

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Tézisek

**A MYOFIBRILLÁRIS KONTRAKTILIS FUNKCIÓ
MOLEKULÁRIS MEGHATÁROZÓI A SZÍVBEN**

Dr. Szilágyi Szabolcs

Témavezetők:

Prof. Dr. Guy Vassort

Dr. Papp Zoltán

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,

Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék

és

Montpellier-i I-es Egyetem,

Orvostudományi Kar

2005

Témavezetők:

Prof. Dr. Guy Vassort

Dr. Papp Zoltán

A Szigorlati Bizottság elnöke:

A Szigorlati Bizottság tagjai:

A Védési Bizottság elnöke:

Opponensek:

BEVEZETÉS

A manapság is elfogadhatatlanul magas mortbiditással és mortalitással járó krónikus szívelégtelenség (CHF) kiemelkedő fontosságú népegészségügyi problémát jelent a fejlett társadalmakban. Az új terápiás eszközök, valamint a napjainkban átértékelt kezelési stratégiák ellenére a CHF pognóza továbbra is rossz. Ezek a könyörtelen tények egyértelműen kihangsúlyozzák a CHF patomechanizmusának mélyebb megismerésére irányuló kutatások szükségességét. Az új felismerések lehetővé tehetik a jelenlegi kezelések hatékonyságának növelését, újabbak kifejlesztését.

A végdisztolés telődés emelkedése a myocardium kontraktilitásának növekedését eredményezi. A Frank-Starling törvény szabályozásában résztvevő mechanizmusok azonban még nem teljesen ismertek. Számos mechanizmus szerepét feltételezik, mint például a troponin C szarkomerhossz (SL)-függő kalcium érzékenység-fokozódása, valamint a nyújtás következtében lecsökkent aktin-miozin távolság és ennek következtében az aktin-miozin kölcsönhatás valószínűségének növekedése. Továbbá, a passzív tenzió változásai mind direkt, mind indirekt módon hatással lehetnek az aktin-miozin kölcsönhatásra. A szív pumpafunkciója CHF-ben nagymértékben megváltozik. A Frank-Starling mechanizmus, valamint a myofilamentumok kalcium érzékenységének CHF-ben feltételezett változásaira vonatkozó ismereteink ellentmondásosak. A kontraktilis fehérjék mennyisége, eloszlása és foszforilációs állapota szintén nem tisztázott. Például, a miozin könnyűlánc 2 (MLC2) mennyiségének csökkenését és foszforilációs állapotainak különféle eltéréseit írták le CHF-ben. Az MLC2-ről ismert, hogy foszforilációja a Ca^{2+} érzékenység emelkedésével jár, így az MLC2 foszforilációs szintjének alakulása CHF-ben a kontraktilis erő meghatározásának szempontjából kiemelkedő fontossággal bír. Szintén megemlítendő, hogy korábbi vizsgálatok a szívizomsejtek elektromos és passzív mechanikai tulajdonságainak regionális eltéréseit igazolták. Munkánk során

ezért a stretch-függő mechanikai tulajdonságok kontroll és szívelégtelen szívben történő vizsgálata során figyelembe vettük a myofilamentumok szívizomfalban való elhelyezkedését is.

A vastag filamentumok alkotórészeként ismert kardiális myozin-kötő C-fehérje (cMyBP-C) kizárólag a szívben expresszálódik. Speciális foszforilációs helyek mellett az aktin, a titin és a miozin számára is rendelkezik kötőhellyel. A többi szarkomerfehérjével létesített többszörös kapcsolat a fehérje szerkezeti és szabályozásban betöltött szerepét valószínűsíti. A cMyBP-C humán génjének mutációit valóban kimutatták a familáris hypertrophiás cardiomyopathia egyes eseteiben. Mindezek ellenére a cMyBP-C szerepe a kontraktilitás szabályozásában, valamint a myofilamentumok SL-függő aktivációjában továbbra is ellentmondásos. Korábbi vizsgálatokban a cMyBP-C funkciójának gátlása következtében a myofilamentumok Ca^{2+} -ra adott válaszkészsége nőtt, nem változott, vagy éppen csökkent. A protein kináz A (PKA) számos kontraktilis fehérje mellett a cMyBP-C-t is foszforilálja, a foszforiláció pedig a myofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységének csökkenésével jár. A cMyBP-C PKA-foszforilációjáról kimutatták, hogy módosítja mind a fehérje aktinnal és miozinnal való kölcsönhatását, mind pedig a miozin-ATPáz aktivitását. A natív cTnI helyettesítése a PKA-val nem foszforolálható lassú vázizom típusú TnI izoformával (ssTnI) a PKA Ca^{2+} -érzékenységre gyakorolt hatásának megszűnését eredményezte. Ennek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a PKA aktív myofilamentum kontraktilitásra gyakorolt hatása kizárólag a cTnI-n keresztül érvényesül, annak közvetítésében a cMyBP-C nem vesz részt. Ezzel szemben a Carrier és munkatársai által létrehozott cMyBP-C knock out egér modell a bal kamrai relaxáció egyértelmű zavarát mutatta. Ez a megfigyelés felveti a Ca^{2+} -szenzitizáció cMyBP-C hiányában bekövetkező változásának lehetőségét.

Klinikai vizsgálatok bizonyították a pozitív inotróp levosimendan hatákonyságát a szívelégtelenség kezelésében. Kardiális hatásmechanizmusként számos

különböző lehetőség (pl. Ca^{2+} -érzékenyítés, foszfodieszteráz (PDE)-gátlás, intracelluláris cAMP szint emelkedés) vetődött fel. A levosimendan inotróp, Ca^{2+} -érzékenyítő, valamint PDE-gátló hatásainak összehasonlítása egy PDE-gátló vegyület, az enoximone hasonló tulajdonságaival a terápiásan releváns koncentráció-tartományban további ismereteket szolgáltathat a levosimendan hatásmechanizmusáról. Továbbá a levosimendan ~80 órás felezési idővel rendelkező metabolitjának, az OR-1896-nak vizsgálata magyarázatot szolgáltathat a levosimendan beadását követően megfigyelhető elhúzódó hemodinamikai hatások kialakulásának okára.

CÉLKITŰZÉSEK

Myofilamentumok funkcionális és szerkezeti jellemzőit vizsgáltuk annak érdekében, hogy a krónikus szívelégtelenség különböző patofiziológiai és terápiás aspektusait jellemezzük. Különböző élettani és biokémiai módszerek alkalmazásával kísérletes munkánk során a következő problémákkal foglalkoztunk:

I. A Frank-Starling törvény szívelégtelenségben

- A passzív és aktív kontraktilis tulajdonságok stretch hatására bekövetkező változásai között lévő összefüggések vizsgálata figyelembe véve a szívizomfalon belüli lokalizációt.
- A kontraktilis fehérjék háttérben álló lehetséges változásainak azonosítása.
- A myofilamentumok stretch-re adott válaszána összehasonlítása kontrol és szívelégtelen patkány szivekben.

II. A cMyBP-C szerepe a myofilamentumok kontraktilitásának szabályozásában

- A myofibrilláris kontraktilitás *in vitro* jellemzése a kardiális MyBP-C teljes hiánya esetén knock out egér modellben.
- A cMyBP-C szerepének vizsgálata a myofilamentumok aktív és passzív kontraktilis tulajdonságaiban stretch, illetve PKA foszforiláció hatására bekövetkező változások létrejöttében.

III. Levosimendan és OR-1896 – hatásmechanizmus a myocardiumban

- A levosimendan és az OR-1896 inotróp, Ca^{2+} -érzékenyítő és PDE-gátló hatásainak összehasonlítása tengerimalac szívben.
- A vegyületek terápiásan releváns plazmakoncentrációk esetén feltételezhető myocardialis hatásmechanizmusainak feltárása.

IV. Levosimendan és enoximone – Ca^{2+} -érzékenyítés és PDE-gátlás

- A levosimendan és az enoximone kontraktilis hatásának myofilamentum és szervszintű párhuzamos meghatározása, valamint PDE-gátló potenciáljuk vizsgálata.
- A megfigyelt funkcionális tulajdonságok ismeretében a myocardiális inotrópia mechanizmusában lévő eltérések meghatározása.

MÓDSZEREK

Kísérleti állatok, állatmodellek

Az ischaemiás szívelégtelenség modelljeként patkány szívmot vizsgáltunk 14 héttel myocardialis infarktust követően. A cMyBP-C myofilamentumokra kifejtett hatását a fehérjét nem expresszáló knock out egér modellben tanulmányoztuk. A farmakológiai vizsgálatokat tengerimalac szíveken végeztük.

Izolált szív preparátumok

Langendorff-szív

Az aortát kanülálva a szívet retrográd perfundáltuk. A bal kamrába helyezett latex ballonnal regisztráltuk az izovolumetriás bal kamrai nyomást. A $+dP/dt_{\max}$ -t állandó koronária-áramlás és szívfrekvencia mellett számítottuk ki. A levosimendant és az OR-1896-ot kumulatív módon adtuk a módosított Tyrode-oldathoz.

Working heart preparátumok

A szív anterográd perfúzióját a véna pulmonalis kanülálásával valósítottuk meg. Állandó pitvari töltőnyomás és bal kamrai utóterhelés mellett az aorta- és koronária-áramlást, valamint a szívfrekvenciát mértük. Perfúziós oldatként módosított Krebs-Henseleit puffer (KHB) oldatot használtunk, melyhez a vizsgált vegyületeket kumulatív módon adtuk hozzá.

Erőmérés izolált myocita preparátumokon

Myocita izolálás és rögzítés

A myocita méretű permeabilizált preparátumokat enzimatis vagy a fagyasztott szövetminták esetén mechanikai izolálást követően detergenssel történt kezeléssel állítottuk elő. Ezután a membránjaitól megfosztott szívmotsejteket szilikon- vagy optikai ragasztóval folyamatos mikroszkópos video ellenőrzés mellett nagyérzékenységű erőmérőhöz rögzítettük.

Oldatok

A különböző Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatokat a relaxáló és a maximális aktivációt kiváltó Ca^{2+} puffer oldatok megfelelő arányú keverésével állítottuk elő.

Kísérletes protokoll

A myofilamentumok kontraktilis tulajdonságainak meghatározásához két eltérő protokollt használtunk. Az első esetben a passzív erő méréséhez a sejtek szarkomerhosszát relaxáló oldatban a nyugalmiról fokozatos nyújtás során 2,3 μm -re növeltük. Az izometrikus kontraktúrák kiváltásához a sejteket egy mikrokapilláris hegyéhez pozicionáltuk és különböző, emelkedő Ca^{2+} koncentrációjú oldatokkal aktiváltuk két különböző SL mellett. A másik esetben a myocytát a relaxáló oldatból Ca^{2+} tartalmú oldatba vittük át. Ebben az elrendezésben az erő amplitúdóját slack-teszttel állapítottuk meg. Az aktív erő meghatározását úgy végeztük, hogy a különböző Ca^{2+} tartalmú oldatokban mért erőből levontuk a relaxáló oldatban mért passzív erőértéket.

A szubmaximális aktivációnál mért erőket a maximális erőértékekre normalizáltuk. Az aktív erő $[\text{Ca}^{2+}]$ függését az izometriás erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenységevel (pCa_{50}) jellemeztük. A Ca^{2+} érzékenység stretch indukálta emelkedését vagy PKA kezelés okozta csökkenését a pCa_{50} változásaként (ΔpCa_{50}) adtuk meg.

Vizsgált vegyületek, PKA

A levosimendant és az OR-1896-ot az Orion Pharma biztosította. Az enoximone-t és a PKA katalitikus alegységét a Sigma-tól szerezzük be.

Biokémiai vizsgálómódszerek

SDS-PAGE

A titintartalom és -izoformák vizsgálatát 2,5–7 %-os acrylamide gradiens gélen végeztük. A cTnI vizsgálatához a teljes szívizom-homogenizátumot 15 %-os SDS-PAGE-el szeparáltuk. A fehérjéket Coomassie blue festéssel vagy specifikus antitestek és ECL-alkalmazásával tettük láthatóvá.

Western immunoblot

A frissen eltávolított szívizomszövet MLC és TnI összetételének vizsgálatára urea gélen vagy SDS-PAGE-el történt szeparálást követően Western immunoblotot használtunk. Az MLC2 izoformákat specifikus kardiális MLC2-ellenes antitestekkel mutattuk ki. A teljes TnI tartalmat és a PKA foszforilált cTnI-t specifikus antitestekkel és ECL-lel határoztuk meg.

Real-Time Quantitative RT-PCR

A RT-PCR-t ssTnI és cTnI specifikus primerekkel végeztük. A mRNS-ek abszolút szintjét a klónozott ssTnI és cTnI hígítási soraiból végzett RT-PCR-ok standard görbéinek alapján szintén meghatároztuk.

Foszfodiesteráz-aktivitás mérések

A PDE III-at és PDE IV-et tengerimalac szívből, humán vérlemezkéből és egy humán myeloid leukaemia promonocyta sejvonalból (U-937) izoláltuk. A levosimendan, az OR-1896 és az enoximone PDE-gátló potenciálját a [^3H]cAMP hasítása során keletkező [^3H]5'AMP mennyiségének folyékony szcintillációs mérésével határoztuk meg.

Adatelemzés

A szigmoid lefutású Ca^{2+} -erő függvényt módosított Hill-egyenlettel illesztettük:

$$F = F_{\max} * ([\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}} / ([\text{Ca}_{50}]^{n_{\text{Hill}}} + [\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{Hill}}})$$

, ahol F az adott $[\text{Ca}^{2+}]$ esetén mérhető erő; $F_{\max}$ az erő telítő $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett; Ca_{50} (vagy pCa_{50}) azt a $[\text{Ca}^{2+}]$ -t adja meg, amelynél az $F = F_{\max} / 2$ (a myofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége mértéke) és n_{Hill} a Hill konstans, mely az erő-pCa összefüggés meredekségével arányos és a kontraktilis apparátuson belüli kooperativitást jellemzi.

A eredményeket $\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$ formában adtuk meg. A statisztikai szignifikancia határa $P < 0,05$ volt. A számításokat egy-vagy kétoldalas ANOVA analízis, Dunnet's two-tailed teszt, Student páratlan t-próba, Wilcoxon signed-rank teszt és Holm-Sidak t-teszt megfelelő alkalmazásával végeztük.

A KONTRAKTILIS PARAMÉTEREK SZÍVIZOMFALON BELÜLI STRETCH-FÜGGŐ SZABÁLYOZÁSA PATKÁNY SZÍVBEN ÉS ANNAK VÁLTOZÁSA MYOCARDIALIS INFARCTUST KÖVETŐEN

EREDMÉNYEK

Szubepikardiális (EPI) és szubendokardiális (ENDO) rétegből származó izolált, nyúzott szívizomsejtek stretch-függő kontraktilis paramétereit vizsgáltuk és azok összehasonlítását végeztük sham, valamint myocardialis infarctuson átesett (PMI) patkány szívekben. A myofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységet (pCa_{50}) 1,9 μm és 2,3 μm SL mellett, izometrikus körülmények között határoztuk meg. 1,9 μm -es SL esetén a sham és a PMI szívek falrétegeinek Ca^{2+} -érzékenységei között nem találtunk szignifikáns eltérést (sham EPI: $5,60 \pm 0,03$, sham ENDO: $5,60 \pm 0,01$, PMI EPI: $5,59 \pm 0,03$, PMI ENDO: $5,62 \pm 0,02$). Ezzel szemben a szarkomerek nyújtása 2,3 μm -re a sham ENDO sejtekben nagyobb Ca^{2+} -érzékenység emelkedést okozott, mint a sham EPI sejtekben (ΔpCa_{50} : $0,24 \pm 0,02$ és $0,11 \pm 0,01$). Érdekes módon, a stretch-indukálta Ca^{2+} -érzékenyítés a PMI szívek megfelelő rétegeiben azonos volt (ΔpCa_{50} : $0,14 \pm 0,01$ és $0,14 \pm 0,01$). Továbbá, a myofilamentumok steady-state feszülését is meghatároztuk oly módon, hogy a sejteket relaxáló oldatban nyugalmi hosszukról 2,3 μm -es SL-re nyújtottuk. Mind a sham, mind pedig a PMI szívekben az ENDO sejtek merevebbeknek bizonyultak az EPI sejteknél (sham EPI: $4,3 \pm 0,2$, sham ENDO: $8,3 \pm 0,4$, PMI EPI: $4,8 \pm 0,5$, PMI ENDO: $8,3 \pm 0,9$ (mN/mm^2 -ben)). A titin vizsgálata nem mutatott ki izoforma eltérést a két réteg között. Ehelyett a fél-szarkomerre jutó titin molekulák számában (melyet a titin/MHC aránnyal jellemeztünk) egy szívizomfalon belüli grádienszt találtunk. Ez az arány mind a sham, mind a PMI szívek EPI rétegében alacsonyabb volt (sham EPI: $0,22 \pm 0,02$, sham ENDO: $0,31 \pm 0,02$, PMI EPI: $0,26 \pm 0,02$, PMI ENDO: $0,34 \pm 0,03$).

A szarkomer különböző szabályozófehérjéinek foszforilációs állapotát is vizsgáltuk a sham és PMI szívek bal kamráinak szabad falában. A fehérjéket (a

~1,9 μm -es és a ~2,3 μm -es SL-nek megfelelő állapotaikban) 1 perces nyújtást megelőzően és azt követően vizsgáltuk. A troponin I PKA foszforilációs szintjében a vizsgált csoportok között nem tapasztaltunk eltérést. Továbbá, urea gélen történt szeparáció segítségével a miozin könnyűlánc 2 négy különböző formáját (két kamrai izoformát, VLC2a-t és VLC2b-t, valamint azok foszforilált formáit, P-VLC2a-t és P-VLC2b-t) tudtuk elkülöníteni. A VLC2a foszforilációs szintje alacsonyabb volt a PMI szívek ENDO rétegében, mint a sham szíveiben. A molekula foszforilációs szintjét a nyújtás egyik mintában sem befolyásolta. Másrészt, a nyújtás a VLC2b forma foszforilációjának kifejezett emelkedését eredményezte az ENDO-sham sejtekben, mely emelkedés az ENDO-PMI sejtekben nem volt megfigyelhető.

MEGBESZÉLÉS

A Frank-Starling törvény molekuláris hátterének jobb megértése érdekében munkánk során egészséges és szívelégtelen szívekből származó szívizomsejtek hosszfüggő kontraktilis tulajdonságait jellemeztük, figyelembe véve a sejtek elhelyezkedését a bal kamra szabad falán belül. A stretch indukálta Ca^{2+} -szenzitizáció (ΔpCa_{50}) és a 2,3 μm -es SL esetén kialakuló passzív erő között figyelemre méltó összefüggés volt kimutatható. A sham szívekben a 2,3 μm -es SL esetén mérhető passzív erő és a stretch-indukálta Ca^{2+} -szenzitizáció mértéke között pozitív korrelációt tapasztaltunk. Ezzel szemben, a PMI szívek ENDO rétegének csökkent stretch-szenzitizációja a pozitív korrelációt megszüntette. Továbbá, vizsgáltuk a különböző szarkomerfehérjék foszforilációs állapotait, hogy magyarázatot találjunk a sham szívek bal kamrai szabad falában lévő stretch-szenzitizáció gradiens hátterére és annak PMI szívekben tapasztalt változására.

Szívizomfalon belüli kontraktilis tulajdonságok és a passzív erő

Munkánk során első alkalommal mutattuk ki a passzív és aktív mechanikai tulajdonságok szabad kamrafalon belüli gradienseit, melyek a szívelégtelen,

remodelláción átesett szívben jelentősen károsodnak. A fél szarkomerre eső titin molekulák számának emelkedése (melyet a titin/MHC arány jellemzett) jól korrelált a myofilamentumok feszülésének szívizomfalon belül megfigyelt gradienseivel. A jelen vizsgálat továbbá megerősítette azt a korábbi megfigyelést is, hogy a kontraktilis apparátus Ca^{2+} -érzékenysége sokkal inkább a stretch indukálta passzív erő, semmint az SL változásával áll összefüggésben. A titin Frank-Starling mechanizmusban betöltött szerepe az aktin-miozin távolság csökkenetése kapcsán már korábban felvetődött.

A szív ciklus alatt az SL kamrafalon belüli változásaira vonatkozó ismeretek hiányosak. Feltételezik, hogy telődéskor a szubendokardiális szarkomerek megnyúlása a szubepikardiálisakét meghaladja, így a végszisztolés állapotban eredetileg megfigyelhető inhomogén falon belüli SL eloszlás homogénebbé válik. Emellett az endokardiumban magasabb kerületi feszülést és ejekciós frakciót találtak. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban eredményeink arra utalnak, hogy a heterogén sejtszintű mechanikai tulajdonságok hozzájárulhatnak a kamrafal inhomogén deformációjához.

Stretch indukálta Ca^{2+} -szenzitizáció és a regulatórikus MLC2 foszforilációja

Ismert, hogy a kardiális troponin I PKA foszforilációja csökkenti a Ca^{2+} -érzékenységet és feltételezik, hogy növeli a myofilamentumok szarkomerhosszfüggő aktivációjának mértékét. A vizsgált mintáinkban talált azonos cTnI foszforiláció azonban arra utal, hogy a cTnI nem játszik meghatározó szerepet a stretch indukálta Ca^{2+} -érzékenyítés szabályozásában. Ehelyett a szívizomban a vastag filamentumok stretch hatására létrejövő szerkezeti változásait feltételeztük. Kísérletes adatok arra utalnak, hogy a stretch-függő aktiváció nem magyarázható kizárólag az aktin és miozin közötti távolság (lattice spacing) csökkenésével, hanem abban más szabályozási mechanizmusok is részt vesznek. Így egy olyan passzív tenzió által aktivált szignalizációs útvonal létezését

feltételeztük, melynek hatása a stretch által a lattice spacingben okozott változáshoz hozzáadódik.

Kísérletes körülményeink között a nagyobb stretch indukálta Ca^{2+} -szenzitizációhoz a VLC2b foszforilációjának lokalizáció-függő emelkedése társult. Ez az eredmény egybeesik azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy a miozin könnyűlánc kináz (MLCK) foszforilálja az MLC2-t és a myofilamentumok MLCK kezelése a Ca^{2+} -érzékenység emelkedését eredményezi. Lehetséges mechanizmusként felvetődött, hogy emelkedik az aktinnal kölcsönhatásba lépni képes miozinfajok száma. Az MLC foszforiláció elősegítheti a S1 miozin szubfragmentum eltávolodását a vastag filamentum gerincétől a vékony filamentumok irányába. Korábbi eredményeink alapján, miszerint az MLCK szenzitizálja a myofilamentumokat, feltételezzük, hogy a stretch egy mindeddig azonosítatlan mechanizmuson keresztül az MLC2 foszforilációjához vezet.

Stretch-szenzitizáció és krónikus szívelégtelenség

A szívelégtelenség kialakulása során végbemenő myocardialis remodeling hatással van erre a regulációs mechanizmusra, mint ahogy az meg nyilvánult a szívelégtelen myocardium szubendokardiális rétegében a VLC2b foszforilációjának és a stretch-szenzitizációnak párhuzamosan bekövetkező csökkenésében. A passzív erő és a stretch-indukálta Ca^{2+} -szenzitizáció mértéke közötti pozitív korreláció megszűnése az ENDO-PMI myofilamentumokban végbemenő funkcionális változásokra utalt. Ezt a felvetést a VLC2b foszforilációjának ENDO-PMI myofilamentumokban megfigyelt csökkenése alátámasztotta. A VLC2b foszforilációja és a stretch-indukálta Ca^{2+} -szenzitizáció mértéke közti összefüggés a VLC2b Frank-Starling mechanizmusban betöltött fontos szerepét valószínűsíti. Feltételezhető továbbá, hogy a remodeling folyamata a myofilamentumok kontraktilitásának stretch-

függő szabályozását elsősorban a myocardium szubendokardiális rétegében befolyásolja.

MYOFILAMENTUM AKTIVÁCIÓ KARDIÁLIS MIOZIN KÖTŐ C FEHÉRJE HIÁNYOS HIPERTRÓFIÁS EGÉR MODELLBEN: A SZARKOMERHOSSZ ÉS A PKA FOSZFORILÁCIÓ HATÁSA

EREDMÉNYEK

Elsőként a myocyták passzív mechanikai tulajdonságait vizsgáltuk cMyBP-C hiányos fiatal (~5 hetes, KO-5) és felnőtt (~55 hetes, KO-55) egerekben, melyek enyhe vagy súlyos fokú hipertrófiát mutattak. Azonos korú WT és KO egerek esetén nem volt különbség a 2,3 μm SL esetén mért passzív erő nagyságában. A passzív tulajdonságokat PKA stimulációt követően is vizsgáltuk. A cTnI alap foszforilációs szintjét és a további PKA foszforiláció mértékét Western blottal értékeltük. Utóbbi a WT és KO sejtekben hasonlóan bizonyult (27 és 30%). Korábbi vizsgálatoknak megfelelően a PKA kezelés mind a WT, mind a KO sejtekben csökkentette a passzív erőt. Ezután az SL-függő aktív kontraktilis tulajdonságokat hasonlítottuk össze a WT és KO bal kamrai myocytákban. 1,9 μm -es SL esetén a KO szívmusclesejtek mindkét korcsoportban magasabb Ca^{2+} -érzékenységet mutattak ($P < 0,01$, a $p\text{Ca}_{50}$ értékei rendre $5,79 \pm 0,03$, $5,77 \pm 0,01$, $5,87 \pm 0,02$ és $5,85 \pm 0,01$ voltak a WT-5, WT-55, KO-5 és KO-55 egerekben). Az SL növelése 2,3 μm -re, a $[\text{Ca}^{2+}]$ -tenzió összefüggés balra tolódását eredményezte ($\Delta p\text{Ca}_{50}$). 2,3 μm -es SL-nél a $p\text{Ca}_{50}$ -ben nem volt szignifikáns eltérés a WT és KO csoportok között. Az SL-függő aktiváció mértéke azonban a KO myofilamentumokban csökkent a WT-hoz viszonyítva. Ez a hatás kifejezettebb volt a felnőtt (pCa egységekben, WT-55= $0,23 \pm 0,01$, KO-55= $0,16 \pm 0,01$), mint a fiatal egerekben (WT-5= $0,18 \pm 0,02$, KO-5= $0,14 \pm 0,01$). A cMyBP-C hiány a $[\text{Ca}^{2+}]$ -tenzió görbe meredekségét csökkentette mindkét SL-nél. Ezt a KO myofilamentumokban a Hill koefficiens alacsonyabb értéke mutatta, bár KO-5 egerekben az alacsony (1,9 μm) SL mellett a változás nem volt szignifikáns ($P = 0,17$). A maximális erőértékekben nem volt eltérés

sem a WT és KO csoportok között, sem pedig a különböző SL-ek és életkorok esetén.

A PKA-val preinkubált myofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységet 1,9 μM és 2,3 μM SL-knél határoztuk meg és a korábban kontrol sejteken mért értékekkel vetettük össze. A WT myocyták PKA kezelése mindkét SL és életkor esetén $\sim 0,13$ pCa egységgel jobb irányba tolta el az erő-pCa görbét, ami a myofilamentumok Ca^{2+} -ra bekövetkezett deszenzitizációját jelezte. A Ca^{2+} -aktiváció SL függése PKA kezelést követően változatlan maradt ($P < 0,01$) még akkor is, ha azt Ca^{2+} koncentrációként (ΔEC_{50}) fejeztük ki. KO myocytákban a PKA foszforiláció csak $\sim 0,03$ - $0,04$ pCa egységgel csökkentette a pCa_{50} -et és szignifikáns hatást csak 1,9 μM SL-nél, a KO-5 állatokban okozott, ahol a pCa_{50} csökkenése 0,07 pCa egység volt ($P = 0,012$). A maximális erőértékek nem változtak, a KO myofilamentumok Hill koefficiens értékei pedig a WT-éhez hasonló mértékben növekedtek.

A TnI expresszióját a WT és a KO szívizomsejtekben Western blottal és a vázizom típusú, valamint a kardiális TnI-t egyaránt felismerő antitesttel vizsgáltuk. A KO myocardiumban, különösen a fiatalabb állatokban a TnI egy új sávja jelent meg, melynek molekulatömege hasonlít a soleus izomban található ssTnI izoformáéhoz. Mintáinkban az ssTnI csak az összes TnI 1% és 4%-át tette ki a WT-5, és WT-55 egerekben, illetve 24% és 7%-ot a KO-5 és KO-55 egerekben. Az ssTnI és cTnI mRNS-ének kvantitatív RT-PCR-ral meghatározott mennyiségei nem különböztek a WT és a KO állatok között és függetlenek voltak az életkortól. A crossing point (CP), melyet az mRNS szintézis jellemzőjeként használtunk nem mutatott változást a KO egerek egyik csoportjában sem, mikor azt a WT-hoz viszonyítottuk. A cTnI és az ssTnI CP értékei rendre $24,5 \pm 1,2$ és $30,4 \pm 0,8$ voltak jelezve, hogy a cTnI mRNS-ének mennyisége az ssTnI mRNS-ének mennyiségénél hozzávetőlegesen 125-ször magasabb. Továbbá, a kontraktilis paramétereket (az EC_{50} , azaz a félmaximális erő kiváltásához szükséges Ca^{2+} koncentrációt és a PKA indukálta

myofilamentum deszenzitizációt) az ssTnI tartalom függvényében fejeztük ki. A kapott összefüggések elemzése nem mutatott kapcsolatot a PKA kezelést követő kontraktilis paraméterek és az ssTnI mennyisége között. A myofilamentumok Ca^{2+} -szenzitivitása mindkét SL esetén inkább a cMyBP-C jelenlétével mutatott összefüggést.

MEGBESZÉLÉS

Vizsgálatunk során a különböző korú és eltérő súlyosságú hypertrophiát mutató cMyBP-C KO és WT egerekből származó kardiális myofilamentumok kontraktilis tulajdonságait jellemeztük. A Ca^{2+} -szenzitivitás megváltoztatására fiziológiailag releváns módszereket, nyújtást és PKA foszforilációt alkalmaztunk.

A cMyBP-C KO egérben alacsony SL esetén megfigyelt Ca^{2+} -érzékenység növekedés megfelelt a korábbi eredményeknek, melyeket a cMyBP-C részleges kivonása során kaptak, és a két életkorban hasonló volt, tehát nem függött a kardiális hypertrophia mértékétől. Mint azt korábban szívizomban az MLC2 foszforilációja kapcsán már leírták, a Ca^{2+} -érzékenység növekedése és a kooperativitás csökkenése a miozin fejek nagyobb flexibilitásával és csökkent rendezettségével állítható párhuzamba. A Ca^{2+} -érzékenység 1,9 μm SL-nél KO egérben tapasztalt emelkedése az erő-pCa görbe meredekségének csökkenésével párosul, mely a miozin kapcsolódás kooperativitásának csökkenését tükrözi, alátámasztva ezzel a cMyBP-C meghatározó szerepét a miozinfjek rendjének és mozgásainak szabályozásában. A Ca^{2+} -érzékenység cMyBP-C-től való függése megegyezik azoknak a korábbi vizsgálatoknak az eredményivel, melyek során a cMyBP-C normális funkcióját S2 vagy C1C2 fragmentumok alkalmazásával, a MyBP-C csonka formájával történt helyettesítésével vagy a protein részleges kivonásával gátolták. Eredményeink azonban ellentétben állnak egy másik, a cMyBP-C egy csonka formáját expresszáló KO egér modell vizsgálata során nyert eredményekkel. Az itt bemutatott megfigyelések felvetik

annak lehetőségét, hogy a vizsgálatok során tapasztalt Ca^{2+} -érzékenységbeli eltérésekért, legalábbis részben, az alkalmazott eltérő SL-k tehetők felelőssé.

Úgy tűnik, hogy a cMyBP-C egy stretch által szabályozott módon befolyásolja a Ca^{2+} -érzékenységet. A normális szerkezetű cMyBP-C hiányában a Ca^{2+} -érzékenység már eleve magas, így a szarkomerhossz további növelésének lényegesen kisebb hatása van. Megfigyeléseinkkel megegyezően a cMyBP-C hiányának hatása a korábbi vizsgálatokban is leginkább alacsony SL-k mellett nyilvánult meg. Ilymódon feltételezhető, hogy a cMyBP-C manipulálásának hatása a stretch-el csökken, esetleg meg is szűnik. A bemutatott eredmények tovább erősítik a cMyBP-C myofilamentális szabályozó szerepét valószínűsítő véleményeket. A cMyBP-C foszforilációja önmagában is csökkenti az interfilamentális távolságot. Emellett, mivel a cMyBP-C képes kölcsönhatásba lépni mind a titinnel, mind a miozinnal, a vázizomban megfigyeltekhez hasonlóan képes lehet, legalábbis részben, átvinni a miozin fejekre a titin nyújtása során kialakuló passzív erőt.

A Konhilas és mtsai. (2003) által kimutatott PKA hatás az SL-függő aktivációra a jelen tanulmányban nem nyert megerősítést. Kísérleteinkben a PKA foszforilációnak, a cTnI foszforilációjának azonos mértékű emelkedése ellenére a WT és KO állatokban, szinte nem volt hatása a Ca^{2+} -érzékenységre a KO myocytákban egyik SL esetén sem. Ez egybeesik Yang és munkatársai (2001) megfigyelésével, akik az izoproterenolra adott válasz csökkenését találták a cMyBP-C egy olyan mutáns formáját expresszáló egérben, amelyből hiányzott mind a titin, mind a miozin C-terminusra lokalizált kötődési helye. Az eltérés oka nem tisztázott, de szerepet játszhatnak mind a mérőmódszerek különbségei, mind a PKA foszforiláció alapszintjének eltérései.

Az ssTnI átmenetileg expresszálódik a szívfejlődés során, az egérben a korai embrió stádiumban az ssTnI a meghatározó izoforma. Az ssTnI továbbá különböző patológias modellekben is reexpresszálódik, ami felveti a β -adrenerg Ca^{2+} -deszenszitizációval szembeni védő szerepét. Eredményink alapján az ssTnI-

nek a megtartott expressziója vagy reexpressziója volt megfigyelhető a fiatal állatokban, mely a kor előrehaladtával megszűnt. Az RT-PCR analízis azonban a KO és a WT állatokban mindkét életkorban hasonló mRNS szinteket mutatott, mely poszttranszlációs szabályozást valószínűsít. A myofilamentumok PKA deszenzitizációjának mértéke nem mutatott összefüggést az ssTnI expressziójával. Így nem tűnik valószínűnek, hogy a megfigyelt hatásokért az ssTnI a felelős, azok sokkal inkább a cMyBP-C hiányához kapcsolhatóak. Az elhanyagolható ssTnI hatás magyarázataként a fehérje nem kielégítő expressziós szintje vagy a szarkomerekbe történő nem megfelelő beépülés merülhet fel.

A LEVOSIMENDAN ÉS AZ OR-1896 IZOLÁLT SZÍVRE, NYÚZOTT MYOCYTA PREPARÁTUMOKRA ÉS FOSZFODIESZTERÁZ ENZIMEKRE GYAKOROLT HATÁSA TENGERIMALACBAN

EREDMÉNYEK

A levosimendan és az OR-1896 hatása Langendorff-szíven állandó szívfrekvencia és koronária-áramlás esetén

A szívizom kontraktilitását a bal kamrai nyomásgörbe első deriváltjának pozitív csúcserővel ($+dP/dt_{\max}$) jellemeztük. A $+dP/dt_{\max}$ szermentes alap átlagértékei a levosimendan és az OR-1896 csoportokban rendre $1129 \pm 85 \text{ mm Hg s}^{-1}$ és $1239 \pm 67 \text{ mm Hg s}^{-1}$ voltak. Ez a paraméter a levosimendan és az OR-1896 esetében igen hasonló koncentráció-függést mutatott ($n=5$ mindkét csoportban). A maximális vegyület által kiváltott, alapszinthez viszonyított relatív bal kamrai $+dP/dt_{\max}$ emelkedés ($E_{\max}$) rendre $26 \pm 4\%$ és $25 \pm 3\%$ volt ($25 \pm 1 \text{ nM}$) a levosimendan és az OR-1896 esetén ($P < 0,05$), melyekhez az OR-1896-énál ($25 \pm 1 \text{ nM}$) kissé alacsonyabb ($P < 0,05$) levosimendan ($15 \pm 2 \text{ nM}$) EC_{50} érték társult.

A levosimendan és az OR-1896 Ca^{2+} -érzékenyítő hatása izolált permeabilizált myocytaszerű preparátumokon

A maximális Ca^{2+} -aktiválta erőt (P_o) szermentes pCa 4,75 Ca^{2+} -tartalmú oldattal, permeabilizált myocytákon határoztuk meg. A keresztmetszetre normalizált P_o $27 \pm 6 \text{ kN m}^{-2}$ volt ($n = 20$), mely összevethető a mások által leírt értékekkel. Az izometrikus erőt maximális (pCa 4,75) és szubmaximális $[Ca^{2+}]$ -k (pCa 5,8, pCa 6, pCa 6,2 and pCa 7) ($n = 7-10$ az egyes csoportokban) mellett határoztuk meg, szupramaximális ($10 \mu\text{M}$) levosimendan vagy OR-1896 koncentrációkat alkalmazva. $10 \mu\text{M}$ koncentrációban sem a levosimendan, sem az OR-1896 nem befolyásolta a maximális (P_o , pCa 4,75) vagy a legalacsonyabb Ca^{2+} -aktiválta erőt (pCa 7) ($P > 0,05$). A hatás elmaradása pCa 7-nél megfelel a korábbi

megfigyeléseknek, melyek szerint diasztolés $[Ca^{2+}]_i$ mellett a keresztkötések disszociációja nem változott. Ezzel szemben köztes $[Ca^{2+}]$ -k esetén mind a levosimendan, mind az OR-1896 növelte az izometrikus erőt ($P < 0,05$). A 10 μ M levosimendan vagy a 10 μ M OR-1896 hiányában vagy jelenlétében mért átlagos erőértékek Hill egyenlettel történt illesztésével kapott Ca^{2+} -erő összefüggés a két vegyület azonos Ca^{2+} -érzékenyítő tulajdonságát mutatta. A kontroll pCa_{50} értéke $5,88 \pm 0,01$ volt és azonos mértékben emelkedett 10 μ M levosimendan ($pCa\ 5,98 \pm 0,03$) vagy 10 μ M OR-1896 ($pCa\ 5,98 \pm 0,02$) hatására ($P < 0,05$).

A levosimendan és az OR-1896 koncentráció-függő Ca^{2+} -érzékenyítő és foszfodieszteráz-gátló hatásai

A levosimendan, illetve az OR-1896 által kiváltott Ca^{2+} -érzékenyítés koncentráció-függését ugyanazon szubmaximális $[Ca^{2+}]$ -t alkalmazva, a tesztelt vegyület emelkedő koncentrációinak jelenlétében, ismétlődő aktivációkkal határoztuk meg. A szermentes izometrikus erő $pCa\ 6,2$ esetén $5,2 \pm 1\ kNm^{-2}$ volt (a $P_0\ 19 \pm 4\%$ -a) és az izometriás Ca^{2+} kontraktúrák amplitúdója a levosimendan és az OR-1896 koncentrációjának emelésével nőtt ($n=20$). Az erőértékeket a szermentes alapértékhez viszonyítva, relatív értéként adtuk meg. A levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatása $8 \pm 1\ nM$ -os EC_{50} értékkel és $51 \pm 7\%$ -os maximális erőemelkedéssel (E_{MAX}) volt jellemezhető. Az OR-1896 esetén az EC_{50} értéke $36 \pm 7\ nM$, míg a maximális erő emelkedése $52 \pm 6\%$ volt.

A levosimendan és metabolitjának foszfodieszteráz-gátló potenciálját tisztított PDE-izoformákon vizsgáltuk. A vegyületek emelkedő koncentrációi a PDE III aktivitását koncentráció-függő módon csökkentették. A félmaximális PDE III gátlást kiváltó koncentrációk (IC_{50}) levosimendan és OR-1896 esetén rendre 2,5 nM és 94 nM voltak. A PDE III-hoz hasonlóan, az emelkedő levosimendan vagy OR-1896 koncentrációk a PDE IV aktivitását is fokozatosan csökkentették, a félmaximális gátlás eléréséhez azonban jelentősen magasabb koncentrációkra

volt szükség. A PDE IV-re vonatkozó IC_{50} értéke levosimendan esetén 25 μM , OR-1896 esetén pedig 286 μM volt.

MEGBESZÉLÉS

Ez a tanulmány a levosimendan és az OR-1896 pozitív inotróp hatásának koncentráció-függését hasonlítja össze a feltételezett, háttérben álló hatásmechanizmusok koncentráció-függésével. A szívizom kontraktilis állapotát a Langendorff-szivekben állandó preload, szívfrekvencia és koronária-áramlás mellett határoztuk meg. Ilyen körülmények között a szívizom kontraktilitás erősödésének lehetséges módjai a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -érzékenységeinek emelkedése és/vagy a Ca^{2+} tranziens amplitúdójának PDE-gátlás hatására bekövetkező növekedése.

A permeabilizált myocita preparátumok és az izolált PDE izoformák vizsgálatával a Ca^{2+} -érzékenyítő és a PDE-gátló hatások elkülönítve jellemezhetőek. A Langendorff-sziveken a levosimendan és az OR-1896 közel azonos pozitív inotróp potenciállal rendelkezett. Számos korábbi kísérletes eredmény szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a levosimendan pozitív inotróp hatásának kiváltásához nem szükséges PDE gátlás és az intracelluláris β -adrenerg útvonal aktivációja. A protein kinase A (PKA) gátló KT 5720 például nem csökkentette a levosimendan által tengerimalac Langendorff-sziveken kiváltott pozitív inotrópiát. Emellett a levosimendan 1 μM -nál alacsonyabb koncentrációk esetén patkány és nyúl myocytákban nem növelte az L-típusú Ca^{2+} áramot (I_{Ca-L}). Továbbá, enzimatikusan izolált tengerimalac myocytákon a levosimendan az $[Ca^{2+}]_i$ változása nélkül, 9 nM-es EC_{50} érték mellett növelte a sejtrövidülés mértékét. Ez az érték jól összevethető a permeabilizált myocytákon általunk mért értékkel ($EC_{50} = 8$ nM). Következésképpen, az intakt membránnal rendelkező izolált sejteken tapasztalt erőnövekedés elsősorban, hacsak nem kizárólagosan, a Ca^{2+} -érzékenyítés következménye lehet.

A humán szívizomzat 4 PDE izoenzime(PDE I, II, III and IV) közül a gyakran a PDE III-at tekintik a pozitív inotróp hatás közvetítőjének. Ez a megközelítés az elvileg PDE III-szelektív vegyületekkel (pl. milrinon) végzett kísérleteken, a G-poteinnel kapcsolt szignalizációs útvonalak intracelluláris kompartmentalizációjának koncepcióján és/vagy a PDE III látszólagos cAMP-re vonatkozó K_m értékén alapul. Kimutatták, hogy a PDE gátlás csökkenti a cAMP feltételezett intracelluláris kompartmentalizációját, ami a különböző PDE izoformák között effektív kölcsönhatás kialakulását teszi lehetővé. Patkány és nyúl szívizomsejteken végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az L-típusú Ca^{2+} áram, illetve a pozitív inotrópia cAMP-n keresztüli növekedése csak abban az esetben valósulhatott meg, ha egyidejűleg legalább két PDE izoforma állt gátlás alatt. Különösen a cAMP-re alacsony K_m -mel rendelkező PDE-kről (azaz a PDE III és IV) mutatták ki, hogy kettős gátlásuk előfeltétele a PDE dependens $[cAMP]_i$ emelkedés és pozitív inotrópia kialakulásának. Egyetlen PDE izoenzim gátlása esetén feltételezhetően a cAMP-t más PDE izoenzimek lebontották így nem került sor jelentős cAMP emelkedésre és az ezt követő cAMP-dependens PKA aktiválódásra. Másrészt, a gyenge PDE szelektivitású PDE inhibitorok (PDEI) szívizomsejtekben nagyobb mértéken emelték a $[cAMP]_i$ -t. A megállapítást, miszerint a levosimendan és metabolitjának pozitív inotróp hatásához a PDE gátlás nem járul hozzá, alátámasztja a vegyületek PDE izoenzim szelektivitása, mely a többi PDEI-énél magasabb. Enzimgátlás-vizsgálatainkban a levosimendan és az OR-1896 PDE IV-hez viszonyított PDE III szelektivitása rendre 10000 és 3000 voltak. A milrinone esetében ez az érték csupán 14-nek adódott. Ez azonban bonyolulttá teszi a levosimendan szelektív PDE III gátló hatásának más vegyületekkel való reprodukcióját szívizomban. Emellett csak gyenge összefüggést találtunk az OR-1896 által kiváltott pozitív inotrópia és a PDE III gátlás koncentráció-függései között. Így, a levosimendanénál valamivel alacsonyabb PDE szelektivitása ellenére a sokkal inkább a Ca^{2+} -érzékenyítéssel, mintsem a PDE gátlással magyarázható

az OR-1896 pozitív inotróp hatása. Humán pitvari myocytaikon végzett mérések alapján feltételezték, hogy az L-típusú Ca^{2+} áram növekedését az 1 μM alatti koncentrációk esetén a PDE III gátlása okozza. Az L-típusú Ca^{2+} áram növekedése azonban az intracelluláris Ca^{2+} tranziens emelkedését is maga után vonná. Ezzel szemben a levosimendan nem növelte az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t végstádiumú szívelégtelen humán szivekből származó bal kamrai izomkötegekben. Továbbá, a levosimendan hemodinamikai hatásai humán krónikus szívelégtelenségben eltérőek voltak a szimpatikus aktivitás és a dobutamin, mint szimpatomimetikus szer hatásaitól. Így a szív teljesítményének emelkedése inkább magyarázható a Ca^{2+} -érzékenyítés miatti erősebb szisztolés kontrakcióval, semmint a szimpatikus kontroll alatt álló szívfrekvencia és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ váltoásaival. A fenti adatok alátámaszthatják azt az elképzelést is, hogy a PDE IV izoforma szintén jelen van és funkcionál az egészséges és a beteg humán kamrai szívizomban. A PDE IV vagy más PDE típusok aktivitása így megakadályozhatja az intracelluláris cAMP felszaporodását a levosimendan alkalmazását követően.

Az egészséges tengerimalacok szívizom preparátumain végzett modellkísérleteink részben magyarázatot szolgáltathatnak a levosimendan által kiváltott inotrópia mechanizmusával kapcsolatos ellentmondásokra. Feltételezzük, hogy a levosimendan és az OR-1896, PDE III gátló potenciáljaik ellenére terápiás plazmakoncentrációik esetén nem változtatják meg az intracelluláris cAMP függő szignálútvonalak működését, mert nem gátolják a PDE IV-et. Az expressziós és intracelluláris lokalizációban lévő eltérések azonban befolyásolhatják a különböző PDE izoformák közötti kölcsönhatásokat. Ennek megfelelően e paraméterek változásai az egészséges szívben és szívelégtelenségben a szelektív PDE gátlás következményeiben bizonyos mértékű variabilitás alapjául szolgálhatnak.

Összefoglalva, adataink alátámasztják azt a hipotézist, hogy a levosimendan és az OR-1896 pozitív inotróp hatásukat a myocardiumban maximális szabad

plazmakoncentrációik esetén Ca^{2+} -érzékenyítőként, nem pedig a PDE III és PDE IV izenzimek egyidejű gátlása révén valósítják meg.

KÉT POZITÍV INOTRÓP ELTÉRŐ HATÁSMECHANIZMUSSEL: A LEVOSIMENDAN ÉS AZ ENOXIMONE KONTRAKTILIS, PDE-GÁTLÓ ÉS DIREKT MYOFIBRILLÁRIS HATÁSAI

EREDMÉNYEK

Izolált working-heart: a levosimendan és az enoximone inotrop hatásai

A levosimendan és az enoximone kardiális pumpafunkcióra kifejtett hatását working-heart módban perfundált, izolált tengerimalac sziveken tanulmányoztuk. A 3 kísérleti csoportban (kontroll, $n = 5$; levosimendan, $n = 7$ and enoximone, $n = 8$) az egyes paraméterek alapértékeiben nem volt szignifikáns különbség. A vizsgált vegyületet emelkedő koncentrációinak vizsgálata során azokat kumulatív módon adtuk a perfúziós oldathoz. A levosimendan és az enoximone kardiális kontraktilitásra kifejtett hatásait 1 nM és $1 \text{ }\mu\text{M}$ közti koncentrációtartományban vizsgáltuk. A szerhatásokat a szermentes kontrollban, azonos oldószer-koncentrációk jelenlétében, azonos időben mért kontroll értékekhez hasonlítottuk. A 10 nM és az azt meghaladó koncentrációkban a levosimendan szignifikánsan növelte az aorta- és koronaria-áramlást ($P < 0.05$). Az enoximone bár $1 \text{ }\mu\text{M}$ -ig nem befolyásolta az aortaáramlást, 50 nM és magasabb koncentrációknál növelte a koronariaáramlást. A levosimendan 10 nM koncentrációtól kiindulva szignifikánsan növelte a perctérfogatot (CO). 50 nM felett a levosimendan hatásának telítődése volt megfigyelhető. A perctérfogat szignifikáns emelkedése enoximone hatására csak 500 nM -nál és afelett (azaz $1 \text{ }\mu\text{M}$ -nál) volt megfigyelhető. Az enoximone által kiváltott kardiális válasz nem járt a szívfrekvencia szignifikáns emelkedésével. Ezzel szemben a levosimendan 100 nM -nál és az azt meghaladó koncentrációkban pozitív kronotróp hatású volt. A kamrai szisztolés térfogat koncentrációfüggése gyakorlatilag megegyezett a CO-éval.

Izolált permabilizált szívizomsejtek: a levosimendan és az enoximone hatása a myofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységére

A maximális Ca^{2+} -aktiválta erőt pCa 4,5-nél, szermentes oldattal határoztuk meg és a keresztmetszetre normalizáltuk (P_0). A P_0 értéke ($20,9 \pm 1,8 \text{ kN/m}^2$, $n = 23$) hasonló volt a mások által közöltekhez. A levosimendan és az enoximone Ca^{2+} -aktivált erőre gyakorolt hatását állandó, szubmaximális szintű Ca^{2+} -aktivációval (pCa 6,2) határoztuk meg. Szermentes oldatban a pCa 6,2-nél kialakult Ca^{2+} -kiváltotta erő ($3,5 \pm 0,3 \text{ kN/m}^2$) a P_0 $17,2 \pm 0,9\%$ -a volt ($n = 23$). A pCa 6,2-nél kialakuló izometrikus erő meghatározása után a levosimendant ($n = 15$) vagy az enoximone-t ($n = 8$) emelkedő koncentrációkban adtuk az aktiváló oldatokhoz (rendre a $0,1 \text{ nM}$ – $10 \text{ }\mu\text{M}$ vagy a 1 nM – $10 \text{ }\mu\text{M}$ koncentráció-tartományokban. Az 1 nM -os és az azt meghaladó levosimendan koncentrációknál az izometrikus erő szignifikánsan nőtt. $1 \text{ }\mu\text{M}$ -os levosimendan koncentrációnál az erő amplitúdója $55,5 \pm 8\%$ -kal volt magasabb a szermentes alapértéknél. A levosimendan koncentráció és az izometrikus erő közti összefüggés EC_{50} értéke 8.4 nM volt. A vizsgált koncentráció tartományban az izometrikus erő nagyságát az enoximone szignifikánsan nem befolyásolta.

Foszfodieszteráz gátlás: a levosimendan hatása a PDE III és PDE IV izoenzimekre

A levosimendan és az enoximone PDE-gátló hatását tisztított PDE izoformákon végzett enzimaktivitás-mérésekkel jellemeztük. Mind a levosimendan, mind az enoximone a PDE III és PDE IV izoformákat koncentráció-függő módon, fokozódó mértékben gátolta. A katalitikus aktivitás fél-maximális gátlásához szükséges koncentrációk (IC_{50}) értékei azonban a két vegyület között fennálló lényeges különbséget tükröztek. A levosimendan a PDE III-ra és PDE IV-re vonatkozó IC_{50} értékei rendre $1,4 \text{ nM}$ és $11 \text{ }\mu\text{M}$, míg a megfelelő értékek az enoximone esetén rendre $1,8 \text{ }\mu\text{M}$ and $160 \text{ }\mu\text{M}$ voltak.

MEGBESZÉLÉS

Kíséleteink során két pozitív inotróp szer, a levosimendan és az enoximone farmakológiai hatékonyságát vizsgáltuk. Az izolált working heart preparátumokon végzett mérések azt mutatták, hogy a levosimendan jóval $1\ \mu\text{M}$ alatt kifejtette maximális inotróp hatását, ezzel szembe az enoximone pozitív inotróp hatása csak $1\ \mu\text{M}$ -os koncentráció közelében jelentkezett. Az $1\ \text{nM}$ és $1\ \mu\text{M}$ közti koncentráció tartományban a levosimendan által kiváltott pozitív inotrópia az enoximone által indukáltat meghaladta. Ez az eltérés a különböző hatásmechanizmusokkal magyarázható: Ca^{2+} -érzékenyítés a levosimendan esetében és jóval kevésbé szelektív PDE III és PDE IV izoenzim gátlás az enoximone esetében. Emellett, a vegyületek vazodilatátor potenciálja befolyásolja a koronária-makrocirkulációt és azon keresztül a kamrai pumpafunkciót. A working heart kísérletek során a direkt myocardialis és az indirekt vaszkuláris hatásokat külön-külön tudtuk jellemezni. A pumpafunkciót támogató hatásuknak megfelelően mindkét vegyület növelte a CO-t és a szisztolés térfogatot. A levosimendan pozitív inotróp hatása mind az aorta-, mind a koronária-áramlás növekedésében megnyilvánult, míg az enoximone csak a koronária-áramlást növelte. Ez azt sugallja, hogy az enoximone pozitív inotróp hatásának kialakításában a koronáriák vazodilatációja méginkább meghatározó szerepet játszik.

Bár a PDE III-at gyakran a pozitív inotróp hatás közvetítőjeként említik, a humán szívizom egyéb PDE izoenzimeit (PDE I, II és IV) is szerepet játszhatnak a $[\text{cAMP}]_i$ szabályozásában. Számos, az előző fejezetben részletezett kísérletes eredmény támasztja alá azt az elgondolást, hogy egyetlen PDE izoenzim altípus gátlása nem elegendő a $[\text{cAMP}]_i$ emeléséhez (pl. a cAMP intracelluláris kompartmentalizációjának csökkenése és ennek következtében a különböző PDE izoformák közti kölcsönhatások; az $\text{I}_{\text{Ca-L}}$, a pozitív inotrópia és a $[\text{cAMP}]_i$ növekedésének elmaradása, stb.). Továbbá, az alacsony K_m -mel rendelkező cAMP PDE-ok (azaz a PDE III és a PDE IV) egyidejű gátlása előfeltétele volt a

PDE-függő $[cAMP]_i$ emelkedés és a pozitív inotrópia kialakulásának. Egyetlen PDE izoenzim gátlása esetén a cAMP-t valószínűleg más PDE izoenzimek lebontották, meggátolva így a $[cAMP]_i$ emelkedését és ezt követően a cAMP-függő PKA aktivációját. Ezzel ellentétben a gyenge PDE szelektivitással rendelkező PDEI-k hatékonyabban emelik a $[cAMP]_i$ szintet. A levosimendan és az enoximone eltérő pozitív inotróp tulajdonságai farmakológiai hátterének megvilágítása érdekében vizsgáltuk azok feltételezhető intracelluláris hatásainak, a PDE-gátlásnak és a Ca^{2+} -érzékenyítésnek koncentráció-függését. Az enoximone 1 μM -os koncentrációig nem befolyásolta a kontraktilitást izolált tengerimalac szivekben. Ezt meghaladó enoximone koncentrációkat alkalmazva az kialakult kontraktilis hatások monoton módon növekedtek 1 mM-os koncentrációig. Mivel a maximális PDE III gátlás az alsó mikromoláris koncentráció tartományban kialakul, az enoximone pozitív inotróp hatásának növekedése ennél jóval magasabb koncentrációk esetén nem magyarázható kizárólag a PDE III gátlásával. Lehetséges alternatívaként a PDE III gátlás olyan egyéb pozitív inotróp mechanizmussal való kombinációja jöhet szóba, amely 1 μM feletti enoximone koncentrációk esetén is mutat koncentráció-függést. Az enoximone közvetlen myofibrilláris hatása kizárható, mivel permeabilizált szívizomsejteken 10 μM -os koncentrációig az enoximone nem volt hatással az izometrikus erőre. Így a további pozitív inotrópia legvalószínűbb mechanizmusaként egy másik PDE izoenzim gátlása vetődhet fel. Az enoximone PDE III és PDE IV gátló hatásainak koncentráció függése csak kismértékben tért el egymástól. Ez az enoximone PDE III-ra vonatkozó IC_{50} koncentrációjának közelében és afelett a PDE III gátlás mellett fokozatosan növekvő mértékű PDE IV gátlást valószínűsít. Továbbá, ez a feltevés magyarázhatja a korábban tengerimalac kamrai homogenizátumban és szelet preparátumokon megfigyelt, 1 mM enoximone koncentráció eléréséig tartó folyamatos intracelluláris cAMP felszaporodást és erő növekedést.

Az izometrikus erő emelkedése a permeabilizált szívizomsejtekben a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő voltát bizonyította ($\text{EC}_{50} = 8 \text{ nM}$), alátámasztva ezzel feltételezett kölcsönhatását a vékony filamentumban található troponin C molekulával. A levosimendan PDE III gátlását jellemző IC_{50} értéke szintén ennek a koncentrációnak a közelében volt. A levosimendan által kiváltott Ca^{2+} érzékenyítés és PDE III gátlás koncentráció függése így átfedést mutatott az izolált tengerimalac sziveken kialakult pozitív inotróp hatás koncentráció függésével. Ez meggátolta annak meghatározását, hogy milyen mértékben vesz részt a Ca^{2+} -érzékenyítés és a PDE-gátlás a levosimendan pozitív inotróp hatásának kialakításában. Érdekes módon azonban az izolált working heart preparátumokon már olyan levosimendan koncentrációk hatására is maximális kontraktilis választ kaptunk, ahol a PDE IV gátlása még nem alakulhatott ki. Emellett egy korábbi tanulmányban a $[\text{cAMP}]_i$ emeléséhez $0,1 \mu\text{M}$ -t meghaladó levosimendan koncentráció volt szükséges. Következésképpen tehát az ennél alacsonyabb koncentrációknál a PDE III és PDE IV egyidejű gátlása nem járulhatott hozzá a levosimendanra adott pozitív inotróp válaszhoz.

Az állítást, miszerint PDE III gátló potenciálja ellenére a PDE-gátlás nem játszik szerepet a levosimendan pozitív inotróp hatásának kialakításában, a levosimendan PDE izoenzim szelektivitása is támogatja, mely a legtöbb más PDEI szelektivitását meghaladja. Az ebben és előző tanulmányokban végzett *in vitro* aktivitás mérések alapján a levosimendan szelektivitási faktora (PDE III vs. IV) 10000 körüli. Az enoximone hasonló értéke 4 és 60 között változik, a mi enzimaktivitási méréseink során 90-nek adódott. Így, másokhoz hasonlóan eredményeink azt mutatják, hogy enoximone adását követően jóval kevésbé szelektív PDE-gátlás következik be, mint levosimendan alkalmazása után. Mindezek az adatok alátámasztják azt a hipotézist, hogy a levosimendan pozitív inotróp hatását Ca^{2+} -érzékenyítőként fejt ki, míg az enoximone egy mérsékelt PDE III vs. PDE IV szelektivitással rendelkező PDE gátlóként teszi ezt. Emellett az enoximone esetén a pozitív inotrópia kialakításában sokkal nagyobb

szerepet játszanak a vaszkuláris hatások, pl. a koronária vazodilatáció, mint a levosimendan esetén.

ÖSSZEFOGLALÁS

Téziseink a krónikus szívelégtelenség patofiziológiai és terápiás vonatkozásaiban végzett kísérleteink eredményeit foglalják össze. A kontraktilitás sejtszinten megfigyelt tulajdonságainak háttérében álló szabályozási mechanizmusokat korszerű biokémiai módszerekkel tártuk fel.

1. A patkány bal kamrájának falában a passzív tenzió és a stretch-függő Ca^{2+} -érzékenyítés gradienseit mutattuk ki. A szubendokardiálisan nagyobb métrékű stretch-szenzitizáció a VLC2b stretch kiváltotta foszforilációjával társult. A szívinfarktust követő szívelégtelenségben a stretch-szenzitizáció grádiensének eltűnésével párhuzamosan a VLC2b foszforilációja is megszűnt a szubendokardiumban.
2. Knock out egér modellben kimutattuk, hogy a cMyBP-C hiánya rövid SL esetén növeli a Ca^{2+} -érzékenységet, csökkenti a Ca^{2+} -érzékenység SL-függő változását és szinte megszünteti annak PKA kiváltotta csökkenést. A megfigyelések a cMyBP-C kardiális kontraktilitás szabályozásában betöltött szerepét valószínűsítik.
3. A levosimendan és az OR-1896 pozitív inotróp, Ca^{2+} -érzékenyítő és PDE inhibitor potenciáljainak összehasonlítása azt mutatta, hogy szívizomban maximális plazmakoncentrációjánál a két vegyület Ca^{2+} -érzékenyítőként, nem pedig a PDE III és a PDE IV egyidejű gátlása útján fejt ki hatását. Továbbá, a levosimendan PDE III vs. PDE IV szelektivitása a legtöbb PDE-gátlóénál magasabbnak bizonyult.
4. A levosimendan és az enoximone összehasonlítása rámutatott egy nagy PDE III vs. PDE IV szelektivitású Ca^{2+} -érzékenyítő, illetve egy mérsékelt szelektivitású PDE-gátló vegyület kardiális hatásmechanizmusában lévő különbségekre.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A tézisek alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

1. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Le Guennec, J.Y., Vassort, G., Lacampagne, A. (2005) Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J.* 19, 88-90. IF: 6.820
2. Cazorla, O.[†], **Szilágyi, S.**[†], Vignier, N., Salazar, G., Krämer, E., Vassort, G., Carrier, L., Lacampagne, A. (2005) Activation of myofilaments in a hypertrophic mouse model lacking the cardiac myosin binding protein C: effect of length and PKA phosphorylation. ([†] a szerzők azonos mértékben járultak hozzá a kézirat elkészítéséhez; közlésre benyújtva)
3. **Szilágyi, S.**, Pollesello, P., Levijoki, J., Kaheinen, P., Haikala, H., Edes, I., Papp, Z. (2004) The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 486, 67-74. IF: 2.432
4. **Szilágyi, S.**, Pollesello, P., Levijoki, J., Haikala, H., Bak, I., Tosaki, A., Borbely, A., Edes, I., Papp, Z. (2005) Two inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J Cardiovasc Pharmacol.* 46, 369-376. IF: 1.576

További *in extenso* közlemények

1. Bodi, A., **Szilágyi, S.**, Edes, I., Papp Z. (2003) The cardiotonic effects of levosimendan in guinea pig hearts are modulated by beta-adrenergic stimulation. *Gen Physiol Biophys.* 22, 313-27. IF: 0.694
2. Kaheinen, P., Pollesello, P., Hertelendi, Z., Borbély, A., **Szilágyi, S.**, Édes, I., Nissinen, E., Haikala, H., Papp, Z. (2005) The positive inotropic effect of levosimendan is correlated to its stereoselective Ca²⁺-sensitizing effect but not to stereoselective phosphodiesterase inhibition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* (nyomtatás alatt) IF: 1.342

Idézhető absztraktok

1. **Szilágyi, Sz.**, Vaszily, M., Édes, I., Papp, Z. (2002) Temperature-dependent changes of the contractile parameters in isolated human cardiomyocytes. *Cardiol. Hung. Suppl.* 1., 88.
2. **Szilágyi, Sz.**, Vaszily, M., Édes, I., Papp, Z. (2002) Temperature-dependence of cross-bridge cycling rate and Ca²⁺-sensitivity of force in

- human cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, A62.
3. Bódi, A., **Szilágyi, S.**, Papp, Z., Édes, I. (2003) The cardiotonic effects of levosimendan in guinea pig hearts are modulated by beta-adrenergic stimulation. *Basic Res Cardiol* 98, A42.
 4. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Vassort, G., Lacampagne, A. (2003) Régionalisation des propriétés contractiles des cardiomyocytes et alteration au cours de l'insuffisance cardiaque chez le rat. *Arch. Mal. Cœur Vaiss.* 96, 396.
 5. **Szilágyi, S.**, Lacampagne, A., Kremer, E., Perriard, J.C., Vassort, G., Cazorla, O. (2003) Effects of the expression of a myomesin truncated form on cardiac contraction. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 24, 340.
 6. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Vassort, G., Lacampagne, A. (2003) Regionalization of rat cardiomyocytes contractile properties : alterations in heart failure. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 24, 343.
 7. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Vassort, G., Lacampagne, A. (2004) Myocyte contraction within the myocardium: tissular aspects. *Arch. Mal. Cœur Vaiss.* 97, 72.
 8. **Szilágyi, S.**, Lacampagne, A., Kremer, E., Perriard, J.C., Vassort, G., Cazorla, O. (2004) Contractile properties of the myocardium following adenoviral expression of the myomesin My2 domain. *Cardiol. Hung.* 34, C32.
 9. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Papp, Z., Vaszily, M., Édes, I., Tóth, A. (2004). The role of PKC izozymes on the regulation of human cardiomyocytes. *Cardiol. Hung.* 34, C87.
 10. **Szilágyi, S.**, Pollesello, P., Levijoki, J., Kaheinen, P., Haikala, H., Édes, I., Papp, Z. (2004) Levosimendan and OR-1896 induced positive inotropy in guinea pig hearts. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 261.
 11. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Papp, Z., Vaszily, M., Édes, I., Tóth, A. (2004) PKC mediated phosphorylation of human myofibrillar proteins. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 272.
 12. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Borbély, A., Vaszily, M., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A. (2005) Translocation and substrate specificity of protein kinase C alpha isozyme in human myocardium. *Cardiol. Hung.* 35, A24.
 13. **Szilágyi, S.**, Cazorla, O., Le Guennec, J.-Y., Vassort, G., Lacampagne, A. (2005) Transmural alterations of stretch-dependent contractile properties in the failing rat heart. *Cardiol. Hung.* 35, A28.
 14. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Vignier, N., Vassort, G., Carrier, L., Lacampagne, A. (2005) Effects of PKA stimulation on the length-dependent of cardiac myosin binding protein C deficient cardiomyocytes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26, 80.
 15. Borbély, A., Hertelendi, Z., Tóth, A., **Szilágyi, S.**, Édes, I., Varró, I., Papp, J.Gy., Papp, Z. (2005) Contractile alterations in isolated human

cardiomyocytes following oxidative protein modifications. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26, 81.

16. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Borbély, A., Vaszily, M., Varró, A., Papp, J.Gy., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A. (2005) PKC alpha in the human myocardium: expression, translocation and possible functions. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26, 82.

Előadások

1. **Szilágyi, Sz.**, Vaszily, M., Édes, I., Papp, Z. (2002) Temperature-dependent changes of the contractile parameters in isolated human cardiomyocytes. Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred.
2. Bódi, A., **Szilágyi, S.**, Édes, I., van der Velden, J., Stienen, G.J.M., Papp, Z. (2002) Heart failure specific alterations in Ca^{2+} -dependencies of force generation and actin-myosin turnover rate in isolated human myocardial cells. 5th Czech-French-Slovak Symposium, Smolenice.
3. Bódi, A., **Szilágyi, S.**, Papp, Z., Édes, I. (2003) Cardiac β -adrenergic signalization and levosimendan. 11th Alpe Adria Cardiology Meeting, Balatonfüred.
4. Papp, Z., Édes, I., **Szilágyi, S.**, Pollesello, P., Levijoki, J., Kaheinen, P., Haikala, H. (2003) What is the mechanism of levosimendan induced positive inotropy? 11th Alpe Adria Cardiology Meeting, Balatonfüred.
5. **Szilágyi, S.**, Lacampagne, A., Kremer, E., Perriard, J.C., Vassort, G., Cazorla, O. (2004) Contractile properties of the myocardium following adenoviral expression of the myomesin My2 domain. Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred.
6. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Papp, Z., Vaszily, M., Édes, I., Tóth, A. (2004) The role of PKC izozymes on the regulation of human cardiomyocytes. Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred.
7. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Papp, Z., Vaszily, M., Édes, I., Tóth, A. (2004) PKC mediated phisphorylation of human myofibrillar proteins. 6th Meeting France-new CEE members "New frontiers in basic cardiovascular research", La Grande-Motte.
8. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Vignier, N., Kulikovskaya, I. Winegrad, S., Vassort, G., Carrier, L., Lacampagne, A. (2004) Influence of vardiac myosin-binding protein C and PKA-dependent phosphorylation on length-dependent activation of myofilaments. 6th Meeting France-new CEE members "New frontiers in basic cardiovascular research", La Grande-Motte.
9. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Borbély, A., Vaszily, M., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A. (2005) Translocation and substrate specificity of protein kinase C alpha isozyme in human myocardium. Annual Meeting of the

- Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred.
10. **Szilágyi, S.**, Cazorla, O., Le Guennec, J.-Y., Vassort, G., Lacampagne, A. (2005) Transmural alterations of stretch-dependent contractile properties in the failing rat heart. Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred.
 11. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Vignier, N., Vassort, G., Carrier, L., Lacampagne, A. (2005) Effects of PKA stimulation on the length-dependent of cardiac myosin binding protein C deficient cardiomyocytes. XXXIV European Muscle Conference, Mátá.

Poszterek

1. Magyar, J., Bányász, T., Kern, A., **Szilágyi, Sz.**, Bakk, J., Szigligeti, P., Körtvély, Á., Nánási, P.P. The effects of timol on contractility and electrophysiological properties of mammalian myocardium. (1999) Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Budapest.
2. Magyar, J., Bányász, T., Kern, A., **Szilágyi, Sz.**, Bakk, J., Szigligeti, P., Körtvély, Á., Nánási, P.P. (1999) The effects of timol on the mechanical and electrophysiological parameters of canine heart. 23rd Meeting of the European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology, Oxford.
3. Magyar, J., Bányász, T., Kern, A., **Szilágyi, Sz.**, Bakk, J., Szigligeti, P., Körtvély, Á., Nánási, P.P. (2000) The effects of timol on the mechanical and electrophysiological parameters of canine heart. (2000). Annual Meeting of the Hungarian Society of Cardiologists, Balatonfüred.
4. **Szilágyi, Sz.**, Vaszily, M., Édes, I., Papp, Z. (2002) Temperature-dependence of cross-bridge cycling rate and Ca^{2+} -sensitivity of force in human cardiomyocytes. 22nd European Section Meeting of the International Society for Heart Research, Szeged.
5. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Lacampagne, A., Kremer, E., Perriard, J.C., Vassort, G. (2003) Effects of expression of a myomesin truncated form in the heart on cardiac contraction. 4th International Ascona Workshop on Cardiomyocyte Cell Motility, Ascona.
6. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Vassort, G., Lacampagne, A. (2003) Régionalisation des propriétés contractiles des cardiomyocytes et alteration au cours de l'insuffisance cardiaque chez le rat. 20^e Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Grenoble.
7. Bódi, A., **Szilágyi, S.**, Papp, Z., Édes, I. (2003) The cardiotonic effects of levosimendan in guinea pig hearts are modulated by beta-adrenergic stimulation. Heart Failure 2003/ISHR-ES, Strasbourg.
8. **Szilágyi, S.**, Lacampagne, A., Kremer, E., Perriard, J.C., Vassort G., Cazorla, O. (2003) Effects of the expression of a myomesin truncated form on cardiac contraction. 32nd European Muscle Conference, Montpellier.

9. Cazorla, O., **Szilágyi, S.**, Vassort, G., Lacampagne, A. (2003) Regionalization of rat cardiomyocytes contractile properties : alterations in heart failure. 32nd European Muscle Conference, Montpellier.
10. **Szilágyi, S.**, Pollesello, P., Levijoki, J., Kaheinen, P., Haikala, H., Édes, I., Papp, Z. (2004) Levosimendan and OR-1896 induced positive inotropy in guinea pig hearts. XXIII European Muscle Conference, Elba.
11. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Papp, Z., Vaszily, M., Édes, I., Tóth, A. (2004) PKC mediated phosphorylation of human myofibrillar proteins. XXIII European Muscle Conference, Elba.
12. Borbély, A., Hertelendi, Z., Tóth, A., **Szilágyi, S.**, Édes, I., Varró, I., Papp, J.Gy., Papp, Z. (2005) Contractile alterations in isolated human cardiomyocytes following oxidative protein modifications. XXXIV European Muscle Conference, Mátá.
13. Molnár, A., **Szilágyi, S.**, Borbély, A., Vaszily, M., Varró, A., Papp, J.Gy., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A. (2005) PKC alpha in the human myocardium: expression, translocation and possible functions. XXXIV European Muscle Conference, Mátá.