* 1995; 273: 209-214.
- 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.

- Hertelendi Z, Tóth A, Borbély A, Galajda Z, van der Velden J, Stienen GJM, Édes I, Papp Z. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca^{2+} sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10: 1175-1184.
- Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev*. 2000; 80: 173-210.
- Hickey KA, Rubányi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1985; 248: C550-C555.
- Hidaka H, Kobayashi R. Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1992; 32: 377-397.
- Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000; 21: 138-167.
- 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.
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*. 1993; 91: 1367-1373.
- Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki Y, Suzuki E, Ikenouchi H, Kohmoto O, Kimura K, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M. Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. *Hypertension*. 1995; 25: 790-795.
- Holman JJ, Craig RK, Marschall I. Human α - and β -CGRP, and rat α -CGRP are coronary vasodilators in the rat. *Peptides*. 1986; 7: 231-235.
- 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.
- Horiuchi Y, Fujii T, Kamimura Y, Kawashima K. The endogenous, immunologically active peptide apelin inhibits lymphocytic cholinergic activity during immunological responses. *J Neuroimmunol*. 2003; 144: 46-52.
- Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular and functional characteristics of APJ: tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem*. 2000; 275: 21061-21067.
- Huser J, Bers DM, Blatter LA. Subcellular properties of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in phospholamban-deficient mouse ventricular cells. *Am J Physiol*. 1998; 274: H1800-H1811.
- Ichiki Y, Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett*. 1994; 338: 6-10.
- Ihara T, Ikeda U, Tate Y, Ishibashi S, Shimada K. Positive inotropic effects of adrenomedullin on rat papillary muscle. *Eur J Pharmacol*. 2000; 390: 167-172.
- 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.
- Ikenouchi H, Kangawa K, Matsuo H, Hirata Y. Negative inotropic effect of adrenomedullin in isolated adult rabbit cardiac ventricular myocytes. *Circulation*. 1997; 95: 2318-2324.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 2863-2867.
- Ishikawa T, Okamura N, Saito A, Masaki T, Goto K. Positive inotropic effect of calcitonin gene-related peptide mediated by cyclic AMP in guinea pig heart. *Circ Res*. 1988; 63: 726-734.
- Ishimitsu T, Ono H, Minami J, Matsuoka H. Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders. *Pharmacol Ther*. 2006; 111: 909-927.
- Ishiyama Y, Kitamura K, Ichiki Y, Nakamura S, Kida O, Kangawa K, Eto T. Hemodynamic effects of a novel hypotensive peptide, human adrenomedullin, in rats. *Eur J Pharmacol*. 1993; 241: 271-273.
- Ishiyama Y, Kitamura K, Kato J, Sakata J, Kangawa K, Eto T. Changes in cardiac adrenomedullin concentration in renovascular hypertensive rats. *Hypertens Res*. 1997; 20: 113-117.
- Isumi Y, Shoji H, Sugo S, Tochimoto T, Yoshioka M, Kangawa K, Matsuo H, Minamino N. Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*. 1998; 139: 838-846.
- Ishizaka Y, Tanaka M, Kitamura K, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 200: 642-646.
- Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Klagsbrun M, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 3221-3226.
- Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem*. 1996; 271: 22391-22397.
- Iwanaga Y, Kihara Y, Hasegawa K, Inagaki K, Yoneda T, Kaburagi S, Araki M, Sasayama S. Cardiac endothelin-1 plays a critical role in the functional deterioration of left ventricles during the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in salt-sensitive rats. *Circulation*. 1998; 98: 2065-2073.

- Iwanaga Y, Kihara Y, Takenaka H, Kita T. Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: possible role of angiotensin II-angiotensin type 1 receptor system. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 41: 798-806.
- 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.
- Japp AG, Cruden NL, Barnes G, van Gemeren N, Mathews J, Adamson J, Johnston NR, Denvir MA, Megson IL, Flapan AD, Newby DE. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2010; 121: 1818-1827.
- 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.
- Jensen BC, Swigart PM, De Marco T, Hoopes C, Simpson PC. α_1 -Adrenergic receptor subtypes in nonfailing and failing human myocardium. *Circ Heart Fail.* 2009; 2: 654-663.
- Jo SH, Leblais V, Wang PH, Crow MT, Xiao RP. Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartmentalizes the concurrent G_s signaling during β_2 -adrenergic stimulation. *Circ Res.* 2002; 91: 46-53.
- Jougasaki M, Wei CM, Aarhus LL, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. Renal localization and actions of adrenomedullin: a natriuretic peptide. *Am J Physiol.* 1995a; 268: F657-F663.
- Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JC Jr. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation.* 1995b; 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.
- Jougasaki M, Stevens TL, Borgeson DD, Luchner A, Redfield MM, Burnett JC Jr. Adrenomedullin in experimental congestive heart failure: cardiorenal activation. *Am J Physiol.* 1997; 273: R1392-R1399.
- Kakkar R, Lee RT. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ Res.* 2010; 106: 47-57.
- Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res.* 2000; 87: 1095-1102.
- Kang M, Walker JW. Protein kinase C delta and epsilon mediate positive inotropy in adult ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38: 753-764.
- Kanski J, Behring A, Pelling J, Schoneich C. Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288: H371-H381.
- Kapas S, Catt KJ, Clark AJ. Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J Biol Chem.* 1995a; 270: 25344-25347.
- Kapas S, Clark AJ. Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995b; 217: 832-838.
- Kato J, Kobayashi K, Etoh T, Tanaka M, Kitamura K, Imamura T, Koiwaya Y, Kangawa K, Eto T. Plasma adrenomedullin concentration in patients with heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 180-183.
- Katugampola SD, Maguire JJ, Matthewson SR, Davenport AP. [(125I)]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol.* 2001; 132: 1255-1260.
- Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1538: 162-171.
- Keaney JFJ, Hare JM, Balligand JL, Loscalzo J, Smith TW, Colucci WS. Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1996; 271: H2646-H2652.
- Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 851-876.
- 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.
- Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res.* 1996; 79: 363-380.
- Kentish JC. A role for the sarcolemmal Na⁺-H⁺ exchanger in the slow force response to myocardial stretch. *Circ Res.* 1999; 85: 658-660.
- Kentish JC, Wrzosek A. Changes in force and cytosolic Ca²⁺ concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae. *J Physiol.* 1998; 506 (Pt 2): 431-444.
- Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe DF. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284: H566-H574.
- 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.

- Kinnunen P, Szokodi I, Nicholls MG, Ruskoaho H. Impact of NO on ET-1- and AM-induced inotropic responses: potentiation by combined administration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 279: R569-R575.
- Kinnunen P, Piihola 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.
- Kiss E, Edes I, Sato Y, Luo W, Liggett SB, Kranias EG. beta-Adrenergic regulation of cAMP and protein phosphorylation in phospholamban-knockout mouse hearts. *Am J Physiol*. 1997; 272: H785-H790.
- 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*. 1993a; 192: 553-560.
- Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993b; 194: 720-725.
- 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.
- Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept*. 2004; 118: 119-125.
- Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept*. 2005; 126: 233-240.
- Knight DR, Smith AH, Flynn DM, MacAndrew JT, Ellery SS, Kong JX, Marala RB, Wester RT, Guzman-Perez A, Hill RJ, Magee WP, Tracey WR. A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 297: 254-259.
- Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev*. 2011; 91: 1-77.
- Kohmoto O, Spitzer KW, Movsesian MA, Barry WH. Effects of intracellular acidosis on $[Ca^{2+}]_i$ transients, transsarcolemmal Ca^{2+} fluxes, and contraction in ventricular myocytes. *Circ Res*. 1990; 66: 622-632.
- Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schlüter KD, Piper HM, Noack E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1996; 78: 91-101.
- 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.
- Krämer BK, Smith TW, Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes: role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na^+H^+ exchanger. *Circ Res*. 1991; 68: 269-279.
- Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, Leschnik M, Liebbrandt A, Makovic M, Swaighofer J, Beetz N, Musialek R, Neely G, Komnenovic V, Kolm U, Metzler B, Ricci R, Hara H, Meixner A, Nghiem M, Chen X, Dawood F, Wong KM, Sarao R, Cukerman E, Kimura A, Hein L, Thalhammer J, Liu PP, Penninger JM. Impaired heart contractility in apelin gene deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res*. 2007; 101: e32-e42.
- 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.
- Lainchbury JG, Nicholls MG, Espiner EA, Yandle TG, Lewis LK, Richards AM. Bioactivity and interactions of adrenomedullin and brain natriuretic peptide in patients with heart failure. *Hypertension*. 1999; 34: 70-75.
- Lainchbury JG, Meyer DM, Jougasaki M, Burnett JC Jr, Redfield MM. Effects of adrenomedullin on load and myocardial performance in normal and heart-failure dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000a; 279: H1000-H1006.
- Lainchbury JG, Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of short-term adrenomedullin infusion in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000b; 85: 1016-1020.
- Lakó-Futó Z, Szokodi I, Sárman 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.
- Lamberts RR, van Rijen MH, Sipkema P, Franssen P, Sys SU, Westerhof N. Increased coronary perfusion augments cardiac contractility in the rat through stretch-activated ion channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282: H1334-H1340.
- Landmesser U, Drexler H. Update on inotropic therapy in the management of acute heart failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2007; 9: 443-449.
- Laurent P, Becker JA, Valverde O, Ledent C, de Kerchove d'Exaerde A, Schiffmann SN, Maldonado R, Vassart G, Parmentier M. The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10. *Nat Neurosci*. 2005; 8: 1735-1741.
- Layland J, Grieve DJ, Cave AC, Sparks E, Solaro RJ, Shah AM. Essential role of troponin I in the positive inotropic response to isoprenaline in mouse hearts contracting auxotonically. *J Physiol*. 2004; 556: 835-847.

- Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem*. 2000; 74: 34-41.
- Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashley EA, Tsao PS, Dalman RL, Quertermous T. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296: H1329-H1335.
- Lerman A, Sandok EK, Hildebrand FL Jr., Burnett JC Jr.. Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation*. 1992; 85: 1894-1898.
- 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.
- Levoye A, Jockers R. Alternative drug discovery approaches for orphan GPCRs. *Drug Discov Today*. 2008; 13: 52-58.
- Li K, Stewart DJ, Rouleau JL. Myocardial contractile actions of endothelin-1 in rat and rabbit papillary muscles: role of endocardial endothelium. *Circ Res*. 1991; 69: 301-312.
- Li S, Li X, Zheng H, Xie B, Bidasee KR, Rozanski GJ. Pro-oxidant effect of transforming growth factor-beta1 mediates contractile dysfunction in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2008; 77: 107-117.
- Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia*. 2006; 49: 1434-46.
- Liang F, Gardner DG. Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF- κ B-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1603-1612.
- Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA, Wang Y. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 12283-12288.
- 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.
- Linke WA. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2008; 77: 637-648.
- Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-EI-Leil MK, Meloche S, Pouyssegur J, Pages G, De Windt LJ, Doevendans PA, Molkentin JD. MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation*. 2004; 109: 1938-1941.
- Liu Q, Hofmann PA. Modulation of protein phosphatase 2a by adenosine A1 receptors in cardiomyocytes: role for p38 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285: H97-H103.
- 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.
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res*. 1994; 75: 401-409.
- Lüscher TF, Enseleit F, Pacher R, Mitrovic V, Schulze MR, Willenbrock R, Dietz R, Rousson V, Hürlimann D, Philipp S, Notter 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.
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*. 1991; 266: 17067-17071.
- MacCarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD, Shah AM. Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart: studies with an intracoronary ET_A receptor antagonist. *Circulation*. 2000; 101: 142-147.
- MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 566-577.
- Maejima Y, Kuroda J, Matsushima S, Ago T, Sadoshima J. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 50: 408-416.
- Magga J, Vuolteenaho O, Marttila M, Ruskoaho H. Endothelin-1 is involved in stretch-induced early activation of B-type natriuretic peptide gene expression in atrial but not in ventricular myocytes: acute effects of mixed ET_A/ET_B and AT₁ receptor antagonists in vivo and in vitro. *Circulation*. 1997; 96: 3053-3062.
- Maguire JJ, Kleinz MJ, Pitkin SL, Davenport AP. [Pyr¹]Apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart. Vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension*. 2009; 54: 598-604.
- Mak S, Newton GE. Vitamin C augments the inotropic response to dobutamine in humans with normal left ventricular function. *Circulation*. 2001; 103: 826-830.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002; 298: 1912-1934.

- Martin SR, Emanuel K, Sears CE, Zhang YH, Casadei B. Are myocardial eNOS and nNOS involved in the beta-adrenergic and muscarinic regulation of inotropy? A systematic investigation. *Cardiovasc Res.* 2006; 70: 97-106.
- Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Fujino M, Inoue K. Prolactin-releasing peptide as a novel stress mediator in the central nervous system. *Endocrinology.* 2001; 142: 2032-2038.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res.* 2003; 93: 388-398.
- Maughan DW. Kinetics and energetics of the crossbridge cycle. *Heart Fail Rev.* 2005; 10: 175-185.
- McClellan G, Weisberg A, Rose D, and Winegrad S. Endothelial cell storage and release of endothelin as a cardioregulatory mechanism. *Circ Res.* 1994; 75: 85-96.
- McDonald KS, Moss RL. Osmotic compression of single cardiac myocytes eliminates the reduction in Ca^{2+} sensitivity of tension at short sarcomere length. *Circ Res.* 1995; 77: 199-205.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998; 393: 333-339.
- McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, Granger CB, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Yusuf S, Pfeffer MA; CHARM Investigators and Committees. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet.* 2003; 362: 767-771.
- McNair LL, Salamanca DA, Khalil RA. Endothelin-1 promotes Ca^{2+} antagonist-insensitive coronary smooth muscle contraction via activation of ϵ -protein kinase C. *Hypertension.* 2004; 43: 897-904.
- Meiry G, Reisner Y, Feld Y, Goldberg S, Rosen M, Ziv N, Binah O. Evolution of action potential propagation and repolarization in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2001; 12: 1269-1277.
- Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1986; 261: 6300-6306.
- Mitra S, Hyvelin JM, Shan Q, Tang F, Bourreau JP. Role of cyclooxygenase in ventricular effects of adrenomedullin: is adrenomedullin a double-edged sword in sepsis? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1034-H1042.
- Mitra S, Bourreau JP. Gs and Gi coupling of adrenomedullin in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290: H1842-H1847.
- Moe GW, Albernaz A, Naik GO, Kirchengast M, Stewart DJ. Beneficial effects of long-term selective endothelin type A receptor blockade in canine experimental heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998; 39: 571-579.
- Moffat MP, Karmazyn M. Protective effects of the potent Na/H exchange inhibitor methylisobutyl amiloride against post-ischemic contractile dysfunction in rat and guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1993; 25: 959-971.
- Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C, Gresham A, Davenport AP. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res.* 1993; 72: 526-538.
- Molnár A, Borbély A, Czuriga D, Ivetta SM, Szilágyi S, Hertelendi Z, Pásztor ET, Balogh A, Galajda Z, Szerafin T, Jaquet K, Papp Z, Edes I, Tóth A. Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2009; 284: 1031-1039.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976; 263: 663-665.
- 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.
- Morimoto A, Nishikimi T, Yoshihara F, Horio T, Nagaya N, Matsuo H, Dohi K, Kangawa K. Ventricular adrenomedullin levels correlate with the extent of cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension.* 1999; 33: 1146-1152.
- Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007; 93: 1137-1146.
- Mukherjee R, Multani MM, Sample JA, Dowdy KB, Zellner JL, Hoover DB, Spinale FG. Effects of adrenomedullin on human myocyte contractile function and beta-adrenergic response. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2002; 7: 235-240.
- Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, Macé B, Comoy E, Letac B, Thuillez C. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation.* 1997; 96: 1976-1982.
- Mulder P, Boujedaini H, Richard V, Derumeaux G, Henry JP, Renet S, Wessale J, Opgenorth T, Thuillez C. Selective endothelin-A versus combined endothelin-A/endothelin-B receptor blockade in rat chronic heart failure. *Circulation.* 2000; 102: 491-493.
- Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature.* 1990; 344: 541-544.
- Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res.* 2006; 71: 208-215.

- Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia–reperfusion injury. *Physiol Rev.* 2008; 88: 581-609.
- Murphy TC, Samson WK. The novel vasoactive hormone, adrenomedullin, inhibits water drinking in the rat. *Endocrinology.* 1995; 136: 2459-2463.
- 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.
- Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki F, Oya H, Kyotani S, Nakanishi N, Goto Y, Masuda Y, Miyatake K, Kangawa K. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 2000; 101: 498-503.
- Nagaya N, Goto Y, Satoh T, Sumida H, Kojima S, Miyatake K, Kangawa K. Intravenous adrenomedullin in myocardial function and energy metabolism in patients after myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 39: 754-760.
- Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura K. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288: R1432-R1437.
- 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.
- Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Ishimitsu T, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omae T, Matsuoka H. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26: 1424-1431.
- Nishikimi T, Tadokoro K, Mori Y, Wang X, Akimoto K, Yoshihara F, Minamino N, Kangawa K, Matsuoka H. Ventricular adrenomedullin system in the transition from LVH to heart failure in rats. *Hypertension.* 2003a; 41: 512-518.
- Nishikimi T, Yoshihara F, Horinaka S, Kobayashi N, Mori Y, Tadokoro K, Akimoto K, Minamino N, Kangawa K, Matsuoka H. Chronic administration of adrenomedullin attenuates transition from left ventricular hypertrophy to heart failure in rats. *Hypertension.* 2003b; 42: 1034-1041.
- Nishimaru K, Miura Y, Endoh M. Mechanisms of endothelin-1-induced decrease in contractility in adult mouse ventricular myocytes. *Brit J Pharmacol.* 2007; 152, 456-463.
- Nishimaru K, Arimoto T, Takeishi Y. Overexpression of diacylglycerol kinase ζ inhibits endothelin-1-induced decreases in Ca²⁺ transients and cell shortening in mouse ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 44, 520-526.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995; 9: 484-496.
- Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ, Rockman HA. Beta-arrestin-mediated beta-1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2445-2458.
- O'Brien RF, Robbins RJ, McMurty IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol.* 1987; 132: 263-270.
- 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.
- O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, Kusakari Y, Shinji H, Obata T, Hongo K, Komukai K, Kurihara S. Interaction of α_1 -adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Circ Res.* 2008; 102: 1378-1388.
- 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.
- Pabla R, Curtis MJ. Effect of endogenous nitric oxide on cardiac systolic and diastolic function during ischemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28: 2111-2121.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87: 315-424.
- 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.
- Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res.* 2000; 87: 460-466.
- Palaniyandi SS, Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? *Cardiovasc Res.* 2009; 82: 229-239.

- Palmer RM, Ferrige AG, and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.
- Palomeque J, Sapia L, Hajjar RJ, Mattiazzi A, Vila Petroff M. Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK. *Am J Phys Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H96-H106.
- 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.
- Parke DG. Cardiovascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Am J Physiol*. 1995; 268: H2574-H2578.
- Parke DG, May CN. Direct cardiac and vascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Br J Pharmacol*. 1997; 120: 1179-1185.
- Patterson S, Starling EH. On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. *J Physiol*. 1914; 48: 357-379.
- Pedersen BK, Akerström TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol*. 2007; 103: 1093-1098.
- Perez NG, de Hurtado MC, Cingolani HE. Reverse mode of the Na⁺-Ca²⁺ exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res*. 2001; 88: 376-382.
- Perez NG, Gao WD, Marban E. Novel myofilament Ca²⁺-sensitizing property of xanthine oxidase inhibitors. *Circ Res*. 1998; 83: 423-430.
- 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.
- Pi Y, Kemnitz KR, Zhang D, Kranias EG, Walker JW. Phosphorylation of troponin I controls cardiac twitch dynamics: evidence from phosphorylation site mutants expressed on a troponin I-null background in mice. *Circ Res*. 2002; 90: 649-656.
- Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G. Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1995; 92: 1169-1178.
- Pieske B, Beyersmann B, Brey V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation*. 1999; 99: 1802-1809.
- Pimentel DR, Adachi T, Ido Y, Heibeck T, Jiang B, Lee Y, Melendez JA, Cohen RA, Colucci WS. Strain-stimulated hypertrophy in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species-dependent Ras S-glutathiolation. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41: 613-622.
- 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*. 2003a; 285: H112-H118.
- 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*. 2003b; 41: 93-98.
- 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.
- Pollock JS, Nakane M, Battered LD, Martinez A, Springall D, Polak JM, Forstermann U, Murad F. Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1993; 265: C1379-C1387.
- Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res*. 2004; 95: 1140-1153.
- Puceat M, Clement O, Lechene P, Pelosin JM, Ventura-Clapier R, Vassort G. Neurohormonal control of calcium sensitivity of myofilaments in rat single heart cells. *Circ Res*. 1990; 67: 517-524.
- Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, Molkentin JD. Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 14074-14079.
- Rademaker MT, Charles CJ, Lewis LK, Yandle TG, Cooper GJ, Coy DH, Richards AM, Nicholls MG. Beneficial hemodynamic and renal effects of adrenomedullin in an ovine model of heart failure. *Circulation*. 1997; 96: 1983-1990.
- Rae J, Gates P, Watsky M. Low access resistance perforated patch recording using amphotericin B. *J Neurosci Methods*. 1991; 37: 15-26.
- Ramaciotti C, McClellan G, Sharkey A, Rose D, Weisberg A, Winegrad S. Cardiac endothelial cells modulate contractility of rat heart in response to oxygen tension and coronary flow. *Circ Res*. 1993; 72: 1044-1064.
- Rao VS, La Bonte LR, Xu Y, Yang Z, French BA, Guilford WH. Alterations to myofibrillar protein function in nonischemic regions of the heart early after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H654-H659.

- Rauma-Pinola T, Paakko P, Ilves M, Serpi R, Romppanen H, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Hautala T. Adrenomedullin gene transfer induces neointimal apoptosis and inhibits neointimal hyperplasia in injured rat artery. *J Gene Med.* 2006; 8: 452-458.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rousseau E, Smith JS, Meissner G. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca²⁺ release channel. *Am J Physiol.* 1987; 253: C364-C368.
- Rubányi GM, Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol.* 1985; 364: 45-56.
- Rubányi GM. The discovery of endothelin: the power of bioassay and the role of serendipity in the discovery of endothelium-derived vasocative substances. *Pharmacol Res.* 2011; 63: 448-454.
- Saavedra WF, Paolucci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie JS, Harrison RW, Zeichner J, Mudrick D, Marbán E, Kass DA, Hare JM. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ Res.* 2002; 90: 297-304.
- Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell.* 1993; 75: 977-984.
- Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 551-571.
- Saetrum Opgaard O, Hasbak P, de Vries R, Saxena PR, Edvinsson L. Positive inotropy mediated via CGRP receptors in isolated human myocardial trabeculae. *Eur J Pharmacol.* 2000; 397: 373-382.
- 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.
- Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature.* 1996a; 384: 353-355.
- Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure: marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation.* 1996b; 93: 1214-1222.
- 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.
- Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nishizono M, Ichiki Y, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. *FEBS Lett.* 1994; 352: 105-108.
- Sakurai K, Norota I, Tanaka H, Kubota I, Tomoike H, and Endo M. Negative inotropic effects of angiotensin II, endothelin-1 and phenylephrine in indo-1 loaded adult mouse ventricular myocytes. *Life Sci.* 2002; 70: 1173-1184.
- Salazar NC, Chen J, Rockman HA. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1768: 1006-1018.
- 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.
- Samson WK. Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 1999; 61: 363-89.
- Samson WK, Murphy TC. Adrenomedullin inhibits salt appetite. *Endocrinology.* 1997; 138: 613-616.
- Samson WK, Murphy TC, Resch ZT. A novel action of the newly described prolactin-releasing peptide: cardiovascular regulation. *Brain Res.* 2000; 858: 19-25.
- Sand C, Peters SL, Pfaffendorf M, Van Zwieten PA. The influence of endogenously generated reactive oxygen species on the inotropic and chronotropic effects of adrenoceptor and ET-receptor stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003; 367: 635-639.
- Santos CXC, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biol Med.* 2011; 50: 777-793.
- Sato A, Canny BJ, Autelitano DL. Adrenomedullin stimulates cAMP accumulation and inhibits atrial natriuretic peptide gene expression in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 230: 311-314.
- 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.

- Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 379-388.
- Schomisch-Moravec C, Reynolds E, Stewart R, Bond M. Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 159: 14-18.
- Schorlemmer A, Matter ML, Shohet RV. Cardioprotective signaling by endothelin. *Trends Cardiovasc Med.* 2008; 18: 233-239.
- Schouten VJ, Allaart CP, Westerhof N. Effect of perfusion pressure on force of contraction in thin papillary muscles and trabeculae from rat heart. *J Physiol.* 1992; 451: 585-604.
- Seki T, Hagiwara H, Naruse K, Kadowaki M, Kashiwagi M, Demura H, Hirose S, Naruse M. In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 218: 601-605.
- Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, Kambayashi Y, Teraoka H, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca^{2+} mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 4412-4417.
- Shimokubo T, Sakata J, Kitamura K, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Augmented adrenomedullin concentrations in right ventricle and plasma of experimental pulmonary hypertension. *Life Sci.* 1995; 57: 1771-1779.
- 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.
- Simor T, Lóránd T, Gaszner B, Elgavish GA. The modulation of pacing-induced changes in intracellular sodium levels by extracellular Ca^{2+} in isolated perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29: 1225-1235.
- Skoumal R, Szokodi I, Aro J, Földes G, Gööz M, Seres L, Sárman 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.
- Snook JH, Li J, Helmke BP, Guilford WH. Peroxynitrite inhibits myofibrillar protein function in an in vitro assay of motility. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 14-23.
- Solaro RJ, Rarick HM. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res.* 1998; 83: 471-480.
- Solaro RJ. Multiplex kinase signaling modifies cardiac function at the level of sarcomeric proteins. *J Biol Chem.* 2008; 283: 26829-26833.
- Sovershaev MA, Egorina EM, Andreassen TV, Jonassen AK, Ytrehus K. Preconditioning by 17beta-estradiol in isolated rat heart depends on PI3-K/PKB pathway, PKC, and ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H1554-H1562.
- Spieker LE, Mitrovic V, Noll G, Pacher R, Schulze MR, Muntwyler J, Schalcher C, Kiowski W, Lüscher TF. Acute hemodynamic and neurohumoral effects of selective ET_A -receptor blockade in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 1745-1752.
- Spieker LE, Noll G, Ruschitzka FT, Lüscher TF. Endothelin receptor antagonists in congestive heart failure: a new therapeutic principle for the future? *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37: 1493-1505.
- Stangl V, Dschietzig T, Bramlage P, et al. Adrenomedullin and myocardial contractility in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2000; 408: 83-89.
- 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.
- Strömer H, Cittadini A, Szymanska G, Apstein CS, Morgan JP. Validation of different methods to compare isovolumic cardiac function in isolated hearts of varying sizes. *Am J Physiol.* 1997; 272: H501-H510.
- 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.
- Sugo S, Minamino N, Kangawa K, Miyamoto K, Kitamura K, Sakata J, Eto T, Matsuo H. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994a; 201: 1160-1166.
- Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994b; 203: 719-726.
- 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.
- Sütsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim JH, Rickenbacher P, Bertel O. Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation.* 1998; 98: 2262-2268.
- Szokodi I. A szívizom-kontraktilitás peptiderg szabályozó mechanizmusa. *Cardiol Hung.* 2004; 34: E106-E113.
- Szokodi I, Kerkelä R, Kubin AM, Sárman 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.

- Szokodi I, Kinnunen P, Ruskoaho H. Inotropic effect of adrenomedullin in the isolated perfused rat heart. *Acta Physiol Scand*. 1996; 156: 151-152.
- 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.
- Szokodi I, Piuhola J, Ruskoaho H. Endothelin receptor blockade and exacerbation of heart failure. *Circulation*. 2003; 107: e211-e211.
- Szokodi I, Ruskoaho H. Adrenomedullin. In: Cardiovascular hormone systems: from molecular mechanisms to novel therapeutics, ed. Bader M, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2008, 168-191.
- Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkariainen 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.
- Takahashi E, Abe J, Gallis B, Aebersold R, Spring DJ, Krebs EG, Berk BC. p90^{RSK} is a serum-stimulated Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 kinase: regulatory phosphorylation of serine 703 of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1. *J Biol Chem*. 1999; 274: 20206-20214.
- Takanashi M, Endoh M. Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am J Physiol*. 1991; 261: H611-H619.
- Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, Ueta Y, Yada T, Leng G, Onaka T. Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J Clin Invest*. 2008; 118: 4014-4024.
- Takeuchi Y, Kihara Y, Inagaki K, Yoneda T, Sasayama S. Endothelin-1 has a unique oxygen-saving effect by increasing contractile efficiency in the isolated rat heart. *Circulation*. 2001; 103: 1557-1563.
- Takimoto E, Soergel DG, Janssen PML, Stull LB, Kass DA, Murphy AM. Frequency- and afterload-dependent cardiac modulation in vivo by troponin I with constitutively active protein kinase A phosphorylation sites. *Circ Res*. 2004; 94: 496-504.
- Talosi L, Kranias EG. Effects of α -adrenergic receptor stimulation on activation of protein kinase C and phosphorylation of proteins in intact rabbit hearts. *Circ Res*. 1992; 70: 670-678.
- Talukder MA, Norota I, Sakurai K, Endoh M. Inotropic response of rabbit ventricular myocytes to endothelin-1: difference from isolated papillary muscles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281: H596-H605.
- Tanaka H, Namekata I, Takeda K, Kazama A, Shimizu Y, Moriwaki R, Hirayama W, Sato A, Kawanishi T, Shigenobu K. Unique excitation-contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005; 371: 526-534.
- Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37: 676-685.
- Tang WH, Kravtsov GM, Sauert M, Tong XY, Hou XY, Wong TM, Chung SK, Man Chung SS. Polyol pathway impairs the function of SERCA and RyR in ischemic-reperfused rat hearts by increasing oxidative modifications of these proteins. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 49: 58-69.
- 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.
- Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*. 2001; 99: 87-92.
- Tavi P, Laine M, Weckström M. Effect of gadolinium on stretch-induced changes in contraction and intracellularly recorded action- and afterpotentials of rat isolated atrium. *Br J Pharmacol*. 1996; 118: 407-413.
- Terata K, Miura H, Liu Y, Loberiza F, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K(+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279: H2620-H2626.
- Terracciano CM, MacLeod KT. Effects of lactate on the relative contribution of Ca²⁺ extrusion mechanisms to relaxation in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*. 1997; 500: 557-570.
- Terzic A, Puceat M, Clement O, Scamps F, Vassort G. α_1 -Adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. *J Physiol*. 1992; 447: 275-292.
- Terzic A, Puceat M, Vassort G, Vogel SM. Cardiac α_1 -adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev*. 1993; 45: 147-175.
- Thastrup J, Cullen PJ, Drobak B, Hanley MR, Davson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 2466-2470.
- Thomas WG, Brandenburger Y, Autelitano DJ, Pham T, Qian H, Hannan RD. Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ Res*. 2002; 90: 135-142.
- Tokola H, Salo K, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Basal and acidic fibroblast growth factor-induced atrial natriuretic peptide gene expression and secretion is inhibited by staurosporine. *Eur J Pharmacol*. 1994; 267: 195-206.

- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1991; 266: 15771-15781.
- Vahebi S, Ota A, Li M, Warren CM, de Tombe PP, Wang Y, Solaro RJ. p38-MAPK induced dephosphorylation of alpha-tropomyosin is associated with depression of myocardial sarcomeric tension and ATPase activity. *Circ Res.* 2007; 100: 408-415.
- Vandecasteele G, Eschenhagen T, Scholz H, Stein B, Verde I, Fischmeister R. Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 1999; 5: 331-334.
- Varró A, Papp JG. The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. *Cardioscience.* 1992;3:131-144.
- 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.
- von Anrep G. On the part played by the suprarenals in the normal vascular reactions of the body. *J Physiol.* 1912; 45: 307-317.
- Walsh K. Adipokines, myokines and cardiovascular disease. *Circ J.* 2009; 73, 13-18.
- Wang C, Du JF, Wu F, Wang HC. Apelin decreases the SR Ca²⁺ content but enhances the amplitude of [Ca²⁺]_i transient and contractions during twitches in isolated rat cardiac myocytes. *Am J Phys Heart Circ Physiol.* 2008a; 294: H2540-H2546.
- Wang H, Kohr MJ, Wheeler DG, Ziolo MT. Endothelial nitric oxide synthase decreases beta-adrenergic responsiveness via inhibition of the L-type Ca²⁺ current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008b; 294: H1473-H1480.
- Wang H, Sakurai K, Endoh M. Pharmacological analysis by HOE642 and KB-R9032 of the role of Na⁺/H⁺ exchange in the endothelin-1-induced Ca²⁺ signalling in rabbit ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 2000; 131: 638-644.
- Wang QD, Li XS, Pernow J. Characterization of endothelin-1-induced vascular effects in the rat heart by using endothelin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1994; 271: 25-30.
- Watanabe T, Endoh M. Characterization of the endothelin-1-induced regulation of L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 360: 654-664.
- Webb GD, Lim LH, Oh VM, El Oakley R, Lee CN, Wong PS, Aye WM, Chan ES, Moore PK. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the internal thoracic artery and saphenous vein. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 132: 1131-1136.
- Wenzel RR, Fleisch M, Shaw S, Noll G, Kaufmann U, Schmitt R, Jones CR, Clozel M, Meier B, Lüscher TF. Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1998; 98: 2235-2240.
- Wenzel S, Tastan I, Abdallah Y, Schreckenber R, Schluter KD. Aldosterone improves contractile function of adult rat ventricular cardiomyocytes in a non-acute way: potential relationship to the calcium paradox of aldosteronism. *Basic Res Cardiol.* 2010; 105: 247-256.
- Westerhof N, Boer C, Lamberts RR, Sipkema P. Cross-talk between cardiac muscle and coronary vasculature. *Physiol Rev.* 2006; 86: 1263-1308.
- Wetzker R, Böhmer FD. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 651-657.
- Winegrad S. Endothelial cell regulation of contractility of the heart. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 505-525.
- Wolska BM, Arteaga GM, Peña JR, Nowak G, Phillips RM, Sahai S, de Tombe PP, Martin AF, Kranias EG, Solaro RJ. Expression of slow skeletal troponin I in hearts of phospholamban knockout mice alters the relaxant effect of β-adrenergic stimulation. *Circ Res.* 2002; 90: 882-888.
- Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q. Subtype-specific α₁- and β-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 330-337.
- Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* 1994; 78: 473-485.
- Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res.* 1997; 80, 76-81.
- Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 657-662.
- Xu N, Wang H, Fan L, Chen Q. Supraspinal administration of apelin-13 induces antinociception via the opioid receptor in mice. *Peptides.* 2009; 30: 1153-1157.
- Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 1996; 271: 3221-3228.
- Yanagawa B, Nagaya N. Adrenomedullin: molecular mechanisms and its role in cardiac disease. *Amino Acids.* 2007; 32: 157-164.
- 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⁺-Ca²⁺ exchange in endothelin-1-induced increases in Ca²⁺ transient and contractility in rabbit ventricular myocytes: pharmacological analysis with KB-R7943. *Br J Pharmacol*. 1999; 126: 1785-1795.
- Yang HY, Liu JC, Chen YL, Chen CH, Lin H, Lin JW, Chiu WT, Chen JJ, Cheng TH. Inhibitory effect of trillinolein on endothelin-1-induced c-fos gene expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005; 372: 160-167.
- Yang LL, Gros R, Kabir MG, Sadi A, Gotlieb AI, Husain M, Stewart DJ. Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation*. 2004; 109: 255-261.
- Yoshimoto R, Mitsui-Saito M, Ozaki H, Karaki H. Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. *Br J Pharmacol*. 1998; 123: 1645-1654.
- 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.
- Zhao XS, Pan W, Bekeredjian R, Shohet RV. Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vivo. *Circulation*. 2006; 114: 830-837.
- 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.
- Zheng M, Zhang SJ, Zhu WZ, Ziman B, Kobilka B, Xiao RP. β_2 -Adrenergic receptor-induced p38-MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by Gi or G $\beta\gamma$ in adult mouse cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2000; 275: 40635-40640.
- Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res*. 2006; 71: 310-321.
- Zimmet JM, Hare JM. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. *Circulation*. 2006; 114: 1531-1544.
- Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 45: 625-632.
- Zolk O, Münzel F, Eschenhagen T. Effects of chronic endothelin-1 stimulation on cardiac myocyte contractile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286: H1248-H1257.

8. Saját közlemények

(A közlemények felsorolása tematikusan, az Értekezésben bemutatottaknak megfelelően történt.)

8.1. Az Értekezés 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, Piihola 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, 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 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. Sárman B, Skoumal R, Leskinen H, Rysä J, Ilves M, Soini Y, Tuukkanen J, Pikkarainen S, Lakó-Futó Z, Sárman 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, Sárman 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 mechanizmusa.
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. Hozzászólás

- 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. Selmeči 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. Hautalla 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 árvarceptor 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, Piuholta 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 pathophysiological 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, Selmecci 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**, Selmecci 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, Gellér L, Kiss P, Selmecci 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 Baláznak, 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 Kerkelät (University of Oulu, Oulu, Finnország), illetve Marczin 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 lélkörért, amellyel a mindennapokban körülvesznek, a hitért és támogatásért, amely meghatározó volt e munka létrejöttében.