

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Nagy László

**Új típusú pozitív inotróp szerek
hatásmechanizmusának vizsgálata**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

Új típusú pozitív inotróp szerek hatásmechanizmusának vizsgálata

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

Tartalomjegyzék

Rövidítési jegyzék	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. A szívelégtelenség epidemiológiája és definíciója.....	8
2.2. A szívelégtelenség klasszifikációja	8
2.3. A szívelégtelenség patogenezise	9
2.4. Az akut szívelégtelenség definíciója	10
2.5. Az akut szívelégtelenség konvencionális gyógyszeres kezelése.....	11
2.6. A szarkomer felépítése és a kontrakció mechanizmusa.....	11
2.7. Klasszikus pozitív inotróp hatású szerek	12
2.8. Szarkomert aktiváló szerek a szívelégtelenség kezelésére.....	13
2.8.1. Ca^{2+} -érzékenyítő szerek a szívelégtelenség kezelésében	14
2.8.2. A miozin aktiváció új terápiás lehetőség szívelégtelenségben	16
2.9. Szarkomert aktiváló szerek alkalmazása más kórállapotokban.....	18
3. Célkitűzések	20
4. Anyagok és módszerek	21
4.1. Felhasznált szövetminták és anyagok.....	21
4.2. Módszerek.....	21
4.2.1. In vitro izometrikus erőmérések izolált és permeabilizált szívizomsejteken.....	21
4.2.2. A szív- és vázizom minták MHC izoforma összetételének vizsgálata.....	24
5. Eredmények.....	26
5.1. Az OM pozitív inotróp hatásának farmakológiai jellemzése	26
5.1.1. Az OM izolált patkány szívizomsejtek mechanikai paramétereire gyakorolt hatása	26
5.1.2. Az OM hatása a szívizomsejtek kinetikai paramétereire	31
5.2. Az OM izolált vázizomsejtekre gyakorolt hatásai.....	33
5.2.1. OM-függő változások izolált lassú endogén kinetikájú vázizomrostok mechanikai paramétereiben	33
5.2.2. Az OM hatása a lassú típusú vázizomrostok kinetikai paramétereire.....	36
5.2.3. Az OM hatása a gyors kinetikájú vázizomrostok mechanikai és kinetikai paramétereire.....	38
5.3. Az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő hatása tengerimalac permeabilizált szívizomsejtjein	40

6. Megbeszélés	45
7. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények	54
8. Összefoglalás	55
9. Irodalomjegyzék	57
9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke	57
9.2. Saját közlemények jegyzéke	67
10. Tárgyszavak.....	69
11. Köszönetnyilvánítás	71
12. Függelék	72

Rövidítési jegyzék

[Ca ²⁺]	kalcium ion koncentációja
ADP	adenozin-difoszfát
ANOVA	varianciaanalízis (Analysis of variance)
ATP	adenozin-trifoszfát
BES	N-Bis-(2-Hidroxietyl)-2-Aminoetán szulfonsav
Ca ²⁺	kalcium ion
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegségek
cTnC, cTnT, cTnI	kardiális troponin C, kardiális troponin T, kardiális troponin I
DMSO	dimetil-szulfoxid
EF	ejekciós frakció
EGTA	egtazic sav
ESC	European Society of Cardiology
F _{aktív}	aktív izometrikus erő
F _{max}	maximális izometrikus erő
F _{passzív}	passzív erő
HFmrEF	szívelégtelenség közepesen csökkent EF-val
HFpEF	szívelégtelenség megtartott EF-val
HFrfEF	szívelégtelenség csökkent EF-val
K ⁺	kálium ion
k _{tr}	aktin - miozin ciklus sebességi állandója
MHC	miozin nehéz lánc
Na ⁺	nátrium ion

NCX	nátrium-kálium cserélő pumpa
n_{Hill}	Hill-koefficiens
NMR	nukleáris mágneses rezonancia
OM	omecantiv mecarbil
pCa	$-\lg[\text{Ca}^{2+}]$
pCa ₅₀	F_{max} -hoz szükséges kalcium koncentráció
PDE	foszfodiészteráz enzim
P_i	foszfát ion
PKA	proteinkináz A
PMSF	fenil-metil-szulfonil fluorid
SR	szarkoplazmatikus retikulum
$t_{1/2\text{akt}}$	félmaximális erő kifejlődéséhez szükséges idő
t_{relax}	relaxációs idő

1. Bevezetés

A fejlett nyugati országokban a két fő halálokot a kardiovaszkuláris megbetegedések, valamint a daganatos betegségek képezik. A két fő betegségcsoport közül napjainkban a kardiovaszkuláris megbetegedések szerepelnek első helyen a morbiditási mutatók tekintetében, míg meglepő módon az 5 éves túlélés alapján a mortalitási mutatók között lényeges különbség nincs.¹

Az elmúlt két évtizedben a korszerű diagnosztikai lehetőségeknek, valamint az egyre fejlettebb farmakológiai és eszközös terápiának köszönhetően a kardiovaszkuláris megbetegedések összesített (elsősorban a krónikus szívelégtelenség) mortalitása csökkent, ezzel szemben az akut szívelégtelenség halálozási mutatói érdemben nem változtak. A szív pumpafunkcióját fokozó pozitív inotróp hatású gyógyszerek nagy része ugyan rövidtávon jelentős hemodinamikai javulást eredményez, közép-, illetve hosszútávon adverz hatásuk van a morbiditási, illetve mortalitási mutatókra. Mivel jelenleg ideális pozitív inotróp szer nem áll a rendelkezésünkre, a kardiovaszkuláris farmakológia egyik fő célja napjainkban olyan új kardiotonikus szerek kifejlesztése, melyek úgy javítják a szívelégtelen miokardium teljesítményét, hogy ezzel párhuzamosan nem fokozzák a szív oxigén fogyasztását, nem eredményeznek további sejtkárosodást, hatásuk szívizom-specifikus, illetve az arritmogén potenciáljuk is elhanyagolható.²

A jelenleg rendelkezésre álló szerek közül egyedül a levosimendan közelíti meg az ideális pozitív inotróp kritériumait, mely a legújabb klinikai tanulmányok alapján neutrális, vagy kismértékben pozitív hatással volt a szívelégtelenség hosszú távú morbiditási és mortalitási mutatóira. A levosimendan alapvázának biokémiai módosításával előállíthatunk hozzá hasonló hatásmechanizmusú új pozitív inotróp szereket, melyek potenciálisan a kiindulási vegyületnél előnyösebb farmakokinetikai és farmakodinamikai hatásokkal bírnak.³ Az ORM-3819-et a levosimendan alapszerkezetének kémiai változtatásával hozták létre, ugyanakkor farmakológiai karakterizációja ez idáig váratott magára.

Az akut szívelégtelenség kezelésére jelenleg még nem törzskönyvezett új gyógyszer-csoportot képeznek a kardiális miozin aktivátorok, melynek fő képviselője az omecamtiv mecarbil (OM) hatékonyan tűnik az eddig elvégzett preklinikai, illetve I. és II. fázisú klinikai vizsgálatokban⁴⁻⁶, ugyanakkor hatásmechanizmusával és biztonságosságával kapcsolatban számos kétely merült fel.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A szívelégtelenség epidemiológiája és definíciója

A szívelégtelenség a szívizomzat funkcionális, vagy strukturális rendellenessége következtében kialakuló karakterisztikus tünetek (fáradékonyság, nehézlégzés, stb.), illetve specifikus jelek (bokaödéma, pangásos zörejek, stb.) összessége, melyet a perifériás szövetek és szervek csökkent perfúziója és következményes alacsony oxigenizációja hoz létre.⁷ A szívelégtelenség a népességet érintő egyik leggyakoribb megbetegedés, prevalenciája a populációban átlagosan 0,5-2%, és szorosan összefügg az életkorral (70 év felett a prevalencia 10% feletti). Számítások szerint Európában közel 10 millió ember szenved szívelégtelenségben, az évente jelentkező új esetek száma 1-5/1000 fő. A szívelégtelenséggel kórházba kerülő betegek mortalitása 30 napon belül 10%, 1 éven belül 22%, az 5 éven belüli halálozási arány pedig 50% körüli, mely meghaladja a daganatos betegségekre vonatkoztatott összesített mortalitási értéket.⁸ Nehezíti a felismerését, hogy a szívelégtelenség tünetei és jelei páciensenként jelentősen eltérőek, illetve a már fennálló szisztolés és/vagy diasztolés diszfunkció ellenére a beteg még tünetmentes lehet. A szívelégtelenség diagnosztizálásához három alapkritériumot kell figyelembe venni:^{7,9}

- a szívelégtelenség tünetei terhelés hatására, vagy nyugalomban is jelentkeznek,
- a szív szerkezetében és/vagy funkciójában kimutatható károsodás,
- terápia hatására csökkennek a tünetek.

2.2. A szívelégtelenség klasszifikációja

A szívelégtelenség altípusainak csoportosítása korábban kizárólag a bal kamrai funkció károsodásának jellege alapján történt: eszerint szisztolés és diasztolés szívelégtelenséget különítettek el. A tisztán szisztolés szívelégtelenségre a miokardium megromlott kontraktilitása, ebből fakadóan az ejekciós frakció (EF), és a perctérfogat csökkenése jellemző. A diasztolés szívelégtelenségben a bal kamra kontraktilitása, így a perctérfogat és az EF megtartott, viszont aktív-, vagy passzív relaxációs zavar következtében a bal kamra diasztolés telődése károsodik, mely a kisvérkörben okoz pangást. A kétféle működészavar azonban gyakran kombinálódik, illetve a szisztolés szívelégtelenségben is megfigyelhető diasztolés funkciózavar, úgymint diasztolés szívelégtelenségben a szisztolés paraméterek károsodása.¹⁰ Ennek megfelelően a korábbi terminológia változott, az Európai Kardiológus Társaság (ESC) aktuálisan érvényes irányelveiben a szívelégtelenség klasszifikációjának

alapja az EF. Ha a szívelégtelenség karakterisztikus tünetei és jelei 50% feletti EF mellett jelentkeznek, akkor megtartott EF-val járó szívelégtelenségről beszélünk (HFpEF), míg 40% alatti EF esetén csökkent EF-val járó szívelégtelenségről (HFrEF) van szó. A kettő közötti, 40-50%-os EF-jú alcsoportot közepesen csökkent EF-val járó szívelégtelenségnek nevezzük (HFmrEF). A kamrák működészavara alapján ezek mellett még jobb-, illetve balszívfél elégtelenség is elkülöníthető, melynek elsősorban a klinikai tünetek értékelésében és a megfelelő terápia megválasztásában van jelentősége. Időbeni lefutása alapján akut és krónikus szívelégtelenség különíthető el.^{7, 10, 11}

2.3. A szívelégtelenség patogenezeise

A szívelégtelenség egy „circulus vitiosus”-szerűen progrediáló kórállapot: különböző etiológiájú kardiovaszkuláris megbetegedések (iszkémiás és non-iszkémiás okok) következtében különféle kompenzációs mechanizmusok (renin – angiotenzin – aldosteron rendszer, szimpatikus tónusfokozódás) lépnek működésbe, melyek rövidtávon támogatják a keringést, hosszabb távon viszont tovább terhelik a már károsodott szívet. A csökkent perctérfogat, vagy akár a nyomás- és volumen-túlterhelés következtében létrejön a miokardium kompenzatórikus hipertrófiája. A kamrák tökéletlen ürülése a szívüregek dilatációjához és ezzel a szívizomrostok megnyúlásához vezet, ami ismét újabb terhet ró a már eddig is dekompenzált szív működésére. A kompenzációs mechanizmusokat indukáló szignalizációs folyamatok előbb-utóbb a szívizomsejtek nekrozisát, apoptózisát és az extracelluláris mátrix átépülését (fibrózis), végül a szívizomzat strukturális és funkcionális „remodelling”-jét eredményezik.¹² Mindezen folyamatok következtében végül szívelégtelenség lép fel. A kórkép etiológiája ugyan sokrétű, de két kulcsfontosságú összetevő felismerhető a dekompenzációhoz vezető folyamatok bonyolult molekuláris útvesztőjében. A szívelégtelenség kialakulásában, progressziójában fontos szerepet játszó egyik összetevő a kontraktilis rendszer diszfunkciója (abnormális aktin – miozin interakció), a másik pedig a calcium (Ca^{2+}) háztartás elemi zavara, melyek részletes ismerete a szívelégtelenség kezelésében használt tradicionális és újabb típusú inotróp szerek hatásmechanizmusa szempontjából bír nagy jelentőséggel.^{13, 14}

A Ca^{2+} homeosztázis zavarát az excitációs – kontraktilis kapcsolat szabályozásában részt vevő regulátor fehérjék, pumpamechanizmusok, ionszűrők, ioncserepumpák, működésének károsodása idézi elő.¹⁵ Diszfunkciójuk eredményeképpen HFrEF-ben szenvedő betegek szívizomsejtjeiben torzul az intracelluláris Ca^{2+} -tranzienst, melynek amplitúdója csökken, időtartama jelentős mértékben megnyúlik, valamint emelkedik a diasztolés Ca^{2+}

koncentráció ($[Ca^{2+}]$) is.¹⁶ A szívizomsejtek kóros Ca^{2+} -anyagcseréjének hátterében egyrészt a szarkoplazmatikus retikulum (SR) kóros működése áll: a Ca^{2+} felvétele lassabb, a Ca^{2+} raktározás mértéke csökkent¹⁷, melynek fő oka az SR felszínén elhelyezkedő SR Ca^{2+} ATPáz (SERCA) mennyiségének és aktivitásának csökkenése.^{18, 19} A SERCA aktivitását szabályozó foszfolambán mennyiségének csökkenése, a rianodin receptorok és a szarkolemmális L-típusú Ca^{2+} -csatornák diszfunkciója tovább torzítja az intracelluláris Ca^{2+} -tranzienst.²⁰ A nyugalmi $[Ca^{2+}]$ emelkedése kompenzáló Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusokat aktivál: a nátrium (Na^+)/ Ca^{2+} cserélő (NCX) mennyiségének és aktivitásának növekedése magas intracelluláris Na^+ koncentrációt hoz létre, amely az akciós potenciál alakját és időtartamát is módosítja.²¹ A kontraktilis rendszer kóros működéséhez a kontraktilis filamentumokat alkotó strukturális és regulátor fehérjék expressziós szintjében bekövetkező változások, ezek poszttranszlációs módosulásai (pl. oxidatív károsodás), valamint a foszforilációs állapotukban bekövetkező eltérések járulhatnak hozzá.^{22, 23}

2.4. Az akut szívelégtelenség definíciója

Az akut szívelégtelenség során a szívelégtelenség tünetei gyorsan jelennek meg és progrediálnak, ezért az azonnali terápiás beavatkozás létfontosságú. A szívelégtelenség ezen alcsoportját rendkívül magas mortalitási mutatók jellemzik, hiszen a kórházi halálozás elérheti a 3-4%-ot, míg a mortalitás 10% körüli a kórházi elbocsátást követő 60-90 napon belül. Egyes források szerint évente körülbelül 1 millió beteg kerül kórházba az USA-ban akut szívelégtelenség miatt. Klinikailag három fő formáját különíthetjük el: (1) *de novo* akut szívelégtelenség, mikor a szívelégtelenség jelei gyors kezdettel, rapidan progrediálva, megelőző tünetek nélkül alakul ki, (2) akut fellángolás krónikus szívelégtelenség talaján, (3) terminális krónikus szívelégtelenség.^{24, 25} Az akut szívelégtelenség patofiziológiájának lényege a miokardiális diszfunkció és az emelkedett szisztémás vaszkuláris ellenállás összefonódása, mely egy öngerjesztő „ördögi körfolyamatot” indít el. Ennek megfelelően – etiológiáját tekintve – az akut szívelégtelenség két fő, de egymással adott esetben kombinálódó formája különíthető el, ahol vagy a bal kamra primer pumpafunkció-elégtelensége (1), vagy az emelkedett szisztémás vaszkuláris ellenállás (2) dominál.²⁶ Az előbbi alcsoportban a klinikai képet a csökkent perctérfogat dominálja, melynek hátterében a szív strukturális (pl. szívinfarktus, ínhúr ruptúra, stb.), vagy funkcionális (ritmuszavarok) károsodása áll. Az akut szívelégtelenség másik csoportjában a szisztémás vaszkuláris ellenállás emelkedése az utóterhelés emelkedéséhez vezet, amely a bal pitvari nyomás fokozódása révén kisvérköri pangást és következményes tüdőödémát okoz.^{2, 26, 27}

2.5. Az akut szívelégtelenség konvencionális gyógyszeres kezelése

Az ESC akut szívelégtelenséggel kapcsolatos irányelvei szerint a megfelelő terápia alapja a beteg aktuális hemodinamikai állapotának nyomon követése, így elsősorban a centrális és perifériás keringési elégtelenség objektív jeleinek és tüneteinek felismerése.^{7, 11} Keringési elégtelenség esetén (RR <90 Hgmm), különösen ha hipoperfúzió és kardiogén sokk lép fel, intravénás inotróp kezelést érdemes választani a perctérfogat és a vérnyomás növelése érdekében, míg intravénás diuretikumok és vazodilatátorok alkalmazása javasolt abban az esetben, mikor a szívelégtelenségben szenvedő beteg vérnyomása megtartott, vagy emelkedett (RR >90 Hgmm), és heveny kisvérköri pangás uralja a klinikai képet.^{7, 25}

Az akut szívelégtelenség kezelésének sikerét a kiváltó okok felismerése és azok gyors megszüntetése (akut koronária szindróma, hipertenzív krízis) és a hatékony szupportív kezelés (diuretikumok, keringéstámogatás) jelenti. Az utóbbi két évtized nagy klinikai tanulmányai kimutatták, hogy a szívizomzat csökkent pumpafunkciójának javítása céljából adott pozitív inotróp hatású szerek nagy része ugyan kedvező hemodinamikai hatásokkal bír, de nem javították az akut szívelégtelenség prognózisát, sőt a hosszabb távú mortalitási és morbiditási adatokat rontották.²⁸⁻³⁰ A keringéstámogatás céljából adott pozitív inotróp hatású gyógyszerek három fő mechanizmussal javíthatják a szív teljesítményét:

- 1.) adrenerg szignalizációs útvonalakkal interferálva a Ca^{2+} -mobilizáló szerek növelik az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -t, mely erősebb szívizom-összehúzódásokat generál (tradicionális inotrópok),
- 2.) az SR Ca^{2+} anyagcseréjére ható szerek szisztolé során fokozzák Ca^{2+} felszabadulást, míg diasztolé során az SR Ca^{2+} raktározását,
- 3.) a szarkomert aktiváló szerek viszont a kontraktilis rendszer alapvető szerkezeti- és működésbeli egységeit, a szarkomereket célozzák.^{2, 28}

2.6. A szarkomer felépítése és a kontrakció mechanizmusa

A szívizomzat pumpafunkcióját javító gyógyszerek támadáspontja közvetett vagy közvetlen módon a kardiális szarkomer, ezért hatásmechanizmusuk ismertetéséhez elengedhetetlen a szarkomer felépítésének és a kontrakció mechanizmusának rövid áttekintése. A miokardium alapvető szerkezeti és funkcionális egységét a kontrakciós erő generálására képes szarkomer jelenti, mely szövettanilag vastag és vékony filamentumokból épül fel, melyek a váz- és szívizomzat harántcsíkoltágáért felelősek. A vékony filamentumok 6-9 nm vastagságúak, fő alkotórészük az aktin, melyhez regulátor funkcióval bíró troponin (Tn) – tropomiozin

molekulákból álló komplexek kötődnek. A vékony filamentumokra jellemző kettős helikális struktúra két polimerizált aktin filamentum egymás köré tekeredésével alakul ki. A vastag filamentumokat alkotó miozin molekulák a szarkomer közepén helyezkednek el, farki és feji régiókból épülnek fel. Az izom-összehúzódnak élettani alapját jelentő csúszó-filamentum modell lényege, hogy a szögben kifelé álló miozin fejek konformáció-változása következtében a vékony filamentumok becsúsznak a vastag filamentumok közé, mely megrövidíti a szarkomer hosszát. A miozin fejek evezőcsapás-szerű konformáció-változásának (power-stroke) létrehozásához az ATP molekulák aktin és Ca^{2+} -függő hidrolízise szükséges. Diasztolé során a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ alacsony, a gátló fehérje komplex (cTnI – tropomiozin) megakadályozza az aktin – miozin kölcsönhatást. Szisztolé során az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ növekedése egy sor olyan konformáció változást idéz elő, ami lehetővé teszi az aktin – miozin interakció kialakulását. Farmakológiai jelentősége szempontjából két fő interakciót kell kiemelni, (1) a cTnC Ca^{2+} kötése megszünteti a cTnI – tropomiozin komplex aktin – miozin kölcsönhatásra gyakorolt gátló hatását, így a (2) vékony filamentumok miozin kötő helyei hozzáférhetővé válnak a miozin fejek számára, megteremtve ezzel a lehetőséget a keresztidák kialakítására.³¹⁻³³

2.7. Klasszikus pozitív inotróp hatású szerek

A szívizom-összehúzódnak csúszó-filamentum modellje szerint a miokardium kontraktilis ereje arányos az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -val. Ezen összefüggés felismerése vezetett szívelégtelenségben (a kialakuló csökkent pumpafunkció javítása érdekében) azon pozitív inotróp szerek alkalmazásához, melyek növelik a szívizomsejtek $[\text{Ca}^{2+}]$ -ját. A gyógyszercsoport a tradicionális inotróp, vagy a Ca^{2+} -mobilizáló pozitív inotróp megjelölést kapta.²

Az első szabadalmaztatott Ca^{2+} -mobilizáló szerek a szív-glikozidok, más néven digitálisz alkaloidák voltak. A forgalomban lévő digoxin és digitoxin a szarkolemmális Na^+ - K^+ -ATP-áz pumpa gátlása révén okoz Ca^{2+} akkumulációt a NCX aktivitásának másodlagos fokozása révén. A korai tanulmányok szerint a digoxin nem javította a szívelégtelenség mortalitását, viszont csökkentette a hospitalizációk gyakoriságát.³⁴ A legújabb metaanalízisek alapján a digoxin alkalmazásával kapcsolatos adatok ellentmondóak, a randomizált vizsgálatokban a mortalitásra alapvetően nem volt hatással az ajánlott szérumszintek betartása mellett. Az ESC legújabb irányelvei szerint napjainkban alkalmazásának fő indikációja a szívelégtelenségben fellépő pitvarfibrilláció, mikor az inotróp támogatás mellett a szívfrekvencia csökkentésére van szükség.^{29, 36}

A Ca^{2+} -mobilizáló szerek akut szívelégtelenségben leggyakrabban alkalmazott képviselői a β -adrenerg receptor agonisták. A közéjük tartozó dobutamin és adrenalin a β_1 -adrenerg receptorok közvetlen aktiválásával növeli az intracelluláris ciklikus adenosinmonofoszfát (cAMP) koncentrációját, mely a proteinkináz A (PKA) aktivitás-fokozódása révén fokozza az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -t. A foszfodiészteráz (PDE) inhibitorok támadáspontjai a cAMP-függő foszforilációs folyamatok, hiszen az ide tartozó milrinon és enoximon a cAMP lebomlásának gátlásával tartja „bekapcsolva” ezt az útvonalat. Ezek a szerek ugyan hatékonyan javítják a miokardium kontraktilitását, viszont fokozták a szívelégtelenség mortalitását.^{2, 30, 37, 38} Ennek hátterében a megnövekedett intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ áll, mely fokozza a szívizomzat oxigén fogyasztását, növeli a szívfrekvenciát, másodlagos jelátviteli útvonalakat aktiválva a szívizomsejtek apoptózisát és nekrozisát eredményezi, valamint arritmogén hatású.²²

Nem tartoznak szigorúan a Ca^{2+} -mobilizálók közé az SR Ca^{2+} anyagcseréjére ható szerek, ugyanakkor szisztolé során szintén fokozzák a Ca^{2+} felszabadulást. Ide tartozik az istaroxim, mely a Na^+ - K^+ -ATP-áz gátlásával a digoxinhoz hasonló módon fokozza a szisztolé alatt a Ca^{2+} felszabadulást, míg diasztolé alatt a SERCA2a aktiválása révén elősegíti az SR Ca^{2+} raktározását, azaz pozitív ino-luzitrop hatásokkal bír. A HORIZON-HF tanulmányban akut szívelégtelen betegek körében az istaroxim hatékonyan javította a balkamra szisztolés és diasztolés funkcióját, ugyanakkor az alkalmazásával kapcsolatos hosszú távú mortalitási adatokról egyelőre nincs információ.³⁹

2.8. Szarkomert aktiváló szerek a szívelégtelenség kezelésére

A Ca^{2+} -mobilizáló szerek mortalitásra kifejtett kedvezőtlen hatásai miatt megfelelő hatékonyságú, de eltérő támadáspontú gyógyszereket kellett fejleszteni, melyek legalább neutrális hatásúak a hosszú távú mortalitási adatokra nézve. A szarkomert aktiváló szerek használatával elviekben elkerülhetjük a tradicionális inotrop szerek alkalmazásának kedvezőtlen következményeit, hiszen az aktin – miozin interakció hatékonyságának célzott, specifikus és közvetlen módosítása mellett nem várható az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ növekedése. A szarkomert célzó szerek hatásmechanizmusa főként 1.) a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenyítésén és 2.) a miozin aktiváción alapul, de mellettük léteznek 3.) járulékos miofilamentális hatásokkal rendelkező szerek is.^{2, 25} A szarkomert aktiváló szerekkel kapcsolatban felmerül a pleiotrop hatásmechanizmus kérdése is. Jelentős részük ugyanis a miofilamentális támadáspontjuk mellett kiegészítő hatásokkal is rendelkezik (pl. PDE III gátlás), amely további hemodinamikai vagy metabolikus előnyökkel/hátrányokkal járhat. Más

szerek viszont tisztán szarkomer szintű hatásokkal bírnak, így ezek hatásmechanizmusában egyetlen feltételezett támadásponttal és elviekben egyetlen célsejt- csoporttal (pl. szívizomsejt) lehet számolni.³

2.8.1. Ca^{2+} -érzékenyítő szerek a szívelégtelenség kezelésében

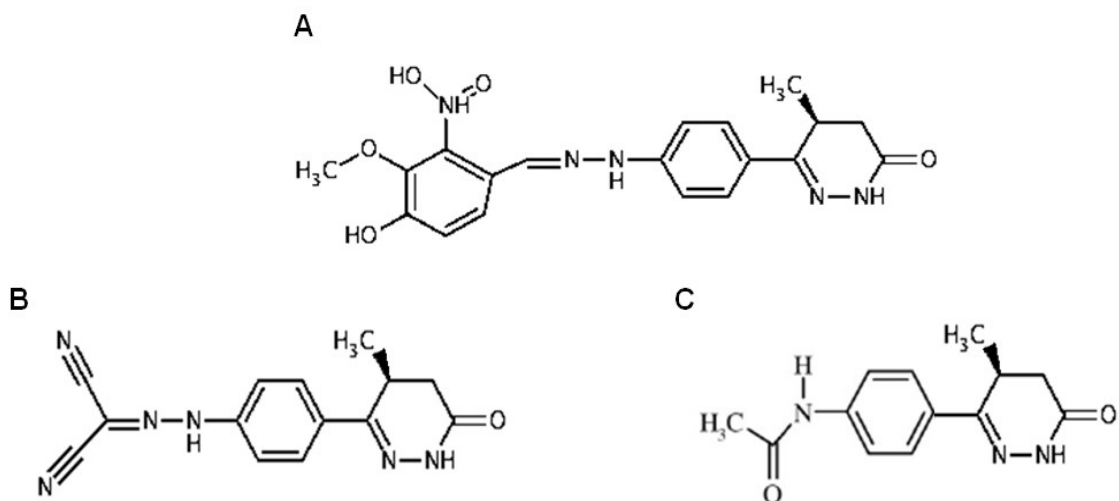
A szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenysége az egységnyi kontraktilis erő (pl. félmaximális erő) kifejtéséhez szükséges $[Ca^{2+}]$ -val jellemezhető. A Ca^{2+} -érzékenység növelésének hatására a szívizomsejtek adott intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mellett erősebb kontrakciós választ produkálnak. A hatás elérhető a miofilamentális rendszer különböző fehérjéinek poszttranszlációs módosításával, vagy egyéb regulátor komplexek kölcsönhatásának megváltoztatásával. Ha a miokardiális kontraktilitás központi elemének a Ca^{2+} – cTnC interakciót tekintjük, akkor Ca^{2+} -érzékenyítésnek kétféle útvonalát különíthetjük el. A centrális útvonalon ható szerek (levosimendan) célpontja a Ca^{2+} – cTnC interakció, míg a Ca^{2+} -érzékenyítés „downstream” útvonalán ható szerek az aktin – miozin interakció hatékonyságának javításával fokozzák a miokardiális kontraktilitást (EMD-53998, CGP-48506).²⁸

Az elmúlt 2-3 évtizedben számos pozitív inotróp hatású Ca^{2+} -érzékenyítő vegyület került preklinikai kipróbálásra, ugyanakkor jelentős részük a kedvező hemodinamikai hatások ellenére nem érte meg a klinikai tesztek a kedvezőtlen mellékhatás-profil miatt.^{33, 40} A Ca^{2+} -érzékenyítők használatával kapcsolatos aggodalmak jelentős része abból fakadt, hogy azok diasztolés $[Ca^{2+}]$ -n is fokozhatják a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységét, ami ronthatja a miokardium relaxációját, így diasztolés diszfunkciót idézhetnek elő. Az ESC akut és krónikus szívelégtelenségre vonatkozó evidenciagyűjteménye jelenleg egyetlen Ca^{2+} -érzékenyítő gyógyszer – a levosimendan – alkalmazását támogatja kardiogén sokkban. A levosimendan a cTnC hidrofób N-terminális doménjéhez kötődve stabilizálja a Ca^{2+} – cTnC komplexet, amely az aktin – miozin interakció gátlásának visszaszorításával fokozza a szívizomsejtek kontraktilitását.⁴¹⁻⁴³ Ebből fakadóan a szer hatása Ca^{2+} -függő, a Ca^{2+} -érzékenyítés csak szisztolé során jön létre Ca^{2+} ionok jelenlétében, elkerülve ezzel a kedvezőtlen diasztolés mellékhatásokat.⁴⁴ A szer nagy szelektivitással gátolja a PDE III és kifejezetten magas koncentrációk esetén a PDE IV izoenzimek aktivitását, pozitív inotróp hatása terápiás koncentrációban azonban elsősorban a Ca^{2+} -érzékenyítésnek tulajdonítható, ekkor ugyanis az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ nem feltétlenül változik.⁴⁵ A levosimendan mitokondriális és vaszkuláris ATP-függő K^+ -csatornák megnyitása révén kardioprotektív és vazodilatatív hatásokkal is bír. Összességében levosimendan hatására a miokardium oxigén fogyasztása nem változik. Ehhez az is hozzájárulhat, hogy az arteriolák és venulák dilatációjával a szer javítja a koronária

keringést és csökkenti a preload és afterload értékét.^{46, 47} Farmakokinetikai sajátosságaival kapcsolatban hangsúlyozandó, hogy a levosimendan tartós hatású, melynek háttérében a hosszú felezési idejű (3 nap) aktív metabolitja, az OR-1896 áll.⁴⁸

A levosimendan intravénás adagolásával kapcsolatos tanulmányok nem bizonyították egységesen a szer hatékonyságát. A kezdeti vizsgálatok arról számoltak be, hogy a levosimendan javítja a szívelégtelenség rövid- és középtávú mortalitását (LIDO és RUSSLAN tanulmány), míg későbbi tanulmányok egyértelműen ezt nem erősítették meg (REVIVE és SURVIVE vizsgálat).⁴⁹⁻⁵¹ A legfrissebb meta-analízisek viszont egyértelműen a levosimendan felsőbbrendűségét támogatják a hagyományos inotrópokhoz és a placebohoz képest, valamint a szívsebészeti perioperatív alkalmazása is előtérbe került kedvező hemodinamikai hatásainak köszönhetően.⁵²⁻⁵⁴ A levosimendan alkalmazása során különös figyelemmel kell lennünk a vérnyomás értékekre: a vazodilatátor hatása miatt átmeneti hemodinamikai instabilitást okozhat, így csak 90 Hgmm feletti szisztolés vérnyomás értékek esetén alkalmazható.⁵⁵

A hagyományos inotróp szerek mellékhatásai és az alkalmazásukkal kapcsolatos kedvezőtlen mortalitási adatok, valamint a szarkomert aktiváló szerek kezdeti kudarcai miatt az elmúlt évtizedben gőzerővel zajlott további, elsősorban miofilamentális hatásokkal rendelkező szerek kifejlesztése. A levosimendannal kapcsolatos, részben kedvező eredmények a hozzá hasonló támadáspontú és szerkezetű cTnC – függő Ca^{2+} -érzékenyítő szerek kifejlesztésére bátorították a gyógyszerkutatókat. A levosimendan-alapváz propándinitril oldalláncának aromás szubsztitúciójával kollaborációs partnereink (Orion Pharma, Finnország) egy új potenciális Ca^{2+} -érzékenyítő szert, az ORM-3819-et hoztak létre, mely feltételezéseink szerint pozitív inotróp hatását a cTnC-hez kötődve fejt ki (1. ábra). Reményeink szerint az új szer mellékhatás-profilja lehetővé teszi majd az alkalmazását olyan esetekben is, amikor valamilyen oknál fogva a levosimendan nem használható. A levosimendan értágító hatása miatt ugyanis időnként a nitrátokhoz hasonlóan fejfájást eredményez, ritkábban hipokalémia, allergiás reakció és pitvarfibrilláció is felléphet az alkalmazása mellett.⁵⁶ Jelen dolgozatban kollaborációs partnereinkkel közösen széles körű farmakológiai karakterizációt hajtottunk végre az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő képessége, cTnC-kötődése, valamint további pleiotróp hatásainak feltérképezése érdekében.

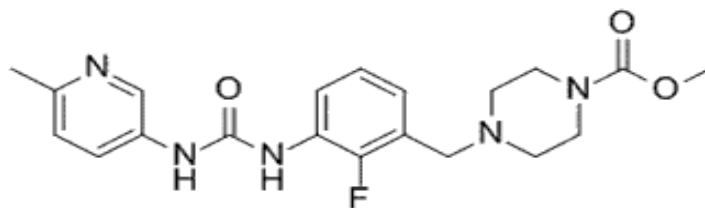


1. **ábra.** Az ORM-3819 (A), a levosimendan (B) és az OR-1896 (C) kémiai szerkezete.

2.8.2. A miozin aktiváció új terápiás lehetőség szívelégtelenségben

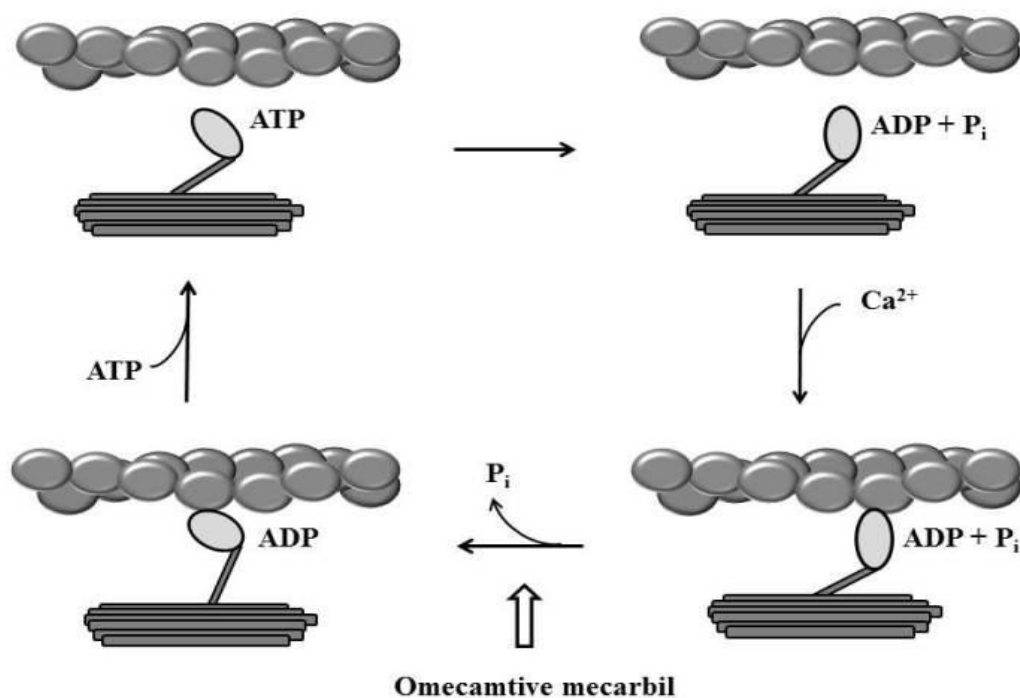
A szarkomer aktiváló szerek másik csoportját a miozin aktivátorok képezik, melyek a kardiális miozin molekulák ATPáz aktivitásának fokozása révén növelik a szívizomsejtek kontraktilis erejét és ezzel a szív pumpafunkcióját.

1998-ban egy amerikai biotechnológiai cég olyan daganatellenes szerek kifejlesztésén dolgozott, melyek a sejtosztódást specifikus mitotikus kinezinek gátlásával állítják meg, de a kifejlesztett szerek között sok épp a várt hatás ellenkezőjét produkálta, hiszen számos származék megnövelte a kinezinek aktivitását. Ez a felfedezés ösztönözte a kutatókat annak megvizsgálására, lehet-e más motoros fehérjék (miozin) aktiválását felhasználni különböző betegségek, így szívelégtelenség terápiájában. Hosszas vizsgálatok és több tucat lehetséges molekula tesztelése után jutottak el a legígéretesebb CK-1827452-nek elnevezett vegyülethez, mely képes a kardiális miozin aktivációjával a szív pumpafunkciójának javítására. Az új, miozin-aktivátorként definiált kémiai vegyület az omecantiv mecarbil (OM) elnevezést kapta (2. ábra).⁴



2. **ábra.** Az omecantiv mecarbil (CK-1827452) szerkezete.

Az OM a kardiális típusú miozin feji részén található motor domén S1 régiójához kötődik. Ez a kölcsönhatás a miozin ATPáz aktivitásának allosterikus fokozását eredményezi, gyorsítva ezzel az anorganikus foszfát (P_i) disszociációját a miozin fejekről. Az aktin – miozin ciklus sebesség-meghatározó lépése a P_i disszociáció a miozin molekulák feji részéről, melyet az erőgeneráló lépés követ. Az OM a P_i disszociáció elősegítése révén növeli az aktinnal reakcióba lépő miozin fejek számát a szívmizomzat összehúzódása során, melynek következtében növekszik a kontrakcióban részt vevő aktív kereszthidak mennyisége (3. ábra).^{57, 58} Mivel a kontrakciós erő az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ fokozódása nélkül jön létre, az OM hatásmechanizmusa elviekben „downstream” mechanizmusú Ca^{2+} -érzékenyítésként is felfogható. Korábbi tanulmányok az OM hatását a kontraktilis erő Ca^{2+} -függésére még nem vizsgálták, így az a saját vizsgálataink előtt nem volt ismert.



3. ábra. Az OM az aktin – miozin ciklus sebesség-meghatározó lépésén fejti ki a hatását, a P_i disszociáció elősegítése révén növeli a szabad miozin fejek számát a kontrakció során.

In vitro preklinikai vizsgálatokban az OM az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis befolyásolása nélkül hatékonyan fokozta patkányok bal kamrájából származó izolált, intakt szívmizomsejtek kontraktilitását. Ugyanakkor a szer nemcsak a szívmizomsejtek erejét növelte,

hanem a kontrakció idejét is megnyújtotta.⁵⁷ Az OM *in vivo* hatékonyan javította az infarktusus, valamint az aorta leszorításával szívelégtelenné tett kutyák bal kamrájának szisztolés funkcióit, ugyanakkor nem befolyásolta a diasztolés funkciót és nem növelte a szív oxigén fogyasztását.⁵⁹ Egy másik, hasonló tanulmányban viszont az OM szignifikáns mértékben fokozta az infarktuson átesett sertések bal kamrájának oxigén fogyasztását, melynek hátterében a bazális ATPáz aktivitás fokozódását vélték felismerni.⁶⁰

A preklinikai tanulmányok zömmel kedvező eredményei után megkezdődött az OM vizsgálata először egészséges, majd ezt követően szívelégtelen emberekben is. A preklinikai vizsgálatokkal összhangban a szer intravénás adagolást követően fokozta mind az egészségesek, mind a szívelégtelen (NYHA III-IV) betegek bal kamrájának szisztolés funkcióját, ugyanakkor nem befolyásolta a diasztolés paramétereket. A szer mellékhatásai jól tolerálhatónak bizonyultak a páciensek számára, a legnagyobb alkalmazott koncentrációkban viszont miokardiális iszkémia és nekroenzim emelkedés lépett fel, melynek hátterében a szisztolé idejének túlzott megnyújtása és ezzel összhangban a diasztolés intervallum megrövidülése állhatott.^{5, 61} Az OM kedvező kardiovaszkuláris hatásai megfigyelhetőek voltak orális adagolás után is.⁶² Az ATOMIC-HF tanulmány alapján úgy tűnt, hogy az OM egyes betegekben javította az elsődleges végpontnak tekintett nehézlégzést NYHA III-IV szívelégtelenség során, viszont hatása ebben a vonatkozásban a szignifikancia küszöböt nem érte el.⁶ A COSMIC-HF tanulmányban a krónikus szívelégtelenségben (HFrEF) szenvedő betegek bal kamrájának szisztolés paraméterei viszont jelentős javulást mutattak OM hatására. A kedvező preklinikai és klinikai adatok mellett egyelőre még nincs evidencia az OM hosszú távú hatásairól. A keményvégpontok vonatkozásában a jelenleg nagyszámú krónikus szívelégtelenség miatt hospitalizált beteg bevonásával megvalósuló III. fázisú klinikai tanulmány (GALACTIC-HF; NCT02929329) fog először adatokat szolgáltatni.

2.9. Szarkomert aktiváló szerek alkalmazása más kórállapotokban

Az akut-, illetve krónikus szívelégtelenség a légzésben részt vevő izmok csökkent kontraktilitásával is együtt jár. Hosszú ideje fennálló gépi lélegeztetés után, krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD), valamint számos neuromuszkuláris betegségben a rekeszizom csökkent kontraktilitása, valamint a többi légzőizom diszfunkciója súlyosbítja a fennálló légzési elégtelenséget.^{63, 64} Ezen változások hátterében kimutatták a rekeszizom eredetű vázizomrostok csökkent Ca^{2+} -érzékenységét. A rekeszizom kontraktilis diszfunkciója tehát megteremti a lehetőséget a Ca^{2+} -érzékenyítők potenciális alkalmazására perifériás légzési elégtelenség esetén is. Egy preklinikai tanulmányban kimutatták, hogy a Ca^{2+} -

érzékenyítő hatású levosimendan *in vitro* javítja a rekeszizom eredetű preparátumok kontraktilitását a Ca^{2+} -érzékenység fokozása révén.⁶⁵ Klinikai tanulmányok *in vivo* is igazolták a levosimendan hatékonyságát, javítva a COPD-ben szenvedő, illetve tartósan gépi lélegeztetett betegek légzésfunkcióját.⁶⁶ A miozin aktiváció szintén potenciális terápiás lehetőséget nyújthat perifériás légzési elégtelenség kezelésére. Ennek elvi alapját az teremti meg, hogy bár az OM elsősorban a szívizomsejtek β -MHC izoformáira hat, a légzési izmokban nagy számban jelen lévő lassú típusú vázizomrostok szintén domináns módon a szívizomsejtekkel identikus β -MHC-t tartalmazzák. Így az OM a Ca^{2+} -érzékenyítő hatását a lassú típusú izomrostokat tartalmazó vázizomokban is kifejtheti, mely a szívelégtelenség mellett az OM alkalmazásának további indikációját jelentheti.⁶⁷

3. Célkitűzések

Jelen tanulmány a miozin aktivátor hatású OM és a levosimendan-származék ORM-3819 farmakológiai jellemzésére, valamint hatásmechanizmusuk elemzésére irányult. Vizsgálataink során célunk az volt, hogy:

- kimutassuk és számszerűsítsük az OM szívizomsejt-kontraktilitásra kifejtett mechanikai (ΔpCa_{50} , n_{Hill} , F_{max} , $F_{aktív}$, $F_{passzív}$) és kinetikai (k_{tr} , $t_{1/2akt}$, t_{relax}) hatásait,
- tanulmányozzuk OM szöveti szelektivitását rekeszizom eredetű vázizomrost-preparátumokon végzett mérésekkel,
- összehasonlítsuk a lassú és gyors endogén kinetikájú vázizomrostokban létrejövő OM-függő hatásokat,
- igazoljuk a levosimendan-származék ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő képességét,
- azonosítsuk az ORM-3819 pozitív inotróp hatásának hátterében álló egyéb pleiotróp farmakológiai mechanizmusokat (PDE III/IV gátlás).

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált szövetminták és anyagok

Az OM-lal végzett kísérleteinkhez használt szívizomminták 8-15 hetes, 250-500 g közti testsúlyú hím Wistar-Kyoto patkányokból származtak. Az ORM-3819-cel kapcsolatos méréseinket 8-15 hetes, 250-500 g testsúlyú hím tengerimalacok szívizom preparátumain végeztük (Toxi-Coop Toxicological Research Centre Zrt, Dunakeszi). Az állatokat standard körülmények között (15-20 °C; páratartalom: 40-70%; megvilágítás: 12 óra/nap; 2-3 állat/ketrec) a Debreceni Egyetem állatházában tartottuk. Vizsgálataink végig összhangban voltak a Debreceni Egyetem etikai szabályzatával (Etikai Engedély száma: 1/2013/DE MÁB).

A kísérleteinkhez felhasznált OM-t az AdooQ BioScience-től szereztük be, míg az ORM-3819-et pedig finn kollaborációs partnerünk, az Orion Pharma biztosította. Az egyes szerekből dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldva 10 mM koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, melyet -4 °C-on tartottunk. A törzsoldatokból aktiváló és relaxáló oldatokkal (összetételüket a későbbiekben részletezzük) történő higítás révén adott OM/ORM-3819 koncentrációjú tesztoldatokat (3 nM – 10 µM) készítettünk. A törzsoldatokat két hétig tároltuk, míg a tesztoldatokat minden kísérleti nap során újrakészítettük. A DMSO nem befolyásolta a preparátumok kontraktilitását, koncentrációja egyik tesztoldatban sem haladta meg az 1%-ot.

4.2. Módszerek

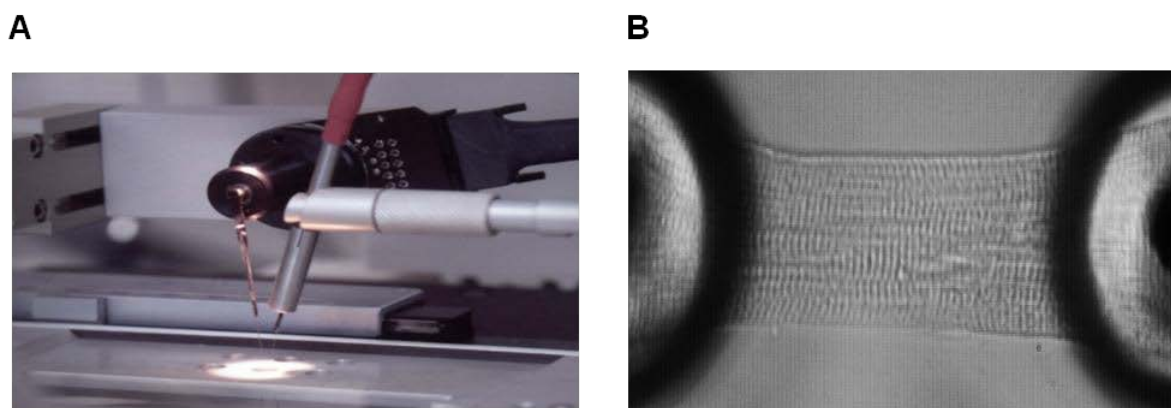
4.2.1. *In vitro* izometrikus erőmérések izolált és permeabilizált szívizomsejteken

A celluláris szintű izometrikus erőmérés során mechanikailag izolált és kémiaileg permeabilizált szívizomsejtek és vázizomrostok kontraktilitásának mechanikai és kinetikai paramétereit vizsgáltuk. A patkányokat, illetve a tengerimalacokat intraperitoneális nátrium-pentobarbitál injekcióval (Release, Garbsen, Germany; 150 mg/kg) altattuk, majd a szívüket és rekeszizmot gyors kimetszés után hűtött izoláló oldatba (100 mM KCl, 10 mM imidazol, 4 mM ATP, 2 mM EGTA, 1 mM MgCl₂; pH 7,0) helyeztük. Az így nyert mintákat ezt követően -80 °C-on tároltuk.

A mélyfagyasztott minták mechanikai izolálása egy szövet-homogenizátor segítségével történt 4 °C-on, majd ezt követően szintén 4 °C-on 5 percig 0,5%-os Triton X-100-zal kezeltük a kapott homogenizátumot. A Triton X-100 egy olyan nem-ionos detergens, mely permeabilizálja a kezelt sejtek membránrendszerét. A kezelés hatására olyan membránfosztott preparátumokat kaptunk, melyeken kontrollált, standardizált körülmények között végezhetünk kontraktilis erőméréseket általunk meghatározott összetételű

tesztoldatokkal. Méréseinket így nem befolyásolta az extra- és intracelluláris milió, valamint az intracelluláris raktárakból kiáramló Ca^{2+} ionok fluktuációja.

Vizsgálataink egy általunk épített miocita set-up-on valósultak meg izometriás körülmények között. Az izolált és membránfosztott szívizomsejteket/vázizomrostokat szilikon-tartalmú akváriumragasztóval (DAP, Baltimore, USA) egy elektromágneses motorhoz (Aurora Scientific Inc., Aurora, Canada), illetve egy érzékeny erőmérőhöz (SensoNor, Horten, Norway) kapcsolt rozsdamentes acél-tűpárhoz rögzítettük. Videomikroszkópos ellenőrzés mellett a preparátumok szarkomerhosszát $2,3\ \mu\text{m}$ -re állítottuk be, majd méréseinket ezt követően $15\ ^\circ\text{C}$ -on végeztük (4. ábra).



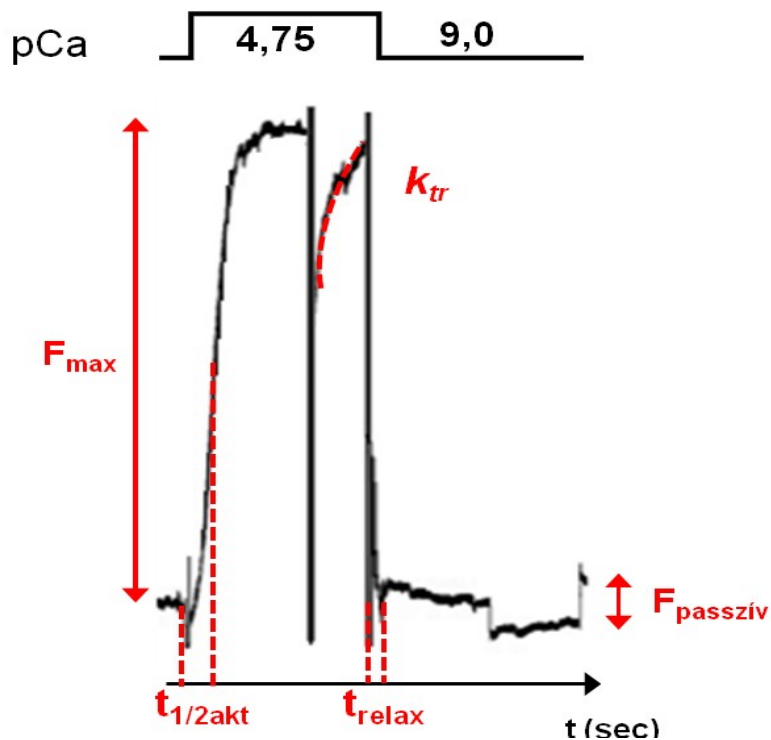
4. ábra. A kontraktilis erőmérő rendszer központi része (A) és egy elektromágneses motor, valamint érzékeny erőmérő rovartüihez rögzített izolált és permeabilizált szívizomsejt (B).

A szívizomsejtek és vázizomrostok kontraktilis paramétereinek vizsgálatakor a preparátumokat Ca^{2+} -mentes relaxáló oldatból aktiváló oldatba helyeztük át. Az aktiváló és relaxáló oldatok összetételét Fabiato és munkatársai által létrehozott szoftver segítségével számítottuk ki.⁶⁸ A relaxáló oldatok pufferként N-bis-(2-hidroxi-2-amil)-2-aminopropán szulfonsavat (BES; 100 mM), KCl-t (37,11 mM), MgCl_2 -t (6,41 mM), ATP-t (6,94 mM), kreatin-foszfátot (15 mM) tartalmaztak (pH 7,2), míg az aktiváló törzsoldat Ca^{2+} -egtazic savat (EGTA) is tartalmazott (7 mM). A törzsoldatok mindegyikéhez proteáz-inhibitorokat is adtunk {Fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF): 0,5 mM, leupeptin: 40 μM és E-64: 10 μM }, melyek a preparátumok kontraktilis filamentumainak degradációját védték ki. Méréseink során a preparátumokat különböző $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú tesztoldatokkal aktiváltuk, melyeket az aktiváló és relaxáló törzsoldatok meghatározott arányú vegyítésével készítettük. A tesztoldatok $[\text{Ca}^{2+}]$ -ját pCa egységekben adtuk meg a $-\lg[\text{Ca}^{2+}]$ képlet alapján. Ennek megfelelően a legnagyobb $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú aktiváló és a legkisebb $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú relaxáló törzsoldat $[\text{Ca}^{2+}]$ -ja pCa 4,75 és pCa 9,0

volt. Ha az izolált és permeabilizált preparátumokat relaxáló oldatból aktiválóba helyeztük át, az izomsejtek izometriás kontraktúrát produkáltak. A maximális Ca^{2+} -aktiválta erő kifejlődésekor a sejtet eredeti hosszúságának 20%-ával átmenetileg megrövidítettük 30 ms időtartamra. Ez az úgynevezett „release – restretch” manőver felszakította a kialakult aktin – miozin kereszthidak jelentős részét, melyet a regisztrátumon a kontraktilis erő hirtelen eltűnése reprezentált. A release – restrech manőver egyrészt megadta a preparátum teljes erejét ($F_{\text{totál}}$), valamint a kontraktilis erő ismételt felépülése fontos információt szolgáltatott az aktin – miozin ciklus sebességi állandójáról (k_{tr}) is. Ezt követően a relaxáló oldatba visszahúzott preparátumokat az originális hosszúságuk 20%-ával megrövidítettük 8 másodperc időtartamra, mialatt a sejtek Ca^{2+} -independens passzív ereje ($F_{\text{passzív}}$) volt regisztrálható. Ez utóbbi a preparátum rigiditásáról adott információt, mely korábbi vizsgálatok alapján jól korrelált a bal kamra diasztolés funkciójával.⁶⁹ Az aktív izometrikus erőt ($F_{\text{aktív}}$) a $F_{\text{totál}}$ és az $F_{\text{passzív}}$ különbségéből számoltuk ki, mely a szisztolés funkciót reprezentálta egy adott szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -n. A pCa 4,75 $[\text{Ca}^{2+}]$ tartalmú tesztoldatok a preparátumok maximális erejét (F_{max}) adják meg az aktin – miozin kereszthidak maximális számú aktivációja miatt. Hasonló elv miatt a pCa 4,75 $[\text{Ca}^{2+}]$ -t (a cTnC-t csaknem teljes mértékben) szaturáló $[\text{Ca}^{2+}]$ -nak is nevezhetjük. Méréseink végén egy tükör segítségével meghatároztuk a sejtek függőleges kiterjedését is. A preparátumok $F_{\text{aktív}}$ és $F_{\text{passzív}}$ paramétereit abszolút egységekben (kN/m^2) is megadtuk, amihez henger alakú geometriát feltételezve a sejtek szélességének és magasságának ismeretében a preparátumok keresztmetszetére normalizáltuk a regisztrált erő értékeket. Kísérleteink során először szaturáló, majd egyre csökkenő $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú aktiváló oldatokban regisztráltuk az összehúzóerők erejét, majd az F_{max} és $F_{\text{aktív}}$ értékeket a $[\text{Ca}^{2+}]$ függvényében ábráztuk. Ekkor a $[\text{Ca}^{2+}]$ – izometriás erő összefüggésre illesztett módosított Hill-egyenlet alapján meghatározhattuk azt a $[\text{Ca}^{2+}]$ -t, ahol a preparátum által produkált erő az F_{max} fele, mely a rendszer Ca^{2+} -érzékenységét reprezentálta. Az $F = F_0 * ([\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}} / ([\text{Ca}_{50}]^{n_{\text{Hill}}} + [\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}})$ egyenlet a kontraktilis funkció jellemzésére szolgáló mechanikai paramétereket tartalmazza; F: adott $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett kialakuló erő; F_0 : maximális Ca^{2+} -telítettség mellett kialakult erő; $[\text{Ca}_{50}]$: a félmáximális erő eléréséhez szükséges $[\text{Ca}^{2+}]$; n_{Hill} : Hill-koefficiens. Utóbbi a kontraktilis filamentumok közti kooperativitás mértékéről nyújt információt.^{70, 71}

A preparátumok mechanikai paraméterein (F_{max} , $F_{\text{aktív}}$, $F_{\text{passzív}}$, n_{Hill} , pCa₅₀) kívül meghatároztuk az izom-összehúzóerők kinetikai jellemzőit is ($t_{1/2\text{akt}}$, t_{relax} , k_{tr}). A release – restretch manővert követő kontraktilis erő ismételt felépülésének exponenciális illesztése megadta az aktin – miozin kereszthidak sebességi állandójaként értelmezhető k_{tr} paramétert.

Az aktivációs időnek ($t_{1/2akt}$) a preparátum aktiváló oldatba helyezésétől a félmaximális erő eléréséig eltelt időt, míg relaxációs időnek (t_{relax}) pedig a relaxáló oldatba helyezéstől az aktív erőn alapvonalra történő csökkenéséig eltelt időt tekintettük (5. ábra).



5. ábra. A Ca^{2+} -kontraktúrák alatt rögzített originális regisztrátumok a szívizomsejt/vázizomrost mechanikai és kinetikai kontraktilis paramétereit ábrázolják a pCa függvényében.

Minden egyes mérési sorozat végén a preparátumok stabilitását szaturáló $[Ca^{2+}]$ -jú aktiváló oldattal teszteltük. Amennyiben az izomsejt F_{max} értéke nem érte el a kiindulási érték 80%-át, a mérés során kapott adatokat nem használtuk fel. A szívizomsejtek kontraktilitását egy LabView (National Instruments, Austin, TX, USA) alapú program (DAQ) segítségével rögzítettük, a mechanikai és kinetikai kontraktilis paramétereket a MyoD programban értékeltük ki. Az adatok grafikus formában történő megjelenítése és a statisztikai analízis GraphPad Prism programban történt. A statisztikai szignifikancia határa $P < 0,05$ volt.

4.2.2. A szív- és vázizom minták MHC izoforma összetételének vizsgálata

A patkányokból származó rekeszizom és bal kamrai szívizomminták MHC összetételének vizsgálata SDS polyakrilamid gél-elektroforézis alkalmazásával történt.⁷² A fagyasztott mintákat homogenizáltuk, majd speciális pufferben 2 percig főztük. Az így előkészített homogenizátumokból hígítással 0,25 mg/ml végkoncentrációjú mintákat készítettük, majd azokat egy felső és alsó gélből álló rendszerre vittük fel (3 μ g/well). A felső gél 30% glicerolt, 4% akrilamid-bis-t, 70 mM Tris-t, 4 mM EDTA-t és 0,4% SDS-t tartalmazott, míg az alsó,

szeparáló gél összetétele a következő volt: 30% glicerol, 6% akrilamid-bis, 0,2 mM Tris, 4 mM EDTA és 0,4% SDS. A gélek polimerizációját 0,05% tetrametil-etiléndiamin és 0,1% ammónium-perszulfát hozzáadásával biztosítottuk. Az elektroforézishez alsó és felső futtató puffert használtunk. A felső puffer 0,1 mM Tris-t, 150 mM glicint és 0,1% SDS-t tartalmazott, míg az alsó 50 mM Tris-t, 75 mM glicint és 0,05% SDS-t. A futtatás 70 V konstans feszültség mellett történt 24 óráig 4 °C-on. A géleket végül Coomassie Blue festékkel festettük, a fehérjéket a molekulaméretük alapján azonosítottuk.

5. Eredmények

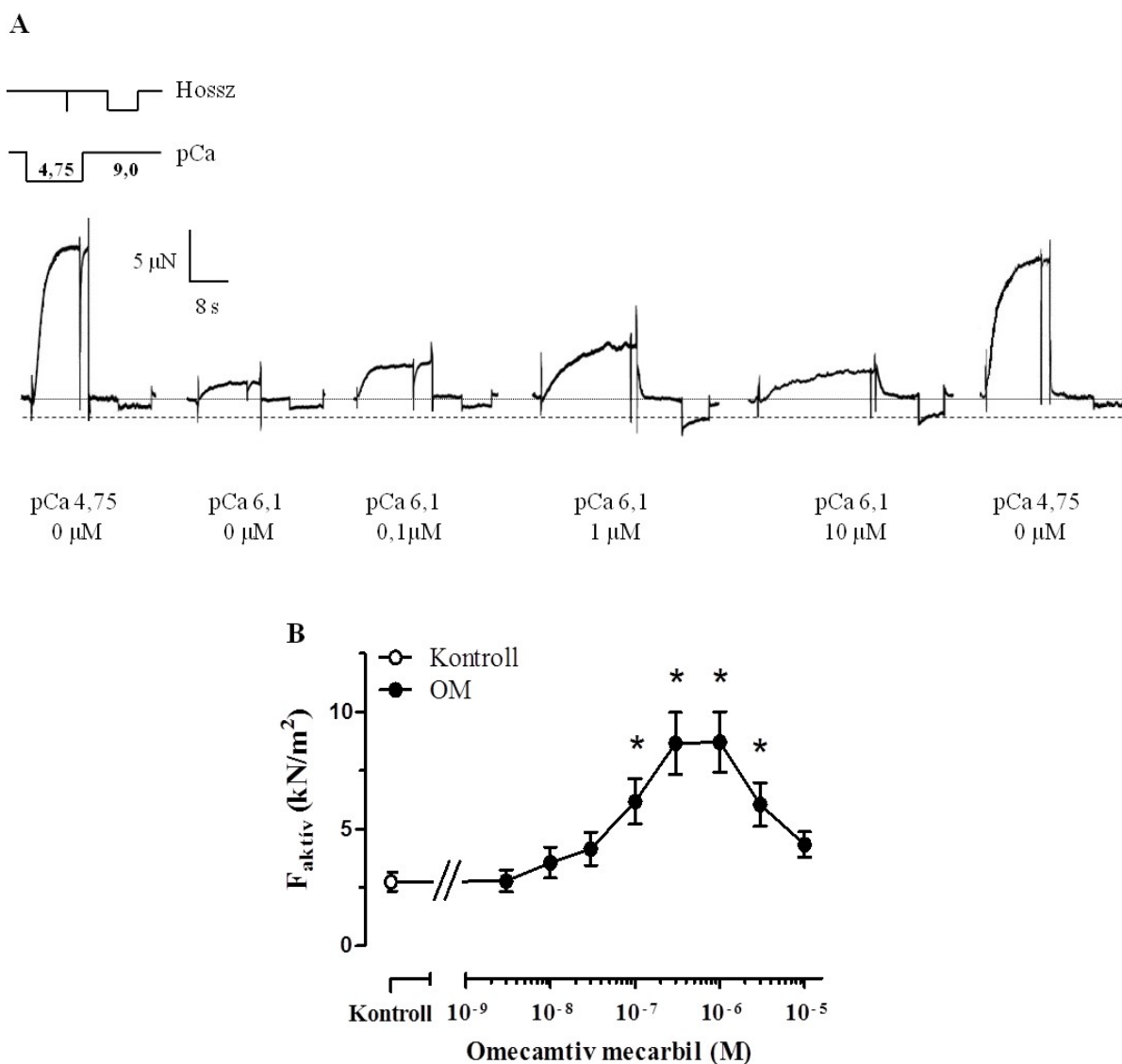
5.1. Az OM pozitív inotróp hatásának farmakológiai jellemzése

Az OM izolált szívizomsejtekre gyakorolt hatásait a kontraktilis funkció mechanikai és kinetikai jellegzetességein keresztül értelmeztük.

5.1.1. Az OM izolált patkány szívizomsejtek mechanikai paramétereire gyakorolt hatása

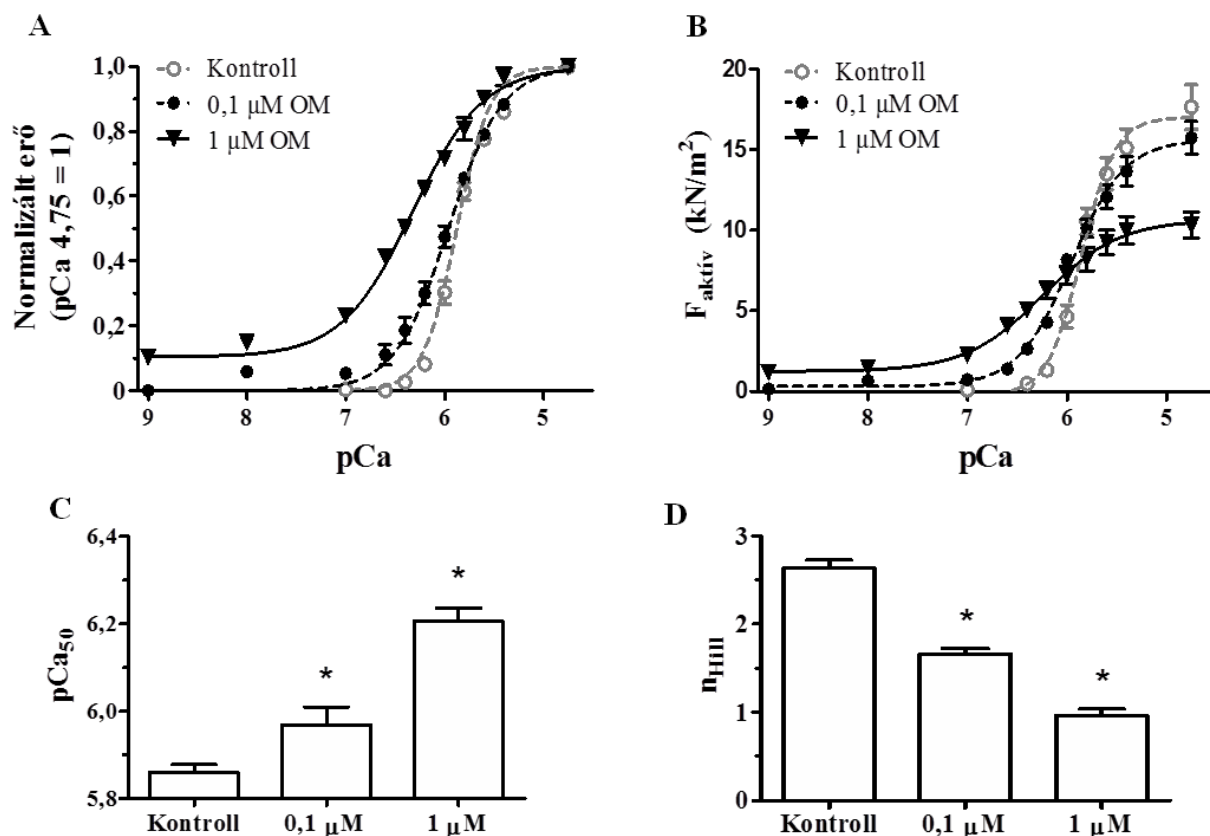
Első lépésben az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatását demonstráltuk Wistar-patkányok bal kamrai szívizomsejtjein ($n = 8$ preparátum). Az izolált és permeabilizált szívizomsejteket méréseink elején OM-t nem tartalmazó tesztoldatokkal kezeltük annak céljából, hogy meghatározzuk a kontroll F_{\max} értéket (pCa 4,75), illetve rögzíthessük egy szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -n (pCa 6,1) is a kezeletlen kontroll csoportra jellemző $F_{\text{aktív}}$ szintet. A szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t úgy választottuk meg, hogy a kialakuló kontraktilis erő az F_{\max} 10-15%-a legyen. Ezt követően ezen a szubmaximális pCa értéken növekvő OM koncentrációjú tesztoldatokkal kezeltük a szívizomsejteket (3 nM – 10 μM) és megmértük a preparátumok $F_{\text{aktív}}$ és $F_{\text{passzív}}$ értékeit. A protokoll végén a szívizomsejtek életképességét OM nélküli, szaturáló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jú tesztoldatokkal ellenőriztük. Egy individuális szívizomsejten végzett méréseinkből származó originális regisztrátumok (6. ábra/A) meggyőző módon szemléltették az OM kontraktilis erőre gyakorolt hatásait. A szer az alkalmazott koncentráció függvényében állandó $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett fokozta a preparátumkontraktilis erejét, tehát Ca^{2+} -érzékenyítő hatást fejtett ki. A maximális Ca^{2+} -érzékenyítés 0,3 μM – 1 μM OM koncentrációban alakult ki, míg ennél magasabb koncentrációban az $F_{\text{aktív}}$ körülbelül a kiindulási (szermentes kontroll) értékkel összemérhető szintre csökkent. Az individuális mérésekből származó adatok átlagolásából származó koncentráció – $F_{\text{aktív}}$ összefüggés ennek megfelelően harang alakúnak bizonyult (6. ábra/B.). Az OM a 0,1 μM – 3 μM közötti koncentráció tartományban fokozta szignifikánsan a szívizomsejtek kontraktilitását, pozitív inotróp hatása viszont elenyészőnek bizonyult 10 μM -os koncentrációban. A haranggörbéként illusztrálható koncentráció – hatás összefüggés maximuma a 0,3 μM – 1 μM közötti plató szakasz kialakulása mellett volt értelmezhető ($F_{\text{aktív}}$ 0,3 μM OM jelenlétében $8,66 \pm 1,32 \text{ kN/m}^2$, 1 μM esetében pedig $8,71 \pm 1,29 \text{ kN/m}^2$ volt, míg OM hiányában $2,74 \pm 0,40 \text{ kN/m}^2$ értéket vett fel, $P < 0,001$). Az OM Ca^{2+} -érzékenyítő képességének számszerűsítése a koncentráció – hatás összefüggés farmakológiai félértéke (EC_{50}), valamint a ΔpCa_{50} révén volt lehetséges. Az előbbi paraméter meghatározását ugyanakkor nehezítette az OM kontraktilis erőre gyakorolt harang alakú hatása. Amennyiben a szerkoncentráció – $F_{\text{aktív}}$ összefüggés 3 nM – 1 μM OM koncentrációk közé eső, platóval

rendelkező részét egy szigmoidális egyenlet segítségével megillesztettük, az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatásához EC_{50} -ként $0,08 \pm 0,01 \mu\text{M}$ értéket tudunk rendelni.



6. ábra. Patkány bal kamrai izolált szívizomsejten mért reprezentatív originális erő regisztrátumok demonstrálják az OM $F_{\text{aktív}}$ -ra gyakorolt hatásait. A preparátumokat adott OM koncentrációjú relaxáló oldatban inkubáltuk 5 percig, majd azonos OM koncentrációjú aktiváló oldatba (pCa 6,1) helyeztük őket. A relaxáló és aktiváló oldatok közötti csere rövid, függőleges artefaktumok formájában látható. A regisztrátumok alatt feltüntettük az adott $[\text{Ca}^{2+}]$ -t, illetve OM koncentrációt (A). Az individuális mérések átlagolásából kapott $F_{\text{aktív}}$ (B) változásokat a szer koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. Eredményeink 8 individuális szívizomsejten végzett mérések átlagolásából származnak (átlag \pm SEM), a statisztikailag szignifikáns különbségeket a szermentes kontrollhoz viszonyítva csillagokkal jelöltük. (* $P < 0,05$ kétmintás Dunnett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

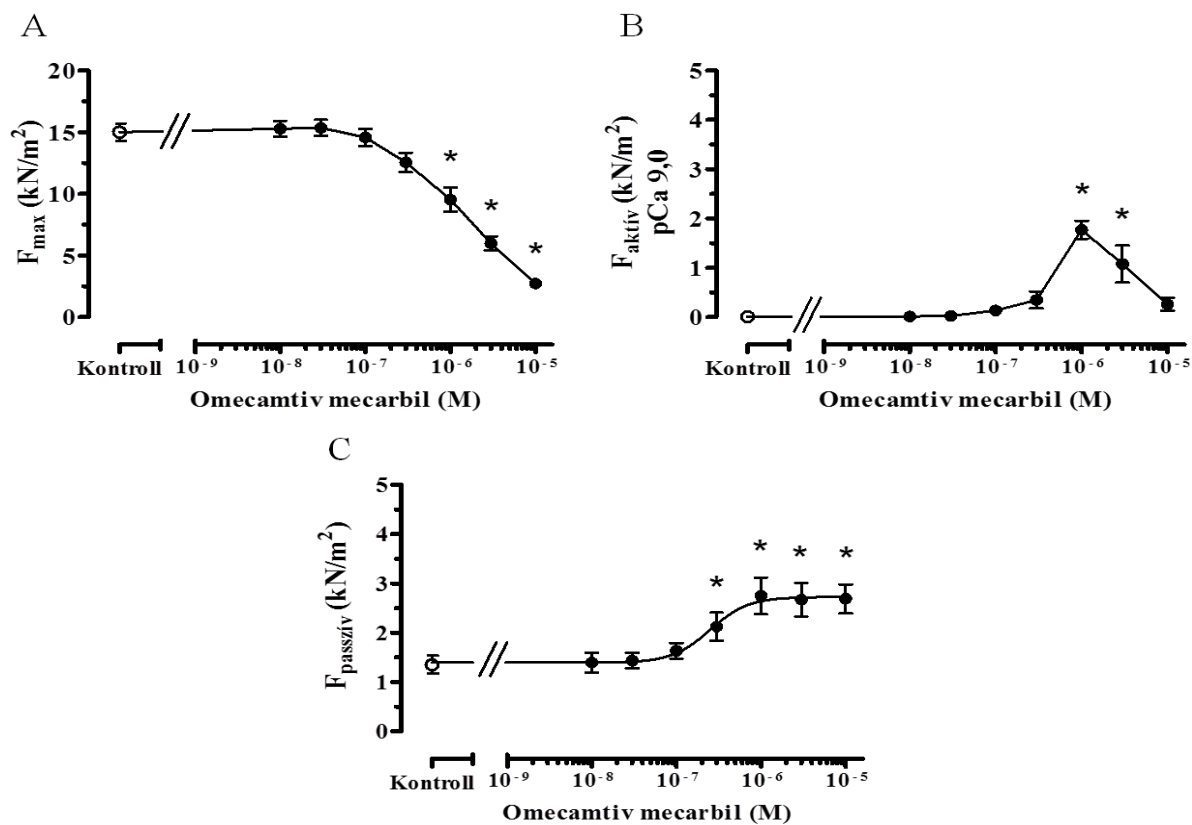
Az OM izolált és permeabilizált szívizomsejtekre gyakorolt Ca^{2+} -érzékenyítő hatását a $[\text{Ca}^{2+}]$ – kontraktilis erő összefüggés alapján tanulmányoztuk fix OM koncentrációk alkalmazása mellett ($n = 8$ individuális szívizomsejt). Ha a preparátumot csökkenő $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú tesztoldatokkal kezeltük OM nélkül, majd $0,1 \mu\text{M}$ és $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében, meghatározhattuk azt a $[\text{Ca}^{2+}]$ -t, ahol a szívizomsejt által produkált erő az F_{max} fele. Ez a rendszer Ca^{2+} -érzékenységét, illetve annak változását reprezentálta (ΔpCa_{50}). Amennyiben az egyes $F_{\text{aktív}}$ értékeket az adott mérési sorozat elején regisztrált F_{max} értékhez viszonyítottuk, megkaptuk az adott szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -hoz tartozó normalizált erő értékeket. A normalizált pCa – erő összefüggésen jól látható, hogy $0,1$ és $1 \mu\text{M}$ OM szignifikáns mértékben fokozta a szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységét, amelyet a görbe balra tolódása reprezentált. $1 \mu\text{M}$ -os szer koncentráció mellett a görbe alsó részének (pCa $7,0 - 9,0$) felfelé tolódása is látható, amely diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ szinteken bekövetkező Ca^{2+} -érzékenyítést sugall (7. ábra/A). Ha abszolút egységekben ábrázoltuk az izometriás erő értékeket, akkor az is látható, hogy magas $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú (pCa $4,75 - 5,6$) tesztoldatokban az OM csökkentette a preparátumok F_{max} értékét (7. ábra/B). A fokozott Ca^{2+} -érzékenységet az összefüggés farmakológiai félértékét reprezentáló pCa_{50} értékek növekedése jelezte (pCa_{50} OM nélkül: $5,86 \pm 0,02$ értéket vett fel, míg az $5,97 \pm 0,02$ és $6,20 \pm 0,03$ volt a $0,1 \mu\text{M}$ és $1 \mu\text{M}$ OM koncentrációjú oldatokban, $P < 0,001$; 7. ábra/C). Az OM csökkentette a kontraktilis fehérjerendszer kooperativitást jellemző n_{Hill} értékét (az n_{Hill} OM nélkül: $2,64 \pm 0,09$ volt, míg $0,1 \mu\text{M}$ és $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében $1,66 \pm 0,06$ és $0,97 \pm 0,07$ értékeket vett fel; $P < 0,001$; 7. ábra/D).



7. ábra. Az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatásának számszerűsítése a pCa – erő összefüggés alapján. A pCa – normalizált erő görbe 0,1 és 1 μM OM hatására balra tolódott (A). Az abszolút egységekben ábrázolt pCa – erő összefüggésből megállapíthatjuk, hogy szaturáló $[\text{Ca}^{2+}]$ -n 1 μM csökkentette a szívizomsejtek erejét, míg pCa 7 és pCa 9 érték között a görbe felfelé tolódott (B). A pCa₅₀ növekedése a Ca^{2+} -érzékenység fokozódását reprezentálta (C). Az OM csökkentette a miofilamentális kooperativitást jellemző n_{Hill} -t (D). Eredményeink 8 individuális preparátumon végzett mérések átlagolásából származnak (átlag \pm SEM). A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki. (* $P < 0,05$ kétmintás Dunnett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

Kísérleteink következő lépésében a pCa – kontraktilis erő összefüggésen tapasztalt F_{max} OM-függő csökkenésére, az $F_{\text{passzív}}$ változásaira, valamint az alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ -n kialakult Ca^{2+} -érzékenyítésre koncentráltunk széles OM koncentráció tartományban (10 nM – 10 μM). Az OM 1 μM és annál nagyobb koncentrációban szignifikánsan csökkentette a preparátumok F_{max} értékét (F_{max} OM nélkül $14,75 \pm 0,70 \text{ kN/m}^2$ és $9,42 \pm 0,97 \text{ kN/m}^2$ volt 1 μM OM jelenlétében, $n = 8$, $P < 0,001$; 8.ábra/A). A kifejezetten alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ -n is megvalósuló Ca^{2+} -érzékenyítést relaxáló oldatban vizsgáltuk, melynek $[\text{Ca}^{2+}]$ -ja pCa 9,0 értékkel közelíthető. A szer a szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -n bemutatott összefüggéshez hasonló módon fokozta a preparátumok erejét pCa 9,0 $[\text{Ca}^{2+}]$ szinteken az 1 μM – 3 μM OM koncentráció tartományban (az $F_{\text{aktív}}$ OM hiányában 0 kN/m^2 volt, míg 1 μM OM jelenlétében $1,77 \pm 0,18$

kN/m^2 erő értékeket mértünk, $n = 6$, $P < 0,01$; 8. ábra/B). Az OM növelte az $F_{\text{passzív}}$ -ot ($F_{\text{passzív}}$ OM nélkül $1,2 \pm 0,12 \text{ kN/m}^2$, míg $0,3 \mu\text{M}$ OM jelenlétében $2,29 \pm 0,31 \text{ kN/m}^2$ volt, $n = 8$; $P < 0,001$), mely hatás farmakológiai félértéke $0,30 \pm 0,1 \mu\text{M}$ -nak adódott (8. ábra/C).

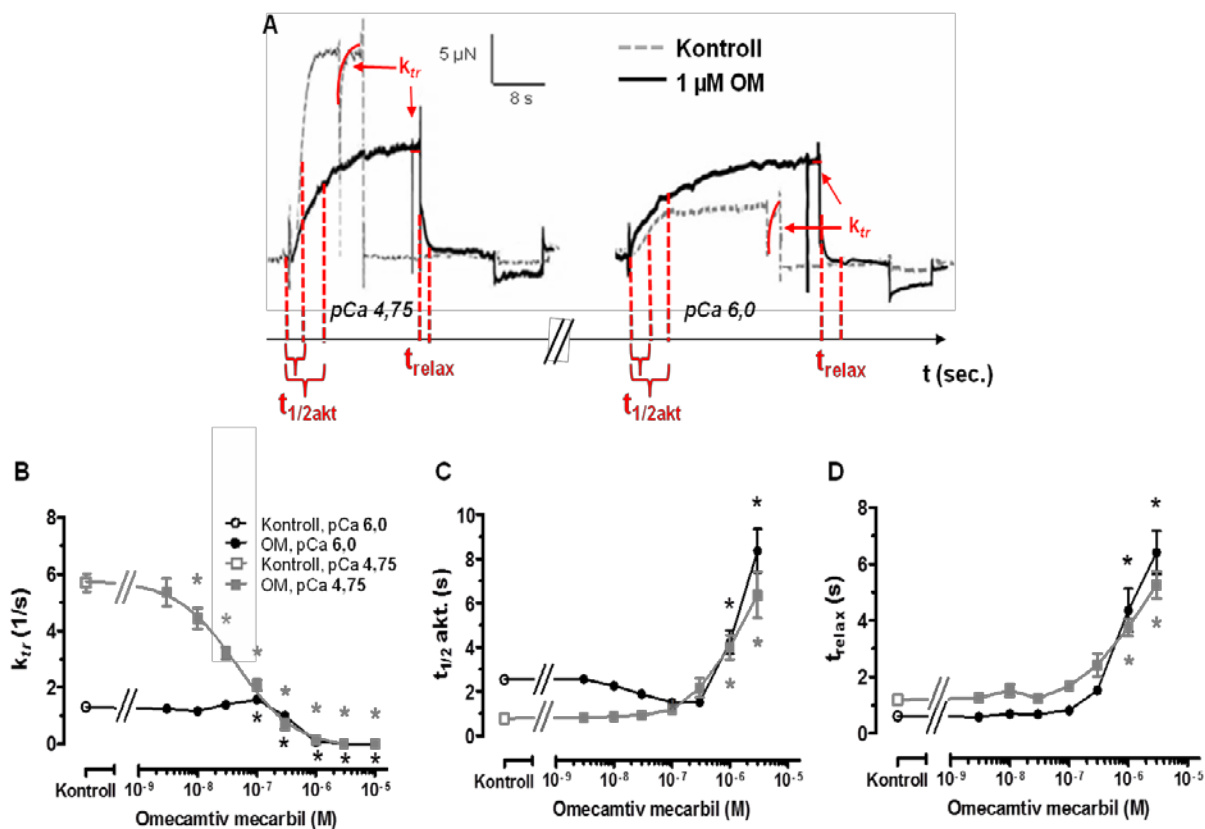


8. ábra. Az OM koncentráció-függő módon csökkentette a preparátumok F_{max} értékeit (A), valamint kifejezetten alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ -n (pCa 9,0) is Ca^{2+} -érzékenyítő hatásúnak bizonyult (B). A szer növelte a szívizomsejtek $F_{\text{passzív}}$ -ját (C). Eredményeink 6, illetve 8 individuális preparátumon végzett mérések átlagolásából származnak (átlag \pm SEM). A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillaggal emeltük ki. (* $P < 0,05$ kétmintás Dunnett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

5.1.2. Az OM hatása a szívizomsejtek kinetikai paramétereire

Az OM izolált szívizomsejtek kinetikájára (k_{tr} , $t_{1/2akt}$, t_{relax}) kifejtett hatásainak vizsgálatára összpontosítva méréseinket szaturáló (pCa 4,75) és a fiziológias szisztolés $[Ca^{2+}]$ -t jobban reprezentáló szubmaximális (pCa 6,0) $[Ca^{2+}]$ szintek mellett végeztük széles OM koncentráció tartományban (3 nM – 10 μ M); (n = 8 – 8 db szívizomsejt). Originális regisztrátumok foglalják 1 μ M OM egy individuális szívizomsejt kontraktilitásának kinetikai paramétereire gyakorolt hatását (9. ábra/A.).

Telítő $[Ca^{2+}]$ -n az OM csökkentette az aktin – miozin kereszthidak sebességi állandóját, vagyis a k_{tr} -t (a kontroll szermentes k_{tr} : $5,70 \pm 0,33$ 1/s volt, míg a 10 nM OM jelenlétében már $4,44 \pm 0,37$ 1/s értékre csökkent, $P < 0,01$). A hatás farmakológiai féllértéke (EC_{50}) $0,05 \pm 0,01$ μ M mellett volt megfigyelhető. Szubmaximális $[Ca^{2+}]$ -n 0,1 μ M OM szignifikáns mértékben fokozta az aktin – miozin kereszthidak sebességét (a kontroll k_{tr} : $1,31 \pm 0,08$ 1/s volt, míg 0,1 μ M OM jelenlétében $1,57 \pm 0,08$ 1/s értéket mértünk; $P < 0,05$), míg 0,3 μ M és magasabb OM koncentrációk alkalmazásakor a k_{tr} ennél a $[Ca^{2+}]$ -nál is csökkent (9. ábra/B). Az OM hatására eleinte gyorsabbnak tűnő Ca^{2+} -kontraktúrákat rögzítettünk, viszont a szerhatás a statisztikai szignifikancia mértéket nem érte el. 1 μ M és magasabb OM koncentrációk alkalmazásakor viszont fokozódott a szívizomsejtek kontrakciós válaszainak kialakulásához szükséges idő (a kontroll $t_{1/2akt}$ pCa 4,75 esetén $0,77 \pm 0,12$ s volt, míg 1 μ M OM jelenlétében $4,02 \pm 0,56$ s értéket kaptunk, $P < 0,001$; a kontroll $t_{1/2akt}$ pCa 6,0 esetén $2,55 \pm 0,19$ s volt, míg az 1 μ M OM jelenlétében $4,23 \pm 0,53$ s értéket vett fel, $P < 0,05$). Hasonlóan változott a relaxációk kinetikája is telítő és szubmaximális $[Ca^{2+}]$ mellett (pCa 4,75 és kontroll körülmények mellett a mért t_{relax} $1,19 \pm 0,10$ s volt, míg 1 μ M OM jelenlétében $3,75 \pm 0,31$ s értéket regisztráltunk; $P < 0,001$, a pCa 6,0 mellett mért kontroll t_{relax} : $0,61 \pm 0,06$ s volt, míg 1 μ M OM jelenlétében $4,36 \pm 0,77$ s adatot rögzítettünk; $P < 0,001$; 9. ábra/C-D). A kontrakciós és relaxációs időt az alacsony erőértékek miatt 1 μ M-os OM koncentráció mellett nem tudtuk meghatározni.

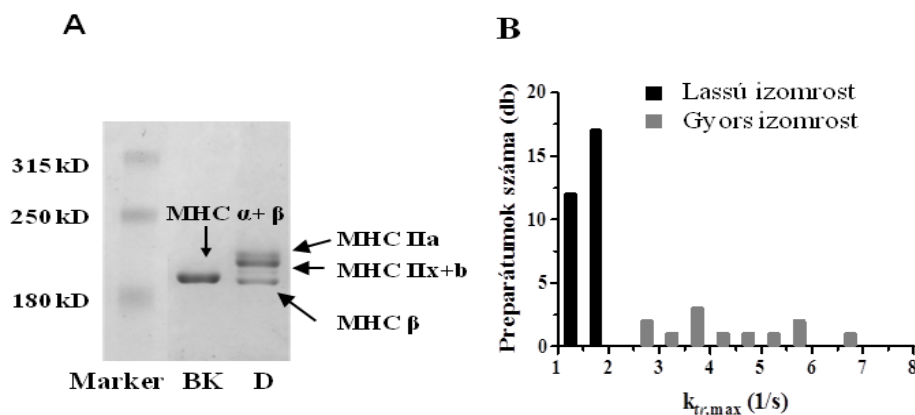


9. ábra. Az OM kinetikai hatása maximális (pCa 4,75) és szubmaximális (pCa 6,0) $[Ca^{2+}]$ mellett. Egy individuális szívizomsejten végzett mérések originális regisztrátuma reprezentálja 1 μ M OM jelenlétében (fekete) és hiányában (szürke szaggatott) a preparátumok aktivációs – relaxációs kinetikájában bekövetkezett változásokat (A). Az OM csökkentette a k_{tr} -t (B), növelte a kontrakció (C) és relaxáció kialakulásához szükséges időt (D). Eredményeink 8 – 8 db szívizomsejt preparátumon végzett mérések átlagolásából származnak (átlag \pm SEM). A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki. (* $P < 0,05$ kétmintás Dunnett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

Izolált szívizomsejteken végzett méréseinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az OM növelte a bal kamrai kardiomiociták Ca^{2+} -érzékenységét, ugyanakkor ezzel párhuzamosan fokozta a szívizomsejtek $F_{passzív}$ -ját. A szer megváltoztatta az aktin – miozin ciklus kinetikáját is, hiszen csökkentette a kereszthidak sebességi állandóját jellemző k_{tr} -t, valamint növelte a kontraktúrák és a relaxációk kifejlődéséhez szükséges időket.

5.2. Az OM izolált vázizomsejtekre gyakorolt hatásai

A továbbiakban az OM-függő változásokat rekeszizom eredetű izolált és permeabilizált vázizomrostokban is tanulmányozni kívántuk. Az OM hatásainak értékelését nehezítette, hogy a vázizomzat különböző MHC összetételű rostokból áll, melyek leegyszerűsítve lassú [MHC I (β)] és gyors (MHC IIa, x, b) típusokra oszthatóak fel. Biokémiai vizsgálatainkban a preparátumok parányi volta miatt nem nyílt lehetőség az izolált és permeabilizált vázizomrostok MHC összetételének közvetlen meghatározására. A rendelkezésre álló – számos izomrostot tartalmazó – rekeszizom minták MHC izoforma összetételét azonban sikerült meghatároznunk, mely a várakozásainknak megfelelően igazolta az MHC összetétel komplexitását (10. ábra/A). Irodalmi adatok birtokában az aktin – miozin ciklus sebességi állandója segítségével szolgálhat a lassú és gyors izomrostok elkülönítésében. Ezért a továbbiakban a preparátumok szaturáló $[Ca^{2+}]$ mellett meghatározott k_{tr} paraméterét használtuk fel a lassú és gyors endogén kinetika differenciálására.⁷³ A két rosttípus közötti elkülönítésre irodalmi adatok tükrében a $k_{tr} = 2,0$ 1/s értéket tekintettük határvonalként (10. ábra/B).

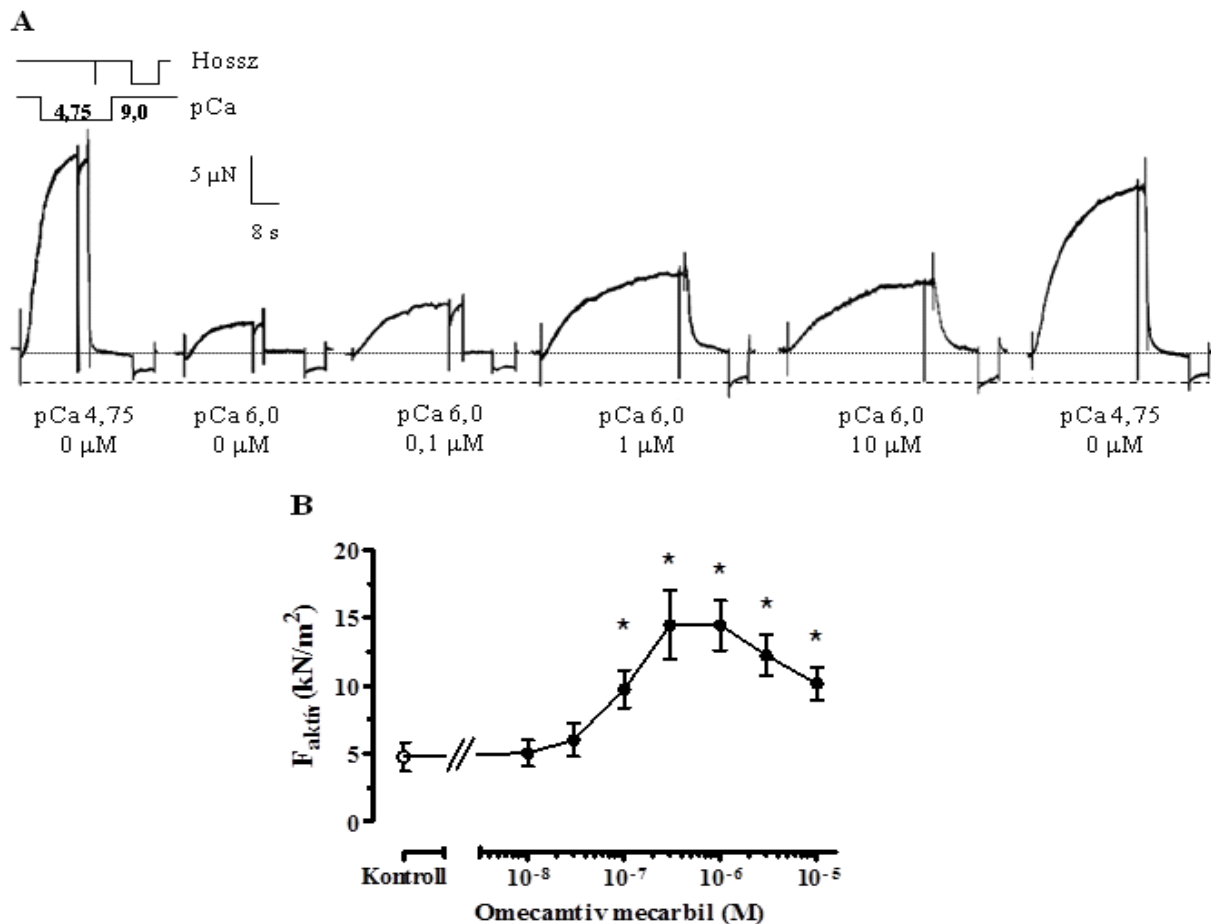


10. ábra. Mechanikai méréseinkhez használt szív (BK)- és vázizom minták (D) MHC izoforma összetételét SDS-PAGE gélelektroforézis és Comassie-Blue festés segítségével határoztuk meg (A). A lassú és gyors endogén kinetikájú vázizomrostok elkülönítésére a szaturáló $[Ca^{2+}]$ mellett mért k_{tr} paramétert használtuk ($k_{tr,max}$) (B).

5.2.1. OM-függő változások izolált lassú endogén kinetikájú vázizomrostok mechanikai paramétereiben

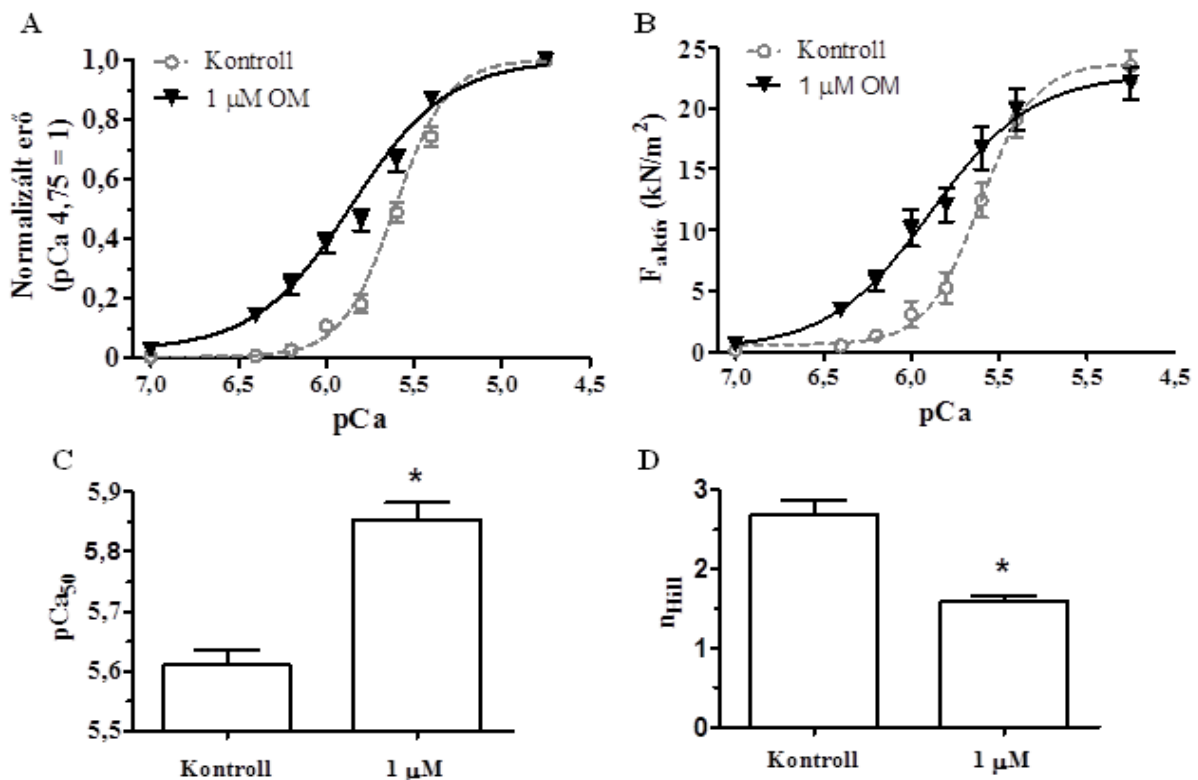
Az OM a lassú típusú vázizomrostok (k_{tr} pCa 4,75 mellett: $1,61 \pm 0,22$ 1/s) kontraktilitására kifejtett hatását a szívizomsejteken végzett méréseinkkel identikus módon határoztuk meg.

Egy kiválasztott vázizomroston nyert originális regisztrátumokon látható, hogy pCa 6,0 koncentrációjú tesztoldatokban az OM emelkedő koncentrációi az izolált szívizomsejteken tapasztaltakhoz hasonlóan fokozták a kontraktilis erőt (11. ábra/A). Az individuális mérések átlagolása után kapott koncentráció – hatás összefüggés illusztrálja az OM-re adott harang alakú kontraktilis választ (n = 14 individuális vázizomrost). 0,1 μM koncentrációtól a szer szignifikáns mértékben fokozta az izolált vázizomrostok $F_{\text{aktív}}$ paraméterét (kontroll $F_{\text{aktív}}$: $4,77 \pm 1,05 \text{ kN/m}^2$ vs. $9,73 \pm 1,4 \text{ kN/m}^2$ 0,1 μM OM jelenlétében, $P < 0,001$), mely hatás maximuma a 0,3 μM – 1 μM közötti OM koncentráció tartományban jött létre. A kontraktilis erő nagyobb OM koncentrációk mellett mérséklődött (11. ábra/B). Ha koncentráció – $F_{\text{aktív}}$ diagramot a plató szakasz végéig (1 μM) egy szigmoid összefüggés segítségével illesztettük, a szer koncentráció-függő hatását $0,16 \pm 0,03 \mu\text{M}$ féltérték segítségével jellemezhettük.



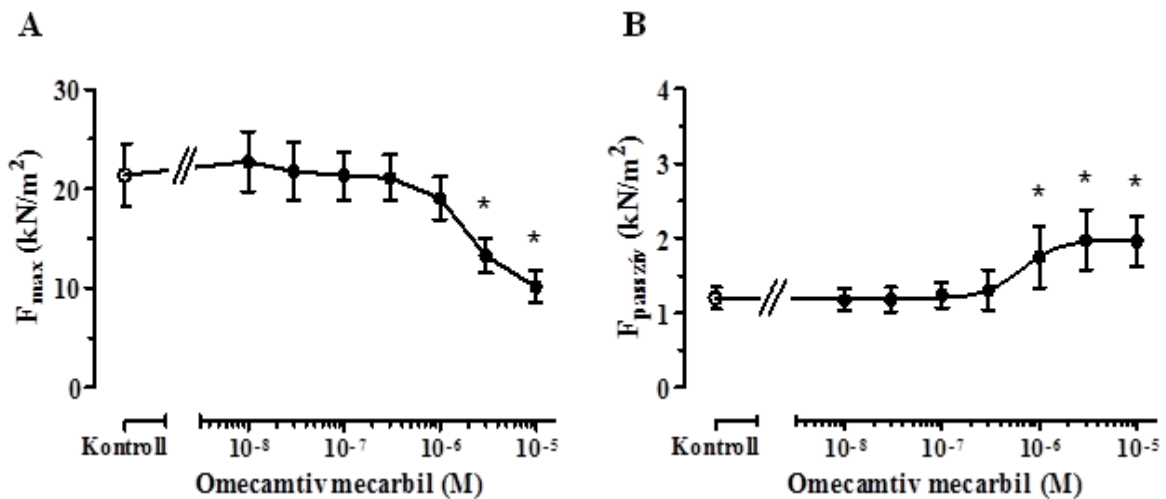
11. ábra. Originális regisztrátumok illusztrálják az OM hatásait egy izolált és permeabilizált vázizomrost kontraktilis paramétereire szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -n (A). Az individuális mérések (n = 14) átlagolásából kapott koncentráció – hatás összefüggés a szer izolált vázizomrostok $F_{\text{aktív}}$ paraméterére gyakorolt harang alakú hatását ábrázolja (B). A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki (* $P < 0,05$ kétmintás Dunett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

Az OM lassú típusú vázizomrostokra (k_{tr} : $1,50 \pm 0,10$ 1/s) gyakorolt Ca^{2+} -érzékenyítő hatását a kontraktilis erő Ca^{2+} -függésének meghatározásával demonstráltuk OM jelenlétében és OM-t nem tartalmazó tesztoldatokban ($n = 9$ vázizomrost). Méréseinkhez a koncentráció – hatás összefüggés ismeretében a maximális kontraktilis választ generáló $1 \mu M$ teszt koncentrációt használtuk. Az egyes mérési sorozatok F_{max} értékére normalizált (12. ábra/A) formában, illetve abszolút (kN/m^2) egységekben (12. ábra/B) is ábrázolt pCa – kontraktilis erő összefüggések balra tolódása, illetve a pCa_{50} növekedése a Ca^{2+} -érzékenyítő hatás jelenlétére utalt (a pCa_{50} OM nélkül $5,61 \pm 0,02$, míg $1 \mu M$ OM-t tartalmazó tesztoldatban $5,85 \pm 0,03$ volt; $P < 0,001$; 12. ábra/C). A szívizomsejtekkel ellentétben $1 \mu M$ OM vázizomrostokon nem csökkentette az F_{max} -ot, illetve kifejezetten alacsony $[Ca^{2+}]$ mellett sem jött létre Ca^{2+} -érzékenyítés. A Ca^{2+} -érzékenység fokozása mellett az OM csökkentette a miofilamentális kooperativitást jellemző n_{Hill} értékét (n_{Hill} OM nélkül $2,68 \pm 0,18$, illetve $1,58 \pm 0,09$ $1 \mu M$ OM jelenlétében; $P < 0,01$, 12. ábra/D).



12. ábra. Az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatásának számszerűsítése a pCa – kontraktilis erő összefüggés alapján izolált lassú endogén kinetikájú vázizomrostokban. $1 \mu M$ OM hatására mind a normalizált (A), mind az abszolút egységekben (B) ábrázolt pCa – kontraktilis erő görbe balra tolódott (A). A pCa_{50} növekedése a Ca^{2+} -érzékenység fokozódását reprezentálta (C). Az OM csökkentette az n_{Hill} -t (D). Eredményeink 9 preparátumon végzett mérések átlagolásából származnak (átlag \pm SEM). A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillaggal emeltük ki. (* $P < 0,05$ párosított Student-féle t -teszt).

Habár 1 μM OM szignifikánsan nem változtatta meg a pCa – kontraktilis erő összefüggés F_{max} értékét, szélesebb koncentráció tartományban (10 nM – 10 μM) is megvizsgáltuk az OM fenti paraméterre feltételezett hatását. Eredményeink szerint 3 μM OM már szignifikánsan csökkentette az izolált lassú típusú vázizomrostok F_{max} értékeit (az F_{max} OM hiányában $21,37 \pm 3,16 \text{ kN/m}^2$ volt, míg 3 μM OM jelenlétében $13,25 \pm 1,78 \text{ kN/m}^2$ értékre csökkent, $n = 6$, $P < 0,001$; 13. ábra/A). Az OM szívizomsejtekhez hasonlóan nemcsak az izomrostok Ca^{2+} -függő aktív, hanem a Ca^{2+} -független passzív erejét is megváltoztatta. 1 μM OM szignifikánsan növelte az izolált vázizomrostok $F_{\text{passzív}}$ -ját (az $F_{\text{passzív}}$ OM nélkül $1,2 \pm 0,15 \text{ kN/m}^2$ volt, míg 1 μM OM jelenlétében $1,75 \pm 0,42 \text{ kN/m}^2$ értéket vett fel, $n = 6$, $P < 0,05$), mely hatás EC_{50} értéke $0,79 \pm 0,16 \mu\text{M}$ volt (13. ábra/B).

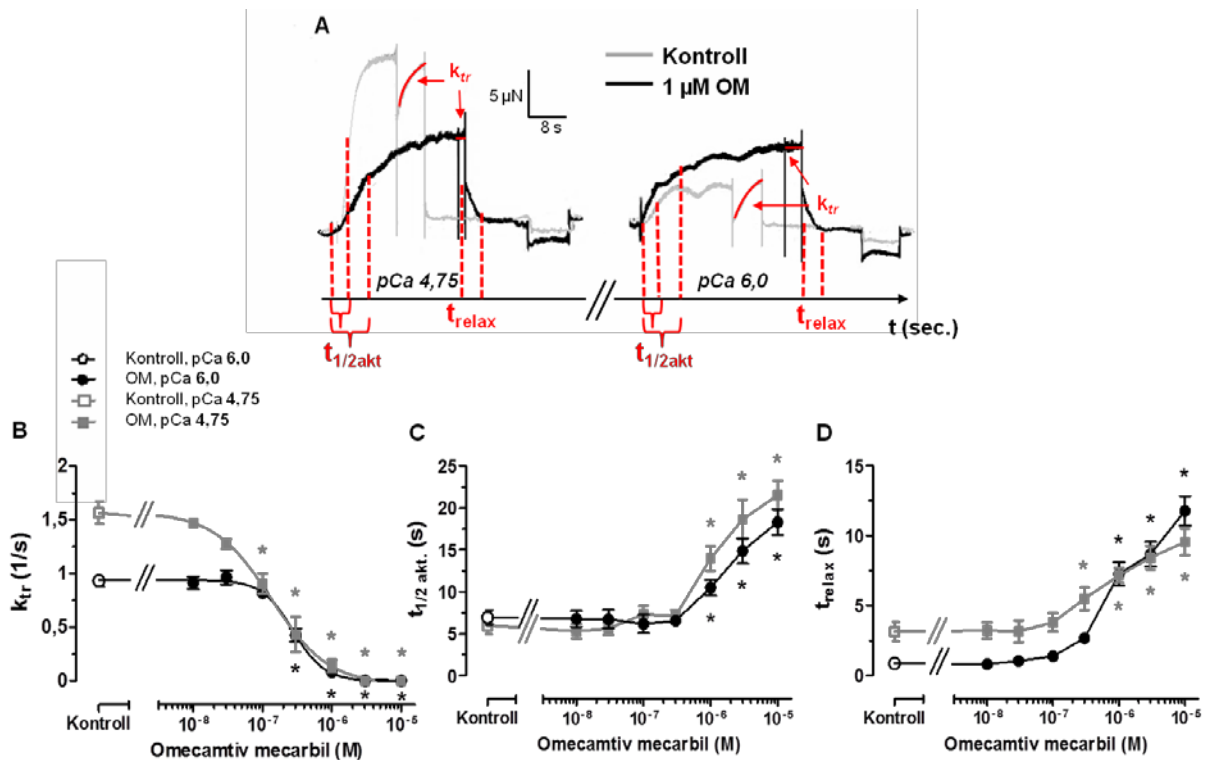


13. ábra. Az OM nagy koncentrációban csökkentette az izolált lassú endogén kinetikájú (k_{tr} : $1,57 \pm 0,11 \text{ 1/s}$) vázizomrostok F_{max} értékeit (A), valamint növelte a preparátumok $F_{\text{passzív}}$ -ját (B). Eredményeink 6 db preparátumon végzett mérések átlagolásából származnak (átlag \pm SEM). A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki. (* $P < 0,05$ kétmintás Dunett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

5.2.2. Az OM hatása a lassú típusú vázizomrostok kinetikai paramétereire

Az OM a szívizomsejtekhez hasonló módon befolyásolta a lassú endogén kinetikával rendelkező vázizomrostok (k_{tr} szaturáló $[\text{Ca}^{2+}]$ -n: $1,57 \pm 0,11 \text{ 1/s}$) kinetikai paramétereit. Méréseinket szaturáló (pCa 4,75; $n = 6$), valamint a fiziológiás körülményeket jobban reprezentáló szubmaximális (pCa 6,0) $[\text{Ca}^{2+}]$ -n is elvégeztük ($n = 11 - 14$ vázizomrost). A szívizomsejtekhez hasonlóan originális regisztrátumok foglalják 1 μM OM egy individuális szívizomsejt kontraktilitásának kinetikai paramétereire gyakorolt hatását (14. ábra/A.).

Az OM csökkentette a k_{tr} paramétert maximális és szubmaximális $[Ca^{2+}]$ -n. Ez a hatás kifejezettebb volt szaturáló $[Ca^{2+}]$ -jú tesztoldatokban (pCa 4,75 mellett az EC_{50} : $0,13 \pm 0,09 \mu M$ volt, míg pCa 6,0 mellett $0,29 \pm 0,04 \mu M$ -nak adódott; 14. ábra/B). Az aktin – miozin ciklus sebességének csökkenésével összefüggésben az OM lassította a vázizomsejtek kontrakciós válaszainak és relaxációinak sebességét pCa 4,75 és pCa 6,0 $[Ca^{2+}]$ -jú tesztoldatokban. Mindezt a kontrakciós (a $t_{1/2akt}$ szermentes kontroll körülmények között és pCa 4,75 mellett $5,99 \pm 0,98$ s volt, míg az $1 \mu M$ OM jelenlétében $13,98 \pm 1,46$ s értéket vett fel, $P < 0,001$; a $t_{1/2akt}$ szermentes kontroll körülmények között és pCa 6,0 mellett $6,96 \pm 0,86$ s volt, míg $1 \mu M$ OM jelenlétében $10,50 \pm 0,93$ s, értéket vett fel, $P < 0,001$) és relaxációs idő növekedése is tükrözte (a szermentes kontroll t_{relax} pCa 4,75 mellett $3,15 \pm 0,68$ s volt, míg az $0,3 \mu M$ OM jelenlétében $5,49 \pm 0,81$ s-nak adódott, $P < 0,05$; valamint a szermentes kontroll t_{relax} pCa 6,0 mellett $0,86 \pm 0,09$ s volt, míg $1 \mu M$ OM jelenlétében $7,26 \pm 0,83$ s értéket vett fel, $P < 0,01$; 14. ábra/C-D).

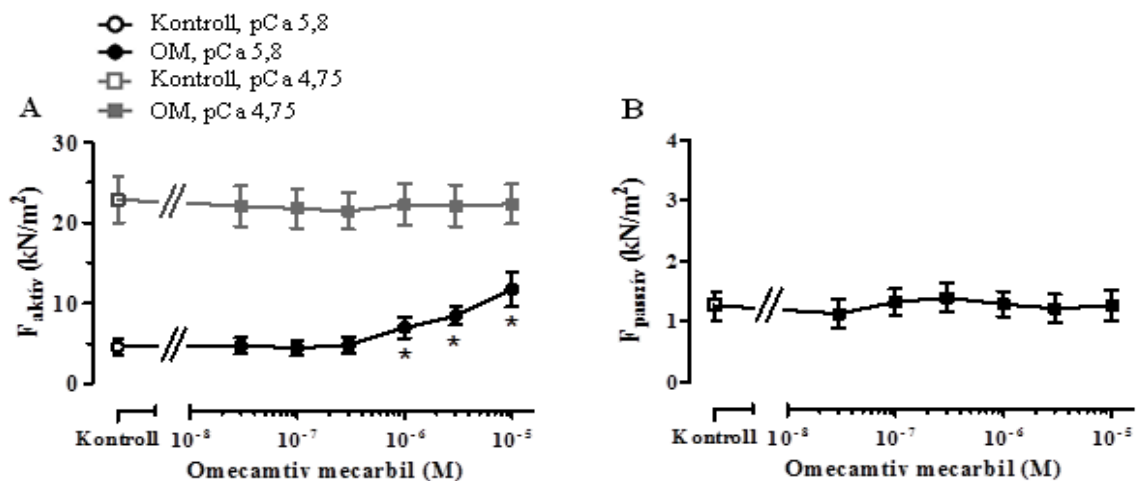


14. ábra. Az OM a szívizomsejtekéhez hasonló módon változtatta meg a lassú típusú vázizomrostok kontrakciójának kinetikáját szaturáló (pCa 4,75) és szubmaximális (pCa 6,0) $[Ca^{2+}]$ mellett (A). A szer csökkentette az aktin – miozin hidak sebességét jelképező k_{tr} -t (B), valamint növelte a kontrakció (C) és relaxáció idejét (D). pCa 4,75 $[Ca^{2+}]$ -n végzett méréseink során 6 db, míg pCa 6,0 $[Ca^{2+}]$ mellett 11 – 14 db izolált és permeabilizált lassú típusú izomrostot használtunk fel. A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki. (* $P < 0,05$ kétmintás Dunett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

5.2.3. Az OM hatása a gyors kinetikájú vázizomrostok mechanikai és kinetikai paramétereire

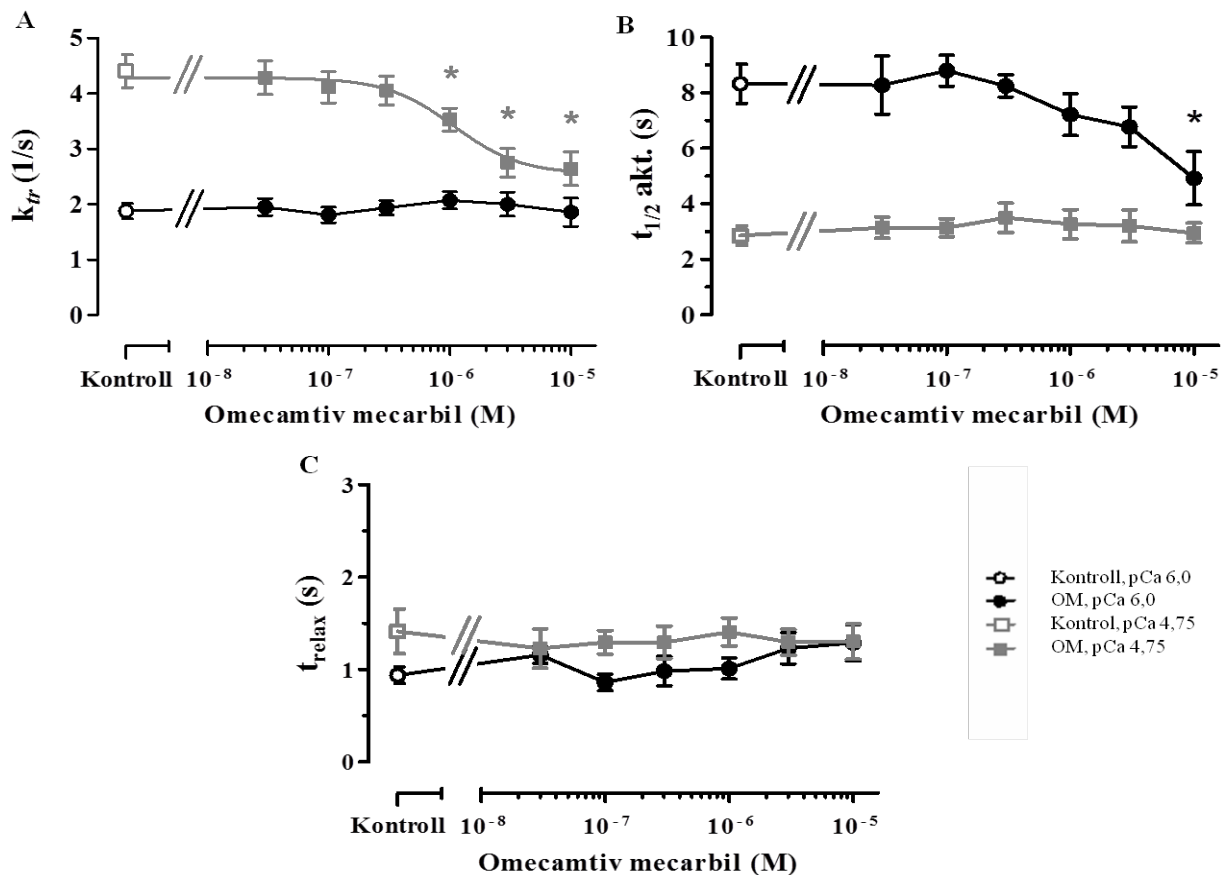
Vázizomrostokkal kapcsolatos méréseink végén vizsgáltuk, hogy a szer miként befolyásolja a rekeszizom eredetű gyors típusú (k_{tr} : $4,60 \pm 0,31$ 1/s) vázizomrostok kontraktilitásának mechanikai és kinetikai paramétereit. Méréseinket az eddigi kísérleteinkhez hasonlóan telítő (pCa 4,75), valamint szubmaximális $[Ca^{2+}]$ (pCa 5,8) mellett végeztük ($n = 6$).

Az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatása révén szubmaximális $[Ca^{2+}]$ -n $1 \mu M$ és annál magasabb koncentrációkban fokozta a gyors endogén kinetikával rendelkező vázizomrostok $F_{aktív}$ -ját (a szermentes kontroll $F_{aktív}$ $4,59 \pm 0,99$ kN/m² volt, míg $1 \mu M$ OM jelenlétében ugyanerre az adatra $6,97 \pm 1,3$ kN/m² érték adódott, $P < 0,05$), ugyanakkor az izolált szívizomsejtekben és lassú típusú vázizomrostokban látottakkal ellentétben harang-alakú koncentráció-függés nem volt megfigyelhető. Mivel az $F_{aktív}$ a legnagyobb – $10 \mu M$ -os – OM koncentrációig lineáris növekedést mutatott, a koncentráció – hatás összefüggés EC_{50} -értékét nem tudtuk meghatározni. Az OM-függő kontraktilis válasz gyors endogén kinetikájú vázizomrostokban kisebb mértékűnek bizonyult a szívizomsejtekhez és a lassú kinetikájú vázizomrostokhoz képest, valamint a szer hatása elsősorban csak magasabb koncentráció-tartományban alakult ki. Telítő $[Ca^{2+}]$ -n az OM nem befolyásolta a gyors kinetikát mutató preparátumok kontraktilitását (15. ábra/A). Az OM nem fokozta a gyors kinetikát mutató vázizomrostok Ca^{2+} -független $F_{passzív}$ -ját sem (15. ábra/B).



15. ábra. Az OM mechanikai és kinetikai hatásai gyors típusú vázizomrostokon pCa 4,75 és pCa 6,0 $[Ca^{2+}]$ mellett. A szer fokozta az izomrostok kontraktilitását (A) az $F_{passzív}$ növelése nélkül (B). Méréseinket 6 – 6 db izolált és permeabilizált gyors típusú izomroston végeztük. A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki (* $P < 0,05$ kétmintás Dunett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

Az OM gyors típusú vázizomrostok kontraktilitásának mechanikai paramétereire kifejtett hatása mellett vizsgáltuk az aktivációs – relaxációs ciklus kinetikájában bekövetkezett OM-függő változásokat is. Az OM szaturáló $[Ca^{2+}]$ -n a szívizomsejteken és a lassú kinetikájú vázizomrostokon kifejtett hatásokhoz hasonlóan, viszont kisebb affinitással (magasabb koncentráció-tartományban) csökkentette a k_{tr} -t (EC_{50} : $1,23 \pm 0,28 \mu M$). Szubmaximális $[Ca^{2+}]$ -n viszont a szer nem változtatta aktin – miozin ciklus sebességi állandóját (16. ábra/A). Az OM minimális mértékben befolyásolta a gyors kinetikájú vázizomrost preparátumok kontrakciós idejét, hatása csak pCa 5,8 $[Ca^{2+}]$ -jú tesztdatokban volt kimutatható, ahol csak a legnagyobb alkalmazott – $10 \mu M$ -os – koncentrációban növelte a $t_{1/2akt}$ -t (a kontroll szermentes $8,33 \pm 0,70$ s volt, és az $10 \mu M$ OM jelenlétében $4,92 \pm 0,96$ s értéket vett fel, $P < 0,01$), míg a relaxáció ideje nem változott (16. ábra/B-C).



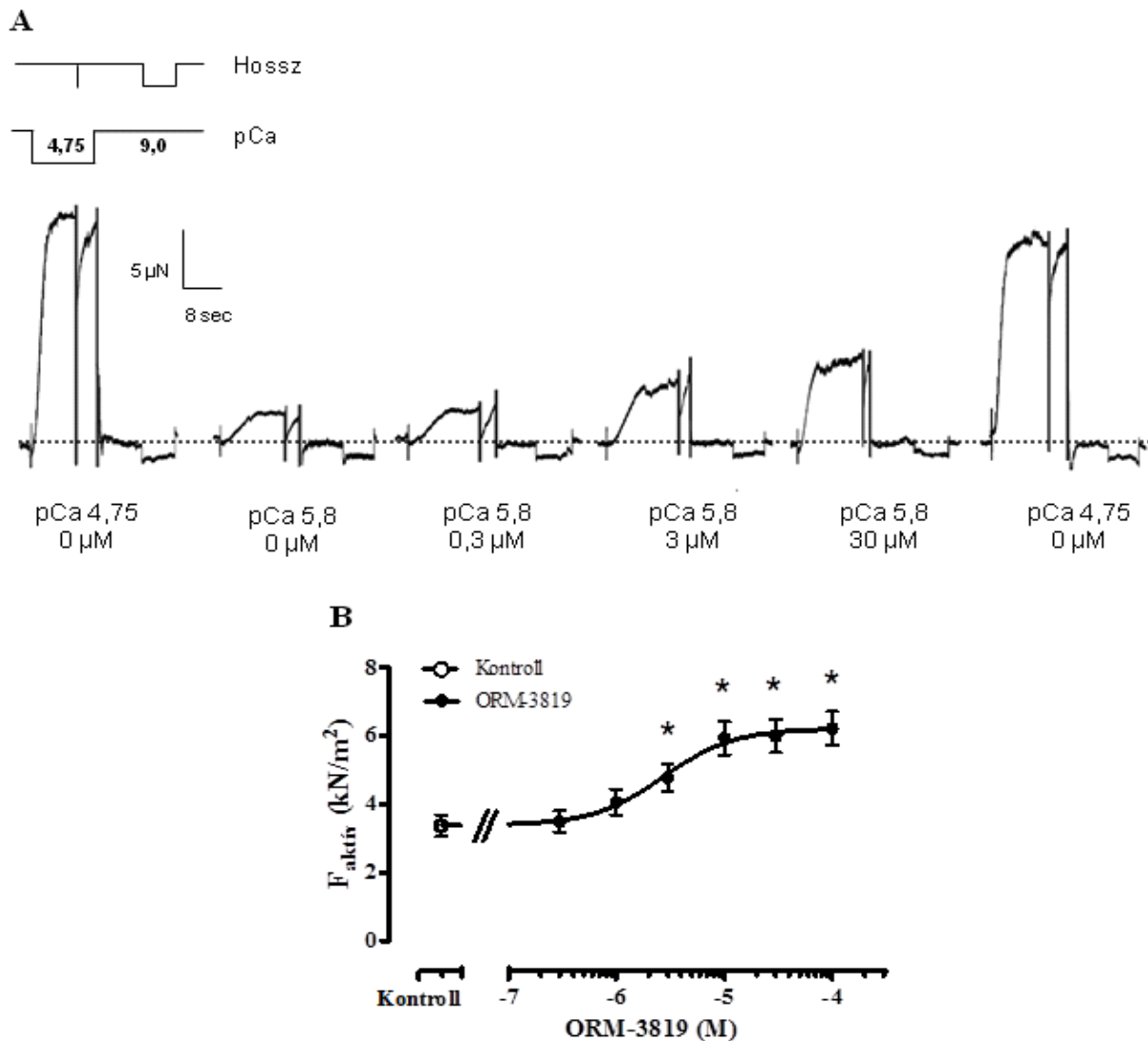
16. ábra. Az OM kinetikai hatásai gyors endogén kinetikájú vázizomrostokban pCa 4,75 és pCa 5,8 $[Ca^{2+}]$ -jú tesztdatokban. A szer telítő $[Ca^{2+}]$ mellett csökkentette, míg szubmaximális $[Ca^{2+}]$ -n nem változtatta meg a k_{tr} -t (A). A kontrakció ideje pCa 5,8 $[Ca^{2+}]$ -jú tesztdatokban maximális OM koncentrációban csökkent, míg pCa 4,75 $[Ca^{2+}]$ mellett nem változott. Az OM nem változtatta meg a relaxáció idejét egyik $[Ca^{2+}]$ -n sem. Eredményeink 6 – 6 db individuális preparátumon végzett mérések átlagolásából származnak (átlag \pm SEM). A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki.

Rekeszizom eredetű izolált vázizomrostokon végzett méréseinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy lassú endogén kinetikájú preparátumokon az OM nagyrészt a szívizomsejtekre jellemző farmakológiai hatásokkal rendelkezett, növelte a vázizomrostok Ca^{2+} -érzékenységét, ezzel párhuzamosan fokozta a preparátumok $F_{\text{passzív}}$ -ját. A szer csökkentette a k_{r} -t, valamint növelte a kontrakció és a relaxáció kifejlődéséhez szükséges időt. Gyors endogén kinetikájú vázizomrostokban az OM mechanikai és kinetikai hatásai a lassú típusú preparátumokban látottaknál mérsékeltebbnek bizonyultak, és elsősorban magasabb OM koncentrációk mellett alakultak ki.

5.3. Az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő hatása tengerimalac permeabilizált szívizomsejtjein

Az OM farmakológiai hatásainak demonstrálása után vizsgálataink középpontjába az új levosimendan-származék, az ORM-3819 és annak feltételezett pozitív inotróp hatásai kerültek. A feltételezett Ca^{2+} -érzékenyítő hatást az OM kapcsán elvégzett kísérletsorozattal megegyező stratégiát követve vizsgáltuk.

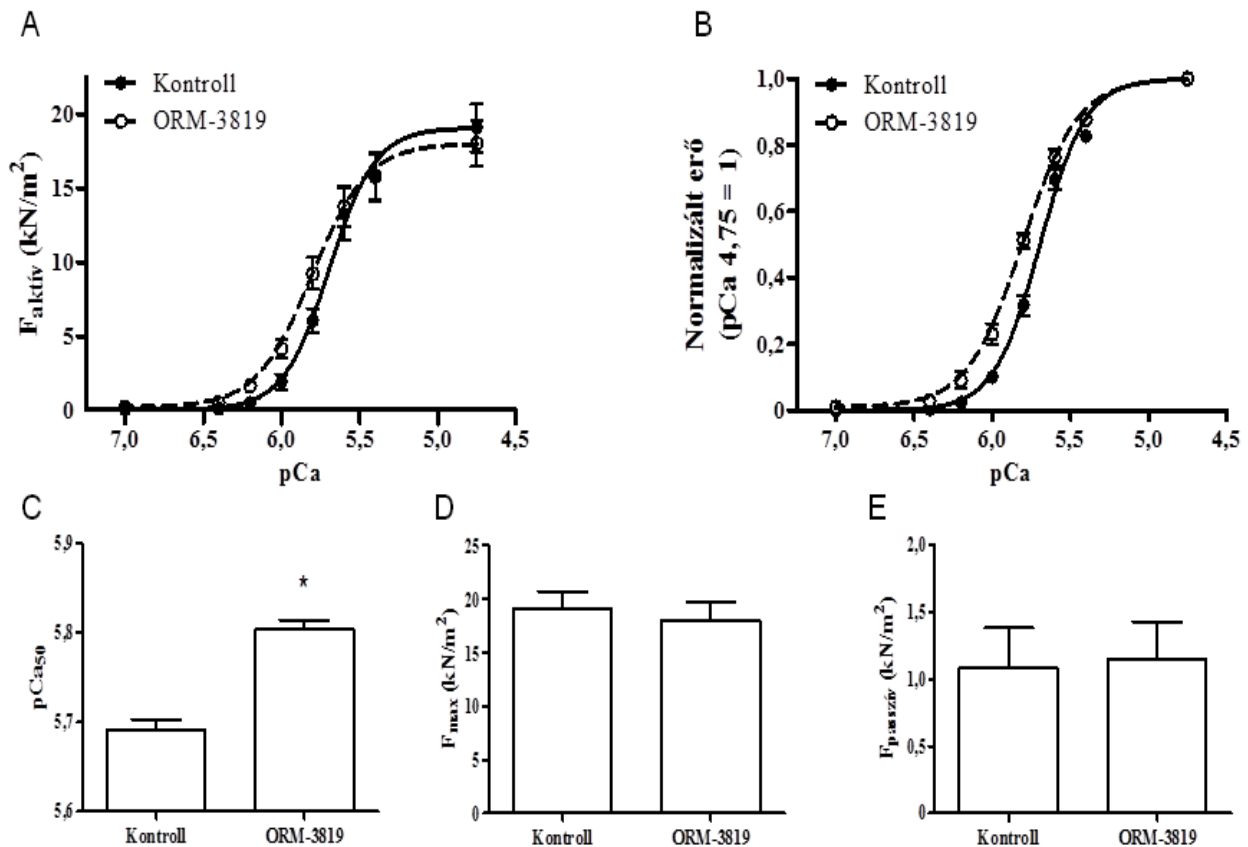
Tengerimalac eredetű izolált és permeabilizált bal kamrai szívizomsejteket szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett (pCa 5,8) növekvő ORM-3819 koncentrációjú tesztoldatokkal kezeltük (0,1 μM – 10 μM), mialatt regisztráltuk a preparátumok $F_{\text{aktív}}$ -ját (n = 10 preparátum). Egy kiválasztott szívizomsejten nyert originális regisztrátumokon látható, hogy pCa 5,8 koncentrációjú tesztoldatokban az ORM-3819 emelkedő koncentrációi fokozták a szívizomsejtek kontraktilitását (17. ábra/A). Az individuális mérések átlagolása után kapott koncentráció – hatás összefüggés illusztrálja, hogy a szer 3 μM és nagyobb koncentrációkban szignifikánsan fokozta a $F_{\text{aktív}}$ -ját (a szermentes kontroll $F_{\text{aktív}}$ $3,38 \pm 0,32 \text{ kN/m}^2$ volt, míg 3 μM ORM-3819 jelenlétében $4,77 \pm 0,4 \text{ kN/m}^2$ értéket kaptunk, $P < 0,05$; 17. ábra/B). A Ca^{2+} -érzékenyítő hatás maximuma a 10 μM és 100 μM közötti koncentráció tartományban alakult ki. Az ORM-3819-függő Ca^{2+} -érzékenyítés EC_{50} értéke $2,88 \pm 0,14 \mu\text{M}$ volt. Hasonló EC_{50} értéket kaptunk ($2,91 \pm 0,09 \mu\text{M}$), mikor méréseinket megismételtük egy másik szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ (pCa 6,0) mellett is (az adatokat nem mutatjuk).



17. ábra. Az ORM-3819 hatása egy izolált és permeabilizált bal kamrai tengerimalac szívizomsejt kontraktilis erejére szubmaximális $[Ca^{2+}]_i$ -n (pCa 5,8). A regisztrátumok alatt feltüntettük az adott Ca^{2+} , illetve ORM-3819 koncentrációkat (A). Az individuális mérések átlagolásából kapott koncentráció – hatás összefüggés az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő hatását illusztrálja (B). Méréseinket 10 permeabilizált szívizomsejten végeztük. A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki (* $P < 0,05$, kétmintás Dunett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

Az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő hatásának számszerűsítésére a 10 μ M koncentrációt használtuk, mivel 10 μ M, 30 μ M és 100 μ M ORM-3819 hozzávetőleg egyforma mértékű kontraktilis választ váltott ki. Az alkalmazott koncentrációban a szer az abszolút egységekben (18. ábra/A), illetve az egyes mérései sorozatok F_{max} értékére normalizált egységekben kifejezett (18. ábra/B) pCa – izometrikus erő összefüggés balra tolódását eredményezte a kontroll mérésorozathoz képest, amely a Ca^{2+} -érzékenység fokozódására utalt. Az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő hatását a normalizált erő Ca^{2+} -függésének farmakológiai félértékével

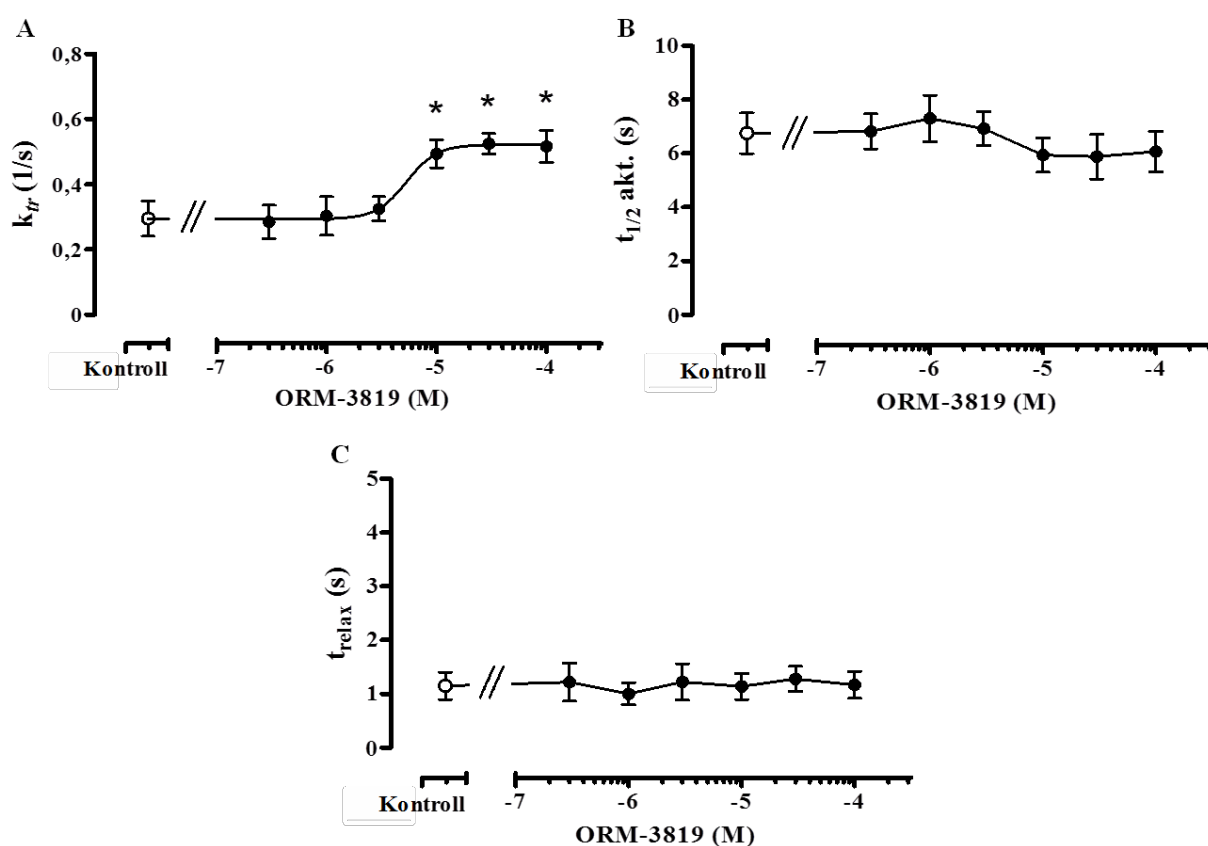
számszerűsítettük (pCa_{50} : $5,69 \pm 0,01$ ORM-3819 nélkül és $5,80 \pm 0,01$ $10 \mu M$ ORM-3819 jelenlétében; ΔpCa_{50} : $0,11 \pm 0,01$, $n = 10$, $P < 0,01$; 18. ábra/C). Az ORM-3819 nem befolyásolta a preparátumok F_{max} értékét (18. ábra/D), valamint hatása elsősorban a szubmaximális $[Ca^{2+}]$ tartományban volt meggyőző, a diasztolé során vélhetően érvényesülő $[Ca^{2+}]$ -n ($pCa \sim 7,0$) Ca^{2+} -érzékenyítő hatása nem alakult ki. A szer nem változtatta meg az izolált és permeabilizált szívizomsejtek $F_{passzív}$ -ját sem (18. ábra/E).



18. ábra. Az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő hatását abszolút (A) és normalizált (B) egységekben kifejezett pCa – izometrikus erő összefüggések alapján tanulmányoztuk. $10 \mu M$ ORM-3819 az összefüggések balra tolódását eredményezte, (C) a kontraktilis erő Ca^{2+} -függésének EC_{50} értéke a Ca^{2+} -érzékenyítést számszerűsíti (pCa_{50}). Az ORM-3819 nem befolyásolta a preparátumok F_{max} (D) és $F_{passzív}$ (E) értékeit. Méréseinket 10 db izolált és permeabilizált szívizomsejten végeztük. A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki (* $P < 0,05$, kétmintás Dunett teszttel bővített ANOVA, ismételt méréseken).

Kísérleteink következő lépéseként azt vizsgáltuk, hogy az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő hatását az izolált szívizomsejtek kontraktilis válaszaiban milyen kinetikai változások követik ($n = 6$). Méréseinket az OM-lal kapcsolatos vizsgálatainkkal azonos módon, széles ORM-3819 koncentráció tartományban ($0,3 \mu M - 10 \mu M$) végeztük, mialatt a

k_{tr} , az aktivációs és relaxációs idő változásait regisztráltuk szubmaximális $[Ca^{2+}]$ mellett (pCa 5,8). Mivel 10 μM ORM-3819 a Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -független kontraktilis erőt szaturáló $[Ca^{2+}]$ -n nem befolyásolta, a teljes mérési sorozatot pCa 4,75 $[Ca^{2+}]$ jelenlétében nem ismételtük meg. Az ORM-3819 fokozta a k_{tr} -t szubmaximális $[Ca^{2+}]$ mellett 10 μM és ennél nagyobb koncentrációban (a kontroll k_{tr} : $0,30 \pm 0,05$ 1/s volt, míg 10 μM OM jelenlétében $0,49 \pm 0,04$ 1/s értéket mértünk, $P < 0,05$; 19. ábra/A). Ezen kinetikai hatás farmakológiai félértéke $5,34 \pm 0,45$ μM volt. 10 μM – 100 μM ORM-3819 jelenlétében a szívizomsejtek kontrakciója vizuálisan gyorsabbnak tűnt, ugyanakkor ez a szerhatás a statisztikai szignifikancia mértékét nem érte el (19. ábra/B). Az ORM-3819 szintén nem befolyásolta a preparátumok relaxációs idejét (19. ábra/C).



19. ábra. Az ORM-3819 kinetikai hatásai tengerimalac eredetű izolált és permeabilizált szívizomsejtekben pCa 5,8 $[Ca^{2+}]$ -jú tesztoldatokban. A szer fokozta az aktin – miozin ciklus sebességi állandóját, a k_{tr} -t (A), míg a preparátumok kontrakciójának (B) és a relaxációjának sebessége szignifikáns mértékben nem változott (C). Eredményeink 6 db individuális preparátumon végzett mérések átlagolásából származnak (átlag \pm SEM). A szermentes kontrollhoz viszonyított statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagokkal emeltük ki.

Legfontosabb eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az ORM-3819 fokozta a bal kamrai szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységet, mely hatás elsősorban a szisztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ -hoz kapcsolható Ca^{2+} szintek mellett jött létre. Az aktin – miozin kereszthidak sebességének fokozódásán kívül nem változott a szívizomsejtek aktivációs – relaxációs ciklusai során észlelt kinetika sem.

6. Megbeszélés

Jelen dolgozat célja az új típusú inotrópok, az ún. szarkomert célzó szerek közé tartozó miozin aktivátor hatású OM, illetve a levosimendan-származék ORM-3819 pozitív inotróp hatásainak farmakológiai jellemzése volt. Patkány, illetve tengerimalac eredetű izolált és permeabilizált szívizomsejteken vizsgáltuk az OM és az ORM-3819 miokardiális kontraktilitásra gyakorolt hatásainak mechanikai és kinetikai következményeit. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az OM fokozza az izolált és permeabilizált szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységét, lassítja ezek aktivációs – relaxációs ciklusának kinetikáját, növeli a Ca^{2+} -független $F_{\text{passzív}}$ -ot, valamint alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ -n is Ca^{2+} -érzékenyít. Az OM némileg kisebb hatékonysággal, de a szívizomsejtek kapcsán leírt változásokhoz hasonló mechanikai és kinetikai hatásokkal rendelkezett rekeszizomból származó, lassú endogén kinetikával rendelkező vázizomrostokon is. A gyors típusú vázizomrostokban az OM minimális hatásokat váltott ki. Megállapítottuk, hogy az ORM-3819 az OM-hoz hasonlóan szintén rendelkezik Ca^{2+} -érzékenyítő hatással izolált szívizomsejteken, mely az OM-hoz viszonyítva eltérő mechanikai és kinetikai változásokkal járt. Az ORM-3819 jelenlétében ugyanis nem változtak meg a szívizomsejtek F_{max} és $F_{\text{passzív}}$ értékei, nem alakult ki Ca^{2+} -érzékenyítés kifejezetten alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ -n, és az aktin – miozin kereszthidak sebességének fokozódásán kívül nem változott a szívizomsejtek aktivációs – relaxációs ciklusai során észlelt kinetika sem.

A miokardium kontraktilitásának fokozására hipotenzióval, hipoperfúzióval és kardiogén sokkal szövődött akut szívelégtelenség esetén az ESC szakmai irányelvei szerint⁷ még mindig első vonalbeli szerként a hagyományos inotrópok (dobutamin, esetleg adrenalin) szerepelnek a vérnyomás vazopresszorokkal (noradrenalin) történő támogatása mellett. Az irányelvek ugyanakkor hangsúlyozzák a Ca^{2+} -mobilizáló szerekkel kapcsolatos biztonságossági aggályokat, hiszen a rövidtávú hemodinamikai hatások ellenére a hosszabb távú mortalitási adatok kedvezőtlennek bizonyultak, melynek hátterében az előbbi inotrópok által okozott intracelluláris Ca^{2+} -túltöltöttség és Ca^{2+} -toxicitás áll.^{2, 28} Emiatt fordult az érdeklődés az olyan új típusú (szarkomert aktiváló) pozitív inotróp gyógyszerek felé, melyek célzottan a miofilamentális rendszerre fejtik ki a hatásukat, és nem befolyásolják a szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisát. Az ideális pozitív inotróp szer nem fokozza a szívizomzat oxigén fogyasztását, nincs arritmogén hatása, nem idéz elő további sejtkárosodást, valamint jól használható patológiás körülmények között, így például miokardiális stunning alatt álló, hipoxiás, acidotikus szívizomterületeken. A jól definiált célok ellenére jelenleg nem rendelkezünk olyan törzskönyvezett gyógyszerként ismert szarkomert

aktiváló szerrel, mely csak és kizárólag miofilamentális támadásponttal bírna. A Ca^{2+} -érzékenyítőként ismert levosimendan olyan pleiotróp hatásokkal (pl. kardio-protekción és potenciális PDE III gátlás) bír, melyek hemodinamikailag támogathatják a szarkomer szintű hatásokat.³ A levosimendan egyre nagyobb teret kap az akut és dekompenzált krónikus szívelégtelenség kezelésében. Alapszerkezetének kémiai módosításával a kutatók igyekeznek olyan új, a levosimendan hatásmechanizmusát követő szereket előállítani, melynek mellékhatás-profilja (pl. vérnyomáscsökkentő hajlam), farmakodinamikai és farmakokinetikai sajátosságai kedvezőbbek, mint az anyavegyületé. Ilyen potenciális szer lehet a dolgozatban bemutatott ORM-3819. Ettől eltérő stratégiát képvisel azon szerek fejlesztése, melyek tisztán miofilamentális támadásponttal igyekeznek elkerülni az összetett hatásprofilot. Érdemes hangsúlyozni, hogy a tisztán miofilamentális hatásokkal bíró szerek között még nem sikerült olyat kifejleszteni, mely maradéktalanul beváltotta volna a hozzájuk fűzött reményeket. Így például az aktin – miozin interakció hatékonyságát javító EMD-53998 ugyan hatékony pozitív inotróp hatásokkal rendelkezik, de iszkémiás szívizomzatban túlzottan fokozta a miokardium rigiditását.⁷⁴ A szarkomert aktiváló szerek közé tartoznak a nemrég kifejlesztett miozin aktivátorok, melyeknek jelenleg egyetlen képviselője az OM. A miozin aktiváció lényege, hogy az OM kizárólag a szívizomsejtek fő erőgeneráló alkotóelemét, a kardiális miozint célozza meg, melynek S1 doménjéhez kötődve növeli a miozin fej Ca^{2+} -függő ATPáz aktivitását.^{57, 75} Ennek hatására fokozódik a P_i disszociációja a miozin fejről, amely az izomélettan csúszó filamentum modelljének megfelelően az aktin – miozin ciklus központi lépése. Ugyanakkor az OM csak az aktin filamentumok jelenlétében fokozta a P_i disszociációját, aktin nélkül ugyanis csökkentette a miozin ATPáz aktivitását. Ez csökkenti az ineffektív ATP hidrolízis mértékét, javítva az aktin – miozin ciklus energiahatékonyságát, melyet *in vivo* tanulmányok is megerősítettek.^{57, 59} A P_i disszociáció fokozása révén az egyes izom-összehúzódások alatt az OM növeli az elérhető, szabad miozin fejek számát a szarkomerben, melynek köszönhetően nagyobb számú aktin – miozin interakció jöhet létre, a feltételezések szerint ezzel egyenes arányban nő a kontraktilis erő. Az OM ATPáz aktivitás fokozásán alapuló hatásmechanizmusa sokáig széles körben elfogadott teória volt, mely ugyanakkor nem ad kielégítő magyarázatot az aktin – miozin ciklus kinetikájában bekövetkező változásokra. A munkánk során kapott eredmények, valamint a legújabb tanulmányok adatai alapján az OM potenciális hatásmechanizmusa mindenképpen revideálásra szorul.

Jelen dolgozat első új megállapítása, hogy az OM Ca^{2+} -érzékenyítés révén fokozza a miokardiális kontraktilitást. Korábbi *in vitro* körülmények között végzett tanulmányok

indirekt módon utaltak az OM e hatására, hiszen a szer fokozta a miofilamentumok ATPáz aktivitásának Ca^{2+} -érzékenységét.⁵⁷ A Ca^{2+} -érzékenyítés közvetlen bizonyítéka a miofilamentumok kontraktilis erejének Ca^{2+} -függése, valamint annak OM hatására bekövetkező változása (ΔpCa_{50}), melyet a szakirodalomban rajtunk kívül mások korábban még nem mutattak be. Adataink egyértelműen alátámasztották az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatását, hiszen a kísérleteink során alkalmazott 0,1 μM és 1 μM OM kezelés után a pCa – kontraktilis erő összefüggések balra tolódása a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységének növekedését reprezentálja.⁶⁷ Ha a bevezetésben bemutatott elvnek megfelelően a cTnC – Ca^{2+} interakciót tekintjük a kontraktilitás alappillérenek, hatásmechanizmusuk alapján centrálisan ható, illetve „downstream” típusú Ca^{2+} -érzékenyítő szerek különíthetők el.²⁸ Így az OM elsősorban egy „downstream” típusú Ca^{2+} -érzékenyítő, mivel az aktin – miozin interakció hatékonyságának fokozása révén fejt ki a hatását, maga a miozin aktiváció pedig a Ca^{2+} -érzékenyítés egyik mechanizmusának tekinthető.⁶⁷

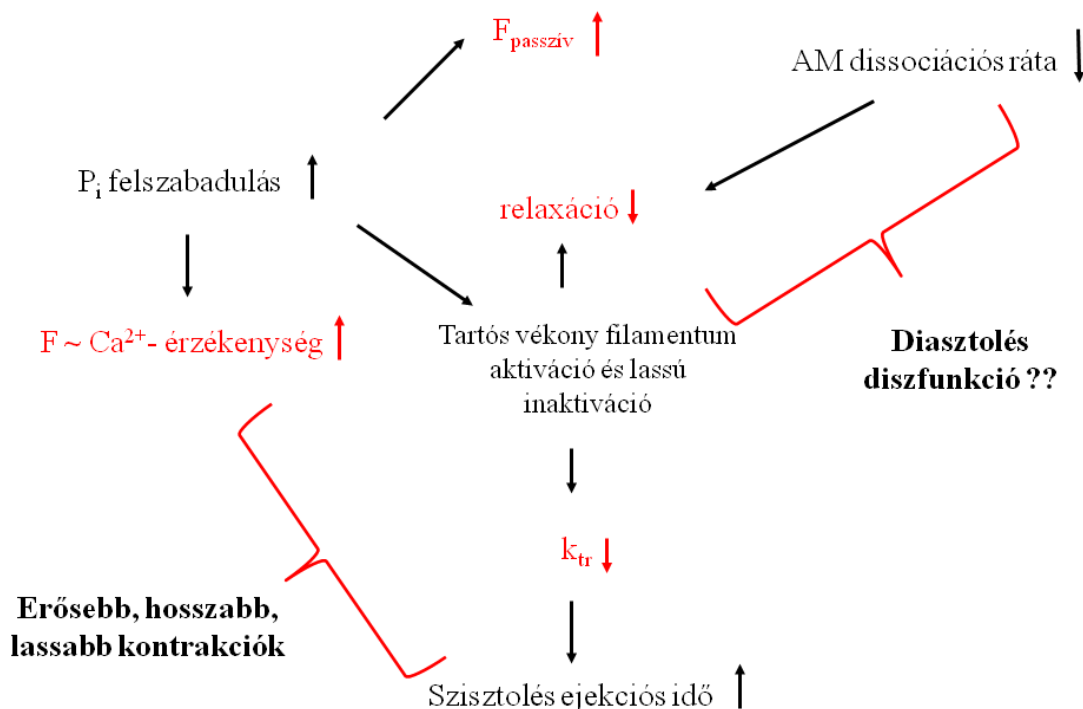
A Ca^{2+} -érzékenyítés jellemezhető továbbá azáltal is, hogy milyen $[\text{Ca}^{2+}]$ tartományban dominál. A szisztolés és diasztolés fázisában igen nehéz megbecsülni az élettani $[\text{Ca}^{2+}]$ -t, hiszen az a szarkolemma ioncsatornáin keresztül megvalósuló ionáramok, illetve az SR transzport folyamatai révén állandóan fluktuál. Durva becsléssel élettani körülmények között a szisztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ 1 μM , amely körülbelül pCa 6,0-nak felel meg, míg diasztolés során a $[\text{Ca}^{2+}]$ 10 nM körüli értékre csökken (\sim pCa 7,0).⁷⁶ A centrálisan ható szerek (levosimendan) Ca^{2+} -érzékenyítő hatása elsősorban a fiziológiás szisztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ -n a legnagyobb, diasztolés és szaturáló (pCa 4,75) $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett nem jön létre kontraktilis erő fokozódás.^{2, 56} A „downstream” típusú szerek viszont akár diasztolés és szuprafiziológiás $[\text{Ca}^{2+}]$ -n is fokozhatják a miokardiális kontraktilitást. Az EMD-53998 – mely az OM kötőhelyéhez közel rögzül a miozin feji részének motor régiójában – pCa 9,0 és pCa 4,75 $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú tesztoldatokban egyaránt növelte az izomerőt izolált és permeabilizált szívizomsejtekben. Hasonló hatásokkal bírt a kezdetleges miozin aktivátor hatású NEM-S1, mely szintén fokozta a miozin ATPáz aktivitását. A szintén „downstream” támadáspontú OM alacsony (0,1 μM) koncentrációban a centrálisan ható szerekhez hasonlóan kizárólag szisztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett hatott, 1 μM koncentrációban viszont diasztolés, szisztolés és szaturáló $[\text{Ca}^{2+}]$ -n is befolyásolta a szívizomsejtek kontraktilitását. Utóbbi, vagy azt megközelítő $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett OM jelenlétében a szívizomsejtek izometrikus ereje csökkent. Ennek hátterében az állhat, hogy egyrészt a szaturáló $[\text{Ca}^{2+}]$ -n közel maximális számú aktin – miozin kereszthíd jön létre, így több aktív kereszthíd bevonása a kontraktilitásba nem lehetséges, másrészt az OM nagy koncentrációban az aktív kereszthidak túlzott mértékű aktiválódását eredményezheti, mely

akadályozza a maximális kontraktilis válasz kialakulását.^{67, 77} Ugyanakkor diasztolés $[Ca^{2+}]$ mellett ($pCa < 7,0$) is kialakult a Ca^{2+} -érzékenyítés, melyet a pCa – kontraktilis erő összefüggés görbéjének felfelé tolódása reprezentált. Eredményeink jól korrelálnak az ATPáz aktivitás Ca^{2+} -függésével⁵⁷, mely magyarázatot szolgáltat a diasztolés $[Ca^{2+}]$ -n megvalósuló kontraktilis erő növekedésre, hiszen Malik és munkatársai $pCa < 7,0$ $[Ca^{2+}]$ -jú tesztoldatokban szintén az ATPáz aktivitás OM-függő fokozódását észlelték. A diasztolés $[Ca^{2+}]$ -n létrejövő Ca^{2+} -érzékenyítés felveti a diasztolés diszfunkció okozásának veszélyét. Ez a probléma komolyan felmerült az OM-hez hasonló farmakológiai hatásokkal bíró EMD-53998 esetében is, mely *in vitro* és *in vivo* állatmodellekben fokozta a miokardium rigiditását.⁷⁸⁻⁸⁰ Emellett kinetikai tanulmányok kimutatták, hogy a szer lassítja az aktin – miozin komplex disszociációját a P_i , illetve az ADP leválását követően.⁸¹ Mindezen folyamatok eredményeképpen növekedhet a szívműködés $F_{passzív}$ -ja, illetve lassulhat a relaxáció, melyet *in vitro* eredményeink is megerősítettek. A diasztolés diszfunkció veszélyét az OM-mel végzett kezelés kapcsán tovább fokozhatja a szívműködés kóros Ca^{2+} homeosztázisa HFrEF-ben. Szívelégtelenségben ugyanis a kontraktilitás csökkenésére adott kompenzációs mechanizmusként növekedhet a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége.⁸² Az OM-indukált diasztolés Ca^{2+} -érzékenyítést tovább komplikálhatja HFrEF-ben a Ca^{2+} homeosztázis elemi zavara miatt a szívműködés emelkedett citoszolikus $[Ca^{2+}]$ -ja.⁷⁴ Az *in vitro* adatokkal korrelálva egy szívelégtelen patkányokon végzett tanulmányban az OM diasztolés diszfunkciót váltott ki, melyet az izovolumetriás relaxáció időkonstansának (τ) és a bal kamrai szisztolés nyomás csökkenésének (dP/dt_{min}) kóros változása reprezentált.⁸³ Annak ellenére, hogy a humán tanulmányok nem igazolták az OM diasztolés funkcióra gyakorolt adverz hatásait, a szer adagolása nagyfokú óvatosságot igényel, hiszen egészséges önkéntes vállalkozókkal végzett humán tanulmányokban az OM kismértékben növelte diasztolés funkcióval korreláló izovolumetriás relaxációs időt (IVRT), valamint az E/E' hányadost.⁶¹ *In vitro* kísérleteink során az OM *in vivo* adagolásával identikus tesztkoncentrációkat használtunk, ahol az OM terápiás koncentrációja a vérplazmában 400 – 600 ng/ml volt, mely körülbelül 1 – 1,5 μM *in vitro* koncentrációnak felel meg. Ugyanakkor az *in vitro* és *in vivo* adatok közötti összefüggések értékelésekor hangsúlyozni kell, hogy modellünkben a mechanikai izoláció és kémiai permeabilizáció miatt a kontraktilis filamentumokat közvetlenül tettük ki a miozin aktivációnak, ezzel szemben *in vivo* a sejtmembrán és egyéb más regulátor proteinek moduláló szerepét is figyelembe kell venni. Hangsúlyozandó továbbá, hogy az OM 82%-ban kötődik plazmafehérjékhez. Mindezek következtében nem

ismert a szer effektív terápiás intracelluláris koncentrációja, mely magyarázhatja az eltéréseket az *in vitro* és az *in vivo* adatok között.^{62, 67, 84}

Az OM hatásmechanizmusát a korábbi tanulmányok elsősorban az ATPáz aktivitás fokozásával és az így létrejövő miozin aktivációval asszociálták.⁵⁷ A legfrissebb tanulmányok szerint viszont az OM csökkenti az aktin – miozin ciklus összesített ATPáz aktivitását, csak az ATP hidrolízisét és a P_i disszociációjának ütemét fokozza a miozin fejekről.⁸⁵⁻⁸⁷ A P_i disszociációja az aktin – miozin ciklus fő sebesség-meghatározó lépése, melynek hatására az aktin – miozin kereszthidak a gyengén rögzült konformációból erősen-kötött, erő-generáló konformációba mennek át. A P_i disszociációjának elősegítése elméletileg az aktin – miozin ciklus és így a kontrakció sebességének fokozódásával jár, viszont *in vitro* és *in vivo* adatok éppen ellenkező OM-hatásokat tükröznek. Tanulmányunkban az OM már alacsony koncentrációban csökkentette a kereszthidak sebességi állandójaként értelmezett k_{r-t} pCa 4,75 [Ca^{2+}]-jú tesztoldatokban, míg pCa 6,0 mellett a hatása kissé magasabb koncentráció tartományban alakult ki. Ennek potenciális magyarázata az, hogy az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatása – mely egyébként gyorsabb kontrakciókhoz vezetne – részben kompenzálja a szer az aktin – miozin ciklus sebességére gyakorolt negatív kinetikai hatásait. A kereszthidak sebességi állandójának csökkenésének következménye a kontrakciós idő ($t_{1/2akt.}$) OM-függő növekedése volt. *In vitro* motilitási assay-k is megerősítették az általunk leírt kinetikai hatásokat, hiszen OM hatására csökken az aktin filamentumok miozin-függő elmozdulásának sebessége.^{75, 85} Az *in vitro* kinetikai és motilitási adatok jól korrelálnak az *in vivo* preklinikai és klinikai vizsgálatok eredményeivel is. Először egészséges, majd szívelégtelen emberek OM-lal történő kezelése után végzett echokardiográfiai vizsgálatok a szisztolés ejekciós idő és az EF fokozódását, illetve szöveti Doppler révén az összehúzódás sebességének csökkenését mutatták.^{5, 61} OM hatására tehát erősebb, tartósabb és lassabb szívizom összehúzódások alakulnak ki. A szer hatásmechanizmusának megértéséhez a kulcsot a P_i disszociációjának fokozódása és a kontrakció kinetikájának lassítása közötti indirekt kapcsolat jelenti. Az OM ugyanis nem befolyásolja, sőt egy tanulmány szerint gátolja a másik ATP degradációs végtermék, az ADP leválását az aktin – miozin komplexről, valamint csökkenti azok disszociációjának sebességét. Ennek köszönhetően az egyensúly az erősen kötött konformációjú aktin – miozin komplex képződése és tartós fennmaradása irányába tolódik, mely a vékony filamentumok között egy kooperatív folyamatot indít el, növelve ezzel a filamentumok Ca^{2+} -érzékenységét. A fokozódó kooperativitás pedig együtt járhat az aktin filamentumok gátló fehérje komplexeinek inaktivációjával, mely tovább fennmaradó kölcsönhatást eredményez, ezáltal hosszabb ideig tartó aktív kontrakció jön létre, a relaxáció

potenciális lassulásával.^{67, 88} Ennek megfelelően az OM-et enzimológiai szempontból nem tekinthetjük szigorúan miozin aktivátornak, hanem inkább az aktin – miozin ciklus alloszterikus modulátorának (20. ábra).⁸⁵



20. ábra. Az OM farmakológiai hatásának sematikus összefoglalása. Piros színnel vannak jelölve a vizsgálataink során a szakirodalomban először publikált jelenségek.

Munkánk során a szakirodalomban szintén először sikerült bemutatni az OM hatásait izolált és permeabilizált rekeszizom eredetű vázizomrostokon. A rekeszizom komplex felépítésű, a gyors endogén kinetikájú rostok (MHC II a, x, b) mellett lassú, azaz β -MHC-t (MHC-I) tartalmazó rostokból áll, mely utóbbi a kardiális miozinnal teljes mértékben megegyezik.^{67, 89} Biokémiai vizsgálatokat nem állt módunkban végezni izolált vázizomrostokon, annak eldöntésére, hogy az egyes preparátumok gyors vagy lassú MHC-t tartalmaznak, ugyanakkor az egyes izomrostok k_{tr} értékei alapján következtetni lehet a típusukra. Az aktin – miozin hidak sebességét jelképező k_{tr} lassú rostok esetében <2 1/s, míg gyors rostokban ugyanez az érték >2 1/s. Lassú típusú vázizomrostokban szívizomsejtekre nagymértékben hasonlító kinetikai és mechanikai OM hatások jöttek létre, melynek háttérében a két különböző szövet azonos típusú MHC tartalma állhat.^{67, 73} A lassú kinetikájú vázizomrostokban és szívizomsejtekben kialakuló hatások közötti különbségek, valamint ezek eltérő OM-koncentráció függése vélhetően a két különböző szövettípus eltérő (szkeletális vs. kardiális) vékony filamentum tartalmával magyarázható. Az OM hatékonyságát gyors típusú

miozint tartalmazó vázizomrostokban is vizsgáltuk, ahol az élettanilag releváns $[Ca^{2+}]$ -n a kontraktilitás enyhe fokozódása mellett más hatását nem sikerült kimutatni, míg szaturáló $[Ca^{2+}]$ mellett a k_{tr} csökkenését figyeltük meg.⁶⁷ Ezek az eredmények korrelálnak a gyors típusú MHC-vel végzett kinetikai vizsgálatokkal, melyek az ATPáz aktivitás és a power-stroke sebességének a csökkenéséről számoltak be. Mindezen hatások a szívizomsejtekben és lassú típusú vázizomrostokon tapasztalt változásokkal szemben jóval magasabb OM koncentráció tartományban alakultak ki.⁸⁶ Eredményeink tehát cáfolják azt, hogy az OM egy szívizom-specifikus Ca^{2+} -érzékenyítő lenne, hiszen némileg kisebb affinitással lassú-, és jelentősen kisebb affinitással gyors endogén kinetikájú vázizomrostokban is kialakultak a jellegzetes mechanikai és kinetikai hatásai (1. táblázat).

	Szívizomsejt	Lassú kinetikájú vázizomrost	Gyors kinetikájú vázizomrost
Pozitív inotróp hatás EC_{50} értéke	$0,08 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,03$	#
$F_{passzív}$ növekedés EC_{50} értéke	$0,26 \pm 0,11$	$0,69 \pm 0,11$	Ø
k_{tr} csökkentés EC_{50} értéke	#	$0,29 \pm 0,04$	Ø

1. táblázat. EC_{50} értékek az élettani szempontból releváns szubmaximális $[Ca^{2+}]$ (pCa 6,0 vagy pCa 5,8) mellett (átlag \pm SEM μ M egységekben). #: EC_{50} érték nem volt meghatározható.

A vázizomrostok Ca^{2+} -érzékenyítése révén a jövőben az OM-et (és annak potenciálisan kifejlesztendő származékait) a vázizomzat krónikus elgyengülésével járó kórképekben is kipróbálhatják, mint alternatív terápiás eszközt.^{63, 64} Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan *in vitro* vagy *in vivo* tanulmány, melyben az OM hatásait vizsgálják légzési elégtelenségben. Az OM-hez hasonló „downstream” típusú Ca^{2+} -érzékenyítő, EMD-53998 korábban normalizálta mesterségesen lélegeztetett malacok izolált és permeabilizált vázizomrostjainak csökkent Ca^{2+} -érzékenységét. Az ATOMIC-HF tanulmányban az OM inotróp hatásait vizsgálták akut szívelégtelenségben szenvedő betegek körében és az elsődleges végpontnak a nehézlégzés javulását tekintették. Az OM nagyobb koncentrációkban – nem szignifikáns módon – csökkentette a fulladásos panaszokat, melynek hátterében a szer előnyös hemodinamikai

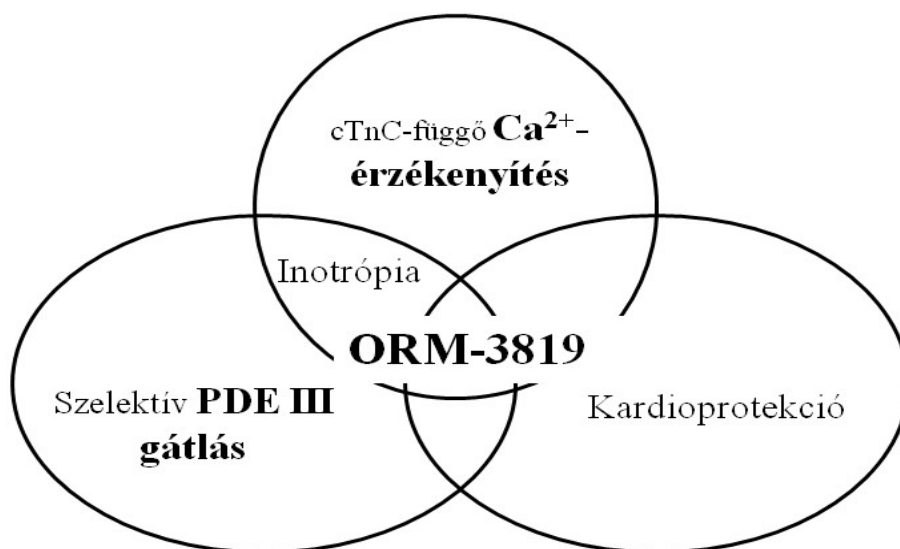
hatása, de saját eredményeink szerint akár a légzőizmok farmakológiai támogatása is állhatott.⁹⁰

A „downstream” típusú Ca^{2+} -érzékenyítő OM mellett a levosimendannal való szerkezeti hasonlósága miatt feltételezhetően a Ca^{2+} homeosztázis centrális, azaz cTnC-függő útvonalán működő ORM-3819 volt a tanulmányunk másik fő célpontja. Finn kollaborációs partnereink első lépésben NMR spektroszkópia segítségével a szer cTnC-hez történő kötődését igazolták. Annak ellenére, hogy a pontos kötőhelyét nem sikerült kimutatni, az NMR mérések megerősítették, hogy a szer a cTnC N-terminális doménjéhez kötődik a levosimendannál kisebb affinitással.⁵⁶ Mindez összhangban van izolált és permeabilizált tengerimalac eredetű szívizomsejteken végzett kontraktilis erőméréseink eredményeivel. Az ORM-3819 ugyanis a levosimendannal arányos mértékben (ΔpCa_{50} egyaránt 0,1 a levosimendan és annak aktív származéka, az OR-1896, valamint az ORM-3819 esetében), ugyanakkor nagyságrendekkel kisebb affinitással fokozta a szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységét (EC_{50} : 9 nM a levosimendan és $\sim 3 \mu\text{M}$ az ORM-3819 esetében).^{91,92} Hasonló nagyságrendű különbséget találtunk az ORM-3819 *in vitro* Ca^{2+} -érzékenyítésének és az *ex vivo* pozitív inotróp hatásának EC_{50} értékei között ($\sim 3 \mu\text{M}$ vs. $\sim 9 \text{nM}$) között, azaz a Ca^{2+} -érzékenyítés önmagában nem magyarázza a szer *ex vivo* mért inotróp hatását. Az *ex vivo* méréseket kollaborációs partnereink Langendorff-perfundált tengerimalac szíveken végezték.⁵⁶

A PDE gátlás egy alternatív lehetőség lehet a szívizomsejtek kontraktilitásának farmakológiai fokozására.⁹³ A PDE izoenzimek (pl. PDE III és IV) gátlása a cAMP intracelluláris koncentrációjának növekedéséhez vezet a degradáció hiányában, mely tartós PKA aktivációt eredményez. A szarkolemmális L-típusú Ca^{2+} -csatorna foszforilációja Ca^{2+} beáramlást, az pedig az SR-ből Ca^{2+} -indukálta Ca^{2+} felszabadulást (calcium induced calcium release - CICR) indít el. A PKA foszforilálja a SERCA2b regulátor fehérjét, a foszfolambant, mely a fölös Ca^{2+} SR-be történő visszavételezését irányítja.^{94,95} Kollaborációs partnereink igazolták az ORM-3819 PDE gátló képességét: a szer már alacsony koncentrációban (EC_{50} : $\sim 4 \text{nM}$) gátolta a PDE III aktivitását, míg a PDE IV esetén nem sikerült teljes farmakológiai gátlást elérniük (EC_{50} : $\sim 5 \mu\text{M}$). A PDE III gátlásban vélhetően az ORM-3819 pyridazinon gyűrűjének szubsztituátlan nitrogénje a kulcs, mely a PDE III katalitikus doménjével direkt interakcióba lép.⁹⁶ A PDE gátlók pozitív inotróp hatását és kedvező hemodinamikai profilját számos tanulmányban vizsgálták. A tisztán PDE III gátló milrinon *ex vivo* tengerimalac szívekben erős inotróp hatást produkált, ennek mértéke azonban elmaradt attól, melyet az ORM-3819 kapcsán regisztráltunk.^{97,98} A PDE III és IV

gátló enoximon szintén markáns kardiotonikus hatású, ugyanakkor hatékonysága sem a levosimendan sem az ORM-3819 potenciálját nem éri el.^{98, 99} Ezek az adatok az ORM-3819 hatásmechanizmusáról szolgáltatnak indirekt bizonyítékokat, melynek pozitív inotróp hatását feltételezéseink szerint a Ca^{2+} -érzékenyítés és a szelektív PDE III gátlás kombinációja hozza létre. Ez a kombinált hatásmechanizmus nem teljesen azonos a levosimendan kapcsán feltételezettel, hiszen az anyavegyület a pozitív inotróp hatását terápiás koncentráció tartományban vélhetően jelentősebb mértékben köszönheti Ca^{2+} -érzékenyítésnek.⁴⁵ A többi PDE gátlóval (pl. milrinon és enoximon) ellentétben az ORM-3819 rendkívül nagy szelektivitással (~ 12000 körüli szelektivitási faktor) gátolja a PDE III izoenzim aktivitását, mely hozzájárulhat ahhoz, hogy elkerüljük a tradicionális inotrópokra és PDE gátlókra jellemző kedvezőtlen mellékhatásokat. Az ORM-3819 szelektív PDE III-gátló hatása elviekben kedvező is lehet, mely nemcsak pozitív inotróp támogatást biztosít, hanem a bal kamra relaxációjának fokozása által javíthatja annak diasztolés funkcióját is. A foszfolamban foszforilációja megszünteti annak gátló hatását a SERCA aktivitására, így fokozódik a Ca^{2+} raktározása, míg a TnI foszforilációja az aktin-miozin kereszthidak disszociációját segíti.³

Munkánk során a PDE III gátlás és a pozitív inotróp hatás között csak indirekt evidenciákat szolgáltatunk, hiszen az intracelluláris cAMP koncentrációjában és a különféle fehérjék foszforiláltságában bekövetkező változásokat nem vizsgáltuk. Szintén további vizsgálatok szükségesek az ORM-3819 vaszkuláris és mitokondriális hatásainak feltárása érdekében, melynek feltételezett jelenlétét a levosimendanhoz hasonlóan K_{ATP} -csatornák gátlása igazolhatja (21. ábra).



21. ábra. A ORM-3819 pozitív inotróp hatását a Ca^{2+} -érzékenyítés és a szelektív PDE III gátlás kombinációja hozza létre.

7. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények

A jelen dolgozat a szarkomert aktiváló szerek közé tartozó a miozin aktivátor hatású OM és a levosimendan származék ORM-3819 farmakológiai hatásait vizsgálta. Vizsgálatainkat OM esetében patkányok bal kamrai szívizomsejtjein, illetve rekeszizom eredetű vázizomrostjain, míg az ORM-3819 kapcsán tengerimalacok bal kamrai kardiomiocitáin végeztük.

Eredményeink alapján a dolgozat legfontosabb megállapításai a következők:

- Az OM egy Ca^{2+} -érzékenyítő szer, mely az aktin – miozin interakció modulálásával a pozitív inotrópia „downstream” mechanizmusán keresztül érvényesül.
- Az OM mechanikai hatásai, illetve az aktin – miozin ciklus aktivációs – relaxációs kinetikájának lassítása erősebb, tartósabb és lassabb kontrakciókat hoz létre, de felmerülhet a diasztolés diszfunkció veszélye a passzív erő fokozódása, a relaxáció lassítása és a diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ -n létrejövő Ca^{2+} -érzékenyítés következtében.
- Az OM a szívizomsejtekben leírtakhoz hasonló kinetikai és mechanikai hatásokat fejtett ki lassú endogén kinetikával rendelkező vázizomrostokban az identikus β -MHC tartalom miatt, viszont az OM affinitása e vázizomrostokhoz mérsékeltebb volt, mint szívizomsejtekben.
- Az ORM-3819 a cTnC-hez történő kötődésével a Ca^{2+} -érzékenyítés centrális útvonalára jellemző hatásokat fejtett ki permeabilizált szívizomsejteken. Az ORM-3819 pozitív inotróp hatásának kialakításában a nagy szelektivitású PDE III gátlás jelentős szerepet kaphat. Így vélhetően az ORM-3819 pozitív inotróp hatása a Ca^{2+} -érzékenység fokozásának és a szelektív PDE III gátlás kombinációjának köszönhető.

8. Összefoglalás

Az akut szívelégtelenség mortalitása a fejlődő farmakológiai és eszközös kezelés ellenére magas, sőt a Ca^{2+} -mobilizáló inotróp szerek adverz hatásúak a hosszú távú túlélésre. A szarkomert aktiváló szerek új terápiás lehetőséget teremtenek az akut szívelégtelenség kezelésére: a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan hatékonyságát egyre több klinikai evidencia támasztja alá, míg a miozin aktivátor omecantiv mecarbil (OM) kapcsán szintén egyre több biztató eredmény lát napvilágot.

Célul tűztük ki, hogy tanulmányozzuk az OM, valamint a levosimendan származék ORM-3819 izolált és permeabilizált szívizomsejtek kontraktilitásának mechanikai és kinetikai paramétereire gyakorolt hatásait, valamint igazoljuk az OM szöveti szelektivitását rekeszizom eredetű vázizomrostokon végzett kontraktilis erőmérésekkel.

Az OM növelte a szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységét, hiszen adott szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett alacsony és közepes koncentrációban fokozta a preparátumok kontraktilitását, míg inotróp hatása mérsékeltebb volt nagy koncentrációban. Az OM fokozta a szívizomsejtek $F_{\text{passzív}}$ -ját, illetve az $F_{\text{aktív}}$ -ját diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ szinteken. A miozin aktiváció eredményeként lassabb és tartósabb Ca^{2+} -kontraktúrákat regisztráltunk, hiszen csökkent az aktin – miozin kereszthidak sebességi állandója. A szívizomsejteken tapasztaltakhoz hasonló jellegű, de kisebb affinitású OM-hatásokat regisztráltunk lassú endogén kinetikájú vázizomrostok esetében, míg gyors típusú vázizomrostok esetén az OM hatása minimálisnak bizonyult a terápiás dózissal identikus koncentráció-tartományban.

A levosimendan származék ORM-3819 szintén fokozta a szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységét az OM-tól eltérő mechanikai illetve kinetikai hatásokkal. A cTnC-függő Ca^{2+} -érzékenyítés következtében erőteljesebb és gyorsabb Ca^{2+} -kontraktúrák jöttek létre, hiszen fokozódott az aktin – miozin hidak sebességi állandója. Az ORM-3819 jelenlétében nem alakult ki Ca^{2+} -érzékenyítés diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ -n, valamint nem változott az $F_{\text{passzív}}$.

Eredményeink alapján az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatású pozitív inotróp szer, mely az aktin – miozin interakció modulálásával az inotrópia szabályozásának „downstream” útvonalán hat. Az OM mechanikai és kinetikai hatásainak köszönhetően erősebb, gyorsabb és lassabb kontrakciók jönnek létre, de alkalmazása fokozott óvatosságot igényel, hiszen felmerülhet a diasztolés diszfunkció veszélye. Az ORM-3819 a cTnC-hez történő kötődésével a Ca^{2+} -érzékenyítés centrális útvonalán hat, de pozitív inotróp hatásában a szelektív PDE III gátlás is szerepet játszhat.

Summary

While Ca^{2+} -mobilizer positive inotropic agents are nowadays less favored in acute heart failure, direct activation of the cardiac sarcomere became an attractive strategy. The Ca^{2+} -sensitizer levosimendan is now widely accepted to give inotropic support for the failing heart and cardiac myosin activation by omecamtiv mecarbil (OM) is also increasingly considered as a promising therapeutic agent in heart failure.

Our aim was to assess the mechanical and kinetic effects of OM and the levosimendan-related ORM-3819 on the contractile function of isolated and permeabilized cardiomyocytes. In addition, we also aimed at the clarification of the tissue selectivity of OM during contractile force measurements in skeletal muscle myofiber preparations from the diaphragm. At a given submaximal $[\text{Ca}^{2+}]$, OM increased the Ca^{2+} -sensitivity of force production in cardiomyocytes in the presence of low and intermediate OM concentrations, but high OM concentrations did not augment force production. OM dependent Ca^{2+} -sensitization was also observed at very low $[\text{Ca}^{2+}]$ levels mimicking diastolic conditions, and it also increased F_{passive} . OM decreased the rate of the actin – myosin cross – bridge cycle. Due to the above mentioned? mechanical and kinetic effects, OM treatment led to strong, slow and long-lasting Ca^{2+} -contractures. OM evoked similar effects in skeletal muscle fibers with slow intrinsic kinetics, nevertheless, OM possessed lower affinity for skeletal muscle fibers than that for cardiomyocytes. In fast skeletal muscle preparations, OM-evoked mechanical changes were observed only at high OM concentrations. The levosimendan-related ORM-3819 also increased the Ca^{2+} -sensitivity of force production of the cardiomyocytes, however with a different mechanism of action than OM. ORM-3819-evoked Ca^{2+} -sensitization was accompanied by strong Ca^{2+} -contractures due to increased rates of cross – bridge cycling. ORM-3819 failed to evoke Ca^{2+} -sensitization at very low $[\text{Ca}^{2+}]$ and it did not increase F_{passive} .

Our data demonstrated OM as a Ca^{2+} -sensitizing agent with a downstream mechanism of action in both cardiomyocytes and diaphragmatic muscle fibers. We propose that OM should be administered with care in patients with heart failure because of its potential adverse effects on myocardial relaxation. ORM-3819 was characterized as a cTnC-dependent Ca^{2+} -sensitizer, thereby acting centrally in the contractile process. The positive inotropic effect of ORM-3819 is complemented by its selective inhibition of PDE III isoenzyme.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Askoxylakis V, Thieke C, Pleger ST, Most P, Tanner J, Lindel K, Katus HA, Debus J, Bischof M. Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: a systematic review. *BMC Cancer* 2010;10:105.
2. Nagy L, Pollesello P, Papp Z. Inotropes and inodilators for acute heart failure: sarcomere active drugs in focus. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014;64(3):199-208.
3. Pollesello P, Papp Z, Papp JG. Calcium sensitizers: What have we learned over the last 25 years? *Int J Cardiol* 2016;203:543-548.
4. Morgan BP, Muci A, Lu PP, Qian X, Tochimoto T, Smith WW, Garard M, Kraynack E, Collibee S, Suehiro I, Tomasi A, Valdez SC, Wang W, Jiang H, Hartman J, Rodriguez HM, Kawas R, Sylvester S, Elias KA, Godinez G, Lee K, Anderson R, Sueoka S, Xu D, Wang Z, Djordjevic N, Malik FI, Morgans DJ, Jr. Discovery of omecamtiv mecarbil the first, selective, small molecule activator of cardiac Myosin. *ACS Med Chem Lett* 2010;1(9):472-477.
5. Cleland JG, Teerlink JR, Senior R, Nifontov EM, Mc Murray JJ, Lang CC, Tsyrlin VA, Greenberg BH, Mayet J, Francis DP, Shaburishvili T, Monaghan M, Saltzberg M, Neyses L, Wasserman SM, Lee JH, Saikali KG, Clarke CP, Goldman JH, Wolff AA, Malik FI. The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *Lancet* 2011;378(9792):676-683.
6. Teerlink JR, Felker GM, McMurray JJ, Ponikowski P, Metra M, Filippatos GS, Ezekowitz JA, Dickstein K, Cleland JG, Kim JB, Lei L, Knusel B, Wolff AA, Malik FI, Wasserman SM, Investigators A-A. Acute Treatment With Omecamtiv Mecarbil to Increase Contractility in Acute Heart Failure: The ATOMIC-AHF Study. *J Am Coll Cardiol* 2016;67(12):1444-1455.
7. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Guidelines ESCCfP. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in

- collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012;33(14):1787-1847.
8. Roger VL. Epidemiology of heart failure. *Circ Res* 2013;113(6):646-659.
 9. Gheorghide M, Zannad F, Sopko G, Klein L, Pina IL, Konstam MA, Massie BM, Roland E, Targum S, Collins SP, Filippatos G, Tavazzi L, International Working Group on Acute Heart Failure S. Acute heart failure syndromes: current state and framework for future research. *Circulation* 2005;112(25):3958-3968.
 10. Kovacs A, Papp Z, Nagy L. Causes and pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail Clin* 2014;10(3):389-398.
 11. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Authors/Task Force M, Document R. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 2016.
 12. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation* 2013;128(4):388-400.
 13. Dzau VJ. Autocrine and paracrine mechanisms in the pathophysiology of heart failure. *Am J Cardiol* 1992;70(10):4C-11C.
 14. Francis GS, Pierpont GL. Pathophysiology of congestive heart failure secondary to congestive and ischemic cardiomyopathy. *Cardiovasc Clin* 1988;19(1):57-74.
 15. Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res* 2003;92(4):350-358.
 16. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1999;85(1):38-46.
 17. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 1992;85(3):1046-1055.
 18. Del Monte F, Butler K, Boecker W, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Novel technique of aortic banding followed by gene transfer during hypertrophy and heart failure. *Physiol Genomics* 2002;9(1):49-56.

19. Lyon AR, Bannister ML, Collins T, Pearce E, Sepehrpour AH, Dubb SS, Garcia E, O'Gara P, Liang L, Kohlbrenner E, Hajjar RJ, Peters NS, Poole-Wilson PA, Macleod KT, Harding SE. SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011;4(3):362-372.
20. del Monte F, Harding SE, Dec GW, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. *Circulation* 2002;105(8):904-907.
21. Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 1999;99(5):641-648.
22. Canton M, Menazza S, Sheeran FL, Polverino de Laureto P, Di Lisa F, Pepe S. Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(3):300-309.
23. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res* 2007;101(2):195-204.
24. Felker GM, Adams KF, Jr., Konstam MA, O'Connor CM, Gheorghiade M. The problem of decompensated heart failure: nomenclature, classification, and risk stratification. *Am Heart J* 2003;145(2 Suppl):S18-25.
25. Pang PS, Komajda M, Gheorghiade M. The current and future management of acute heart failure syndromes. *Eur Heart J* 2010;31(7):784-793.
26. Cotter G, Felker GM, Adams KF, Milo-Cotter O, O'Connor CM. The pathophysiology of acute heart failure--is it all about fluid accumulation? *Am Heart J* 2008;155(1):9-18.
27. Cotter G, Moshkovitz Y, Milovanov O, Salah A, Blatt A, Krakover R, Vered Z, Kaluski E. Acute heart failure: a novel approach to its pathogenesis and treatment. *Eur J Heart Fail* 2002;4(3):227-234.
28. Endoh M. Cardiac Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ sensitizers. *Circ J* 2008;72(12):1915-1925.
29. Tacon CL, McCaffrey J, Delaney A. Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Intensive Care Med* 2012;38(3):359-367.

30. O'Connor CM, Gattis WA, Uretsky BF, Adams KF, Jr., McNulty SE, Grossman SH, McKenna WJ, Zannad F, Swedberg K, Gheorghiade M, Califf RM. Continuous intravenous dobutamine is associated with an increased risk of death in patients with advanced heart failure: insights from the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am Heart J* 1999;138(1 Pt 1):78-86.
31. Gomes AV, Potter JD, Szczesna-Cordary D. The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* 2002;54(6):323-333.
32. Katz AM, Lorell BH. Regulation of cardiac contraction and relaxation. *Circulation* 2000;102(20 Suppl 4):IV69-74.
33. Kass DA, Solaro RJ. Mechanisms and use of calcium-sensitizing agents in the failing heart. *Circulation* 2006;113(2):305-315.
34. Digitalis Investigation G. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med* 1997;336(8):525-533.
35. Wang ZQ, Zhang R, Chen MT, Wang QS, Zhang Y, Huang XH, Wang J, Yan JH, Li YG. Digoxin Is Associated With Increased All-cause Mortality in Patients With Atrial Fibrillation Regardless of Concomitant Heart Failure: A Meta-analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;66(3):270-275.
36. Vamos M, Erath JW, Hohnloser SH. Digoxin-associated mortality: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Eur Heart J* 2015;36(28):1831-1838.
37. Uretsky BF, Jessup M, Konstam MA, Dec GW, Leier CV, Benotti J, Murali S, Herrmann HC, Sandberg JA. Multicenter trial of oral enoximone in patients with moderate to moderately severe congestive heart failure. Lack of benefit compared with placebo. Enoximone Multicenter Trial Group. *Circulation* 1990;82(3):774-780.
38. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 1991;325(21):1468-1475.
39. Shah SJ, Blair JE, Filippatos GS, Macarie C, Ruzylo W, Korewicki J, Bubenek-Turconi SI, Ceracchi M, Bianchetti M, Carminati P, Kremastinos D, Grzybowski J, Valentini G, Sabbah HN, Gheorghiade M, Investigators H-H. Effects of istaroxime on diastolic stiffness in acute heart failure syndromes: results from the Hemodynamic, Echocardiographic, and Neurohormonal Effects of Istaroxime, a Novel Intravenous Inotropic and Lusitropic Agent: a Randomized Controlled Trial in Patients

- Hospitalized with Heart Failure (HORIZON-HF) trial. *Am Heart J* 2009;157(6):1035-1041.
40. Hasenfuss G, Teerlink JR. Cardiac inotropes: current agents and future directions. *Eur Heart J* 2011;32(15):1838-1845.
 41. Sorsa T, Pollesello P, Solaro RJ. The contractile apparatus as a target for drugs against heart failure: interaction of levosimendan, a calcium sensitiser, with cardiac troponin c. *Mol Cell Biochem* 2004;266(1-2):87-107.
 42. Sorsa T, Pollesello P, Rosevear PR, Drakenberg T, Kilpelainen I. Stereoselective binding of levosimendan to cardiac troponin C causes Ca²⁺-sensitization. *Eur J Pharmacol* 2004;486(1):1-8.
 43. Levijoki J, Pollesello P, Kaivola J, Tilgmann C, Sorsa T, Annala A, Kilpelainen I, Haikala H. Further evidence for the cardiac troponin C mediated calcium sensitization by levosimendan: structure-response and binding analysis with analogs of levosimendan. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32(3):479-491.
 44. Pollesello P, Ovaska M, Kaivola J, Tilgmann C, Lundstrom K, Kalkkinen N, Ulmanen I, Nissinen E, Taskinen J. Binding of a new Ca²⁺ sensitizer, levosimendan, to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modelling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study. *J Biol Chem* 1994;269(46):28584-28590.
 45. Papp Z, Edes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenpera M, Leppikangas H, Mebazaa A, Landoni G, Grossini E, Caimmi P, Morelli A, Guarracino F, Schwinger RH, Meyer S, Algotsson L, Wikstrom BG, Jorgensen K, Filippatos G, Parissis JT, Gonzalez MJ, Parkhomenko A, Yilmaz MB, Kivikko M, Pollesello P, Follath F. Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol* 2012;159(2):82-87.
 46. Erdei N, Papp Z, Pollesello P, Edes I, Bagi Z. The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the K(ATP) and BK(Ca) channels in rat isolated arterioles. *Br J Pharmacol* 2006;148(5):696-702.
 47. Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris NE. Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2004;68(5):807-812.
 48. Puttonen J, Laine T, Ramela M, Hakkinen S, Zhang W, Pradhan R, Pentikainen P, Koskinen M. Pharmacokinetics and excretion balance of OR-1896, a pharmacologically active metabolite of levosimendan, in healthy men. *Eur J Pharm Sci* 2007;32(4-5):271-277.

49. Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JG, Scholz H, Peuhkurinen K, Harjola VP, Mitrovic V, Abdalla M, Sandell EP, Lehtonen L, Steering C, Investigators of the Levosimendan Infusion versus Dobutamine S. Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet* 2002;360(9328):196-202.
50. Moiseyev VS, Poder P, Andrejevs N, Ruda MY, Golikov AP, Lazebnik LB, Kobalava ZD, Lehtonen LA, Laine T, Nieminen MS, Lie KI, Investigators RS. 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* 2002;23(18):1422-1432.
51. Mebazaa A, Nieminen MS, Packer M, Cohen-Solal A, Kleber FX, Pocock SJ, Thakkar R, Padley RJ, Poder P, Kivikko M, Investigators S. Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial. *JAMA* 2007;297(17):1883-1891.
52. Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Bignami E, Morelli A, Guarracino F, Zangrillo A. Effects of levosimendan on mortality and hospitalization. A meta-analysis of randomized controlled studies. *Crit Care Med* 2012;40(2):634-646.
53. Lim JY, Deo SV, Rababa'h A, Altarabsheh SE, Cho YH, Hang D, McGraw M, Avery EG, Markowitz AH, Park SJ. Levosimendan Reduces Mortality in Adults with Left Ventricular Dysfunction Undergoing Cardiac Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Card Surg* 2015;30(7):547-554.
54. Kivikko M, Pollesello P, Tarvasmaki T, Sarapohja T, Nieminen MS, Harjola VP. Effect of baseline characteristics on mortality in the SURVIVE trial on the effect of levosimendan vs dobutamine in acute heart failure: Sub-analysis of the Finnish patients. *Int J Cardiol* 2016;215:26-31.
55. Kasikcioglu HA, Cam N. A review of levosimendan in the treatment of heart failure. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2(4):389-400.
56. Nagy L, Pollesello P, Haikala H, Vegh A, Sorsa T, Levijoki J, Szilagyi S, Edes I, Toth A, Papp Z, Papp JG. ORM-3819 promotes cardiac contractility through Ca(2+) sensitization in combination with selective PDE III inhibition, a novel approach to inotropy. *Eur J Pharmacol* 2016;775:120-129.
57. Malik FI, Hartman JJ, Elias KA, Morgan BP, Rodriguez H, Brejc K, Anderson RL, Sueoka SH, Lee KH, Finer JT, Sakowicz R, Baliga R, Cox DR, Garard M, Godinez G, Kawas R, Kraynack E, Lenzi D, Lu PP, Muci A, Niu C, Qian X, Pierce DW,

- Pokrovskii M, Suehiro I, Sylvester S, Tochimoto T, Valdez C, Wang W, Katori T, Kass DA, Shen YT, Vatner SF, Morgans DJ. Cardiac myosin activation: a potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science* 2011;331(6023):1439-1443.
58. Malik FI, Morgan BP. Cardiac myosin activation part 1: from concept to clinic. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51(4):454-461.
59. Shen YT, Malik FI, Zhao X, Depre C, Dhar SK, Abarzua P, Morgans DJ, Vatner SF. Improvement of cardiac function by a cardiac Myosin activator in conscious dogs with systolic heart failure. *Circ Heart Fail* 2010;3(4):522-527.
60. Bakkehaug JP, Kildal AB, Engstad ET, Boardman N, Naesheim T, Ronning L, Aasum E, Larsen TS, Myrmel T, How OJ. Myosin Activator Omecamtiv Mecarbil Increases Myocardial Oxygen Consumption and Impairs Cardiac Efficiency Mediated by Resting Myosin ATPase Activity. *Circ Heart Fail* 2015;8(4):766-775.
61. Teerlink JR, Clarke CP, Saikali KG, Lee JH, Chen MM, Escandon RD, Elliott L, Bee R, Habibzadeh MR, Goldman JH, Schiller NB, Malik FI, Wolff AA. Dose-dependent augmentation of cardiac systolic function with the selective cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil: a first-in-man study. *Lancet* 2011;378(9792):667-675.
62. Palaparthi R, Banfield C, Alvarez P, Yan L, Smith B, Johnson J, Monsalvo ML, Malik F. Relative bioavailability, food effect, and safety of the single-dose pharmacokinetics of omecamtiv mecarbil following administration of different modified-release formulations in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2016;54(3):217-227.
63. Ottenheijm CA, Jenniskens GJ, Geraedts MC, Hafmans T, Heunks LM, van Kuppevelt TH, Dekhuijzen PN. Diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: a role for heparan sulphate? *Eur Respir J* 2007;30(1):80-89.
64. Powers SK, Kavazis AN, Levine S. Prolonged mechanical ventilation alters diaphragmatic structure and function. *Crit Care Med* 2009;37(10 Suppl):S347-353.
65. van Hees HW, Andrade Acuna G, Linkels M, Dekhuijzen PN, Heunks LM. Levosimendan improves calcium sensitivity of diaphragm muscle fibres from a rat model of heart failure. *Br J Pharmacol* 2011;162(3):566-573.
66. van Hees HW, Dekhuijzen PN, Heunks LM. Levosimendan enhances force generation of diaphragm muscle from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179(1):41-47.
67. Nagy L, Kovacs A, Bodi B, Pasztor ET, Fulop GA, Toth A, Edes I, Papp Z. The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of

- force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat. *Br J Pharmacol* 2015.
68. Fabiato A, Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Paris)* 1979;75(5):463-505.
 69. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 2005;111(6):774-781.
 70. van der Velden J, Klein LJ, van der Bijl M, Huybregts MA, Stoker W, Witkop J, Eijssman L, Visser CA, Visser FC, Stienen GJ. Isometric tension development and its calcium sensitivity in skinned myocyte-sized preparations from different regions of the human heart. *Cardiovasc Res* 1999;42(3):706-719.
 71. Fitzsimons DP, Patel JR, Moss RL. Cross-bridge interaction kinetics in rat myocardium are accelerated by strong binding of myosin to the thin filament. *J Physiol* 2001;530(Pt 2):263-272.
 72. Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* (1985) 1993;75(5):2337-2340.
 73. Bodnar D, Geyer N, Ruzsnavszky O, Olah T, Hegyi B, Sztrétye M, Fodor J, Dienes B, Balogh A, Papp Z, Szabo L, Muller G, Csernoch L, Szentesi P. Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signalling. *J Physiol* 2014;592(Pt 6):1353-1365.
 74. Webster KA, Bodi I, McNamara JP, Tracy M, Discher DJ, Bishopric NH. Negative lusitropy and abnormal calcium handling in hypoxic cardiac myocytes exposed to the calcium-sensitizer EMD 53998. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25(7):747-751.
 75. Wang Y, Ajtai K, Burghardt TP. Analytical comparison of natural and pharmaceutical ventricular myosin activators. *Biochemistry* 2014;53(32):5298-5306.
 76. Marks AR. Calcium and the heart: a question of life and death. *J Clin Invest* 2003;111(5):597-600.
 77. Moss RL, Razumova M, Fitzsimons DP. Myosin crossbridge activation of cardiac thin filaments: implications for myocardial function in health and disease. *Circ Res* 2004;94(10):1290-1300.
 78. Palmer S, Di Bello S, Herzig JW. The effects of EMD 57033 on rigor tension in porcine skinned cardiac trabecula. *Eur J Pharmacol* 1995;294(1):83-90.

79. Ishisu R, Abe Y, Onishi K, Sekioka K, Nakano T. Differential effects of EMD-53998 on calcium-pressure relationship in normal and ischemic guinea pig heart. *Am J Physiol* 1996;271(1 Pt 2):H311-319.
80. Papp Z, Van Der Velden J, Borbely A, Edes I, Stienen GJ. Effects of Ca²⁺ -sensitizers in permeabilized cardiac myocytes from donor and end-stage failing human hearts. *J Muscle Res Cell Motil* 2004;25(3):219-224.
81. Liu LC, Dorhout B, van der Meer P, Teerlink JR, Voors AA. Omecamtiv mecarbil: a novel cardiac myosin activator for the treatment of heart failure. *Expert Opin Investig Drugs* 2015.
82. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 2003;57(1):37-47.
83. Wilson K, Guggilam A, West TA, Zhang X, Trask AJ, Cismowski MJ, de Tombe P, Sadayappan S, Lucchesi PA. Effects of a myofilament calcium sensitizer on left ventricular systolic and diastolic function in rats with volume overload heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;307(11):H1605-1617.
84. Szentandrassy N, Horvath B, Vaczi K, Kistamas K, Masuda L, Magyar J, Banyasz T, Papp Z, Nanasi PP. Dose-dependent electrophysiological effects of the myosin activator omecamtiv mecarbil in canine ventricular cardiomyocytes. *J Physiol Pharmacol* 2016;67(4):483-489.
85. Liu Y, White HD, Belknap B, Winkelmann DA, Forgacs E. Omecamtiv Mecarbil modulates the kinetic and motile properties of porcine beta-cardiac myosin. *Biochemistry* 2015;54(10):1963-1975.
86. Rohde JA, Thomas DD, Muretta JM. Heart failure drug changes the mechanoenzymology of the cardiac myosin powerstroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017.
87. Swenson AM, Tang W, Blair CA, Fetrow CM, Unrath WC, Previs MJ, Campbell KS, Yengo CM. Omecamtiv Mecarbil Enhances the Duty Ratio of Human Beta Cardiac Myosin Resulting in Increased Calcium Sensitivity and Slowed Force Development in Cardiac Muscle. *J Biol Chem* 2017.
88. Poggesi C, Tesi C, Stehle R. Sarcomeric determinants of striated muscle relaxation kinetics. *Pflugers Arch* 2005;449(6):505-517.

89. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 2011;91(4):1447-1531.
90. Ochala J, Radell PJ, Eriksson LI, Larsson L. EMD 57033 partially reverses ventilator-induced diaphragm muscle fibre calcium desensitisation. *Pflugers Arch* 2010;459(3):475-483.
91. Szilagyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Edes I, Papp Z. The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 2004;486(1):67-74.
92. Lancaster MK, Cook SJ. The effects of levosimendan on $[Ca^{2+}]_i$ in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1997;339(1):97-100.
93. Schmitz W, Eschenhagen T, Mende U, Muller FU, Neumann J, Scholz H. Phosphodiesterase inhibition and positive inotropy in failing human myocardium. *Basic Res Cardiol* 1992;87 Suppl 1:65-71.
94. Ferrier GR, Zhu J, Redondo IM, Howlett SE. Role of cAMP-dependent protein kinase A in activation of a voltage-sensitive release mechanism for cardiac contraction in guinea-pig myocytes. *J Physiol* 1998;513 (Pt 1):185-201.
95. Bangash MN, Kong ML, Pearse RM. Use of inotropes and vasopressor agents in critically ill patients. *Br J Pharmacol* 2012;165(7):2015-2033.
96. Allcock RW, Blakli H, Jiang Z, Johnston KA, Morgan KM, Rosair GM, Iwase K, Kohno Y, Adams DR. Phosphodiesterase inhibitors. Part 1: Synthesis and structure-activity relationships of pyrazolopyridine-pyridazinone PDE inhibitors developed from ibudilast. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21(11):3307-3312.
97. Kaheinen P, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H. Effects of levosimendan and milrinone on oxygen consumption in isolated guinea-pig heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43(4):555-561.
98. Zausig YA, Stowe DF, Zink W, Grube C, Martin E, Graf BM. A comparison of three phosphodiesterase type III inhibitors on mechanical and metabolic function in guinea pig isolated hearts. *Anesth Analg* 2006;102(6):1646-1652.
99. Szilagyi S, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H, Bak I, Tosaki A, Borbely A, Edes I, Papp Z. Two inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46(3):369-376.

9.2. Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/177/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

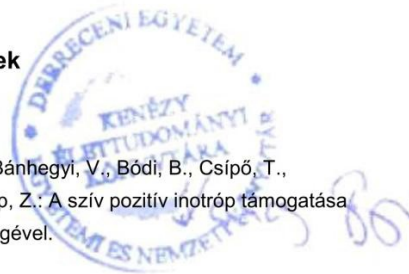
Jelölt: Nagy László
Neptun kód: HJJZL4
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10059355

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Nagy, L., Pollesello, P., Haikala, H., Végh, Á., Sorsa, T., Levijoki, J., Szilágyi, S., Édes, I., Tóth, A., Papp, Z., Papp, G. J.: ORM-3819 promotes cardiac contractility through Ca²⁺ sensitization in combination with selective PDE III inhibition, a novel approach to inotropy. Eur. J. Pharmacol. 775, 120-129, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.028>
IF: 2.73 (2015)
2. Nagy, L., Kovács, Á., Bódi, B., Pásztorné Tóth, E., Fülöp, G. Á., Tóth, A., Édes, I., Papp, Z.: The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat. Br. J. Pharmacol. 172 (18), 4506-4518, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13235>
IF: 5.259
3. Nagy, L., Pollesello, P., Papp, Z.: Inotropes and inodilators for acute heart failure: sarcomere active drugs in focus. J. Cardiovasc. Pharmacol. 64 (3), 199-208, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.000000000000113>
IF: 2.135

További közlemények

4. Nagy, L., Gödény, I., Nánási, P. P., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csipő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., Kovács, Á., Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktivátor hatású omecamtiv-mecarbil segítségével. Cardiol. Hung. 47 (1), 69-76, 2017.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



5. Kovács, Á., Papp, Z., Nagy, L.: Causes and pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction.
Heart Fail. Clin. 10 (3), 389-398, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hfc.2014.04.002>
IF: 1.844
6. Balogh, Á., Tóth, A., Pásztorné Tóth, E., Nagy, L., Kovács, Á., Kalász, J., Contreras, G. A., Édes, I., Papp, Z.: Myofilament carbonylation modulates contractility in human cardiomyocytes.
Exp. Clin. Cardiol. 20 (1), 2026-2035, 2014.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,968

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,124

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.06.14.



10. Targyszavak

- Ca^{2+} - mobilizáló
- centrálisan ható Ca^{2+} -érzékenyítő
- downstream Ca^{2+} -érzékenyítő
- gyors és lassú típusú vázizomrost
- levosimendan
- omecamtiv mecarbil
- ORM-3819
- PDE III gátlás
- szarkomert aktiváló szer
- szívizomsejt

Keywords

- Ca^{2+} -mobilizer
- cardiomyocytes
- central Ca^{2+} -sensitizer
- downstream Ca^{2+} -sensitizer
- levosimendan
- myofiber with fast and slow kinetics
- omecamtiv mecarbil
- ORM-3819
- PDE III inhibition
- sarcomere targeted agents

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Papp Zoltán* Professzor Úrnak, aki magasszintű és precíz szakmai tudásával támogatta a PhD munkámat és segített elsajátítani a kutatói szakma és az ahhoz szükséges kritikus gondolkodásmód alapjait.

Hálásan köszönöm *Dr. Tóth Attila* Professzor Úrnak a gyakorlati és elméleti tanácsaival nyújtott segítségét, melyek nélkülözhetetlen fontossággal bírtak a szakmai nehézségek leküzdéséhez.

Köszönöm *Dr. Édes István* Professzor Úrnak, aki a Kardiológiai Intézet vezetőjeként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Köszönettel tartozom *Dr. Kovács Árpádnak* és egykori TDK témavezetőmnek, *Dr. Balogh Ágnesnek*, akik nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a kísérleti technika elsajátításában, valamint Bódi Beátának a kísérletek elvégzése során nyújtott gyakorlati segítségéért.

Köszönöm a Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársainak, különösen *Mányiné Siket Ivettának* és *Pásztorné Tóth Enikőnek*, hogy megkönnyítették és támogatták a munkámat. Köszönöm a tanszék jelenlegi és volt PhD hallgatóinak a támogatását és a sok boldog emléket, illetve külön szeretnék köszönetet mondani myocya-labor összes munkatársának a támogató hozzáállását, mely megkönnyítette a beilleszkedésemet a kutatócsoportba.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni barátnőmnek, *Tóth Anna Zsófiának*, aki támogatott és lelket öntött belém a kevésbé sikeres időkben, illetve *családomnak*, különösen *Édesanyámnak*, mert az ő szeretetük és biztatásuk nélkül jelen disszertáció nem készülhetett volna el.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt, az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K 109083), és az Európai Unió FP7-HEALTH-2010: ‘MEDIA-Metabolic Road to Diastolic Heart Failure’ MEDIA-261409, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00043. számú, „Szív- és érkutatói kiválóságközpont (IRONHEART)” című projekt keretein belül valósult meg.

12. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomatait tartalmazza: