

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Disszertáció

**A Ca²⁺-érzékenyítő levosimendan és a myocardium β-adrenerg
jelátviteli rendszere közötti interakciók**

Dr. Bódi Annamária

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
KARDIOLÓGIAI INTÉZET

DEBRECEN, 2004

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. A szívizom kontrakció és relaxáció celluláris háttere	3
1.2. A Ca^{2+} által kiváltott myofibrilláris válasz	4
1.3. A kontraktilitás β -adrenerg szabályozása	6
1.4. Ca^{2+} -érzékenyítő mechanizmusok, a levosimendan mint Ca^{2+} -érzékenyítő	9
1.5. Célkitűzések	17
2. Módszerek	19
2.1. Echocardiographia	19
2.2. Perfúziós technika	19
2.3. Biokémiai módszerek	21
2.4. Mérések izolált cardiomyocytaon	22
2.5. Statisztikai módszerek	22
3. Eredmények	23
3.1 Echocardiographiás vizsgálatok	23
3.2 Perfúziós vizsgálatok	26
3.3 Izolált cardiomyocyta vizsgálatok	29
3.4 Megfigyelések humán szívelégtelenség kezelése kapcsán	30
4. Megbeszélés	33
4.1. A levosimendan által mediált Ca^{2+} -érzékenyítés és troponin I foszforiláció	33
4.2. Krónikus szívelégtelenség kezelése a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendannal és a β -adrenerg rendszer modulátoraival	35
5. Összefoglalás	37
6. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatóságának lehetőségei	38
7. Köszönetnyilvánítás	39
8. Irodalom	40
8.1. Saját, a témával kapcsolatos közlemények	40
8.2. Nemzetközi irodalom	42
9. Függelék. A saját témával kapcsolatos közlemények	

1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedek kutatási eredményei alapján a szívizom összehúzódó képességének (kontraktilitásának) szabályozását, a szabályozást végző fontosabb myocardialis fehérjéket és ezek működését mind jobban megismertük. Világossá vált, hogy a myocardium kontrakciós erejének növelését több úton is el lehet érni (Bers, 1991; Opie, 1998; Edes és mtsai, 2001). Ezek közül a klinikai gyakorlat számára a jelenleg elérhető két legfontosabb lehetőség: 1/ az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növelése (pl. β -adrenerg agonisták, digitalis vagy foszfodiészteráz (PDE) gátlók alkalmazásával), 2/ a myofibrilláris fehérjék Ca^{2+} -érzékenységének farmakológiai növelése (a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan alkalmazásával).

Jelen disszertáció elsősorban a Ca^{2+} -érzékenyítés és a β -adrenerg mechanizmusok összefüggéseivel foglalkozik. A disszertáció áttekintést nyújt a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan és a β -adrenerg agonista isoproterenol myocardiumra kifejtett kísérletes hatásairól, és bemutatja a szerző levosimendannal szerzett klinikai tapasztalatait. Vizsgálataink során különös figyelmet szenteltünk a szívizomsejtek β -adrenerg jelátviteli rendszeréből és a levosimendan hatásmechanizmusából fakadó, valószínűsíthető interakcióknak.

1.1. A szívizom kontrakció és relaxáció celluláris háttere

A szívizom kontrakciói és relaxációi az intracelluláris fehérjékhez tartósan nem asszociált, úgynevezett „szabad” Ca^{2+} koncentráció változásainak függvénye. Ebből következik, hogy az intracelluláris Ca^{2+} anyagcsere jellegzetességei a myocardium pumpafunkciója szempontjából elsődlegesek (Bers, 1991; Opie, 1998). Az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) változásait egy rövidülésre képes kontraktilis fehérjerendszer (myofibrilláris struktúra) alakítja át erővé (Solaro és mtsai, 1971). A kontraktilis rendszer erőgenerálásának és rövidülésének lényege az elektron mikroszkópos felvételek alapján vastag filamentumoknak (döntően miozin) és vékony filamentumoknak nevezett (aktin, troponinok és tropomiozin) struktúrák egymás fölött történő elcsúszása, melyet ATP jelenlétében az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése indít el. A szívizom myofibrilláris Ca^{2+} -receptorának a vékony filamentum troponin C molekulája tekinthető, mely jelentős Ca^{2+} affinitással bír (Palmer és Kentish, 1994). A szív diastoléja alatt a relaxált szívizomban a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alacsony (pCa: 7 körüli; $\text{pCa} = -\log[\text{Ca}^{2+}]_i$). Ilyenkor a Ca^{2+} zömmel a sarcoplasmaticus reticulum (SR) raktárakban tárolódik, ezért a troponin C regulatorikus Ca^{2+} -kötőhelyéhez csak elhanyagolható mennyiségű Ca^{2+} kötődik, és kontrakcióra nincs lehetőség. A felszíni membrán (sarcolemma) depolarizációjának hatására

az L-típusú Ca^{2+} -csatornák megnyílnak és az extracelluláris térből az intracelluláris tér irányába kialakuló következményes L-típusú Ca^{2+} áram, az SR raktárakból intracelluláris Ca^{2+} felszabadulást hoz létre (Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} felszabadulás). Ez a két folyamat együttesen az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t igen gyorsan pCa: 6 körüli értékre növeli. A szabadabbá váló Ca^{2+} mennyiségét tehát az akciós potenciál ideje alatt az extracelluláris térből beáramló Ca^{2+} mennyisége és az SR raktárak telítettsége együttesen határozzák meg. Egyes becslések szerint a kontrakciók során felszabaduló Ca^{2+} 60-70%-a az SR-ből származik, míg a fennmaradó hányad az extracelluláris térből, a Ca^{2+} csatornákon keresztül jut az intracelluláris térbe (Bers, 1991). Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ maximális értékének elérése után az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkenni kezd. Ezért részben az $I_{\text{Ca,L}}$ és a Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} felszabadulás fokozatos megszűnése, részben a Ca^{2+} -ot az intracelluláris térből eltávolító mechanizmusok párhuzamos aktiválódása tehető felelőssé. Egyetlen összehúzódnás alatt tehát egyetlen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csúcs jön létre, másképp fogalmazva a systolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése tranziens jelenség. Ca^{2+} gyors eltávolítását döntően az SR membránban található enzim a Ca^{2+} -ATPáz végzi, mely nagy sebességgel és az ATP energiájának felhasználásával a Ca^{2+} ionokat az SR membrán vezikuláiba pumpálja. A Ca^{2+} eltávolításában további két sarcolemmális folyamat is részt vesz: 1/ a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ioncsere, mely a kontrakció kapcsán az extracelluláris térből beáramlott Ca^{2+} -t extracelluláris Na^+ -ra cseréli, 2/ a sarcolemmális Ca^{2+} -ATPáz enzim, mely ATP felhasználásával juttatja a Ca^{2+} -kat az extracelluláris térbe. A relaxáció során tehát az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hirtelen a nyugvó állapotnak megfelelő értékre csökken (pCa: 7). Emiatt a troponin C regulatorikus kötőhelyéről a Ca^{2+} leválik és visszaáll a vékony filamentumok nyugvó izomállapotra jellemző térszerkezete.

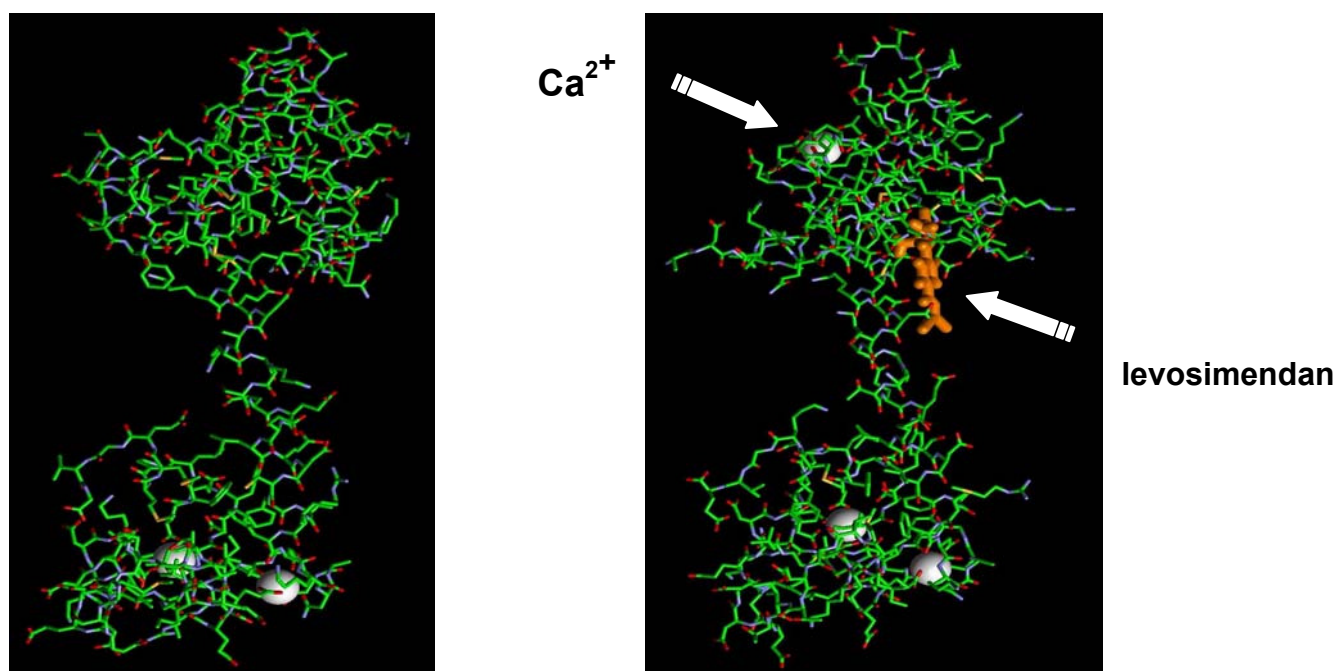
Fentiek alapján érthető, hogy a troponin C Ca^{2+} -telítettsége, és az ehhez kapcsolódó fehérjeszerkezet kiemelt jelentőségű a kontrakció sajátosságainak meghatározásában. Az is könnyen belátható, hogy a szív kontrakcióinak és relaxációinak jellemzőit a Ca^{2+} tranziens sajátosságai (amplitúdó és kinetika) és a myofibrilláris fehérjék Ca^{2+} -ra adott válaszadó képessége („ Ca^{2+} -érzékenység”) együttesen határozzák meg. A szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisának, vagyis Ca^{2+} felvételének és leadásának, illetve a myofibrilláris struktúra Ca^{2+} -érzékenységének farmakológiai módosításai tehát lehetőséget kínálnak a myocardium kontraktilitásának modulálására.

1.2. A Ca^{2+} által kiváltott myofibrilláris válasz

A myofibrilláris fehérjék közül a troponin C, mint a myofibrilláris Ca^{2+} -receptor molekulánként 3 Ca^{2+} -t kötésére képes. Ezek közül azonban mindössze egyetlen Ca^{2+} kötése és disszociációja szabályozza az élettani körülmények között zajló kontrakciós relaxációs

ciklusokat. A regulatorikus kötőhelyhez történő Ca^{2+} kötődésnek a troponin C térszerkezetére jellegzetes hatásai vannak (1. ábra). A troponin C konformáció-változása a többi troponin alegység (troponin C, troponin I, troponin T) és a tropomiozin kölcsönhatásait is befolyásolja, ami végeredményben elősegíti a rövidülést és erőgenerálást lehetővé tevő aktin-miozin kereszthidak kialakulását. Nyugalmi állapotban, alacsony Ca^{2+} koncentráció mellett a troponin C és troponin I/troponin T között csak gyenge kölcsönhatások érvényesülnek. A troponin I viszont erősen kötődik az aktinhoz (Solaro és Rarick, 1996; Solaro 2001). Ezzel a vékony filamentumok elmozdulása a vastag filamentumokhoz képest és maga a kontrakciós folyamat is gátolt. A Ca^{2+} troponin C-hez való kötődését követően a troponin C N-terminálisa és a troponin I C-terminálisa között kialakuló erőteljes kölcsönhatás miatt a troponin I az aktinnal fenntartott kötöttségéből felszabadul, így a kontrakciónak a továbbiakban már nincs akadály (Rarick és mtsai, 1996; Solaro 2001). A troponin I az aktin és troponin C között megvalósuló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő ingázása egy „mozgásgátló ék” hatásához hasonlítható, ami nyugalmi állapotban gátolja (ékeli) a vékonyfilamentumok csúszását. A troponin C a Ca^{2+} kötődését követően a troponin C és troponin I közötti kölcsönhatás miatt az „ék” távozik az aktin felszínéről (Reiffert és mtsai, 1999). A troponin T szerepe a nyugalmi (relaxált) szívizomban még ma sem teljesen tisztázott. Valószínűleg a tropomiozin felé közvetíti a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat és relaxált állapotban a tropomiozin az a fehérje mely közvetlenül gátolja az aktin felszínén a miozin-keresztkötések kialakításához szükséges felületet.

A kontrakció cellularis szabályozása során a következő fő lépések mennek végbe: 1/ A depolarizáció hatására emelkedik az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mely a troponin C Ca^{2+} kötődését eredményezi. 2/ A Ca^{2+} kötődése a troponin C harmadlagos szerkezetében konformációváltozást eredményez, ami csökkenti a troponin I aktinra gyakorolt gátló hatását (növekszik a kölcsönhatás a troponin C és I között – mintegy felszabadul az „ék”). Ennek során a tropomiozin molekulák által alkotott fonal valamelyest elmozdul a kettős helikális struktúrával rendelkező fibrilláris aktin felszínén, és ezzel szabaddá válik az aktin monomereken a miozinnal való keresztkötésekhez szükséges felület. 3/ Keresztkötések alakulnak ki az aktin és a miozin között és létrejön a kontrakció. 4/ A relaxáció során a Ca^{2+} a troponin C-ről disszociál (mivel a Ca^{2+} nagy sebességgel az SR raktárakba pumpálódik), visszaáll a troponin C eredeti konformációja és ismét blokkolódik az aktin felszínén az a felület ami a keresztkötések kialakításához szükséges. Ennek a folyamatnak részeként visszacsúszik a tropomiozin szál az eredeti, nyugalmi pozíciójába, másrészt erősödik a troponin I kapcsolódása az aktinhoz – tehát ismét blokkolódik a vékony filamentum (Opie, 1998).

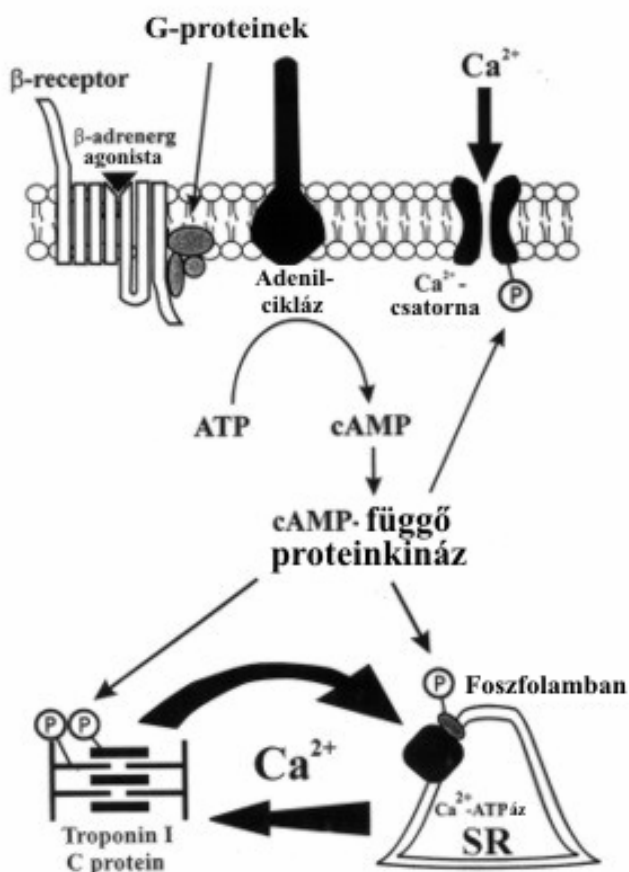


1. ábra. A troponin C (zöld színnel) diastole alatti (bal oldal) és systole alatti konformációi (jobb oldal) és a levosimendan (narancs sárga színnel) kötődése a troponin C-hez. A troponin C N-terminálisán (felül) elhelyezkedő regulatorikus Ca^{2+} -kötőhelyéhez diastole során nem kapcsolódik Ca^{2+} (ezüst színnel). A troponin C ebben a konformációs állapotban nem képez kötőhelyet a levosimendan számára. Systole alatt a troponin C Ca^{2+} által indukált konformációjában egy hidrofób jellegű zseb alakul ki amelyhez a levosimendan kapcsolódni tud. Feltételezhető, hogy a levosimendan troponin C-hez történő kötődése stabilizálja a troponin C Ca^{2+} által indukált konformációját. A troponin C konformációjának stabilizálódása fokozza az aktin-miozin interakciót.

1.3. A kontraktilitás β -adrenerg szabályozása

A szívizom kontraktilis szabályozásában a legfontosabb humorális mechanizmust a katekolaminok a β -adrenerg szignalizációs rendszeren keresztül biztosítják (Hasenfuss és mtsai, 1994; Edes és mtsai, 1989; Edes és mtsai, 2001) (2. ábra). A különböző β -adrenerg agonisták (adrenalin, isoproterenol stb.) kötődése a myocardialis β -adrenerg-receptorhoz (zömében β_1 - kisebb mértékben β_2 -receptorokhoz) fokozza az adenilcikláz enzim aktivitását és növeli az intracelluláris ciklikus AMP (cAMP) szintjét. A β -receptor és adenilcikláz közötti kapcsolatot speciális membránfehérjék (G_s proteinek) biztosítják. Az intracelluláris cAMP koncentráció emelkedése a cAMP-dependens proteinkinázt (porteinkináz A, PKA) aktiválja. Az aktiváció során szabaddá váló katalitikus alegység számos intracelluláris fehérjét foszforilál. A fehérjefoszforilációs folyamatok lényeges szerepet játszanak a pozitív inotrop, chronotrop és lusitrop hatások kialakulásában (Kranias és Solaro, 1982; Robertson és mtsai, 1982; Edes és mtsai, 1989; Noland és Kuo, 1991; Opie 1998; Edes és Kranias, 2001). A fehérjefoszforilációs folyamatok mai ismereteink szerint a Ca^{2+} tranzienszt és a myofibrilláris fehérjéket egyaránt szabályozzák. A pozitív inotrop hatás kiindulási pontja az L-típusú Ca^{2+}

csatorna α_1 -alegységének foszforilációja (Jurevicius és Fischmeister, 1996), mely révén nő a befelé irányuló Ca^{2+} áram, és ez a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció fokozza a myocardium kontraktilitását. A pozitív lusitrop hatás létrejöttében fontos szerepet játszik egy erőteljes gátló jellegű SR membrán foszfoprotein, a foszfolamban foszforilációja, amely elsősorban a relaxáció sebességének növekedéséhez járul hozzá. A foszfát csoport beépülése a foszfolamban valószínűleg megszakítja a fehérje és az SR Ca^{2+} -ATPáz kapcsolódását. A Ca^{2+} pumpa ezáltal felszabadul a gátlás alól és ezért jelentősen fokozódik az SR Ca^{2+} felvétele (pozitív lusitrop hatás) (Edes és Kranias, 2001). A Ca^{2+} -felvétel gyorsulása fokozatosan telíti az SR raktárakat kalciummal, ami másodlagosan a kontraktilitást is növeli (növekszik az SR-ből felszabadítható Ca^{2+} mennyisége).



2. ábra. A β -adrenerg stimulusra bekövetkező lényegesebb intracelluláris foszforilációs lépések szívizomsejtekben. A sarcolemma β -adrenerg-receptorai (heptahelikális receptor) G-proteinek révén kapcsolódnak az adenilcikláz enzimhez. Az aktivált cikláz ATP-ből ciklikus AMP-t (cAMP) hoz létre, mely a cAMP-függő proteinkinázt (PKA) hozza működésbe. Az aktivált kináz foszforilálja az L-típusú Ca^{2+} csatornát (növekvő Ca^{2+} belépés, pozitív inotropia), a foszfolambant (növekvő SR Ca^{2+} -felvétel, pozitív lusitropia és inotropia), a troponin I-t és a C proteint (csökkent Ca^{2+} -érzékenység, pozitív lusitropia).

Ugyancsak a relaxáció sebességének növekedéséhez rendelhető a myofibrilláris fehérjék (azok közül is elsősorban a troponin I) β -adrenerg hatásra bekövetkező foszforilációja, mivel ezzel párhuzamosan csökken a myofibrillum Ca^{2+} iránt mutatott érzékenysége (Noland and Kuo, 1991; Robertson és mtsai, 1982). A közvetlen molekuláris folyamatok a troponin I foszforilációjával kapcsolatban jól mérhetők: adott Ca^{2+} koncentráció mellett csökken a myofibrilláris kontraktilis erő (Ca^{2+} -érzékenység csökkenés) és csökken a myofibrilláris ATP-áz aktivitás. Valószínűsíthető, hogy a troponin I foszforilációja intermolekuláris kapcsolatok révén csökkenti a közvetlenül mellette - a vékony filamentumban - elhelyezkedő troponin C Ca^{2+} -érzékenységét (Solaro, 2001). A troponin I molekula két funkcionális szempontból jelentős PKA foszforilációs hellyel rendelkezik, a Ser-22 és Ser-23 pozícióban, melyek a molekula N-terminális végéhez közel helyezkednek el (Mittmann és mtsai, 1990). A molekula három különböző foszforilációs állapotban: defoszforilált, monofoszforilált és biszfoszforilált formában fordulhat elő a szívizomban. Ezen formák egymáshoz viszonyított aránya a β -adrenerg rendszer aktuális aktiváltsági szintjétől függ. A molekula PKA-mediált foszforilációja a kontraktilis rendszer csökkent Ca^{2+} -érzékenységéhez vezet, azonban ehhez mind a két foszforilációs hely egyidejű foszforilációja szükséges (Dohet és mtsai, 1995; Zhang és mtsai, 1995a; Reiffert és mtsai, 1998; Ward és mtsai, 2002). A cTnI foszforiláció elősegíti a myocardium relaxációját (England 1976; Zhang és mtsai, 1995b), mert ilyenkor a cTnC Ca^{2+} -affinitása csökken, ami a Ca^{2+} gyorsabb disszociációját teszi lehetővé. A β -adrenerg stimulálásra bekövetkező troponin I foszforiláció Ca^{2+} -érzékenységet csökkentő hatását elvileg védőmechanizmusként is felfoghatjuk, mely a cardiomyocytákat a β -adrenerg ingerlés által kiváltott túlzott Ca^{2+} aktivációtól tartja távol. Fontos azt is észrevenni, hogy a Ca^{2+} -érzékenység csökkenéséből származó gyorsult relaxáció a β -adrenerg pozitív chronotropia miatt szűkülő diastolés időt és az ezzel veszélyeztetetté váló diastolés telődést is kompenzálja.

A PKA a vastag filamentumban található C proteint szintén foszforilálja. Ennek a foszforilációs folyamatnak a szerepe ma még nem teljesen feltárt. A PKA aktivitását fenntartó intracelluláris cAMP szint számos inotrop szer hatására változhat. A cAMP hasítását fiziológias körülmények között az ún. foszfodieszteráz enzimek (PDE) bontják (Reeves és mtsai, 1987), melynek gátlása több szer elsődleges vagy másodlagos hatása (PDE-gátlók, és Ca^{2+} -érzékenyítők lásd alább). A PDE-gátlók a cAMP bontás visszaszorítása miatt különböző mértékű szimpatomimetikus hatással rendelkeznek (Shadid és Nicholson, 1990; de Cheffoy de Courcelles és mtsai, 1992; Katano és Endoh, 1992; Kelso és mtsai, 1995; Muller és mtsai, 1992; Cone és mtsai, 1999).

1.4. Ca^{2+} -érzékenyítő mechanizmusok, a levosimendan mint Ca^{2+} -érzékenyítő

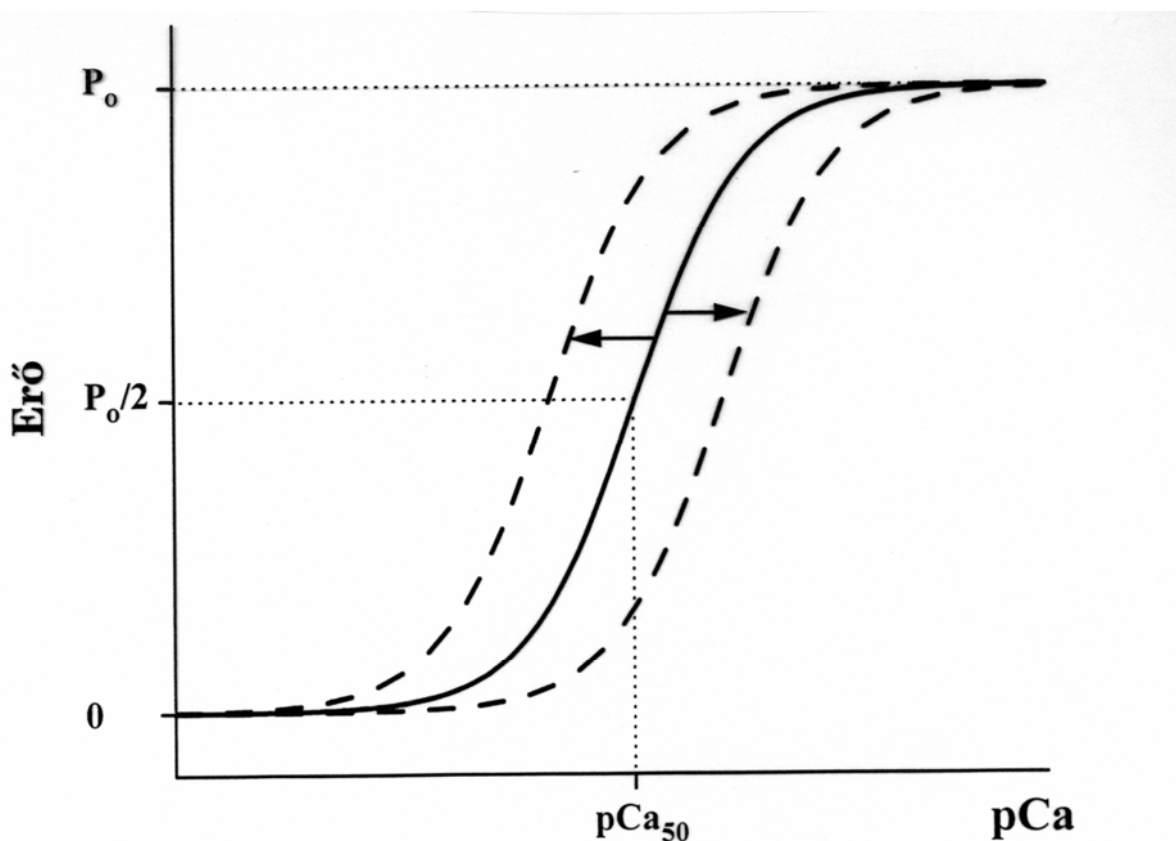
Klinikai szempontból számos esetben lenne kívánatos, hogy a szívizom kontraktilitása a szív Ca^{2+} -homeosztázisának megváltozása nélkül valósuljon meg. Azt lenne célszerű tehát elérni, hogy a kontraktilis rendszerből adott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett nyerjünk ki több erőt, fokozzuk a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} -ra adott válaszát, növeljük az izomműködés hatékonyságát. Ezeknek az elveknek a közös jelölésére alkották a Ca^{2+} -érzékenyítés fogalmát. A Ca^{2+} -érzékenyítés olyan folyamatok gyűjtőneve, melyek különböző molekuláris támadáspontok mellett javítják az izomösszehúzódnak hatékonyságát. Ahhoz, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítéshez vezető különböző molekuláris lehetőségeket vázoljuk először azokkal az elvi megfontolásokkal kell megismerkedjünk, melyek a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének leírásához kvantitatív szempontból szükségesek.

A szív myofibrilláris struktúrái által generált erő Ca^{2+} -függését intakt szívizomzaton nehéz megítélni, mert az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a szív ciklus alatt folyamatosan és igen gyorsan változik. Ez a tény és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció pontos mérésének technikai nehézségei nagymértékben gátolják, hogy a szív ciklus alatti pillanatnyi Ca^{2+} szint és a myofilamentális válasz közötti kapcsolatot megbízhatóan jellemezzük. A myofibrilláris erő Ca^{2+} -függésének tanulmányozására egyszerűbb rendszerekre van szükség. A mérésekhez leggyakrabban sarcolemmájuktól megfosztott úgynevezett hámozott (más néven nyúzott) preparátumokat alkalmaznak. Az ilyen preparátumok myoplazmatikus terében a szabad Ca^{2+} koncentráció szabályozható, a kialakult erő pedig kontrollált sarcomerhosszak mellett egyidejűleg mérhető. Amennyiben a kialakult erőértékeket a Ca^{2+} koncentráció függvényben tüntetjük fel, úgy jellegzetes szigmoid lefutású görbét kapunk (kalcium-erő összefüggés). A Ca^{2+} koncentráció kifejezésére rendszerint a moláris érték tízes alapú negatív logaritmusát alkalmazzák (pCa), így pCa-erő összefüggésről (3. ábra) is beszélhetünk. A szigmoid lefutású görbe az ún. Hill-egyenlettel illeszthető, mely a kontraktilis rendszer által generált erő Ca^{2+} -függésének legfontosabb kvantitatív értékeit tartalmazza:

$$P_{\text{Ca}} = P_o * ([\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}} / (\text{Ca}_{50}^{n_{\text{Hill}}} + [\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}})) \quad (1)$$

ahol P_{Ca} az adott Ca^{2+} koncentráció mellett kialakult izomerőt, P_o a maximális Ca^{2+} telítettség mellett létrejött izomerőt (maximális Ca^{2+} -aktivált erő), $[\text{Ca}^{2+}]$ az adott Ca^{2+} koncentrációt, Ca_{50} (vagy pCa_{50}) a félmaximális erő kifejlődéséhez szükséges Ca^{2+} koncentrációt, végül n_{Hill} az ún. Hill-koefficiens jelöli. A Ca_{50} (vagy pCa_{50}) a kontraktilis rendszer Ca^{2+} iránti érzékenységét önmagában jellemzi. Értéke nagymértékben függ a troponin C Ca^{2+} iránti affinitásától. A Ca_{50} növekedése (mely értelemszerűen a pCa_{50} csökkenésével jár együtt) a

kalcium-erő összefüggés jobbra tolódásával (Ca^{2+} -érzékenység csökkenés, pl. β -stimuláció) jár együtt, a Ca_{50} csökkenése ezzel ellentétes hatást illusztrál (Ca^{2+} -érzékenyítés). A Hill-koefficiens (n_{Hill}) a szigmoid görbe meredekségére, és egyúttal a kontraktilis rendszeren belüli kooperativitás mértékére jellemző adat. A kontraktilis filamentumok kooperatív interakciója számos, a vékony és vastag filamentumok között kialakuló bonyolult intermolekuláris kapcsolat következménye. Fontos annak hangsúlyozása, hogy élettani körülmények között a szív vékony filamentumai sohasem telítettek teljesen kalciummal, ezért a Ca^{2+} tranziens amplitúdójának emelkedése a kontraktilis erő növekedéséhez vezet. A vastag filamentum miozin ATPáz aktivitásának Ca^{2+} -függését ugyancsak a Hill-egyenlettel lehet jellemezni. Figyelembe véve azt, hogy a miozin molekulák a vékony filamentumok Ca^{2+} telítettségének függvényében bontják az ATP-t (és generálnak erőt) nem meglepő, hogy a miozin ATPáz aktivitásának és a kontraktilis erőnek a Ca^{2+} -érzékenysége azonos.



3. ábra. A kontraktilis rendszer pCa-erő összefüggése. A Ca^{2+} koncentráció kifejezésére rendszerint a moláris koncentráció tízes alapú negatív logaritmusát alkalmazzák (pCa, vízszintes tengely). A Ca^{2+} koncentráció balról jobbra nő (a pCa érték ezzel párhuzamosan csökken). A Ca^{2+} koncentráció növekedésével az izometriás körülmények között mért izomerő a maximális Ca^{2+} -aktivált erő (P_0) eléréséig fokozódik (függőleges tengely). Az összefüggés szigmoid lefutást mutat. A kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének jellemzésére gyakorta a félmaximális erő ($P_0/2$) eléréséhez szükséges Ca^{2+} ($p\text{Ca}_{50}$) koncentrációt alkalmazzák. A pCa-erő összefüggés jobbra tolódása a Ca^{2+} -érzékenység csökkenését, a pCa-erő összefüggés balra tolódása a Ca^{2+} -érzékenység fokozódását jelzi (szaggatott görbék és a nyilak).

A hámozott rostokon végzett farmakológiai vizsgálatok előnye az, hogy a kontraktilis fehérjerendszer Ca^{2+} -függésére kifejtett hatások közvetlenül tanulmányozhatók. A vastag és vékony filamentumokon belüli támadáspont pontosabb meghatározásához azonban további módszertani finomításokra van szükség. Az aktin és a miozin molekulák közvetlen (troponin nélküli) egymásrahatása pl. jól tanulmányozható un. *in vitro* motilitási tesztek alkalmazásával (*in vitro* motility assay). Ebben a rendszerben a tisztított miozin (nitrocellulózhoz kötve) és a rajtuk, szabadon mozgó aktin fonalak kölcsönhatása (troponinok nélkül is) tanulmányozható (Opie, 1998). Az aktin szálak vándorlási sebessége az aktin és miozin molekulák kölcsönhatása kapcsán jelentkező erőgeneráló lépésekről szolgáltat információt. A molekuláris biológiai és celluláris fiziológiai módszerek megfelelő ötvözésével ma már viszonylag egyszerűen lehet jellemezni egy szer kontraktilis rendszeren belüli molekuláris támadáspontját és hatásmechanizmusát.

Hogyan képzelhető el, hogy növekedjen a szívizomzat által létrehozott erő a Ca^{2+} koncentráció növekedése nélkül? A kérdésre választ a természet is szolgáltat, mert pl. a hypertrophiás (de nem elégtelen systolés funkciójú) szívben a maximális Ca^{2+} -aktivált erő (P_0) az aktin és miozin közötti kereszthidak számának növekedése következtében fokozódik. Arra is van azonban lehetőség, hogy az egyes kereszthidak által generált erő növekedjen. További elvi lehetőség, hogy a kontraktilis rendszeren belüli kooperativitás fokozódjon (a pCa-erő összefüggés válik meredekebbé, n Hill nő). Ennek a változásnak az lenne az előnye, hogy kisebb Ca^{2+} koncentráció emelkedés révén is jelentősen fokozódna az izomerő (energetikai előny). Utóbbi mechanizmusra jelenleg még nem ismerünk gyakorlati példát, de a későbbi gyógyszerfejlesztéseknél kívánatos lenne ennek a stratégiai szemléletnek a kiaknázása. Az eddig felvetett mechanizmusok ugyan fokozzák a maximális Ca^{2+} -aktivált erőt (P_0) de szigorúan véve nem érintik a myofibrilláris rendszer Ca^{2+} -érzékenységet (pCa₅₀ változatlan). A Ca^{2+} -érzékenység fokozódásának tisztán érvényesülő formájában a pCa-erő összefüggés a pCa tengely mentén balra tolódik. Ilyen hatás csak egyes Ca^{2+} -érzékenyítők alkalmazásakor érvényesül (lásd alább). Az is elképzelhető, hogy az aktin-miozin ciklusban a kereszthidak hosszabb időt töltsenek az erőgeneráló állapotban. Ilyenkor a Ca^{2+} -érzékenyítő hatás a P_0 és pCa₅₀ értékeket egyaránt fokozza. A Ca^{2+} -érzékenyítő szerek tehát a pCa-erő összefüggés paramétereinek izolált vagy kombinált módosítását eredményezhetik, mely részben közvetlen kontraktilis rendszerre kifejtett, részben másodlagos (pl. PDE-gátló) hatásaikból származik.

A Ca^{2+} -érzékenyítő vegyületeknek hatásmechanizmusuk és támadáspontjuk alapján három főbb osztálya ismert (Solaro 1996; Endoh 2001). A kontraktilis rendszer aktiválásában

központi helyzetű troponin C Ca^{2+} -kötését szem előtt tartva centrális támadáspontúak azok a szerek, melyek fokozzák a troponin C Ca^{2+} iránti affinitását (I. osztály, pimobendan, MCI-154). Kései (downstream) támadáspontúak azok a vegyületek, melyek növelik a Ca^{2+} -kötött troponin C kontraktilis rendszert aktiváló hatását (II. osztály, levosimendan, OR-1896) vagy megváltoztathatják a keresztkötések kinetikáját (gyorsabb aktin-miozin asszociáció és/vagy lassult aktin-miozin disszociáció) (III. osztály, pl. EMD 57033, ORG 30029, CGP 48506) (Vannier és mtsai, 1997). Az első osztályba tartozó pimobendan és MCI-154 szelektíven kötődik a troponin C-hez és adott Ca^{2+} koncentrációnál növeli a Ca^{2+} kötődés valószínűségét (balra tolja a Ca^{2+} koncentráció – troponin C Ca^{2+} szaturációs görbét) (Solaro és mtsai, 1993). Ebben az értelemben ezeknek a vegyületeknek a hatása mintegy fordítottja az ischaemiás acidózis során bekövetkező myocardialis válasznak (Allen és Orchard, 1987). Ugyanis az acidosis kapcsán deszenzibilizálódik a myocardium és csökken a Ca^{2+} hatékonysága (jobbra tolódik a Ca^{2+} koncentráció – troponin C Ca^{2+} szaturációs görbe). (A teljességhez hozzátartozik, hogy acidosisban a deszenzibilizálódáson kívül a maximális Ca^{2+} -aktivált erő is csökken (Kentish, 1991; Papp és Édes, 2000; Papp és mtsai, 2002).) Az MCI-154 nem befolyásolja az aktin által aktivált és az alap miozin ATPáz aktivitásokat. Mindezek alapján feltételezik, hogy a vegyület nem hat az aktin-miozin interakcióra. Mind a pimobendan, mind az MCI-154 PDE-gátló hatással is rendelkezik, ami ugyancsak hozzájárul a vegyületek pozitív inotrop, lusitrop és vazodilatátor hatásaihoz. Sőt, a fokozott intracelluláris cAMP aktivált PKA a troponin I foszforilációja révén a Ca^{2+} -érzékenységet csökkentheti is. A pimobendan a májban Ca^{2+} -érzékenyítő hatástól mentes erős PDE-gátló vegyületté metabolizálódik.

A második osztályba tartozó levosimendan és szervezeten belül kialakuló aktív származéka az OR-1896 (4. ábra) a Ca^{2+} kötődését követően változtatják meg a vékony filamentumok működését és ezáltal fokozzák az aktin és miozin interakcióját. A levosimendan molekuláris szerkezetének kifejlesztése szisztematikusan tervezett kutatások eredményeként jött létre. A cél az volt, hogy olyan kémiai struktúrát alakítsanak ki, amelyik szelektíven és Ca^{2+} -függő módon kapcsolódik a myocardialis Ca^{2+} -receptorhoz, a humán troponin C-hez (Pollesello és mtsai, 1994; Haikala és mtsai, 1995a; Sorsa és mtsai, 2001; 2003). Az előállított levosimendan kötődése az N-terminális közelében történik, ahol a Ca^{2+} által indukált konformációban egy hidrofób jellegű zseb alakul ki (1. ábra). Ebbe rögzül a levosimendan dihidropiridazinon gyűrűje, míg a vegyület dinitril vége poláros jellegű aminosavakhoz (Gln¹¹, Gln¹⁶, Asp⁸⁸, Ser⁸⁹, és Lys⁹²) kapcsolódik. Feltételezik, hogy a vegyület kötődése a troponin C-hez mintegy stabilizálja a troponin C Ca^{2+} által indukált

konformációját, ami növeli a vékony filamentumok aktivitását (Haikala és mtsai, 1992). Ugyanakkor a levosimendan nem befolyásolja a troponin C Ca^{2+} kötését (Edes és mtsai, 1995). Ebben a tekintetben a levosimendan hatásmechanizmusa élesen különbözik a pimobendan és MCI-154 vegyületek hatásától. A levosimendan troponin C-hez történő kötődése viszont Ca^{2+} -függő, így a Ca^{2+} -érzékenyítő hatás várhatólag a systole alatt maximális, a diastole alatt pedig elenyésző. Ez a jelleg magyarázhatja azt a megfigyelést, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítés ellenére a levosimendan nem rendelkezik negatív lusitrop hatással (Haikala és mtsai, 1995b). A levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatását különböző körülmények között tanulmányozták. Myofibrillaris preparátumokon a szer dóziszfüggő ($0.03\text{-}10\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) módon növelte a Ca^{2+} által létrehozott izomfeszülést (a pCa-erő összefüggést kis mértékben balra tolta), viszont a Ca^{2+} által kiváltott maximális választ, valamint a miozin-ATPáz aktivitást a levosimendan nem befolyásolta (Edes és mtsai, 1995; Sato és mtsai, 1998). Utóbbi észrevételek azért lényegesek, mivel valószínűsítik, hogy a levosimendan nem növeli a myocardium energiaigényét, illetve oxigénfogyasztását (Haikala és mtsai, 1992). Kísérletes körülmények között a levosimendan dózis-függő pozitív inotrop hatással rendelkezett (Boknik és mtsai, 1997; Edes és mtsai, 1995; Jamali és mtsai, 1997; Lilleberg és mtsai, 1995; Weterings és mtsai, 1996; Kristóf és mtsai, 1998; Kristóf és mtsai, 1998; Kristóf és mtsai, 1999), ami alacsony koncentráció alkalmazása esetén ($0.03\ \mu\text{M}$) nem járt együtt pozitív lusitrop és chronotrop hatásokkal (Edes és mtsai, 1995). Ugyanezt erősítették meg a cAMP-függő proteinkináz-inhibitorral (KT5720) végzett vizsgálatok is, amelyek során azt találták, hogy alacsony koncentrációban a pozitív inotrop hatást a KT5720 nem befolyásolta (Haikala és mtsai, 1997). A myocardialis hatások mellett a levosimendan erőteljes vazodilatátor (simaizom relaxáló) tulajdonsággal is rendelkezik, melynek a hatásmechanizmusa csak részlegesen tisztázott, feltehető, hogy abban ATP-függő K^+ csatornák megnyílásának is szerepe van (Kaheinen és mtsai, 2001; Pataricza és mtsai, 2000; Yokoshiki és mtsai, 1997; Boknik és mtsai, 1997; Ajiro és mtsai, 2002; Sato és mtsai, 1998). Számos új kísérletes adat utal arra, hogy a levosimendan tisztán Ca^{2+} -érzékenyítő hatású dózistartomány korlátozott. Kiderült, hogy a levosimendan terápiás koncentrációt meghaladó dózisokban (Edes és mtsai, 1995) az intracelluláris PDE enzimek gátlására is képes, melynek a következményes intracelluláris cAMP koncentráció növekedése miatt β -mimetikus hatása lehet. Érdekes megfigyelés, hogy a levosimendan pozitív inotrop hatása a posztischaemiás stunning során is megtartott (Kristóf és mtsai, 1998). Ez a tény azért is figyelemre méltó, mert ebben a kórállapotban a troponin I proteolitikus károsodása is szerepet játszhat (Gao és mtsai, 1997),

jóllehet ez az elképzelés még nem nyert egyértelmű bizonyítást (Solaro, 1999; Papp és mtsai, 2000; 2001).

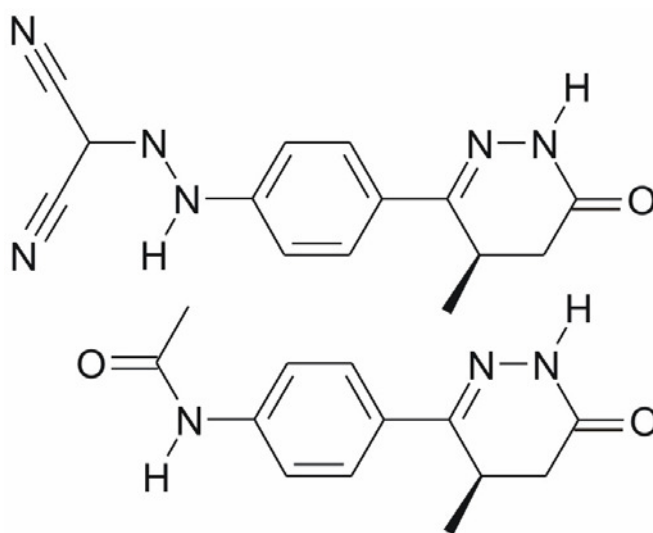
A Ca^{2+} -érzékenyítők harmadik osztályát az aktin-miozin kereszthidakra ható vegyületek (EMD 53998 és ennek enantiomerjei az (+)EMD 57033 és (-)EMD 57439), továbbá az ORG 30029 és a CGP 48506 alkotják. Hámozott izompreparátumokon az EMD 53998 balra tolta a pCa-erő görbét, (ami egyértelműen jelzi a vegyület Ca^{2+} -érzékenyítő tulajdonságát) és emelte maximális Ca^{2+} -aktivált erő értékét is. Ugyanakkor az EMD 53998 erőteljes PDE gátló hatással is rendelkezik. Mivel az optikailag aktív vegyület egy racem keverék, megvizsgálták a két sztereoizomer tulajdonságait is. Az (+)EMD 57033 inkább Ca^{2+} -érzékenyítő hatásokkal, az (-)EMD 57439 pedig inkább PDE gátló hatásokkal rendelkezett. Az EMD 53998 és az (+)EMD 57033 balra tolta a szívizom pCa-miozin ATPáz aktivitás görbét is. Az aktin-miozin ATPáz aktivitásának növekedése és a görbe balra tolódása olyan preparátumokban is észlelhető volt, amelyekből a tropomiozint és a troponin komplexeket előzetesen kivonták. Utóbbi eredmények egyértelműen jelzik, hogy ezek a vegyületek közvetlenül segítik az aktin-miozin keresztkötések kialakulását és pozitív inotrop hatásuk elsősorban ezzel magyarázható. Ugyanezt igazolta az aktin fonalak mozgásának direkt vizsgálata is (nitrocellulózhhoz kötött miozin fejeken, *in vitro* motility assay-ben), ahol az (+)EMD 57033 növelte az aktin szálak csúszási sebességet. A hatás létrejöttében a vékony filamentumok keresztkötések által történő aktiválása kitüntetett szerepet kaphat. A szív kontraktilitására kifejtett hatások közül kedvezőtlen, hogy az (+)EMD 57033 és az EMD 53998 megnyújtják a kontrakció hosszát és negatív lusitrop hatásúak. A következményes végdiastolés nyomásfokozódás diastolés funkciózavar fennállásakor (pl. szívelégtelenség) kifejezetten hátrányos lehet. Ezt a korlátozó tényezőt csak részben enyhíti az az energetikai előny, hogy az (+)EMD 57033-vel indukált pozitív inotropia csak viszonylag kis mértékben jár együtt a myocardium oxigénigényének fokozódásával. Az ORG 30029 az (+)EMD 57033-hoz hasonlóan kedvezőtlenül hat a diastolés relaxációra, ezzel szemben a CGP 48506 csak kis mértékben rendelkezik ezzel a hatással.

Az eddigi tapasztalatok alapján úgy tűnik, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítő és PDE-gátló hatás egy szerben történő megfelelő kombinációja a Ca^{2+} -érzékenyítő kutatás jelenlegi legsúlyosabb problémája. A Ca^{2+} -érzékenyítő szerek klinikai alkalmazásakor a kamrai relaxáció lassulás a leggyakoribb közvetlen nehézség (Lee és mtsai, 1996). Tiszta Ca^{2+} -érzékenyítő hatás érvényesülésekor a lassult relaxáció értelmezése viszonylag kézenfekvő. Amennyiben pl. nő a troponin C Ca^{2+} affinitása, úgy a Ca^{2+} disszociációja is csak alacsonyabb Ca^{2+} koncentrációnál következik be. Ha a troponin C Ca^{2+} -affinitása változatlan, de az aktin-

miozin ciklus mégis több erőt generál, úgy a teljes relaxációhoz szintén jelentősebb Ca^{2+} koncentráció csökkenésre van szükség. A Ca^{2+} -érzékenyítő szerek gyakori mellékhatásaként jelentkező PDE-gátlás ebből a szempontból elvileg kedvező is lehet, hiszen a PDE-gátlás következtében emelkedő cAMP szint PKA aktiváció révén fokozhatja az SR Ca^{2+} visszavételét és a relaxáció ütemét. Ezzel kapcsolatban az a legkomolyabb nehézség, hogy PKA stimuláció a troponin I foszforiláció révén a Ca^{2+} -érzékenységet is csökkentheti. Továbbá azt is észre kell venni, hogy a PDE-gátlás eredményeként végülis emelkedhet a Ca^{2+} tranziens amplitúdója (β -mimetikus hatás), így a Ca^{2+} -érzékenyítés elvi előnye (változatlan Ca^{2+} -tranziens) elvész.

A PDE-gátlás hámozott rostokon a myoplazmatikus tér dialízise miatt nem érvényesül. A Ca^{2+} -érzékenyítők PDE-gátló potenciálját és ennek kontraktilitásra kifejtett moduláló hatását ezért csak intakt sejteken, szíveken lehet tanulmányozni. További komplikációt a Ca^{2+} -érzékenyítők szervezetben belüli metabolizmusa és az ilyenkor keletkező metabolitok esetleges további szív- érrendszeri hatásai jelenthetnek. Mindezek alapján érthető, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítőkkel kapcsolatos kutatások (más szerekhez hasonlóan) csak különböző komplexitású biológiai modelleken végzett párhuzamos vizsgálatok révén szolgáltathatnak megfelelő ismereteket.

levosimendan



OR-1896

4. ábra. A levosimendan és aktív metabolitja. A levosimendan (mely a {[4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil]hidrazono}propanedinitril (-) enantiomere) és a levosimendan OR-1896 jelű aktív metabolitjának (mely a N-[4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil] acetamid (-) enantiomere) kémiai szerkezetei.

A levosimendan kötődése a troponin C N-terminálisán történik (lásd feljebb) közel a troponin I kötődési helyéhez. Így már viszonylag régen felmerült annak az elvi lehetősége, hogy a két közeli kötőhely bizonyos körülmények között egymással vetélkedhet. β -stimuláció nélkül levosimendan jelenlétében korábban nem ismertek fel interferenciát a két kötőhely között. Tehát valószínűleg a kontraktilis rendszer aktivációja és a levosimendan hatásának kialakulása ilyenkor nem érintik egymást. Ugyanakkor ismert, hogy a troponin I β -adrenerg stimulációra bekövetkező foszforilációja csökkenti a myofilamentumok, azaz a troponin C Ca^{2+} -érzékenységet. Ezért feltételezhető, hogy farmakológiai Ca^{2+} -érzékenyítés és a β -adrenerg stimulációra bekövetkező Ca^{2+} -érzékenység csökkenés között interakció áll fenn, melynek molekuláris hátterét a troponin C N-terminálisa képezi. A jelen disszertációban ennek a molekuláris kapcsolatnak kiemelt figyelmet szenteltünk.

1.5. Célkitűzések

Az előző fejezetekben bemutattuk, hogy a levosimendan olyan Ca^{2+} -érzékenyítő vegyület, amelynek receptora a troponin C N-terminálisa. Arra is felhívtuk a figyelmet, hogy a β -adrenerg ingerület a szívmusclejtekben (a troponin I foszforilációja révén) csökkenti a troponin C Ca^{2+} -érzékenységét. Jelenleg nem ismert, hogy a levosimendan Ca^{2+} -érzékenységet növelő hatását a troponin I foszforilációs szintje hogyan befolyásolja. A klinikai gyakorlatban a legelterjedtebb pozitív inotrop gyógyszerek β -adrenerg hatásmechanizmussal (pl. dopamin, foszfodieszteráz gátlók) rendelkeznek, melyek a szimpatikus izgalomhoz hasonlóan fokozzák a troponin I foszforilációs szintjét. Terminális szívelégtelenségben a troponin I foszforilációs szintje az egészséges kontrollhoz viszonyítva csökken (Bodor és mtsai, 1997; Van der Velden 2000; 2003). A krónikus szívelégtelenség mortalitási adatait viszont a tartós β -blokkoló kezelés javítja. Ezért napjainkban a tartós β -blokkoló kezelés a szívelégtelenség standard terápiájának tekinthető. Krónikus szívelégtelenség akut exacerbációja során viszont a pozitív inotrop kezelés igénye gyakorta felmerül. Pillanatnyilag nem eldöntött, hogy a β -adrenerg stimuláló szereket vagy a β -adrenerg gátlószereket a Ca^{2+} -érzékenyítővel kombinációban érdemes-e alkalmazni. Ezért célul elsősorban ennek a kérdéskörnek a vizsgálatát tűztük ki. Vizsgálatainkat különböző állatkísérletes és humán klinikai rendszerekben végeztük:

- 1) Altatott tengerimalacok i.p. β -adrenerg (isoproterenol) előkezelését követően az i.p. alkalmazott levosimendan hatását a bal kamrai systolés és diastolés funkcióira és a spontán szívfrekvenciára non-invazív módszerrel (echocardiographia) határoztuk meg. Ezzel az *in vivo* megközelítéssel megkíséreltünk válaszolni arra, hogy: a/ befolyásolja-e az isoproterenol előkezelés a levosimendan szív hatásait? b/ ha igen, akkor ez a hatás *in vivo* körülmények között milyen mértékű?
- 2) Langendorff-szerint perfundált izolált tengerimalac szívekben ugyancsak isoproterenol előkezelést követően vizsgáltuk a levosimendan hatásait a bal kamra kontrakciós és relaxációs paramétereire és párhuzamosan mértük a myofibrilláris fehérjék (elsősorban a troponin I) foszforilációs állapotát. Ebben az izolált szíveket tartalmazó elrendezésben a kontraktilis paramétereket és a myofibrilláris fehérjék foszforilációs állapotát csak az isoproterenol és a levosimendan módosíthatta. Ez a rendszer tehát mentes volt a perifériás vasculáris hatásoktól, a szisztémás reflexkapcsolatoktól és a levosimendan metabolizmusából származó aktív metabolitól (OR-1896). Az ugyancsak Langendorff-preparátumokat és fluoreszcens Ca^{2+} -mérési technikát alkalmazó kiegészítő méréseinkben

a levosimendan dózis-hatásfüggését a bal kamrai kontraktilitásra és egyidejűleg az $[Ca^{2+}]_i$ -ra is lehetőségünk volt rögzíteni. Ezekből a kísérletekből indirekt módon a levosimendan foszfodieszteráz-gátló képességére is következtethettünk.

- 3) Membránrendszerüktől megfosztott cardiomyocytákon (un. nyúzott vagy hámozott preparátumok) a kontraktilis fehérjék foszforilációjának hatását a levosimendan által kiváltott Ca^{2+} -érzékenyítésre állandó Ca^{2+} koncentráció mellett tanulmányoztuk.
- 4) Klinikai körülmények között humán beteganyagon elemeztük a levosimendan szisztémás cardiovascularis és közvetlen szívhatásait. A betegek klinikai állapotának és gyógyszerelésének figyelembe vétele mellett összefüggéseket kerestünk az állatkísérletek során nyert adatok és a levosimendan humán alkalmazása kapcsán tapasztalt eredmények között.

2. Módszerek

2.1. Echocardiographia

Az echocardiographiás vizsgálatokat felületesen altatott Hartley tengerimalacokon (450-600 g) végeztük. Az altatás ip. 100 mg.kg⁻¹ ketaminnal történt. Az Acuson Sequioa készülék 7 MHz-es transducerével a bal kamra mozgását (2D és 2D-vel irányított M-mód technika) segítségével vizsgáltuk. A vizsgálat során az állatok különböző dózisban isoproterenolt (i.p. 25-100 µg.kg⁻¹), és/vagy levosimendant (i.p. 12,5-50 µg.kg⁻¹) kaptak. A dózis-hatás görbék felvételét követően az izolált isoproterenol kezelés eredményét isoproterenol + levosimendan kombinált kezelésével hasonlítottuk össze. A kombinációs vizsgálatokban (az előzetesen elvégzett dózis-hatás görbék alapján) hozzávetőlegesen maximális szerhatást biztosító adagok egymást követő alkalmazása történt. Ennek során az isoproterenol (50 µg.kg⁻¹) alkalmazását követően 15 perccel adtuk be a levosimendant (50 µg.kg⁻¹) és a kombinált szerhatás kiértékelését további 15 perc elteltével végeztük. Az állatok a vizsgálatokat jól tűrték, elhullást vagy egyéb komplikációt nem észleltünk. A dózis-hatás görbék felvétele kapcsán ugyanazon a tengerimalacon ismételt méréseket (emelkedő gyógyszeradag) hetente egy alkalommal végeztünk.

Előkísérleteink alapján a legmegbízhatóbban reprodukálható systolés és diastolés funkció paramétereknek az M-mód echocardiographias képen mért hátsófal kontrakciós (PW-CV) sebesség, illetve hátsófal relaxációs (PW-CV) sebesség bizonyult. A nagy bazális szívfrekvencia (270-300 perc⁻¹) és egyéb pozicionálási problémák miatt a Doppler adatok és az ejekciós frakció nehezen reprodukálhatónak és ezért megbízhatatlannak bizonyultak. A méréseket két gyakorlott echocardiographias személy végezte, melyek során adott állapot jellemzésére 3 szívciklus átlaga szolgált.

2.2. Perfúziós technika

A perfúziós kísérleteinkhez 500-600 g súlyú Hartley tengerimalacokat használtunk. A vizsgálatokhoz az állatokat pentobarbitál (30 mg.kg⁻¹) és heparin (500 U.kg⁻¹) keverékével elaltattuk, majd a mellkas megnyitását követően a szívet kiemeltük. A lehűtött szíveket azonnal kanuláltuk, majd módosított Krebs-oldattal Langendorff-szerint retrográd aortaperfúziót végeztünk (az oldat összetétele (mmol.L⁻¹): NaCl:118, KCl:4,7, CaCl₂:2,5, MgSO₄:1,2, NaHCO₃:25, Na₂EDTA: 0,5, KH₂PO₄:0,23, glükóz:5,5; pH:7,4). A puffert 95%-os O₂ és 5% CO₂ keverékével szaturáltuk. Az izolált szívek felfüggesztését követően a

kísérletek egy részében a bal kamra mechanikai paramétereinek mérése mellett radioaktív jelölést végeztünk, másik részében fluoreszcens módszerrel az $[Ca^{2+}]_i$ -t rögzítettük.

A radioaktív jelzést alkalmazó elrendezésben a szíveket először 25-30 percig (átfolyásos, nem recirkulációs módon) radioaktívan nem jelölt Krebs-pufferrel perfundáltuk. Ezen idő alatt a preparátum hemodinamikai szempontból stabilizálódott. Ezt követően kapcsoltunk át arra a recirkulációs rendszerre, mely $200 \text{ cpm.pmol}^{-1} \text{ } ^{32}\text{P}$ -ortofoszfátot (P_i) tartalmazó módosított Krebs-puffert tartalmazott és a dobogó szívpreparátumokat ezzel 30 percig perfundáltuk. Ez az idő a myocardium ATP készletének magas specifikus aktivitású jelöléséhez elegendő volt. A recirkulációs periódust követően visszakapcsoltunk az eredeti átfolyásos rendszerre és a szíveket hideg (radioaktívan nem jelzett) Krebs-pufferrel egy percig mostuk. Ezt követően a szíveket különböző hatóanyagokkal (isoproterenol, levosimendan) kezeltük, majd a preparátumokat folyékony nitrogénben lehűtött Wollenberger-fogóval hirtelen lefagyasztottuk. A levosimendant az Orion-Farmos Laboratóriumában szintetizálták.

Az $[Ca^{2+}]_i$ monitorozására szolgáló elrendezésben a szíveket a hemodinamikai stabilizáció érdekében Ca^{2+} indikátort nem tartalmazó Krebs-pufferrel először 25-30 percig (átfolyásos, nem recirkulációs módon) perfundáltuk. Ezt követően a dobogó szíveket $200 \text{ ml } 5 \mu\text{M}$ Fura-2-acetoximetilésztert tartalmazó módosított Krebs-puffert tartalmazó oldattal 30 percig recirkuláltattuk. Ez az idő a myocardium Fura-2-jelölését szolgálta. A recirkuláció alatt ugyanis a zsíroldékony Fura-2-acetoximetilészter a szívizomsejtek intracelluláris terébe diffundált, majd ott nem specifikus eszterázok hatására a molekula acetoximetilészter komponense hidrolizált. A hidrolízis után visszamaradó Fura-2 zsíroldékonsága csekély, ezért a Fura-2 kizárólag az intracelluláris térben koncentrált. A recirkulációs periódust követően visszakapcsoltunk az eredeti átfolyásos rendszerre és a szívek koszorúsér-rendszerét a továbbiakban Fura-2-acetoximetilészter-mentes Krebs-oldattal perfundáltuk. Ezt követően a szíveket növekvő koncentrációjú levosimendan oldattal kezeltük, majd a szerhatások kialakulása után a preparátumok mechanikai viselkedését és bal kamra epicardiális sejtrétegeinek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját párhuzamosan rögzítettük. Az $[Ca^{2+}]_i$ méréséhez a szív bal kamrai felszínét trifurkációs száloptikás kábel közbeiktatásával Photon Technology International (USA) gyártmányú Deltascan egységgel világítottuk meg. A megvilágítás során 200 Hz frekvenciával 340 nm -es és 380 nm -es gerjesztő fényhullámhosszakot váltogattunk. Az $[Ca^{2+}]_i$ -val arányos 510 nm -es fluoreszcens fényt egy nagy érzékenységű fotoelektron-sokszorozó egységhez vezettük, mely a fényintenzitásoknak megfelelő elektromos jeleket állította elő. Az $[Ca^{2+}]_i$ változásait a Fura-2 két gerjesztő

hullámhosszon nyert fluorszincencia-intenzitás (háttérkorrigált) hányadosával (R) fejeztük ki (Gryniewicz és mtsai, 1985).

A perfúzió közben a szívfrekvenciát és a bal kamra nyomását a bal kamrába helyezett polietilén kanül segítségével folyamatosan regisztráltuk. A kanült Statham-transzducerhez, illetve ezen keresztül egy IBM-PC kompatibilis komputer-rendszerhez csatlakoztattuk, mely az optikai jelek feldolgozását is lehetővé tette. A kontraktilitás és a relaxáció sebességének jellemzésére a kamrai nyomásgörbe idő szerinti első deriváltjának maximális értékeit használtuk ($+dP/dt_{\max}$ és $-dP/dt_{\max}$).

2.3. Biokémiai módszerek

A myofibrilláris frakció tisztítása a lefagyasztott szívizom minták porításával nyert anyag 1-1,5 g-os mennyiségeiből történt (Solaro, 1971). Az izolálási technika lényege, hogy többszöri homogenizálást és centrifugálást követően 1%-os Triton X-100 detergenst tartalmazó foszfát pufferrel a különböző membránszennyeződések és az egyéb szolubilizálható fehérjéket eltávolítsuk.

Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist 10-18%-os és/vagy 5-20%-os lineáris gradiens lapgéleken Laemmli (1970) szerint végeztük. A gélelektroforézist követően a géllapokat fixáltuk, majd Coomassie-kékkel festettük. A fölösleges festék kimosását 40% metanolt, és 10% ecetsavat tartalmazó oldatban végeztük. Ezt követően a géllapokat vékony műanyag zsákokban légmentesen lezártuk és Kodak Lanex Regular kazettákba helyeztük. Az autoradiográfiát Fuji RX röntgenfilmekkel, általában 48 órás expozíciós időt használva végeztük. Az előhívott filmek és a Coomassie-kékkel festett gélen látható kép alapján az egyes radioaktívan jelölődött fehérjéket (troponin I és C protein) molekulásúlyuk alapján azonosítottuk. A fehérjékbe beépült ^{32}P meghatározásához az egyes foszfoproteineket a géllapokból szikével kivágtuk majd folyadék-szcintillációs módszerrel radioaktivitásukat megmértük (Édes és mtsai, 1989). A foszfát beépülést (figyelembe véve valamennyi perfundált szív $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ specifikus aktivitását) $\text{pmol } ^{32}\text{P}.\text{mg}^{-1}$ fehérje értékekben, fejeztük ki.

A fehérjemeghatározásokat Peterson (1997) módszerével végeztük, standardként borjú szérum albumint használtunk. A perfundált szívek $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ specifikus aktivitását Kopp és Bárány szerint (1979) határoztuk meg.

2.4. Mérések izolált cardiomyocytákon

A cardiomyocytákat mechanikusan izoláltuk (Van der Velden és mtsai, 1998; 2002; Papp és mtsai, 2002). Az izoláló oldat a következő komponenseket tartalmazta (mmol.L⁻¹) imidazol:10, MgCl₂:1, KCl:100, EGTA:2, Na₂ATP:4 (pH 7,0). Az aktiváló (pCa 4,75) és relaxáló (pCa 10) oldatok szabad Ca²⁺ összetételét komputer program segítségével terveztük (Fabiato és Fabiato, 1979). A közbülső pCa értékekkel jellemzett aktiváló oldatokat a fentebb leírt alap oldatok megfelelő arányú keverésével állítottuk elő. A myocytákat tartalmazó szuszpenziót 0,5%-os Triton X-100-al 5 percig kezeltük. Ez a detergens kezelés a sejtek membránkomponenseit eltávolította és így az aktiváló oldat Ca²⁺ koncentrációja szabad diffúzió révén jutott el a myofilamentumokhoz. A vizsgálni kívánt izolált cardiomyocytát invertáló mikroszkóp tárgyasztalán szilikonragasztóval két vékony rozsdamentes acéltűhöz ragasztottuk. Az egyik tűhöz érzékeny erőmérő transzducert, a másik tűhöz elektromagnetikus motort rögzítettünk és mindkét tű mozgását botkormány-vezérelt elektromotoros mikromanipulátorokkal szabályoztuk. Az átlagos sarcomerhosszt relaxáló oldatban 2,2 µm-re állítottuk (Fan és mtsai, 1997; Gannier és mtsai, 1993). A szívizomsejtet övező oldatok cseréjét kontrollált hőmérsékleti viszonyok mellett (15 °C) a tárgyasztal oldalirányú mozgatása révén valósítottuk meg, melynek során a preparátumot az egyik kis volumenű oldatcseppből (kb. 40µl) a másikba vittük át. Az izometrikus erőmérés során a kialakult maximális feszülést mind analóg módon, mind digitális jelek formájában egyedi fejlesztésű komputer program segítségével regisztráltuk. A maximális feszülés kialakulását követően a myocyták hosszát hirtelen (1 msec alatt) 20%-al csökkentettük majd az eredeti hosszra visszaállítottuk („slack test”) (Papp és mtsai, 2002). Ez a manőver a nulla erőszint meghatározására szolgált. A kísérletek során az adatgyűjtést 20 Hz-es frekvenciával végeztük, a slack test során a frekvenciát 1000 Hz-re növeltük.

2.5. Statisztikai módszerek

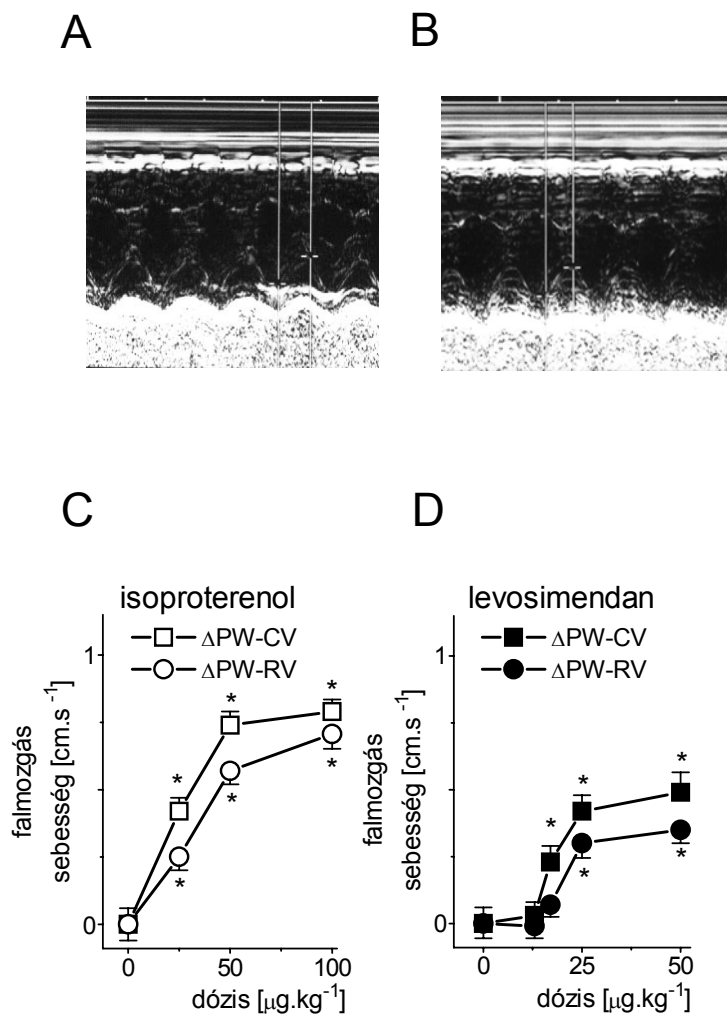
A számszerűsíthető eredményeket az átlag és a mintaközép hibája (S.E.M.) segítségével tüntettük fel, a statisztikai vizsgálatokat Student féle *t*-teszttel vagy varianciaanalízissel végeztük. Szignifikánsnak a P<0,05 eltéréseket tekintettük. A levosimendan Ca²⁺-érzékenyítő hatásának koncentráció-függését módosított Hill-egyenlet segítségével illesztettük (Szilágyi és mtsai, 2004).

3. Eredmények

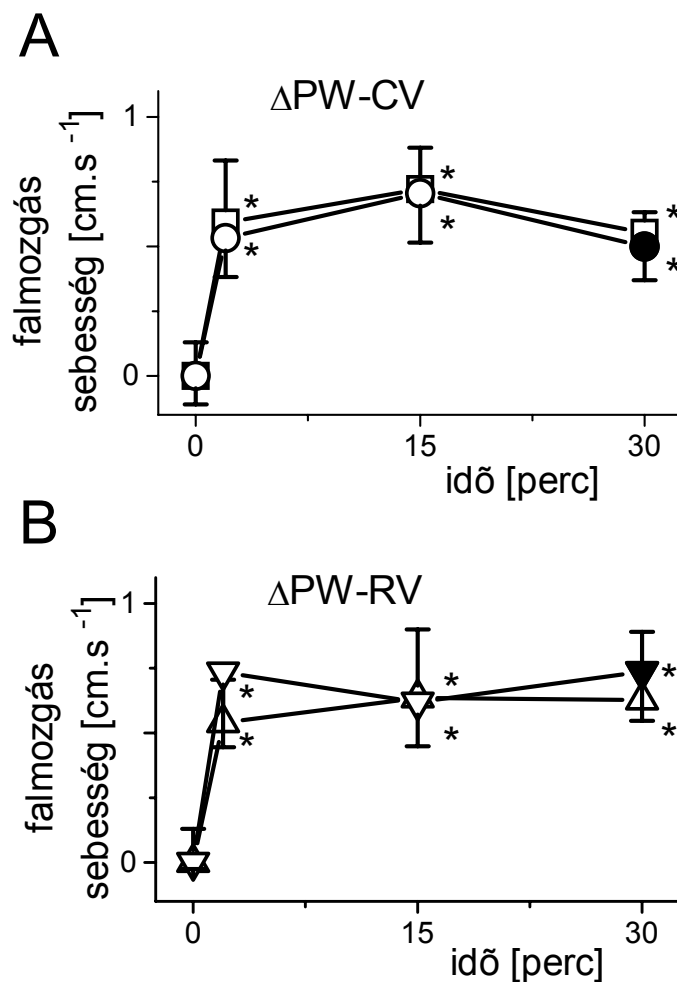
3.1. Echocardiographias vizsgálatok

Altatott tengerimalac szíveken, mind a levosimendan, mind az isoproterenol a bal kamra hátsó falának összehúzóási (PW-CV) és a relaxációs sebességét (PW-RV) dózis-függő módon fokozta. Az isoproterenol ($100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) hatására a bazális PW-CV és PW-RV értékek ($2,08\pm 0,06 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, illetve $2,28\pm 0,06 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$) szignifikánsan növekedtek ($2,87\pm 0,09 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, illetve $2,99\pm 0,06 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$). Ugyanezen állatokban a szívfrekvencia is szignifikáns emelkedést mutatott ($284\pm 11 \text{ ütés}\cdot\text{perc}^{-1}$ értékről $341\pm 10 \text{ ütés}\cdot\text{perc}^{-1}$ -es értékre). A Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ -os dózisa szintén szignifikánsan növelte, mind a kontraktilitási ($1,96\pm 0,06 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ -ről $2,45\pm 0,07 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ -re), mind a relaxációs paramétereket ($2,03\pm 0,05 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ -ről $2,38\pm 0,05 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ -re). Kisebb mértékben, de a szívfrekvencia is szignifikánsan nőtt ($278\pm 9 \text{ ütés}\cdot\text{perc}^{-1}$ -ről $307\pm 8 \text{ ütés}\cdot\text{perc}^{-1}$ -re) (5. ábra).

Kísérleteink következő fázisában a levosimendan kezelést előzetes isoproterenol alkalmazás után vezettük be (6. ábra). A potenciális interakció vizsgálata érdekében először közel maximális hatású isoproterenol kezelést alkalmaztunk, majd a maximális hatást kiváltó levosimendan dózist injektáltuk. A kombinált kezelés idő-hatás görbéinek és az izolált isoproterenol alkalmazás idő-hatás görbéinek összehasonlítása során a levosimendan adását követően nem észleltünk szignifikáns változást a kamrafunkciós paraméterekben sem a 15 perces, sem a 30 perces adatok összehasonlításakor. (Az önálló [nem kombinált] dózis-hatás görbék felvétele kapcsán a levosimendan hatás csúcspontja 15 percnél volt.) A kombinált kezelés során a maximális levosimendan dózis ($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) előzetes isoproterenol ($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) kezelést követően tehát, már nem fokozta a bal kamra kontraktilitását, sem a relaxáció sebességét sem a szívfrekvenciát.



5. ábra. Altatott tengerimalacok bal kamrai (hátsó fal) falmozgás sebességének meghatározása M-mód echocardiographia felhasználásával. Az 1 másodperc hosszúságú M-mód felvételeket nyugalmi állapotban (A) és 2 perccel az isoproterenol (i.p. $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (B) alkalmazása után mutatjuk be. A függőleges vonalak a systolés falmozgás kezdetét és végét jelölik. C. A systolés falmozgás (PW-CV, □) és a diastolés falmozgás (PW-RV, ○) isoproterenol okozta növekedése (Δ) az isoproterenol koncentrációjának függvényében (átlag \pm S.E.M.). D. Δ PW-CV (■) és Δ PW-RV (●) az alkalmazott levosimendan koncentrációjának függvényében. A csillagok a szermentes alapállapothoz viszonyított szignifikáns különbségeket jelölik. (A PW-CV és PW-RV értékeket az isoproterenol és levosimendan alkalmazása után 2 és 15 perccel határoztuk meg.)



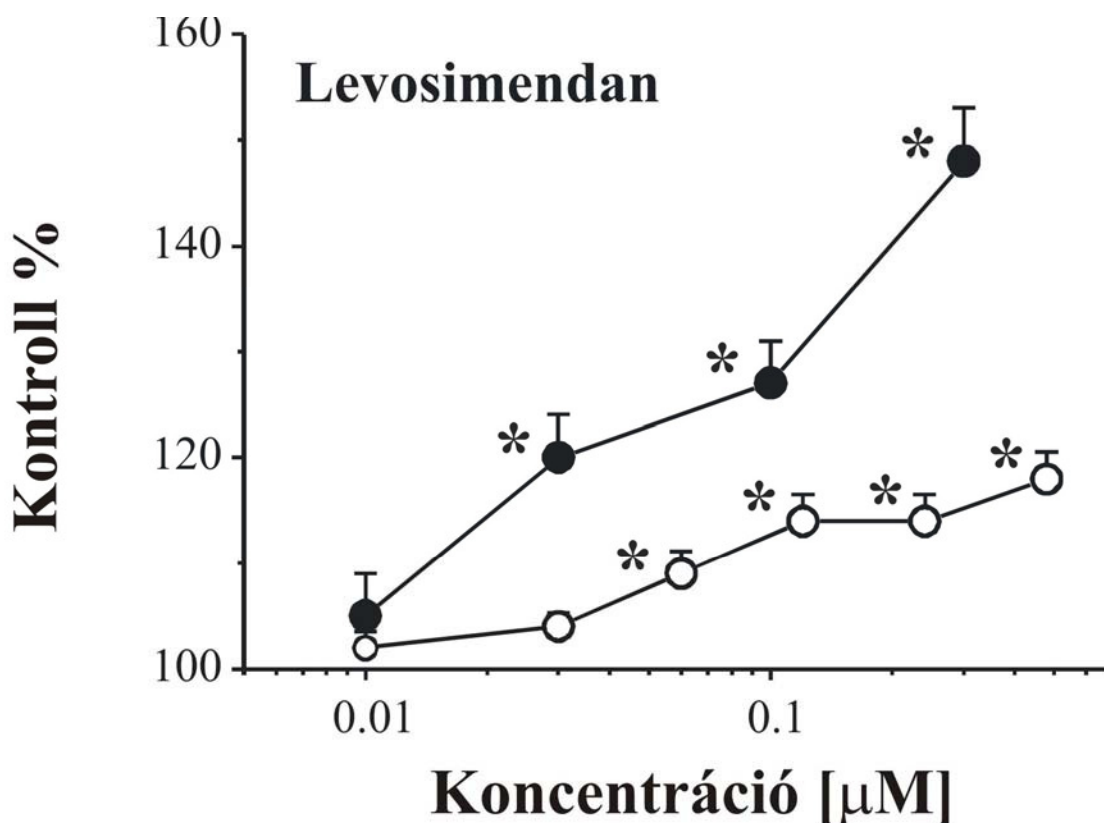
6. ábra. A $\Delta PW-CV$ (A) és $\Delta PW-RV$ (B) átlagok időfüggése altatott tengerimalacok különböző csoportjaiban: egyszeri isoproterenol alkalmazás ($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a 0 perc időpillanatban; $\Delta PW-CV$: \square ; $\Delta PW-RV$: \triangle); egyszeri isoproterenol alkalmazás ($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a 0 perc időpillanatban) egyszeri levosimendan alkalmazással kombinálva ($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a 15 perces időpillanatban) ($\Delta PW-CV$: \circ ; $\Delta PW-RV$: ∇). Az isoproterenol levosimendannal történő kombinációja 30 perccel a kísérletek kezdete után ($\Delta PW-CV$: \bullet ; $\Delta PW-RV$: \blacktriangledown) a kontraktilis paraméterekben nem eredményezett szignifikáns változást a levosimendan mentes csoport megfelelő paramétereireihez viszonyítva (\square vagy \triangle). (A csillagok a szermentes alapállapothoz (0 perc) viszonyított szignifikáns különbségeket jelölik.)

Kombinált kezelés során a levosimendan inotrop és lusitrop hatásának elmaradása elviekben számos okkal magyarázható. Felmerülhet például, hogy a levosimendan hiányzó hatása az altatott állatok folyamatosan változó elő- és utóterhelésével, valamint a növekvő szívfrekvenciával is összefüggésbe hozható. Más szavakkal nem zárható ki, hogy az altatott állatokban a Ca^{2+} -érzékenyítés hatását a folyamatosan változó keringési környezet miatt nem észlelhetjük megfelelően. Ezért kísérleteinket a továbbiakban izolált szívpreparátumokra is kiterjesztettük.

3.2. Perfúziós vizsgálatok

Perfúziós vizsgálataink során a Langendorff-preparátum bal kamrai utóterhelését konstans (70 vízcmm körüli) értékre állítottuk, ezért ez a modell némileg leegyszerűsített körülmények között tette lehetővé a kamra funkciójának tanulmányozását. Az izolált készítmény továbbá biztosította az $[Ca^{2+}]_i$ párhuzamos rögzítését vagy a preparátum $[^{32}P]$ ortofoszfáttal történő magas fajlagos aktivitású izotóp jelölését és így a fehérjefoszforilációs folyamatok (pl. troponin I foszforiláció) direkt, „in vivo” tanulmányozását is (Édes és mtsai, 1989). Kísérleteink során igyekeztünk a kombinált (isoproterenol + levosimendan) kezelést olyan körülmények között végezni, hogy a kontraktilitásban és a relaxáció sebességben bekövetkező változásokat a myofibrilláris fehérjék foszforiláltsági állapotának párhuzamos tanulmányozásával értékelhessük.

Izolált Langendorff-szíveket alkalmazó kísérleteink első lépéseként, az altatott tengerimalacokon végzett mérésekhez hasonlóan, először dózis-hatáserősség vizsgálatokat végeztünk. A levosimendan maximális hatáserősségének meghatározása során párhuzamosan az $[Ca^{2+}]_i$ -t is rögzítettük. A 7. ábrán bemutatott eredmények alapján az isoproterenollal kombinált mérésekhez a $0,3 \mu\text{molL}^{-1}$ levosimendan koncentrációt választottuk. A fluoreszcens hányados jel (R) dózis függése felhívja a figyelmet arra, hogy ennél a koncentrációnál viszonylag kis mértékű, de szignifikáns Ca^{2+} tranziens amplitúdó növekedéssel is számolni kell. További előkísérleteket és korábbi irodalmi adatok felhasználva az izolált isoproterenol alkalmazás vonatkozásában is bővítettük ismereteinket (Édes és mtsai, 1989). Nyilvánvalóvá vált, hogy a 2 perc időtartamú $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ isoproterenol kezelés maximálisan foszforilálta a myofibrilláris fehérjéket (legalábbis a markerként használt troponin I-t és a C protein-t). A stimulálás leállítását követően a kontraktilitási ($+dP/dt_{\text{max}}$) és relaxációs ($-dP/dt_{\text{max}}$) paraméterek és a szívfrekvencia 3-4 perc alatt visszatértek a stimulálást megelőző bazális értékekre (Talosí és mtsai, 1993). Ehhez képest a troponin I és a C protein defoszforilációja lassú folyamatnak bizonyult, mivel ezek még 15 perccel az isoproterenol stimulálást követően is részlegesen foszforiláltak maradtak (Talosí és mtsai, 1993). Kombinált szerhatást tesztelő kísérleteinket ezért úgy állítottuk be, hogy kihasználjuk azt az időablakot, amikor a bal kamra funkció már normalizálódott, de a troponin I és a C protein még részlegesen foszforilált állapotban volt. Ez a megoldás egyedülálló lehetőséget nyújtott annak a kérdésnek a tanulmányozására, hogy a kontraktilis paraméterek azonos értékein (kiindulási vs. isoproterenol stimulált) befolyásolja-e a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatását a kontraktilis fehérjék foszforilációja (8. ábra).

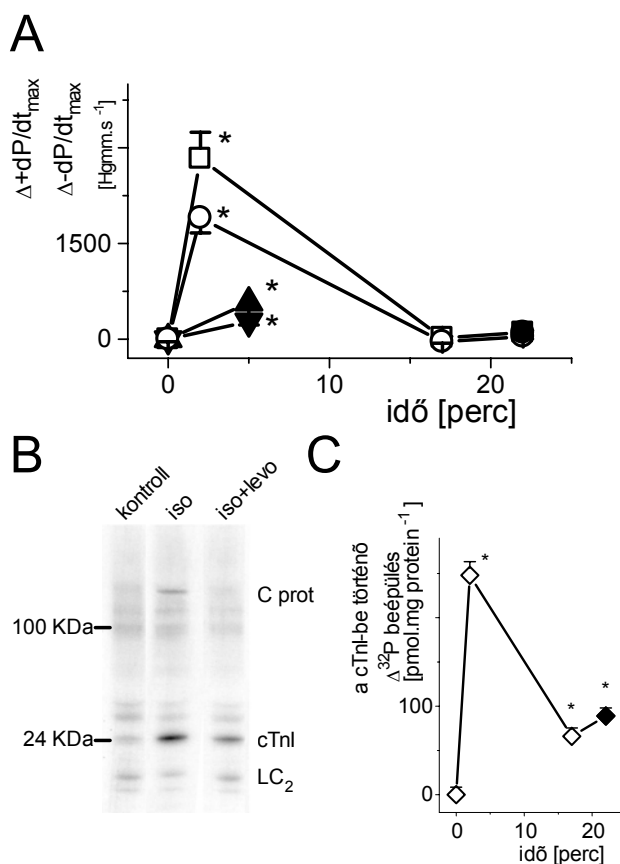


7. ábra A levosimendan dózis-hatás függése Langendorff-szerint perfundált tengerimalac szíveken a kontraktilitásra (+dP/dt_{max}, ●) és az [Ca²⁺]_i-val arányos fluoreszcens hányados értékekre (○) (átlag±S.E.M.). A csillagok a szermentes alapállapothoz (100%) viszonyított szignifikáns különbségeket jelölik.

Az isoproterenol (0,1 µmol.L⁻¹, 2 perc) és a levosimendan (0,3 µmol.L⁻¹, 5 perc) önállóan alkalmazva Langendorff-szerint perfundált szíveken egyértelmű pozitív inotrop, lusitrop és chronotrop hatásokkal rendelkeztek. Az isoproterenol stimulálás kapcsán a bazális +dP/dt_{max}, -dP/dt_{max} és szívfrekvencia értékek (rendre: 2066±43 Hgmm.sec⁻¹, 2002±40 Hgmm.sec⁻¹, illetve 172±16 ütés.perc⁻¹) drámai módon, szignifikánsan növekedtek (rendre: 4896±415 Hgmm.sec⁻¹, 3904±238 Hgmm.sec⁻¹, illetve 273±11 ütés.perc⁻¹). Az önálló levosimendan kezelés esetében ugyanezen paraméterek a következőképpen alakultak; bazális értékek, rendre: 2050±39 Hgmm.sec⁻¹, 1990±37 Hgmm.sec⁻¹, illetve 175±4 ütés.perc⁻¹; stimulált értékek, rendre: 2624±83 Hgmm.sec⁻¹, 2269±56 Hgmm.sec⁻¹, illetve 201±3 ütés/perc. Korábbi irodalmi adatokkal összehangban (Talosi, 1993) azt tapasztaltuk, hogy az isoproterenol stimulálást követő emelkedett kamrafunkciós paraméterek és a szívfrekvencia 3-4 perccel az isoproterenol infúzió leállítását követően normalizálódtak és tértek vissza a bazális értékekre.

A kombinált kezelés során először isoproterenolt alkalmaztunk (0,1 µmol.L⁻¹, 2 perc), majd a stimulálást követően a szívpreparátumokat további 15 percre mostuk, ez alatt valamennyi kamrafunkciós paraméter normalizálódott. Ekkor maximális dózisú

levosimendan alkalmaztunk ($0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) és a bal kamra funkcióváltozását regisztráltuk. Utóbbi körülmények között a levosimendan hemodinamikailag nem okozott szignifikáns növekedést a kamrafunkciós paraméterekben ($+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$, $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$).



8. ábra. **A.** Langendorff-szerint perfundált tengerimalac szívek $+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ (□) és $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ (○) változásainak (Δ) időfüggése (a 0 időpillanattól 2 percig tartó $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ koncentrációjú) isoproterenol és azt követő (17. perctől indított 5 percig tartó $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ koncentrációjú) levosimendan kezelés során. A (0 időpillanatban indított 5 percig tartó $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ koncentrációjú) levosimendan izolált alkalmazásának kontraktilis paraméterekre kifejtett következményeit ($\Delta +\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$: ▲ és $\Delta -\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$: ▼) szintén feltüntettük. A levosimendan izolált alkalmazásával ellentétben (▲ és ▼) nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kontraktilis paraméterekben ha a levosimendan kezelést isoproterenol előkezeléssel kombináltuk (■ és ●). **B.** A Langendorff-perfúziós kísérletek végén a szívizomfehérjék ³²P inkorporációját autoradiográfias módszerrel határoztuk meg. Az így ábrázolt fehérjecsíkok intenzitása a ³²P inkorporáció mértékével („kontroll” = kontroll körülmények; „iso” = 2 perc $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ isoproterenol perfúzió; „iso+levo” = isoproterenol és levosimendan kombinált alkalmazása; „C prot” = miozin kötő protein C, LC₂ = miozin könnyű lánc 2). **C.** A troponin I (cTnI) ³²P beépülés változásának (melyet a kontraktilis rendszer foszforilációjának markereként kezeltünk) időbeli alakulása isoproterenol (◇) és azt követő levosimendan (◆) kezelést követően Langendorff-szerint perfundált tengerimalac szíveken (a protokoll az A részen lévón leírtakkal megegyezik). Az A és C ábrarészekben a csillagok szermentes állapothoz viszonyított szignifikáns különbségeket jelölik.

A myofibrilláris fehérjék foszforilációját a szívpreparátumok ³²P-ortofoszfát jelölését követően vizsgáltuk. A korábbi irodalmi adatokkal megegyezően az isoproterenol ($0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 2 perc) többszörösére növelte ($360 \pm 31 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein, $n=4$) a bazális foszforilációt ($112 \pm 17 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein, $n=4$). Ugyanakkor az isoproterenol stimulálás

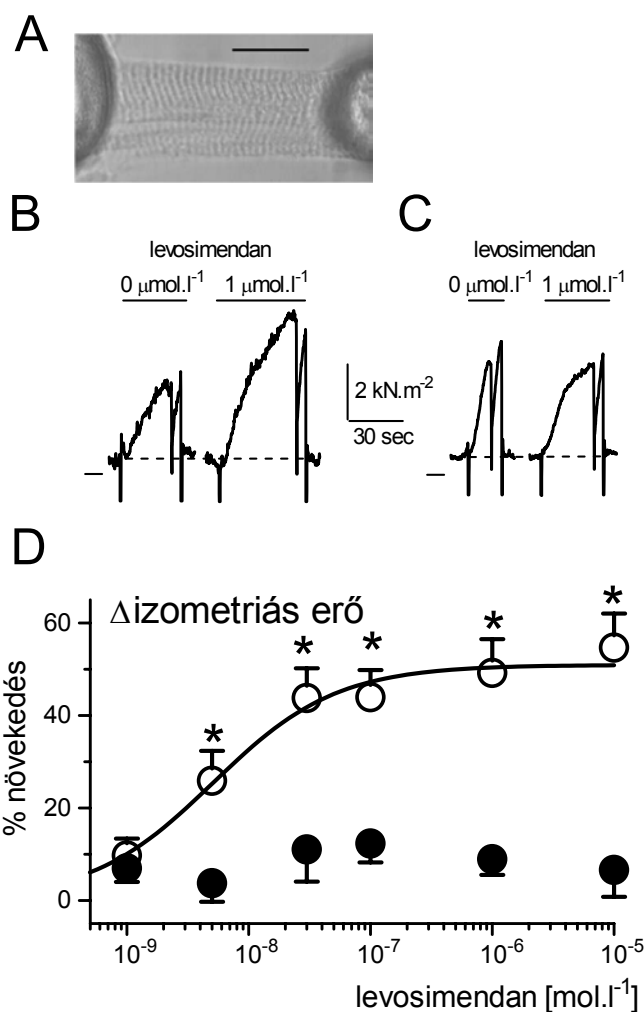
leállítását és 15 perc mosást követően a troponin I foszforiláció még mindig szignifikánsan magasabb volt ($178 \pm 19 \text{ pmol.mg}^{-1}$ protein, $n=4$), mint a bazális érték. Ha az isoproterenol stimulálást és a 15 perces mosási periódust egy további levosimendan infúzió ($0,3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) követte, akkor 5 perc folyamatos stimulálás után további mérsékelt, de szignifikáns növekedést észleltünk a troponin I ^{32}P -inkorporációban ($201 \pm 18 \text{ pmol.mg}^{-1}$ protein, $n=4$). Végeredményben kísérleteinkkel egyértelműen bizonyítani lehetett, hogy isoproterenol stimulálást követően, amíg a troponin I foszforiláció a bazális értékre nem csökken (ez perfundált tengerimalac szíveken kb. 30 perc) a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan szignifikánsan csökkent hemodinamikai hatékonyságot mutatott.

Mindezek után megvizsgáltuk a myofibrillumok levosimendan - Ca^{2+} -érzékenység összefüggését izolált, hámozott sejteken is, ahol a myofibrilláris szerhatások azonos Ca^{2+} koncentrációk és fehérje foszforilációs szintek mellett tanulmányozhatók.

3.3. Izolált cardiomyocyta vizsgálatok

Izolált hámozott cardiomyocytákon a levosimendan dózis-függő módon növelte a myofibrilláris Ca^{2+} -érzékenységet. Ez a hatás elsősorban a szubmaximális Ca^{2+} -aktivációt okozó Ca^{2+} koncentrációknál (esetünkben pCa 6,2) volt jól észlelhető. Szermentes körülményeink között a pCa 6,2 Ca^{2+} koncentrációnál a pCa 4,75-nél mért maximális izometrikus erő (P_0) $13 \pm 1\%$ -a alakult ki. A fenntartott pCa 6,2 mellett azonban, már 5 nmol.L^{-1} levosimendan hatására is szignifikánsan növekedett az izometriás erő, ami a vegyület Ca^{2+} -érzékenyítő hatását jelezte. A maximálisan elérhető izometrikus erő növekedés ($10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ -os levosimendan koncentráció hatására) $51 \pm 5\%$ -nak bizonyult.

Ugyanakkor a myofibrilláris preparátum cAMP-függő PKA katalitikus alegységgel (100 U/ml ATP jelenlétében) történő 40 perces előkezelése, mely a kontraktilis rendszer foszforiláltságát fokozta, teljes mértékben felfüggesztette a levosimendan által kiváltott Ca^{2+} -érzékenyítést. Ezen körülmények között még a $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ -os levosimendan koncentráció is teljesen hatástalannak bizonyult. Korábbi irodalmi adatok alapján (Van der Velden és mtsai, 2000; 2002) a katalitikus alegységgel történt inkubálás, hasonló kísérleti körülmények között egyértelműen foszforilálta a troponin I alegységet.

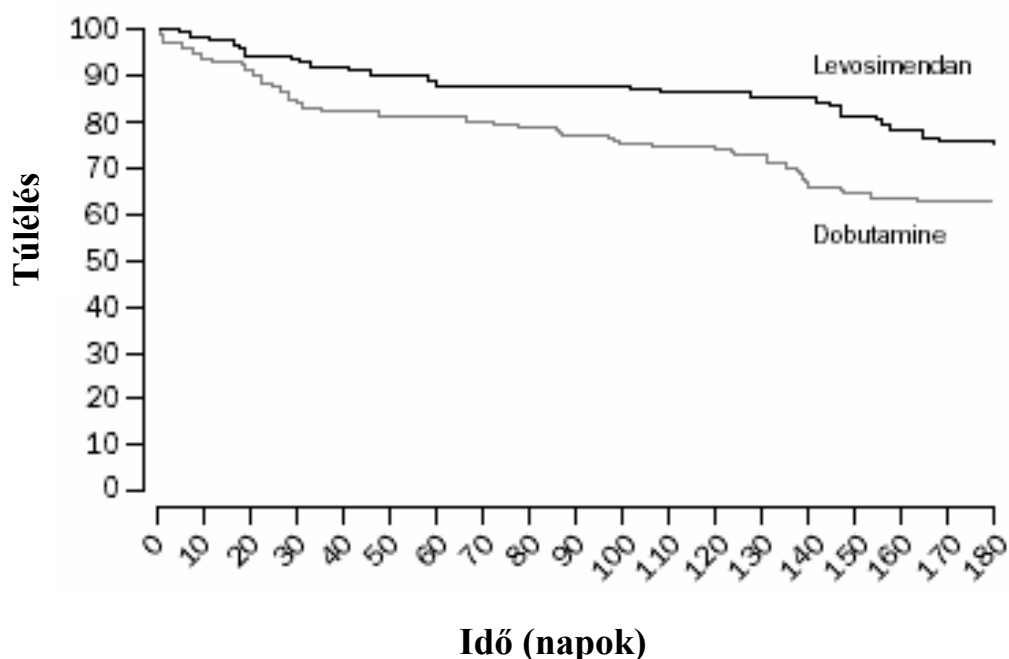


9. ábra. Hámozott tengerimalac szívizomsejteken végzett közvetlen erőmérések. A kísérletes elrendezés során használt szívizomsejt preparátum kétdimenziós képét az A ábrarész mutatja. Az izolált myocytát egy nagyérzékenyséű erőmérő és egy elektromágneses motor között rögzítettük (sarcomerhossz: $2,2 \mu\text{m}$, kalibrációs vonal: $20 \mu\text{m}$, relaxáló oldat). A Ca^{2+} kontraktúrákat ($p\text{Ca}$: 6.2) $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ levosimendan jelenlétében és hiányában rögzítettük 100 U.ml^{-1} protein kináz A (40 percig tartó) inkubáció előtt (B) és után (C). A vízszintes jelölések és a szaggatott vonalak a nulla és passzív erőszinteket mutatják. D. Az izometriás erő dózis-függése a levosimendan koncentráció függvényében protein kináz A kezelés előtt (○) és után (●). (100 U.ml^{-1} protein kináz A és 6 mmol.l^{-1} dithiothreitol 40 percig 20°C -on.) A folyamatos vonal a Hill-egyenlettel végrehajtott illesztés eredményeit mutatja ($EC_{50} = 5 \pm 3 \text{ mmol.l}^{-1}$, $n_{\text{Hill}} = 0.9 \pm 0.3$, $P_{\text{levo(max)}} = 51 \pm 5\%$). A csillagok a szermentes alapállapothoz (100%) viszonyított szignifikáns különbségeket jelölik.

3.4. Megfigyelések humán szívelégtelenség kezelése kapcsán

Ritkán adódik egy kutatási project kapcsán, hogy a preklinikai kísérleti megfigyeléseket (állatkísérleteket) követően ugyanannak a személynek lehetősége legyen az újonnan kifejlesztett gyógyszer klinikai kipróbálásában is résztvenni. Szerencsésen alakultak a körülmények, mivel a preklinikai kísérleteink mellett elindultak a levosimendannal kapcsolatos III-as fázis vizsgálatok is. A vizsgálatok kapcsán szívelégtelenség különböző formáiban (krónikus szívelégtelenség akut exacerbációja, szív műtétet követő globális

stunning, előrehaladott szívelégtelenség [szívtranszplantációs várólista]) hasonlították össze a levosimendan klinikai hatékonyságát a vezető forgalomban lévő pozitív inotrop szerrel (dobutamin). Ez a tanulmány a LIDO study volt, amelybe összesen 203 beteget választottak be. Klinikánk is részt vett a tanulmányban és összesen 10 beteget randomizáltunk. A LIDO tanulmány adatai alapján a levosimendan kiváló hemodinamikai hatékonyságú, jól tolerálható szernek bizonyult és szignifikánsan csökkentett a 30 napos és féléves teljes mortalitást (10. ábra). A LIDO tanulmányba beválogatott betegeink adatait külön elemezve azt az érdekes eseti megfigyelést tettük, hogy a krónikus β -blokkoló kezelés szignifikánsan javította a levosimendan hatékonyságát (perctérfogat, pulmonlis kapillaris nyomás csökkenése) (1. táblázat). Mivel a krónikus β -blokkoló kezelés hatására egyértelműen csökken a bazális cAMP szint és a troponin I bazális foszforilációja feltételeztük, hogy a levosimendan hemodinamikai hatékonyságának növekedése a bazális foszforiláció ezen változásával függhet össze. Ezek a klinikai megfigyelések teoretikusan jól magyarázhatóak preklinikai álatkísérleteink adataival. A LIDO tanulmányban az egész beteganyagra kiterjesztve részletesen megvizsgálták a β -blokkoló kezelés és a levosimendan hatékonyságának összefüggését és megerősítették egyedi megfigyelésünket (11. ábra) (Follath és mtsai, 2002).

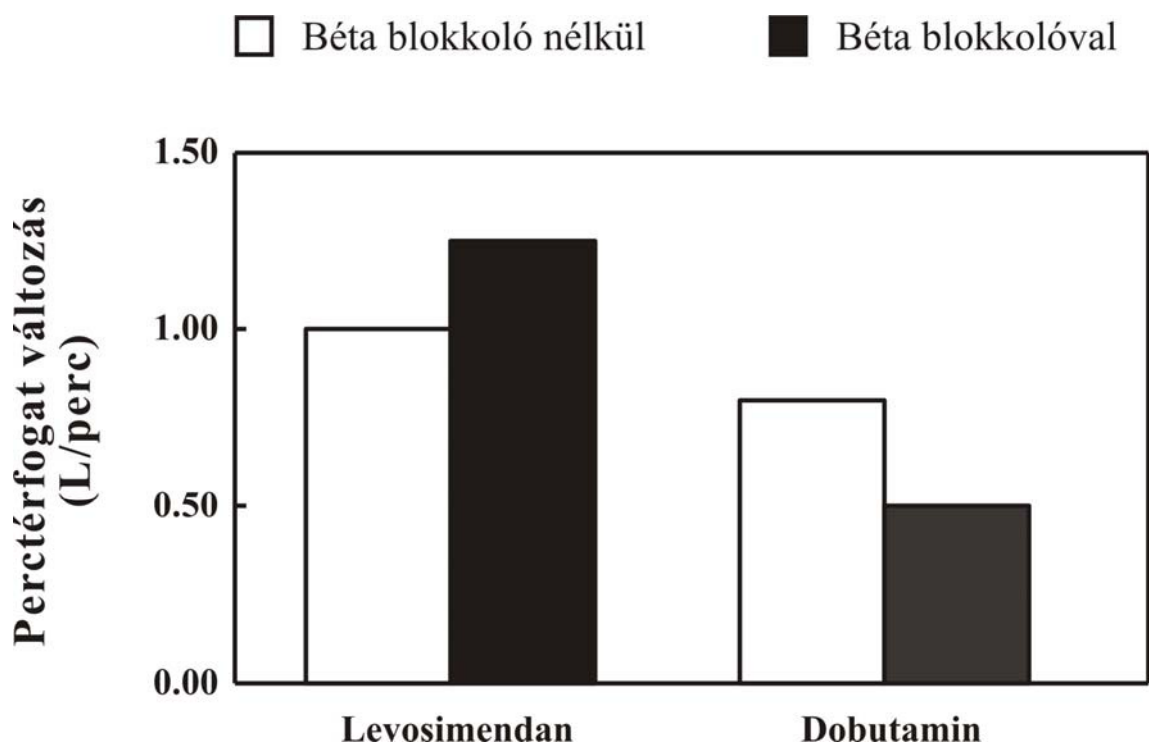


10. ábra. A levosimendan és dobutamin hatása a túlélésre előreladott szívelégtelenségben szenvedő betegeken. A halálozás csökkenése a levosimendan csoportban szignifikánsnak bizonyult mind az 1 hónapos (30 nap), mind a fél éves (180 nap) időpontokat tekintve.

1. Táblázat. A levosimendan hemodinamikai hatása a β -blokkoló kezelés függvényében (saját adatok)

	Krónikus β -blokkoló kezelés mellett (n=2)	Krónikus β -blokkoló kezelés nélkül (n=2)
Perctérfogat növekedése (L.perc ⁻¹)	1,4	0,8
Pulmonális nyomás csökkenése (Hgmm)	8,7	4,8

Az adatok két-két beteg átlagai. A kis esetszám miatt statisztikai vizsgálatot nem végeztünk, az adatok csak egyedi megfigyelésünket mutatják. Ugyanakkor a LIDO tanulmány teljes beteganyagán (n=203) hasonló összefüggést mutattak ki Follath és mtsai, 2002 (lásd 11. ábra).



11. ábra. Levosimendan hatása a perctérfogatra a β -blokkoló kezelés függvényében (LIDO adatok). A béta blokkoló kezelés szignifikánsan növelte a levosimendan hatékonyságát. Dobutamin esetében fordított hatás volt megfigyelhető, ami valószínűleg a beta receptorra gyakorolt kompetitív hatások eredménye.

4. Megbeszélés

4.1. A levosimendan által mediált Ca^{2+} -érzékenyítés és troponin-I foszforiláció

Eredményeink szerint a különböző állatmodelleken (altatott tengerimalac, perfundált Langendorff-szív preparátum, izolált cardiomyocyt) a levosimendan jól mérhető dózis-függő pozitív inotrop és lusitrop hatással rendelkezett. A kombinált (isoproterenol + levosimendan) kezelés során valamennyi modellben kimutatható volt a levosimendan kontraktilis választ fokozó hatásainak csökkenése/megszűnése, amely a Langendorff-kísérletek és az izolált cardiomyocyt vizsgálata alapján a kontraktilis fehérjék - és azok között is elsősorban a troponin I - foszforilációjával függhetett össze. Eredményeink felvetik, hogy a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatása direkt módon függ a troponin I foszforiláció mértékétől. Haikala és mtsai (1997) ilyen irányú felvetései összhangban állnak saját mérési eredményeinkkel.

Az altatott állatokon és a Langendorff-perfundált szíveken mért maximális isoproterenol és levosimendan válaszok összehasonlítása érdekes összefüggéseket tárt fel. Altatott állatokon a levosimendan által kiváltott maximális inotrop válasz megközelítőleg 50%-a volt az isoproterenolénak. A Langendorff-szerint perfundált szíveken a levosimendan hemodinamikai hatásai azonban lényegesen elmaradtak az isoproterenol mögött. Feltételezhetően a levosimendan hatékonyabb, ha myocardialis sejteken kívül az egész cardiovascularis rendszer kapcsolatba kerül a vegyülettel. Ez azt is sugallja, hogy a szívizomsejtek myofilamentális struktúráin kívül a teljes szerhatás kialakulásához más, pl. vasculáris támadáspontok is hozzájárulnak. Úgy tűnik tehát, hogy a levosimendan okozta pozitív inotropia kifejeződése szempontjából előnyösebb, ha a cardiális hatásokon kívül a vasculáris hatások is érvényesülhetnek.

A levosimendan keringéstámogató hatása fiziológias körülmények között összetett, potenciálisan több különböző mechanizmust is magába foglalhat: 1/ Ca^{2+} -érzékenyítés, 2/ foszfodiészteráz (PDE) gátlás és 3/ ATP-függő K^+ csatorna aktiválás. Méréseink szerint a Ca^{2+} -érzékenyítő hatás már igen alacsony koncentráció mellett kialakult, izolált cardiomyocytákon a számított EC_{50} érték $5 \pm 3 \text{ nmol.L}^{-1}$ -nak bizonyult. Tehát klinikailag releváns koncentrációknál is ($6\text{-}12 \text{ nmol.L}^{-1}$) (Kivikko és mtsai, 2002) valószínűleg számítani kell a Ca^{2+} -érzékenyítő hatásra. Ugyanakkor a cAMP koncentráció emelkedésével járó PDE-gátló hatás csak magasabb koncentrációknál észlelhető (Virag és mtsai, 1996), ami valószínűsíti, hogy a klinikailag releváns dózisoknál ennek a mechanizmusnak alárendelt szerepe van. Altatott tengerimalacokban a kontrakciók sebessége kisebb levosimendan koncentrációk mellett kezdett emelkedni, mint a relaxációk sebessége. A kontrakciós sebesség

izolált fokozódása valószínűleg tiszta Ca^{2+} -érzékenyítő hatás következménye. A nagyobb levosimendan koncentrációknál azonban a PDE-gátló hatás nem zárható ki, mert a lusitropia fokozódását Ca^{2+} -érzékenyítéssel nem, kifejezett mértékű PDE-gátlással azonban magyarázható (Edes és mtsai, 1995; Brixius és mtsai, 2002). A levosimendan legnagyobb dózisaival a lusitropia jelentős fokozódását tapasztaltuk (a relaxációs sebesség jelentős fokozódását altatott tengerimalacokon és a $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ emelkedését Langendorff-szíveken), ami arra utal, hogy a szer maximális hatásának kifejedésében bizonyos mértékben a cAMP szint fokozódása is szerepet kaphatott. Fentiekkel összhangban a Langendorff-perfúziós kísérletekben $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ koncentrációknál nagyobb levosimendan koncentrációk alkalmazásakor az epicardiálisan regisztrált $[\text{Ca}^{2+}]$ növekedését tapasztaltuk. A terápiás körülmények között alkalmazott levosimendan cAMP-t emelő hatása azonban valószínűleg korlátozott (Hasenfuss és mtsai, 1998), mivel a terápiás koncentráció (6-12 nM) elmarad attól a szinttől mely a cAMP koncentráció effektív emeléséhez szükséges (Kivikko és mtsai, 2002). Ezt a feltételezést támogatják saját, újkeletű adataink is, melyek szerint a két domináns intracelluláris PDE izoforma (a PDE III és PDE IV) (Steinberg és Bruton, 2001) együttes gátlásához szükséges levosimendan koncentráció EC_{50} értéke $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -os tartományban van (Szilagyi és mtsai, 2004). Az ATP-függő K^{+} csatorna aktiválás közvetlenül nem az inotropia befolyásolásán keresztül hat, hanem az utóterhelés csökkentésével javítja a keringést. A levosimendan okozta vazodilatáció vélhetően olyan regionális sajátságokkal bír, mely előnyös kombinációt jelent a myofilamentális Ca^{2+} -érzékenyítéssel (Nieminen és mtsai, 2000; Slawsky és mtsai, 2000).

A PKA foszforiláció gátló hatását a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatására minden állatmodellen észlelni lehetett, de a legegységesebb eredményeket az izolált cardiomyocytákon elvégzett kísérletek adták. A cAMP-függő protein kináz katalitikus alegységgel és ATP-vel történt preinkubáció gyakorlatilag felfüggesztette a Ca^{2+} -érzékenyítést. Ezen körülmények között korábban egyértelműen igazolták a troponin I foszforilálódását (Van der Velden és mtsai, 2000; 2002). A drámai hatás valószínűleg több tényezőnek tudható be: 1/ az izolált preparátum mentes volt mindenfajta egyéb zavaró hatástól (elő-, utóterhelés változása, ATP-függő K^{+} csatorna aktiválás, PDE-gátlás stb.) (Lee és mtsai, 1996), így mindenfajta „tompító” másodlagos kompenzáció nélkül volt vizsgálható a Ca^{2+} -érzékenyítés és protein foszforiláció kapcsolata és 2/ az izolált preparátum jellegéből (permeabilizált sejt) következően valószínűleg nem rendelkezik protein foszfatáz aktivitással, így a katalitikus alegység által mediált foszforiláció valószínűleg teljes mértékben szaturálta a foszforilálható helyeket.

4.2. Krónikus szívelégtelenség kezelése a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendannal és a β -adrenerg rendszer modulátoraival

Az egészséges myocardiális mintákon mért kísérletes adataink fenntartások nélkül a patológiás körülményekre nem vonatkoztathatók. Krónikus szívelégtelenségben az irodalmi adatok alapján: 1/ csökken a sejtszintű β -adrenerg válasz, ami a troponin I bazális foszforilációját is csökkenti (Bodor és mtsai, 1997; Van der Velden és mtsai 2003), 2/ csökken a Ca^{2+} tranziens amplitúdója (Beuckelmann és mtsai, 1992) és 3/ növekszik a myofibrillumok Ca^{2+} -érzékenysége (Wolf és mtsai 1996; Van der Velden és mtsai, 2003). (Ez utóbbi jelenséget általában a troponin I bazális foszforiláció csökkenésével magyarázzák (Wolf és mtsai, 1996; Van der Velden és mtsai, 2003).) A levosimendanról viszont az is ismert, hogy annak troponin C-hez történő kapcsolódása és ezért az általa keltett pozitív inotropia is Ca^{2+} -dependens (Haikala és mtsai. 1995b; Haikala és mtsai. 1997). Felmerült, hogy ez a Ca^{2+} -dependencia magyarázhatja azt a kísérletes megfigyelést, hogy a Ca^{2+} -tranziens kis mértékű növelése (akár az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelés, akár isoproterenol alkalmazás árán) miért fokozhatta a levosimendan pozitív inotrop hatását egyes terminális szívelégtelenségből származó humán szívpreparátumokon (Brixius és mtsai, 2002). Saját eredményeink alapján felmerül, hogy az emberi szívelégtelenségben a β -stimuláció a down-regulált β -adrenerg szignalizációs rendszer miatt nehezen teszi lehetővé a kontraktilis filamentumok oly mértékű foszforilációját, mely gátat szabna a levosimendan okozta Ca^{2+} -érzékenyítés kifejlődésének. Tehát valószínű, hogy krónikus szívelégtelenség során az isoproterenol alkalmazása nem vált ki olyan mértékű intracelluláris választ (cAMP szint növekedés, fehérje foszforiláció), mint egészséges myocardiumban. Mindezek alapján a krónikus szívelégtelenségben a β -mimetikus szerek és a levosimendan együttes alkalmazása nem egyértelműen kontraindikált. Mindazonáltal saját adataink inkább azt támogatják, hogy a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatásának jobban kedvez a kontraktilis fehérjék kisebb foszforiláltsági szintje. Tehát krónikus szívelégtelenség talaján a bazális troponin I szint foszforilációjának csökkenése valószínűleg kedvező állapotot teremt, ha a levosimendant önállóan (β -agonista nélkül) alkalmazzuk.

A fenti elméleti megfigyeléseket és fejtegetéseket a klinikum teljes mértékben igazolta. A levosimendan speciális Ca^{2+} -érzékenyítő tulajdonsága miatt (troponin C kötődés) klinikailag különösen hatékonynak és jól tolerálható szernek bizonyult krónikus szívelégtelenség kapcsán (Nieminen és mtsai, 2000). A LIDO és RUSSLAN tanulmányok adatai alapján (Moiseyev és

mtsai, 2002; Follath és mtsai, 2002) akut szívelégtelenségben szenvedő betegekben már rövidtávon (72 órán belül) egyértelműen csökkent a mortalitás dobutaminnal (LIDO) vagy placeboval szemben (RUSSLAN). Egy, illetve 6 hónap múlva is észlelhető volt a korán kialakult mortalitás különbség a betegcsoportok között, sőt a különbség némileg még növekedett is. A klinikai tünetek és a mortalitás javulása független volt a szívelégtelenség kiváltó okától (ischaemiás szívbetegség, cardiomyopathia). A LIDO tanulmány adatait elemezve azt találták, hogy a krónikus szívelégtelenségben használt β -blokkoló kezelés egyértelműen csökkentette a dobutamin hemodinamikai hatékonyságát, amelyet az azonos receptoron (β -adrenerg receptor) bekövetkező agonista és antagonisták hatásai kioltó hatásának tulajdonítottak. Ugyanakkor a β -blokkoló kezelés egyértelműen javította a levosimendan hemodinamikai hatékonyságát (perctérfogató, pulmonális kapillaris nyomás változása), amely hatást valószínűleg a korábban részletezett intracelluláris hatások (krónikus szívelégtelenségben az intracelluláris cAMP tartalom és a bazális troponin I foszforiláció csökkenése stb. – lásd előző bekezdést) okozhattak.

A krónikus szívelégtelenség epidemiológiailag súlyos probléma, mivel az átlag populáció 1-2%-át érinti és gyógyszeres kezelése (ACE-gátlók, β -adrenerg receptor blokkolók, vízhajtók, digitális) nem tekinthető megoldottnak. Ha kialakultak a szívelégtelenség egyértelmű klinikai jelei az átlagos túlélés a betegség előrehaladott állapotától függően 1-5 év között ingadozik. Egyéb gyógyszeres (angiotenzin II receptor gátlók, új típusú inotrop szerek) és sebészi megoldásokkal is kísérleteznek, amelyek szelektált beteganyagon tovább javíthatják a kedvezőtlen mortalitási statisztikát. Mindezen próbálkozások között egyértelmű helye van az új típusú Ca^{2+} -érzékenyítő szereknek (levosimendan), amelyek akut szívelégtelenségben már bizonyítottak és a krónikus stádiumban történő kipróbálásuk a közeljövőben várható.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatását a β -adrenerg rendszer intenzív stimulációja negatívan befolyásolhatja. A levosimendan keltette Ca^{2+} -érzékenyítés mértékét azonban a Ca^{2+} -tranziens amplitúdója és a kontraktilis fehérjék foszforilációs állapota együttesen határozzák meg. Krónikus szívelégtelenség során a Ca^{2+} háztartás és a sejtszintű β -adrenerg szignalizációs folyamatok egyaránt zavart szenvednek. Ez a krónikus szívelégtelenség talaján átépült myocardiumban elvileg kedvezőbb háttérrel biztosítható a β -mimetikus szerek és a levosimendan együttes alkalmazásának, mint az egészséges myocardiumban. Az együttes alkalmazás klinikai körülmények között történő feltárása és az indikációs területek részletes tisztázása még várat magára.

5. Összefoglalás

- Echocardiographias vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy altatott tengerimalacokon a levosimendan dózis-függő módon növelte a bal kamra kontraktilitását. Előzetes isoproterenol stimulálás azonban megszüntette a levosimendan pozitív inotrop hatását.
- Langendorff-szerint perfundált szíveken a levosimendan szignifikánsan növelte a bal kamra kontraktilitására jellemző paramétert ($+dP/dt_{max}$). Előzetes isoproterenol stimulálást követően azonban a levosimendan hatása lényegesen csökkent.
- Izolált hámozott cardiomyocytákon is vizsgáltuk a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő tulajdonságának és a troponin I foszforilációjának összefüggését. Ezen kísérleti körülmények között az értelmezhetőséget komplikáló hemodinamikai hatások (elő-, utóterhelés változása, szívfrekvencia módosulása stb.) nélkül tanulmányozhatók a tengerimalacból izolált myofibrillum tulajdonságai. Eredményeink szerint a levosimendan dózis-függő módon növelte a myofibrillum Ca^{2+} -érzékenységét. Ez a hatás elsősorban alacsonyabb Ca^{2+} koncentrációk esetében volt jól észlelhető. Ugyanakkor a myofibrillumok ATP jelenlétében történő PKA előkezelése (foszforilációs körülmények között) teljes mértékben felfüggesztette a Ca^{2+} -érzékenyítést.
- Egyéb vizsgálatok irodalmi adatai alapján akut szívelégtelenségben a levosimendan jó hatékonyságú és jól tolerálható szernek bizonyult. A LIDO tanulmányba beválogatott betegek adatait külön elemezve arra utaló jeleket tapasztaltunk, hogy a krónikus β -blokkoló kezelés a levosimendan hatékonyságát (perctérfogat növekedése, pulmonalis kapillaris nyomás csökkenése) semmiképp sem rontja, esetleg javíthatja is. Feltételeztük, hogy a hatékonyság növekedése a troponin I bazális foszforilációjának csökkenésével függ össze. Részben ezen megfigyelésünk alapján, a LIDO tanulmányban az egész beteganyagra kiterjesztve részletesen megvizsgálták a β -blokkoló kezelés és a levosimendan hatékonyságának összefüggését és hasonló eredményre jutottak.

6. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatóságának lehetőségei

- A szívelégtelenség relatív gyakorisága miatt sok embert érintő betegség. Ezért fontos kutatási feladat a myocardium kontraktilitását befolyásoló intracelluláris hatásmechanizmusok tisztázása, mert az további adatokat nyújthat a betegség jobb megértéséhez és az újabb terápiás lehetőségek kialakításához.
- Vizsgálataink különleges jelentőségét az adta, hogy kísérleteinket részben altatott állatokon és dobogó szívpreparátumokon (*in vivo* és *ex vivo* körülmények között) végeztük. Így az általunk észlelt biokémiai eltérések egyrészt fiziológiailag mérhető válaszokat reprezentálnak, másrészt direkt módon összevethetők a bal kamra funkció változásával. Ezért megfigyeléseink valószínűleg jól adaptálhatók a humán szívimra is.
- Az általunk alkalmazott szerek vagy jelenleg kerülnek be a klinikai gyakorlatba (levosimendan) vagy származékai már kiterjedten használatosak (isoproterenol) a humán gyógyászatban. Kísérleti eredményeink további adatokat nyújthatnak ezen gyógyszerek myocardialis hatásmechanizmusának pontosabb megértéséhez.
- Külön problémát jelent a klinikumban a pozitív inotrop és a β -blokkoló szerek kombinálása az akut és krónikus szívelégtelenség kezelése kapcsán. Eredményeink szerint a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan hatékony terápiás fegyver lehet a Ca^{2+} -érzékenység növelésére/helyreállítására elsősorban olyan betegek kapcsán, akik bazális troponin I foszforilációja csökken. A levosimendan β -blokkoló szerekkel történő kombinációja ezért kevésbé tűnik problematikusnak, mint a β -mimetikus szerekkel történő együttes alkalmazás.

7. Köszönetnyilvánítás

Megtisztelő kötelességem e helyen köszönetet mondani elsősorban Dr. Édes István intézetigazgató egyetemi tanárnak és Dr. Papp Zoltán egyetemi docensnek, hogy az értekezésemben kidolgozott témát támogatták, értékes tanácsaikkal tudományos törekvéseimet mindvégig messzemenően segítették.

Köszönettel tartozom minden egyes jelenlegi és volt munkatársamnak, akik a vizsgálatokban, az értekezés előkészítésében önzetlen segítséget nyújtottak. Külön köszönetemet szeretném kifejezni Móré Gábornénak, aki jelentős segítséget nyújtott kísérleteim során és közvetlen munkatársaimnak támogatásukért, tanácsaikért.

8. Irodalom

8.1. A téziseket megalapozó *in extenso* közlemények és könyvfejezet

1. **Bódi A**, Kristóf É, Kiss É, Czuriga I, Papp Gy, Édes I. (1995): A Ca^{2+} -érzékenyítők hatása a bal kamra funkcióra és a myocardium fehérje foszforilációs rendszerére. *Cardiol. Hung.* **24**:7-12.
2. Édes I, Kristóf É, **Bódi A**. (1997): A krónikus szívelégtelenség kialakulásának patomechnizmusa. *Magyar Belorvosi Archivum* **50**:515-518.
3. Kristóf É, Szigeti G, Papp Z, **Bódi A**, Facskó A, Papp JG, Kovács L, Kranias GE, Édes I. (1998): Cardiac responses to calcium sensitizers: effects on left ventricular function cyclic AMP levels, protein phosphorylation and myoplasmic calcium concentration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **853**:316-319. **IF: 0,959**
4. Édes I, Kristóf É, **Bódi A**.: A krónikus szívelégtelenség kialakulásának celluláris, molekuláris mechanizmusa. Fejezet a Kardiologia című szakkönyvből, Szerkesztő: Préda I. in press.
5. **Bódi A**, Szilágyi S, Édes I, Papp Z. (2003): The cardiotoxic effects of levosimendan in guinea pig hearts are modulated by β -adrenergic stimulation. *Gen. Physiol. Biophys.* **22**:313-327. **IF: 0,719**

A tézisekhez kapcsolódó III-as fázis tanulmány

6. Follath F. et al., and LIDO investigators incl. **Bódi A**. (2002): Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomized double-blind trial. *Lancet* **360**:196-202. **IF: 15,397**

További *in extenso* közlemények

7. Vaszily M, Hejmel L, Szerafin T, **Bódi A**, Hermann K, Péterffy Á. (1997): Dynamicus cardiomyoplastica II. Saját tapasztalataink. *Cardiol. Hung.* **3**:115-120.
8. Kristóf É, Szigeti Gy, Papp Z, **Bódi A**, Ball AN, Walsh RA, Édes I. (1999): The effects of levosimendan on the left ventricular function and protein phosphorylation in postischemic guinea pig hearts. *Bas. Res. Cardiol.* **94**:223-230. **IF: 1,148**
9. Varga E, **Bódi A**, Ferdinandy P, Droy-Lefaix M, Blasing IE, Tosaki A. (1999): The protective effects of EGb 761 in isolated ischemic/ reperfused rat hearts: A link between cardiac function and nitric oxide production. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34**:711-717. **IF: 1,989**
10. Nagy Z, **Bódi A**, Vaszily M, Szerafin T, Horvath A, Jagamos E, Horvath G, Peterffy A. (1999): A mitralis insufficiencia műtéti kezelése anuloplasticás öltéssel. *Orv. Hetil.* **140**:285-289.

11. Nagy ZL, **Bódi A**, Vaszily M, Szerafin T, Horvath A, Peterffy A. (2000) Five-year experience with a suture annuloplasty for mitral valve repair. *Scand. Cardiovasc. J.* **34**:528-532. **IF: 0,508**
12. Nagy Z, **Bódi A**, Vaszily M, Szerafin T, Galajda Z, Len A, Peterffy A. (2002) A Pericarbon stent-nélküli műbillentyűvel kapcsolatos két éves magyarországi tapasztalatok. *Orv. Hetil.* **143**:2337-2341.

A tézisek témájához kapcsolódó idézhető előadáskivonatok

13. Édes I, **Bódi A**, Kiss É, Tálosi L, Papp Gy. (1995): Effects of levosimendan on sarcoplasmic reticular function in guinea pig hearts. *Cardiol. Hung. Suppl.1*:38.
14. Édes I, Kristóf É, **Bódi A**, Kiss É. (1996): Effects of calcium sensitizers on left ventricular function and myocardial protein phosphorylation. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**:A142.
15. **Bódi A**, Kristóf É, Kruzsicz V, Hegedűs I, Édes I. (1998): Effects of levosimendan on left ventricular function in guinea pigs – an echocardiographic study. *Cardiol. Hung. Suppl.1*:65.
16. Kristóf É, Szigeti Gy, Papp Z, **Bódi A**, Papp Gy, Kovács L, Édes I. (1998): Cardiac responses to calcium sensitizers: effects on left ventricular function and myoplasmic calcium concentration. *Cardiol. Hung. Suppl.1*:66.
17. Kristóf É, **Bódi A**, Ball AN, Walsh RA, Édes I. (1999): The effects of levosimendan on the postischaemic myocardium. *J. Card. Fail.* **5/3Suppl.1**:A228.
18. **Bódi A**, Szilágyi S, Papp Z, Édes I. (2003): Interaction between beta-adrenergic stimulation and levosimendan induced positive inotropy in guinea pig hearts. *Cardiol. Hung. Suppl.2*:21.
19. **Bódi A**, Szilágyi S, Papp Z, Édes I. (2003): The cardiotoxic effects of levosimendan in guinea pig hearts are modulated by beta-adrenergic stimulation *Bas. Res. Cardiol.* **98**:A42.
20. **Bódi A**, Szilágyi S, Papp Z, Édes I. (2003): Cardiac β -adrenergic signalization and levosimendan. "11th Alpe Adria Cardiology Meeting" kongresszusi kiadványa:36.

További idézhető előadáskivonatok

21. Vaszily M, **Bódi A**, Polgár P, Szerafin T, Péterffy Á. (1995): Az első dynamicus cardiomyoplastica műtétek során szerzett tapasztalataink. *Cardiol. Hung. Suppl.24*:92.
22. Vaszily M, **Bódi A**, Szerafin T, Szabó Z, Péterffy Á. (1995): Clinical experience with dynamic cardiomyoplasty in Hungary. *Cardiol. Hung. Suppl.3*:43.
23. Barta J, Tóth A, Édes I, Vaszily M, Kristóf É, **Bódi A**, Papp Z. (2001): Calpain-I degrades desmin more effectively than troponin I in human myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**:A8.

8.2. Nemzetközi irodalom

- Ajiro Y, Hagiwara N, Katsube Y, Sperelakis N, Kasanuki H. (2002): Levosimendan increases L-type Ca^{2+} current via phosphodiesterase-3 inhibition in human cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 435, 27-33.
- Allen DG, Orchard CH (1987): Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ. Res.* 60, 153-168.
- Bers DM. (1991) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E (1992): Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85, 1046-1055.
- Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA (1997): Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96, 1495-1500.
- Boknik P, Neumann J, Kaspareit G, Schmitz W, Scholz H, Vahlensieck U, Zimmermann N. (1997): Mechanism of the contractile effect of levosimendan in the mammalian heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 277-283.
- Brixius K, Reicke S, Schwinger RH. (2002): Beneficial effects of the Ca^{2+} sensitizer levosimendan in human myocardium. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 282, H131-H137.
- Cone J, Wang S, Tandon N, Fong M, Sun B, Sakurai K, Yoshitake M, Kambayashi J, Liu Y. (1999): Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. *J. Cardiovascular. Pharmacol.* 34, 497-504.
- de Cheffoy de Courcelles D, de Loore K, Freyne E, Janssen PA, (1992): Inhibition of human cardiac cyclic AMP-phosphodiesterases by R 80122, a new selective cyclic AMP-phosphodiesterase III inhibitor: a comparison with other cardiotonic compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 6-14.
- Dohet C, al-Hillawi E, Trayer IP, Ruegg JC (1995): Reconstitution of skinned cardiac fibres with human recombinant cardiac troponin-I mutants and troponin-C. *FEBS Lett* 377, 131-134.
- Edes I, Solaro RJ, Kranias EG. (1989): Changes in phosphoinositide turnover in isolated guinea pig hearts stimulated with isoproterenol. *Circ. Res.* 65, 989-996.
- Edes I, Kiss E, Kitada Y, Powers FM, Papp JG, Kranias EG, Solaro RJ (1995): Effects of Levosimendan, a cardiotonic agent targeted to troponin C, on cardiac function and on phosphorylation and Ca^{2+} sensitivity of cardiac myofibrils and sarcoplasmic reticulum in guinea pig heart. *Circ. Res.* 77, 107-113.

- Edes I, Kranias EG. (2001): Ca^{2+} -ATPases. Cell Physiology, Source Book. Ed.: Sperelakis, N., Academic Press, New York, USA, 271-282.
- Endoh M. (2001): Mechanism of action of Ca^{2+} sensitizers – update 2001. Cardiovasc. Drug Ther. 15, 397-404.
- England PJ (1976): Studies on the phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin during modification of contraction in perfused rat heart. Biochem. J. 160, 295-304.
- Fabiato A, Fabiato F. (1979): Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. J. Physiol. (Paris) 75, 463-505.
- Fan D, Wannenburg T, de Tombe PP. (1997): Decreased myocyte tension development and calcium responsiveness in rat right ventricular pressure overload. Circulation 95, 2312-2317.
- Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JG, Scholz H, Peuhkurinen K, Harjola VP, Mitrovic V, Abdalla M, Sandell EP, Lehtonen L, Steering Committee and Investigators of the Levosimendan Infusion versus Dobutamine (LIDO) Study. (2002): Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. Lancet 360, 196-202.
- Gannier F, Bernengo JC, Jacquemond V, Garnier D. (1993): Measurements of sarcomere dynamics simultaneously with auxotonic force in isolated cardiac cells. IEEE Trans Biomed Eng 40, 1226-1232.
- Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. (1997) Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. Circ Res. 80, 393-399.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem. 260, 3440-3450.
- Haikala H, Nissinen E, Etemadzadeh E, Linden I-B, Pohto P. (1992): Levosimendan increases Ca^{2+} -sensitivity without enhancing myosin ATPase activity and impairing relaxation. J. Mol. Cell. Cardiol. 24 (suppl) S.97.
- Haikala H, Kaivola J, Nissinen E, Wall P, Levijoki J, Linden IB. (1995a): Cardiac troponin C as a target protein for a novel calcium sensitizing drug, levosimendan. J. Mol. Cell. Cardiol. 27, 1859-1866.
- Haikala H, Nissinen E, Etemadzadeh E, Levijoki J, Linden IB. (1995b): Troponin C-mediated calcium sensitization induced by levosimendan does not impair relaxation. J Cardiovasc Pharmacol. 25, 794-801.
- Haikala H, Kaheinen P, Levijoki J, Linden IB. (1997): The role of cAMP- and cGMP-dependent protein kinases in the cardiac actions of the new calcium sensitizer, levosimendan. Cardiovasc. Res. 34, 536-546.
- Hasenfuss G, Mulieri LA, Leavitt BJ, Alpert NR. (1994): Influence of isoproterenol on contractile protein function, excitation-contraction coupling, and energy turnover of isolated nonfailing human myocardium. J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 1461-1469.

- Hasenfuss G, Pieske B, Castell M, Kretschmann B, Maier LS, Just H. (1998): Influence of the novel inotropic agent levosimendan on isometric tension and calcium cycling in failing human myocardium. *Circulation* 98, 2141-2147.
- Jamali IN, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Wartler DC. (1997): Intracoronary levosimendan enhances contractile function of stunned myocardium. *Anesth Analg* 85, 23-29.
- Jurevicius Z, Fischmeister R. (1996): cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca^{2+} channels by beta-adrenergic agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 295-299.
- Kaheinen P, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H. (2001): Levosimendan increases diastolic coronary flow in isolated guinea-pig heart by opening ATP-sensitive potassium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37, 367-374.
- Katano Y, Endoh M. (1992). Effects of a cardiotonic quinolinone derivative Y-20487 on the isoproterenol-induced positive inotropic action and cyclic AMP accumulation in rat ventricular myocardium: comparison with rolipram, Ro 20-1724, milrinone, and isobutylmethylxanthine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, 715-722.
- Kelso EJ, McDermott BJ, Silke B. (1995): Differential effects of phosphodiesterase inhibitors on accumulation of cyclic AMP in isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 441-452.
- Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikainen PJ, (2002): Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 40, 465-471.
- Kentish JC (1991): Combined inhibitory actions of acidosis and phosphate on maximum force production in rat skinned cardiac muscle. *Pflügers Arch* 419, 310-318.
- Kopp SL, Barany M. (1979): Phosphorylation of the 19,000-dalton light chain of myosin in perfused rat heart under the influence of negative and positive inotropic agents. *J. Biol. Chem.* 254, 12007-12012.
- Kranias EG, Solaro RJ. (1982): Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature* 298, 182-184.
- Kristof E, Szigeti G, Papp Z, Bodi A, Facsko A, Kovacs L, Papp JG, Kranias EG, Edes I. (1998): Cardiac responses to calcium sensitizers and isoproterenol in intact guinea pig hearts: Effects on cyclic AMP levels, protein phosphorylation, myoplasmic calcium concentration and left ventricular function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 853: 316-319.
- Kristof E, Szigeti G, Papp Z, Bodi A, Ball NA, Walsh RA, Edes I. (1999): The effects of levosimendan on the left ventricular function and protein phosphorylation in post-ischemic guinea pig hearts. *Basic Res. Cardiol.* 94, 223-230.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Mittmann K, Jaquet K, Heilmeyer LM Jr (1990): A common motif of two adjacent phosphoserines in bovine, rabbit and human cardiac troponin I. *FEBS Lett* 273, 41-45.
- Lancaster MK, Cook SJ. (1997): The effects of levosimendan on $[Ca^{2+}]_i$ in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 339, 97-100.
- Lee JA, Palmer S, Kentish JC. (1996): Photolysis of the novel inotropes EMD 57033 and EMD 57439: evidence that Ca^{2+} sensitization and phosphodiesterase inhibition depend upon the same enantiomeric site. *Br. J. Pharmacol.* 118, 2037-2044.
- Lilleberg J, Sundberg S, Nieminen MS. (1995): Dose-range study of a new calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharm.* 26: S63-S69.
- Moiseyev VS, Poder P, Andrejevs N, Ruda MY, Golikov AP, Lazebnik LB, Kobalava ZD, Lehtonen LA, Laine T, Nieminen MS, Lie KI, RUSSLAN Study Investigators. (2002) Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN). *Eur. Heart J.* 23, 1422-1432.
- Muller B, Stoclet JC, Lugnier C. (1992): Cytosolic and membrane-bound cyclic nucleotide phosphodiesterases from guinea pig cardiac ventricles. *Eur. J. Pharmacol.* 225, 263-272.
- Nieminen MS, Akkila J, Hasenfuss G, Kleber FX, Lehtonen LA, Mitrovic V, Nyquist O, Remme WJ. (2000): Hemodynamic and neurohumoral effects of continuous infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 1903-1912.
- Noland TA, Kuo JF. Jr. (1991): Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin I or troponin T inhibits Ca^{2+} -stimulated actomyosin MgATPase activity. *J. Biol. Chem.* 266, 4974-4978.
- Opie LH. (1998): The heart physiology from cell to circulation. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA
- Palmer S, Kentish JC (1994): The role of troponin C in modulating the Ca^{2+} -sensitivity of mammalian skinned cardiac and skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 480, 45-60.
- Papp Z, Édes I. (2000) A myocardialis ischaemia és reperfüzió patofiziológiája. *Lege Artis Medicinae* 10, 501-511.
- Papp Z, Van der Velden J, Stienen GJM. (2000): Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc. Res.* 45, 981-993.
- Papp Z, Barta J, Stienen GJM (2001): Troponin I degradation and myocardial stunning. *Circulation* 104: E157-E157.
- Papp Z, Szabo A, Barends JP, Stienen GJM. (2002): The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J. Physiol. (London)* 543, 177-189.

- Pataricza J, Hohn J, Petri A, Balogh A, Papp JG. (2000): Comparison of the vasorelaxing effect of cromakalim and the new inodilator, levosimendan, in human isolated portal vein. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 213-217.
- Peterson GL. (1977): A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Polesello P, Ovaska M, Kaivola J, Tilgmann C, Lundstrom K, Kalkkinen N, Ulmanen I, Nissinen E, Takinen J. (1994): Binding of a new Ca^{2+} sensitizer, Levosimendan, to recombinant human troponin C. *J. Biol. Chem.* 269, 28584-28590.
- Rarick HM, Tu XH, Solaro RJ, Martin AF. (1997): The C terminus of cardiac troponin I is essential for full inhibitory activity and Ca^{2+} sensitivity of rat myofibrils. *J. Biol. Chem.* 272, 26887-26892.
- Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Kranias EG, Potter JD, Solaro RJ. (1982): The effect of troponin I phosphorylation on the Ca^{2+} -binding properties of the Ca^{2+} -regulatory site of bovine cardiac troponin. *J. Biol. Chem.* 257, 260-263.
- Reeves ML, Leigh BK, England PJ, (1987): The identification of a new cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in human and guinea-pig cardiac ventricle. Implications for the mechanism of action of selective phosphodiesterase inhibitors. *Biochem. J.* 241, 535-541.
- Reiffert SU, Jaquet K, Heilmeyer LM Jr, Herberg FW. (1998): Stepwise subunit interaction changes by mono- and bisphosphorylation of cardiac troponin I. *Biochemistry* 37: 13516-13525.
- Reiffert S, Maytum R, Geeves M, Lohmann K, Greis T, Bluggel M, Meyer HE, Heilmeyer LM, Jaquet K. (1999): Characterization of the cardiac holotroponin complex reconstituted from native cardiac troponin T and recombinant I and C. *Eur J Biochem.* 261: 40-47.
- Sato S, Talukder H, Sugawara H, Sawada H, Endoh M. (1998): Effects of levosimendan on myocardial contractility and Ca^{2+} transients in aequorin-loaded right-ventricular papillary muscles and indo-1-loaded single ventricular cardiomyocytes of the rabbit. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (30): 1115-1128.
- Shahid M, Nicholson CD, (1990): Comparison of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in rat and rabbit ventricular myocardium: positive inotropic and phosphodiesterase inhibitory effects of Org 30029, milrinone and rolipram. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 342, 698-705.
- Slawsky MT, Colucci WS, Gottlieb SS, Greenberg BH, Haeusslein E, Hare J, Hutchins S, Leier CV, LeJemtel TH, Loh E, Nicklas J, Ogilby D, Singh BN, Smith W. (2000): Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure. Study Investigators. *Circulation* 102, 2222-2227.
- Solaro RJ, Pang DC, Briggs FN. (1971): The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100. *Biochem. Biophys. Acta* 245, 259-262.

- Solaro RJ, Gambassi G, Warshaw DM, Keller MR, Spurgeon HA, Beier N, Lakatta EG (1993): Stereoselective actions of thiadiazinones on dog cardiac myocytes and myofilaments. *Circ. Res.* 73, 981-990.
- Solaro RJ. (1996): Calcium sensitizers and molecular mechanism of altered response of cardiac myofilaments to calcium. In: *Molecular mechanism of cardiovascular regulation.* (Ed: Endoh M., Morad M., Scholz H., Iijima T.) Springer, Tokyo, 363-372.
- Solaro RJ, Rarick HM (1998): Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ. Res.* 83, 471-480.
- Solaro RJ. (1999): Troponin I, stunning, hypertrophy, and failure of the heart. *Circ. Res.* 84, 122-124.
- Solaro RJ. (2001): Mechanisms regulating cardiac myofilament response to calcium. *Heart physiology and pathophysiology.* Ed: Sperelakis N., Academic Press, New York, USA, 519-526.
- Sorsa T, Heikkinen S, Abbott MB, Abusamhadneh E, Laakso T, Tilgmann C, Serimaa R, Annala A, Rosevear PR, Drakenberg T, Pollesello P, Kilpeläinen I. (2001): Binding of levosimendan, a calcium sensitizer, to cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 276, 9337-9343.
- Sorsa T, Pollesello P, Permi P, Drakenberg T, Kilpeläinen I. (2003): Interaction of levosimendan with cardiac troponin C in the presence of cardiac troponin I peptides. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 1055-1061.
- Steinberg SF, Brunton LL. (2001): Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 751-773.
- Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Édes I, Papp Z. (2004): The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* 486, 67-74.
- Talosi L, Edes I, Kranias EG. (1993): Intracellular mechanisms mediating reversal of beta-adrenergic stimulation in intact beating hearts. *Am. J. Physiol.* 264, H791-H797.
- Takahashi R, Talukder MA, Endoh M. (2000): Inotropic effects of OR-1896, an active metabolite of levosimendan, on canine ventricular myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 400, 103-112.
- Van der Velden J, Klein LJ, van der Bijl M, Huybregts MA, Stooker W, Witkop J, Eijssman L, Visser CA, Visser FC, Stienen GJM. (1998): Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovasc. Res.* 38, 414-423.
- Van der Velden J, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Stienen GJM. (2000): Effect of protein kinase A on calcium sensitivity of force and its sarcomere length dependence in human cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 46, 487-495.
- Van der Velden J, Boontje NM, Papp Z, Klein LJ, Visser FC, de Jong JW, Owen VJ, Burton PBJ, Stienen, GJM. (2002): Calcium sensitivity of force in human ventricular

- cardiomyocytes from donor and failing hearts. *Basic Res. Cardiol.* 97 Suppl.1, I/118-I/126.
- Van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJM. (2003): Increased Ca^{2+} -sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc. Res.* 57, 37-47.
- Vannier C, Lakomkine V, Vassort G. (1997): Tension response of the cardiotonic agent (+)-EMD-57033 at the single cell level. *Am. J. Physiol.* 272, C1586-C1593.
- Virag L, Hala O, Marton A, Varro A, Papp JG. (1996): Cardiac electrophysiological effects of levosimendan, a new calcium sensitizer. *Gen. Pharmacol.* 27, 551-556.
- Ward DG, Cornes MP, Trayer IP. (2002): Structural consequences of cardiac troponin I phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277, 41795-41801.
- Weterings C.J. (1996): The effect of the calcium sensitizer levosimendan on normal and stunned left ventricular myocardium. *Br. J. Anesth.* 76(Suppl.), 4.
- Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM. (1996): Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J. Clin. Invest.* 98, 167-176.
- Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. (1997): Levosimendan, a novel Ca^{2+} sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K^+ channel in rat arterial myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 333, 249-259.
- Zhang R, Zhao J, Potter JD (1995a): Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca^{2+} affinity of cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 270, 30773-30780.
- Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. (1995b): Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ. Res.* 76, 1028-1035.
- Zimmermann N, Boknik P, Gams E, Herzig JW, Neumann J, Scholz H. (1998): Calcium sensitization as new principle of inotropic therapy in end-stage heart failure? *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 14, 70-75.