

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Kardiális miozin-aktivátorok szisztolés és diasztolés
funkcióra kifejtett hatásainak vizsgálata *in vitro* és *in vivo***

Dr. Ráduly Arnold Péter

Témavezető: Dr. Borbély Attila



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Kardiális miozin-aktivátorok szisztolés és diasztolés funkcióra kifejtett hatásainak vizsgálata in vitro és in vivo

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: **Dr. Ráduly Arnold Péter**, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Borbély Attila

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Sepp Róbert, az MTA doktora
Dr. Lekli István, PhD

A Bíráló Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
Tagok: Prof. Dr. Sepp Róbert, az MTA doktora
Dr. Lekli István, PhD
Dr. Szentandrásyné Dr. Gönczi Mónika, PhD
Dr. Nagy Gergely György, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Augusztai Nagyelőadó
2023. július 18. 13 óra

1 Irodalmi áttekintés

1.1 A szívelégtelenség definíciója, epidemiológiája és csoportosítása

A szívelégtelenség (SZE) a szív strukturális és/vagy funkcionális károsodása következtében létrejövő komplex klinikai szindróma, mely során a betegnek a szívelégtelenségre jellemző típusos panaszai (fulladás, nehézlégzés, fáradékonyság) és tünetei (telt nyaki vénák, pulmonális pangás, bokaödéma) vannak. A SZE mind a fejlett, mind a fejlődő társadalmakban igen gyakori az öregedő társadalom és fejlődő terápia miatt.

Az Európai Kardiológiai Társaság (ESC) által 2021-ben kiadott szakmai ajánlás alapján a SZE csoportosítása a bal kamrai ejekciós frakció (BKEF) alapján az alábbiak szerint történik:

1. SZE csökkent ejekciós frakcióval (Heart Failure with reduced Ejection Fraction – HFrEF, BKEF<40%), 2. SZE közepes mértékben csökkent ejekciós frakcióval (Heart Failure with mildly reduced Ejection Fraction - HFmrEF, BKEF 41-49%) és 3. SZE megtartott ejekciós frakcióval (Heart Failure with preserved Ejection Fraction (HFpEF, BKEF≥50%).

1.2 A szisztolés szívelégtelenség (HFrEF) pathofiziológiája és kezelése

Az etiológiától függetlenül a HFrEF központi eleme a kontraktilis funkció és ennek következtében a perctérfogat (CO) csökkenése, mely számos egymást erősítő kóros adaptációs folyamatot indít el. A CO a szívfrekvencia (HR) és a pulzustérfogat (SV) szorzata. Az SV-t meghatározó tényezők közül kiemelendő az előterhelés, az utóterhelés és a kontraktilitás. Utóbbi a szív inotróp állapotát jellemzi. A SZE-ben aktiválódó kompenzációs mechanizmusok tulajdonképpen a csökkent CO-t és artériás középnyomás csökkenését próbálják normalizálni/javítani. Ezek közül kiemelendő a Frank-Starling mechanizmus, a neurohumorális rendszer kóros aktivációja és a BK-i remodelling.

A bázisterápiát képező gyógyszerek közös jellemzője, hogy képesek csökkenteni a mortalitást, a hospitalizációk számát, így javítják a betegség prognózisát. A RAAS-gátló vegyületek közül kiemelendők az angiotenzin-konvertáz enzim gátlók (intolerancia esetén az angiotenzin-receptor blokkolók). Napjainkra számos evidencia áll rendelkezésre a nátriuretikus peptid útvonalat is befolyásoló angiotenzin-receptor neprilizin-inhibitorok (ARNI) kedvező hatásairól HFrEF-ben. A szimpatikus idegrendszer túlaktivációja szelektív β 1-receptor blokkolók segítségével valósítható meg. A mineralokortikoid receptor antagonisták (MRA) szintén jó hatékonysággal alkalmazhatóak, ugyanis a nátrium-reabszorpció gátlásán keresztül hatékonyan képesek fokozni a nátriumürítést. Az utóbbi évek intenzív kutatásainak és klinikai

tanulmányok eredményeképpen a nátrium glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) gátlók alkalmazása is bekerült a HFrEF bázisterápiájába.

1.3 Az előrehaladott stádiumú szívelégtelenség

A SzE progresszív lefolyású betegség, mely a betegek életminőségének fokozatos romlásához vezet. A New York Heart Association (NYHA) a mindennapi aktivitás és a betegek szubjektív panaszai alapján négy funkcionális stádiumot különít el (NYHA I-IV.). Ha a korábban említett optimális gyógyszeres és eszközös kezelés ellenére is rosszabbodik a beteg állapota, előrehaladott SzE alakul ki. Ebben a betegcsoportban terápiás továbblépésre van szükség. A definitív, végleges megoldás a szívtranszplantáció, illetve bizonyos betegek esetében mechanikus keringéstámogatás jön szóba. Mivel azonban kevés beteg felel meg a szigorú kritériumoknak, a betegek nagyobb hányadánál konzervatív/gyógyszeres kezelés kerül alkalmazásra, melynek egyik hatékony eszköze lehet a pozitív inotróp/inodilátor kezelés. Ezen szerek hosszútávú használata több tanulmány eredményei alapján növeli a mortalitást és nem csökkenti a hospitalizációk számát. A jelenlegi kutatások célja olyan szelektív, kontraktilitást fokozó gyógyszerek kifejlesztése, amelyek már a HFrEF korábbi stádiumában is alkalmazhatók és primeren a pumpafunkció javítását célozzák.

1.4 A pozitív inotróp hatású szerek csoportosítása

1.4.1 Konvencionális/upstream mechanizmusú pozitív inotróp szerek

Az „upstream” mechanizmus útján ható szerek közé azon tradicionális pozitív inotróp szerek sorolhatóak, amelyek az IC Ca^{2+} -koncentrációt különböző szignáltranszdukciós és/vagy receptorális útvonalak módosításán keresztül befolyásolják. Ezen csoport tagjai a hagyományos pozitív inotróp szerek: a klinikai gyakorlatban főként akut SzE kezelésében alkalmazott dobutamin képes a β_1 -receptorok aktiválásán keresztül olyan foszforilációs folyamatokat iniciálni, melyek végső soron az IC Ca^{2+} -szint növekedéséhez vezetnek. A csoport további tagjai a dopamin, milrinon, adrenalin, noradrenalin és a szívglikozidok. Ezen gyógyszerek közös tulajdonsága, hogy növelik az IC Ca^{2+} -szintet, ezáltal a miokardium energiaigényét és oxigénfelhasználását, amely hosszú távon kifejezetten előnytelen a szívizom energetikája szempontjából. A Ca^{2+} -túltöltöttség továbbá melegágyát képezi a pitvari és kamrai aritmiák kialakulásának.

1.4.2 Centrális és downstream mechanizmus útján ható szerek

A „centrális” mechanizmusú gyógyszerek, mint pl. a levosimendan (Levo), fokozzák a TnC Ca^{2+} iránti affinitását, továbbá az ATP-szenzitív K^{+} -csatorna aktiválásán keresztül

vazodilatációt váltanak ki, ezért inodilátornak is nevezik őket. Magasabb plazmakoncentrációk esetén az „upstream” mechanizmus jellegzetességeit is mutatják, ugyanis PDE3-gátló hatással rendelkeznek.

A „downstream” mechanizmus jellegzetessége, hogy az IC Ca^{2+} -szintre nem fejt ki semmilyen hatást, így teljesen mentes a konvencionális pozitív inotróp szerekre jellemző mellékhatásoktól, így feltételezhetően energetikailag is kedvezőbb a szívizomsejteknek. Jelenleg ebbe a csoportba tartozó molekulák a miozin-ATPáz aktivitásának a fokozásán keresztül hatnak. Ezen gyógyszercsoport egy korábbi képviselője az EMD 53998 (EMD), mely egy enantiomer molekula. Egyik párja downstream mechanizmus útján hat, míg a másik PDE3-gátló hatással rendelkezik. Utóbbi évtized intenzív kutatásainak eredményeként fejlesztették ki az omecamtiv mecarbilt (OM), illetve a danicamtivot, melyek valójában csak a miozin molekula ATPáz aktivitásának a fokozásán keresztül fejtik ki hatásukat, ebből kifolyólag úgy hivatkoznak rájuk, mint miozin-aktivátorok.

1.5 A miozin-aktivátorok

1.5.1 Hatásmechanizmus

A szívizom összehúzódásának molekuláris alapegységét, a szarkomert a vékony (aktin) és vastag (miozin) filamentumok együttese alkotja. A miozin molekula gyakorlatilag két globuláris fejből és egy farki részből áll. A miozinej kiemelkedő fontosságú abból a szempontból, hogy rajta található az aktin és adenzin trifoszfát (ATP) kötőhely, illetve ennek megfelelően ATPáz aktivitással rendelkezik, ezáltal a kémiai energiát fizikai energiává képes alakítani. A miozin-aktivátorok, az OM és a danicamtiv képesek a kardiális típusú miozin S1 régiójához szelektíven kötődni és ATP-hidrolizáló képességét fokozni. Ez elősegíti az ADP és P_i képződését, illetve a P_i disszociációját a miozinejről, így felgyorsítva a ciklus sebességmeghatározó lépését és a miozin-ADP komplex keletkezését, azaz a gyengén kötött formából az erősen kötött formába való átalakulást, melyet aztán az erőgenerálás lépése követ. Teoretikusan így a folyamatnak köszönhetően megnövekszik az egy ciklus alatt kialakuló aktin-miozin interakciók száma, így lehetővé téve a nagyobb erő kifejtést az oxigénfelhasználás növekedése nélkül.

1.5.2 Omecamtiv mecarbíl

A daganatellenes terápia fejlődése során nagy áteresztőképességű módszer (HTS) segítségével olyan molekulákat kerestek, melyek a sejtosztódásban szerepet játszó motorfehérjéket, a kinezineket képesek gátolni. Ennek során azonban, nem egy gátló, hanem aktiváló molekulát

találtak. További modifikációkkal jutottak el az OM-hoz (CK-1827452), mely *in vivo* kísérletek elvégzésére is alkalmasnak bizonyult és hatékonyan volt képes fokozni a miozin-ATPáz aktivitását. Preklinikai vizsgálatok során igazolták, hogy képes jelentősen fokozni a patkányból izolált szívmuscle sejtek kontrakciós erejét, a kontrakciós idő kisfokú elnyújtása révén, azonban a kalcium tranziens befolyásolása nélkül. *In vivo* vizsgálatok során különböző szívelégtelenség-állatmodellekben a BK funkció javult az oxigénfelhasználás fokozódása nélkül.

Az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok pozitív eredményei tették lehetővé, hogy humán kísérleteket kezdjenek az új gyógyszerjelölttel. Az első dóziskereső klinikai vizsgálat, illetve az ATOMIC-HF vizsgálat során iv. OM kezelést hasonlítottak össze placeboval. Később a COSMIC-HF vizsgálat során per os kezelést alkalmaztak. Ezen vizsgálatokba döntően 40% alatti EF-el rendelkező HFrEF betegeket válogattak be. Kiemelendő a szisztolés funkció javulása, a SET jelentős megnyúlása ezen vizsgálatok alapján, továbbá a szer jól tolerálhatónak és biztonságosnak bizonyult. Adverz események esetében nem találtak különbséget, habár kismértékű növekedés volt megfigyelhető a TnI szintekben, de ez nem mutatott összefüggést az alkalmazott OM dózissal az ATOMIC-HF vizsgálat során. A GALACTIC-HF fázis III. klinikai vizsgálat során. Az elsődleges összetett végpont, azaz a CV halálozás vagy SzE miatti esemény (hospitalizáció vagy sürgős vizit) az OM-al kezelt betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt a placebo csoporthoz képest. A kompozit végpont összetevőit külön vizsgálva, a CV okból bekövetkező halálozás tekintetében nem volt szignifikáns különbség, azonban SzE miatti események tekintetében jelentős csökkenés volt megfigyelhető az OM csoportban. Továbbá kismértékű, de nem szignifikáns növekedés volt a TnI-szintben és jelentősen csökkent az NT-proBNP szint is OM-al kezelt betegek esetében.

1.5.3 Danicamtiv

Feltételezhetően az OM-al végzett klinikai vizsgálatok bizonytalan eredményei ösztönözték a kutatókat egy új közvetlen miozin-aktivátor, a danicamtiv kifejlesztésére. Az OM-hoz hasonlóan a danicamtiv is felgyorsítja a tisztított humán S1 miozin molekulák ATPáz aktivitásának sebességét *in vitro*, és növeli a SET-t és az BKEF-t, valamint a bal pitvari szisztolés funkciót HFrEF *in vivo* kísérleti kutyamodelljében. A fázis I. klinikai vizsgálat során igazolták a danicamtiv biztonságosságát, mely eredmények alapján megtervezték és elvégezték a dóziseszkálációs vizsgálatokat szívelégtelen betegekben, ahol a BK szisztolés funkció javulása mellett átmeneti tünetmentes Tn plazmakoncentráció-emelkedést tapasztaltak a betegek 23%-ánál. Egy nemrég elvégzett preklinikai vizsgálatban az OM adagoláshoz képest

szélesebb terápiás ablak, nagyobb kontraktilis funkció-javító potenciál és kedvezőbb luzitrop hatás társult danicamtiv alkalmazásakor.

2 Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki *in vitro* modellrendszerben izolált, intakt szívműködéseken megvizsgálni a különböző OM-koncentrációk hatására létrejövő szisztolés és diasztolés szarkomerhossz-változásokat, azok kinetikáját és összefüggéseit, valamint az IC Ca^{2+} -tranzienekben bekövetkező változásokat. Komparátor vegyületekként EMD-t és Levosimendant használtuk.

In vivo vizsgálatunk során részletesen kívántuk elemezni az új típusú miozin-aktivátornak, a danicamtivnak a szív ciklus időtartamaira, a szisztolés és diasztolés funkcióra kifejtett hatásait.

3 Anyagok és módszerek

3.1 *In vitro* kísérletek

3.1.1 A szívműködése izolálása

Az *in vitro* vizsgálataink során kutyából enzimatikusan izolált, BK-i szívműködéseket használtunk, melyek intakt membránrendszerrel rendelkeznek. Az elektrofiziológiai tulajdonságok szempontjából a kutyából izolált szívműködések kiválóan alkalmazhatóak az emberi szívműködések modellezésére. Kísérleteink során, ivarérett, kutatási célra tenyésztett, vegyesen hím és nőstény kutyából (n=6, átlagsúly: 10,6±2,1 kg, életkor: 15,1±4,2 hónap) származó BK-i szívműködéseket használtunk.

3.1.2 A Ca^{2+} szint változásának és a szarkomerhossz rövidülésének a mérése

A szívműködéseket IC Ca^{2+} -szintjét Fura-2 AM Ca^{2+} érzékeny ratiometrikus fluoreszcens festékkel vizsgáltuk. Olyan téglalap/rúd alakú sejteket választottunk ki, amelyek vizuális ellenőrzés során megfelelő összehúzódással rendelkeztek a téringerlés hatására és morfológiailag (tisztá citoplazma, éles szélű, jól látható csíkolt) is alkalmasnak bizonyultak. A téringerlés során szobahőmérsékleten 0,1 Hz-es frekvenciát alkalmaztunk (Experimenta Setup, MDE, Heidelberg). A Fura-2 Ca^{2+} telítettség függvényében eltérő hullámhosszokon gerjeszthető, Ca^{2+} -kötött formában 340 nm-en, míg Ca^{2+} hiányában 380 nm-en rendelkezik excitációs maximummal. Így a 340, illetve 380 nm-en gerjesztett Fura-2 festék arányainak a változása jól tükrözi az IC térben létrejövő Ca^{2+} -szint változását. A fluoreszcens emissziót mindkét hullámhossz esetében 510 nm felett detektáltuk, és a rögzített jeleket 120 Hz-en digitalizáltuk a FeliX szoftver segítségével (Ratiomaster RM-50 System, Horiba, New

Brunswick, NJ, USA). A Felix GX szoftver a szarkomerhossz modul (SL-101HS HORIBA/PTI Piscataway, NJ) segítségével választottuk ki a szívizomsejt egy régióját, hogy nyomon követhessük a harántcsíkolt mintázat változását és ebből számított a szoftver a szarkomerhosszt. A kísérleti protokoll a következő volt: szobahőmérsékleten a szívizomsejteket 0,1 Hz-en legalább 2-3 percig stimuláltuk, hogy minden kísérlet elején elérjünk egy állandósult „steady-state” állapotot. Az egyes kísérletben alkalmazott gyógyszerekkel OM-lal (0,03 μM , 0,1 μM , 0,3 μM vagy 1 μM végkoncentrációban), Levo-nal (1 μM) vagy EMD-vel (1 μM) 5-8 percig inkubáltuk a sejteket, majd ismételt téringerléseket kezdtünk és rögzítettük a kontrakciókat és a Fura 2 arány változásait.

3.1.3 A kontraktilis paraméterek és Ca^{2+} tranziensek jellemzése

A nyugalmi (stimulus nélküli) SL (RSL; μm) a steady-state állapot elérést követően, illetve az egyes kezeléseket követően került rögzítésre. Vizsgáltuk továbbá a frakcionális szarkomerhossz rövidülést (FSL; %), az összehúzódás időtartamát (s), az összehúzódás és a relaxáció sebességét ($\mu\text{m/s}$). A nyugalmi Ca^{2+} -szintet a Fura-2 arány alapján becsültük a kiindulási értéken. A Ca^{2+} -tranziensek esetén vizsgáltuk az amplitúdót, a kialakulásának a sebességét és lecsengési kinetikáját, továbbá az időtartamát.

3.2 In vivo kísérletek

3.2.1 Kísérleti elrendezés, állatmodell

Az *in vivo* kísérleteket 8-12 hetes felnőtt Sprague-Dawley patkányokon (n= 14, súly: 417,90 $\pm$ 51,95 g, Charles River Laboratories Inc., Németország) végeztük. Az echokardiográfia során folyamatosan három elvezetéses EKG rögzítést és monitorizálást történt. A danicamtivot iv. 2 mg/kg dózisban, egyszeri bolusban adtuk be az előzőleg kanülált farokvénába, a helyi állatgondozási bizottság által jóváhagyott protokoll szerint (4-1/2019/DEMÁB).

3.2.2 Konvencionális echokardiográfia

A transzthorakális echokardiográfiát (TTE) a Vevo 3100 képalkotó rendszerrel végeztük, amely a Vevo Imaging Station-t (VisualSonics, Amszterdam, Hollandia) tartalmazta, és egy magas frekvenciájú transzducerrel (MX250, 14-28 MHz) volt felszerelve. Az echokardiográfia a danicamtiv iv. beadása után 5 perccel kezdődött és legfeljebb 15 percig tartott. Az adatgyűjtést B-, 2D-, M- és Doppler-módban végeztük, paraszternális hosszú- és rövidtengelyű (PSLAX és PSAX), valamint szupraszternális (SST) és csúcsi 4 üregű (A4C) nézetekből. A vizsgálatokat az American Society of Echocardiography iránymutatásai szerint

végeztük el. A szívfrekvenciát (HR, ütés/perc) az EKG monitorizálás során számítottuk oly módon, hogy öt másodpercre jutó szív ciklusokat megszámoltuk és ebből kalkuláltuk az egy percre vonatkoztatott átlagfrekvenciát. A falvastagságot és a BK átmérőket M-módban, a papilláris izmok középső szintjén, PSLAX és PSAX nézetekből, a bal pitvari maximális átmérőt (mm), az aorta gyök átmérőt (mm) szintén M-módú felvételekből mértük. A végdiasztolés átmérőt (EDD, mm) és a végszisztolés átmérőt (ESD, mm), PSLAX M-módú felvételeken az endo- és epikardiális határok manuális jelölésével határoztuk meg. A BK térfogatát diasztolében és szisztolében (EDV, illetve ESV; μ l) a szoftver a következőképpen számította ki: $(7,0/(2,4+EDD))^3 \cdot EDD^3$, illetve $(7,0/(2,4+ESD))^3 \cdot ESD^3$. A BKEF (%) $100 \cdot (EDV - ESV)/EDV$ érték szerint mértük. Továbbá vizsgáltuk frakcionált rövidülést (FS; %), a pulzustérfogatot (μ l), a CO-t (ml/perc). Az endokardiális falösszehúzódnak kinetikájának mérésére az BK hátsó falán mért M-mód képre illesztettünk egy egyenest és ebből számítottuk a mereedségnek megfelelően a sebességet (MVel, mm/s).

A diasztolés funkciót pulzatilis hullámú Dopplerrel (PWD) és szöveti doppler képalkotással (TDI) értékeltük apikális 4 üregi nézetekből a mitrális billentyű, illetve a szeptális anulusz magasságában. A PWD segítségével mértük a transzmitrális korai (MV E, mm/s) és késői pitvari (MV A, mm/s) áramlási csúcssebességet, az E/A arányt. Meghatároztuk az izovolumetrikus összehúzódnak időt (IVCT, ms), a szisztolés ejekciós időt (ms) és az izovolumetrikus relaxációs időt (IVRT, ms). A szív ciklus hosszát (CL; ms) az R-R távolságból határoztuk, a szisztolés időtartamát (ms) ET+IVCT-nek tekintettük, míg a diasztolés idejét (DiasDur; ms) CL-SystDur-ként számoltuk és vizsgáltuk a diasztolés/szisztolés idejének arányát is. Aorta áramlási paramétereinek meghatározására is PWD módot használtuk a módosított szupraszternális (aortaív) nézetből. Megmértük pulmonális véna pitvari reverse áramlás (AR) csúcssebességét (PV Ar, mm/s) és időtartamát (PV ARdur, ms). A szeptális gyűrűnél szöveti Doppler-képalkotást (TDI) végeztünk a szisztolés (s', mm/s), valamint a korai (e' mm/s) és a késői (a', mm/s) beáramlás során. Ezután meghatározták az E/e' arányt. Minden egyes paraméter esetében három szív ciklus átlagolására került sor.

3.2.3 *Strain echocardiographia*

A strain paraméterek meghatározását az előre felvett felvételek elemzésével offline végeztük. A hagyományos echokardiográfia során nagy képkockasebességű (>200 fps) B-mód felvételeket rögzítettünk, mind a PLAX és PSAX nézetből. A képeket lassított felvételen (1/8) értékeltük a VevoStrain® kiterjesztéssel felszerelt VevoLAB® szoftver segítségével (ver.5.6.0; FUJIFILM VisualSonics, Amszterdam, Hollandia). A hosszanti és radiális strain paramétereket

a PLAX nézetből, míg a cirkumferenciális strain paramétereket a PSAX nézet képeiből értékeltük, a papilláris izmokat kihagyva. A kamra határait meghatároztuk, és a speckle-tracking rendszer a körvonalazott kamra melletti körkörös területeket rendelte hozzá. Az iv. danicamtiv beadása után elemeztük a radiális szisztolés csúcs- és átlagsebesség értékeket (cm/s), a globális longitudinális strain (GLS; %), a globális cirkumferenciális strain (GCS; %)

3.2.4 Elektrogardiográfia

Az echokardiográfiás vizsgálatokkal párhuzamosan három elvezetéses EKG monitorizálást végeztünk. Az EKG-felvételek értékelésére a LabChart Reader v8.1.14 szoftvert használtuk. Az értékelés során a következő paramétereket vizsgáltuk: HR, PQ- QRS és QT-idő, korrigált QT-intervallum, valamint T-hullám amplitúdó. Az értékeléshez 5 egymást követő szív ciklust átlagoltunk minden egyes paraméterre vonatkozóan.

3.3 Alkalmazott gyógyszerek és anyagok

A kísérletek során használt OM-et az AdooQ BioScience-től rendeltük. A levosimendant finn kollaborációs partnerünk biztosította. Az *in vitro* kísérletekhez az egyes gyógyszereket DMSO-ban oldottuk és 10 μ M-os törzsoldatot készítettünk és -20°C-on tároltuk, majd ebből történtek az egyes végkoncentrációk hígítása és a sejtek kezelése. Az *in vivo* kísérletekhez használt danicamtivot és az alkalmazáshoz szükséges oldószer (10% DMSO/90% (20% szulfobutil-éter- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) fiziológiás sóoldatban) elkészítéshez szükséges vivőanyagot (SBE- β -CD) a MedChemExpress-től (NJ, USA) vásároltuk.

3.4 Statisztikai elemzés

Az eredményeket kiértékelés és grafikonok elkészítése a GraphPad Prism 9.0 szoftverben történt (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Az *in vitro* mérések során az egyes csoportokban a kísérletek száma 7 és 11 között változott 6 különböző szívből. A háttér fluoreszcencia-intenzitási szinteket a mérések végén egy szívizomsejt nélküli régióból nyertük és manuálisan kivontuk a fluoreszcencia-intenzitásokat. Tizennégy patkányt vizsgáltunk a danicamtiv iv. kezelése előtt és után. Minden kísérlet esetében a kapott eredményeket értékeltük a normalitás szempontjából (Kolmogorov-Smirnov normalitási teszt), majd párosított t-tesztekkel, vagy közös egyirányú ANOVA-val, vagy Kruskal-Wallis-teszttel többszörös összehasonlítással elemeztük, ahogyan az megfelelő volt. Az egyes adatokat átlag $\pm$ SEM értékeként adtuk meg. A statisztikai szignifikanciát $p < 0,05$ -nél fogadtuk el, a pontos p értékeket az eredmények részben tüntettük fel.

4 Eredmények

4.1 *In vitro* kísérletek - Omecamtiv mecarbil, EMD-53998 és Levosimendan

4.1.1 *Az OM és EMD csökkentette, míg a Levosimendan nem befolyásolja a nyugalmi szarkomerhosszat*

A OM kezelés hatására a szívműködés nyugalmi szarkomerhossza (RSL) dózisfüggő módon, jelentős mértékben csökkent $1,94 \pm 0,04 \mu\text{m}$, $1,77 \pm 0,04 \mu\text{m}$, $1,62 \pm 0,05 \mu\text{m}$ és $1,50 \pm 0,05 \mu\text{m}$, $0,03 \mu\text{M}$ OM, $0,1 \mu\text{M}$ OM, $0,3 \mu\text{M}$ OM és $1 \mu\text{M}$ OM esetén vs. $1,96 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (kontroll, az SL változások $0,1 \mu\text{M}$ -nál magasabb koncentrációk esetén $p < 0,05$). Az $1 \mu\text{M}$ EMD szintén a nyugalmi SL szignifikáns csökkenését idézte elő ($1,83 \pm 0,08 \mu\text{m}$, $p < 0,05$), míg a Levo nem befolyásolta azt. Az IC nyugalmi Ca^{2+} -koncentráció változatlan maradt mind az OM, EMD vagy Levo kezelések során.

4.1.2 *Az OM, EMD és Levo eltérő módon befolyásolja a bal kamrai szívműködés kinetikai paramétereit kontrakció és relaxáció során*

A szisztolés SL szignifikánsan csökkent $0,03 \mu\text{M}$, $0,01 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$ és $1 \mu\text{M}$ OM koncentrációk alkalmazásakor téringert követően ($1,65 \pm 0,03 \mu\text{m}$, $1,53 \pm 0,03 \mu\text{m}$, $1,39 \pm 0,02 \mu\text{m}$ és $1,34 \pm 0,03 \mu\text{m}$ vs. $1,74 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (Kontroll), $p < 0,05$ minden esetben). Az OM-hez hasonlóan az EMD ($1,51 \pm 0,03 \mu\text{m}$ -re, $p < 0,05$) és Levo ($1,63 \pm 0,03 \mu\text{m}$ -re, $p < 0,05$) is jelentősen csökkentette a szisztolés SL-t. Az OM növelte a frakcionális szarkomerhossz-rövidülést (FSL) $0,03 \mu\text{M}$ -os koncentrációban ($14,34 \pm 1,64\%$ vs. $11,17 \pm 0,55\%$), de magasabb gyógyszerkoncentrációknál nem volt rá jelentős hatással, míg $1 \mu\text{M}$ -os koncentrációban az EMD és a Levo is szignifikánsan növelte ezt a paramétert ($17,36 \pm 0,98\%$ (EMD) és $17,02 \pm 0,80\%$ (Levo) vs. $11,17 \pm 0,55\%$, $p < 0,05$). A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóit egyik alkalmazott gyógyszer sem befolyásolta.

Az OM koncentráció növekedésével a kontrakciós idő progresszív megnyúlása volt megfigyelhető ($1,50 \pm 0,33 \text{ s}$, $2,31 \pm 0,21 \text{ s}$, $3,85 \pm 0,15 \text{ s}$ és $5,89 \pm 0,57 \text{ s}$, $0,03 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$ és $1 \mu\text{M}$ OM koncentrációban, vs. $0,95 \pm 0,05 \text{ s}$ a kontroll, $\geq 0,1 \mu\text{M}$ felett: $p < 0,05$), míg az EMD és a Levo nem befolyásolta ezt a paramétert. Az OM koncentráció növekedésével ($0,03 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$ és $1 \mu\text{M}$) a kontraktilis válaszok, a kontrakciók ($0,51 \pm 0,13 \mu\text{m/s}$, $0,27 \pm 0,10 \mu\text{m/s}$, $0,11 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$ és $0,05 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ vs. $0,65 \pm 0,05 \mu\text{m/s}$) és a relaxációk ($1,12 \pm 0,30 \mu\text{m/s}$, $0,29 \pm 0,06 \mu\text{m/s}$, $0,13 \pm 0,03 \mu\text{m/s}$, $0,05 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ vs. $0,95 \pm 0,10 \mu\text{m/s}$, vs. kontroll) sebességének jelentős fokú lassulása volt megfigyelhető. Az OM-lal és az EMD-vel ellentétben a Levo növelte mind az összehúzódások, mind a relaxációk kinetikáját. A Ca^{2+} -tranziensek

időtartamát, az IC Ca^{2+} -tranziensek felfutásainak és lecsengésének kinetikáját (amelyet a K sebességállandóval jellemeztünk) egyik gyógyszeres kezelés sem befolyásolta.

4.1.3 Az OM egyedi módon változtatja meg a Ca^{2+} - szarkomerhossz összefüggést

A kontraktilis válaszok és az IC Ca^{2+} -tranziensek közötti kapcsolat további jellemzése érdekében a SL-t az IC Ca^{2+} -koncentráció függvényében ábrázoltuk. Ezek a Ca^{2+} - SL összefüggések nem különböztek alacsony koncentrációjú ($0,03 \mu\text{M}$) OM kezelés előtt és után (4A ábra). A $0,1 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$ vagy $1 \mu\text{M}$ OM alkalmazását követően azonban a hurokdiagrammok jelentősen és fokozatosan lefelé tolódtak, ami arra utal, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítő hatás mind a szisztolés, mind a diasztolés IC Ca^{2+} -koncentrációnál jelen van. $1 \mu\text{M}$ EMD jelenlétében a Ca^{2+} - SL összefüggés hasonló volt, mint a $0,1 \mu\text{M}$ OM alkalmazása során. A Ca^{2+} - SL kapcsolat a Levo jelenlétében a rövidebb szisztolés SL-ak felé tolódott, ami a szer szisztolés során kiváltott Ca^{2+} -érzékenyítő hatására utal.

4.1.4 A diasztolés és szisztolés szarkomer dinamika kölcsönhatásainak vizsgálata

A három szer különböző hatásmechanizmusainak szemléltetése érdekében a szisztolés válaszok paramétereit az OM, EMD vagy Levo kezelések során a megfelelő diasztolés SL függvényében fejeztük ki. Ez a megközelítés igazolta az OM és az EMD hatásai közötti hasonlóságokat, különösen, amikor a diasztolés és a szisztolés SL, vagy az összehúzóási időtartamok közötti összefüggéseket elemeztük. A diasztolés SL-FSL összefüggések ugyanakkor az OM és az EMD hatásmechanizmusa közötti különbségre hívták fel a figyelmet. A Levo mellett változatlan diasztolés SL a szer OM-tól vagy EMD-től eltérő Ca^{2+} -érzékenyítő hatására utal.

4.2 In vivo kísérletek - Danicamtiv

4.2.1 A danicamtiv csökkenti a végszisztolés átmérőt, de nem befolyásolja a végdiasztolés átmérőt

A danicamtiv miokardiális funkcióra kifejtett hatásait echokardiográfiával követtük nyomon altatott patkányokban. 2 mg/kg danicamtiv iv. beadása után a BK-i ESD jelentős csökkenését ($2,93 \pm 0,17 \text{ mm}$ vs. $3,76 \pm 0,11 \text{ mm}$, $p < 0,001$) tapasztaltuk, azonban a BK-i EDD nem változott ($7,56 \pm 0,12 \text{ mm}$ vs. $7,74 \pm 0,26 \text{ mm}$, $p = 0,45$).

4.2.2 A danicamtiv javítja a bal kamrai kontraktilitást

A releváns BK-i kontraktilis paraméterek, beleértve az BKEF-t ($89,36 \pm 0,99\%$ vs. $79,76 \pm 1,24\%$, $p < 0,001$), a FS-t ($63,57 \pm 1,47\%$ vs. $50,58 \pm 1,30\%$, $p < 0,001$) és a SV-t ($290,56 \pm 20,26 \mu\text{l}$ vs. $243,89 \pm 10,07 \mu\text{l}$, $p = 0,012$) szignifikánsan javultak a danicamtiv kezelést

követően. Emellett a CO is jelentősen nőtt ($72,45 \pm 5,04$ ml/perc vs. $61,40 \pm 2,99$ ml/perc, $p=0,026$), ami alátámasztja a gyógyszerjelölt pozitív inotróp hatását.

4.2.3 A diasztolé és szisztolé időtartama megváltozik danicamtiv hatására

A danicamtiv szív ciklus különböző időtartamaira kifejtett hatását is megvizsgáltuk, mely során mind a szisztolé időtartama ($106,00 \pm 3,30$ ms vs. $88,64 \pm 1,83$ ms, $p=0,0001$), mind a SET szignifikáns megnyúlását tapasztaltuk ($87,14 \pm 3,05$ ms vs. $72,28 \pm 1,53$ ms, $p<0,001$). Az echokardiográfiával mért paraméterekből kalkulált diasztolés időtartam szignifikánsan csökkent ($133,00 \pm 4,66$ ms vs. $152,20 \pm 4,19$ ms, $p=0,008$), amit a diasztolés és a szisztolés időtartam arányának jelentős csökkenése kísért ($1,28 \pm 0,07$ vs. $1,73 \pm 0,06$, $p<0,001$).

4.2.4 A kontrakció kinetikája jelentősen lassul, azonban a bal kamrai strain paraméterek javulnak a danicamtiv kezelést követően

A danicamtiv hatását a szívizomösszehúzódnak dinamikájára strain echokardiográfia segítségével részletesebben is megvizsgáltuk. A BK-i radiális szisztolés csúcssebesség ($2,67 \pm 0,17$ cm/s vs. $3,50 \pm 0,13$ cm/s, $p<0,001$, $n=9$) és az összehúzódnak sebesség (M-módban mért meredekség) ($2,30 \pm 0,11$ cm/s vs. $3,32 \pm 0,23$ cm/s, $p=0,008$, $n=10$) szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető. A danicamtiv kezelés hatására azonban, mind a globális longitudinális strain ($-33,27 \pm 1,45\%$ vs. $-24,22 \pm 1,30\%$, $p<0,001$), mind a globális cirkumferenciális strain ($-59,29 \pm 3,36\%$ vs. $-54,58 \pm 3,28\%$, $p=0,015$) paraméterek szignifikánsan csökkentek, ami az BK szisztolés funkció javulására utal. A danicamtiv kezelések során kialakult aorta- vagy pulmonális artériás átlag- és csúcssebességekben, illetve átlag- és csúcsgradiensekben nem volt szignifikáns változás.

4.2.5 A danicamtiv diasztolés diszfunkciót okoz

A danicamtiv hatására a korai (E) transzmitrális beáramlási sebesség szignifikánsan csökkent ($645,92 \pm 29,17$ mm/s vs. $720,92 \pm 11,87$ mm/s, $p=0,013$), a késői (A) transzmitrális beáramlási sebesség pedig jelentősen növekedett ($506,93 \pm 37,81$ mm/s vs. $379,24 \pm 19,00$ mm/s, $p=0,003$). Az E/A arány ennek megfelelően jelentősen csökkent ($1,97 \pm 0,10$ vs. $1,38 \pm 0,10$, $p=0,0003$), amely a BK-i töltőnyomás emelkedését jelezheti. A szöveti doppler (TDI) sebességek (azaz a mitrális billentyű szeptumának korai (a') és késői (e') szöveti sebességei) a mitrális E és A hullám sebességéhez hasonlóan változtak. A TDI e'/a' arány változásai tovább erősítik a danicamtiv beadásakor megváltozott mitrális beáramlási mintázatot. Mindazonáltal az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) ezzel egy időben változatlan maradt. Ezen túlmenően a pulmonális véna pitvari reverz áramlási sebességének ($201,10 \pm 24,85$ mm/s vs. $136,70 \pm 11,35$

mm/s, $p=0,008$) és az áramlás időtartamának ($28,10\pm2,24$ ms vs. $20,27\pm0,77$ ms, $p=0,004$) jelentős növekedése volt megfigyelhető, ami a BK diasztolés funkciójának romlását és a bal pitvar kontrakció erősségének fokozódását jelezheti.

5 Megbeszélés

5.1 *Az omecamtiv mecarbil pozitív inotróp és diasztolés diszfunkciót okozó hatása in vitro*

Eredményeink alapján az OM pozitív inotróp hatásának hátterében elsősorban az összehúzódások idejének megnyúlása, nem pedig a kinetikai paraméterek gyorsulása, vagy a frakcionált szarkomerhossz-rövidülés növekedése áll.

Megállapítottuk, hogy az OM, az EMD és a Levo az IC Ca^{2+} -tranziensek jelentős változásának hiányában is markáns változásokat idéz elő a szívműködés összehúzódásaiban és relaxációiban, tehát a Ca^{2+} -érzékenységet fokozzák. Ugyanakkor a Ca^{2+} -érzékenyítő mechanizmusuk különböző, és ennek megfelelően eltérő típusú kontraktilis válaszokat eredményeztek. Mivel a Levo és az EMD is gátolja a PDE3-at, a változatlan IC Ca^{2+} -szint ezen szerek jelenlétében potenciálisan azzal magyarázható, hogy ezek a szerek az általunk alkalmazott koncentrációkban a többi (PDE3-on kívüli) PDE izoformát kutya szívműködésében nem gátolják.

Az OM alacsony (diasztolés) IC Ca^{2+} -koncentráció esetén a szívműködés SL-csökkenését idézte elő téringelés hiányában is. A SL-csökkenés mértéke hasonló volt téringelést követően a stimulált szívműködésben mérhető diasztolés SL-hoz, ami arra utal, hogy az aktin-miozin kölcsönhatás OM-függő aktiválásához nem volt szükség Ca^{2+} -ra. Ezek az eredmények összhangban vannak a patkányokból nyert permeabilizált szívműködésnek diasztolés Ca^{2+} -szintek mellett létrejövő izometrikus erejének fokozódásával. Az OM-hez hasonlóan az EMD is csökkentette a nyugalmi SL-t, ami hasonlóságot mutat a két szer esetében. Vizsgáltunkból az is tisztán látható, hogy a diasztolés és szisztolés SL-ok, valamint a kontrakciós időtartamok csökkenése szoros összefüggést mutat a növekvő OM-koncentrációkkal. A diasztolés SL csökkenése felelős azért, hogy magasabb OM-koncentrációk esetében a FSL nem mutatott jelentős növekedést annak ellenére, hogy a szisztolés SL-ak jelentősen csökkentek, tehát a nyugalmi SL csökkenés gátat szab az FSL növekedésének.

Az általunk alkalmazott OM-koncentráció tartományában ($0,01-1 \mu\text{M}$), mely megfelelt a klinikai tanulmányokban alkalmazott OM-plazmaszintekkel, a nyugalmi SL csökkenését tapasztaltuk. A GALACTIC-HF vizsgálat során a cél a legalább 200 ng/ml -es ($0,5 \mu\text{M}$) plazmakoncentráció elérése és az 1000 ng/ml ($2,5 \mu\text{M}$) feletti koncentráció elkerülése volt.

Fontos megjegyezni, hogy korábbi kísérletek során a >1200 ng/ml-es ($3\text{ }\mu\text{M}$) OM-koncentráció esetén a szisztolés időtartam jelentős megnyúlását tapasztalták, mely diasztolé során a koronária keringés romlásához, potenciálisan miokardiális iszkémia kialakulásához vezethet. Az OM állatkísérletekben és humán tanulmányokban egyaránt a SET növekedését okozta. A SET megnyújtása a gyógyszer egyik legjelentősebb hatása: a szer alacsony IC Ca^{2+} -koncentráció mellett is fenntartja a kontrakciót. Annak ellenére, hogy az *in vitro* erő kifejtés kinetikája lassult, az OM *in vivo* nem befolyásolta az időegység alatt létrejövő nyomásváltozás maximumát (dP/dt_{max}), ami arra utal, hogy az OM farmakokinetikai tulajdonságai *in vitro* és *in vivo* eltérőek lehetnek.

A szívizomsejtek összehúzódásainak időtartama majdnem hatszorosára nőtt magas OM-koncentráció mellett, ami - a vékony filamentumok inaktiválódásának késleltetése és az erősen kötődő kereszthidak számának növekedése miatt - a kontraktilis rendszer elhúzódó aktiválódására utal. Korábbi tanulmányunkban permeabilizált patkány szívizomsejteken megfigyeltük, hogy mind a félmaximális kontrakció eléréséhez szükséges időtartam ($t_{1/2}$), mind pedig az aktin-miozin kereszthidak kinetikáját jellemző sebességi állandó (k_{tr}) jelentősen növekedett, mely - összhangban jelen megfigyeléseinkkel - szintén a miozin filamentumok csökkent *in vitro* motilitására utal. Összességében az OM által kiváltott Ca^{2+} -érzékenység-fokozódás hozzájárulhat az erősebb, lassabb és elhúzódó összehúzódásokhoz.

Fontos megemlíteni, hogy az OM által kiváltott kontrakciós időtartam-növekedés nem volt megfigyelhető az EMD alkalmazása során, mely a szerek miozin molekulán lévő eltérő kötőhelyeivel magyarázható. Az OM kötőhelye a miozin S1 doménjén valószínűleg az aktin-kötő felület és a nukleotid-kötő zseb közelében lévő hasadékból található. Ez a hely feltehetően ideális a szívizomzat miozin motorjának, mind az enzimatis, mind a mechanikai tulajdonságainak allosztérikus modulációjához. Habár EMD kötőhelye nem azonos az OM miozin S1 doménen lévő kötőhelyével, ennek ellenére az EMD adagolása szintén képes növelni a miozin ATPáz aktivitását.

Jelen vizsgálatban az OM hatására az intakt szívizomsejtek relaxációja jelentősen csökkent, különösen magasabb ($0,3$ és $1\text{ }\mu\text{M}$) koncentrációknál, az EMD vagy a Levo ugyanakkor azt csak kismértékben befolyásolta. Ez összhangban van korábbi vizsgálatunk eredményével, mely során az OM jelentősen megnyújtotta a permeabilizált patkány szívizomsejtek relaxációját és megnövelte Ca^{2+} -független passzív erejüket ($F_{\text{passzív}}$). Eredményeink alapján a relaxáció már alacsony OM-koncentrációknál ($0,1$ - $0,3\text{ }\mu\text{M}$) is károsodott, ez a hatás magas OM-koncentrációnál ($1\text{ }\mu\text{M}$) még kifejezettebb. SzE-ben az OM-

által kiváltott diasztolés diszfunkciót az emelkedett nyugalmi IC Ca^{2+} -szint potenciálisan súlyosbíthatja. A diasztolés funkció romlását - amelyet az izovolumetrikus relaxáció időállandójának (τ) és az BK-nyomáscsökkenés sebességének ($dP/dt_{\max}$) csökkenése tükröz - már korábban kimutatták térfogat-túlterhelés SzE modelljében patkányokban iv. OM-kezelés során. Ugyanakkor egészséges önkéntesekben az OM nem rontotta a diasztolés funkciót hasonló plazmakoncentrációban. Az OM esetleges diasztolés diszfunkciót okozó hatását COSMIC-HF tanulmányban is vizsgálták. A post-hoc elemzés során az IVRT növekedése igazolódott az E/A arány, vagy az E-hullám változása nélkül. A GALACTIC-HF-ben a diasztolés funkciót részletesen nem vizsgálták.

Annak ellenére, hogy az OM, az EMD és a Levo sem változtatja meg az IC Ca^{2+} -tranzienst, az egyes szerek különböző módon befolyásolták a Ca^{2+} -SL összefüggést. Az OM magas koncentrációban jelentősen csökkentette a SL-t, ezáltal diasztolés rövidüléshez és elhúzódozó relaxációhoz vezetett. Az EMD szintén a nyugalmi SL csökkenését eredményezte, de a relaxációs kinetikát nem befolyásolta. Az OM-lal és az EMD-vel ellentétben Levo kezelés során a káros hatások egyike sem volt megfigyelhető. Az OM mellett tapasztalt jelentős nyugalmi SL-csökkenés párhuzamba állítható a klinikai vizsgálatokban megfigyelt BK-i diasztolés átmérő csökkenéssel. Ez a tényező hatással lehet FS-re magas OM-koncentrációknál és befolyásolhatja a BKEF meghatározását is. Az OM szívműködés nyugalmi SL-ra és relaxációs kinetikájára kifejtett káros hatásai a OM-plazmaszint rendszeres meghatározásának fontosságára és szükségességére hívják fel a figyelmet a szer klinikai alkalmazása során.

5.2 A danicamtiv szisztolés és diasztolés funkcióra kifejtett hatása in vivo

In vivo tanulmányunkban átfogó echocardiográfiás elemzéssel kimutattuk, hogy a danicamtiv jelentős hatást gyakorol, mind a szisztolés, mind a diasztolés funkcióra patkányszívekben. A fenti adatok és a szív S1 miozinján OM és danicamtiv alkalmazásával végzett preklinikai vizsgálat eredményei arra utalnak, hogy a miozin ATPáz sebességét még diasztolés Ca^{2+} -szint mellett is növelik a direkt miozin-aktivátorok.

A BK-i kontraktilitást jellemző paraméterek közül danicamtiv hatására jelentősen javult az EF és az FS, továbbá a non-invazívan meghatározott SV, és a CO is. Ellentétben az OM-al, amely humán alkalmazás során az EDD-t és az ESD-t is csökkentette, a danicamtiv csak az ESD-t csökkentette, az EDD-t nem befolyásolta. Ezek az eredmények összhangban vannak a szívelégtelen kutyákon végzett preklinikai adatokkal, és részben egy fázis 2a klinikai vizsgálat eredményeivel is, ahol az EDD kevésbé tűnt érzékenynek a danicamtivra, mint az ESD. Egy nemrégiben humán mesterséges szívműködés szívműködés a danicamtiv és az OM hatásait

összehasonlító vizsgálatban a danicamtiv hatására a szisztolés funkciót jellemző paraméterekben kifejezettebb javulás volt megfigyelhető a relaxációhoz képest. A megnövekedett BK-i töltőnyomást köztudottan a pitvari kontraktilis funkció növekedése kompenzálja. A danicamtiv esetében ezt a jelenséget jól tükrözte a transzmitrális A-hullám jelentős növekedése, az E-hullám, az E/A arány, valamint a szöveti dopplerrel mért e'/a' arány is jelentős mértékű csökkenése.

A GALACTIC HF vizsgálatban az OM-kezelés hatására a szívfrekvencia kisméretékben csökkent, melyet a javuló kontraktilis funkció következtében létrejövő pozitív hatásokkal hoztak összefüggésbe. *In vivo* kísérleteinkben a szívfrekvencia nem változott. A SET növekedése a miozin-aktivátorok egyik specifikus hatása. Kísérleteink során a változatlan HR mellett megjelenő SET megnyúlása eredményezte a szisztolés időtartam növekedését. Ennek következtében a diasztolés időtartam rövidül, így a diasztolés és a szisztolés időtartam arányának változása potenciálisan hatással lehet a koronária perfúzióra. Az OM humán fázis II. és III. vizsgálatokban megfigyelt hatásaival ellentétben patkányszívben az IVCT-t és az IVRT-t a danicamtiv nem befolyásolta. A danicamtiv fázis IIa vizsgálatában csak extrém magas dózisok (>3500 ng/ml) esetében figyelték meg az IVRT megnyúlását. A SET növekedése együtt járt a miokardiális teljesítményindex (Tei-index) javulásával.

Fontos megjegyezni, hogy a strain echokardiográfiát különösen kisállatokban ritkábban alkalmazzák, bár nagyon érzékeny módszer a BK funkció változásainak kimutatására. A szívizom sebesség és a strain TDI-vel is mérhető, bár a speckle tracking 2D-strain-t jobb technikának tartják, mivel a TDI-vel ellentétben a kapott eredmények szögfüggetlenek. Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a danicamtiv jelentősen csökkenti a szívizom összehúzóási sebességét, amit egy 2D-strain paraméter, a radiális szisztolés csúcssebesség jelentős csökkenése is megerősített. A PLAX-ban nyert M-mód képen az összehúzás felszállószára illesztett egyenes meredeksége is csökkent, amely szintén megerősíti, hogy a szívizomösszehúzás kinetikája lassult. Jelen vizsgálatunkban a danicamtiv BK szisztolés funkcióra gyakorolt hatását nemcsak a standard módszerekkel (EF, FS, SV, CO), hanem 2D-strain echokardiográfiával is értékeltük. A danicamtivval kezelt patkányszívben szignifikánsan alacsonyabb (negatívabb) GLS és GCS értékeket mértünk.

Kísérleti eredményeink szívelégtelenségre történő extrapolálhatóságát korlátozhatja az a tény, hogy vizsgálatainkat egészséges állatokon végeztük. Ugyanakkor adataink összhangban vannak a szívelégtelenség kutyamodelljében és a danicamtivval végzett 2a fázisú vizsgálatban megfigyelt eredményekkel.

Összességében elmondható, hogy az OM és a danicamtiv szívre gyakorolt hatásai hasonlóak: mindkét vegyület javítja a bal kamra szisztolés funkcióját, ugyanakkor alkalmazásukkor diasztolés diszfunkció kialakulásával is számolnunk kell. A danicamtiv OM-lal szembeni előnye, hogy nem befolyásolja az IVRT-t és a IVCT-t, valamint nem változtatja meg az EDD-t sem.

A danicamtiv az OM-hez hasonlóan a Ca^{2+} -homeosztázis befolyásolása nélkül javítja a BK-i szisztolés funkciót. Vizsgálatunk során pitvari aritmia, malignus kamrai ritmuszavar, vagy vezetési zavar megjelenését nem tapasztaltuk, amely szintén támogatja azt a tényt, hogy a danicamtiv független a konvencionális pozitív inotróp szerekre jellemző mellékhatásoktól. Fontos megjegyezni, hogy kutatócsoportunk egy korábbi *in vivo* vizsgálata során, ahol szintén egészséges patkányokon alkalmaztunk OM-kezelést, egy úgynevezett alternáló elektromechanikus jelenség alakult ki, amelyet a danicamtiv esetében nem tapasztaltunk. Bár a danicamtiv is befolyásolja az BK-i diasztolés funkciót, ez a hatás kevésbé szembetűnő, mint az OM alkalmazásakor. Ez a különbség bizonyos mértékig összefügghet a danicamtiv által kiváltott pitvari kontraktilitás fokozódásával. Ezenkívül a diasztolés diszfunkció osztályhatásként jelenik meg a direkt miozin-aktivátorok alkalmazása során. Eredményeink alapján a danicamtivval kezelt betegeknél nagy figyelmet kell fordítani az BK diasztolés funkciójának rendszeres ellenőrzésére.

5.3 Limitációk

A kísérleteket *in vitro* végeztük enzimatikusan izolált kutya szívműködéseken, szobahőmérsékleten és alacsony ingerlési arány mellett, ezért eredményeink emberi szívre történő extrapolálásakor mindenképpen óvatosságra van szükség. Mindazonáltal a kutya szívműködése celluláris elektrofiziológiai szempontból a humán szívműködéshez hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek.

Mivel a biológiai folyamatok kinetikája a hőmérséklet csökkenésével lelassul, a standardizált körülmények között végzett kísérletek során alacsony frekvenciájú stimulációt választottunk. Jelenlegi kísérleteinkhez hasonlóan egy korábbi vizsgálatunkban 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz-es ingerlési frekvenciák alkalmazása során a szívműködés hosszának csökkenését és relaxációs zavarát figyeltük meg 1 μM vagy 2 μM OM koncentráció mellett 37 °C-on. Az *in vitro* ép szívműködéssel ellentétben az *in vivo* alkalmazott OM koncentrációk mellett potenciálisan alacsonyabb mértékű miozin aktiváció érhető el.

5.4 Új tudományos eredmények

- Kutatásunk során igazoltuk, hogy az omecamtiv mecarbil téringerlés hiányában is a szarkomerhossz csökkenését idézi elő, a szer kalciumérzékenyítő hatású.
- Az OM és az EMD hasonló támadáspont ellenére eltérően változtatja meg a miokardiális szarkomer dinamikát.
- Az OM hatására egyedi kalcium-szarkomerhossz összefüggés látható, mely során igazoltuk, hogy a növekvő OM koncentrációk esetén, eltolódva a kalcium tranziens lecsengése után következik be a relaxáció, nyugalmi/diasztolés kalciumszint mellett.
- *In vivo* vizsgálatainkban strain elemzés során elsőként írtuk le a danicamtiv összehúzódási kinetikájának a lassulását.
- Elsőként említjük a miozin aktivátorok esetén a diasztolés diszfunkciót, mint osztályhatás (omecamtiv mecarbil és danicamtiv esetén), illetve mint elkerülhetetlen mellékhatást a szisztolés funkció javulása érdekében, melyet kísérleteink során szintén alátámasztottunk az ejekciós frakció, a frakcionális rövidülés és a non-invazívan mért hemodinamikai paramétereknek a becslésével.
- Igazoltuk, hogy a danicamtiv hatására a diasztolé ideje jelentősen lerövidül, ugyanis a szisztolé idejét elnyújtja, mely felveti a coronaria perfúzió veszélyét.

6 Összefoglalás

Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy az omecamtiv mecarbil (OM) *in vitro* a szisztolés funkció javulását változatlan Ca^{2+} tranziensek mellett, a szisztolés szarkomerhossz csökkentése és kontrakciók elnyújtása révén éri el. A magasabb OM koncentrációk mellett a diasztolés szarkomerhosszak jelentős csökkenése, a kinetikai paraméterek lassulása és a kontrakció idejének szignifikáns növekedése figyelhető meg. Mindezen változások diasztolés diszfunkció kialakulásához vezetnek. Az EMD - a hasonló molekuláris támadáspont ellenére - mind a szisztolés, mind a diasztolés szarkomerhosszat csökkenti, ugyanakkor a kinetikai paramétereket inkább fokozza. A Levo a diasztolés szarkomerhossz megváltoztatása nélkül fokozta a kontrakciókat.

In vivo a danicamtiv hatására a bal kamrai kontraktilitás, a bal kamrai ejekciós frakció, a frakcionált rövidülés, a pulzustérfogat és a perctérfogat is jelentős mértékben növekedett. Korszerű echocardiographiás módszerekkel a GLS és GCS javulása, míg a kontrakciós kinetika lassulása (radiális szisztolés csúcssebesség csökkenése és az M-módban mért kontrakció meredekségének ellapulása) volt kimutatható.

A miozin aktivátorok legfontosabb echocardiographiás markere a szisztolés ejekciós idő (SET) jelentősen megnyúlása a szívfrekvencia, az IVCT és az IVRT változása nélkül. A szisztolés időtartamának megnyúlása következtében a diasztolés időtartama lerövidül, amely miokardiális iszkémia kialakulásához vezethet a szer alkalmazása során.

A miozin-aktivátorok esetén a szisztolés funkció javulása mellett számolni kell a diasztolés funkció romlásával (osztályhatás). A danicamtiv esetén kialakuló diasztolés diszfunkció nem elhanyagolható, ezért a kezelés előtt a bal kamrai diasztolés funkció pontos meghatározása, a kezelés alatt pedig annak szoros követése javasolt. Ezen potenciálisan káros hatások jelentősen korlátozhatják/megkérdőjelezhetik ezen új gyógyszercsoport klinikai gyakorlatban történő alkalmazását.



Nyilvántartási szám: DEENK/84/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ráduly Arnold Péter
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ráduly, A. P.**, Tóth, A., Sárkány, F., Horváth, B., Szentandrassy, N., Nánási, P. P., Csanádi, Z., Édes, I., Papp, Z., Borbély, A.: Omecamtiv mecarbil augments cardiomyocyte contractile activity both at resting and systolic Ca²⁺ levels. *ESC Heart Failure. [Epub ahead of print]*, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ehf2.14300>
IF: 3.612 (2021)
2. **Ráduly, A. P.**, Sárkány, F., Kovács, M. B., Bernát, B., Juhász, B., Szilvássy, Z., Pórszász, R., Horváth, B., Szentandrassy, N., Nánási, P. P., Csanádi, Z., Édes, I., Tóth, A., Papp, Z., Priksz, D., Borbély, A.: The Novel Cardiac Myosin Activator Danicamtiv Improves Cardiac Systolic Function at the Expense of Diastolic Dysfunction In Vitro and In Vivo: Implications for Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (1), 446, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24010446>
IF: 6.208 (2021)

További közlemények

3. Bernát, B., Erdélyi, R., Fazekas, L., Garami, G., Szekeres, R., Takács, B., Bombicz, M., Varga, B., Sárkány, F., **Ráduly, A. P.**, Romanescu, D. D., Papp, Z., Tóth, A., Szilvássy, Z., Juhász, B., Priksz, D.: Drug Candidate BGP-15 Prevents Isoproterenol-Induced Arrhythmias and Alters Heart Rate Variability (HRV) in Telemetry-Implanted Rats. *Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (3), 1-22, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16030359>
IF: 5.215 (2021)





4. Priksz, D., Lampé, N., Kovács, Á., Herwig, M., Bombicz, M., Varga, B., Wilisicz, T., Szilvássy, J., Pósa, A., Kiss, R., Gesztelyi, R., **Ráduly, A. P.**, Szekeres, R., Sieme, M., Papp, Z., Tóth, A., Hamdani, N., Szilvássy, Z., Juhász, B.: Nicotinic-acid derivative BGP-15 improves diastolic function in a rabbit model of atherosclerotic cardiomyopathy.
Br. J. Pharmacol. 179 (10), 2240-2258, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15749>
IF: 9.473 (2021)
5. Fagyas, M., Nagy, B. J., **Ráduly, A. P.**, Mátyás, S., Mártha, L., Erdősi, G., Sipka, S. i., Enyedi, E. E., Szabó, A. Á., Pólik, Z., Kappelmayer, J., Papp, Z., Borbély, A., Szabó, T., Balla, J., Balla, G., Bai, P., Bácsi, A., Tóth, A.: The majority of severe COVID-19 patients develop anti-cardiac autoantibodies.
GeroScience. 44, 2347-2360, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-022-00649-8>
IF: 7.581 (2021)
6. Sárkány, F., **Ráduly, A. P.**, Borbély, A.: Az intravénás vaspótlás jelentősége krónikus szisztolés szívelégtelenségben.
Orvostovábbk. szle. 28 (3), 41-46, 2021.
7. **Ráduly, A. P.**, Tóth, A., Papp, Z., Borbély, A.: Új lehetőség a szisztolés szívelégtelenség (HFrEF) kezelésében: omecantiv-mecarbil.
Cardiol. Hung. 51 (2), 118-124, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.26430/CHUNGARICA.2021.51.2.118>
8. **Ráduly, A. P.**, Kothalawala, E., Borbély, A.: Előrelépés a szívelégtelenség kezelésében.
Háziorv. továbbk. szle. 25, 797-802, 2020.
9. Kiss, A., **Ráduly, A. P.**, Regdon, Z., Polgár, Z., Tarapcsák, S., Stumolo, I., El-Hamoly, T., Virág, L., Hegedűs, C.: Targeting nuclear NAD⁺ synthesis inhibits DNA repair, impairs metabolic adaptation increases chemosensitivity of U-2OS osteosarcoma cells.
Cancers (Basel). 12 (5), 1-27, 2020.
IF: 6.639

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 38,728

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,82

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, 2023.03.17.



7 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Borbély Attilának, aki PhD munkám kezdete óta lelkesen támogatott, tudományos gondolkodásmódomat formálta, precizításra nevelt, munkámat segítette és példát mutatott, mind szakmailag és emberileg egyaránt.

Hálás vagy Dr. Papp Zoltán Professzor Úrnak, aki megteremtette a lehetőséget, hogy a Klinikai Fiziológiai Tanszéken végezhessem a kutatásaimat, továbbá kritikus tudományos gondolkodás és precizitás alapjait átadta számomra.

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Attila Professzor Úrnak, aki állandó gyakorlati tanácsaival, iránymutatásaival és kreativitásával nagyban hozzájárult a gyakorlati és elméleti tudásom nagyfokú fejlődéséhez.

Külön köszönettel tartozom Pólik Zsófiának, aki nem csak a klinikai kutatásokban nyújtott hatalmas segítséget, hanem baráti támogatására minden nehéz időszakban számíthattam, és kiváló csapatot alkottunk és fogunk alkotni a későbbiekben is.

Továbbá hálával tartozom Dr. Priksz Dánielnek, aki nagymértékben hozzájárult ahhoz, hogy a munkám sikeres legyen.

Köszönöm a Klinikai Fiziológiai Tanszék további munkatársainak és jelenlegi aktív és volt PhD hallgatóinak, hogy baráti támogató környezetet teremtettek és ezzel nagyban segítették a munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Édesanyámnak és Édesapámnak, hogy nem csak a PhD tanulmányaim alatt, de eddigi összes megpróbáltatás során mellettem voltak és a legnagyobb segítséget nyújtották számomra. Továbbá hálás vagyok bátyámnak, aki PhD tanulmányaim alatt is igyekezett az általános iskolában megkezdett gimnáziumon és egyetemen át folytatott tanácsadásaival a helyes irányban tartani. Köszönöm sógornőmnek és öcsémnek, nagyszüleimnek, barátaimnak és kedves páromnak, hogy bíztak bennem és erőt adtak mikor szükségem volt rá.

Továbbá a kutatás elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00043. számú, „Szív- és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART)” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg és TKP2020-NKA-04 - Járműipar, Inzulínrezisztencia, Úrkutatás (DE-SPACE) támogatta.