

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Értekezés Tézisei

**A Ca^{2+} -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

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Tézisek

**A Ca^{2+} -ÉRZÉKENYÍTŐ LEVOSIMENDAN ÉS A
MYOCARDIUM β -ADRENERG JELÁTVITELI RENDSZERE
KÖZÖTTI INTERAKCIÓK**

Dr. Bódi Annamária

**Témavezetők: Dr. Édes István
Dr. Papp Zoltán**

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

DEBRECEN, 2004

BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedek kutatási eredményei alapján a szívizom összehúzódó képességének (kontraktilitásának) szabályozását, a szabályozást végző fontosabb myocardiális fehérjéket és ezek működését mind jobban megismertük. Világossá vált, hogy a myocardium kontrakciós erejének növelését több úton is el lehet érni. 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 kutatásainkban elsősorban a Ca^{2+} -érzékenyítés és a β -adrenerg mechanizmusok összefüggéseivel foglalkoztunk. Vizsgálataink során különös figyelmet szenteltünk a szívizomsejtek β -adrenerg jelátviteli rendszeréből és a levosimendan hatásmechanizmusából fakadó, valószínűsíthető interakcióknak.

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. 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. 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 akadálya. A troponin I az aktin és troponin C között megvalósuló $[Ca^{2+}]_i$ -függő ingázása egy „mozgásgátló ék” hatásához hasonlítható, ami nyugalmi állapotban gátolja (ékeli) a vékonyfilamentumok csúszását. A troponin C a Ca^{2+} kötését követően a troponin C és troponin I közötti kölcsönhatás miatt az „ék” távozik az aktin felszínéről. 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 kontraktilitás β -adrenerg szabályozása

A szívizom kontraktilis szabályozásában a legfontosabb humorális mechanizmust a katekolaminok a β -adrenerg szignalizációs rendszeren keresztül biztosítják. 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 (proteinkináz 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. A fehérjefoszforilációs folyamatok mai ismereteink szerint a Ca^{2+} tranzienszt és a myofibrilláris fehérjét egyaránt szabályozzák. A pozitív inotrop hatás kiindulási pontja az L-típusú Ca^{2+} csatorna α_1 -alegységének foszforilációja, 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 foszfolambanba 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). 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).

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. 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 filametumban - elhelyezkedő troponin C Ca^{2+} -érzékenységét. 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. A molekula három különböző foszforilációs állapotban: defoszforilált, monofoszforilált és biszfoszforilált formában fordulhat elő a szívízomban. 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. A cTnI foszforiláció elősegíti a myocardium relaxációját, 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, 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.

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 választ, 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 izomösszehúzódás hatékonyságát.

A levosimendan és szervezeten belül kialakuló aktív származéka az OR-1896 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. Az előállított levosimendan kötődése az N-terminális közelében történik, ahol a Ca^{2+} által indukált konformációban egy hidrofób jellegű zseb alakul ki. Ebbe rögzül a levosimendan dihidropiridazinon gyűrűje, míg a vegyület dinitril vége poláros jellegű aminosavakhoz (Gln^{11} , Gln^{16} , Asp^{88} , Ser^{89} , és Lys^{92}) 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. Ugyanakkor a levosimendan nem befolyásolja a troponin C Ca^{2+} kötését. 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. A levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatását különböző körülmények között tanulmányozták. Myofibrillaris preparátumokon a szer dózisfüggő ($0.03\text{-}10\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) 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. Utóbbi észrevételek azért lényegesek, mivel valószínűsítik, hogy a levosimendan nem növeli a myocardium energiaigényét, illetve oxigénfogyasztását. Kísérletes körülmények között a levosimendan dózis-függő pozitív inotrop hatással rendelkezett, ami alacsony koncentráció alkalmazása esetén ($0.03 \mu\text{M}$) nem járt együtt pozitív lusitrop és chronotrop hatásokkal. 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. A myocardiális 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. Számos új kísérletes adat utal arra, hogy a levosimendan tisztán Ca^{2+} -érzékenyítő hatású dózistartomány korlátozott. Kiderült, hogy a levosimendan terápiás koncentrációt meghaladó dózisokban 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.

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+} -érzékenységét. 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.

CÉLKITŰZÉSEK

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 szívet 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 metabolittól (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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra is lehetőségünk volt rögzíteni. Ezekből a kísérletekből indirekt módon a levosimendan foszfodieszteráz-gátló képességére is következtethettünk.
- 3) Membránrendszerüktől megfosztott cardiomyocytakon (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.

MÓDSZEREK

Echocardiographia

Az echocardiographiás vizsgálatokat felületesen altatott Hartley tengerimalacokon végeztük. 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 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), és/vagy levosimendant (i.p. 12,5-50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) 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 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) alkalmazását követően 15 perccel adtuk be a levosimendant (50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) 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.

Perfúziós technika

A perfúziós kísérleteinkhez Hartley tengerimalacokat használtunk. A vizsgálatokhoz az állatokat pentobarbitál és heparin keverékével elaltattuk, majd a mellkas megnyitását követően a szívet kiemeltük. A lehűtött szíveket azonnal kanüláltuk, majd módosított Krebs-oldattal Langendorff-szerint retrográd aortaperfúziót végeztünk. Az izolált szívek felfüggesztését követően a kísérletek egy részében a bal kamra mechanikai paramétereinek mérése mellett radioaktív jelölést végeztünk, másik részében fluoreszcens módszerrel az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -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 ^{32}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 visszkapcsoltunk 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 ml 5 μM Fura-2-acetoximetiésztert tartalmazó módosított Krebs-puffert tartalmazó oldattal 30 percig recirkuláltattuk. Ez az idő a myocardium Fura-2-jelölését szolgálta. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ méréséhez a szív bal kamrai felszínét trifurkációs száloptikás kábel közbeiktatásával Photon Technology International (USA) gyártmányú Deltascan egységgel világítottuk meg. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásait a Fura-2 két gerjesztő hullámhosszon nyert fluorszcencia-intenzitás (háttérkorrigált) hányadosával (R) fejeztük ki.

A perfúzió közben a szívfrekvenciát és a bal kamra nyomását a bal kamrába helyezett polietilén kanül segítségével folyamatosan regisztráltuk. A kontraktilitás és a relaxáció sebességének jellemzésére a kamrai nyomásgörbe idő szerinti első deriváltjának maximális értékeit használtuk ($+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ és $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$).

Biokémiai módszerek

A myofibrilláris frakció tisztítása a lefagyasztott szívizom minták porításával nyert anyag 1-1,5 g-os mennyiségeiből történt. Az izolálási technika lényege, hogy többszöri homogenizálást és centrifugálást követően 1%-os Triton X-100 detergenst tartalmazó

foszfát pufferrel a különböző membránszennyeződéseket és az egyéb szolubilizálható fehérjéket eltávolítsuk.

Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist 10-18%-os és/vagy 5-20%-os lineáris gradiens lapgéleken Laemmli szerint végeztük. 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) molekulasúlyuk alapján azonosítottuk. A fehérjékbe beépült ^{32}P meghatározásához az egyes foszfoproteineket a géllapokból szikével kivágtuk majd folyadék-szcintillációs módszerrel radioaktivitásukat megmértük.

Mérések izolált cardiomyocytaikon

A cardiomyocytaikat mechanikusan izoláltuk. A myocytaikat tartalmazó szuszpenziót 0,5%-os Triton X-100-al 5 percig kezeltük. A vizsgálni kívánt izolált cardiomyocytaikat 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. Az izometrikus erőmérés során a kialakult maximális feszülést, mind analóg módon, mind digitális jelek formájában egyedi fejlesztésű komputer program segítségével regisztráltuk.

Statisztikai módszerek

A számszerűsíthető eredményeket az átlag és a mintaközép hibája (S.E.M.) segítségével tüntettük fel, a statisztikai vizsgálatokat Student félé t -teszttel vagy varianciaanalízissel végeztük. Szignifikánsnak a $P < 0,05$ eltéréseket tekintettük. A levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatásának koncentráció-függését módosított Hill-egyenlet segítségével illesztettük.

EREDMÉNYEK

Echocardiographias vizsgálatok

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

Kísérleteink következő fázisában a levosimendan kezelést előzetes isoproterenol alkalmazás után vezettük be. 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 ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) előzetes isoproterenol ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) kezelést követően tehát, már nem fokozta a bal kamra kontraktilitását, sem a relaxáció sebességét, sem a szívfrekvenciát.

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. Kísérleteink során igyekeztünk a kombinált (isoproterenol + levosimendan) kezelést olyan körülmények között végezni, hogy a kontraktilitás 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. Az isoproterenollal kombinált mérésekhez a $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ 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. Nyilvánvalóvá vált, hogy a 2 perc időtartamú $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ isoproterenol kezelés maximálisan foszforilálta a myofibrilláris fehérjét (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. 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. 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.

Az isoproterenol ($0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 2 perc) és a levosimendan ($0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 5 perc) önállóan alkalmazva Langendorff-szerint perfundált szíveken egyértelmű pozitív inotrop, lusitrop és chronotrop hatásokkal rendelkeztek. Az isoproterenol stimulálás kapcsán a bazális $+dP/dt_{\text{max}}$, $-dP/dt_{\text{max}}$ és szívfrekvencia értékek (rendre: $2066 \pm 43 \text{ Hgmm.sec}^{-1}$, $2002 \pm 40 \text{ Hgmm.sec}^{-1}$, illetve $172 \pm 16 \text{ ütés.perc}^{-1}$) drámai módon, szignifikánsan növekedtek (rendre: $4896 \pm 415 \text{ Hgmm.sec}^{-1}$, $3904 \pm 238 \text{ Hgmm.sec}^{-1}$, illetve $273 \pm 11 \text{ ütés.perc}^{-1}$). Az önálló levosimendan kezelés esetében ugyanezen paraméterek a következőképpen alakultak; bazális értékek, rendre: $2050 \pm 39 \text{ Hgmm.sec}^{-1}$, $1990 \pm 37 \text{ Hgmm.sec}^{-1}$, illetve $175 \pm 4 \text{ ütés.perc}^{-1}$; stimulált értékek, rendre: $2624 \pm 83 \text{ Hgmm.sec}^{-1}$, $2269 \pm 56 \text{ Hgmm.sec}^{-1}$, illetve $201 \pm 3 \text{ ütés/perc}$. Korábbi irodalmi adatokkal összhangban 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 ($0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 2 perc), majd a stimulálást követően a szívpreparátumokat további 15 percig mostuk, ez alatt valamennyi kamrafunkciós paraméter normalizálódott. Ekkor maximális dózissal levosimendant alkalmaztunk ($0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$) és a bal kamra funkcióváltozását regisztráltuk. Utóbbi körülmények között a levosimendan hemodinamikailag nem okozott szignifikáns növekedést a kamrafunkciós paraméterekben ($+dP/dt_{\text{max}}$, $-dP/dt_{\text{max}}$).

A myofibrilláris fehérjék foszforilációját a szívpreparátumok ^{32}P -ortofoszfát jelölését követően vizsgáltuk. A korábbi irodalmi adatokkal megegyezően az isoproterenol ($0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 2 perc) többszörösére növelte ($360 \pm 31 \text{ pmol.mg}^{-1} \text{ protein}$, $n=4$) a bazális foszforilációt ($112 \pm 17 \text{ pmol.mg}^{-1} \text{ protein}$, $n=4$). Ugyanakkor az isoproterenol stimulálás leállítását és 15 perc mosást követően a troponin I foszforiláció még mindig szignifikánsan magasabb volt ($178 \pm 19 \text{ pmol.mg}^{-1} \text{ protein}$, $n=4$), mint a bazális érték. Ha az isoproterenol stimulálást és a 15 perces mosási periódust egy további levosimendan infúzió ($0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$) követte, akkor 5 perc folyamatos stimulálás után további mérsékelt, de szignifikáns növekedést észleltünk a

troponin I ^{32}P -inkorporációban ($201 \pm 18 \text{ pmol.mg}^{-1} \text{ protein}$, $n=4$). 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.

Izolált cardiomyocytá 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 $\text{pCa } 6,2$) volt jól észlelhető. Szermentes körülményeink között a $\text{pCa } 6,2$ Ca^{2+} koncentrációnál a $\text{pCa } 4,75$ -nél mért maximális izometrikus erő (P_o) $13 \pm 1\%$ -a alakult ki. A fenntartott $\text{pCa } 6,2$ 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.

Megfigyelések humán szívelégtelenség kezelése kapcsán

A vizsgálatok kapcsán szívelégtelenség különböző formáiban (krónikus szívelégtelenség akut exacerbációja, szívműtétet 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 fél éves teljes mortalitást. A LIDO tanulmányba beválogatott betegek 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).

MEGBESZÉLÉS

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

Eredményeink szerint a különböző állatmodelleken (altatott tengerimalac, perfundált Langendorff-szív preparátum, izolált cardiomyocytá) 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 cardiomyocytá vizsgálatok 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.

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 myocardiális 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: $1/ \text{Ca}^{2+}$ -

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 cardiomyocytaikon a számított EC_{50} érték $5 \pm 3 \text{ nmol.L}^{-1}$ -nak bizonyult. Tehát klinikailag releváns koncentrációknál is ($6\text{--}12 \text{ nmol.L}^{-1}$) valószínűleg számítani kell a Ca^{2+} -érzékenyítő hatásra. Ugyanakkor a cAMP koncentráció emelkedésével járó PDE-gátló hatás csak magasabb koncentrációknál észlelhető, 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. A levosimendan legnagyobb dózisainál a lusitropia jelentős fokozódását tapasztaltuk (a relaxációs sebesség jelentős fokozódását altatott tengerimalacokon és a $-dP/dt_{\max}$ 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 nmol.L^{-1} koncentrációknál nagyobb levosimendan koncentrációk alkalmazásakor az epicardiálisan regisztrált $[Ca^{2+}]$ növekedését tapasztaltuk. A terápiás körülmények között alkalmazott levosimendan cAMP-t emelő hatása azonban valószínűleg korlátozott, mivel a terápiás koncentráció ($6\text{--}12 \text{ nM}$) elmarad attól a szinttől mely a cAMP koncentráció effektív emeléséhez szükséges. Ezt a feltételezést támogatják saját, újkeletű adataink is, melyek szerint a két domináns intracelluláris PDE izoforma (a PDE III és PDE IV) együttes gátlásához szükséges levosimendan koncentráció EC_{50} értéke $\mu\text{mol.L}^{-1}$ -os tartományban van. 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 sajátosságokkal bír, mely előnyös kombinációt jelent a myofilamentális Ca^{2+} -érzékenyítéssel.

A PKA foszforiláció gátló hatását a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatására minden állatmodellen észlelni lehetett, de a legegységelműbb 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. 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.), 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.

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, 2/ csökken a Ca^{2+} tranziens amplitúdója és 3/ növekszik a myofibrillumok Ca^{2+} -érzékenysége. (Ez utóbbi jelenséget általában a troponin I bazális foszforiláció csökkenésével magyarázzák.) A levosimendanról viszont az is ismert, hogy annak troponin C-hez történő kapcsolódása és ezért az általa keltett pozitív inotropia is Ca^{2+} -dependens. 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. 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. A LIDO és RUSSLAN tanulmányok adatai alapján 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 antagonist hatások egymást kioltó hatásának tulajdonítottak. Ugyanakkor a β -blokkoló kezelés egyértelműen javította a levosimendan hemodinamikai hatékonyságát (perctérfogat, pulmonalis 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, digitalis) 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 biztosíthat 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.

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 cardiomyocytaikon 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 betegeink 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.

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 patomechanizmusa. *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 cellularis, 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, Szeráfin 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 annuloplasticás 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 cardiotonic 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.