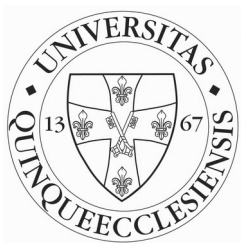


Az endogén apelin and endothelin peptidek pozitív inotróp hatásának vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés

dr. Perjés Ábel.

Témavezető: Dr. Szokodi István, Ph.D
Programvezető: Prof. Dr. Koller Ákos
Iskolavezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Szívgyógyászati Klinika

2014

ÁLTALÁNOS BEVEZETŐ

Szívelégtelenség (SZE) az az állapot, amelyben a szív által egy adott időpillanatban keringtetett vér mennyisége (perctérfogat) nem elegendő, ahhoz, hogy megfeleljen perifériás szervekben jelentkező a keresletnek. Ez csökkent fizikai terhelhetőséghez és perifériás szervi károsodáshoz vezet, romlik az életminőség és csökken a várható élettartam. A népesség átlagéletkorának növekedésével párhuzamosan az akut és krónikus szívelégtelenség előfordulása is folyamatosan növekszik, így a szívelégtelenség az egyik vezető halálókká vált és hatalmas terhet jelent mind a betegek, mind pedig az egészségügyi ellátórendszerek számára Európában és az USA-ban egyaránt¹⁻³. Bár jelentős javulás tapasztalható a krónikus SZE kezelésének hatékonyságában⁴, az akut SZE epizódok túlélési adatai nem változtak az elmúlt három évtizedben⁵. A SZE betegek hosszú távú túlélése nagyban összefügg a betegség akut exacerbációs epizódjainak hatékony és gyors ellátásától. Az akut SZE-ben a keringés romló hemodinamikai funkciója a tünetek kiváltó oka, és kezelés fókuszában ennek helyreállítása áll. A fő nehézség a SZE terápiája kapcsán az, hogy a hagyományos inotróp szerek, bár javítják a szív hemodinamikai paramétereit, kifejezetten károsak vagy pusztán hatástalanok a hosszú távú túlélés szempontjából. Proarrhythmogén hatásaik miatt a β -adrenerg agonisták⁶ és foszfodiészteráz-gátlók használata⁷ csak rövid távú intenzív terápiás beavatkozás idejére korlátozódnak, vagy esetleges szívűtétig tartó periódus áthidaló megoldásként alkalmazhatóak. A szívglikozidok is második vonalbeli kezelésként ajánlottak csak krónikus SZE-ben, mivel ezek sem javítják a betegek mortalitását⁸. Így tehát elmondható, hogy komoly igény lenne olyan terápiás szerre, mely úgy tudná javítani a szívizom összehúzódásának erejét, hogy emellett hosszú távon is javítaná a betegek túlélését. Hogy ezt elérhessük, elengedhetetlen, hogy jobban megértsük a szívizom kontraktilitás endogén szabályozását.

A szívizom-összehúzódásának ereje folyamatos idegi szabályozás, valamint endokrin, parakrin és autokrin faktorok befolyása alatt áll. A vegetatív idegrendszer behálózza a szívet: szimpatikus ingerekre a neurotranszmitter noradrenalin felszabadulása növeli a pulzusszámot

és a szívizom összehúzódását. Az adrenokortikotrop hormon, valamint a szimpatikus aktivitás hatására mellékvese velőből adrenalin és noradrenalin szabadul a véráramba, amely a szív endokrin szabályozását szolgálja. Szív különböző szövetei, mint a szívizomsejtek, fibroblasztok és vaszkuláris endoteliális és simaizom sejtek szintén számos humorális faktort termelnek, amelyek között az endotelin (ET)⁹, az apelin¹⁰ és az adrenomedullin¹¹ peptidek mint pozitív inotróp hatású anyagok lettek azonosítva. A β -adrenerg jelátvitel krónikus stimulálása megnövekedett mortalitáshoz vezet. Az újonnan felfedezett kardiális endogén peptidek, mint az ET, vagy az apelin és az adrenomedullin azonban új irányt jelenthetnek a SZE kezelésében, mivel inotróp hatásuk jelentősen eltér a β -adrenerg stimulustól mind a hatás jellege, mind a mögöttes jelátviteli mechanizmusok tekintetében.

BEVEZETŐ

Endothelin a kardiovaszkuláris rendszerben

Ahogy a 1980-as évek elején nyilvánvalóvá vált, hogy az endotheliális sejtek vasoaktív anyagokat is termelnek, intenzív kutatás kezdődött e faktorok azonosítására. Az ET-1 -melyet először 1988-ban izoláltak¹²- jelen ismereteink szerint a leghatékonyabb és egyben a legtartósabb hatást kiváltó endogén vasoaktív anyag¹³. Az ET-1 többek között a vaszkuláris endothel- és simaizomsejtek, szívizomsejtek, fibroblasztok, makrofágok, légúti epiteliális sejtek, hasnyálmirigy szigetsejtek és az agyi neuronok által termelődik. Normál élettani körülmények között az ET-ek nem keringő hormonok, hanem mint autokrin és parakrin faktorok működnek a szervezeten több pontján¹⁴. Az ET-1-nek számos funkciója van a szívben. Szerepet játszik a szívkoszorúerek tónusának szabályozásában, és serkenti a szívizomsejt növekedését és a fibroblaszt proliferációt. Ezen túlmenően az ET-1 pozitív inotróp hatása fontos szabályozója a szívizom kontraktilitásnak¹⁵⁻¹⁷. Különösen érdekes, hogy az endogén ET-1-ről kimutatták, hogy hozzájárul a Gregg hatás (a kontraktilis erő fokozódása a koronária áramlási sebesség növekedésének hatására)¹⁸, a Frank-Starling válasz¹⁹, és az Anrep effektus²⁰ kialakulásához. Az ET-1 kétféle típusú G-proteinhez kapcsolt receptorhoz (GPCR) képes kötődni (ETA és ETB receptorok)²¹, melyek közvetítik a peptid különböző

hatásait a sejt felé. Mind az ETA, mind az ETB receptorok expresszálódnak a kardiomiociták felszínén, az ETA receptor jelentős, 85-90%-os túlsúlyával²². Az ET-1 pozitív inotróp hatásáért az ETA receptor felel²³.

In vitro vizsgálatok azt sugallták, hogy az ET-1 pozitív inotróp hatásának legnagyobb részét a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységének fokozásával éri el. Ugyanakkor az inotróp válasz az intracelluláris kalcium tranziens kismértékű fokozódásával is jár²⁴⁻²⁶. Azonban a pontos sejten belüli mechanizmusok egyelőre feltáratlanok. Szívizomsejtekben az ETA receptor általánosan elfogadott álláspont szerint G_q -proteineken keresztül aktiválja a protein kináz C (PKC) jelátviteli kaszkádot^{15,16}. Korábbi vizsgálatok azt sugallják, hogy az ET-1 a Na^+ -proton pumpa (NHE) PKC-függő aktiválása által fejt ki kontraktilitást fokozó hatását²⁷⁻²⁹. A NHE stimulálása a sejten belüli pH-t lúgos irányba tolja el, ezáltal fokozza a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységét^{27,30}. Ugyanakkor a NHE által a sejtbe bejuttatott extra Na^+ indirekt módon, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter (NCX) reverz módjának aktiválása által hozzájárulhat a sejtbe beáramló Ca^{2+} szintjének emelkedéséhez^{20,25}. Ezen felül az ET-1 képes fokozni az intracelluláris Ca^{2+} tranziens az L-típusú Ca^{2+} csatornán keresztül is²⁴. Habár egyes szerzők a PKC-nak központi szerepet tulajdonítanak az ET-1 jelátviteli rendszerében, saját kutatási eredményeink alapján a PKC részvétele az ET-1 inotróp hatásának közvetítésében kevésbé valószínű³¹.

Munkacsoportunk kimutatta, hogy a mitogén aktiválta protein kinázok (MAPK) családjába tartozó extracelluláris szignál regulálta kináz 1 és 2 (EK1/2) kritikus szereppel bírnak az ET-1 inotróp hatásának közvetítésében³¹. Az ERK1/2 aktivációja a NHE foszforilációjához vezethet akár közvetlenül, akár a p90 riboszómális S6 kinázon (p90RSK) közvetítésével^{32,33}. Csoportunk bemutatta, hogy nagy valószínűséggel a sejtmembránhoz kötött p90RSK közvetíti az ET-1 hatását a NHE felé³¹.

Az ET-1 jelátvitel módosítása reaktív oxigén gyökök által

A reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) túlzott termelődése számos kórtani állapotban jellemző, így a kongesztív szívelégtelenségben is. Mint ismert, az oxidatív stressz egy sor változást indukál

szívelégtelenségben, úgyis mint szívizomsejt-hypertrófia, apoptózis, nekrozis és intersticiális fibrózis, melyek mind hozzájárulnak a pumpafunkció romlásához. Ezen felül a nagy mennyiségű ROS képes az excitációs-kontrakciós apparátus számos fehérjéjének aktivásán direkt módon változtatni; ezáltal az oxidatív stressz közvetlenül lehet felelős a kontrakciós diszfunkció kialakulásáért³⁴⁻³⁷. Ezzel szemben nemrég kimutatták, hogy az endogén termelt ROS, mint jelátviteli molekulák, szerepet játszhatnak az ET-1 pozitív inotróp hatásának közvetítésében. Akut ET-1 kezelés fokozta a ROS termelődését izolált patkány³⁸ és macska³⁹ szívizomsejtekben. Antioxidánsokkal ezt a hatást ki lehet védeni mindkét modellben^{38,39}. Ezen felül a gyökfogók a ROS termelődésének megakadályozása mellett gátolták az exogén ET-1 által kiváltott pozitív inotróp választ is, azt sugallva, hogy az ET-1 inotróp hatása szabadgyök függő^{39,40}. Azonban a ROS miokardiumban betöltött funkcionális szerepéről egyelőre kevés adat áll rendelkezésre.

Apelin a szív- és érrendszerben

1993-ban egy új, G-protein kapcsolt receptort azonosítottak homológia-klónozásos módszerrel. Ez a receptor, melyet APJ-nek neveztek el, nagy fokú homológiát mutat az angiotenzin II 1-es típusú receptorával (AT1-R), azonban nem képes kötni az angiotenzin II-t⁴¹. Az APJ árva receptor maradt egészen 1998-ig, amikor is endogén ligandját, az apelint elsőként sikerült izolálni szarvasmarha gyomor kivonatából. Az apelint egy 36 aminosavból álló peptidként azonosították⁴², később nemzetközi konszenzus alapján a receptor nevét is „apelin receptor”-ra módosították⁴³. A (Pyr1)apelin-13 a leghatékonyabb és legnagyobb mennyiségben előforduló apelin izoforma szívizomban⁴⁴. Az apelin és az apelin receptor számos szervben és szövetben megtalálható. Emberben az apelin prekursorának, illetve az apelin receptorának mRNS-e kimutatható a központi idegrendszerben, a szívben, tüdőben, vesékben, a méhlepényben és az emlőmirigyben. Mind az apelin, mind annak receptora azonosítható immunhisztológiai módszerekkel az endotheliális sejtekben és a vaszkuláris simaizomsejtekben a humán érrendszer teljes hosszában. A szívben az apelin receptorra jellemző immunreakció volt detektálható az endokardiumban és, kisebb mértékben ugyan, de a miokardiumban is⁴⁵. Az apelin receptor

miokardiális sűrűsége összemérhető az AT1-R-ével, de jóval alacsonyabb az ET-1 receptorénál⁴⁶. Immunhisztológiai vizsgálatok az apelin peptidet kimutatták az endokardiális endotelből⁴⁷. Ez az eloszlási mintázat, a peptid alacsony plazma szintje és a keringő peptid rövid féléletideje mind arra utal, hogy az apelin autokrin illetve parakrin faktorként működik a szív- és érrendszerben.

Nem sokkal a felfedezése után az apelinről kiderült: potens értágító és pozitív inotróp hatással rendelkezik, mely kombináció meglehetősen ritka az endogén ágensek közt. További vizsgálatok kiderítették, hogy a peptid fontos szerepet játszik az érújdonképződés és a szív magzati fejlődése során is. A peptid pozitív inotróp szerepét igazolták intakt¹⁰ és elégtelen⁴⁸ patkány szívben és emberben egyaránt⁴⁹. Mivel szubnanomoláris tartományban is hatásos már, az apelin az egyik legpotensebb endogén pozitív inotróp szer amit eddig azonosítottak, melynek maximális hatása az izoproterenol hatásának mintegy 70 %-át éri el. Ez az inotróp hatás az izolált patkányszívekben összemérhető más, ismert endogén inotróp peptidok, úgyis mint az ET-1³¹ 1 és az adrenomedullin¹¹ hatásával.

A humán apelin receptor (korábbi nevén APJ) a G-protein kapcsolt receptorok tipikus, 7 transzmembrán doménből álló struktúrájával rendelkezik és nagyfokú hasonlóságot mutat az AT1-R-ral. Azonban az angiotenzin II nem kötődik az apelin receptorhoz⁴². Az apelin legalább kétféle különböző foszforilációs szignált aktivál. Az egyik jelátviteli szabályozó a foszfatidilinozítid 3-kináz-Akt kaszkád, a másik pedig ERK által mediált. Ezek az apelin-indukálta jelátviteli utak pertussis toxin (PTX) érzékenyek, azt sejtetve, hogy ezek a mechanizmusok G_i proteineken keresztül aktiválódnak⁵⁰.

Az apelin fokozhatja a szívizom kontraktilitást egyaránt PTX-rezisztens G_q- és PTX-érzékeny G_i proteineken keresztül. PLC, PKC, NHE és NCX mind az apelin-indukálta pozitív inotróp válasz jelátvitelében résztvevő molekulákként lettek azonosítva^{10,51}. Azonban egyelőre vita tárgya, hogy az apelin fokozza-e a kalcium sejtbe történő beáramlását, vagy kizárólag a miofilamentum Ca²⁺ érzékenységének fokozásán keresztül fejt ki inotróp hatását^{48,51,52}.

A kezdeti vizsgálatok arra utaltak, hogy a kontraktilitás PKC-függő növekedése a NHE aktivitásának fokozásán és járulékos alkalizáción keresztül valósul meg²⁷. Azonban újabb eredmények azt bizonyítják, hogy a PKC-függő inotrópia nem társul intracelluláris pH változással⁵³. Lehetséges ugyanakkor, hogy a PKC aktivációja a miofibrillumok Ca²⁺ érzékenységének növelésén keresztül növeli a szívizom kontraktilitását. Ez az érzékenyítés létrejöhet akár a miozin könnyű lánc (RLC)⁵⁴ vagy a troponin I^{55,56} foszforilációján keresztül. Emellett a PKC-ről az is elképzelhetőnek tartható, hogy képes az L-típusú Ca²⁺ csatornán keresztül a Ca²⁺ tranzienseket növelni^{57,58}. A konkrét PKC izoenzim, mely az apelin inotróp hatását közvetíti, egyelőre nem ismert.

A tézis célkitűzései

Nagy mennyiségű adat támasztja alá az ET-1 illetve az apelin kardiovaszkuláris jelentőségét. Kontraktilitást szabályozó szerepük pontos tisztázása új terápiás lehetőségeket tárhat fel a szívelégtelenség kezelésében. Célunk az volt, hogy feltárjuk a peptidek által kiváltott pozitív inotróp válasz pontos jelátviteli mechanizmusait, különös figyelmet fordítva az alábbiakra:

- 1) az endogén ROS termelés szerepe
- 2) MAPK-ok aktivációja
- 3) az apelin jelátvitelében részt vevő PKC izoforma azonosítása
- 4) és olyan apelin-indukálta szubcelluláris mechanizmus(ok) feltárása, amely lehetővé teszi a Ca²⁺ érzékenység befolyásolását

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Izolált patkányszív perfúzió

Az Oului Egyetem Kísérleti Állat Központjából származó 7 hetes hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk fel kísérleteinkhez (n=316). Minden kísérletünk az Oului Egyetem Kísérleti Állatok Felhasználást és Gondozást Felügyelő Bizottsága által jóváhagyott protokolt követve hajtottunk végre. A patkányszíveket Langendorff módszer szerint izoláltuk és retrográd módon perfundáltuk, mint ahogy korábban leírtuk³¹. A kontrakciók erejét (apikobazális elmozdulás) egy

elektronikus erőmérővel regisztráltuk (FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) amelyet egy, a szívcsúcshoz rögzített horoggal kötöttünk össze és 20 mN-os előfeszítésnek tettünk ki. Állandó áramlás mellett a koronária nyomásra jellemző perfúziós nyomást mértünk nyomástransducer segítségével (model BP-100, iWorx Systems, Inc., Dover, NH, USA), mely a perfúziós rendszer oldalágához kapcsolódott. Az izolálást ekvilibrációs fázis követte (40 ± 4 min), majd a kísérleteket egy 5 perces kontrol periódus után indítottuk. A különböző szerekkel 5, 10, 15 illetve 20 percig kezeltük a szíveket. A kísérletek után a szíveket gyorsan feldolgoztuk és a bal kamrából vett mintákat folyékony nitrogénbe mártva lefagyasztottuk, majd -70 C fokon tároltuk további feldolgozásig.

Western blot

A fagyasztott bal kamrai szövetet megőröltük folyékony nitrogén alatt, majd a feloldottuk és homogenizáltuk jéghideg lízispufferben. A mintákat ezek után centrifugáltuk és a felülúszót begyűjtöttük. A fehérjeizolátumokat standard koncentrációra hígítottuk és azonos mennyiségű proteint ($30 \mu\text{g}$) vittünk fel a 10 %-os SDS poliakrilamid gél minden sávjába. Elektroforézist követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át. A fehérje mennyiségét fluoreszcens és kemilumineszcens módszer segítségével határoztuk meg, ahogy korábban már leírtuk³¹. A blotok kvantifikációja Quantity One Basic 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) programmal történt.

Intracelluláris ROS mérés

ROS termelődését etidium fluoreszcencia módszer segítségével határoztuk meg, ahogy ezt mások korábban leírták⁵⁹. Ezen kísérletek során a patkány szívek dihidroetidiumot ($10 \mu\text{mol/l}$) tartalmazó pufferrel lettek perfundálva kísérleti szerrel vagy anélkül, melyet egy 5 perces etidium kimosási periódus követett. A nem fluoreszcens dihidroetidium a sejtbe kerülve az intracelluláris ROS által oxidálódik, mely reakció során etidium keletkezik, mely a DNS-hez kötődik. A dihidroetidium oxidálódása és a következményes fluoreszcencia erősödés egyenesen arányos a ROS szinttel, elsődlegesen a szuperoxid anion mennyiségével⁶⁰. A kezelés végeztével a szíveket gyorsan

szeleteltük, majd a mintákat Tissue Tec O.C.T. (Sakura Finetek Europe B.V, Zoeterwoude, NL) anyagba ágyasztuk és lefagyasztottuk ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) mígnem $20\text{ }\mu\text{m}$ -es kriosekcióra kerültek. A metszeteken a fluoreszcenciát Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkóppal mértük.

Statisztikai analízis

Az eredményeinket $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formátumban ábrázoljuk. Két utas ismételt mérés ANOVA tesztet használtunk, hogy a különböző kezelések kontraktilitásra kifejtett hatását elemezzük. Ha az ANOVA teszt a kezelések időbeli lefutásában szignifikáns különbséget detektált, akkor az egyes kezelési csoportok Bonferroni poszt-hoc teszttel hasonlítottuk össze. Ha csak 2 csoportot kellett összehasonlítani, párosítatlan T-próbát alkalmaztunk. Minden más esetben egy utas ANOVA tesztet használtunk Bonferroni poszt-hoc teszttel kombinálva. Szignifikánsnak $P < 0,05$ esetet tekintettünk.

EREDMÉNYEK

ET-1 fokozza az intracelluláris ROS termelődését

Korábban az ET-1-ről már kimutatták, hogy fokozza a sejten belüli ROS termelődést sejtenyészetekben patkány, egér és macska szívizomsejteken^{39,40,61,62}. Hogy tanulmányozzuk, hogy az ET-1-nek van-e hatása a ROS termelésre izolált patkányszívben, fluoreszcens mikroszkóp segítségével megmértük a ROS-függő dihidroetidium oxidációt az izolált szívekből készített fagyasztásos metszeteken⁵⁹. Etidium fluoreszcencia detektálható volt minden metszetről. ET-1-gyel (1 nmol/L) és dihidroetidiummal ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) kezelt szívekben szignifikánsan magasabb etidium fluoreszcenciát mértünk, mint a kontrol csoportban ($P < 0,01$). Az antioxidáns N-acetilcisztein (NACC) ($500\text{ }\mu\text{mol/L}$) kivédte az ET-1 által indukált etidium fluoreszcencia növekedést ($P < 0,001$), míg a gyökfogó önmagában csak egy enyhe hatást fejtett ki a fluoreszcenciára ($P < 0,05$).

ET-1 a ROS termelés fokozása által növeli a szívizom kontraktilitását

Hogy meghatározhatjuk, az ET-1 hatására termelt ROS befolyásolja-e a kontraktilis válasz kialakulását, az antioxidáns NACC-tel és a

szuperoxid-dizmutáz (SOD) mimetikum MnTMPyP-vel⁶³ egészítettük ki az ET-1 kezelést. Izolált patkányszívben az ET-1 (1 nmol/l) 10 perces infúziója a kamrai kontraktilitás lassan kialakuló, de tartós növekedéshez (43%, $P < 0,001$) vezet, mint ahogy arról már korábban is beszámoltunk^{18,31}. NACC infúzió (500 $\mu\text{mol/L}$) önmagában nem befolyásolta a kontraktilitást ($P = \text{NS}$). Amikor a NACC az ET-1-gyel kombinációban került alkalmazásra, az antioxidáns szignifikánsan gyengítette az ET-1 pozitív inotróp hatását. Ez a gyengítés a teljes hatás mintegy 33%-át jelentette 10 perces perfúzió esetén ($P < 0,001$). Ehhez hasonlóan, amikor az ET-1 MnTMPyP (10 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében került alkalmazásra, a peptid által kiváltott inotróp hatás 35 %-kal gyengébbnek bizonyult ($P < 0,05$). MnTMPyP önmagában nem befolyásolta a kontraktilis erő nagyságát ($P = \text{NS}$).

NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS vesz részt az ET-1-indukálta inotróp válasz kialakulásában

A membránhoz kapcsolt NAD(P)H-oxidázok fontos forrásaik a miokardiális $\text{O}_2\cdot^-$ ionoknak^{64,65}. Korábban kimutatták, hogy az ET-1 aktiválja a NAD(P)H-oxidázt és ROS termelést indukál patkány szívmozsejt-tenyészetben⁶⁶. A NAD(P)H-oxidáz kontraktilitásra vonatkozó hatását megvizsgálandó az apocynin nevű farmakológiai gátlószert alkalmaztunk⁶¹. ET-1-gyel együtt alkalmazva az apocynin (100 $\mu\text{mol/L}$) szignifikánsan gyengítette az ET-1 által indukált inotróp választ a kísérlet teljes időtartama alatt, 10 percnél mintegy 36 %-os gátlást produkálva ($P < 0,001$). Apocynin egyedül nem befolyásolta a kontrakciós erőt ($P = \text{NS}$). Az izolált szívben történt ROS mérések kimutatták továbbá, hogy az apocynin meggátolta az ET-1 kezelés hatására jelentkező etidium-fluoreszcencia fokozódást ($P < 0,001$), míg a szer önmagában adva nem befolyásolta a fluoreszcencia intenzitását ($P = \text{NS}$).

A mitoK_{ATP} csatorna gátlása gyengíti az ET-1 indukálta inotróp választ

A mitokondriális ATP függő K^+ csatorna (mitoK_{ATP}) nyitása bizonyítottan növeli a mitokondriális ROS képződését⁶⁷⁻⁶⁹. Ezért mi megvizsgáltuk, hogy a mitoK_{ATP} a ROS produkció fokozásán keresztül részt vesz-e az ET-1 által kiváltott inotróp válasz közvetítésében. A

mitoK_{ATP} szerepét farmakológiai gátlószere, az 5-HD (200 μmol/L) segítségével vizsgáltuk⁶⁷. 5-HD infúzió egyedül nem volt hatással a kamrai kontraktilitásra (P=NS). Amikor a gátlószert az ET-1-gyel kombinációban adtuk, akkor a gátlószer 43 %-kal gyengítette az ET-1 által kiváltott kontrakciós erő növekedést (P<0,001). ROS mérések azt mutatták, hogy bár az 5-HD önmagában szignifikánsan csökkentette az etidium fluoreszcenciát (P<0,05), az ET-1 mégis képes volt fokozni a dihidroetidium oxidációját 5-HD jelenlétében (P<0,05). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mitoK_{ATP} nyitása szükséges az ET-1 inotróp hatásának teljes kifejlődéséhez, azonban ez a hatás nem ROS mediált.

A BK_{Ca}, de nem a sarcK_{ATP} csatornák érintettek az ET-1-indukálta inotróp válasz kialakulásában

A mitoK_{ATP} mellett megvizsgáltuk további K⁺ csatornák szerepét az ET-1 kontraktilitást fokozó hatásának kialakításában. A mitokondriális nagy vezetőképességű Ca²⁺ aktiválta K⁺ csatornák (BK_{Ca}) és a szarkolemmális K⁺-ATP csatornák (sarcK_{ATP}) jelentőségét farmakológiai inhibitorok segítségével vizsgáltuk. A BK_{Ca} gátlószer paxilline⁷⁰ (1 μmol/L) önmagában nem befolyásolja az inotrópiát, azonban 41 %-kal gyengítette az ET-1 által kiváltott kontraktilitás növekedést (P<0,01). A sarcK_{ATP} gátló HMR1098⁷¹ (3 μmol/L) azonban nem volt hatással az ET-1 indukálta inotróp válaszra (P=NS). Ezen adatok azt mutatják, hogy a mitokondriális BK_{Ca} csatorna igen, de a sarcK_{ATP} csatorna nem érintett az ET-1 inotróp válaszában kifejlődésében.

ET-1-stimulált ROS termelés fokozza az ERK1/2 foszforilációját

Nemrég kimutattuk, hogy az ERK1/2 aktivációja jelentős szerepet játszik az ET-1 pozitív inotróp hatásának kialakításában³¹. Mivel az ERK1/2 foszforilációt redox-szenzitívnek tartják kardiomiocita tenyészetekben gyűjtött adatok alapján^{72,73}, megvizsgáltuk, vajon a ROS hogyan módosítja az ERK1/2 aktivációt az intakt felnőtt patkányszívben. Korábbi adatainkkal egybehangzóan³¹, 10 perces ET-1 (1 nmol/L) kezelés növeli a foszforilált ERK1/2 mennyiségét (P<0,001). NACC (500 μmol/L), MnTMPyP (10 μmol/L) vagy apocynin (100 μmol/L) szignifikánsan gyengítette az ET-1-indukálta ERK1/2

foszforilációt ($P < 0,01$; $P < 0,001$ és $P < 0,05$). A gátlószerek egyedül adva nem voltak hatással az ERK1/2 foszforilációjára ($P = \text{NS}$). Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a ROS az ERK1/2 útvonal proximális aktivátoraiként mediálhatja az ET-1 inotróp hatását.

Az apelin pozitív inotróp hatása a PKC ϵ izoformán keresztül mediált

Izolált patkányszívben az apelin (2 nmol/L) infúziója a kontraktilis erő fokozatosan kialakuló, hosszan tartó növekedéséhez vezet ($27 \pm 3\%$, $P < 0,001$), megerősítve azt a korábbi megfigyelésünket, mely szerint az apelin jelentős pozitív inotróp hatással rendelkezik a 0.1-10 nmol/L koncentrációtartományban¹⁰. Az előző vizsgálatunk azt sugallta, hogy az apelin a PLC-PKC kaszkádon keresztül hathat¹⁰. Ezzel összhangban, csakúgy, mint előző kísérleteinkben, a szelektív PKC gátlószert Bis (90 nmol/L) 42 %-kal ($P < 0,05$) csökkentette az apelin által kiváltott inotróp hatást¹⁰. Bis kezelés önmagában nem volt hatással a kontraktilitásra ($P = 1.0$ vs. kontrol).

Hogy a PKC érintettségéről további bizonyítékokat gyűjtsünk, megvizsgáltuk a szívizom-kontraktilitás szabályozásának szempontjából legjelentősebb PKC izoformák, a PKC α és a PKC ϵ ^{74,75} viselkedését. A különböző PKC izoformákra jellemző, hogy aktivációjuk során a citoszolból a sejtmembrán frakcióba helyeződnek át⁷⁶. A kontrolhoz képest az apelinnel 5 percig kezelt felnőtt patkányszívben jelentős PKC ϵ felhalmozódás figyelhető meg a szívizomsejtek partikuláris frakciójában. Hosszabb, 10 perces kezelés után ez a felhalmozódás már nem mutatható ki, azt jelezve, hogy az apelin által kiváltott PKC ϵ aktiváció átmeneti jellegű. A PKC ϵ -nal ellentétben a PKC α az apelin kezelés egyetlen vizsgált időpontjában sem mutatta jelét transzlokációnak.

Az apelin-indukálta inotrópia RLC mediált

Korábbi megfigyeléseink alapján azt gondoljuk, hogy az apelin pozitív inotróp hatása nagyrészt a miofilamentum Ca²⁺ érzékenységének növelése révén jön létre, nem pedig a beáramló Ca²⁺ mennyiségének fokozása által⁵². A RLC fokozott foszforilációját a miozin könnyű lánc kináz (MLCK) végzi⁷⁷, növelve a miofilamentum Ca²⁺ érzékenységét⁷⁸. Hogy megvizsgáljuk, az RLC foszforilációja milyen szerepet játszik az apelin-indukálta pozitív inotróp hatás

kialakításában, a MLCK szelektív és potens gátlószerét, az ML-7-et alkalmaztuk izolált patkányszívben. Az ML-7 (1 $\mu\text{mol/L}$) szignifikánsan gyengítette az apelin hatására kialakult inotróp választ, a gátlás maximuma elérte a teljes hatás 52.5 %-át ($P < 0,01$). ML-7 önmagában nem mutatott eltérést a kontrolhoz képest ($P = 1.0$).

Ezt követően urea-glycerol PAGE-et végeztünk, hogy a patkányszívekből izolált fehérjékből elválasszuk a foszforilált RLC fehérjét a nem foszforiláltaktól. Az általunk detektált bazális RLC foszforilációs szint megegyezett a hasonló technikát alkalmazó közleményekben található eredményekkel^{77,79}, azonban az apelin kezelés jelen körülmények közt nem vezetett semmilyen detektálható változáshoz az RLC foszforilációt illetően.

Apelin és a MAPK jelátviteli rendszer

Meghatároztuk az apelin stimulus hatására létrejövő változásokat az ERK1/2 és a p38-MAPK foszforilációs állapotában a célból, hogy feltárjuk a MAPK-ok lehetséges érintettségét az apelin által aktivált jelátviteli rendszerben. Immunoblot vizsgálatunk kimutatta, hogy az apelin tartós emelkedést okoz a bal kamrai ERK1/2 foszforilációjában ($P < 0,01$ 5 percnél, $P < 0,05$ 10 és 20 perceknél vs. kontrol), a legnagyobb növekedés (99 ± 23 %) 10 perces időpontban detektálható. A p38-MAPK foszforilációja 5 percnél növekedő tendenciát mutatott, azonban a változás nem volt szignifikáns. Ezzel szemben 10 perces apelin kezelés szignifikánsan csökkentette a p38-MAPK foszforilációját (-65 ± 3 % vs. kontrol, $P < 0,05$).

Hogy bemutassuk, az ERK1/2 aktivációja elengedhetetlen az apelin indukálta pozitív inotróp válasz kialakulásához, az U0126 nevű farmakológiai inhibitor használtunk. Ez az anyag az ERK1/2 proximális aktivátorának, a MEK1/2 szelektív gátlószere. Az apelin inotróp hatását az U0126 (5 $\mu\text{mol/L}$) szignifikánsan csökkentette, a gátló hatás maximuma elérte az eredeti növekmény 56 %-át ($P < 0,05$ vs. apelin). U0126 önmagában nem befolyásolta a kontraktilitást ($P = 1,0$ vs. kontrol). Immunoblot technikával azt is kimutattuk, hogy 15 perc kezelés után az U0126 hatására a foszforilált ERK1/2 minimális szintűre csökkent akár önmagában adtuk (a foszfo-ERK1/2 mennyisége a kontrol csoport 31 ± 15 %-a, $P < 0,01$ vs. kontrol), akár az apelinnel

kombináltuk az U0126-ot (az apelin csoport foszfo-ERK1/2 szintjének $4\pm 8\%$ -a, $P < 0.001$ vs. apelin).

A PKC ϵ transzlokációja újszülött patkány kamrai miocitákban ERK1/2 aktivációval jár együtt⁸⁰. Mivel kísérleteinkben az apelin szignifikánsan fokozta a PKC ϵ transzlokációját, megvizsgáltuk, hogy vajon a PKC az ERK1/2 proximális aktivátoraként viselkedik-e apelin stimulus alatt. Érdekes módon azt találtuk, hogy a Bis, amely az apelin által kiváltott inotróp választ hatásosan gyengítette, semmilyen hatással nem bírt az apelin-indukálta ERK1/2 foszforilációra. Ez azt bizonyítja, hogy apelin stimulus hatására az ERK1/2 a PKC-től független módon aktiválódik.

DISZKUSSZIÓ

Az ET-1 és a ROS

Izolált patkányszíven végzett kutatásaink bizonyítják, hogy a ROS kulcsszerepet játszik a szívizom kontraktilitásának akut szabályozásában. Eredményeink alapján az ET-1, amely aktiválja az ERK1/2–p90RSK–NHE jelátviteli útvonalat³¹, a kontraktilitás növelő hatását részben a ROS termelés fokozásán keresztül éri el. Ezek az adataink erőteljes bizonyítékok arra, hogy a ROS jelátvivő molekulákként is viselkedhetnek fiziológiás körülmények között.

Korábbi sejt kultúrákon végzett vizsgálatok ellentmondó eredményeket szolgáltatottak a ROS és ET-1 kontraktilitást befolyásoló szerepével kapcsolatban. A mi eredményeink demonstrálják, hogy a ROS hozzájárulnak az ET-1 pozitív inotróp hatásának kialakulásához az izolált felnőtt patkányszívben. ET-1 akut infúziója fokozza a ROS termelődését, melyet a dihidroetidium etidiummá történő oxidációja meghatározásával mértünk. Ez a reakció leginkább a sejten belül felszabaduló $O_2^{\cdot-}$ meghatározására alkalmas⁵⁹. Ezen felül az antioxidáns NACC gátolta az ET-1-indukálta etidium-fluoreszcencia növekedést. Fontos még, hogy az ET-1 által kiváltott inotróp válasz is csökkent a szabadgyökfogó hatású NACC és MnTMPyP hatására.

A NAD(P)H és a mitokondriális K^+ csatornák szerepe

A NAD(P)H-oxidáz enzimes család a $O_2^{\cdot-}$ legfontosabb forrása a szívizomban^{64,81}. Figyelemre méltó, hogy adataink alapján a NAD(P)H

oxidáztól származó ROS részt vesz a kamrai kontraktilitás fokozásában, ugyanis az ET-1-indukálta inotróp válasz valamint az etidium fluoreszcencia egyaránt jelentősen csökkent a NAD(P)H-oxidáz gátló apocynin hatására. Ezen felül a SOD mimetikum hasonló módon befolyásolta a kamrai kontraktilitást, mint a NAD(P)H oxidáz gátló, azt sugallva, hogy a $O_2\bullet^-$ lényegesen nagyobb jelentőséggel bír, mint a H_2O_2 .

A NAD(P)H-oxidáz eredetű ROS a mitokondriumokból nagyobb fokú ROS felszabaduláshoz is vezethet a $mitoK_{ATP}$ ⁸² csatornák megnyitásával. Ezt a jelenséget "ROS-indukálta ROS kibocsátásnak" is nevezik⁸³. Andrukhiv és munkatársai kimutatták, hogy ezért a hatásért a mitokondriális mátrix pH értékének emelkedése felel, melyet a $mitoK_{ATP}$ -n keresztül zajló mitokondriális K^+ influx indukál. Ezen felül az is bebizonyosodott, hogy az elektron transzport lánc komplex I-e az $O_2\bullet^-$ -t a $mitoK_{ATP}$ nyitásának hatására termeli⁸⁴. Jól ismert, hogy a $mitoK_{ATP}$ fontos szerepet játszik az iszkémia/reperfúziós károsodással szemben fellépő kardioprotekcióban^{67,68}. Azonban a $mitoK_{ATP}$ szívben betöltött élettani funkciója nem tisztázott. Kísérleteinkben a szelektív $mitoK_{ATP}$ gátló 5-HD jelentősen csökkentette az ET-1 pozitív inotróp hatását, míg a ROS termelésre nem volt szignifikáns befolyással³⁹. Garlid és munkatársai leírták, hogy a $mitoK_{ATP}$ gátlás csökkenti a szív képességét arra, hogy olyan pozitív inotróp stimulusokra reagáljon, mint a dobutamin, a ouabain vagy a Ca^{2+} ⁸⁵. Azt sugallták, hogy a $mitoK_{ATP}$ nyitása egy kiegészítő K^+ áramot eredményez, mely véd a stressz-indukálta mitokondriális mátrix megduzzadásával, kiszélesedésével szemben, miáltal hozzájárul a citoszol és mitokondriumok közötti kedvező hatásfokú energiatranszfer fenntartásához. Azt a hipotézist állították fel, hogy a mitokondriális mátrix K^+ influx elengedhetetlen a pozitív inotróp stimulus hatására kialakuló válaszhoz⁸⁵. Saját eredményeink ezenkívül még azt mutatják, hogy a mitokondriális BK_{Ca} csatorna inhibitor paxilline képes volt az ET-1 inotróp hatását csökkenteni, míg a $sarcK_{ATP}$ csatorna gátló HMR1098 erre nem volt hatással. Ez alátámasztja azt az elképzelést, mely szerint a mitokondriális K^+ influx elengedhetetlen a pozitív inotróp válasz kialakulásához. A megfigyelés, mely szerint a ROS képes a $mitoK_{ATP}$ csatornák nyitására⁸⁶, felveti annak a lehetőségét, hogy a NAD(P)H-

oxidáz eredetű ROS ezen csatornák aktiválásával a miokardiumot egy olyan állapotban tartja, ami kedvező az intenzív munkavégzés szempontjából. Hogy egy ilyen mechanizmus valóban jelentős szerepet tölt-e be fiziológias körülmények közt, még további megerősítésre vár.

ROS és jelátvitel

Jelen eredményeink szerint az ERK1/2 aktivációja nagyrészt redox-érzékeny intakt felnőtt patkányszívben, ugyanis az ET-1-indukálta ERK1/2 foszforiláció nagyrészt blokkolható volt szabadgyökfogókkal illetve NAD(P)H-oxidáz gátlókkal. A GPCR-függő Raf-MEK1/2-ERK1/2 kaszkád aktiváció számos mechanizmuson keresztül létrejöhet^{73,87}. Például a G_q-mediálta PKC aktiváció stimulálhatja a Raf-ot, mely az ERK1/2 útvonal első eleme. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) transzaktiváció, mely a GPCR és ERK1/2 aktiváció összekötésének egyik ismert alternatív mechanizmusa⁸⁷, szintén hozzájárul az ET-1-indukálta kontraktilitás növekedéshez a MEK1/2-ERK1/2 szignál proximális aktivátoraként³¹. GPCR-mediálta ROS termelés inaktíválhatja a protein-tirozin foszfatázokat, azt eredményezve, hogy az EGFR tirozin foszforilációs szintje nő, ami a Ras-ERK1/2 kaszkád aktivációjához vezet^{73,87}. Ezen felül a ROS közvetlenül fokozhatják a Ras aktivációját, szintén a Raf-MEK1/2-ERK1/2 útvonal beindításához vezetve^{73,88}. Továbbá a ROS közvetlenül aktiválhatja a G proteineket. A βγ-alegység, mely ilyenkor felszabadul, szintén aktiválhatja az ERK1/2-t⁸⁹. Ez alapján azt is gondolhatjuk, hogy az ET-1-indukálta ROS termelés visszacsatolással hat a G proteinhez kapcsolt ET receptorra, mely fokozza az ERK szignált. Az ET-1 által fokozott endogén ROS termelés ERK1/2 és p90RSK foszforilációján keresztül elősegítheti a NHE aktiválását. A következményes alkalizáció közvetlenül is fokozza a miofibrillumok Ca²⁺ érzékenységét, de a megemelkedett Na⁺ influx növelheti Ca²⁺ influxot is a NCX reverz módú aktivációján keresztül. Bizonyíték van arra is, hogy a NCX közvetlenül is szabályozható ROS által, azonban arról nincs adat, hogy a ROS-nak hatása lenne a reverz módú aktivációra^{90,91}. Ca²⁺ influx más módon is befolyásolható ROS által: ET-1-ről leírták, hogy izolált patkány kardiomiocitákban képes növelni az L-típusú Ca²⁺ csatornák nyitási valószínűségét, és ezt a hatást a NAD(P)H oxidáz gátlás szignifikánsan gyengítette. Ez a megfigyelés egy

olyan mechanizmust ír le, melyben a NAD(P)H-oxidáz eredetű $O_2^{\bullet-}$ produkció Ca^{2+} influx fokozódáshoz vezet³⁸, amely szintén hozzájárulhat az ET-1 pozitív inotróp hatásának kialakulásához.

Az apelin inotróp jelátvittele

Az itt bemutatott eredmények alátámasztják korábbi saját¹⁰ és mások által⁵¹ közölt megfigyeléseket, mely szerint a PKC farmakológiai gátlása jelentősen gyengíti az apelin pozitív inotróp hatását. A PKC enzimesalád számos tagból áll, úgyis mint a klasszikus (α , β I, β II, és γ), új (δ , ϵ , θ , and η) és atipikus PKC-k (ζ , ι/λ). Az egyes enzimek különböző, akár egymással éppen ellentétes hatásokkal rendelkeznek⁹², és aktiválásukat követően mind a rájuk jellemző szubcelluláris kompartmentbe kerülnek⁹³. Különböző PKC izoformákról ismert, hogy a szívizom kontraktilitást szabályozzák^{74,75}. Azonban eddig még nem sikerült meghatározni, melyik az az izoenzim, amelyik az apelin inotróp hatását közvetíti. Jelen eredményeink arra utalnak, hogy az apelin a PKC ϵ membránba történő transzlokációját váltja ki, míg a PKC α transzlokációjára nincs hatással. Specifikus PKC ϵ horgonyzó fehérjéket azonosítottak a miofilamentum Z-vonalainál és a discus intercalaris területén⁹⁴. Aktivációkor a PKC ϵ ezen területeken halmozódik fel, erős pozitív inotróp hatáshoz vezetve⁹⁵. Ez a megfigyelés az aktivált PKC ϵ -t az apelin receptor közvetlen közelébe helyezi⁵².

Az RLC szabályozza a miofilamentum keresztidák tulajdonságait, ezáltal modulálni képes a szívizom kontrakciós erejét. Az MLCK által kiváltott fokozott RLC foszforiláció növeli a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységet⁷⁸. A szívizom RLC foszfát körforgásának ciklusideje lényegesen hosszabb, mint a simaizomban. Ez azt sugallja, hogy a kardiális RLC a szívizom kontraktilitás hosszú távú finomhangolásában játszik szerepet⁹⁶. Mivel az apelin által kiváltott kontrakciós válasz és az RLC foszforilációjának időbeli lefutása nagyfokú hasonlóságot mutat a szívben, felmerül, hogy az apelin az MLCK által közvetített módon fokozza a szívizom kontraktilitást. Ezt alátámasztandó, megmutattuk, hogy az MLCK gátlás csökkenti az apelin indukálta pozitív inotróp választ, így joggal feltételezhetjük, hogy ez a hatás részben MLCK függő. Azonban urea-glicerol PAGE módszerrel nem sikerült szignifikáns változást kimutatnunk az RLC foszforilációs állapotában. Azt azonban

figyelembe kell venni, hogy mivel fiziológiás állapotban az RLC bazális foszforiláltsága is eléri 40 % körüli szintet⁹⁶, így arányaiban eleve csak korlátozott növekmény érhető el. Mindazonáltal már az RLC foszforilációs szintjében bekövetkező kis változás is jelentős eltérést képes kiváltani a kontraktilitás tekintetében. Korábban már demonstrálták, hogy az RLC foszforiláció 10 %-os növekedése képes lehet a kontrakciós erő akár 70 %-os fokozására⁹⁷. Jelen vizsgálatunk egyik limitáló tényezője, hogy ilyen kis foszforilációs változások a mi *ex vivo* kísérleti körülményeink között kimutathatatlanok maradhatnak.

A kardiális MLCK aktivációjának mechanizmus egyelőre nem pontosan ismert. A sima- és vázizomokkal ellentétben a szívizomban található MLCK nem Ca^{2+} /calmodulin-függő. Azonban a szívizom-specifikus MLCK fehérjén potenciálisan PKC-függő foszforilációs helyeket azonosítottak⁹⁸. Egyes vizsgálatok ki is mutattak PKC által kiváltott RLC foszforilációt a szívben^{54,99}, azonban mások ennek ellenkezőjére szolgáltattak bizonyítékot^{100,101}. Mindenesre a kardiális MLCK és a RLC a PKC potenciális disztális jelátviteli célpontjai lehetnek, melyek részt vesznek az apelin-indukálta inotróp válasz közvetítésében.

A MAPK-ok jól ismertek, mint a szív fiziológiás és kóros folyamatainak fontos regulátorai¹⁰². Azonban csak egy-két közlemény számolt be arról, hogy szerepük lehet a kamrai kontraktilitás szabályozásában^{31,103}. A mi vizsgálatunk olyan eredményeket mutat be, melyek demonstrálják, hogy az apelin stimulus az ERK1/2 aktivációjához vezet a szívizomban, valamint ezen aktiváció gátlásával az apelin inotróp válasza gyengíthető. Korábban már bizonyítottuk, hogy a NHE aktivációja hozzájárul az apelin-indukálta inotróp hatáshoz^{10,52}. Mivel az ERK1/2 a NHE ismert regulátora¹⁰⁴, véleményünk szerint az apelin jelátvitelében az ERK1/2-NHE tengely fontos szerepet játszik. Az ERK1/2 aktivációja, sok más mellett, létrejöhet PKC-kon keresztül⁸⁰. Tudva, hogy a PKC érintett az apelin inotróp jelátviteli rendszerében, logikus lehetőség, hogy az ERK1/2 apelin-függő aktivációja PKC-n keresztül mediált. Azok az eredményeink azonban, melyek szerint a kontraktilitást gyengíteni képes PKC gátlásnak semmi hatása nem volt az apelin indukálta ERK1/2 foszforilációra, azt bizonyítják, hogy az apelin-dependens ERK1/2 aktiváció a PKC-któl

függetlenül jön létre. Azaz a PKC és az ERK1/2 egymástól független, párhuzamos jelátviteli utak, melyek az apelin pozitív inotróp hatását közvetítik.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során az apelin, illetve az ET-1 által kiváltott inotróp válasz jelátviteli mechanizmusait tanulmányoztuk izolált patkányszívben. Kutatásaink legfontosabb eredményeiként kimutattuk, hogy (1) az ET-1-indukálta szívizomkontrakció-fokozódás függ a NAD(P)H oxidáz eredetű ROS termelődéstől, amely (2) aktiválja az ERK1/2 jelátviteli rendszerét. (3) Mitokondriális káliumcsatornák (mitoK_{ATP} and BK_{Ca}) szükségesek az ET-1 inotróp hatásának közvetítéséhez, azonban ez a jelenség ROS-tól független mechanizmusnak tűnik. (4) Azonosítottuk a specifikus PKCε izoenzimet, mely apelin stimulus hatására aktiválásra kerül. (5) Jelen vizsgálat demonstrálta, hogy az apelin stimulus az ERK1/2 foszforilációjához vezet, valamint, hogy az ERK1/2 aktivációja elengedhetetlen a teljes apelin-indukálta inotróp válasz kialakulásához. (6) Ezen felül adataink alátámasztják, hogy az ERK1/2 aktivációja PKC-ktől független módon jön létre. (7) Azt is elsőként sikerült bizonyítanunk, hogy a miozin könnyűlánc kináz aktivitása szükséges az apelin által kiváltott kontraktilis erő növekedés létrejöttéhez. Ezáltal egy újabb olyan mechanizmust sikerült az apelin inotróp jelátviteléhez kapcsolnunk, mely alátámasztja azt a hipotézisünket, hogy az apelin inotróp hatása legfőképpen a miofilamentumok Ca²⁺ érzékenységének fokozásában jelenik meg.

HIVATKOZÁSOK

A hivatkozások listája a tézisfüzet angol változatában található.