

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**ÚJ TÍPUSÚ POZITÍV INOTRÓP SZEREK HATÁSMECHANIZMUSÁNAK
VIZSGÁLATA**

Dr. Nagy László

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2017

ÚJ TÍPUSÚ POZITÍV INOTRÓP SZEREK HATÁSMECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Nagy László, általános orvos, kardiológus szakorvosjelölt

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Kerekes György, PhD
Dr. Szokodi István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2017. november 14. 11:00 óra,
Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekgyógyászati Intézet, Szontagh könyvtár

Az értekezés bírálói:

Dr. Lekli István, PhD
Dr. Zima Endre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Kerekes György, PhD
Dr. Lekli István, PhD
Dr. Szokodi István, PhD
Dr. Zima Endre, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2017. november 14. 13:00 óra
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A szívelégtelenség definíciója, epidemiológiája és klasszifikációja

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. 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.

Az Európai Kardiológus Társaság (ESC) aktuálisan érvényes irányelveiben a szívelégtelenség klasszifikációjának alapja az ejekciós frakció (EF). Ha a dekompenzáció 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). Időbeni lefutása alapján akut és krónikus szívelégtelenség különíthető el.

1.2. 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 – aldoszteron rendszer, szimpatikus tónusfokozódás, natriuretikus faktorok) lépnek működésbe, melyek rövidtávon támogatják a keringést, hosszabb távon viszont tovább terhelik a már károsodott szívet. A csökkent perctérfogat, vagy akár nyomás- és volumen-túlterhelés következtében létrejön a miokardium kompenzációs hipertrofiája. 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 átépülését (remodelling) eredményezik.

1.3. Az akut szívelégtelenség

Az akut szívelégtelenség során a kardiális dekompenzáció 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. Klinikailag

három fő formáját különíthetjük el: (1) *de novo* akut szívelégtelenség, mikor a szívelégtelenség tünetei gyors kezdettel, rapidan progrediálva, megelőző tünetek nélkül alakul ki, (2) akut fellángolás krónikus szívelégtelenség talaján, (3) terminális krónikus szívelégtelenség. A komplex klinikai kép ellenére az akut szívelégtelenség két fő, de egymással adott esetben kombinálódó formája különíthető el, ahol vagy a bal kamra csökkent pumpafunkciója (1), vagy az emelkedett szisztémás vaszkuláris ellenállás (2) dominál. Az előbbi alcsoportban a klinikai képet a balszívfél elégtelenség dominálja, melynek hátterében a szívizomzat strukturális (pl. szívinfarktus, ínhúr ruptúra, stb.), vagy funkcionális (malignus kamrai aritmia) károsodása áll. Az akut szívelégtelenség másik csoportjában a szisztémás vaszkuláris tónus és így az utóterhelés (afterload) fokozódása növeli a bal kamra töltőnyomását, mely kisvérköri pangást és következményes tüdőödémát okoz.

1.4. Az akut szívelégtelenség konvencionális gyógyszeres kezelése

Az ESC akut szívelégtelenséggel kapcsolatos irányelvei szerint a megfelelő terápia kulcsa a beteg aktuális hemodinamikai állapota, így elsősorban a centrális és perifériás keringési elégtelenség objektív jeleinek és tüneteinek felismerése. 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 dekompenzálódó beteg vérnyomása megtartott, vagy emelkedett (RR >90 Hgmm), és heveny kisvérköri pangás uralja a klinikai képet.

A 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. 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+} koncentrációt ($[\text{Ca}^{2+}]$), mely erősebb szívizom-összehúzóódásokat 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.

1.5. Klasszikus pozitív inotróp hatású szerek

A szívizom-összehúzóódás csúszó-filamentum modellje szerint a miokardium kontraktilis ereje arányos az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -val. Ezen összefüggés felismerése vezetett szívelégtelenségben azon pozitív inotróp szerek alkalmazásához, melyek növelik a szívizomsejtek $[\text{Ca}^{2+}]$ -t. A gyógyszercsoport a tradicionális inotróp, vagy Ca^{2+} -mobilizáló inotróp szerek megjelölést kapta, melyek 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 adenzin-monofoszfát (cAMP) koncentrációját, mely a proteinkináz A (PKA) aktivitás-fokozódása révén fokozza az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -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 fokozzák a szívelégtelenség mortalitását. Ennek hátterében a megnövekedett intracelluláris $[Ca^{2+}]$ áll, mely növeli a szívizomzat oxigén fogyasztását, emeli a szívfrekvenciát, másodlagos jelátviteli útvonalakat aktiválva a szívizomsejtek apoptózisát és nekrozisát eredményezi, valamint aritmogén hatású.

1.6. 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 inotróp szerek alkalmazásának kedvezőtlen következményeit, hiszen az aktin – miozin interakció hatékonyságának célzott, specifikus és közvetlen módosítása mellett nem várható az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ 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. A szarkomert aktiváló szerekkel kapcsolatban felmerül a pleiotróp hatásmechanizmus kérdése is. Jelentős részük ugyanis a miofilamentális támadáspont 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.

1.6.1. 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. 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).

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. 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. A szer nagy szelektivitással gátolja a PDE III és kifejezetten magas koncentrációk esetén a PDE IV izoenzyme aktivitását, viszont pozitív inotróp hatása terápiás koncentrációban elsősorban a Ca^{2+} -érzékenyítésnek tulajdonítható, ekkor ugyanis az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ szignifikánsan nem változik. A levosimendan mitokondriális és vaszkuláris ATP-függő K^+ -csatornák megnyitása révén kardioprotektív és vazodilatatív hatásokkal is bír. 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). 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.

A levosimendan alapvázának kémiai 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 fejti ki. Reményeik 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 csökkentheti a szívelégtelen beteg vérnyomását, a nitrátokhoz hasonlóan fejfájást eredményezhet, ritkábban hipokalémia, allergia és pitvarfibrilláció is felléphet az alkalmazása mellett. 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.

1.6.2. 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. Prototípus vegyületük, az omecamtiv mecarbil (OM) a kardiális típusú miozin feji részén található motor domén S1 régiójához kötődik. Ez a kölcsönhatás a miozin ATPáz aktivitásának alloszterikus fokozását eredményezi, gyorsítva ezzel az anorganikus foszfát (P_i) disszociációját a miozin fejeiről. Az aktin – miozin ciklus sebeség-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 szívizomzat összehúzódása során, melynek következtében növekszik a kontrakcióban részt vevő aktív kereszthidak mennyisége. Mivel a kontrakciós erő az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ fokozódása nélkül jön létre, az OM hatásmechanizmusa elviekben „downstream” mechanizmusú Ca^{2+} -érzékenyítésként is

felfogható. Korábbi tanulmányok az OM kontraktilis erő Ca^{2+} -függésére gyakorolt hatására még nem terjedtek ki, így az a saját vizsgálataink előtt nem volt ismert.

Preklinikai vizsgálatokban az OM hatékonyan fokozta patkányok bal kamrájából származó izolált, intakt szívműködés kontraktilitását *in vitro* körülmények között, anélkül, hogy befolyásolta volna az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázist. Ugyanakkor a szer nemcsak a szívműködés erejét növelte, hanem a kontrakció idejét is megnyújtotta. Az OM *in vivo* hatékonyan javította infarktusos, valamint az aorta lezárásával szívelégtelenné tett kutyák bal kamrájának szisztolés funkcióit, ugyanakkor nem befolyásolta a diasztolés funkciókat és nem növelte a szív oxigén fogyasztását. 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.

A preklinikai tanulmányok zömmel kedvező eredményei után megkezdődött az OM vizsgálata először egészséges, majd ezt követően szívelégtelen embereken is. A preklinikai vizsgálatokkal összhangban a szer intravénás adagolást követően fokozta mind az egészségesek, mind a szívelégtelen (NYHA III-IV) betegek bal kamrájának szisztolés funkcióit, 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 szisztolés idejének túlzott megnyújtása és ezzel összhangban a diasztolés intervallum megrövidülése állhatott. 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. A COSMIC-HF tanulmányban a krónikus szívelégtelenségben (HFrEF) szenvedő betegek bal kamrájának szisztolés paraméterei viszont jelentős javulást mutattak OM hatására. A preklinikai és klinikai adatok mellett egyelőre még nincs evidencia az OM hosszú távú hatásairól, illetve a szívelégtelenség mortalitására gyakorolt hatásáról sem.

1.7. Szarkomer aktív szerek alkalmazása más kórállapotokban

Az akut, illetve krónikus szívelégtelenség a légzésben részt vevő izmok csökkent kontraktilitásával is együtt jár. Tartós gépi lélegeztetés után, krónikus obstruktív tüdőbetegségekben (COPD), valamint neuromuszkuláris betegségekben a rekeszizom csökkent és a többi légzőizom diszfunkciója súlyosbítja a fennálló légzési elégtelenséget. Ezen változások hátterében kimutatták a rekeszizom eredetű vázizomrostok csökkent Ca^{2+} -érzékenységet. 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. Klinikai tanulmányok *in vivo* is igazolták a levosimendan hatékonyságát, javítva a COPD-ben szenvedő, illetve tartósan gépi lélegeztetett betegek légzésfunkcióit. 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 tartalmaznak. 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.

2. 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 szívizom kontraktilitásra kifejtett mechanikai ($\Delta p\text{Ca}_{50}$, n_{Hill} , F_{max} , $F_{\text{aktív}}$, $F_{\text{passzív}}$) és kinetikai (k_{tr} , $t_{1/2\text{akt}}$, 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 az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő képességét,
- azonosítsuk az ORM-3819 pozitív inotróp hatásának hátterében álló egyéb pleiotróp farmakológiai mechanizmusokat (PDE III/IV gátlás).

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált szövetminták és anyagok

Az OM-mel 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. Az állatokat standard körülmények között a Debreceni Egyetem állatházában tartottuk. Vizsgálataink végig összhangban voltak a Debreceni Egyetem etikai szabályzatával (Etikai Engedély száma: 1/2013/DE MÁB). Az OM-t az AdooQ BioScience-től szereztük be, míg az ORM-3819-et pedig finn kollaborációs partnerünk, az Orion Pharma biztosította, melyekből DMSO-ban oldva 10 mM koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. A törzsoldatokat ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) 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.

3.2. In vitro izometrikus erőmérések izolált és permeabilizált szívizomsejteken

A celluláris szintű izometrikus erőmérés során mechanikailag izolált és kémiai 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 helyeztük, majd -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 detergens, mely permeabilizálta a kezelt sejtek membránrendszerét, így olyan membránfosztott preparátumokat kaptunk, melyeken kontrollált, standardizált körülmények között végezhetünk kontraktilis erőméréseket, általunk meghatározott összetételű tesztoldatokkal. Méréseinket így nem befolyásolta az extra- és intracelluláris miliő, 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, vagy vázizomrostokat szilikon tartalmú akváriumragasztóval (DAP 100%, Baltimore, USA) egy elektromágneses motorhoz (Aurora Scientific Inc., Aurora, Canada), illetve egy érzékeny erőmérőhöz (Sensonor, Horten, Norway) kapcsolt rozsdamentes acél-tűpárhoz rögzítettük. Video-mikroszkópos ellenőrzés mellett a preparátumok szarkomerhosszát 2,3 μm -re állítottuk be, majd méréseinket ezt követően 15 °C-on végeztük. 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. 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 az aktiváló és relaxáló törzsoldat $[\text{Ca}^{2+}]$ -ja pCa 4,75 és 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 (F_{max}) 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. Az aktív izometrikus erőt ($F_{\text{aktív}}$) az $F_{\text{totál}}$ és $F_{\text{passzív}}$ különbségéből számoltuk ki, mely a szisztolés funkciót reprezentálta egy adott szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -n. Méréseink végén egy tükör segítségével meghatározzuk 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 összehúzódások erejét, majd az $F_{\max}$ és $F_{\text{aktív}}$ értékeket a $[\text{Ca}^{2+}]$ függvényében ábrázoltuk. Ekkor a $[\text{Ca}^{2+}]$ – 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 (pCa_{50}) reprezentálta.

A preparátumok mechanikai paraméterein ($F_{\max}$, $F_{\text{aktív}}$, $F_{\text{passzív}}$, n_{Hill} , pCa_{50}) kívül meghatároztuk az izom-összehúzódások 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 ($t_{1/2\text{akt}}$) a preparátum aktiváló oldatba helyezésétől a félmaximális erő eléréséig eltelt időt, míg relaxációs időnek (t_{relax}) pedig a relaxáló oldatba helyezéstől az $F_{\text{aktív}}$ alapvonalra történő csökkenéséig eltelt idejét tekintettük. Minden egyes mérési sorozat végén a preparátumok stabilitását szaturáló $[\text{Ca}^{2+}]$ -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, 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

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

A patkányokból származó rekeszizom és bal kamrai szívizomminták MHC összetételének vizsgálata SDS poliakrilamid gél-elektroforézis alkalmazásával történt. A fagyasztott mintákat homogenizáltuk, majd speciális pufferben 2 percig főztük. Az így kapott homogenizátumokból hígítással előkészített mintákat készítettük egy felső és alsó gélből álló rendszerre vittük fel, majd 24 óráig 4 °C-on történt futtatás után a géleket végül Coomassie Blue festékkel festettük.

4. Eredmények

4.1. Az OM pozitív inotróp hatásának farmakológiai jellemzése

4.1.1. Az OM izolált patkány szívizomsejtek mechanikai paramétereire gyakorolt hatása

Első lépésben az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatását demonstráltuk patkányok bal kamrai szívizomsejtjein. Az izolált és permeabilizált szívizomsejteket méréseink elején OM-et nem tartalmazó tesztoldatokkal kezeltük annak céljából, hogy meghatározzuk a kontroll $F_{\max}$ értéket (pCa 4,75), illetve rögzíthessük egy szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -n (pCa 6,1) is a kezeletlen kontroll csoportra jellemző $F_{\text{aktív}}$ szintet. A szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -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. 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, $P < 0,001$; $n = 8$ különböző szívműködősejt). Az OM Ca^{2+} -érzékenyítő képességének számszerűsítése a koncentráció – hatás összefüggés farmakológiai félértéke (EC_{50}), valamint a ΔpCa_{50} révén volt lehetséges. Amennyiben a szerkoncentráció – $F_{\text{aktív}}$ összefüggés 3 nM és 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 tudtunk rendelni.

A ΔpCa_{50} -et a $[\text{Ca}^{2+}]$ – kontraktilis erő összefüggés alapján tanulmányoztuk állandó OM koncentrációk alkalmazása mellett. 0,1 és 1 μM OM szignifikáns mértékben fokozta a szívműködősejtek Ca^{2+} -érzékenységet, amelyet a görbe balra tolódása reprezentált. 1 μM -os szerkoncentráció mellett a $[\text{Ca}^{2+}]$ – kontraktilis erő összefüggés alsó része (pCa 7,0 – pCa 9,0) felfelé tolódott, amely diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ szinteken bekövetkező Ca^{2+} -érzékenyítést sugall. Ha abszolút egységekben ábrázoltuk az izometriás erő értékeket, akkor magas $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú (pCa 4,75 – 5,6) tesztoldatokban az OM csökkentette a preparátumok F_{max} értékét. 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 μM és 1 μM OM koncentrációjú oldatokban, $P < 0,001$). 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 μM és 1 μM OM jelenlétében $1,66 \pm 0,06$ és $0,97 \pm 0,07$ értékeket vett fel; $P < 0,001$; $n = 8$ különböző szívműködősejt).

Kísérleteink következő lépésében a pCa – kontraktilis erő összefüggésen tapasztalt F_{max} OM-függő csökkenésére, valamint az alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ -n kialakult Ca^{2+} -érzékenyítésre koncentráltunk a korábbiaknál szélesebb OM koncentráció tartományban (10 nM – 10 μM). Az OM 1 μM -os és annál nagyobb koncentrációkban csökkentette a preparátumok Ca^{2+} -függő 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; $P < 0,001$; $n = 8$). 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 (pCa 6,1) bemutatott koncentráció – hatás 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 $1,77 \pm 0,18 \text{ kN/m}^2$ erő értékeket mértünk, $P < 0,01$; $n = 6$).

Az OM az $F_{\text{passzív}}$ komponenst is befolyásolta ($F_{\text{passzív}}$ OM nélkül $1,2 \pm 0,12 \text{ kN/m}^2$ volt, míg 0,3 μM OM jelenlétében $2,29 \pm 0,31 \text{ kN/m}^2$ erő értéket mértünk; $P < 0,001$; $n = 8$). Az $F_{\text{passzív}}$ -ra gyakorolt hatás farmakológiai félértéke $0,31 \pm 0,1 \mu\text{M}$ volt.

4.1.2. Az OM hatása a szívizomsejtek kinetikai paramétereire

A továbbiakban az OM izolált szívizomsejtek kinetikájára (k_{tr} , $t_{1/2akt}$, t_{relax}) kifejtett hatásainak vizsgálatára összpontosítottunk szaturáló (pCa 4,75) és a fiziológias szisztolés $[Ca^{2+}]$ -t jobban reprezentáló szubmaximális (pCa 6,0) $[Ca^{2+}]$ szintek mellett széles OM-koncentráció tartományban (3 nM – 10 μ M). Méréseinket 8 db individuális preparátumon végeztük.

Telítő $[Ca^{2+}]$ -n az OM csökkentette a k_{tr} -t (a kontroll szermentes k_{tr} : $5,70 \pm 0,33$ 1/s volt, míg 10 nM OM jelenlétében már $4,44 \pm 0,37$ 1/s értékre csökkent, $P < 0,01$). A hatás farmakológiai félértéke (EC_{50}) $0,05 \pm 0,01$ μ M mellett volt megfigyelhető. Szubmaximális $[Ca^{2+}]$ -n az OM k_{tr} -re gyakorolt hatása bifázisosnak bizonyult, hiszen 0,1 μ M OM kismértékben 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, $P < 0,05$). Nagyobb OM koncentrációk alkalmazásakor a k_{tr} ennél a $[Ca^{2+}]$ -nál is csökkent.

Az OM hatására 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 $2,55 \pm 0,9$ 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; $P < 0,001$).

4.2. Az OM izolált vázizomsejtekre gyakorolt hatásai

Az OM izolált vázizomrostokra gyakorolt hatásainak értékelését nehezítette, hogy a vázizomzat különböző MHC összetételű rostokból áll, melyek leegyszerűsítve lassú [MHC I (β)] és gyors (MHC II a, x, b) típusokra oszthatóak fel. Biokémiai vizsgálatainkban a preparátumok parányi volta miatt nem nyílt lehetőség az izolált és permeabilizált vázizomrostok MHC összetételének közvetlen meghatározására. Irodalmi adatok birtokában az aktin – miozin ciklus sebességi állandója segítségül 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. A két rosttípus közötti elkülönítésre irodalmi adatok tükrében a $k_{tr} = 2,0$ 1/s értéket tekintettük határvonalként.

4.2.1. 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. Szubmaximális $[Ca^{2+}]$ mellett 0,1 μ M koncentrációtól a szer szignifikáns mértékben fokozta az izolált vázizomrostok $F_{aktív}$ paraméterét (kontroll $F_{aktív}$: $4,77 \pm 1,05$ kN/m² vs. $9,73 \pm 1,4$ kN/m² 0,1

μM OM jelenlétében, $P < 0,001$), mely hatás maximuma a $0,3 \mu\text{M} - 1 \mu\text{M}$ közötti tartományban jött létre, míg ennél nagyobb OM koncentrációk mellett a szer kontraktilitást fokozó hatása mérséklődött. Ha koncentráció – $F_{\text{aktív}}$ diagramot a plató szakasz végéig ($1 \mu\text{M}$) egy szigmoid összefüggés segítségével illesztettük, a szer koncentráció-függő hatását $0,16 \pm 0,03 \mu\text{M}$ félérték segítségével illusztrálhattuk ($n = 14$ db izolált vázizomrost).

Az OM lassú típusú vázizomrostokra ($k_{\text{tr,max}}: 1,50 \pm 0,10 \text{ 1/s}$) gyakorolt Ca^{2+} -érzékenyítő hatását a kontraktilis erő Ca^{2+} -függésének meghatározásával demonstráltuk a maximális kontraktilis választ generáló $1 \mu\text{M}$ -os OM jelenlétében és OM-t nem tartalmazó tesztoldatokban. Az OM fokozta az izolált lassú endogén kinetikájú vázizomrostok Ca^{2+} -érzékenységét (a pCa_{50} OM nélkül $5,61 \pm 0,02$, míg $1 \mu\text{M}$ OM-et tartalmazó tesztoldatban $5,85 \pm 0,03$ volt; $P < 0,001$; $n = 9$). A szívizomsejtekkel ellentétben $1 \mu\text{M}$ OM vázizomrostokon nem csökkentette az F_{max} -ot, illetve diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ -n sem jött létre Ca^{2+} -érzékenyítés.

Habár $1 \mu\text{M}$ OM szignifikánsan nem változtatta meg a $\text{pCa} - \text{kontraktilis erő}$ összefüggés F_{max} értékét, szélesebb koncentráció tartományban ($10 \text{ nM} - 10 \mu\text{M}$) is megvizsgáltuk az OM fenti paraméterre feltételezett hatását. Eredményeink szerint $3 \mu\text{M}$ 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 $3 \mu\text{M}$ OM jelenlétében $13,26 \pm 1,78 \text{ kN/m}^2$ értékre csökkent, $P < 0,001$). $1 \mu\text{M}$ és annál nagyobb koncentrációjú 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 $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében $1,75 \pm 0,42 \text{ kN/m}^2$ értéket vett fel, $P < 0,05$), mely hatás EC_{50} értéke $0,79 \pm 0,16 \mu\text{M}$ volt.

4.2.2. Az OM hatása a lassú típusú vázizomrostok kinetikai paramétereire

Az OM csökkentette a k_{tr} paramétert mindkét $[\text{Ca}^{2+}]$ -n. Ez a hatás kifejezettebb volt szaturáló $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú tesztoldatokban ($\text{pCa } 4,75$ mellett az EC_{50} : $0,13 \pm 0,09 \mu\text{M}$ volt, míg $\text{pCa } 6,0$ -n $0,29 \pm 0,04 \mu\text{M}$ -nak adódott. Az OM lassította a vázizomsejtek kontrakciós válaszainak és relaxációinak sebességét $\text{pCa } 4,75$ és $\text{pCa } 6,0$ $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú tesztoldatokban. Mindezt a kontrakciós (a $t_{1/2\text{akt}}$ szermentes kontroll körülmények között és $\text{pCa } 4,75$ mellett $5,99 \pm 0,98 \text{ s}$ volt, míg az $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében $13,98 \pm 1,46 \text{ s}$ értéket vett fel, $P < 0,001$; a $t_{1/2\text{akt}}$ szermentes kontroll körülmények között és $\text{pCa } 6,0$ mellett $6,96 \pm 0,86 \text{ s}$ volt, míg $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében $10,50 \pm 0,93 \text{ s}$ értéket vett fel, $P < 0,001$) és relaxációs idő növekedése is tükrözte (a szermentes kontroll t_{relax} $\text{pCa } 4,75$ mellett $3,15 \pm 0,68 \text{ s}$ volt, míg az $0,3 \mu\text{M}$ OM jelenlétében $5,49 \pm 0,81 \text{ s}$ volt, $P < 0,05$; a szermentes kontroll t_{relax} $\text{pCa } 6,0$ mellett $0,86 \pm 0,09 \text{ s}$ volt, míg $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében $7,26 \pm 0,83 \text{ s}$ érték adódott, $P < 0,01$; $n = 11-14$).

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

Az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatása révén szubmaximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -n $1 \mu\text{M}$ és annál nagyobb koncentrációkban fokozta a gyors endogén kinetikával ($4,40 \pm 0,29 \text{ 1/s}$) rendelkező vázizomrostok $F_{\text{aktív}}$ -ját (a szermentes kontroll $F_{\text{aktív}}$ $4,59 \pm 0,99 \text{ kN/m}^2$ volt, míg $1 \mu\text{M}$ OM jelenlétében ugyanerre az adatra $6,97 \pm 1,3 \text{ kN/m}^2$ érték adódott, $\text{pCa } 5,8$, $P < 0,05$), ugyanakkor az izolált

szívizomsejtekben és lassú típusú vázizomrostokban látottakkal ellentétben harang-alakú koncentráció-függés nem volt megfigyelhető. 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. Az OM nem fokozta a gyors kinetikát mutató vázizomrostok Ca^{2+} -független $F_{passzív}$ -ját sem.

Az OM csak szaturáló $[Ca^{2+}]$ -n csökkentette a gyors endogén kinetikájú vázizomrostok k_{tr} értékeit, mely a szívizomsejtekben és a lassú kinetikájú vázizomrostokban kifejtett hatásoknál kisebb affinitásúnak bizonyult (EC_{50} : 1,08 μM). Az OM minimálisan befolyásolta a gyors kinetikájú vázizomrost preparátumok kontrakciós idejét, hatása csak pCa 5,8 $[Ca^{2+}]$ -jú tesztoldatokban volt kimutatható a legnagyobb alkalmazott – 10 μM -os – koncentrációban (a kontroll szermentes $t_{1/2akt}$ $8,33 \pm 0,70$ s volt, és az 10 μM OM jelenlétében $4,92 \pm 0,96$ s értéket vett fel, $P < 0,01$), míg a relaxáció ideje nem változott. Méréseinket 6 – 6 db izolált és permeabilizált vázizomroston végeztük.

4.3. 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. Tengerimalac eredetű izolált és permeabilizált bal kamrai szívizomsejteket pCa 5,8 $[Ca^{2+}]$ mellett növekvő OM koncentrációjú tesztoldatokkal kezeltük (0,1 μM – 10 μM), mialatt regisztráltuk a preparátumok $F_{aktív}$ -ját. A szer 3 μM és nagyobb koncentrációkban szignifikánsan fokozta a preparátumok kontraktilis erejét (a szermentes kontroll $F_{aktív}$ $3,38 \pm 0,32$ kN/m² volt, míg 3 μM ORM-3819 jelenlétében $4,77 \pm 0,4$ kN/m² értéket kaptunk, $P < 0,05$; $n = 10$), mely hatás maximuma a 10 μM és 100 μM közötti koncentráció tartományban alakult ki. Az ORM-3819-függő Ca^{2+} -érzékenyítés EC_{50} értéke $2,88 \pm 0,14$ μM volt.

Az ORM-3819 Ca^{2+} -érzékenyítő hatásának számszerűsítésére a 10 μM koncentrációt használtuk, mivel 10 μM , 30 μM és 100 μM ORM-3819 hozzávetőleg ugyanakkora választ váltott ki. Az alkalmazott koncentrációban a szer a pCa – izometrikus erő összefüggés balra tolódását eredményezte a kontroll mérésorozathoz képest, amely a Ca^{2+} -érzékenység fokozódására utalt (pCa₅₀: $5,69 \pm 0,01$ ORM-3819 nélkül és $5,80 \pm 0,01$ 10 μM ORM-3819 jelenlétében; ΔpCa_{50} : $0,11 \pm 0,01$; $P < 0,01$; $n = 10$). Az ORM-3819 nem befolyásolta a preparátumok F_{max} értékét, valamint hatása elsősorban a szubmaximális $[Ca^{2+}]$ tartományban volt meggyőző, míg 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.

Kísérleteink következő lépéseként széles ORM-3819 koncentráció tartományban (0,3 μM – 10 μM) azt vizsgáltuk, hogy a szer Ca^{2+} -érzékenyítő hatását milyen kinetikai változások követik.

Méréseink során 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 méréssorozatot 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 ($P < 0,05$; $n = 10$). Az alábbi kinetikai hatások farmakológiai félértéke $5,34 \pm 0,45$ μM volt. 10 μM – 100 μM ORM-3819 jelenlétében a szívmusclejtek kontrakciója vizuálisan gyorsabbnak tűnt, ugyanakkor ez a szerhatás a statisztikai szignifikancia mértékét nem érte el. Az ORM-3819 szintén nem befolyásolta a preparátumok relaxációs idejét.

5. 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 szívmusclejteken 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 szívmusclejtek Ca^{2+} -érzékenységét, lassítja ezek aktivációs – relaxációs ciklusának kinetikáját, növeli a Ca^{2+} -független $F_{passzív}$ -ot, valamint alacsony $[Ca^{2+}]$ -n is Ca^{2+} érzékenyít. Az OM némileg kisebb hatékonysággal, de a szívmusclejtek kapcsán leírt változásokhoz hasonló mechanikai és kinetikai hatásokkal rendelkező rekeszizomból származó, lassú endogén kinetikával rendelkező vázizomrostokon is. Megállapítottuk, hogy az ORM-3819 az OM-hez hasonlóan szintén Ca^{2+} -érzékenyítő izolált szívmusclejteken, az OM-től eltérő kinetikai és mechanikai hatásokkal.

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 ezen hatására, hiszen a szer fokozta a miofilamentumok ATPáz aktivitásának Ca^{2+} -érzékenységét. 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 jelenti. Ha a cTnC – Ca^{2+} interakciót tekintjük a kontraktilitás alappillérenek, hatásmechanizmusuk alapján centrálisan ható, illetve „downstream” típusú Ca^{2+} -érzékenyítő szerek különíthetők el. Így az OM elsősorban egy „downstream” típusú Ca^{2+} -érzékenyítő, mivel az aktin – miozin interakció hatékonyságának fokozása révén fejti ki a hatását, maga a miozin aktiváció pedig a Ca^{2+} -érzékenyítés egyik mechanizmusának tekinthető. A Ca^{2+} -érzékenyítés jellemezhető továbbá azáltal is, hogy milyen $[Ca^{2+}]$ tartományban dominál. A

szisztolés és diasztolés fázisában igen nehéz megbecsülni az élettani $[Ca^{2+}]$ -t, hiszen az a szarkolemma ioncsatornáin keresztül megvalósuló ionáramok, illetve az SR transzport folyamatai révén állandóan fluktuál. Durva becsléssel élettani körülmények között a szisztolés $[Ca^{2+}]$ 1 μM , amely körülbelül pCa 6,0-nak felel meg, míg diasztolés során a $[Ca^{2+}]$ 10 nM körüli értékre csökken ($\sim$ pCa 7,0). A centrálisan ható szerek (levosimendan) Ca^{2+} -érzékenyítő hatása elsősorban a fiziológiás szisztolés $[Ca^{2+}]$ -n érvényesül, míg a „downstream” típusú szerek viszont akár diasztolés és szuprafiziológiás $[Ca^{2+}]$ -n is fokozhatják a miokardiális kontraktilitást. A „downstream” támadáspontú OM alacsony (0,1 μM) koncentrációban a centrálisan ható szerekhez hasonlóan kizárólag szisztolés $[Ca^{2+}]$ mellett hatott, 1 μM koncentrációban viszont diasztolés, szisztolés és szaturáló $[Ca^{2+}]$ -n is befolyásolta a szívizomsejtek kontraktilitását. A Ca^{2+} -érzékenyítés 1 μM OM jelenlétében is kifejlődött, viszont szaturáló, vagy azt megközelítő $[Ca^{2+}]$ -n a szívizomsejtek izometrikus ereje csökkent. Ennek hátterében az állhat, hogy egyrészt a szaturáló $[Ca^{2+}]$ -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 aktiválódását eredményezheti, mely akadályozza a maximális kontraktilis válasz kialakulását. 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+} -függésével, mely magyarázatot szolgáltat a diasztolés $[Ca^{2+}]$ -n megvalósuló kontraktilis erő növekedésre, hiszen Malik és munkatársai pCa < 7,0 $[Ca^{2+}]$ -jú testoldatokban az ATPáz aktivitás OM-függő fokozódását észlelték. A diasztolés $[Ca^{2+}]$ -n létrejövő Ca^{2+} -érzékenyítés felveti a diasztolés diszfunkció okozásának veszélyét. Kinetikai tanulmányok kimutatták, hogy a szer lassítja az aktin – miozin komplex disszociációját a P_i , illetve az ADP leválását követően. Mindezen folyamatok eredményeképpen növekedhet a szívizomsejtek $F_{passzív}$ -ja, illetve lassulhat a relaxáció, melyet *in vitro* eredményeink is megerősítettek. A diasztolés diszfunkció veszélyét az OM-mel végzett kezelés kapcsán tovább fokozhatja a szívizomsejtek HFrEF-ben leírt kóros Ca^{2+} -homeosztázisa. Szívelégtelenségben ugyanis a kontraktilitás csökkenésére adott kompenzációs mechanizmusként fokozódhat a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége. Az OM-indukált diasztolés Ca^{2+} -érzékenyítést tovább komplikálhatja a szívizomsejtek emelkedett citoszolikus $[Ca^{2+}]$ -ja. 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. 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. *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, viszont az *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 terápiais intracelluláris koncentrációja, mely magyarázhatja az eltéréseket az *in vitro* és az *in vivo* adatok között.

Az OM hatásmechanizmusának kulcsát a korábbi tanulmányok elsősorban az ATPáz aktivitás fokozásában látták. Újabb tanulmányok szerint viszont az OM mérsékli az aktin – miozin ciklus összesített ATPáz aktivitását, csak az ATP hidrolízisét és a P_i disszociációjának ütemét fokozza a miozin fejekről. A P_i disszociációjának gyorsítása ellent mond a keresztkötési ciklus sebesség-csökkenésének, melynek közvetlen következménye az izolált és permeabilizált szívizomsejtek kontrakciós idejének növekedése. A kontrakció megnyúlásának hátterében az állhat, hogy az OM már alacsony koncentrációban csökkentette a k_{tr} -t pCa 4,75 $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú tesztoldatokban, míg pCa 6,0 mellett a hatása csak magasabb koncentráció tartományban alakult ki, hiszen az OM Ca^{2+} -érzékenyítő hatása – mely egyébként gyorsabb kontrakciókhoz vezetne – részben kompenzálja a szer az aktin – miozin ciklus sebességére gyakorolt negatív kinetikai hatásait. *In vitro* motilitási assay-k is megerősítették, hogy OM hatására csökken az aktin filamentumok miozin-függő elmozdulásának sebessége. 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. OM hatására tehát erősebb, tartósabb és lassabb szívizom összehúzódások alakulnak ki. A szer hatásmechanizmusának alapja a P_i disszociációjának fokozódása és a kontrakció kinetikájának lassítása közötti indirekt kapcsolat. Az OM ugyanis nem fokozza, 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 el, mely a vékony filamentumok között egy kooperatív folyamatot indít el, növelve ezzel a filamentumok Ca^{2+} -érzékenységet. 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. Így az OM-et enzimológiai szempontból nem tekinthetjük szigorúan miozin aktivátornak, hanem inkább az aktin – miozin ciklus alloszterikus modulátorának.

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 IIa, x, b) mellett lassú, azaz β -MHC-t (MHC-I) tartalmazó rostokból áll, mely utóbbi a kardiális miozinnal teljes mértékben megegyezik. 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 >2 1/s. Lassú típusú vázizomrostokban szívizomsejtekre nagymértékben hasonlító kinetikai és mechanikai OM hatások jöttek létre, melynek hátterében a két különböző szövet azonos típusú MHC tartalma állhat. 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 $[Ca^{2+}]_i$ -n a kontraktilitás enyhe fokozódása mellett más hatását nem sikerült kimutatni, míg szaturáló $[Ca^{2+}]_i$ mellett a k_{tr} csökkenését figyeltük meg. 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. 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. A vázizomrostok Ca^{2+} -érzékenyítése révén a jövőben az OM-t a vázizomzat krónikus elgyengülésével járó kórképekben is kipróbálhatják, mint alternatív terápiás eszközt. 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.

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, ugyanakkor a levosimendannál kisebb affinitással. Mindez összhangban van izolált és permeabilizált tengerimalac eredetű szívizomsejteken végzett kontraktilis erőméréseink eredményeivel. Az ORM-3819 ugyanis a levosimendannal arányos

mértékben (ΔpCa_{50} egyaránt $\sim 0,1$ a levosimendan és annak aktív származéka, az OR-1896, valamint az ORM-3819 esetében), ugyanakkor nagyságrendekkel kisebb affinitással fokozta a szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységet (EC_{50} : 9 nM a levosimendan és $\sim 3 \mu M$ az ORM-3819 esetében). Hasonló nagyságrendű különbséget találtunk az ORM-3819 *in vitro* Ca^{2+} -érzékenyítésének és az *ex vivo* pozitív inotróp hatásának EC_{50} értékei között ($\sim 3 \mu M$ vs. ~ 9 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 (az adatokat nem mutatjuk). A PDE gátlás egy alternatív lehetőség lehet a szívizomsejtek kontraktilitásának farmakológiai fokozására. Kollaborációs partnereink igazolták az ORM-3819 PDE gátló képességét, hiszen a szer már alacsony koncentrációban (EC_{50} : ~ 4 nM) gátolta a PDE III aktivitását, míg a PDE IV esetén nem sikerült teljes farmakológiai gátlást elérniük (EC_{50} : $\sim 5 \mu M$). A PDE III gátlásban vélhetően az ORM-3819 pyridazinon gyűrűjének szubsztituátlan nitrogénje a kulcs, mely a PDE III katalitikus doménjével direkt interakcióba lép. 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. 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. 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.

6. 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 omecamtiv 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 szívmusclejtek kontraktilitásának mechanikai és kinetikai paramétereire gyakorolt hatásait, valamint igazoljuk az OM szöveti szelektivitását rekeszmuscle eredetű vázizmusratokon végzett kontraktilis erőmérésekkel. Az OM növelte a szívmusclejtek Ca^{2+} -érzékenységet, 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 szívmusclejtek $F_{\text{passzív}}$ -ját, illetve az $F_{\text{aktív}}$ -ját diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]$ szinteken. A miozin aktiváció eredményeként lassabb és tartósabb Ca^{2+} -kontrakciókat regisztráltunk, hiszen csökkent az aktin – miozin kereszthidak sebességi állandója. A szívmusclejteken tapasztaltakhoz hasonló jellegű, de kisebb affinitású OM-hatásokat regisztráltunk lassú endogén kinetikájú vázizmusratok esetében, míg gyors típusú vázizmusratok esetén az OM hatása minimálisnak bizonyult a terápiás dózisokkal identikus koncentráció-tartományban. A levosimendan származék ORM-3819 szintén fokozta a szívmusclejtek Ca^{2+} -érzékenységet az OM-tól eltérő mechanikai illetve kinetikai hatásokkal. A cTnC-függő Ca^{2+} -érzékenyítés következtében erőteljesebb és gyorsabb Ca^{2+} -kontrakciók 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.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Papp Zoltán* Professzor Úrnak, aki magas szintű 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 Attilán* 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 myocyta-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 érutatási kiválóságközpont (IRONHEART)” című projekt keretein belül valósult meg.

8. Függelék



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

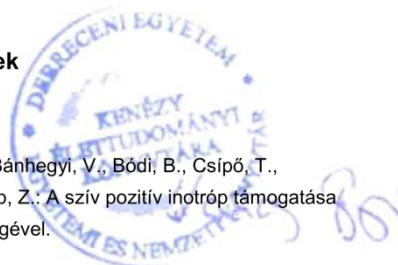
Jelölt: Nagy László
Neptun kód: HJJZL4
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10059355

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., Csípő, 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.06.14.

