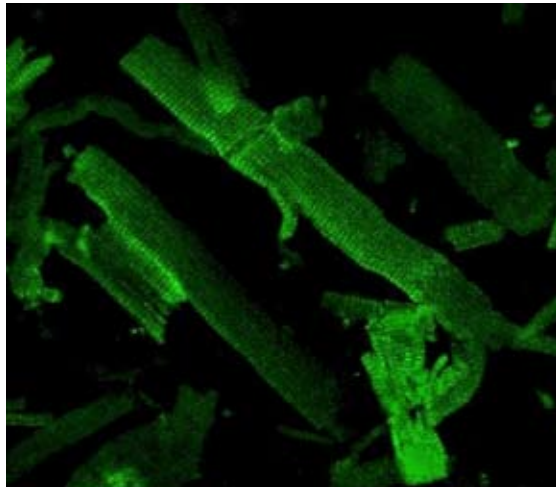


Studia Physiologica
19/2012



Papp Zoltán

Miokardiális szarkomerdinamika
élettani és kóros körülmények között



Studia Physiologica
Fasciculus 19

Miokardiális szarkomerdinamika élettani és kóros körülmények között

Papp Zoltán



A kötet megjelenését a Semmelweis Egyetem Piramis Projekt (TÁMOP-4. 2. 3/08/1/KMR-2008-0003) és a Studia Physiologica Alapítvány támogatása tette lehetővé

Sorozatszerkesztő: *Nagy Zoltán*

Nyelvi lektor: *Kékesi Violetta*

Címlapkép: Izolált kamrai szívizomsejtek szuszpenziója. A felvétel konfokális mikroszkópos technikával készült (sertésszív, 540-szeres nagyítás). Az immunfluoreszcens festés a szívizomsejtek troponin-I molekuláihoz kötött antitestes jelölés eredménye.

© *Papp Zoltán, 2012*

© *Semmelweis Kiadó, 2012*

ISSN 1219-2791

ISBN 978-963-331-266-7

A könyv szerzői jogi oltalom és kizárólagos kiadói felhasználási jog alatt áll. Bármely részének vagy egészének mindennemű többszörözése kizárólag a sorozatszerkesztő, a szerző és a kiadó előzetes írásbeli engedélye alapján jogszerű.

	Semmelweis Kiadó
	1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.
	www.semmelweiskiado.hu

Felelős kiadó: dr. Tancos László igazgató

Tördelőszerkesztő: Békésy János

Borítóterv: Tancos László

SKD: 405

Nyomda: Akaprint Kft.

Ajánlás:

*„Egy szívével is látó fiziológus,
Juhász-Nagy Sándor Professzor
emlékének”*

Bevezetés

„Baj van a motorral” – mutat aggodalmas arccal mellkasára a beteg. „Fokozni kellene a szív pumpafunkcióját” – küzd a megoldhatatlannak tűnő feladattal a kardiológus. „Szakadékony a szívszövet, renyhe a szív működés” – tekint gondterhelten az operált szívre a szívsebész. „Hogyan kerülhetnénk el a vérkeringés megingásait” – töpreng az intenzív terápiás orvos. A keringés összeomlása a szívizombetegség rettegett szövődménye. Felismerjük, hogy mi romlott el a motorban? Tudunk a beteg szívizmon segíteni? Hol tart most a tudomány?

A szív pulzációját nagymértékben differenciálódott izomsejtek a kardiomiociták biztosítják. A szívizomsejtek ingerlékenyek, vagyis megfelelő ingerre ingerületi folyamattal válaszolnak. A sejtfelszínen ható stimulus és az ingerületi folyamat elektromos komponenseiről viszonylag régebb óta rendelkezünk ismeretekkel. Újabb felismerés, hogy a jól definiálható elektrofiziológiai jelenségeken túl a szívizomszöveten belül a különböző sejtes elemek (szívizom-, simaizom-, endotél-, kötőszöveti és gyulladásosejtek, vérlemezkék) között bonyolult lokális kémiai és mechanikai kommunikáció is érvényesül. Ez a kapcsolatrendszer elsősorban humorális ágensek segítségével igazítja ki a szervezet szintjén ható idegi és endokrin szabályozást. A kóros körülmények között teret nyerő szignálok előnytelenül érinthetik a szív válaszadó képességét, és gyengülő szív-összehúzóerőkhöz vezetnek. A károsító hatások a szívizomban hosszabb távon strukturális/funkcionális változásokat, idegen szóval „remodelinget” is eredményeznek, melyek az izomsejt-génműködés áthangolódását is magukban foglalják.

Krónikus szívelégtelenség során, a koszorúér-betegségek következtében kialakuló iszkémiás/reperfúziós szindrómákban (pl. angina pectoris, myocardialis infarctus, de szívűtéteket és szívkatéteres beavatkozásokat követően is), továbbá egyes gyulladásosejtes folyamatokkal párhuzamosan (pl. széptikus és autoimmun myocarditis, transzplantátum reakció) és bizonyos gyógyszerek (pl. doxorubicin) mellékhatásaként is számolni kell a szívizom pumpafunkciójának csökkenésével. Valamennyi felsorolt kórállapotban olyan összetett, a miokardium extra- és intracelluláris szerkezetét károsító folyamatok aktiválódnak, melyeket részben reverzibilis, részben irreverzibilis funkcionális változások kísérnek. Egyes esetekben a szívizom „elfajulása” egyértelműen a miokardiális fehérjéket kódoló gének örökletes mutációihoz kötött (pl. hypertrophiás cardiomyopathia). Más esetekben a genetikai háttér és a szívizomsejtek jelátviteli folyamatainak változása a szív funkciózavaraihoz csak részben bizonyított. Az akut funkcióvesztés kapcsán sokszor az valószínűsíthető, hogy a szívizomzat integritása a szöveti vérellátás szélsőséges ingadozása vagy toxikus ágensek miatt kerül stresszhatás alá. Ennek következtében a szív létfontosságú fehérjekomponensei poszttranszlációs jellegű fehérjekárosodásokat (pl. fehérjeoxidáció, fehérjefragmentáció) szenvednek. A szívizom működészavaraiért felelős ok-okozati összefüggések – a kórfolyamatokban felvetett mediátorok és a molekuláris interakciók egymást kiegészítő bonyolult rendszere miatt – még ma is sok bizonytalanságot hordoznak. Ugyanakkor, a szívizomsejtek funkcióvesztéséért közvetlenül felelős mechanizmusok – több szerzett vagy genetikusan meghatározott szívbetegségben – a

különböző kóreredit ellenére közös kapcsolatokat is tartalmaznak. Az általános érvényű kórfolyamatok molekuláris szintű feltérképezése közelebb vihet olyan terápiás megoldások kifejlesztéséhez, melyek segítségével a szívizom ép morfológiai és funkcionális állapota különböző szívbetegségek fennállása esetén biztosítható.

Az elmúlt évtizedekben lényeges előrehaladás történt az egészséges szív működés celluláris és szubcelluláris hátterének feltárásában. A molekuláris ismeretek felhalmozódása komoly reményeket ad arra, hogy a közeljövőben számos, a kóros kontraktilis funkcióval kapcsolatos állapot (pl. szívelégtelenség) pontosabb molekuláris értelmezést kapjon. Az új ismeretek birtokában a jövőben várhatóan eredményesebben vehetjük fel a küzdelmet a szív- érrendszeri betegségekkel.

Jelen rövid kiadvány a szívizomsejtek mechanikai működésével kapcsolatos vizsgálatokból kíván ízelítőt nyújtani. A részben személyes tapasztalatokon is alapuló összefoglalás célja, hogy szemléltesse a szívizomsejtek élettani és kóros működésére irányuló kísérletes megközelítéseket.

A vérkeringéstől a szívizomsejtekig

A szívizomsejtek összehúzódnó képessége, ún. kontraktilitása a keringő perctérfogat fenntartása szempontjából érdemel különleges figyelmet. A szívizom mechanikai működésének sejt szintű szabályozásáról napjainkra igen kiterjedt ismeretek halmozódtak fel (Bers, 2001; Édes, 2000; Opie, 2004; Wolledge és mtsai., 1985). Közismert, hogy a szívizom kontraktilis válaszait közvetlenül a szívizomsejtek intracelluláris kalciumion (Ca^{2+}) háztartása szabályozza. Az egyetlen szív cikluson belül kialakuló intracelluláris kalciumion koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) változásra, mint Ca^{2+} -tranzienstre szokás hivatkozni. Ez azt jelenti, hogy az összehúzódnáskor kialakuló (szisztolés) csúcshullám elérésére kialakuló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ maximum csak átmeneti jellegű. A szívizomzat relaxációját (a diasztolét) az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ meredek csökkenése előzi meg (Bers, 2001). A szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisának központi szerepe miatt az intracelluláris Ca^{2+} anyagcserét meghatározó molekulák: a Ca^{2+} -csatorna fehérjék, Ca^{2+} -pumpáként vagy Ca^{2+} -cserélőként működő iontranszporterek és az intracelluláris Ca^{2+} -kötő fehérjék az elmúlt évtizedekben intenzív kutatás tárgyát képezték. A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák, mely a sejt belsejébe áramló Ca^{2+} komplex és szelektív szabályozását végzik, elengedhetetlenek a szív kontrakciós-relaxációs ciklusa szempontjából. Ca^{2+} -csatornákról azonban az is ismertté vált, hogy azok lényeges szerepet játszanak a membrán depolarizáció szöveti hatásainak (szekréció, növekedés, metabolikus és ingerlékenységi változások) kialakításában is. A szívizomsejtek összehúzódnásával és elernyedésével közvetlenül összefüggő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változások nagyságrendjéről is rendelkezünk becslésekkel (Opie, 2004). Az egészséges miokardiumra a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hozzávetőleg 100 nmol/l diasztolés és 1 $\mu\text{mol/l}$ szisztolés csúcserőkei jellemzőek (Bers, 2001). Az akciós potenciál hatására kialakuló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedését a Ca^{2+} -koncentráció gradiens irányának megfelelő Ca^{2+} -áramlások idézik elő, ezért annak megvalósulásához nem szükséges kémiai energia. A szív diasztolés relaxációja során azonban a sejten belüli Ca^{2+} -nak jelentős – mintegy 1000-, 10000-szeres – koncentráció-gradienssel szemben kell részben a sejten kívüli térbe, részben a sejten belüli raktárakba (szarkoplazmatikus

retikulum, SR) kerülnie. Mindez jelentős energiaigénnyel terheli a szívimsejtek oxidatív energiatermelő folyamatait.

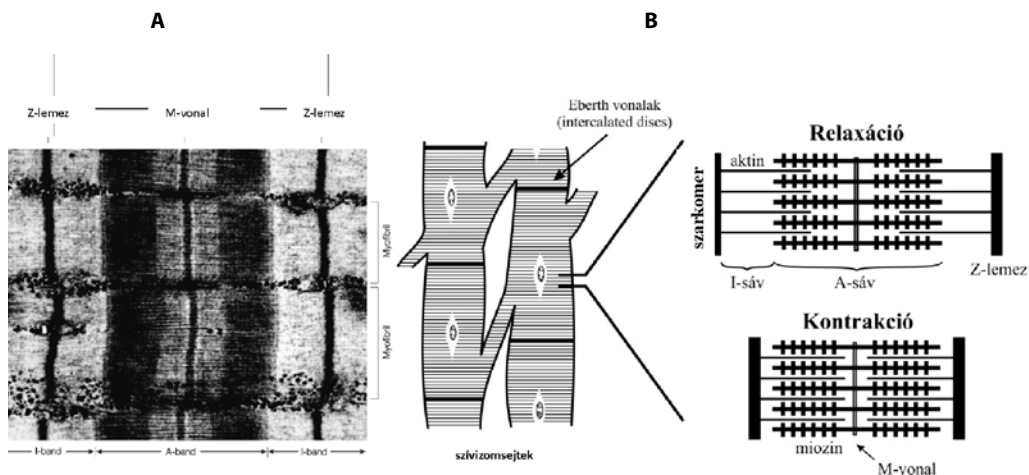
A szívimsejtek kontraktilis erejének alakulását végeredményben a Ca^{2+} -tranzien paraméterei (amplitúdó, időbeli lefutás, „ Ca^{2+} -availability”) és a Ca^{2+} -tranzienre reagáló miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége („ Ca^{2+} -sensitivity”) együttesen határozzák meg. Jelen kiadványban bemutatott vizsgálatok döntő többsége a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységi tulajdonságaihoz kapcsolódik. Ezért, az egyébként szintén lényeges Ca^{2+} -tranzienssel szemben, a továbbiakban a Ca^{2+} -regulált kontraktilis fehérjerendszer tulajdonságaival részletesebben foglalkozom.

A szívimsejtek kontraktilitását klinikai körülmények között viszonylag nehéz kvantitatív módon jellemezni, mert azt a szív elő- és utóterhelésén kívül a szív összehúzó-dások frekvenciája és potenciális ritmuszavarai, valamint a szívimsejtek különböző (pl. β -adrenerg) jelátviteli folyamatai is szabályozzák. Még nehezebb intakt keringési viszonyok között a pumpafunkció csökkenés hátterében a Ca^{2+} -tranzienst érintő, vagy a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységét csökkentő folyamatokat, esetleg ezek kombinációit felismerni. Preklinikai jellegű vizsgálataink során ezért arra tettünk kísérletet, hogy zömében sejtszintű élettani modellrendszerek és biokémiai módszerek kombinációival tárjuk fel a szív különböző kórállapotaiban igazolt kóros tényezők hatásait a szívimsejtek kontraktilis működésére. A kísérletek jelentős része izolált humán szívimsejteken történt, mely elősegítette az adatok humán patológiára való vonatkoztatását. Az azonosított fehérje-eltérések és azok kapcsolatai a szívimsejtek kontraktilis paramétereivel hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a szív kóros pumpafunkcióját okozó tényezők megfelelő értelmezést nyerjenek.

A szívimsejtektől a szarkomerekig

A szívimsejtek morfológiai és funkcionális egységei a szívimsejtek, melyek 125-150 μm hosszúságú és 15-25 μm átmérőjű kissé ellapult, hengeres alakú struktúrák. A szívimsejtek egymással vég- és oldalirányú kontaktusok (nexusok) révén kapcsolódnak (1. ábra), és együttesen egy meglehetősen egységes szerkezetű hálózatot alkotnak. A sejtek közötti nagymértékben differenciált kontaktusok (Eberth-vonalak, „intercalated discs”) a szívimsejtek mechanikai és elektromos folytonosságát egyaránt biztosítják. A szívimsejtek elektron- vagy fénymikroszkópos vizsgálatakor a szívimsejtek hossz tengelyére merőlegesen harántcsíkoltságot ismerhetünk fel. Az egymást váltó eltérő fénytörésű csíkok rendezettsége arra hívja fel a figyelmet, hogy a szívimsejtek összehúzó-dását a kontraktilis fehérjék vázizomhoz hasonló szigorú geometrikus rendszere biztosítja (Tskhovrebova és Trinick, 2003).

A harántcsíkoltság a sejteken belül, a sejtek hossz tengelyével párhuzamosan futó kontraktilis fehérjemolekulák (miofilamentumok) rendezettségének köszönhető. A miofilamentumokat a szívimsejtek összehúzó-dásáért felelős fehérjék alkotják, melyeket elektronmikroszkópus megjelenségük alapján vékony és vastag filamentumokként különböztetjük el. Manapság már keveseknek okoz meglepetést, hogy a vastag filamentumok elsősorban miozinból, a vékony filamentumok pedig elsősorban aktinból állnak. Ne



1. ábra. A szívizom összehúzódása a szívizomsejtek szarkomereinek megrövidülésén alapul.

A: A szívizom szarkomereinek elektronmikroszkópikus felvétele. **B:** A szarkomerek szerkezete a szívizomsejtekben relaxáció és kontrakció alatt. A jobb oldali séma a szarkomereket 90°-os elforgatás után mutatja (Tskhovrebova és Trinick, 2003; és Édes, 2000 alapján).

felejtjük el azonban, hogy az izomműködés mechanizmusának tisztázásában több hazai kutató elvülhetetlen érdemeket szerzett. A meghatározó jelentőségű felismerések forrásai között is kiemelkedik a Szent-Györgyi Albert vezette szegedi biokémiai iskola, mely az izomműködésről alkotott elképzeléseinket modern biokémiai alapokra helyezte (Szent-Györgyi, 1942; Szent-Györgyi, 1943a; Szent-Györgyi, 1943b; Szent-Györgyi, 1945; Szent-Györgyi, 1949). Szent-Györgyi Albert és követői munkái alapján az izomműködés ultrastrukturális alapjai mára klasszikus ismeretökké váltak. Így manapság már nem vitatható, hogy az izomsejtek mechanikai feladatait a szarkoplazmatikus tér zömét kitöltő miofilamentum kötegek (a miofibrillumok) valósítják meg, melyek a szívizomsejteken belül hosszirányban ismétlődő egységeket ún. szarkomereket alkotnak. Az izomműködésről szerzett ismeretek bővülésével a szarkomerek finomszerkezetéről is egyre pontosabb képet alkothatunk. Mára a szarkomereket felépítő miofilamentális fehérjéről és az általuk alkotott szupramolekuláris struktúráról is kiterjedt ismeretekkel rendelkezünk. Az azonosított, nagyszámú szarkomerfehérjék a különböző membránrendszerekkel (pl. szarkolemma, SR, mitokondrium, maghártya) kialakított kapcsolatok révén mechanikai, és jelátviteli funkciókat is megvalósítanak. Az izomfehérjék elsődleges funkcióik alapján strukturális (citoszkeletális) és regulatorikus csoportokba sorolhatók, az esetenként átfedő funkciók miatt azonban ez az osztályozás egyes fehérjék esetében nehézkes. Így például a szarkomereket határoló a Z-lemezekre, és a bennük található egyes citoszkeletális fehérjékre (pl. α -aktinin, dezmin, fodrin, stb.) manapság már nem csak, mint passzív teherviselő elemekre, hanem mint a mechanikai jellegű stresszhatások jeltovábbítóira is tekinthetünk. A izomműködés során keletkező izomerő fehérje-fehérje interakciók segítségével jön létre. A kontrakció általánosan elfogadott ún. csúszó-filamentum teóriája („sliding filament theory”) szerint a vastag és vékony

filamentumok közötti ciklikus, ATP-igényes interakció a miofibrilláris erőgenerálás, a szívizomsejt rövidülés, végeredményben a szívdobbanások alapja.

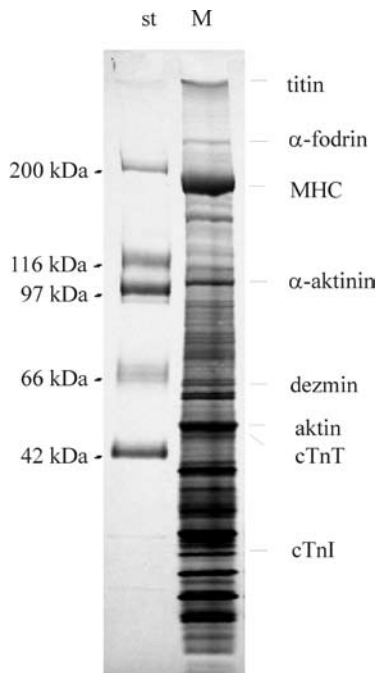
A szarkomerektől a kontraktilis fehérjéig

A vastag filamentumok zömében miozin nehéz láncokból, kisebb részben egyéb fehérjékből (miozin könnyű láncok, miozin kötő C-protein) épülnek fel. A két farki és két feji régióval rendelkező miozin két, kb. 200 kDa molekulatömegű miozin nehéz láncból (MHC) és négy kisebb polipeptidből (miozin könnyű láncok, MLC, röviden LC) áll. A könnyű láncokkal asszociált nehéz láncok három különböző izomiozint alkothatnak. A V_1 jelű homodimer két α -MHC-t, a V_3 jelű két β -MHC-t, míg a V_2 heterodimer, egy molekula α -MHC-t és egy molekula β -MHC-t tartalmaz. *In vitro* körülmények között a V_1 -es izomiozin rendelkezik a legmagasabb, a V_3 -as a legalacsonyabb ATPáz aktivitással. A V_2 -es izomiozin ATPáz aktivitása a két homodimer között helyezkedik el. Kis emlősökben, (pl. egerekben) javarészt V_1 -es miozin, míg emberben és sertésben elsősorban V_3 -as dimerek fordulnak elő. A könnyű miozin láncok révén további kombinációk jöhetnek létre. Az MLC1-nek (vagy LC1-nek), az ún. esszenciális könnyű láncnak két formája létezik: a pitvari (ALC1) és a kamrai (VLC1). Ezzel szemben három regulatorikus könnyű miozin lánc (MLC2) ismert: ezek közül egy a pitvari izomzatra specifikus (ALC2), és kettő a kamrára (VLC2 és VLC2*). A regulatorikus könnyű miozin lánc (MLC2) a Ca^{2+} -kaldmodulindependens kináz (CAMK) és a proteinkináz C (PKC) révén egyaránt foszforilálható. Fiziológiai körülmények között a humán kamrai szívizomban a domináns β -MHC kíséretében VLC1 és VLC2, vagy VLC1 és VLC2* fordul elő (van der Velden, 1998).

A vékony filamentum legfontosabb alkotóeleme az aktin. Az aktin monomerek 43-48 kDa molekulatömegű globuláris fehérjék (G-aktin), melyek polimerizációval hozták létre az aktin filamentumot. Két ilyen polimerizált aktin filamentum egymás köré tekeredésével alakul ki az a kettős helikális struktúra, mely a vékony filamentumok vázát szolgáltatja. A tropomiozin szintén két α -helikális polipeptid lánc egymás köré történő csavarodásával jön létre. A vég a véghez kapcsolódó tropomiozin dimerek által alkotott pálcaszerű láncolat kívülről az aktin kettős helixre fonódik. Ez a kapcsolat egyrészt stabilizálja, merevíti az aktint, másrészt elfedi az aktin monomerek miozinkötő helyeit, és ezért alapállapotban nem jöhet létre az aktin-miozin interakció. Klasszikus elképzelés szerint a kontrakció csak a tropomiozin konformációjának megváltozását követően (a troponinok Ca^{2+} -kötését követően) fejlődhet ki. A vékony filamentum minden hetedik globuláris aktin monomeréhez egy-egy troponin komplex kötődik. A troponin komplex három különböző funkcióval rendelkező alegységből áll. A Ca^{2+} -kötő fehérje a szívre specifikus troponin-C (cTnC), a troponin-T (cTnT) a tropomiozint kötő egység, végül a troponin-I (cTnI) az aktin-miozin interakciót gátló struktúra. A vékony filamentumokhoz kapcsolódó cTnC molekula (a troponin komplex tropomiozin molekulákkal fenntartott térbeli konformációs kapcsolata révén) az aktin és miozin kölcsönhatását $[Ca^{2+}]$ -függő módon szabályozza. A szívizom kontraktilis fehérjei közül tehát a cTnC rendelkezik azzal a Ca^{2+} -kötő képességgel, mely ezt a fehérjét a miofibrilláris rendszer Ca^{2+} -szenzorává teszi. A $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésének időtartama megszabja a kontrakció hosszát. Ennek az a

magyarázata, hogy a cTnC molekulák Ca^{2+} telítettségük függvényében biztosítják az interakcióra lépő aktin és miozin molekulák, és így az erőgeneráló kereszthidak működését. A cTnT viszonylag nagyszámú izoformáival szemben felnőtt emlős szívben csak egyetlen cTnC és cTnI izoforma ismert. Emberi szívben a cTnT-nek négy izoformáját azonosították, melyeket a csökkenő molekulatömeg irányában növekvő számokkal láttak el (cTnT1, cTnT2, cTnT3, cTnT4). A különböző cTnT izoformák expressziója az egyedfejlődés során változik. Az embrionális szívben mind a négy izoforma fellelhető, ezzel szemben felnőtt szívben a cTnT3 erősen dominál. A cTnI-t a proteinkináz A (PKA) mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között effektíven foszforilálja, míg *in vitro* a proteinkináz C (PKC) is jól foszforilálja a cTnI-t és a cTnT-t (Édes, 2000).

Az erőgenerálásban közvetlenül résztvevő eddig tárgyalt (vékony és vastag filamentum) fehérjéket számos további rendezi a szarkomereken belül megfelelő struktúrába. Ízelítőül az alábbiakban ezek közül mutatok be néhányat, melyek a későbbi fejezetekben majd visszatérnek. A titin, vagy más néven konnektin például 3000-3700 kDa-os molekulatömegével az eddig ismert legnagyobb méretű izomfehérje. A Z-lemezek és M-vonalak közötti tereket hidalja át, és fontos szerepe van a miofibrillumok strukturális és regulatorikus fehérjéinek összerendezésében (Gregorio és mtsai., 1999). A titin számos helyen foszforilálható, mely a szarkomer passzív mechanikai sajátosságainak meghatározásában jelentős. A titin a passzív izomfeszülés legfőbb intracelluláris meghatározója, de a szarkomerhosszban bekövetkező változások függvényében hat a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységre is (Neagoe és mtsai., 2002). A humán szívizomban szövet-specifikus alternatív „splicing” mechanizmussal két eltérő hosszúságú izoforma expresszálódik, egy nagyobb és elasztikusabb (N2BA, 3300 kDa) és egy rövidebb és merevebb (N2B, 3000 kDa) (Freiburg és mtsai., 2000). A fodrin sejt/szövet-specifikusan expresszálódó, α és β alegységekből tetramert formáló struktúrfehérje. Hálózatos rendszert alkot a sejtmembrán alatt, ahol komplex kapcsolatot hoz létre a membrán és a citoskeletális rendszer között. Az aktint keresztkötve indirekt módon hat egyéb intracelluláris fehérjék szerveződésére, másrészt felelős a membránfehérjék rendeződésének megtartásáért, asszociálódik a sejtmembrán ioncsatornáival és pumpáival és szerepet kap a szinaptikus transzmisszióban is (De Matteis és Morrow, 2000; Isayama és mtsai., 1993; Winkelmann és Forget, 1993). A dezmin a szívizomsejtek citoskeletális rendszerében, hasonlóan más eukarióta sejtekhez, fontosnak tartják az intermedier filamentumok alkotásában. Döntően a Z-lemezek periferiáján helyezkedik el, így részt vesz a Z-lemezek szerkezeti stabilizálásában, a miofibrillumok egymáshoz és a szubsarkolemmális sejtvázhoz való rögzítésében is (Richardson és mtsai., 1981). Az α -aktinin szintén a Z-lemezeknél lokalizálódó struktúrfehérje, ahol antiparalel dimereket képez összekötve az aktin filamentumok végeit. Amennyiben az α -aktinint eltávolították a filamentális rendszerből, károsodott az aktin-miozin kapcsolat során generált erő hatékony tovaterjedése, valamint feltehetően a megváltozott interfilamentális távolságok miatt csökkent a keresztkötések kialakulásának valószínűsége is. Ezért nem meglepő, hogy az α -aktinin eltávolítása a miozin ATP-áz gátlásához és csökkent kontraktilitáshoz vezetett. Feltételezhető, hogy az α -aktinin moleku-



2. ábra. Humán balkamrai szívizomból készített szövethomogenizátum fehérjemintázata.

Az ezüst-festett gradiens (6-18 %) nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélen elválasztott miofilamentális fehérjék (M) közül néhány pozícióját jobb oldalon tüntettük fel. A molekulatömeg standardok helyzete a bal oldalon látható (st) (Barta és mtsai., 2003 alapján).

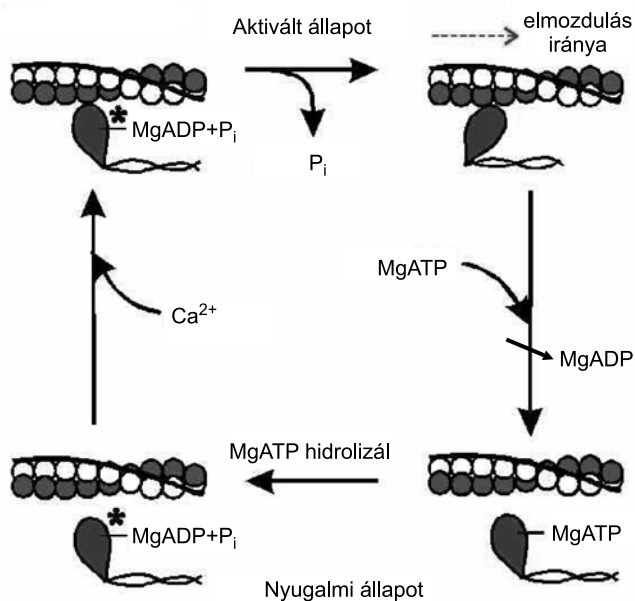
kává alakítja. Az izom összehúzódása alatt az aktin és miozin molekulák között ciklikus interakció alakul ki, melynek során a miozinefejek az aktin filamentumokhoz kapcsolódva időről-időre keresztkötéseket (más néven kereszthidakat) hoznak létre (3. ábra). A miozin aktin iránti affinitása a ciklus alatt nagymértékben változik, mely a ciklicitás molekuláris alapja. Nyugalmi állapotban a miozin MgADP-t és anorganikus foszfátot (P_i) köt. Amennyiben a $[Ca^{2+}]$ emelkedik, úgy a vékony filamentumokon végbemenő konformációs változások a miozinefejek aktinhoz való kapcsolódását indukálják, az izomműködés aktíválódik. A keresztkötésekről ezt követően disszociál a P_i , amit a miozinefej erőt generáló konformáció-változása kísér („power stroke”). Az erőt generáló lépés eredményeként a vékony és vastag filamentumok egymás mellett elmozdulnak („sliding”), kezdetét veszi a rövidülés. Az aktin és miozin ezt követő disszociációjához a miozinak MgATP megkötésére van szüksége, mely a MgADP-t leszorítva kapcsolódik a miozinhoz. A miozinról leváló MgADP-t a miofibrilláris kreatinkináz a mioplazmában lévő kreatinfoszfát felhasználásával nagy sebességgel ismét MgATP-vé alakítja. Az intracelluláris MgATP koncentráció csökkenésével járó kóros állapotokban (pl. hosszantartó iszkémia során) a MgATP

lának fontos szerepe van a miozin ATP-áz maximális aktivitásának szabályozásában is (Malhotra és mtsai., 1986).

Nátriumdodecilszulfát-poliakrilamid gél-elektroforézis (SDS-PAGE) segítségével a szív-izomsejtek fehérjéi egymástól elválaszthatók (2. ábra). Továbbá, megfelelő detekciós eljárásokat követően, a fehérjék expressziójában, foszforilációs állapotában, degradációjában, szulfhidril (SH) csoportjainak oxidatív állapotában, nitrációjában bekövetkező változások is értékelhetőek. Vizsgálataink során különös gondot fordítottunk arra, hogy a kontraktilis fehérjék expressziós mintázatában, foszforilációs állapotában és más, fent felsorolt poszttranszlációs módosulásaiban bekövetkező változások mechanikai következményeit felismerjük. A továbbiakban ezért a kontraktilis rendszert alkotó fehérjék mechanikai sajátosságait és az azzal kapcsolatos mérés technika legfontosabb elemeit foglalom össze.

Az aktin-miozin ciklus

A vastag filamentum miozinja a vékony filamentumok vázát alkotó aktinnal közösen a Mg^{2+} -iont kötő ATP (MgATP) hidrolíziséből származó kémiai energiát mechanikai mun-

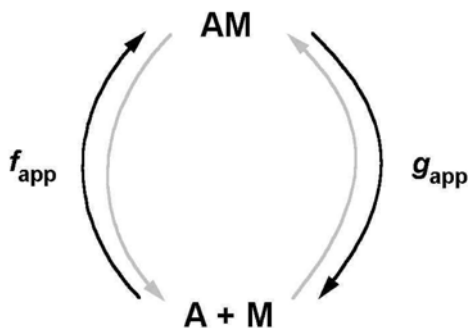


3. ábra. Az aktin-miozin ciklus egyszerűsített sémája.

Ca^{2+} és MgATP jelenlétében az aktin és miozin molekulák erőt és rövidülést eredményező ciklikus kapcsolatot alakítanak ki. A miozin – ATPáz aktivitása révén – a MgATP -t MgADP -vé és anorganikus foszfáttá (P_i) alakítja. Az intermedierek disszociációja azonban csak az erőt generáló aktin-miozin kapcsolat létrejötte előtt következik be. Az erőgenerálás kapcsán kialakuló konformációs változások a vékony és vastag filamentumok egymás melletti elcsúszását eredményezik. A miozinefejek aktinról történő disszociációját az MgATP kötése váltja ki. A miozin disszociációja után Ca^{2+} jelenlétében az aktin-miozin kapcsolat (újabb aktin kötőhelyen) ismét létrejöhet (Édes, 2000 alapján).

hiány következtében az aktin-miozin kapcsolat rögzülhet, mely a szívizomzatban rigoros tónusfokozódást eredményezhet. A MgATP -kötés hatására csökken tehát átmenetileg a miozin affinitása a Ca^{2+} -ot kötött vékony filamentum iránt. A miozin ezután ismét hasítja a MgATP -t. Az ebből származó energia azonban nem szabadul fel közvetlenül, ahhoz a miozinak ismét az aktinhoz (rendszerint újabb kötőhelyen) kell kapcsolódnia. Az újból létrejövő kapcsolat teszi teljessé a ciklust, mely – ha a $[\text{Ca}^{2+}]$ továbbra is nagy – a fenti lépések ismétlődésével folytatódik. Ép metabolikus viszonyok mellett, mely közel változatlan MgATP koncentrációt biztosít, az aktin-miozin interakció addig tart, amíg a Ca^{2+} -szint ismét alacsony szintre nem csökken.

A fentiekben ismertetett séma az aktin-miozin ciklus erősen leegyszerűsített változata. Elsősorban biokémiai vizsgálatok alapján ma lényegesen több közti lépéssel lehet számolni. Az aktin-miozin interakció funkcionális megközelítése azonban a négyállapotú modellnél egyszerűbbek birtokában is lehetséges. Amennyiben csak arra koncentrálnunk, hogy az aktin-miozin kapcsolat mikor eredményez erőt, úgy elegendő mindössze két állapottal számolnunk: az „erőt generáló” és (disszociált) „erőt nem generáló” aktin-miozin szerkezetekkel.



4. ábra. Az aktin-miozin ciklus funkcionális szemléletű kétállapotú modellje.

Az erőt nem generáló állapotból (A+M) erőt generáló állapotba (AM) történő átmenet sebességi állandója f_{app} , míg az erőt generáló konformációváltozást követő disszociációs lépésre g_{app} sebességi paraméterrel szokás hivatkozni (vastag fekete nyilak). Az óramutató járásával ellentétes irányú átmenetek (szürke nyilak) termodinamikai okok miatt igen kis valószínűséggel mennek végbe (Édes, 2000 alapján).

Ebben a modellben az erőt nem generáló megnevezés magába foglalja mindazon biokémiaailag definiált állapotokat, melyek a miozin erőt generáló konformációját közvetlenül megelőzik, vagy azt követik (4. ábra) (Brenner, 1988; Wolff és mtsai., 1995). A kétállapotú modell alkalmazásakor az erőt generáló aktin-miozin keresztkötés létrejöttét jellemző sebességi állandóra, mint „ f_{app} ” szokás hivatkozni, míg a disszociációra jellemző sebességi állandó jele: „ g_{app} ”. A klasszikus izomélettani tárgyalás során az aktin-miozin egymásra hatás számos jellemzőjét megismerhetjük, ha az izom rövidülési sebességét a rövidülés közben ébredt erő függvényében tüntetjük fel („force-velocity” összefüggés). A maximális rövidülési sebességhez (V_{max}) zéró erő tartozik. A V_{max} paraméter azért érdemel kitüntetett figyelmet, mert annak értéke az aktin-miozin ciklus maximális ciklussebességével ($f_{app} + g_{app}$) arányos (Wolledge és mtsai., 1985). A ciklussebesség becslése azonban a „force-velocity” kapcsolat meghatározása nélkül is lehetséges. Membránrendszerüktől megfosztott váz- és szívizom preparátumok kontraktilis erejét pl. gyakorta tanulmányozzák a közeg Ca^{2+} tartalmának közvetlen emelése után („ Ca^{2+} -kontraktúra”) izometriás körülmények között is.

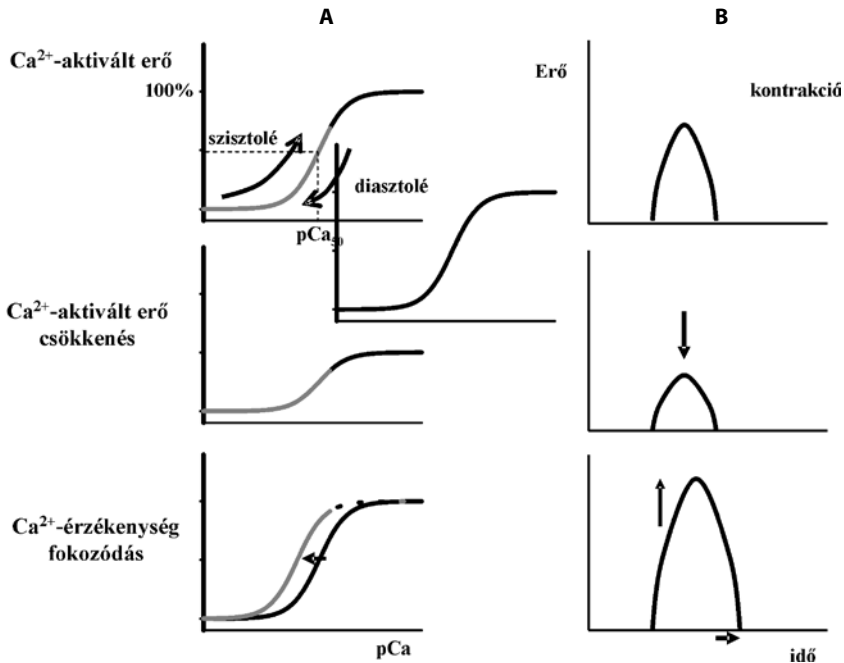
Az izometriás Ca^{2+} -kontraktúra kialakulása során (8. ábra) megfigyelhetjük, hogy a passzív előfeszítettségi állapotból indulva az izomerő folyamatosan fejlődik ki egy közel állandó csúcs erőérték („steady-state csúcs erő”) eléréséig. A kontraktúra csúcserejének eléréséig terjedő idő alatti fokozatos aktiváció egyik meghatározója az aktin-miozin kölcsönhatás ciklussebessége. Tekintve, hogy a Ca^{2+} -kontraktúrák kialakulása során fontos sebesség-meghatározó tényezőként merül fel a Ca^{2+} preparátumok belsejébe történő diffúziója is, ezért az izomélettani mérések során sokszor optikai módszerrel (pl. lézer „flash”) pillanatszerűen szabadítják fel a – fényérzékeny kelátor kötésében már előzőleg az izomsejt belső terébe juttatott – Ca^{2+} -ot. Alternatív megoldásként az is felmerült, hogy Ca^{2+} -kontraktúrák során a „steady-state” csúcs erő kialakulása után, amikor a $[Ca^{2+}]$ a preparátum teljes keresztmetszetében már állandó, a preparátum hosszát igen gyorsan (néhány ms-on belül) változtassák meg (rövidítés majd nyújtás,

„release-retch”), és így éri el az aktin-miozin hidak átmeneti felszakadását. Következésképpen az izomerő először megszűnik, majd a Ca^{2+} jelenléte miatt igen gyorsan újragenerálódik (9. ábra). Az erő növekedésének időbelisége csak az aktin-miozin ciklus kinetikájától függ és exponenciális függvény segítségével jól illeszthető. Elméleti megfontolásokból következik, hogy az exponens időállandójának reciproka (k_{tr} , „rate constant of tension redevelopment”) a kétállapotú aktin-miozin modell f_{app} és g_{app} paraméter-összegének felel meg. Ezek alapján a k_{tr} kísérletes meghatározása elvezet az aktin-miozin ciklussebesség élettani körülmények közötti méréséhez.

A kontraktilis erő Ca^{2+} -függése

A szív miofibrillaris struktúrái által generált erő Ca^{2+} -függését intakt szívizomzaton nehéz megítélni, mert a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a szív ciklus alatt folyamatosan és igen gyorsan változik. Ez a tény és a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pontos mérésének technikai nehézségei nagymértékben nehezítik, hogy a szív ciklus alatti pillanatnyi $[\text{Ca}^{2+}]$ és a miofilamentális válasz közötti kapcsolatot intakt szívizomsejteken megbízhatóan jellemezzük. A miofibrillaris erő $[\text{Ca}^{2+}]$ -függésének tanulmányozására egyszerűbb rendszerekre van szükség. A mérésekhez leggyakrabban szarkolemmájuktól megfosztott, ún. „permeabilizált” (más néven „hámozott”, „nyúzott” vagy „skinned”) preparátumokat alkalmaznak. Az ilyen preparátumok mioplazmatikus terében a $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelluláris oldatok alkalmazásával szabályozható, a kialakult erő pedig kontrollált szarkomerhosszak mellett egyidejűleg mérhető. A $[\text{Ca}^{2+}]$ kifejezésére rendszerint a moláris érték tízes alapú logaritmusának -1-szeresét alkalmazzák (pCa). Amennyiben az erőértékeket a $[\text{Ca}^{2+}]$ függvényben tüntetjük fel, úgy jellegzetes szigmoid lefutású görbét kapunk: így pCa-erő összefüggésről is beszélhetünk (5. ábra). A félmaximális erő eléréséhez szükséges $[\text{Ca}^{2+}]$ a Ca^{2+} -érzékenységet önmagában jellemzi (pCa_{50}). Fontos arra felhívni a figyelmet, hogy a szív egyes összehúzódásai alatt a kontraktilis rendszer teljesen nem telítődik kalciummal, és a szisztolés alatti kontrakciós erő valamint a diasztolés relaxáció a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} -telítettségének a függvénye. Változatlan Ca^{2+} -tranzienst mellett a Ca^{2+} -érzékenységi görbe maximumának a csökkenése (pl. az aktin-miozin kereszthidak számának csökkenése esetén) a kontrakciós erő arányos csökkenését eredményezi. A pCa_{50} növekedése a pCa-erő összefüggés balra tolódásával (Ca^{2+} -érzékenység fokozódás, pl. a szarkomerhossz növelése vagy Ca^{2+} -érzékenyítő szerek adása után) és a kontraktilis erő növekedésével jár együtt. A Ca^{2+} -érzékenység fokozása növelheti a szív összehúzódásainak időtartamát is. A pCa_{50} csökkenése ezzel ellentétes hatású (5. ábra).

A Hill-koefficiens (n_{Hill}) a szigmoid görbe meredekségére utal, mely a kontraktilis rendszeren belüli kooperativitás mértékére jellemző adat. A kontraktilis filamentumok kooperatív interakciója számos, a vékony és vastag filamentumok között kialakuló bonyolult molekuláris kapcsolat következménye. Lényeges összefüggés volt az a felismerés, mely szerint az aktin-miozin rendszeren belül uralkodó kooperativitás a vékony filamentumok Ca^{2+} -szenzor funkcióját is befolyásolja (Bremel és Weber, 1972). Továbbá az is fontos, hogy az aktin-miozin ciklus egyes állapotai közötti átmenetek módosítása szintén hatással van a miofibrillaris erő Ca^{2+} -függésének alakulására (Brenner, 1988).

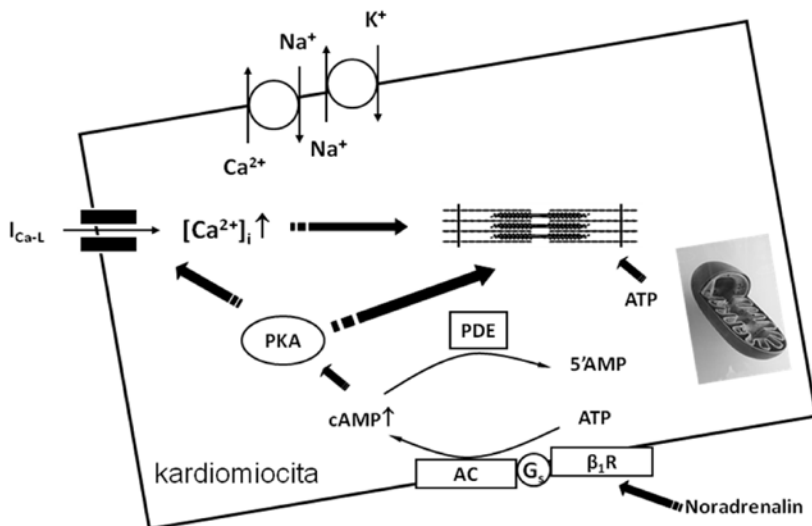


5. ábra. A kalcium-erő összefüggés változásainak hatásai (A) a kontrakciós válaszra (B).

A Ca²⁺-koncentráció kifejezésére rendszerint a moláris koncentráció tízes alapú negatív logaritmusát alkalmazzák (pCa, vízszintes tengely). A Ca²⁺-koncentráció balról jobbra nő (a pCa érték ezzel párhuzamosan csökken). A Ca²⁺-koncentráció növelésével kísérletes körülmények között az izomerő a maximális Ca²⁺-aktivált erő eléréséig fokozható (függőleges tengely). Az összefüggés szigmoid lefutást mutat. *In vivo* viszonyok között a szisztolé alatti kontrakciós erő valamint a diasztolé relaxáció a kontraktilis fehérjék szubmaximális Ca²⁺-telítettségének a függvénye (felül). Változatlan Ca²⁺-tranziens mellett a Ca²⁺-érzékenységi görbe maximumának a csökkenése (pl. az aktin-miozin keresztidák számának csökkenése esetén) a kontrakciós erő arányos csökkenését eredményezi (középen). A pCa-erő összefüggés balra tolódása a Ca²⁺-érzékenység fokozódását jelzi (szürke görbe és nyíl, alul). Ilyen jellegű Ca²⁺-érzékenység fokozódás alakul ki a szarkomerhossz növelésének, vagy Ca²⁺-érzékenyítők hatására.

A pozitív inotropia és a miofibrilláris Ca²⁺-érzékenység kapcsolata

A különböző β -adrenerg agonisták (noradrenalin, adrenalin, izoproterenol, stb.) kötődése a miokardiális β -adrenerg receptorhoz a felszíni membrán G-proteinjein keresztül fokozza az adenilcikláz enzim aktivitását és növeli az intracelluláris ciklikus AMP (cAMP) szintjét. Az intracelluláris cAMP koncentráció emelkedése miatt aktiválódik a cAMP-dependens proteinkináz (PKA). Az aktivált PKA különböző intracelluláris fehérjefoszforilációs folyamatokat indít el, melyeknek lényeges szerepet tulajdonítanak a pozitív inotrop, kronotrop és luzitrop hatások létrejöttében (Hasenfuss és mtsai., 1994). Mindezek háttérében a szisztolé alatt kialakuló tranziens intracelluláris Ca²⁺-koncentráció változások jellegzetes módosulásai figyelhetők meg. A β -adrenerg ingerlés hatására kialakuló pozitív inotropia elsősorban a szívizomsejtek belső Ca²⁺ raktáraiból történő fokozott Ca²⁺ felszabadulás következménye, mely végeredményben a szisztolé alatti csúcs Ca²⁺-koncentrációt emeli. A gyorsult relaxációt azonban a Ca²⁺-tranziens leszálló



6. ábra. Kapcsolatok a szívizomsejtek β -adrenerg jelátviteli rendszere és kontraktilis működése között.

A β_1 -adrenerg receptor ingerülete fokozza a PKA aktivitását, mely számos szívizomfehérje foszforilációjához vezet. A foszforilált fehérjék fokozzák az intracelluláris szisztolés csúcs Ca^{2+} -koncentrációt és az izomerőt (pozitív inotropia). Mindez jelentős többlet ATP igénnyel jár együtt. PKA-mediált fehérje foszforiláció miatt a Ca^{2+} szarkoplazmatikus retikulumba történő visszavétele fokozódik (a sémás ábrán nem szerepel), és a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenysége csökken. Utóbbiak miatt a kardiomiociták relaxációs sebessége gyorsul (pozitív luzitropia). ($I_{\text{Ca-L}}$: L-típusú Ca^{2+} csatorna; AC: adenilcikláz enzim; $\beta_1\text{R}$: β_1 -adrenerg receptor, Gs: stimulatorikus G-fehérje; PDE: foszfodieszteráz enzim.)

száranak meredekebbé válásán kívül az is támogatja, hogy a β -adrenerg ingerlés a kontraktilis rendszer Ca^{2+} iránt mutatott érzékenységét csökkenti. A Ca^{2+} -érzékenység csökkenéséért a myofibrilláris cTnI PKA mediált foszforilációja felelős (Zhang és mtsai., 1995). Fontos hangsúlyozni, hogy a PKA aktivitását fenntartó intracelluláris cAMP szint számos inotrop szer hatására változhat (Endoh, 1998). A cAMP bontását élettani körülmények között a foszfodieszteráz nevű enzimek (PDE) végzik, melyek gátlása több szer elsődleges vagy másodlagos hatásának lényege. A PDE-gátlók a cAMP bontás visszaszorítása miatt szimpatomimetikus (tehát pozitív inotrop) hatással rendelkeznek. A szívizomsejtek β -adrenerg jelrendszerének aktivációja ugyan fokozott kontraktilis erőhöz vezet, de ehhez jelentősen nagyobb energia- és ezért oxigénigény is társul (6. ábra).

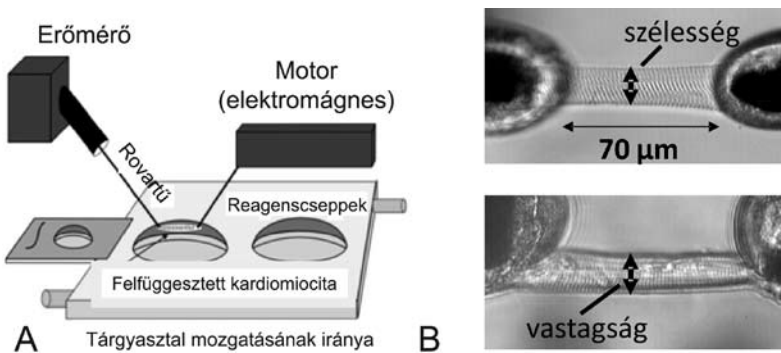
Hogyan mérhető a kontraktilis funkció izolált szívizomsejteken?

Az izolált szívizomsejteken történő kontraktilis erőmérés előnyei közé tartozik, hogy a kivitelezéshez szükséges szövetmennyiség csekély (kb. 3 mm^3), mely különböző fajú élőlényekből és mélyfagyasztott szívmintákból is biztosítható. A szívizomszövet-mintákból különálló szívizomsejteket mechanikai izoláció révén nyertük. Ezt megelőzőleg a szövetdarabokat Ca^{2+} -mentesített relaxáló oldatban olvasztottuk fel, és az izolált sejteket mérés előtt detergenst (triton-X-100) tartalmazó relaxáló oldatban inkubáltuk. A tritonkezelés eredményeként a sejtek membránrendszerei átjárhatóvá váltak („permeabilizált”

vagy „kémiailag nyúzott” szívizomsejtek), és így lehetőség nyílt a miofibrilláris funkciók kontrollált intracelluláris körülmények között történő vizsgálatára. Ezek a permeabilizált szívizomsejt-preparátumok a gyógyszeres és metabolikus jellegű hatások tanulmányozásán kívül megfelelő környezetet biztosítottak a miofilamentumok enzimatis és nem-enzimatis módosítására és az *in vitro* létrehozott hatások következményeinek tanulmányozására is. A β -adrenerg ingerlésre bekövetkező foszforilációs folyamatok mechanikai hatásai, pl. a szívizomsejt proteinkináz A katalitikus alegységgel történő inkubációja után, míg a defoszforilált kontraktilis rendszer működése foszfátáz-kezelést követően váltak értékelhetővé. A permeabilizált szívizomsejteket a mérések előtt Ca^{2+} -mentes relaxáló oldatba helyeztük. A preparátumok minőségét rendszeresen végrehajtott kontroll (maximális Ca^{2+} -aktiváció) mérésekkel és a szarkomerstruktúra fénymikroszkópos morfológiájának követésével ellenőriztük.

A mechanikai mérőrendszer egy invertáló mikroszkóp köré épült. A mikroszkóp tárgyasztalára helyezett sejteket két oldalról elektromotoros mikromanipulátorok segítségével közelítettük meg. Az egyik oldali mikromanipulátorokhoz érzékeny erőmérőn keresztül, míg a másik oldalhoz egy elektromágneses motoron keresztül csatoltunk egy-egy rovartűt. A rovartűk és a kiválasztott szívizomsejt közti kapcsolatot szilikon ragasztóval biztosítottuk (7. ábra).

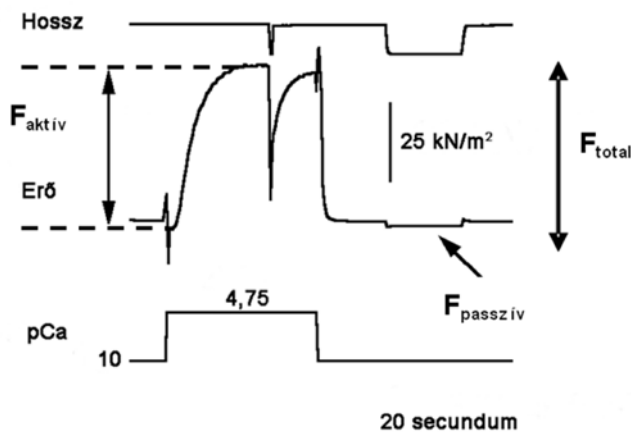
A szívizomsejtek Ca^{2+} -kontrakciói során képződő erő kialakulását izometriás körülmények között 15°C -on mértük. A sejtek aktiválása előtt a szarkomerek átlagos hosszát relaxáló oldatban a mikroszkóphoz kapcsolt számítógépes videojel-feldolgozó rendszer segítségével, $1,9\ \mu\text{m}$ -es és $2,3\ \mu\text{m}$ -es értékek között, az adott kísérletes protokoll igényei szerint állítottuk be (Fan és mtsai., 1997). A mérésekhez szükséges relaxáló és



7. ábra. Az izolált szívizomsejtek kontraktilis tulajdonságainak mérésére szolgáló mérőrendszer központi részének vázlata.

A: A szívizomsejt egy 15°C -os hőmérsékletű mérőkád fölött helyezkedik el a mikroszkóp tárgyasztalán. A relaxáló oldatcseppbe merülő szívizomsejt pozícióját egy horizontális, harántcsikollattal rendelkező pálcza jelzi (középen). A sejt egyik vége olyan rovartűhöz van kapcsolva, mely egy érzékeny erőmérő toldaléka (bal oldalon), másik vége ugyanilyen módszerrel egy elektromágneses motorhoz rögzített (jobb oldal). A sejt Ca^{2+} -tartalmú aktiváló oldatba (jobb oldali oldatcsepp) történő átvitelét a mikroszkóp tárgyasztalának oldalirányú mozgásával lehet elérni. (A sejt rögzítése a bal oldali fedőlemezén történt.)

B: Izolált és membránrendszerétől megfosztott szívizomsejtről a mérőrendszeren belül két irányból (felülről és oldalról) készített fénymikroszkópius képek. A szívizomsejt végeinél látható transzparens gyűrűszerű képződmények a rovartűkre (sötét idomok a széleken) felvitt ragasztócseppeknek felelnek meg.



8. ábra. Egyetlen Ca²⁺-kontraktúra izolált szívizomsejten.

A Ca²⁺-kontraktúrákat a humán szívizomsejt relaxáló oldatból (pCa 10) Ca²⁺-tartalmú aktiváló oldatba (pCa 4,75 – pCa 6,5) történő átvitelével idéztük elő. (Az ábrán pCa 4,75 szerepel.) Az aktiváció alatti gyors hosszváltozást („release-restretch” manőver a kontraktúra csúcán) a teljes kontraktilis erő (F_{total}) megszűnése, majd gyors regenerációja kísérte. A relaxáló oldatban végrehajtott hosszváltozások segítségével a sejt passzív erejét ($F_{passzív}$) határoztuk meg. Az aktív izomerő ($F_{aktív}$) a F_{total} és $F_{passzív}$ különbsége.

aktiváló oldatok összetételét számítógépes program (Fabiato és Fabiato, 1979) segítségével terveztük. Az alap relaxáló és aktiváló oldatok Ca²⁺-koncentrációja pCa 9 (vagy pCa 10) és pCa 4,75 (vagy 4,82) volt. A pCa 4,75 értéknél kisebb Ca²⁺-koncentrációjú aktiváló oldatokat az alap relaxáló és aktiváló oldatok keverésével hoztuk létre. Esetenként szükséges volt pCa 4,75-nél nagyobb [Ca²⁺]-t is alkalmazni (pl. modell-izkémiai oldatok esetén), melyeket az alap aktiváló oldathoz adott CaCl₂ segítségével hoztuk létre. A szívizomsejt relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő átvitelét a kontraktilis erő fokozódása követte (8. ábra).

A Ca²⁺-aktivált erő maximumának kifejlődése után egy úgynevezett „release-restretch” manővert végeztünk, melynek során a sejtet, eredeti hosszának 20%-ával megrövidítettük, majd ezt követően visszaállítottuk a kiindulási hosszat. Ezt a rendszer – előzetesen beállított protokollja szerint – az elektromágneses motorhoz rögzített rovartű mozgatásával érte el. Az igen nagysebességű (20 msec alatt kivitelezett) hosszváltoztatás során a kialakult aktin-miozin keresztkötések döntő többsége felszakadt, majd azok újból felépültek. Ezt az eseményt a regisztrátumon belül ébredt erő (F_{total}) megszűnése, majd annak gyors regenerációja kísérte. Az erő regenerációjának üteme elsősorban az aktin-miozin ciklus sebességétől függ, melyet az erőgörbék „release-restretch” manővert követő részének illesztésével lehetett becsülni (lásd alább). Az izometriás csúcserőt (F_{total}) mely az aktív és passzív komponensek összege ($F_{aktív}$ és $F_{passzív}$) a gyors rövidüléssel párhuzamos hirtelen erőcsökkenésből határoztuk meg. A relaxáló oldatban lényegesen hosszabb ideig tartó rövidítés révén a szívizomsejtben ébredt passzív erőkomponenst ($F_{passzív}$) az aktivációs ciklust követően mértük.

A kontraktúra amplitúdóját számos, különböző Ca²⁺-koncentrációjú aktiváló oldatban is meghatároztuk, melyek segítségével a Ca²⁺-érzékenységi görbe szerkesztésére nyílt lehetőség az (1) egyenlet felhasználásával. A szigmoid lefutású görbe az ún. Hill-

egyenlettel illeszthető, mely a kontraktilis rendszer által generált erő Ca^{2+} -függésének legfontosabb kvantitatív értékeit tartalmazza:

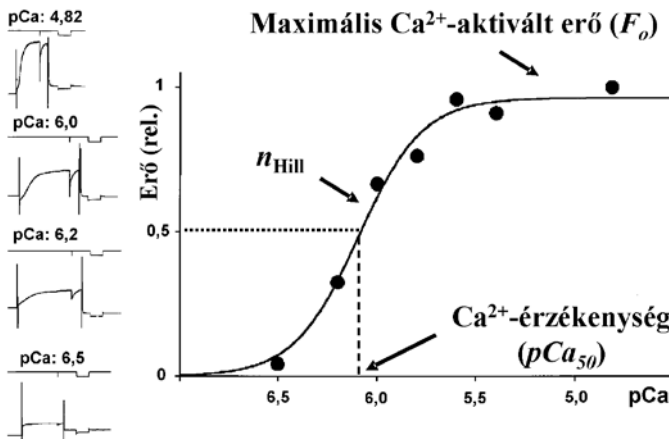
$$F = F_o * \{[\text{Ca}^{2+}]^n_{\text{Hill}} / ([\text{Ca}_{50}]^n_{\text{Hill}} + [\text{Ca}^{2+}]^n_{\text{Hill}})\}, \quad (1)$$

ahol F az adott Ca^{2+} -koncentráció mellett kialakult izomerőt, F_o a maximális Ca^{2+} -telítettség mellett létrejött aktív izomerőt (maximális Ca^{2+} -aktivált erő), $[\text{Ca}^{2+}]$ az adott Ca^{2+} -koncentrációt, $[\text{Ca}_{50}]$ a félmáximális erő kifejlődéséhez szükséges Ca^{2+} -koncentrációt, és végül n_{Hill} az ún. Hill-koefficiens jelöli. A $[\text{Ca}_{50}]$ vagy $p\text{Ca}_{50}$ a kontraktilis rendszer Ca^{2+} iránti érzékenységet önmagában jellemzi. Értéke nagymértékben függ a cTnC Ca^{2+} iránti affinitásától (9. ábra).

Az aktin-miozin ciklus sebességének meghatározásához a „release-restretch” manőver alatti erőtranzienst azon szakaszát illesztettük, mely csak az erőregenerálódás alatti periódust tartalmazta (10. ábra). Az illesztéshez a következő exponenciális összefüggést (2) használtuk:

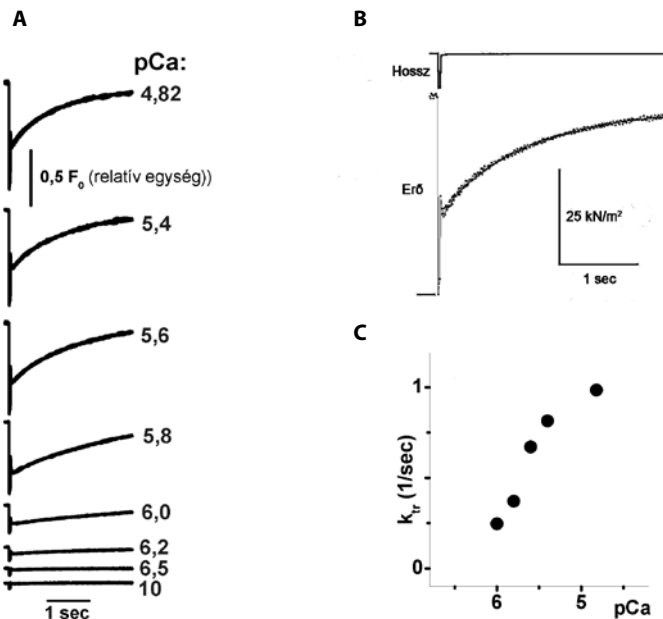
$$F = F1 + F2 * (1 - e^{-t*k_{tr}}) \quad (2)$$

ahol t az idő, $F1$ az a minimális erőérték, ahonnan az illesztett görbe indul, a $F1 + F2$ az a maximális erőérték melyhez az illesztett görbe közelít és k_{tr} az exponens időállandója.



9. ábra. Az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenységének mérése egyetlen szívizomsejten.

A humán eredetű szívizomsejt Ca^{2+} -kontraktúráit egymást követő jelleggel relaxáló oldatból ($p\text{Ca}$ 9) különböző Ca^{2+} -koncentrációjú aktiváló oldatokba ($p\text{Ca}$ 6,5 – $p\text{Ca}$ 4,82) történő átvitelekkel idéztük elő (bal oldal). Az aktivációk következtében kialakuló aktív erők maximumait (fekete kör alakú szimbólumok a jobb oldali koordináta rendszerben) a Ca^{2+} -koncentráció ($p\text{Ca}$) függvényében ábrázolva minden egyes sejtre meg lehetett szerkeszteni az adott szívizomsejt Ca^{2+} -érzékenységi görbéjét. Ehhez a Hill-egyenlettel (1-es számú egyenlet, lásd a szövegben) történő illesztés után jutottunk. A félmáximális erő létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} -koncentráció ($p\text{Ca}_{50}$) a sejt Ca^{2+} -érzékenységét közvetlenül jellemző adat, míg a Hill-koefficiens (n_{Hill}) a görbe meredekségével arányos.



10. ábra. A release-restretch manőver alatti erőregenerációk sebességének meghatározása.

A: Különböző [Ca²⁺]-knál (pCa: 4,82-10) mért erőtransziens-család egyetlen humán eredetű szívizomsejten.

B: Egyetlen erőtransziens illesztésének vázlata. Felül a szívizomsejt Ca²⁺-kontraktúrájának (pCa 4,75) csúcsán végrehajtott gyors hosszcsökkentése (a sejt eredeti hosszának 80%-ra) és visszanyújtása az eredeti hossza („release-restretch” manőver), alul a következményes erőtransziens (szürke görbe) látható. Az erő regenerációs szakaszára helyezett szaggatott exponenciális az illesztési rutin eredménye. **C:** A görbeillesztésekből számolt k_{tr} paraméter Ca²⁺-függést mutatott. (A bemutatott eredmények az 5. ábrán szereplő méréshez tartoznak, a mintavételezési frekvencia 1000 Hz volt.)

Az izolált szívizomsejt-mérőrendszert analóg kamera és video-jelfeldolgozó-egység, elektromágneses motort működtető elektronika, analóg/digitális jelátalakítók, analóg rekorder, keringető hűtő termosztát, három egymással összehangolt személyi számítógép és két elektronikai szűrő tette teljessé (11. ábra).



11. ábra. A Debrecenben létrehozott és Középkelet-Európában egyedülálló izolált szívizomsejt mérőrendszer.

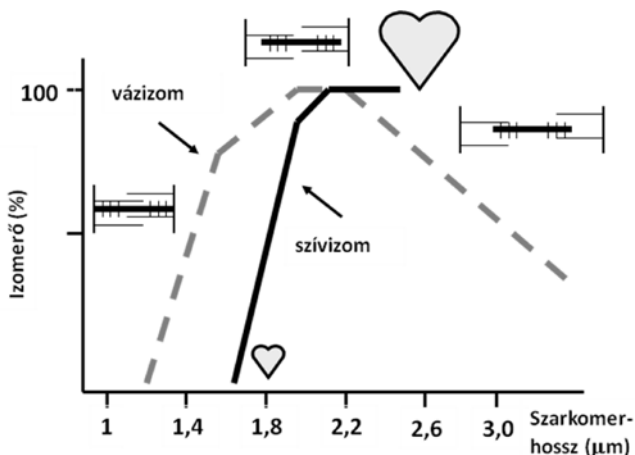
A: A teljes mérőrendszer laboratóriumon belüli elhelyezkedése. **B:** A mérőrendszer központi része. Bal oldalon az elektromágneses motor, jobb oldalon az erőmérő a mérőkád fölött látható.

Frank-Starling mechanizmus a szarkomerek szintjén

A Frank-Starling mechanizmus szerint a vénás visszaáramlás fokozódása a végdiasztolés telődés növelésén, és így a szarkomerek nyújtásán keresztül erősebb szisztolés összehúzódásokhoz vezet (Patterson és Starling, 1914). Ez a mechanizmus a keringés vénás oldalán kialakuló nyomás- és térfogat-fokozódást a szívkamrákból kilökött vér mennyiségének növelésével kompenzálja. Azonban mind a mai napig ismeretlen, hogy a szív geometriai viszonyainak változása milyen molekuláris mechanizmus révén fejt ki hatást a kontraktilis fehérjeelemek Ca^{2+} -függő erőgenerálására.

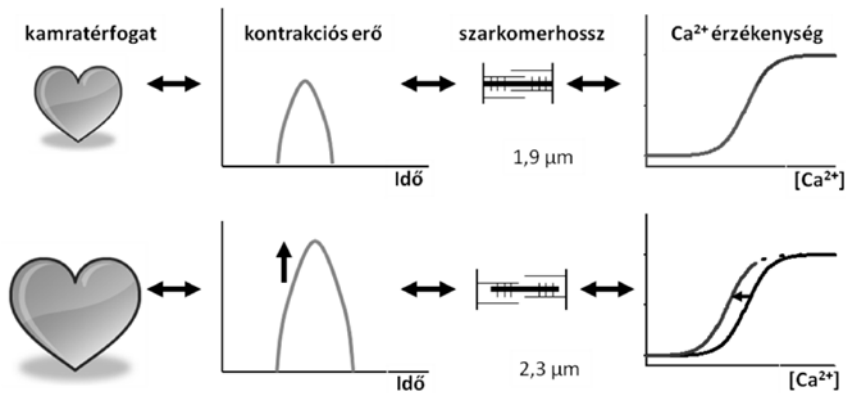
A kardiológiai gyakorlatban gyakorta hivatkozott kamra-funkciós görbe (ún. Starling-görbe) csúcspontja a szívizomsejtek esetében 2,2-2,3 μm körüli szarkomerhosszoknál alakul ki. Eddig tart a Starling-görbéket magyarázó hossz-feszülés diagram felszálló szakasza (12. ábra). Az optimális szarkomerhossz (2,2-2,3 μm) mellett maximális a miozin és az aktin közötti kölcsönhatás. Ezen érték felett (>2,2 μm) és alatt (<2,2 μm) az aktin-miozin interakció határfoka csökken. A szívizom esetében a szarkomerhossz ritkán haladja meg a 2,2-2,4 μm értéket, tehát a dekompenzált dilatált miokardium a Starling-görbe csúcán, de mobilizálható hossz-függő tartalék hiányában működik. A szívizom masszív elasztikus rendszerei (extracelluláris kollagén, és intracelluláris titin) ugyanis megakadályozzák a miofilamentumok további megnyúlását.

A nyugalmi rosthosszúság és a kontrakciós erő közötti hossz-feszülés összefüggést a korábbiakban kizárólag a vékony és vastag filamentumok közötti átfedés mértékével magyarázták. Feltételezték, hogy az átfedő terület nagysága határozza meg az aktin-miozin interakció intenzitását, és ez a hossz-feszülés diagramnak megfelelően ered-



12. ábra. A Frank-Starling mechanizmus kapcsolata a szarkomerhossz változásával.

A vénás visszaáramlás fokozódása a kamrai térfogat, és ezáltal a szarkomerek átlagos hosszának növekedését is eredményezi. Az aktív izomerő a szarkomerhossz növekedésével párhuzamosan bizonyos határig szintén nő (hossz-feszülés diagram). A vázizomzaton (szürke szaggatott vonal) és a szívizomzaton (fekete folytonos vonal) mérhető hossz-feszülés összefüggés egymással nem azonos.



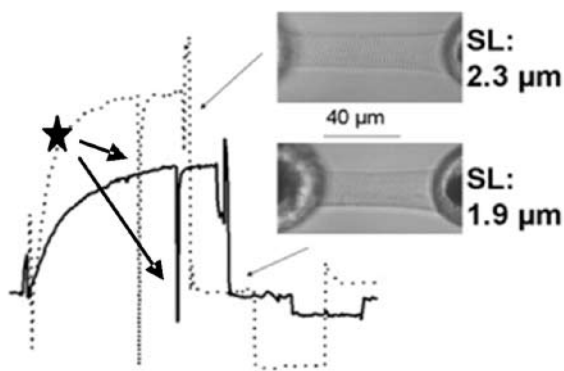
13. ábra. A Frank-Starling mechanizmus kapcsolata a Ca^{2+} -aktivált erő Ca^{2+} -érzékenységének változásával.

A kamrai térfogat fokozódása következtében létrejövő szarkomerhossz-megnyúlás a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységének növekedéséhez vezet. Ennek következtében a kontrakciós erő is fokozódik.

ményezi a Frank-Starling mechanizmust. Problémásnak tűnik azonban, hogy a hasonló harántcsíkolttsággal (és ezért szarkomerstruktúrával is) bíró vázizomzat hossz-feszülés összefüggése a szívizomhoz képest jelentősen eltérő. A mai tudásunk szerint a szívben a szarkomerhossz nyújtására ébredő erőtöbblet ezért csak kismértékben vezethető vissza a fenti mechanisztikus modellre. Jelentősebbnek tűnik az, hogy a nyújtás hatására egyrészt fokozódik a cTnC Ca^{2+} -érzékenysége másrészt fokozódik a miofilamentumok közti kooperatív interakció hatékonysága (Allen és Kentish, 1985; Campbell, 1997; Fuchs és Martyn, 2005). Következésképpen az optimális szarkomerhossz eléréséig nő a cTnC Ca^{2+} -telítettsége és a kontrakciós erő (13. ábra).

A szarkomeren belüli összefüggést biztosító mechanizmussal nagyon sokan foglalkoztak, a folyamat molekuláris háttere mégsem tisztázott. Valószínű, hogy ebben a folyamatban szerepet kap a vastag filamentumokat a szarkomer központi helyére rögzítő titin fehérje, és a vastag és vékony filamentumok közti oldallirányú tér („lattice spacing”) nyújtás hatására bekövetkező csökkenése is. Eldöntetlen azonban, hogy az aktin-miozin kereszthidak számának és/vagy az aktin-miozin ciklus egyes átmeneteinek kinetikai változásai adnak-e jobb magyarázatot a szarkomer nyújtásra észlelt fokozott izomerőre. Az sem ismert továbbá, hogy az eltérő expressziós fehérjemintázatokat tükröző szívizomzatokban, melyek a humán krónikus szívelégtelenség progressziója kapcsán alakulnak ki (de különböző emlős fajokban egészséges állapotban is fellelhetők), hogyan érvényesül a Ca^{2+} -aktivált erő Ca^{2+} -érzékenységének szarkomerhossz-függése.

A sertés, egér és humán szívizomsejtek, egészséges egyedekben is részben eltérő miofibrilláris fehérjéket expresszálnak és ezért eltérő aktin-miozin ciklussebességgel (k_{tr}) rendelkeznek. Összehasonlító jellegű vizsgálatunk lehetőséget adott a Frank-Starlingmechanizmust biztosító szarkomerhossz (SL)-regulált Ca^{2+} -érzékenység fehérje expresszió-függésének, és hipotetikus k_{tr} -függésének tanulmányozására (14. ábra).



14. ábra. A Frank-Starling mechanizmus rekonstrukciója egyetlen, egér eredetű szívizomsejten.

Az alkalmazott Ca^{2+} koncentráció a maximális erő felének kiváltásához volt elegendő (SL: 1,9 μm , pCa 6,2). Az izomerő mind 1,9 (folyamatos vonal), mind 2,3 μm (szaggatott vonal) szarkomerhossz esetében szerepel. Az aktiváció tejjessé válása után végrehajtott gyors hosszváltoztatásokat (csillaggal és nyilakkal jelölve) váltottunk ki, és az ezek hatására bekövetkező hirtelen erő transzienseket is rögzítettünk. Ezzel a manőverrel (80%-ra rövidített, majd visszaállított szarkomerhossz – release-restretch) számítottuk a k_r értékét.

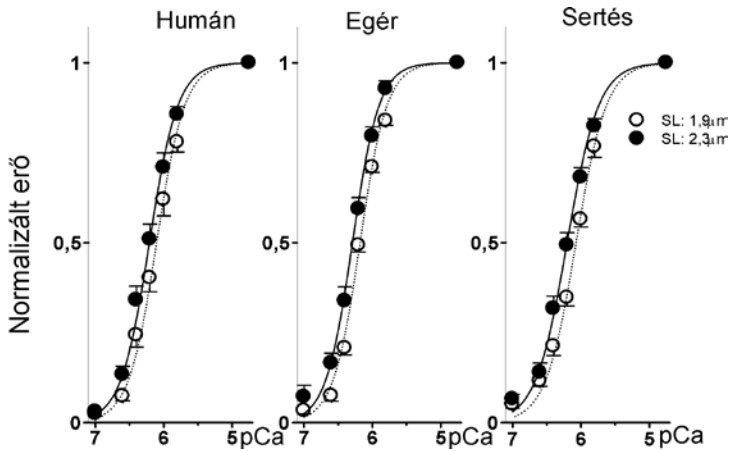
Először a három emlősfaj szíveiből nyert szívizomsejt-preparátumok alap mechanikai viselkedését vetettük össze (1. táblázat).

1. táblázat. Három emlős faj szívizomsejtjeinek keresztmetszetre normalizált maximális Ca^{2+} -aktivált erő értékei (F_o) és passzív erő értékei ($F_{passzív}$)

F_o (kN/m ²)	1,9 μm	2,3 μm
Sertés	30,3±3,0	51,8±6,9*
Egér	27,2±3,9	56,6±3,9*
Humán	28,6±3,3	49,5±3,7*
$F_{passzív}$ (kN/m ²)	1,9 μm	2,3 μm
Sertés	3,8±0,6	6,9±0,7*
Egér	3,8±0,8	10,5±0,6*§
Humán	2,5±0,4	5,7±0,7*

*: $P < 0,05$ átlagok 1,9 μm vs. 2,3 μm szarkomerhossz azonos fajon belül, §: $P < 0,05$ átlag vs. humán vagy sertés adatok azonos szarkomerhossznál.

Az 1. táblázatban feltüntetett eredmények alapján megállapítható, hogy a vizsgált emlősfajok szívizomsejtjeinek aktív ereje egymáshoz nagyban hasonló, és a SL növeletésével egyöntetűen fokozható volt. A Hill-koefficiensek szintén nem tértek el a három csoportban. A nyújtás hatására az egyes szívizomsejtekben átlagosan 11-19 kN/m²-rel növekedett az F_o . Érdekes viszont, hogy a passzív erő, egér eredetű szívizomsejtekben,



15. ábra. Három emlősfaj szívizomsejtjeit jellemző Ca^{2+} -érzékenységi görbék SL-függése.

Mindhárom faj Ca^{2+} -érzékenységi görbéje azonos mértékben tolódott balra a sejtek nyújtását követően. A két különböző szarkomerhosszhoz tartozó erőértékeket üres (1,9 μm) és telt (2,3 μm) szimbólumokkal különítettük el, melyek egymástól a pCa 7-től nagyobb de pCa 4,75-től kisebb $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál szignifikánsan eltértek. Az illesztett görbék balra tolódásainak mértéke az egyes fajknál szignifikáns volt, ugyanakkor azok mértéke nem különbözött a három faj között. (Mintaszámok: humán n=16 szívizomsejt, egér n=8 szívizomsejt és sertés n=6 szívizomsejt.)

a nyújtás hatására nagyobb mértékben fokozódott, mint emberi és sertés eredetű szívizomsejtekben.

A következő lépésben a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységének SL-függő változásait kívántuk összehasonlítani a három fajban. A Ca^{2+} -érzékenység könnyebb összehasonlíthatósága érdekében a különböző szívizomsejteken mért erőértékeket az adott sejten mért maximumra normalizáltuk (15. ábra). A rövidebb, 1,9 μm -es és hosszabb, 2,3 μm -es szarkomerhossznál meghatározott Ca^{2+} -érzékenységre jellemző paramétert ($p\text{Ca}_{50}$) a 2. táblázat foglalja össze. Méréseink szerint a három különböző fajból izolált szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenységi görbéi a sejtek megnyújtását követően hozzávetőlegesen azonos mértékben tolódtak balra. A balratolódás mértéke minden esetben szignifikáns volt. Sertésekben $0,14 \pm 0,01$, egerekben és emberekben $0,11 \pm 0,01$ pCa egységgel lehetett kifejezni a szívizomsejtek nyújtását követő Ca^{2+} -érzékenység fokozódás átlagait, melyek a különböző fajok esetében egymástól szignifikánsan nem különböztek.

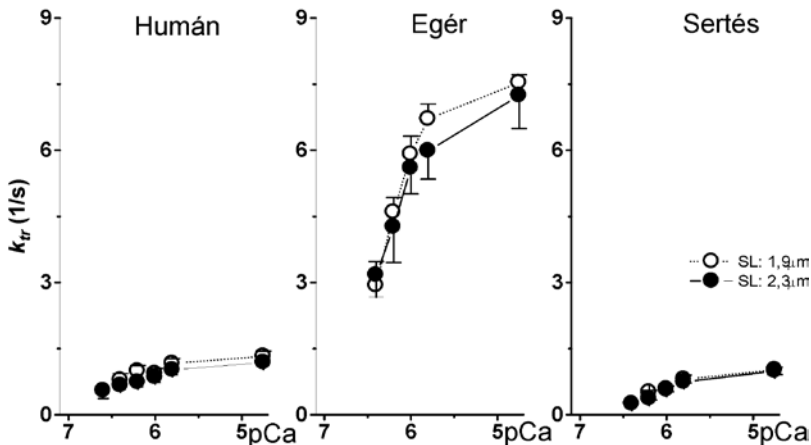
2. táblázat. Három emlősfaj $p\text{Ca}_{50}$ értékei rövidebb (1,9 μm -es) és hosszabb (2,3 μm -es) szarkomerhosszknál

$p\text{Ca}_{50}$	1,9 μm	2,3 μm
Sertés	$6,07 \pm 0,02$	$6,21 \pm 0,03^*$
Egér	$6,18 \pm 0,01$	$6,29 \pm 0,03^*$
Humán	$6,10 \pm 0,04$	$6,21 \pm 0,03^*$

*: $P < 0,05$ adatok 1,9 μm vs. 2,3 μm szarkomerhossz azonos fajon belül.

A továbbiakban a keresztkötési kinetikát jellemző k_{tr} paraméter SL-függésének meghatározására koncentráltunk. Ezek a mérések érdekes, újszerű eredményeket hoztak. A különbségek hangsúlyozása érdekében a három fajból származó adatokat a mért abszolút értékekkel tüntettük fel (16. ábra). Az 1,9 μm -en és a 2,3 μm -en valamilyeni Ca^{2+} -koncentráción meghatározott aktin-miozin ciklussebesség (k_{tr}) emberekben viszonylag lassú, egerekben viszonylag gyors és sertésekben – a humán adatokhoz hasonlóan – ismét viszonylag lassú volt. A maximális Ca^{2+} -telítettségénél (1,9 μm -es szarkomerhosszan) mért $k_{tr,max}$ paraméter sertésekben: $1,02 \pm 0,05$ 1/s; egerekben: $7,44 \pm 0,15$ 1/s és emberekben: $1,33 \pm 0,11$ 1/s volt. Ezek az adatok megerősítik, hogy a Frank-Starling mechanizmus a három emlősben alapvetően eltérő aktin-miozin kinetika mellett, de a SL növelésére közel azonos Ca^{2+} -érzékenység-fokozódást eredményezve valósult meg.

Meglepő, hogy a szívizomsejtek nyújtását követően a k_{tr} paraméter egyik fajban sem változott szignifikánsan. A Ca^{2+} -érzékenység SL-függő növekedése a vizsgált emlősökben tehát nem járt együtt az aktin-miozin ciklussebesség változásával.



16. ábra. Az aktin-miozin ciklus sebessége különböző emlős szívekben.

Míg emberben és sertésben viszonylag lassú kinetika figyelhető meg, addig az egerekben viszonylag gyors aktin-miozin ciklussebesség kíséri a szívösszehúzódásokat. A szívizomsejtek nyújtásának hatására egyik fajban sem változott a keresztkötési kinetika. (Mintaszámok: humán $n=16$ szívizomsejt, egér $n=8$ szívizomsejt és sertés $n=6$ szívizomsejt.)

A P_i kontraktilis hatásairól ismert, hogy az, az erőgeneráló aktin-miozin átmenettel összefüggésben, csökkenteni képes a Ca^{2+} -aktivált erőt (Kentish, 1986; Pate és Cooke, 1989; Regnier és mtsai., 1995; Tesi és mtsai., 2000), miközben az aktin-miozin ciklussebesség nő. Ezért megvizsgáltuk, hogy kísérleti preparátumainkon 10 mM P_i hogyan befolyásolja a Ca^{2+} -aktivált erőt és a k_{tr} -t. Várakozásunknak megfelelően 10 mM P_i valamilyen Ca^{2+} -koncentrációnál szignifikánsan csökkentette a kialakult izometriás erőt. Az F_o a P_i hatására mindhárom vizsgált fajban a kontroll $\sim 60\text{-}65\%$ -ára csökkent (humán mintákban $65 \pm 5\%$, egerekben, $60 \pm 1\%$ és sertésekben $61 \pm 1\%$; $P > 0,05$; SL: 1,9 μm). A P_i hatása alatt a Ca^{2+} -érzékenység SL-függését is vizsgáltuk. Ezért minden mért erőérté-

ket az adott körülmények között mért maximumra normalizáltuk és a kapott adatokat illesztettük a Hill-egyenlettel. Az analízis azt mutatta, hogy a nyugalmi SL (1,9-ről 2,3 μM -re történő) növelése által kiváltott Ca^{2+} -érzékenyítést egyik fajban sem befolyásolta a P_i jelenléte. A kapott változás ($\Delta p\text{Ca}_{50}$) a P_i jelenlétében is $\sim 0,1$ pCa-egység volt. Ugyanakkor a 10 mM P_i alkalmazása drámai gyorsulást okozott mindhárom faj esetében az aktin-miozin keresztkötési kinetikában (k_{tr}). A 10 mM P_i -t tartalmazó humán és sertés minták esetében a $k_{tr,max}$ növekedése $\sim 1,6$ -szor haladta meg a P_i nélküli kísérleti körülmények között mért értéket. Egér preparátumok esetén ez a növekedés elérte a ~ 3 -szorosot. A keresztkötési kinetika gyorsulása mindkét SL-nál észlelhető volt, de az SL módosítása tovább nem módosította a k_{tr} értékeket (bármely Ca^{2+} koncentrációnál vizsgálva). Más szavakkal, 10 mM P_i alkalmazása mindhárom emlősben szignifikánsan fokozta az aktin-miozin ciklussebességét, de ez a gyorsulás független volt a SL értéktől.

Korábbi vizsgálatokban, melyeket részben nyúl vázizom preparátumokon (Tesi és mtsai., 2000), részben egérszív miofibrillumain végeztek (Piroddi és mtsai., 2006) a hőmérséklet emelése fokozta a P_i aktin-miozin cikluskinetikára kifejtett hatását. Ezért megvizsgáltuk, hogy saját kísérleti rendszerünkben a hőmérséklet növelése – a fiziológiásabb tartomány irányába – mennyiben befolyásolja a preparátumok kontraktilitási paramétereit. Ezért 10 mM P_i jelenlétében végzett kísérleti protokollunkat humán szívizomsejteken 25 °C-on is megismételtük. Eredményeink szerint 1,9 μm -es SL esetén 25°C-on a maximális Ca^{2+} aktivált erő 35,2 \pm 4,2 kN/m² volt (n=10 humán szívizomsejt), míg 10 mM P_i hozzáadása után ezen érték 17,4 \pm 2,4 kN/m²-re csökkent. Ezen kísérleteink azt mutatták, hogy – az irodalmi adatok alapján megfogalmazott várakozásainknak megfelelően – 25°C-on 10 mM P_i erőteljesebben csökkentette a F_o -t, mint 15 °C-on. A hőmérséklet emelés viszont tovább növelte a mért k_{tr} értékeket. A k_{tr} növekedése $\sim 5,2$ -szeres volt a P_i nélküli 15 °C-on elvégzett mérések adataihoz képest. A humán preparátumokon 25 °C-on 10 mM P_i jelenlétében mért $k_{tr,max}$ érték 7,03 \pm 0,321/s volt. A k_{tr} esetleges SL-függését vizsgálva azonban továbbra sem találtunk szignifikáns különbséget a k_{tr} -ben a két eltérő SL alkalmazásakor.

Összességében megállapítható, hogy vizsgálati eredményeink kiegészítő jellegű információkat szolgáltatnak a Frank-Starling mechanizmus molekuláris hátteréhez. Olyan összehasonlító jellegű méréseket végeztünk, melyek során azonos laboratóriumi körülmények között három különböző emlősfaj szívizom aktin-miozin ciklussebességének szarkomerhossz-függését vizsgálhattuk. A munka jelentőségét az adja, hogy a szívizomsejtek szarkomerhossza és kontraktilis ereje közti kapcsolat molekuláris szinten ma még nem feltárt. Így az sem eldöntött, hogy a Frank-Starling mechanizmus során a szarkomerek megnyúlását az aktin-miozin interakció sebességének és/vagy az egymásra ható aktin-miozin kereszthidak számának változása kíséri-e. Hipotézisünk szerint, amennyiben a Frank-Starling mechanizmus az aktin-miozin ciklus kinetikájának változásával magyarázható, úgy membrán-permeabilizált izolált szívizomsejteken a szarkomerhossz változtatásával a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységének és az aktin-miozin specifikus k_{tr} paraméternek egyaránt változnia kellett volna. Továbbá feltételez-

tük, hogy az emberi, egér és sertés preparátumok adatainak összehasonlítása segíthet az emlősökben általánosan uralkodó törvényszerűségek felismerésében is.

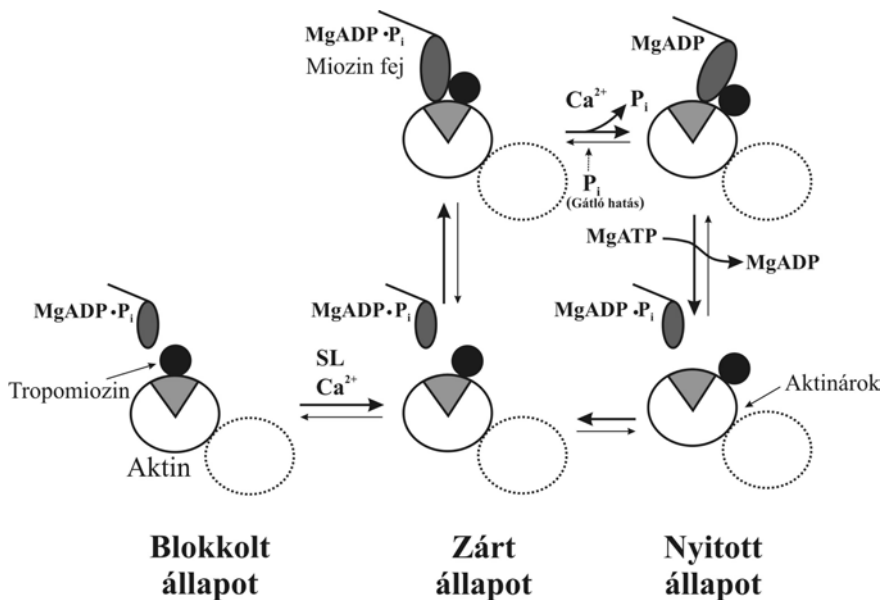
A Ca^{2+} -érzékenység fokozódása – a szarkomerhossz 1,9 μm -ról 2,3 μm -re történő emelésére – emberekben, egerekben, és sertésekben statisztikailag nem különbözött, és mértéke összevethető volt mások által a Frank-Starling mechanizmusra korábban kapott kísérletes eredményekkel (Adhikari és mtsai., 2004; Allen és Kentish, 1985; Wannenburg és mtsai., 1997). A Ca^{2+} -érzékenységi görbék balra tolódásának mértéke tehát az emlős szívből univerzálisnak tűnik. A nagyobb szarkomerhossznál kialakuló Ca^{2+} -érzékenység-fokozódás szubmaximális aktiváció esetén a Ca^{2+} -érzékenységi görbék szigmoid jellege miatt akár az erő duplázódását is maga után vonhatja, mely jól magyarázza a diasztolés telődés fokozódásának kontraktilis erő fokozó hatását.

A k_{tr} vizsgálata során megfigyeltük, hogy a három fajban alapvetően eltérő kereszt-kötési kinetika mellett zajlanak a szívizom kontrakciók. A k_{tr} mindhárom emlősfajban kifejezett Ca^{2+} -koncentráció-függést mutatott. Kisebb Ca^{2+} -koncentrációk felé haladva a kereszt-kötési kinetika lassult, jóllehet az egerek abszolút értékben kifejezett k_{tr} paraméterei valamennyi Ca^{2+} -koncentrációnál szignifikánsan nagyobbak voltak a másik két fajban észlelteknél. Irodalmi adatok alapján ez minden bizonnyal azzal magyarázható, hogy az egerek szívizomában az MHC két izoformája közül sokkal nagyobb arányban található meg a gyorsabb α izoforma, míg emberben és sertésben ez az arány a lassabb β izoforma javára tolódik el (Konhilas és mtsai., 2002; Rundell és mtsai., 2005). Ez a kinetikai különbség összefüggésben állhat azzal az élettani sajátossággal, miszerint az egerek nyugalmi szívfrekvenciája 500 ütés/perc körüli. Így ahhoz, hogy az állat hatásos összehúzódnásokkal képes legyen fenntartani perctérfogatát, nyilvánvalóan gyorsabban kivitelezett szívizom kontrakciókra van szüksége. Az egérszívek gyorsabb kinetikája mellett is azonos Ca^{2+} -érzékenység fokozódás, ugyanakkor arra hívja fel a figyelmet, hogy a Frank-Starling mechanizmus szempontjából a miozin nehézláncok összetétele alárendelt jelentőségű. Ezért a krónikus szívelégtelenség kapcsán kialakuló relatív β -MHC izoforma túlsúlytól (Mercadier és mtsai., 1981) sem várható az SL-függő Ca^{2+} -érzékenyítés változása. Az egerek szívizomsejtjei a humán és sertés eredetű szívizomsejtekhez viszonyítva jelentősebb passzív erőt generáltak a 2,3 μm -es szarkomerhosszon. Ennek a magyarázata az egerek merevebb titin izoforma expressziójával állhat összefüggésben (Cazorla és mtsai., 2000).

A F_o és $p\text{Ca}_{50}$ értékekben P_i jelenlétében észlelt változásokat az aktin-miozin cikluson belüli átmenetek változásaihoz rendelik (Palmer és Kentish, 1998; Pate és Cooke, 1989). Adataink azt mutatták, hogy a P_i fajtól és SL-től függetlenül közel azonos relatív mértékkel csökkentette a preparátumok által generált erőt. A P_i minden vizsgált fajban hasonló módon befolyásolta a kereszt-kötési kinetikát, ezért hatása az aktin-miozin ciklusra konzervatívnak mondható. Humán szívizomsejtekben a mért k_{tr} értékek tovább emelkedtek, amikor az P_i -t tartalmazó oldatok hőmérsékletét 15°C-ról 25°C-ra emeltük. Mindennek ellenére bármely adott $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál és P_i -nél a k_{tr} értéke egyik vizsgált fajban sem függött a nyugalmi szarkomerhosszúságtól.

Az SL-függő Ca^{2+} -érzékenyítés molekuláris mechanizmusa ma még nem tekinthető tisztázottnak, de valószínűsíthető hogy a következő tényezőknek van kiemelt szerepük:

1) az SL megnyújtása növeli az erőgeneráló keresztkötések számát (Adhikari és mtsai., 2004; Fitzsimons és Moss, 1998), és/vagy 2) növeli a cTnC Ca^{2+} -affinitását (Fukuda és mtsai., 2000; Hofmann és Fuchs, 1987). Az, hogy a két mechanizmus molekuláris koordinációja hogyan történik, és melyik folyamat milyen mértékben befolyásolja az aktin-miozin ciklus sebességét, jelenleg nagyrészt még ismeretlen. Elméleti megfontolások azonban arra engednek következtetni, hogy az erőgeneráló keresztkötések számának növekedése valószínűleg lassítaná az aktin-miozin ciklus sebességét (Campbell, 1997), míg a cTnC-hez kötött Ca^{2+} növekedése inkább gyorsítaná ezt a paramétert (Brenner, 1988; Wolff és mtsai., 1995). Eredményeink azt mutatták, hogy dacára a SL-növelésre létrejött erőnövekedésnek adott $[\text{Ca}^{2+}]$ esetén a k_{tr} állandó maradt. Más szavakkal fogalmazva, mindhárom vizsgált fajban a $[\text{Ca}^{2+}]$, a P_i és humán minták esetén a hőmérséklet változtatása ellenére sem sikerült elkülöníteni egymástól a két lehetséges elméleti állapotot: SL-függő módon nem nőtt és nem is csökkent a k_{tr} . Elméletileg lehetséges, hogy a két folyamat kiegyenlítette egymást, és így a kooperatív erő fokozódása épp annyira lassította, mint a Ca^{2+} -affinitás növekedés gyorsította az aktin-miozin ciklust, és ezért az nem változott. Az alkalmazott nagyszámú eltérő kísérleti elrendezés tükrében, ez a lehetőség azonban valószínűtlen. Sokkal valószínűbb, hogy a $[\text{Ca}^{2+}]$ (és nem a SL)



17. ábra. A vékony filamentum aktivációjának három-fázisú modellje.

„Blokkolt” állapotban a tropomiozin fonalak gátolják (blokkolják) az aktin „aktív” felszínét (sötétszürke körcikk), amihez a miozin fejek kötődhetnek. Ca^{2+} jelenlétében aktiválódik a cTnC, a tropomiozin fonál a kettős aktinhélixen az ún. „aktinárok” irányába mozdul el, és lehetővé válik a gyenge keresztkötések kialakulása („zárt” állapot) a miozin fej és az aktin „aktív” felszíne között. A Ca^{2+} elősegíti a „nyitott” állapot kialakulását, ami a tropomiozin fonál aktinárok mélyére való elmozdulásával, és teljesen szabaddá vált „aktív” felszínnel jár. Így kialakulhatnak az erős aktin-miozin keresztkötések. A SL növelése, eredményeink szerint fokozza a zárt állapot kialakulásának valószínűségét. Az anorganikus foszfát (P_i) gátolja a nyitott állapot kialakulását, csökkenti az erős aktin-miozin keresztkötések kialakulási valószínűségét és ezzel az izomerőt (McKillop és Geeves, 1993, figyelembe vételével).

a fő meghatározója emlős szívekben a k_{tr} értékének. Eredményeink ezért inkább azt az elképzelést támogatják, mely szerint a SL nem szabályozza közvetlenül a k_{tr} szempontjából meghatározó keresztköti lépéseket (Adhikari és mtsai., 2004). Mindez a vékony filamentum aktiváció három-fázisú modelljével jól magyarázható (17. ábra) (McKillop és Geeves, 1993; Wannenburg és mtsai., 2000), mert az helyt ad a kontraktilis erő SL-függő növekedésének a keresztköti kinetika látható változtatása nélkül is. Ezen modell szerint Ca^{2+} jelenlétében SL-függő módon fokozódhat az úgynevezett „blokkolt” állapotból az úgynevezett „zárt” állapotba való átmenet valószínűsége, mely gyenge aktin-miozin keresztköti létrejöttéhez is vezet, és ez a rendszer Ca^{2+} -érzékenységének fokozódását okozza. A valódi aktin-miozin ciklus azonban csak a „zárt” és úgynevezett „nyitott” állapotok között zajlik. A „zárt” és „nyitott” állapotok közti átmenetek tükröződnek tehát a k_{tr} -ben, de ezek már nem érzékenyek a SL-ra.

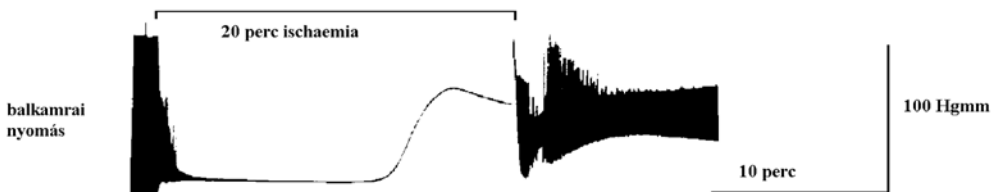
Méréseink szerint tehát a Frank-Starling mechanizmust eredményező molekuláris folyamatok nem az aktin-miozin ciklus sebességének változásával, hanem inkább az egyes aktin-miozin keresztidák számának növekedésével hozhatók összefüggésbe.

Iszkémiás/reperfúziós eredetű miokardiális funkciózavarok hatása a szívizomsejtek működésére

A szívizomzat átmeneti ideig tartó iszkémiájával és azt követő reperfúziójával számos, klinikailag jól definiált helyzetben számolhatunk. Így pl. : instabil, vagy variáns angina esetén; acut myocardialis infarctus korai reperfúziója (spontán, vagy trombolízis) kapcsán, szívkatéterezés során, a kardioplégiával együtt járó nyitott szívű műtétek és szívtranszplantációk, sőt iszkémiás szívbeteg terheléses kardiológiai vizsgálata alatt is (Kloner és mtsai., 1998). A következményes iszkémiás/reperfúziós szívizom-károsodás reverzibilis (kábult miokardium, „stunning”), és irreverzibilis (apoptózis, nekrozis) komponensei csökkent pumpafunkcióval járó állapotot eredményeznek (Piper és mtsai., 1998), melyek a kóros celluláris elváltozások függvényében a vérkeringést veszélyeztetik. Az iszkémiás szívbetegségek magas prevalenciája, a katéteres és műtéti beavatkozások növekvő száma egyaránt azt igénylik, hogy az iszkémiás/reperfúziós szívizom-károsodás patomechanizmusáról alkotott ismereteinket bővítsük, és a megszerzett ismereteket lehetőség szerint újabb terápiás beavatkozások céljaira használjuk (Papp és Édes, 2000).

Az elmúlt két évtized állatkísérletei alapján az iszkémiás/reperfúziós szívizom-károsodás számos kóros tényezője vált világossá. Felismertük, hogy a reperfúziót követő átmeneti ideig tartó oxigén szabadgyök-képződés és intracelluláris Ca^{2+} -túltöltöttség minőségileg más típusú veszélyeket hordoz (reperfúziós károsodás) (Marban és mtsai., 1989), mint az azt megelőző iszkémia alatti kóros útra terelődött metabolizmus (iszkémiás károsodás) (Allen és Orchard, 1987; Ebus és mtsai., 2001; Kloner és mtsai., 1998; Marban és mtsai., 1989; Piper és mtsai., 1998; Stienen és mtsai., 1999). A szívizomzat iszkémiás/reperfúziós funkciózavarai jól követhetők – a valós viszonyokat számos szempontból helyesen modellező – izolált szíveket alkalmazó kísérletekben (Gao és mtsai., 1995; Gao és mtsai., 1996b) (18. ábra).

Ezen megközelítés alapja az, hogy a leggyakrabban kis állatokból (pl. patkány) eltávolított szív koszorúér-keringését (az aortába rögzített kanülön keresztül történő



18. ábra. Langendorff-szerint perfundált izolált szív (patkány) balkamrai nyomásváltozásai egy 20 perces tartó globális iszkémiás periódus előtt, alatt és után.

Az iszkémia kezdetét követően a balkamrai nyomás gyorsan megszűnt, 10-15 perc elmúltával iszkémiás kontraktúra alakult ki. A reperfúziót halmozott ritmuszavarok követték, majd a kamranyomás egy, a pre-iszkémiához viszonyított csökkent funkcionalitású szinten stabilizálódott (kábult miokardium, „stunning”) (Papp és Édes, 2000 alapján).

retrográd) perfúzió révén tartjuk fenn (Langendorff-szív). Ily módon, a kamrák funkciója *ex vivo* körülmények között több órán keresztül tanulmányozható, a balkamrai nyomás pedig mérhető. A perfúzió megszüntetése ilyenkor az egész szívre kiterjedő, globális iszkémiát hoz létre, mely a kontraktilis erő néhány perc alatti teljes megszűnését vonja maga után. A balkamrai nyomásban ilyenkor kialakuló zuhanás tehát az oxigénhiányossá tett izomszövet pumpafunkciójának rohamos csökkenésére hívja fel a figyelmet. A 18. ábrán egy Langendorff-szerint perfundált patkányszív balkamrai nyomásváltozásait egy 20 percig tartó globális iszkémiás periódus előtt, alatt és után tüntették fel. Az iszkémia kezdetét követően a balkamrai nyomás gyorsan megszűnt, 10-15 perc elmúltával iszkémiás kontraktúra alakult ki. A reperfúziót halmozott ritmuszavarok követték, majd a kamranyomás egy, a pre-iszkémiához viszonyítva csökkent funkcionalitású szinten stabilizálódott (kábult miokardium, „stunning”).

Ma már ismert, hogy a folytonos oxigénhiány dacára, az iszkémia beállta után az izom-összehúzódnak energiaforrásként szolgáló MgATP kezdetben csak kismértékű koncentráció-csökkenést mutat. Ennek az az oka, hogy az intracelluláris kreatinfoszfát készlet a MgADP-ből történő MgATP reszintézist akár 5-10 percig is biztosíthatja (Allen és mtsai., 1985; Allen és Orchard, 1987). A pumpafunkció koszorúér-elzáródást követő azonnali romlásának a MgATP hiánya ezért nem lehet a magyarázata. Azt is leírták, hogy a közel fiziológiás értéken tartott MgATP-koncentráció az iszkémia első perceiben az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázist is képes még fenntartani. Mindezen szempontokat figyelembe véve született meg a kontraktilis erő iszkémiás megszűnésének metabolikus elmélete (Allen és mtsai., 1985). Az iszkémia kialakulását követően a pumpafunkció hirtelen romlása jelentős részben azért következik be, mert a miofibrilláris rendszer Ca^{2+} -ra adott válaszadó-készsége (Ca^{2+} -érzékenysége) a megváltozott metabolikus viszonyok miatt (intracelluláris acidózis, P_i akkumuláció) drámaian csökken (Eisner és mtsai., 1989; Elliott és mtsai., 1992; Kentish, 1986; Kentish, 1991; Palmer és Kentish, 1998). Némileg meglepő, hogy az iszkémia időtartamának előrehaladásával a teljes relaxációt egy tónusos izomaktiváció (iszkémiás kontraktúra) követi. Elképzelhető, hogy ekkorra az intracelluláris MgATP-koncentrációja már oly alacsony értékre csökken, mely az aktin és a miozin hullamerevséghez hasonló, rigoros összehúzódnak okozza (Koretsune és Marban, 1990; Stapleton és Allshire, 1998; Ventura-Clapier és Veksler, 1994). Az sem zárható ki azonban, hogy ennek a tónusfokozódásnak más metabolikus okai is vannak (Allshire és mtsai., 1987; Hoar és mtsai., 1987; Pate és Cooke, 1989). Így például felmerült, hogy az iszkémiás kontraktúra létrejöttében szerepet kap az MgATP/MgADP arány megváltozása is, mely felvetést saját kutatási eredményeink is alátámasztották (Papp és mtsai., 2002). Az iszkémiát túlélő sejtekben a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ a korai reperfúzió alatt ritmuszavarok fellépését, de a kontraktilis rendszer átmeneti funkciócsökkenését is eredményezheti (Hoar és mtsai., 1987; Marban és mtsai., 1989; Matsumura és mtsai., 1996; Opie, 1992).

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szabályozása zavarai iszkémia/reperfúzió alatt

A miokardium iszkémiája alatt a szívizomsejtek anyagcseréjében bekövetkező változások idézik elő a $[Ca^{2+}]_i$ diasztolés emelkedését (Allen és mtsai., 1985; Eisner és mtsai., 1989; Elliott és mtsai., 1992). Iszkémia alatt az anyagcsere mérleg negatív lesz: azaz az energiafelhasználás meghaladja az aktuális energiatermelést. Ezért a szívizomzat makroerg foszfát-kötéseket tartalmazó molekuláinak koncentrációja csökken (Opie, 2004). A vérellátás megszűnése után az ellátatlan szívizomterület kreatin-foszfát tartaléka fokozatosan leépül, majd teljesen kimerül. Az ATP-készlet az első percekben viszonylag stabil, majd fenntartott iszkémia esetén az is fokozatosan csökken (Allen és mtsai., 1985; Allen és Orchard, 1987). Mindezek következtében a szívizomzat leginkább energiaigényes funkciói szenvednek zavart, így az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésével előbb-utóbb mindenképp számolni kell (Eisner és mtsai., 1989; Elliott és mtsai., 1992; Marban és mtsai., 1989; Piper és mtsai., 1998). A szív globális funkcióját tekintve az iszkémia kialakulását követően először a relaxációs zavar jelentkezik, ezt követi a kontraktilis erő szisztolés csökkenése, majd az elektromos diszfunkció jelei fejlődnek ki, és csak végül jelenik meg az iszkémiás eredetű fájdalom, az angina.

A glikolízis a szívizom egyetlen, hipoxiás körülmények között is energianyeresre alkalmas biokémiai folyamata. Az anaerob energianyeres termékeként kialakult piruvátot a laktát-dehidrogenáz enzim laktáttá alakítja NADH egyidejű NAD^+ -dá történő oxidálásával. A laktát intracelluláris felszaporodása és az ATP hidrolízise során keletkező H^+ akkumulációja következtében a szívizomzatban acidózis alakul ki. Az intracelluláris pH változásainak, mint a fentiekben már utaltam rá, szerepet tulajdonítanak a kontraktilis funkció iszkémia alatti csökkenésében (Allen és Orchard, 1987). Az alacsony pH (10 – 20 perces iszkémia végére az intracelluláris pH becsült értéke 6 – 6,5 körül alakul) ugyanis csökkenti a kontraktilis rendszerben Ca^{2+} -érzékelő funkcióval rendelkező cTnC molekula Ca^{2+} -kötését (Kentish, 1991; Palmer és Kentish, 1998). Az iszkémiás periódus alatt anaerob irányba kényszerített intracelluláris metabolizmus idővel az extracelluláris tér pH-ját is azonos értelemben változtatja. A reperfúziót követően azonban az extracelluláris pH és az oxigénellátás hamar normalizálódik. Némileg meglepő, hogy az extracelluláris pH és O_2 tenzió reperfúziót követő hirtelen helyreállása paradox módon átmenetileg növeli a szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} -telítettségét (Marban és mtsai., 1989). Ezt a jelenséget részben azzal magyarázzák, hogy a sejtmembránon át megvalósuló H^+ kiáramlást egy antiport rendszeren (Na^+/H^+ -csere) keresztül jelentős Na^+ beáramlás kíséri. A Na^+ transzmembrán gradiensének csökkenése termodinamikailag előnytelenül érinti egy másik transzporter működését, a Na^+/Ca^{2+} -csereét az intenzitását is. Ezért időegység alatt kevesebb Ca^{2+} jut ki a sejtekből, mint fiziológiás intracelluláris pH és Na^+ -koncentráció jelenlétében (Kloner és mtsai., 1998). Az iszkémiássá tett miokardium reoxigenizációja másrészt intenzív oxidatív szabadgyök-képzést is indukál, mely a jelentős $[Ca^{2+}]_i$ -különbséggel jellemzett tereket elválasztó membránrendszerek (felszíni membrán és SR membrán) és különböző fehérjék oxidatív károsításával járul hozzá a szívizomsejtek $[Ca^{2+}]_i$ fokozódásához (Bollí és Marban, 1999; Piper és mtsai., 1998). A $[Ca^{2+}]_i$ normalizálódása a rövid (10-20 perces) iszkémiás inzultust túlélő sejtekben a

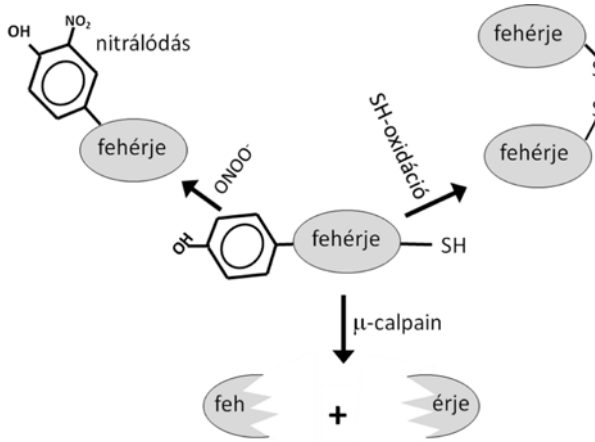
vérkeringés helyreállítását követően 15-20 perccel következik be (Gao és mtsai., 1995). A fenti membránfolyamatoknak és a következményes $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedésnek kiemelkedő jelentősége lehet. A szívizomsejtek reperfúzió allatti átmeneti Ca^{2+} -tútelítettsége ugyanis jelentőse mértékben hozzájárulhat a kontraktilis funkció csökkenéséhez és szívritmuszavarok létrejöttéhez (Bolli és Marban, 1999; Gao és mtsai., 1996b; Marban és mtsai., 1989).

A kórosan emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ patogenetikai szerepét nagyban módosítja az iszkémiás periódus időtartama. Míg az 1-2 percgig tartó, úgynevezett azonnal szűnő iszkémiát követően a kontrakciós funkció néhány másodperc után normalizálódik, addig a 10-20 percgig tartó teljes vérrellátási hiány súlyosabb, de még mindig reverzibilis, úgynevezett miokardiális kábulatot („stunning”) idéz elő (Kloner és mtsai., 1998; Opie, 1992). Ilyenkor a pumpafunkció teljes helyreállása a reperfúziót követően az intracelluláris metabolizmus és a Ca^{2+} homeosztázis rendeződése ellenére sem következik be azonnal, a mechanikus diszfunkció rövidebb-hosszabb ideig (órák-napok) fennáll. A kábult, azaz csökkent kontraktilitású, de életképes szívizomzat működészavarának megértéséhez különböző állatmodelleken végzett vizsgálatok eredményeit használhatjuk fel.

A reverzibilis iszkémiás/reperfúziós miokardium-károsodás feltételezett mechanizmusai

A napjainkban leginkább elfogadott álláspont szerint a iszkémiát követő reverzibilis miokardiális pumpafunkció csökkenés magyarázata a károsodott kontraktilis fehérjerendszer csökkent Ca^{2+} -érzékenységgel függ össze (Bolli és Marban, 1999). E jelenség oka az, hogy a miokardiális stunning-ban akut fehérjekárosodások következnek be, melyek jellegzetesen poszttranszlációs módosításokat jelentenek. Létrejöttükben a fehérjeoldalláncok oxidatív-nitrozatív stressz hatására bekövetkező átalakulásai és Ca^{2+} -függő proteolitikus folyamatok egyaránt szerepet kaphatnak (Kloner és mtsai., 1998; Matsumura és mtsai., 1996). A károsodott fehérjék cseréje időt igényel, és ez magyarázhatja az órákig – napokig tartó funkcionális zavart (Bolli és Marban, 1999). Az eddig felvetett fehérjék közül kiemelendők a miofilamentumot alkotó fehérjék sérülései. A fehérjék vázának és/vagy oldalláncainak oxidációja éppúgy vezethet a fehérjék feldarabolódásához, mint azok kovalens módosításához: a szulfhidril (SH) csoportok oxidációja, karbonil-képzés, eseteleg intra- vagy intermolekuláris kapcsolatok létrejötte révén (Giordano, 2005). A kontraktilis fehérjerendszeren belül számos regulatorikus és strukturális funkcióval rendelkező fehérje károsodását valószínűsítették. Ugyanakkor meglepő, hogy a kiterjedt vizsgálatok ellenére sem világos még, hogy melyek a kábult miokardiumot kísérő mechanikai funkciózavar elsődleges molekuláris okai. A bizonytalanság forrásai sokrétűek. Bár a csökkent kontraktilitás hátterében egy, a késő-iszkémia és korai reperfúzió alatt (a Ca^{2+} -túlterhelt szakaszokban) bekövetkező Ca^{2+} -függő proteolitikus folyamat aktiválódása valószínű (Gao és mtsai., 1995; Gao és mtsai., 1996b), nem rendelkezünk abszolút érvényű bizonyítékokkal arra vonatkozólag, hogy más mechanizmusok, mint amilyen a reaktív oxigén és reaktív nitrogén intermedierek okozta eltérések, azt milyen mértékben egészítik ki (Bolli és Marban, 1999). Továbbá, a különböző kísérletes rendszerekben nyert eredmények humán szívre való

érvényesíthetőségét nagyban korlátozza a faji-különbségekből fakadó szórás is. Saját modell vizsgálatainkban a humán szív kontraktilis fehérjéinek oxidatív, nitrozatív és proteolitikus folyamataival egyaránt foglalkoztunk (19. ábra), ezért ezeket a folyamatokat a következőkben röviden összefoglaljuk.



19. ábra. A reverzibilis posztisztkémiai szívizom-károsodás (stunning) feltételezett molekuláris mechanizmusai.

A szívizom fehérjéi a rövid ideig tartó iszkémiát követő reperfúzió hatására poszttranszlációs változásokat szenvedhetnek, melyek a fehérjefunkciók módosulásaiával járnak. Irodalmi adatok alapján a szívizomfehérjék SH-oldalláncainak oxidációja, peroxinitrit hatására tirozin tartalmú oldalláncainak nitrációja, de a fehérjék fragmentációja is bekövetkezhet.

Az oxidatív stressz csökkent szív pumpafunkcióhoz vezető szerepét az iszkémiás/reperfúziós anyagcserezavaron kívül, a krónikus szívelégtelenség és a gyulladásos citokinek okozta miokardiumkárosodás kapcsán is felvetették (Canton és mtsai., 2011; Tsutsui és mtsai., 2011). A legfontosabb reaktív oxigén gyökök és származékaik, a szuperoxid anion (O_2^-) és a hidroperoxi gyökök (HO_2). Ezek túlzott termelése a fehérjék oxidatív módosításait eredményezi. Szuperoxid anion hatására a patkányból izolált miofilamentumok maximális Ca^{2+} -aktivált erő értékei drámaian csökkentek (MacFarlane és Miller, 1992). Továbbá az iszkémiát követő reperfúzió során a patkányszívek miofilamentumaiból kivont aktin és a tropomiozin fehérjék részben reverzibilis, részben irreverzibilis oxidatív módosulásait ismerték fel (Canton és mtsai., 2004). A miofilamentumokat érő fehérjeoxidáció funkcionális jelentőségére olyan kardiomiopátiával együtt járó transzgenikus állatkísérletekben is rámutattak, melyekben a xantin-oxidáz enzim gátlása a miofilamentumok oxidációját kivédte, és ennek kapcsán a szív kontraktilis funkciója is ép maradt (Duncan és mtsai., 2005). Altatott sertéseken végzett kísérletekben (Canton és mtsai., 2006) a koszorúerek mikroembolizációja kapcsán észlelt kontraktilis funkciózavart hozták összefüggésbe a tropomiozin reverzibilis oxidációjával. A tropomiozin oxidatív károsodása biokémiailag kimutatható diszulfid hidak képzéséhez vezetett. Az antioxidáns hatású C-vitamin jelentős mértékben gátolta a tropomiozin diszulfidhídjainak létrejöttét és a kontraktilis funkciózavart. Összességében ezek az állatkísérletes adatok arra hívták fel a figyelmet, hogy a kontraktilis fehérjék

oxidációja fontos szerepet játszhat az oxidatív stressz pumpafunkciót csökkentő hatásában. A humán miokardiumon belüli fehérjecélpontok vonatkozásában viszont alig áll ilyen természetű adat rendelkezésre. A humán szívizomminták fehérje SH-csoport-oxidációjának *in vitro* tanulmányozása ezért összefüggéseket teremthet a korábbi állatkísérletes adatokkal. Az SH-csoportok viselkedését célzó vizsgálatok jelentőségét az is aláhúzza, hogy az SH-oxidatív átalakulások megfelelő redukáló szerek alkalmazásával elvileg visszafordíthatók (Gao és mtsai., 2012). Permeabilizált izompreparátumokban az SH-csoportok szelektív oxidációja és redukciója egy SH-specifikus oxidálószer, a 2,2'-ditiodipiridin (DTDP) (Lamb és Posterino, 2003), és különböző redukáló szerek alkalmazásával megvalósítható (Hertelendi és mtsai., 2009; Hertelendi és mtsai., 2008).

Az elmúlt évek kiemelkedő jelentőségű eredményei közé tartoznak a reaktív nitrogén intermedierek *in vivo* betöltött funkcióinak felismerése. A legismertebb ilyen jellegű intermedier a nitrogénmonoxid (NO). A nitrogénmonoxid szuperoxid anionnal fiziológiai körülmények között is peroxinitritté (ONOO⁻) alakul, mely élettani mennyiségben szignalizációs szereppel is rendelkezik (Ferdinandy, 2006). A peroxinitrit termelődés kóros emelkedése azért lehet fontos, mert a peroxinitrit több aminosav nitrooxidatív módosítására képes, és ez a fehérjék (pl. enzimek és ioncsatornák) inaktiválódásához vezethet. A peroxinitrit által kiváltott nitrálódás a tirozin és a triptofán oldalláncokon történik. A reakcióban képződő nitrotirozint az *in vivo* termelődő peroxinitrit indikátornak is tekintik. A peroxinitrit fokozott, és ezért potenciálisan toxikus, szöveti szintjeivel az iszkémiás/reperfúziós anyagcserezavar kapcsán, de feltehetően a krónikus szívelégtelenség kialakulása során is számolni kell (Haywood és mtsai., 1996; Mihm és mtsai., 2001). Állatkísérletes modellekben a miokardiális fehérjék peroxinitrit-indukált károsodása (nitrotirozin oldalláncok képződése), valamint a szív pumpafunkciójának romlása között szoros összefüggés mutattak ki (Ferdinandy és mtsai., 2000; Weinstein és mtsai., 2000). Peroxinitrittel vagy citokinekkal kezelt patkány „dolgozó szív” preparátumokon csökkent a szívizomzat ATP felhasználása, mely alapján a peroxinitrit kontraktilis funkcióra kifejtett közvetlen hatását feltételezték (Ferdinandy és mtsai., 1999; Schulz és mtsai., 1997). A miofibrilláris kreatin kináz 40 kDa molekulatömegű izoformájának nitrálódását doxorubicin-kezelt egérszívekben és peroxinitrit-kezelt patkányszív trabekulákban is igazolták (Mihm és mtsai., 2001; Weinstein és mtsai., 2000). Az eddigi kísérletes eredmények alapján megállapítható, hogy a peroxinitrit-indukált nitrotirozin-oldallánc képződés több célfehérje károsodását okozhatja (Kanski és mtsai., 2005; Mihm és mtsai., 2001; Weinstein és mtsai., 2000). Arról is vannak adatok, hogy a peroxinitrit az SH-csoportok oxidációjára is képes. Azon összefüggések azonban, melyek a peroxinitrit hatására a fehérjékben létrejövő nitrotirozin oldalláncok és oxidált SH-csoportok képződésén keresztül csökkent szívfunkcióhoz vezetnek, különösképpen a humán szívben, ma még feltáratlanok.

Specifikus proteáz inhibitorokkal végzett kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy az iszkémiát követő Ca²⁺-túltöltődés hatására kialakuló részleges miokardiális proteolízis a μ -calpain (Calpain-I), neutrális intracelluláris proteázhoz kapcsolható (Gao és mtsai., 1997; Gao és mtsai., 1996a; Matsumura és mtsai., 1996; Yoshida és mtsai., 1995). A μ -calpain minden sejtben expresszálódó, limitált proteolízis során aktiválódó enzim-

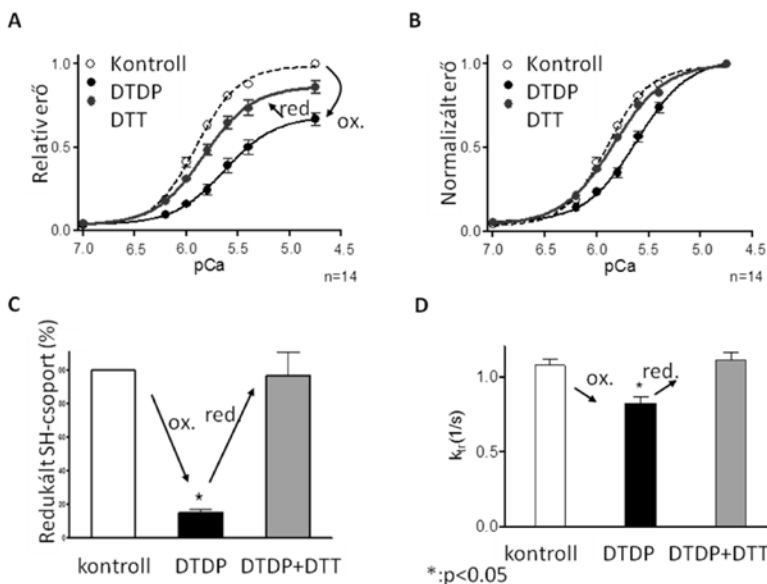
fehérje, mely fiziológiásan valószínűleg az izomfehérjék szabályozott lebontásában vesz részt. Indirekt bizonyítékok állnak rendelkezésre arra, hogy a μ -calpain szerepet játszik a miokardium reverzibilis iszkémiás/reperfúziós károsodásában is. A μ -calpain inhibitorával, Ca^{2+} -csatornablokkolók alkalmazásával, továbbá az akciós potenciál időtartamának rövidítésével az iszkémiás/reperfúziós károsodás mértéke csökkenthető (Bolli és Marban, 1999; Matsumura és mtsai., 1996). A μ -calpain-ról ismert, hogy a szarkomerek Z-lemezeinek környékén halmozódik fel és, hogy a μM -os $[\text{Ca}^{2+}]_i$ képes aktiválni (Goll és mtsai., 1991). *In vitro* körülmények között a μ -calpain számos regulatorikus és strukturális funkcióval bíró miofibrilláris fehérjét hasít (Di Lisa és mtsai., 1995; Goll és mtsai., 1991). Nem ismert azonban, hogy ezek hogyan viszonyulnak a kábult miokardium csökkent funkcionalitásához. A korábbiakban felmerült, hogy a μ -calpain a troponin-komplex cTnI alegységének degradációján keresztül játszik döntő szerepet (Gao és mtsai., 1997). Ezek alapján a kábult miokardium a kontraktilis fehérjék regulációs folyamatainak károsodása következtében alakulna ki. Mások eredményei alapján viszont a kábult miokardium patogenezisében egy, a szívizomsejteket érő strukturális károsodás valószínűsíthető (Matsumura és mtsai., 1996; Van Eyk és mtsai., 1998; Yoshida és mtsai., 1995). A kifejezett miofibrilláris funkcióromlást eredményező proteolízis ugyanis megbontja a Z-lemezek egységét, ami a dezmin és feltehetőleg más citoszeletális fehérjék (pl. titin, fodrin, α -aktinin) hasításához köthető. Tovább bonyolíthatja a képet, hogy a lehasadó degradációs termékeket transzglutamináz aktivitású enzimek más miofibrilláris fehérjékhez kapcsolhatnak. Ilyen kovalens komplexeket a cTnI hasításából keletkező degradált proteinek vonatkozásában is azonosítottak (McDonough és mtsai., 1999). A humán miokardium iszkémiás károsodásának diagnosztikájában a troponin komplex (elsősorban a cTnI és a cTnT) bomlástermékeinek vérplazmában történő felismerése jelenleg központi helyen szerepel (Katrukha és mtsai., 1998). Nincs egyetértés azonban abban, hogy melyek a proteolízis által elsősorban károsított struktúrák (Di Lisa és mtsai., 1995; Gao és mtsai., 1997; Goll és mtsai., 1991; Matsumura és mtsai., 1996; McDonough és mtsai., 1999; Van Eyk és mtsai., 1998; Wang és mtsai., 2002; Yoshida és mtsai., 1995), valamint hogy ezek milyen módon viszonyulnak a megváltozott miofibrilláris funkcióhoz, és az eddig feltárt összefüggések milyen mértékben vonatkoztathatók az emberi szívizomzat iszkémiás/reperfúziós károsodására (Kloner és mtsai., 1998). A legújabb vizsgálati eredmények alapján az is felmerült, hogy a proteolitikus aktivitáshoz a szabadgyökök által aktivált matrix metalloproteináz-2 enzim működése is hozzájárulhat (Wang és mtsai., 2002).

Összefoglalva: a kábult miokardium kialakulásában számos strukturális és regulatorikus funkcióval bíró fehérje károsodása valószínűsíthető. A funkció romlásához nem feltétlenül szükséges nagymérvű fehérje-átalakulás. Ez a tény is magyarázhatja azt, hogy a funkcionális hatású fehérje-változásokat miért olyan nehéz pontosan azonosítani.

A szívizom szarkomerét alkotó fehérjék SH-oxidáció, peroxinitrit-expozíció és μ -calpain-okozta eltérései

A kontraktilis fehérjék SH-oxidáció hatására bekövetkező funkcionális változásait bal-kamrai donor eredetű humán szívizomsejteken a fehérjék SH oldalláncait szelektív módon oxidáló DTDP alkalmazásával tanulmányoztuk (Hertelendi és mtsai., 2008). DTDP növekvő koncentrációival végzett inkubációk után megfigyeltük, hogy a kamrai sejtek telítő $[Ca^{2+}]$ jelenlétében egyre kisebb erejű összehúzódások létrehozására voltak csak képesek. 10 mM DTDP alkalmazását követően az erőgenerálás megszűnt, jöllehet az 10 mM antioxidáns hatású ditiotreitolt (DTT) alkalmazását követően jelentős mértékben ismét visszatért. 10 mM DTT DTDP-kezelés nélkül viszont nem fejtett ki hatást. Ezekben a vizsgálatokban azt is megfigyelhettük, hogy az SH-oxidálószer okozta teljes funkcióvesztés a szívizomsejtek fénymikroszkópos szerkezetében nem okozott eltérést. A továbbiakban a DTDP-okozta mechanikai és a fehérjék SH-oxidatív állapotában bekövetkezett változásokat kívántuk összehasonlítani, melyet a redukált SH-csoportok mennyiségét mérő Ellman-reakció segítségével kíséreltük meg. Ezen eredményeink alapján megállapítható volt, hogy a humán kamrai szívizomsejtekben a redukált SH-csoportok mennyiségének teljes elvesztésével párhuzamosan a Ca^{2+} -aktivált erőgenerálás szintén felfüggesztődött, jöllehet, az F_o és a fehérje-SH-oxidáció koncentráció-függő változása, relatív értelemben, egymással nem volt teljesen azonos. A F_o közel felére történő erőcsökkenéshez vezető 2,5 mM DTDP alkalmazásakor pl. a szívizomsejtek redukált SH csoportjainak (Ellman-reakcióval meghatározott) kontrollhoz viszonyított relatív aránya mindössze $14,8 \pm 2,4\%$ volt. Mindazonáltal, a DTDP ugyanazon koncentráció-tartományban csökkentette az F_o -t és a fehérjék redukált SH-csoportjainak mennyiségét, az SH specifikus redukálószer erélyes reverziót eredményezett nem csak az erőben, de az SH csoportok számában is. Mindezek a DTDP-vel modulált SH-csoportok mennyiségének és a mechanikai paraméterek közti ok-okozati összefüggések jelenlétére hívták fel a figyelmet.

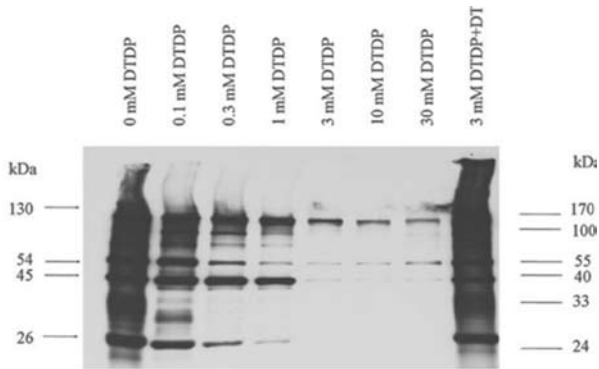
A továbbiakban az SH-oxidatív elváltozások mechanikai következményeit részleteiben kívántuk tanulmányozni. Ehhez egyetlen, a maximális erő közel felére történő erőcsökkenéshez vezető DTDP koncentrációt (2,5 mM) használtunk, viszont meghatároztuk az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenységét, és a $k_{tr,max}$ értékét is (20. ábra). A maximális erő közel felére történő mesterséges erőcsökkentést azért tartottuk megfelelő stratégiának, mert ilyenkor a kiváltott mechanikai hatás részletei még megfelelő jel-zaj viszonyok mellett voltak értékelhetőek. 2,5 mM DTDP hatására nem csak az F_o (a kontroll 64%-ára), hanem annak Ca^{2+} -érzékenysége ($\Delta pCa_{50} = 0,22 \pm 0,02$) és $k_{tr,max}$ (1,07 \pm 0,04 1/sec-ról 0,8 \pm 0,05 1/sec-ra) is csökkent. A $k_{tr,max}$ paraméterben tapasztalt DTDP-függő szignifikáns csökkenés arra hívta fel a figyelmet, hogy a DTDP-okozta SH-oxidáció kapcsán az aktin-miozin ciklus sebessége csökken. 2,5 mM DTDP hatására az n_{Hill} némileg csökkent (2,01 \pm 0,08-ról 1,76 \pm 0,08-ra, míg az $F_{passzív}$ kis mértékben nőtt (2,6 \pm 0,3 kN/m²-ről 2,8 \pm 0,2 kN/m²-re). 10 mM DTT az n_{Hill} és $F_{passzív}$ kivételével a többi paramétert majdnem tökéletesen helyreállította.



20. ábra. Az SH-oxidáció és SH-redukció miofibrilláris hatásai humán szívizomsejteken.

A relatív (A) és normalizált (B) Ca^{2+} -erő összefüggések azt mutatják, hogy 2,5 mM DTDP okozta fehérje oxidáció (ox.) csökkentette a Ca^{2+} -aktivált erőt, és annak Ca^{2+} -érzékenységet. 10 mM DTT önmagában nem fejtett ki hatást, de majdnem teljesen helyreállította a Ca^{2+} -erő összefüggésekben tapasztalt változásokat a DTDP alkalmazását követően (red.). 2,5 mM DTDP drasztikusan csökkentette a redukált állapotban található SH csoportok mennyiségét (C), és kis mértékben az aktin-miozin ciklussebességet (k_{tr}) is. Utóbbi két hatás teljes mértékben visszafordítható volt (Hertelendi és mtsai., 2008 alapján).

A DTDP-okozta funkcionális eltérésekért felelős SH-oxidált fehérjék azonosítása érdekében további biokémiai jellegű vizsgálatokat hajtottunk végre. A miokardiális homogenizátumok fehérjeinek SH-csoportjait a különböző protokollok után (DTDP és/ vagy DTT alkalmazása után) először biotiniláltuk, a fehérjéket SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével szétválasztottuk, majd a fehérjéket Western immunoblot során streptavidin-peroxidáz segítségével detektáltuk. A DTDP koncentráció 0-30 mM-ig terjedő fokozódásával párhuzamosan észlelt festődési intenzitáscsökkenés arányos volt a fehérjék SH-oxidációjának mértékével, és mindez látszólag reprodukálta az Ellman-reakció során kapott kvantitatív eredményeket (21. ábra). A különböző molekulatömegű fehérjék festődési intenzitása egymástól eltérő DTDP koncentrációknál szűnt meg. Ez arra utalt, hogy a különböző miokardiális fehérjék DTDP-érzékenysége nem volt azonos. Továbbá az is figyelemre méltó, hogy a DTDP-expozíciókat követő DTT-kezelés hatására minden fehérje esetén visszatért a jelintenzitás, vagyis a DTT valamennyi ábrázolt fehérje oxidált SH-csoportjait redukálta. Érdemes megjegyezni, hogy több miokardiális fehérje oxidációja a 0,1 mM és 1 mM DTDP közötti koncentráció-tartományban következett be, ahol érdemi F_o csökkenését nem észleltük. Nagyobb DTDP koncentrációknál (1-10 mM) ahol az F_o csökkenésének zöme létrejött, négy jól festődő miokardiális fehérje oxidációját észleltük a 130, 54, 45 és 26 kDa molekulatömegeknél. Ezek közül két fehérje, a 45 kDa-nál és a 26 kDa-nál ábrázolódók, oxidálódtak teljes



21. ábra. Humán miokardiális fehérjék emelkedő DTDP koncentrációkkal történt kezelését követő SH-oxidáció-érzékeny Western immunoblot analízis.

A festődési intenzitás csökkenése a fehérjék SH-oxidációjának mértékével arányos. 10 mM DTT kezelés hatására a 3 mM DTDP hatására létrejövő fehérje-oxidáció valamennyi fehérje esetén helyreállt. A bal oldalon nyíllal jelölt fehérjék oxidációja azoknál a DTDP koncentrációknál következett be, melyeknél a kontraktilis funkciózavar kifejlődött (Hertelendi és mtsai., 2008 alapján).

mértékben, míg a másik kettő oxidációja csak részleges volt. A 45 kDa-os és 26 kDa-os fehérjék teljes oxidációja és a párhuzamosan észlelt jelentős csökkenés az F_o -ban arra utalt, hogy utóbbi fehérjék oxidatív állapota jelentős szerepet kaphat a miofibrilláris erő SH-oxidáció függő csökkenésében.

A cTnI és a MLC1 molekulatömege egyaránt közel áll 26 kDa-hoz. Ezért immunoprecipitációs vizsgálatokat végeztünk, mely a 26 kDa magasságában észlelt intenzitáscsökkenés hátterében az MLC1 fehérje oxidációját igazolta. A 45 kDa-os fehérje, mely az MLC1-hoz hasonló DTDP-érzékenységgel rendelkezett Western immunoblot vizsgálatok és ezüsttel festett gélek alapján az aktinnal volt azonos. A molekulatömegek hasonlósága alapján a 130 kDa és 54 kDa magasságában vándorló fehérjék nagy valószínűséggel a miozinkötő C-fehérjének és a dezminnek felelhetnek meg (Flashman és mtsai., 2004; Papp és mtsai., 2000).

A peroxinitrit kontraktilis működésre kifejtett hatásait, az SH-oxidációra vonatkozó *in vitro* modellvizsgálatainkhoz hasonlóan, izolált humán donor eredetű permeabilizált kamrai szívizomsejteken tanulmányoztuk (Borbely és mtsai., 2005a). Az alkalmazott stratégiai is hasonló volt, melynek értelmében először a szer mechanikai és biokémiai hatásainak koncentráció-függését vizsgáltuk. A nagyobb koncentrációjú peroxinitrit kezelésekre hatására egyidejűleg fokozódott a peroxinitrit-kezelt minták nitro tirozin tartalma, melyet nitro tirozin-specifikus antitestek felhasználásával végzett dot blot módszerrel mutattunk ki. A peroxinitrit koncentráció-függő módon csökkentette az F_o -t (IC_{50} : $55 \pm 4 \mu M$), míg a fehérjék nitrációja drámaian nőtt. A peroxinitrit-okozta kontraktilis depresszió molekuláris mechanizmusának feltárása érdekében az F_o hozzávetőleg felére való csökkenést előidéző 50 μM peroxinitrit kezeléseket előtt és után meghatároztuk a szívizomsejtek izometriás erejének és keresztkötési kinetikájának (k_{tr}) Ca^{2+} -függését. Eredményeink szerint a peroxinitrit minden $[Ca^{2+}]$ -nál csökkentette az izometriás erőt. A peroxinitrit-

kezelést követő erőértékek saját maximumra való normalizálását követően azonban a Ca^{2+} -érzékenységi görbe nem különbözött a peroxinitrit kezelés előtti görbétől ($p\text{Ca}_{50}$: $5,89 \pm 0,02$ és $5,86 \pm 0,04$; n_{Hill} : $2,22 \pm 0,11$ és $2,42 \pm 0,25$; $50 \mu\text{M}$ peroxinitrit előtt és után ($P > 0,05$)). Továbbá, a peroxinitrit kezelést követően a $k_{tr,max}$ szintén nem változott a $p\text{Ca}$ $4,75$ [Ca^{2+}]-nál; $k_{tr,max}$: $1,14 \pm 0,03$ 1/s és $1,05 \pm 0,07$ 1/s $50 \mu\text{M}$ peroxinitrit előtt és után ($P > 0,05$)) de az ennél kisebb [Ca^{2+}]-knál sem ($P > 0,05$). Mindazonáltal észlelhető volt, hogy a peroxinitrit hatására a szívizomsejtek harántcsíkolttsága károsodott, és a passzív erőkomponens is némiképp fokozódott ($2,1 \pm 0,1$ kN/m^2 -ről $2,5 \pm 0,2$ kN/m^2 -re ($P < 0,05$)), mely szintén a szívizomsejt preparátumok ultrastrukturális károsodására utalt.

A következőkben arra tettünk kísérletet, hogy azonosítsuk azon kontraktilis fehérjéket, melyek nitrálódása felelős lehetett a humán szívizomsejtek mechanikai funkciójában észlelt változásokért. Ezért SDS-PAGE-t követően Western immunoblot vizsgálatokat végeztünk és ezek kapcsán igyekeztünk meghatározni azon fehérjék molekulatömegét melyek magasságában releváns peroxinitrit koncentrációk alkalmazása után jelentős nitrorozoin képződés alakult ki. A peroxinitrit kisebb koncentrációinál (25 - $100 \mu\text{M}$) egyetlen 100 kDa-os fehérje nitrációja volt megfigyelhető. Nagyobb peroxinitrit koncentrációknál (250 - $500 \mu\text{M}$), azonban további fehérjék nitrációja is bekövetkezett. A 100 kDa magasságában festődő fehérje molekulatömege megegyezett az α -aktininéval. Immunprecipitációs vizsgálatok felhasználásával a nitrált fehérjét valóban kétségen kizáróan azonosítani tudtuk az α -aktininnal.

A μ -calpain miofibrilláris fehérjéket érintő proteolitikus hatásait és azok mechanikai következményeit patkány jobbkamrai szívizomsejtjein tanulmányoztuk (Papp és mtsai., 2000). Mivel a μ -calpain aktivációjához szükséges [Ca^{2+}] jelentős erőgeneráláshoz is vezethet a μ -calpain jelenlétében 40 mM $2,3$ -butandion monoxim-ot (BDM) is alkalmaztunk, mely az aktin-miozin interakciót a μ -calpain kezelésekk alatt felfüggesztette. A szívizomsejtek μ -calpain kezelése után megfigyeltük, hogy a μ -calpain csökkenti az izometriás erőt, ezért a μ -calpain kezelés intenzitását úgy választottuk meg, hogy a kezelést követően az F_0 közel 50% -os csökkenése alakuljon ki ($1,25$ U μ -calpain, 40 mM BDM és $p\text{Ca}$ $5,0$ jelenlétében, 10 percig 15°C -on). Azt is észleltük azonban, hogy a μ -calpain hatására a preparátumok mechanikai stabilitása is csökkent, melyet a harántcsíkoltat maximális aktivációt követő elmosódása, és a szubmaximális aktivációknál mért erő értékeinek csökkenése is jelzett. A μ -calpain okozta mechanikai hatások részletes elemzése érdekében a μ -calpain inkubációkat követően kezdetben csak szubmaximális aktivációkat alkalmaztunk (II. fázis), majd megmértük az F_0 -t és a szubmaximális aktivációkat megismételtük (III. fázis). Ezzel a megközelítéssel egyetlen μ -calpain kezeléshez 3 $p\text{Ca}$ -erő összefüggést tudtunk rendelni. A kontroll körülményeket jellemző I. fázis során mért összefüggés a még rendezett szarkomer struktúra mellett, míg a μ -calpain közvetlen hatására létrejövő hatásokat a II. fázis tükrözte, majd a μ -calpain-kezelt szívizomsejtek szarkomer struktúrájának maximális aktivációt követő rendezetlenné válása után következött a III. fázis. A szívizomsejtek izometriás erejének Ca^{2+} -érzékenységét az *in vitro* μ -calpain kezelésekk előtt (I. fázis) és után (II. és III. fázisok) egyaránt meghatároztuk. A μ -calpain kezelés hatására valamennyi [Ca^{2+}]-n csökkent a Ca^{2+} -aktivált erő. Feltűnő volt azonban, hogy a II. fázist követő maximális aktiváció után (III. fázis) a

legtöbb szubmaximális aktivációt eredményező $[Ca^{2+}]_i$ -n az izomerő tovább csökkent. A kontraktúrák maximumainak normalizálása után nyert Ca^{2+} -érzékenységi görbék összehasonlítása során az is világossá vált, hogy az F_o csökkenése ellenére az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenysége a μ -calpain kezelést közvetlenül követő II. fázisban még nem változott ($pCa_{50,I. fázis}$: $5,44 \pm 0,03$; $pCa_{50,II. fázis}$: $5,40 \pm 0,02$). A III. fázisban azonban az I. és II. fázisokban észlelt Ca^{2+} -érzékenységhez viszonyítva szignifikáns Ca^{2+} -érzékenység csökkenést észleltünk ($pCa_{50,III. fázis}$: $5,34 \pm 0,02$). A μ -calpain-kezelt szívizomsejtek mechanikai instabilitása és a Ca^{2+} -érzékenység progresszív hanyatlása azért figyelemreméltó, mert az a μ -calpain szarkomereszerkezetet érintő potenciális hatásaira hívja fel a figyelmet. Ezt a feltevést támogatta az is, hogy a μ -calpain-kezelt szívizomsejteken a k_{tr} csak a maximális Ca^{2+} -aktivációk során csökkent, a szubmaximálisaknál nem. A továbbiakban ezért a szívizomsejtek azon fehérjéit igyekeztünk azonosítani, melyek μ -calpain általi hasítása felelős lehetett a mechanikai funkció aktiváció-függő változásaiért.

A μ -calpain miokardiális fehérjékre kifejtett proteolitikus hatásainak tanulmányozása érdekében permeabilizált szívizomsejt-szuszpenziók felhasználásával SDS-poliakrilamid gélelektroforéziseket végeztünk és a géleket ezüstoffestést követően értékeltük. Eredményeink szerint a BDM nem befolyásolta a μ -calpain hatására létrejövő fehérjevaltozásokat, melyek közül a legszembetűnőbb egy új, feltehetően degradációs eredetű fehérjecsík megjelenése a 146 kDa pozícióban és a dezmin fehérje magasságában észlelt intenzitáscsökkenés volt. Az 55 kDa-nál észlelt μ -calpain kezelésre intenzitáscsökkenést mutató fehérje, Western immunoblot módszerrel végzett vizsgálataink szerint, valóban a dezmin fehérjének felelt meg. A dezmin számos hasítási termék keletkezése mellett az alkalmazott μ -calpain kezelés hatására igen intenzíven bomlott. Figyelembe véve a dezmin fehérje szerepét a miofibrilláris citoskeleton stabilizálásában, a dezmin bomlás nagy valószínűséggel kapcsolatban állt a μ -calpain-hatására észlelt mechanikai funkció változásaival. Langendorff-szerint perfundált és iszkémiás/reperfúziós protokolloknak kitett patkányszívvekben szintén észleltünk dezminhasítást. Irodalmi adatok ugyancsak alátámasztják azt, hogy az iszkémiás/reperfúziós szívizom károsodás során több, a miokardiális szarkomer stabilitásáért felelős fehérje szerkezete károsodik. Mindezek alapján a μ -calpain-függő dezmindegradáció hozzájárulhat a iszkémiát követő mechanikai funkciózavar létrejöttéhez.

Az SH-oxidáció és peroxinitrit mechanikai hatásait humán szívizomsejteken, míg a μ -calpain mechanikai hatásait először patkány szívizomsejteken tanulmányoztuk. Ezért a μ -calpain proteolitikus hatásait humán miokardiális mintákon is vizsgáltuk. A μ -calpain humán miofibrilláris fehérjéket érintő potenciális proteolitikus hatásairól balkamrai homogenizátumokon végzett *in vitro* μ -calpain inkubációk segítségével tájékozódunk ($T=30^\circ C$). Az eredményeket ezüstoffestett gradiens SDS-poliakrilamid gélek felhasználásával értékeltük, melyek számos fehérje pozícióban jelentős intenzitás-eltérést azonosítottak. A fehérjecsíkok intenzitásának csökkenése (akár teljes eltűnése) vagy előzőleg nem detektálható, μ -calpain hatásra megjelenő új fehérjecsíkok a fehérjedegradáció jelenségére utaltak. Némely eltérés olyan molekulatömeg tartományban jelentkezett, mely korábbi adatok alapján hasonló a miokardium iszkémiát követő reperfúziós károsodása során azonosított több proteolitikusan hasadó miofibrilláris fehérje molekula-

tömegéhez (Di Lisa és mtsai., 1995; Gao és mtsai., 1997; Matsumura és mtsai., 1996; McDonough és mtsai., 1999; Murphy és mtsai., 2000; Papp és mtsai., 2000; Van Eyk és mtsai., 1998; Yoshida és mtsai., 1995). Ezek a hasonlóságok arra sarkalltak bennünket, hogy részletesebben megvizsgáljuk, hogy a μ -calpain mediált proteolízis valóban a szarkomer strukturális (titin, α -fodrin, α -aktinin, dezmin) és regulatorikus (cTnT és cTnI) funkciói szempontjából fontos fehérjék hasítását valósítja-e meg, és ha igen akkor azok μ -calpain-érzékenysége hogyan viszonyul egymáshoz. Ezért a további vizsgálatainkban elsősorban ezekre a fehérjékre koncentráltunk. A titin, α -fodrin, α -aktinin, dezmin, cTnT and cTnI fehérjék feltételezett degradációját célzott Western immunoblot és a titin esetében ezüst-festett SDS-poliakrilamid gél analízissel is vizsgáltuk. Az 1 U illetve 5 U μ -calpain aktivitás mellett végzett emésztés eredményeit 0,5, 15, 30, 60 és 120 perc inkubációt követően értékeltük. A nagy (5 U) μ -calpain aktivitás mellett végzett inkubáció eredménye azt mutatta, hogy, bár eltérő effektivitással, de az összes általunk vizsgált fehérjét képes hasítani a μ -calpain.

A miokardium iszkémiás-reperfúziós funkciózavarainak létrejöttében (és más miokardiális károsodásokban is) korábban felvetett sejtszintű mechanizmusok közül három (SH-oxidáció, peroxinitrit-okozta fehérjekárosodások és μ -calpain okozta proteolízis) miofibrilláris hatásait hasonló általános megközelítést alkalmazva, de egymástól függetlenül tanulmányoztuk. Jelenleg még nem eldöntött, hogy a számos bizonyítékkal támogatott patogén mechanizmusok a szarkomer kontraktilis működésének döntően strukturális, avagy regulatorikus jellegű eltéréseit okozzák-e. Ezért olyan modell-kísérleteket terveztünk, melyekben a Ca^{2+} -regulált szarkomerfunkció változásai és az azokért felelős kontraktilis fehérjeeltérések egymáshoz rendelhetők. Valamennyi kísérletben közös volt, hogy a szívizomsejtek kontroll (kezelés előtti) mechanikai tulajdonságainak meghatározása után *in vitro* alkalmaztuk a potenciálisan fehérjekárosító ágens, majd a mechanikai funkcióváltozás részleteit és az azokért felelős biokémiai változásokat a kezelt szívizomsejteken illetve azok homogenizátumain igyekeztünk azonosítani. A szívizomsejt-károsítás mértékét önkényesen választottuk meg a F_o közel 50%-os csökkenését eredményezőre, mely vélhetően nem felel meg az *in vivo* különböző kórállapotokban bekövetkező hatásoknak. Ez az 50%-os F_o -csökkenés ugyanakkor elegendő biztonságot adott (másként fogalmazva elfogadható jel-zaj arányt biztosított) ahhoz, hogy a F_o csökkenéséért felelős szarkomerdinamikai eltérés természetét (struktúra és/vagy reguláció) felismerhessük. A 3. táblázat az SH-oxidáció, peroxinitrit-expozíció, és μ -calpain kísérleteink során észlelt miokardiális hatásokat összegzi.

Az alkalmazott három különböző ágens mindegyike képes volt teljes mértékben felfüggeszteni a Ca^{2+} -aktivált erőgenerációt. Az előidézett funkciózavar molekuláris természete és azok szarkomerdinamikai következményei azonban eltértek. Irodalmi adatokkal összhangban (Ceconi és mtsai., 2000) a miokardiális fehérjék alapállapotukban döntően redukált SH csoportokkal rendelkeztek, és az SH-oxidációnak viszonylag jelentős mértéket kellett elérni ahhoz, hogy a mechanikai funkció is sérüljön. A miokardiális fehérjék közül néhány SH-oxidációja azonban a mechanikai következmény szempontjából jelentősebb lehetett a többiekénél. Eredményeink szerint a MLC1 és aktin oxi-

3. táblázat. Az SH-oxidáció, peroxinitrit-expozíció, és μ -calpain kontraktilis hatásai izolált membránpermeabilizált szívizomsejteken

	Ca ²⁺ -érzékenység (pCa ₅₀)	Aktin-miozin ciklussebesség (k _{tr})	Harántcsíkolat	Károsodó fehérjék	Hatás a szarkomerre
SH-oxidáció	csökken (reverzibilis)	csökken (reverzibilis)	változatlan	MLC1, aktin (reverzibilis)	regulatorikus
peroxinitrit	nem változik	nem változik	elmosódott	α -aktinin	strukturális
μ -calpain	nem változik, majd aktiváció-függő módon csökken	aktiváció-függő módon csökken	elmosódott	titin, α -fodrin, dezmin, cTnT, cTnI, α -aktinin	strukturális

dációja valószínűleg azon kontraktilis fehérjék közé tartoznak, melyek SH-oxidációja úgy váltja ki az aktin-miozin ciklussebesség csökkenését, hogy eközben a Ca²⁺-érzékenység is csökken. Terápiás szempontból fontos lehet, hogy az SH-oxidatív eredetű szarkomerfunkció-eltérések reverzibilisek voltak. Mindezek alapján a kontraktilis fehérjék SH-oxidatív károsodása a szarkomerdinamika finom regulációjának zavarát eredményezheti. A peroxinitritre kialakuló mechanikai zavar döntően a fehérjék nitrálásán keresztül indukált hatásoknak köszönhető, melyek a szarkomerstruktúra irreverzibilis változásához vezettek. Eredményeink alapján nem zárható ki, hogy a peroxinitrit okozta α -aktinin-nitrálódás kulcsszerepet játszott a mechanikai funkció csökkenésében. Az α -aktinin szerepe a Z-lemezek integritásában (Goll és mtsai., 1991; Malhotra és mtsai., 1986; Opie, 2004), az aktin filamentumok Z-lemezekhez történő rögzítésében lehet, és ezért a szarkomerekben ébredő erő longitudinális továbbvitelében is valószínűsíthető. Az α -aktinin szelektív sérülésekor a harántcsíkolat összezilálódott, a kieső aktin-miozin elemek miatt az F₀ ugyan csökkent, a megmaradt egységek szabályozása (pCa₅₀, k_{tr}) azonban nem változott. Mindezek összhangban állhattak az α -aktinin molekulák egy részének feltételezett kiesésével. A μ -calpain okozta proteolitikus eltérések szintén károsították a szarkomerek integritását, ezért a μ -calpain-hoz kapcsolódó vizsgálatainkban a szarkomerek strukturális károsodásához aligha férhet kétség. A szarkomerstruktúra felzulása azonban ebben az esetben nem történt meg jelentős erő kifejtéssel járó összehúzódások nélkül, jelezvén, hogy a mechanikai labilitás ebben az esetben más típusú fehérjék károsodásához rendelhető, mint a peroxinitrit kezelések után. A μ -calpain humán bal kamrai szövetmintákban különböző intenzitással számos miofibrillaris fehérjét hasított. A humán miokardium néhány μ -calpain-érzékeny fehérjéjének proteolitikus hasíthatóságait összehasonlítva, több olyan struktúrfehérjét azonosítottunk, melyek egy feltételezett szabályozatlanná váló μ -calpain aktiválódás után viszonylag könnyen áldozatául eshetnek a proteolízisnek (titin, α -fodrin, dezmin), míg a vékony filamentum regulatorikus fehérjéi (cTnI, cTnT), de egy struktúrfehérje (α -aktinin) is kevésbé tűntek jó μ -calpain-szubsztrátnak (Barta és mtsai., 2005). A μ -calpain proteolitikus hatásai azért is érdekesek, mert néhány korábbi vizsgálat alapján a cTnI részleges proteolízisét kulcsfontosságúnak tekintették az iszkémiát követő miokardiális kábulat mechanizmusában (Gao és mtsai., 1997; Gao és mtsai., 1996a; Murphy és mtsai., 2000). Saját

vizsgálati eredményeink megkérdőjelezik a μ -calpain-hoz kötött izolált cTnI proteolízis koncepcióját (Papp és mtsai., 2001). Figyelemreméltó volt például, hogy a szívizom homogenizátumok kívülről hozzáadott μ -calpain nélkül is mutattak „spontán” fehérje degradációt, mely csak a Ca^{2+} -ot tartalmazó reakcióközegben, calpain inhibitor hiányában volt megfigyelhető. Az endogén proteolitikus aktivitás okozta változások a degradációs termékek molekulatömege alapján hasonlóságot mutattak az *in vitro* exogén μ -calpain-indukált inkubációk során kapott eredményekkel. Az α -fodrin, a dezmin és a cTnI autoproteolitikus hasítási termékei (endogén Ca^{2+} -függő proteolízis eredményeként) hasonlóságot mutattak az exogén μ -calpain által indukált proteolízis során keletkező degradációs termékek molekula-tömegével. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy ezek a fehérjék *in vivo* is a μ -calpain célfehérjei, így degradációjuk szerepet kaphat a miokardium μ -calpain-mediált károsodásainak kialakulásában. Az iszkémiás/reperfúziós anyagcserezavar során átmenetileg kritikus szintre emelkedő [Ca^{2+}] és szabályozatlan μ -calpain aktiváció során várhatóan a fent felsorolt fehérjék degradációját is kiváltja, melynek mértéke arányban állhat a miofibrilláris diszfunkcióval is. Eredményeink szerint a μ -calpain-mediált proteolízis nem valószínű, hogy egyetlen fehérjére, például a cTnI-re korlátozódna, hanem inkább a poszttranszlációs módosítások egyik jelentős útvonaltól reprezentálhatja, érintve számos fehérje szerkezetét és működését (Croall és DeMartino, 1991; Goll és mtsai., 2003).

A krónikus szívelégtelenség során kialakuló miokardiális funkciózavar

Experimentális kardiológiai kutatások eredményeként az utóbbi évtizedben lényegi előrehaladás történt a krónikus szívelégtelenség kialakulásával kapcsolatos molekuláris és celluláris jelenségek tisztázásában (Opie, 2004). A párhuzamosan fejlődő terápiás lehetőségek (pl. ACE-gátlók, β -adrenerg receptorblokkoló vegyületek) sokat javítottak a szívelégtelenségben szenvedő betegek életminőségén és a mortalitási adatokon. Ennek ellenére a kontraktilis funkció romlásának közvetlen ellensúlyozására ideális gyógyszerrel továbbra sem rendelkezünk. A krónikus szívelégtelenséget okozó eltérések vizsgálata ezért a jövőben is kiemelt feladat marad.

A krónikus szívelégtelenség kapcsán kialakuló kóros pumpafunkció és makroszkopikus szívatépülés hátterében kiterjedt celluláris és molekuláris változások („remodelling”-gel kapcsolatos folyamatok) húzódnak meg (Mittmann és mtsai., 1998). A jelenségek okainak és következményeinek megfelelő értelmezését nagymértékben hátráltatja, hogy a krónikus szívelégtelenség számos jelentősen különböző etiológiájú kórfolyamat végeredménye (de Tombe, 1998). Ennek következtében a kóreredet okozta elsődleges elváltozások és a hemodinamikai szívelégtelenség (mint „végző közös út”) során megjelenő eltérések igen változékony celluláris és molekuláris elemeket tartalmazhatnak. A napjainkban széles körben alkalmazott állatkísérletes megközelítésekre sajnos ugyanezek a megfontolások érvényesek. Az állatkísérletes adatok humán szívelégtelenségre való közvetlen vonatkoztatását a faji különbségek tovább nehezítik. A végrehajtott nagyszámú vizsgálat – mindezen nehézségek ellenére – napjainkra számos általános érvényűnek látszó celluláris és molekuláris mechanizmust tárt fel (Barinaga, 1998; Molkentin és mtsai., 1998; Mudd és Kass, 2008).

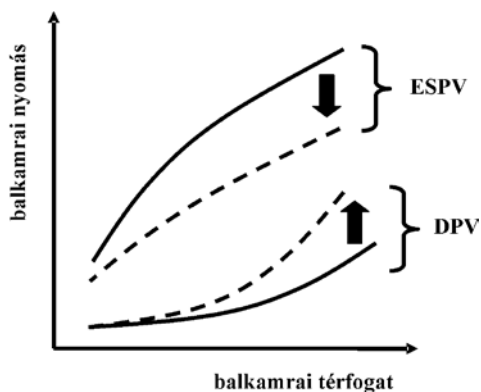
Igy például bizonyítottnak tekinthető, hogy az elégtelen pumpafunkciójú szívizomban előbb-utóbb csökkenni fog az $I_{to,1}$ K^+ -csatornák expressziója (Bers, 2001). Következőként az akciós potenciálok időtartama (elsősorban kisebb szívfrekvenciák fennállásakor) jelentősen fokozódhat. Az akciós potenciálok hosszának növekedése kedvez a szívizomsejtekbe történő Ca^{2+} -belépésnek és emiatt a Ca^{2+} -aktivált izomerőnek elvileg fokozódni kellene. Előrehaladott szívelégtelenségben azonban az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója csökken, a Ca^{2+} -tranziensek leszálló szára lassul, és csak a diasztolében mért $[Ca^{2+}]_i$ mutat szignifikáns emelkedést (Opie, 2004). Ezeket a változásokat sejtszintű Ca^{2+} -mozgásokat befolyásoló fehérjékhez (Na^+/Ca^{2+} -cserélő fehérje, rianodin-receptor), és különösen az intracelluláris Ca^{2+} -raktárba Ca^{2+} -ot juttató SERCA2 Ca^{2+} -pumpa csökkent működéséhez rendelik. A változásokat leggyakrabban a SERCA2 enzim fehérje szintjének csökkenésével, vagy funkciójának károsodásával, esetleg mindkettővel magyarázzák (Bers, 2001; Opie, 2004). Humán szívizomból származó preparátumokban pozitív korrelációt találtak a SERCA2 mRNS és fehérjemennyiség, valamint a különböző kardiovaszkuláris funkcionális paraméterek között. Feltételezik tehát, hogy a SERCA2 csökkent működése miatt növekszik diasztolében a $[Ca^{2+}]_i$, ami csökkent, részleges relaxációhoz, majd súlyos kontraktilitás-zavarhoz vezet (Schlotthauer és mtsai.,

1998). A krónikus szívelégtelenség során kialakuló miokardiális remodellingben tehát változik a sejtszintű Ca^{2+} -háztartás kulcsfontosságú fehérjéinek működése. Elsősorban ezek az aránytalanságok felelősek az intracelluláris Ca^{2+} -tranziens kóros lefutásáért, melyet a diasztolés Ca^{2+} -szint emelkedése és a szisztolés Ca^{2+} -csúcs csökkenése jellemez (Édes, 2000). A celluláris Ca^{2+} -homeosztázis megbomlott egyensúlya magyarázhatja a szívfrekvencia növekedésére elmaradó kontraktilis erőfokozódást és (legalábbis részben) a szívelégtelenségben közismerten fokozott ritmuszavar hajlamot is.

A miofibrilláris fehérjék szívelégtelenség során kialakuló változásai szintén régóta intenzív kutatás tárgyát képezik (Perez és mtsai., 1999). Ismert, hogy előrehaladott szívelégtelenségben a kontraktilis apparátus miozin ATP-áz aktivitása csökken. Kis állatokban (pl. patkányban) és a humán pitvarban csökken a V_1 ($\alpha\alpha$) és növekszik a V_3 ($\beta\beta$) MHC izoenzim expressziós szintje (Mercadier és mtsai., 1981). Következésképpen a kontraktilis filamentumok működése ugyan gazdaságosabbá válik, ennek azonban az az ára, hogy csökken a kontrakció maximális sebessége (V_{\max}) (de Tombe és ter Keurs, 1991). A kis emlősöknél leírt miozin izoenzim váltás („switch”) jelentősége a humán kamrai eredetű szívizomsejtekben vitatott (Nadal-Ginard és Mahdavi, 1989). A miokardium „gazdaságosabb üzemmódra” való beállása azonban a humán szívre is jellemző. Valószínűsítik, hogy ebben a változásban az embrionális troponin T izoforma és miozin könnyű lánc expresszió-változások kaphatnak szerepet (McAuliffe és mtsai., 1990). A hemodinamikai túlterheltség okozta szívelégtelenségben a cTnI bazális foszforilációjának csökkenéséről szintén rendelkezünk adatokkal (Bodor és mtsai., 1997). Továbbá, kamrai sejtekben vázizom típusú α -aktin megjelenéséről is beszámoltak (Opie, 2004). Nem eldöntött azonban, hogy a humán szívelégtelenség kialakulása során melyek a legfontosabb, funkcionális következmények is járó miofibrilláris fehérje-eltérések.

A krónikus szívelégtelenség területén folytatott korábbi vizsgálatok számos sejtszintű szignalizációs útvonal érintettségét igazolták (Heineke és Molkentin, 2006). A hipertrofiás transzformáció szempontjából kitüntetett jelentőségűnek tűnnek azok a kapcsolatok, melyek a szarkolemma angiotenzin II, endotelin és katekolaminok G-fehérje-kapcsolt receptorain keresztül az intracelluláris foszfolipáz C és PKC izoenzim aktiválásán át közvetítenek szignálokat (Edes és mtsai., 2008). Nem világos azonban, hogy az aktivált PKC rendszer milyen szerepet játszik a kontraktilis fehérjerendszer foszforilációjában, és az hogyan hat az elégtelen funkciójú miokardium kontraktilis mechanikájára. Az sem egyértelmű, hogy milyen hatással van a PKC rendszer aktivációja a PKA rendszer működésére.

A szisztolés szívelégtelenség, mely a kontrakciós erő, és az ejekciós frakció csökkenésével jár együtt, diagnosztikailag és koncepcionálisan is viszonylag jól körülhatárolható (Papp, 2007). Nem ilyen tiszta a kép a diasztolés szívelégtelenség vonatkozásában, mely definíció szerint a szívkamra relaxációs zavarát jelöli szisztolés funkcióvesztés nélkül (22. ábra). A sokszor átfedő klinikai tünetek ellenére a kétféle szívelégtelenség egymástól való elkülönítésének igénye nem új keletű. Bár a szisztolés és diasztolés szívelégtelenség különválaszthatóságát többen elvi alapon vitatják, valószínű, hogy a két szindróma demográfiai, epidemiológiai kapcsolatok és a kialakulási mechanizmus szempontjaiból is eltér egymástól. A szisztolés szívelégtelenségre rendszerint excentrikus



22. ábra. A szisztolés és diasztolés szívelégtelenség illusztrálása nyomás-térfogat diagram segítségével.

A bal kamra szisztolés funkciójának beszűkülése grafikusán a végszisztolés nyomás-térfogat összefüggés (ESPV) meredekségének csökkenésével, míg a diasztolés szívelégtelenség a diasztolés nyomás-térfogat (DPV) összefüggés meredekségének fokozásával ábrázolható (Papp, 2007 alapján).

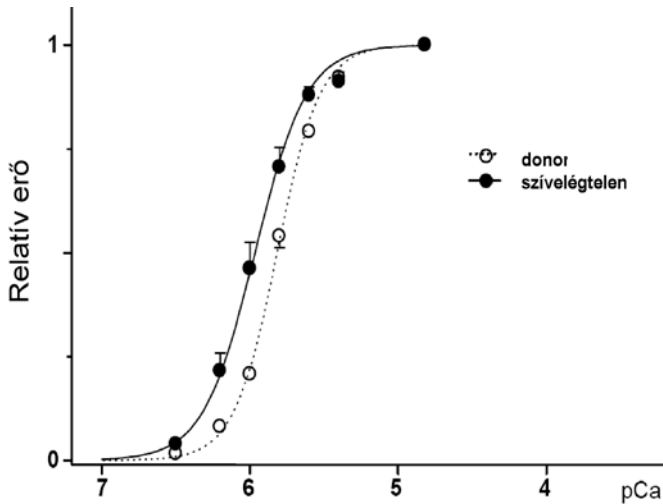
az ejekciós frakció csökkenésével áll összefüggésben (Katz és Zile, 2006).

Az, hogy a szív szisztolés, diasztolés, vagy esetleg kombinált funkciózavart szenved minden bizonnyal olyan egymást csak részben átfedő jelátviteli rendszerek aktiválódásának tudható be, melyek sejtproliferációra kifejtett hatásai lényegesen különböznek (Wilkins és mtsai., 2004). Ezek excentrikus hipertrófia esetén a szarkomerek számát hosszirányban fokozzák, míg koncentrikus hipertrófia során a szarkomerek felszaporodása elsősorban egymással parallel figyelhető meg (Russell és mtsai., 2000). A kamrafal átépülését eredményező szignalizációs folyamatok különbségei azért is figyelmet érdemelnek, mert a szisztolés szívelégtelenség prognózisát kedvezően befolyásoló gyógyszereink jótékony hatása diasztolés szívelégtelenség során nem magától értetődő.

Szisztolés szívelégtelenséggel együtt járó kontraktilis fehérjereeltérések

Terminális szisztolés szívelégtelenség (NYHA IV) miatt explantált szívekből és egészségesnek tekintett donor szívekből izolált szívmuszkuláris sejtek kontraktilis fehérje-összetételét, a kontraktilis fehérjék foszforilációs szintjeit és a szívmuszkuláris sejtek Ca^{2+} -függő erőgenerálását több tanulmányban összehasonlító jelleggel vizsgáltuk (Papp és mtsai., 2004; van der Velden és mtsai., 2002; van der Velden és mtsai., 2006; van der Velden és mtsai., 2003a; van der Velden és mtsai., 2003b; van der Velden és mtsai., 2003c). Figyelemre méltó, hogy a szívelégtelenség fennállása esetén a Ca^{2+} -függő erőgenerálás vonatkozásában valamennyi vizsgálatunkban egymással összecsengő adatokat kaptunk, melyeket most egyetlen konkrét vizsgálat eredményein keresztül szemléltetjük (Papp és mtsai., 2004) (23. ábra).

hipertrófia, progresszív balkamrai tágulat, és a bal kamra szisztolés paramétereinek kóros értékei jellemzőek. Ezzel szemben diasztolés szívelégtelenségben a kialakuló hipertrófia többnyire koncentrikus jellegű, a balkamrai térfogat megtartott vagy csökkent, és a kamrafunkciós paraméterek is elsősorban csak a diasztolé alatt térnek el a normálistól (Zile és mtsai., 2005). Felmerült, hogy a két szindrómához tartozó különbségek a szívmuszkuláris sejtek méretében, alakjában és molekuláris összetételében is tükröződnek. A diasztolés szívelégtelenség értelmezhetőségét nehezíti, hogy az csökkent ejekciós frakcióval rendelkező szisztolés szívelégtelenséggel rendelkező betegekben is kialakulhat. Ezekben a komplikált esetekben is úgy tűnik azonban, hogy a tünetek súlyossága inkább a diasztolés szívelégtelenséggel, mintsem



23. ábra. A kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenysége terminális szívelégtelenségben fokozódik.

Az izometriás erő Ca^{2+} -függése donor szívekből és terminális szívelégtelenségből származó humán permeabilizált szívizomsejteken. A folytonos és szaggatott vonalak a Hill-egyenlettel történt illesztések eredményeit mutatják. Az *in vitro* körülmények között végrehajtott proteinkináz A (PKA) kezelés a szívelégtelenségből származó szívizomsejtek fokozott Ca^{2+} -érzékenységét megszünteti (Papp és mtsai., 2004 alapján).

Azonos SL mellett a szívelégtelenségből származó és donor szívizomsejtek F_o értékei egymástól nem különböztek (38 ± 4 kN/m² és 36 ± 3 kN/m²). Továbbá, a diasztolés szívelégtelenségben nem szenvedő betegekből nyert szívizomsejtek passzív ereje sem különbözött az egészséges egyénekből származókéétól ($1,5 \pm 0,3$ kN/m² és $1,2 \pm 0,2$ kN/m²). Az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenysége azonban a szívelégtelen csoportban a 23. ábrán illusztrált módon szignifikánsan nagyobb volt ($\Delta p\text{Ca}_{50} \sim 0,15$) mint a nem-szívelégtelen szívizomsejtekben. Mindezek a megfigyelések arra engedtek következtetni,

hogy a humán szívelégtelenség kialakulása során a Ca^{2+} -regulált kontraktilis erő maximuma és a szívizomsejtek passzív tulajdonságai ugyan nem változnak, a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} -ra adott válaszaik mégis sztereotip átalakuláson mennek keresztül. Ezek saját mérési körülményeink között az izometriás erő Ca^{2+} -érzékenységének fokozódásában öltöttek alakot (Papp és mtsai., 2004).

További vizsgálataink rámutattak arra, hogy a szívelégtelenségből származó szívizomsejtek egyöntetűen alacsonyabb cTnI és MLC2 foszforilációs szintekkel rendelkeznek (van der Velden és mtsai., 2002; van der Velden és mtsai., 2003c). A cTnI és az MLC2 foszforilációs szintjei, valamint az MLC1 az izoforma-megoszlás szempontjaiból a humán miokardium minták heterogén sajátosságokkal rendelkeztek, és nem mutattak egyértelmű jellegzetességeket a MHC és cTnI izoformák expressziós szintjei sem (van der Velden és mtsai., 2003a; van der Velden és mtsai., 2003c). Az is figyelmet érdemlő volt, hogy a szívelégtelenségből származó szívizomsejtek fokozott Ca^{2+} -érzékenysége *in vitro* PKA foszforilációval normalizálható volt (van der Velden és mtsai., 2002; van der Velden és mtsai., 2003c). Eredményeink alapján, a krónikus szívelégtelenség során kialakuló miofibrilláris Ca^{2+} -érzékenység fokozódás ezért legnagyobb valószínűséggel a kontraktilis fehérjék csökkent β -adrenerg szignalizáció-függő foszforiláltságával állt összefüggésben és csekély valószínűséggel volt magyarázható a kontraktilis fehérjék eltérő izotípusainak megjelenésével.

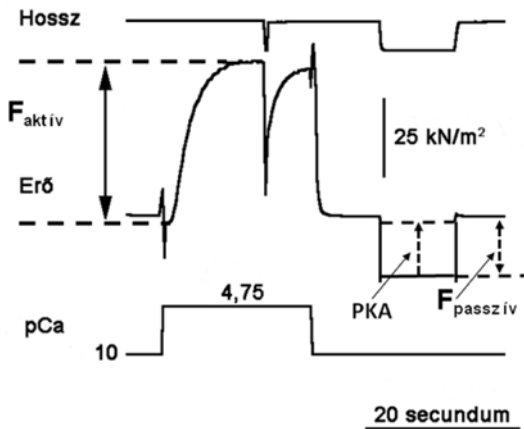
Diasztolés szívelégtelenséggel együtt járó kontraktilis fehérjeeltérések

A diasztolés diszfunkció kvantitatív jellemzésére a balkamrai diasztolés nyomáscsökkenés és balkamrai diasztolés telődés echocardiographiás paraméterei szolgálnak. A diasztolés nyomáslejtő abnormitása a $-dP/dt$ csúcsertékének csökkenésében, az izovolumetriás relaxációs idő és az ehhez tartozó időállandó (τ) megnyúlásában tükröződik. A kamratelődés diasztolés diszfunkció esetén lassú, és a pitvari komponens arányának fokozódása ellenére is csak részleges. Mindezek a kamrafal merevségét tükrözik, mely elviekben a kardiomiociták és az extracelluláris mátrix szerkezet/funkció-változásai következtében egyaránt létrejöhet. Az intracelluláris elemek között elsősorban a citoskeleton felépítésében szerepet kapó titint és a mikrotubuláris fehérjét övezi figyelem, míg az extracelluláris mátrixban a kollagén és az elasztin bír megkülönböztetett jelentőséggel. A molekuláris és sejtszintű változások a kamrafal merevségének fokozódásával csökkent, késleltetett relaxációt; lassú, részleges kamratelődést és végeredményben diasztolés szívelégtelenséget eredményeznek. A diasztolés szívelégtelenséget okozó strukturális és funkcionális eltérések a beteg keringési rendszer alkalmazkodóképességét az elő- vagy utóterhelés emelkedésekor, vagy hirtelen fellépő ritmuszavarok fellépésekor nagyban korlátozzák. A csökkent alkalmazkodóképesség elsősorban a bal kamra tágulékonyágának beszűkülésével áll összefüggésben, mely a Frank-Starling mechanizmus mobilizálásának lehetőségét korlátozza. A diasztolés diszfunkció ezért az artériás vérnyomás hirtelen emelkedését követően, pitvarfibrilláció kapcsán vagy akár egy só-dús étel elfogyasztását követően is akut tödődemába sodorhatja a viszonylag tünetmentes betegeket is.

A diasztolés szívelégtelenséghez kapcsolódó bizonytalanságok feloldását nagyban hátráltatja, hogy megfelelő állatmodellekkel nem rendelkezünk és, hogy a humán vizsgálati anyagokhoz való hozzáférés lehetősége is korlátozott. Utóbbi vonatkozásban kiemelkedőnek tűnnek azok a próbálkozások, melyek parányi szívizom biopsziák felhasználásával igyekeznek minél részletesebb képet alkotni a humán diasztolés diszfunkció patogenezisééről (Borbely és mtsai., 2005b). A biopsziás anyagok gondos feldolgozásával ugyanis korrelációs vizsgálatokat lehet végezni a klinikailag leírt kamrafunkciós paraméterek, a szívizomsejtek elemi mechanikai tulajdonságai és a szívizomszövetek fehérje összetétele között.

Endomiokardiális biopsziás anyagok gondos elemzése során ismertük fel, hogy a diasztolés szívelégtelenségben szenvedők szívizomsejtjeiben a $2,2 \mu\text{m}$ -es (vagyis az Frank-Starling mechanizmus optimális szarkomerhosszára) történő nyújtás során a kardiomiocitákon belül olyan passzív erőkomponens fejlődik ki, mely átlagban közel kétszer akkora is lehet, mint a kontrollnak minősített, diasztolés szívelégtelenséggel nem rendelkező személyek szívizomsejtjeiben. A passzív erőkomponens kalciummentes közegben mérhető, és az elsősorban a szív relaxált állapotában, a diasztolés telődés alatt bír jelentőséggel, hiszen a szívizomsejtek előfeszítettsége ilyenkor fokozódik (24. ábra).

A passzív erőkomponens növekedése azt eredményezi, hogy hasonló mértékű relaxáció eléréséhez kétszer akkora erő (vagy pitvar-kamrai nyomásgradiens) szükséges.



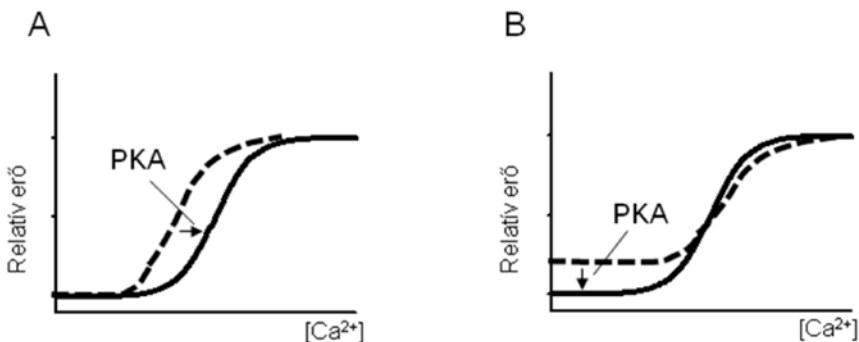
24. ábra. A diasztolés szívelégtelenségben szenvedő betegek szívizomsejtjei fokozott passzív erőt produkálnak.

A Ca^{2+} -mentes relaxáló oldatban mért passzív erő ($F_{\text{passzív}}$) a szívizomsejtek elasztikus tulajdonságait tükrözi. Az *in vitro* körülmények között végrehajtott proteinkináz A (PKA) kezelés jelentősen csökkenti a passzív erő mértékét.

tek belső tulajdonságaival függhetett össze. Tekintettel arra, hogy a szívizomsejteket a preparálás során detergens kezelésnek tettük ki, a szarkolemma és a szarkoplazmatikus retikulum kalcium raktár integritása megszűnt. Mindezek azt eredményezték, hogy preparátumok aktin-miozin függő aktív erőkifejtése csak a szívizomsejtekhez kívülről adott kalcium jelenlétében volt lehetséges. Ez a tény pedig kizárja annak lehetőségét, hogy a nyugalmi körülmények között tapasztalt fokozott erőkifejtés a szarkoplazmatikus retikulum kalcium raktár kulcsfehérjéinek (kalcium pumpa, foszfolamban, rianodin-

Érdekes, hogy a passzív erőkomponens növekedése nem figyelhető meg sem egészséges kardiomiocitákban, sem a tisztán szisztolés szívelégtelenséggel jellemezhető betegek szívizomsejtjeiben (van Heerebeek és mtsai., 2006) (25. ábra).

A diasztolés szívelégtelenségben szenvedő betegek *in vivo* regisztrált, a balkamrai diasztolés diszfunkciót jellemző haemodinamikai paraméterek jól korreláltak a biopsziás minták *in vitro* rögzített passzív erőkomponenseinek és kollagén tartalmának együttes összehasonlításai során. A passzív erőkomponens fokozódása azért is figyelmet érdemel, mert a preparátumok izolálása során a szívszövet kollagén tartalmát eltávolítottuk, és ezért a fokozott passzív erő egyedül a szívizomsej-

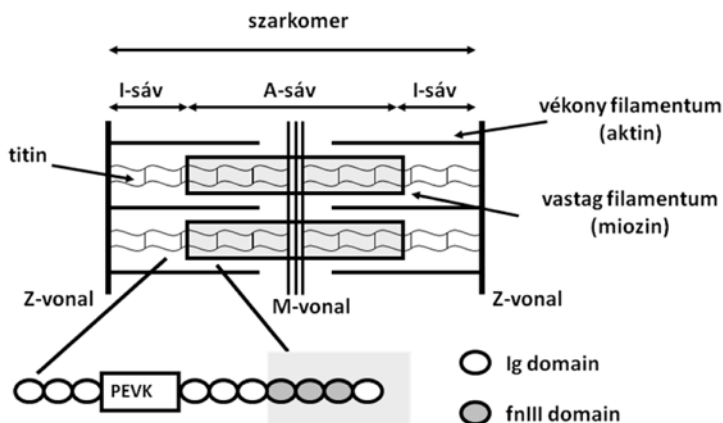


25. ábra. A kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységének szisztolés (A) és diasztolés (B) szívelégtelenségben tapasztalt eltérései vázlatos formában.

A kontrollokhoz (folytonos vonal) viszonyított kóros eltéréseket a szaggatott vonalakkal kiemelt görbék jelzik. Szisztolés szívelégtelenségben fokozott Ca^{2+} -érzékenység, diasztolés szívelégtelenségben fokozott passzív erő jelentkezik. Mindkét eltérés jelentős mértékben korrigálható *in vitro* körülmények között végrehajtott proteinkináz A (PKA) kezelésekkkel.

receptor kalcium szekrécións csatorna) módosult expressziójától/foszforilációjától, vagy a felszíni membrán nátrium/kalcium-cserélőjétől bármilyen mértékben is függhetett volna. A passzív erő fokozódását kizárólag a kardiomiociták miofibrilláris/citoszkeletális tulajdonságainak változása idézhette elő. A miofibrilláris fehérjék egészséges kontroll csoporttal történő összehasonlítása során, diasztolés szívelégtelenségre specifikusnak tekinthető izotípus eltérés a legtöbb szarkomert alkotó fehérje, mint a miozin nehéz láncok, aktin, cTnT, cTnI, dezmin, vagy tropomiozin szerkezetében nem ismerhető fel. Továbbá, nem tapasztaltunk a fehérjék, elsősorban a cTnI, bomlására utaló jeleket sem. Mindezek alapján valószínűtlen, hogy a szarkomer struktúráját alkotó fehérjék többségében izotípus eltérés vagy proteolitikus bomlás okozná a funkcionális eltéréseket. Érdekes megfigyelés volt viszont, hogy a passzív erőkomponens fokozódása a permeabilizált szívpreparátumok *in vitro* végzett PKA kezelésével normalizálható volt. Fontos hangsúlyozni, hogy PKA kezelést követően csak a diasztolés szívelégtelenségből származó minták passzív erőkomponense csökkent jelentős mértékben, az egészséges kontroll kardiomiociták passzív ereje nem változott. A PKA enzim a β -adrenerg szignalizációs kaszkád intracelluláris jeltovábbító enzime, mely foszforilálni képes a cTnI-t, a miozinkötő protein C-t, és a titint. A cTnI vonatkozásában foszforilációs szintbeli különbséget a kontroll és betegekből származó minták között nem találtunk. A figyelem ezért fokozatosan a titin fehérje foszforilációja felé terelődik (26. ábra).

A titinről – különösen annak kevésbé rugalmas N2B jelű izoformájáról – ismert, hogy foszforilációs helyeinek PKA-mediált foszforilációja csökkenti a szívizomzatban a passzív izomerőt. A titin foszforiláció összefüggése a passzív erőkomponenssel, és ennek a molekuláris kapcsolatnak a szerepe a diasztolés szívelégtelenségben az előző években további vizsgálatok sorában állt a középpontban (Borbely és mtsai., 2009a; Borbely és mtsai., 2009b; Hamdani és mtsai., 2010; Hamdani és mtsai., 2008; Hamdani és mtsai., 2009; van Heerebeek és mtsai., 2006; van Heerebeek és mtsai., 2008).



26. ábra. A titin fehérje szarkomeren belüli pozíciója és sematikus szerkezete.

Minden egyes titin fehérje áthidal egy fél szarkomert (a Z-vonalaktól az M-vonalig). A titin filamentumok szerkezetében immunoglobulin (Ig) és III-as típusú fibronektin III (fnIII) domainek és kevésbé struktúrált PEVK szekvenciák ismétlődnek. A titin a szarkomer I-sávhoz tartozó területén csak immunoglobulin domainek találhatók.

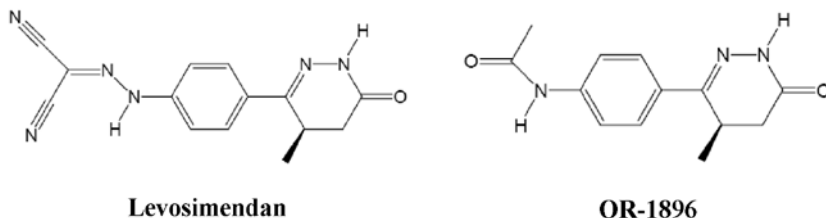
A szívizomzat kontraktilis fehérjerendszere, mint farmakológia célpont

A klinikai gyakorlatban a szívizom összehúzódások erejének fokozására alkalmazott ún. pozitív inotrop hatású vegyületek zöme a Ca^{2+} -koncentráció növelésén keresztül fejt ki hatását (Endoh, 1998). Ezek az izomerő támogatása mellett minden körülmények között fokozzák a miokardium energiaigényét, és aritmia-hajlamát is. Klinikai szempontból ezért az lenne kívánatos, hogy a szívizom kontraktilitása a szív Ca^{2+} -homeosztázisának megváltozása nélkül valósuljon meg. Azt kellene tehát elérni, hogy a kontraktilis rendszerből adott Ca^{2+} -koncentráció mellett nyerjünk ki több erőt, vagyis fokozzuk a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} -ra adott válaszát, és így növeljük az izomműködés hatékonyságát. A fenti elvek közös jelölésére alkották a Ca^{2+} -érzékenyítés fogalmát. (Endoh, 2001). Az elmúlt évtizedekben folytatott gyógyszerfejlesztések számos olyan vegyületet eredményeztek, melyek a kontraktilis fehérjerendszer különböző pontjaira hatva Ca^{2+} -érzékenyítő hatást fejtenek ki. Ezek közül azonban csak a levosimendan bizonyult klinikailag is alkalmazhatónak (Follath és mtsai., 2002; Moiseyev és mtsai., 2002). A levosimendan birtokában, napjainkban a miofibrilláris Ca^{2+} -érzékenység megőrzése, a kórosan csökkent Ca^{2+} -érzékenység visszaállítása, sőt esetenként a fiziológiást is meghaladó Ca^{2+} -érzékenység elérése új terápiás szempontokként merülnek fel. Az egyre biztatóbb klinikai eredmények a preklinikai jellegű vizsgálatok a levosimendan hatásmechanizmusának finomabb részleteire, a gyógyszeres interakciókra és a különböző kórállapotokban történő alkalmazás lehetőségeire koncentrálnak annak érdekében, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítő kezelés optimális feltételeit kialakíthassuk.

A levosimendan kardiovaszkuláris hatásainak farmakológiai és kórtani háttere

A levosimendan ((-) [4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil]hidrazono)propanedinitril) szerkezetének fejlesztése szisztematikus kutatások eredményeként jött létre. A cél az volt, hogy olyan kémiai struktúrát alakítsanak ki, amelyik szelektíven és Ca^{2+} -függő módon kapcsolódik a miokardiális Ca^{2+} -receptorhoz, a humán cTnC-hez (Haikala és mtsai., 1995a; Pollesello és mtsai., 1994; Sorsa és mtsai., 2001). Az előállított levosimendan kötődése a cTnC N-terminálisa közelében történik, ahol a Ca^{2+} által indukált konformációban egy hidrofób jellegű zseb alakul ki. Ebbe rögzül a levosimendan dihidropiridazinon gyűrűje, míg a vegyület dinitril vége poláros jellegű aminosavakhoz kapcsolódik. Feltételezik, hogy a vegyület kötődése a cTnC-hez mintegy stabilizálja a cTnC Ca^{2+} által indukált konformációját, ami növeli a vékony és vastag kontraktilis filamentumok közötti interakciók hatékonyságát. Ugyanakkor a levosimendan nem befolyásolja a cTnC Ca^{2+} kötését. A levosimendan cTnC-hez történő kötődése Ca^{2+} -függő, így a Ca^{2+} -érzékenyítő hatás várhatóan a szisztolé alatt maximális, a diasztolé alatt pedig elenyésző. Ez a jelleg magyarázhatja azt a megfigyelést, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítés ellenére a levosimendan nem rendelkezik negatív luzitrop hatással (Haikala és mtsai., 1995b). A levosimendan szervezeten belüli metabolizmusa bonyo-

lult, az elimináció előtt több köztes terméket eredményez. Az OR-1896 jelű ((-) N- [4-(1,4,5,6- tetrahidro- 4- metil- 6- oxo- 3- piridazinil) fenil] acetamid) hosszú féléletidejű termék azért érdekes, mert Ca^{2+} -érzékenyítő aktivitással is rendelkezik, ezért egyszeri levosimendan alkalmazást követően akár napokkal később is hozzájárulhat a pozitív inotropiához (27. ábra).



27. ábra. A levosimendan és aktív metabolitja (OR-1896).

A levosimendan (mely a ([4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil]hidrazono)propanedinitril (- enantiomere) és az OR-1896 (mely a N-[4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil] acetamid (- enantiomere) kémiai szerkezetei.

A levosimendan különböző kísérletes rendszerekben PDE-gátló és ezért β -mimetikus sajátságokat is mutatott (Ajiro és mtsai., 2002; Boknik és mtsai., 1997). A levosimendan farmakológiai jellegzetességeit tovább bonyolítja, hogy a szer a miokardiális hatások mellett erőteljes vazodilatátor tulajdonsággal rendelkezik, melynek a hatásmechanizmusában feltehetően ATP-függő K^+ csatornák megnyílása is szerepet kap (Kaheinen és mtsai., 2001; Pataricza és mtsai., 2000; Yokoshiki és mtsai., 1997).

A csökkent vérellátású miokardiumban felszaporodó anorganoikus foszfát és acidózis egyaránt csökkentik a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységét. A β -adrenerg stimulációra aktiválódó PKA erőlyesen foszforilálja a cTnI-t, ami ugyancsak a Ca^{2+} -érzékenység csökkenéséhez vezet. A szívelégtelenséggel kapcsolatos fehérjeexpressziós változások, az alkalmazott β -blokkoló terápia és az iszkémiát követő reperfüzió során bekövetkező fehérjekárosodások szintén érinthetik ezt a paramétert. Mindezek tükrében a miofibrillaris erő aktuális Ca^{2+} -érzékenysége számos, különböző előjelű és többszörös interakciókkal rendelkező hatások eredőjeként alakul ki. A kapcsolatrendszer pontosabb megismerése egyrészt hozzájárulhat a kontraktilis rendszer működésének molekuláris szintű feltárásához, másrészt segíthet abban, hogy a farmakológiai úton elérhető Ca^{2+} -érzékenyítés várható hasznát különböző kórállapotokban pontosabban becsülhessük. Kísérletes munkánk során ebben a kérdéskörben igyekeztünk ismereteinket bővíteni.

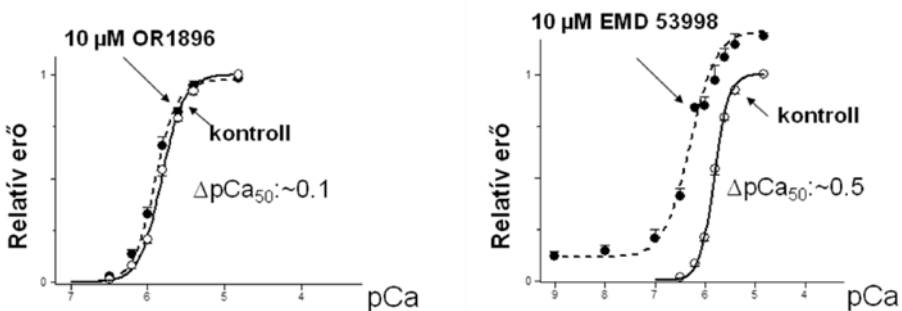
Vizsgálataink tervezésénél alapvető kutatási célként jelöltük meg a levosimendan miokardiális hatásait magyarázó molekuláris tényezők azonosítását. Méréseink további részében arra igyekeztünk választ találni, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan és annak aktív metabolitja az OR-1896 milyen hatásokkal rendelkezik olyan modellkörülmények között, melyek önmagukban is módosítják a miofibrillaris rendszer Ca^{2+} -érzékenységét.

A levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatását különböző kísérletes körülmények között tanulmányoztuk. A szervezeten belüli viszonyokat legjobban utánzó kísérletes elren-

dezeként altatott kis állatokat (tengerimalacokat) használtunk. A szív működés globális paramétereit és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásait a szervezetből izolált és mesterségesen életben tartott un. Langendorff-preparátumokon tanulmányoztuk. A miofibrilláris erőgenerálás közvetlen mérése érdekében membránrendszeriktől megfosztott szívizomsejt preparátumokat alkalmaztunk. Élettani jellegű méréseinket a kontraktilis fehérjerendszer expressziós és foszforilációs változásainak értékelése érdekében biokémiai és izotóptechnikai mérésekkel egészítettük ki. A különböző szívizom preparátumokat tengerimalacokból és műtéttechnikai okok miatt eltávolított humán kamrai anyagokból nyertük.

A levosimendan miokardiális hatásainak mechanizmusa

Tengerimalacok miofibrilláris preparátumain a levosimendan dóziszfüggő módon növelte a Ca^{2+} által létrehozott izomfeszülést (a kalcium – erő összefüggést kis mértékben balra tolta), viszont a Ca^{2+} -által kiváltott maximális választ a levosimendan nem befolyásolta. A levosimendan pozitív inotrop potenciálját össze kívántuk hasonlítani az aktív metabolit (OR-1896) és olyan ismert pozitív inotrop potenciállal rendelkező molekulákkal (pl. az EMD 53998 jelűvel), melyek különböző preparátumokon Ca^{2+} -érzékenyítő tulajdonságokat is mutattak (Uhlmann és mtsai., 1995). Mérési eredményeink szerint a levosimendan és annak aktív metabolitja (OR-1896) közel azonos mértékű, de az EMD 53998-hez viszonyítva kisebb Ca^{2+} -érzékenyítő hatással rendelkeznek. Az EMD-53998-cal szemben azonban sem a levosimendan, sem az OR-1896 nem fokozta a szívizomsejtek passzív erejét (28. ábra). EMD 53998 jelenlétében a szívizomsejtek gyakorlatilag Ca^{2+} -mentes körülmények között sem tudtak teljes mértékben elernyedni. Ez a hatás magyarázhatja a vegyület korábban *in vivo* körülmények között tapasztalt káros hatását a miokardium diasztolés funkciójára, és indokolhatja azt is, hogy az EMD 53998 klinikai alkalmazására miért nem kerülhetett sor.



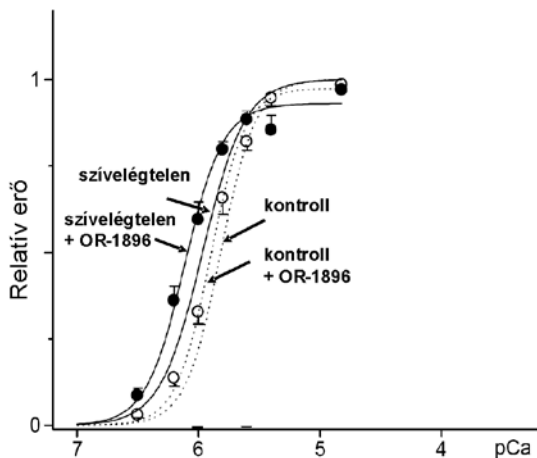
28. ábra. Az OR-1896 (levosimendan metabolit) és az EMD 53998 Ca^{2+} -érzékenyítő hatásainak összehasonlítása.

A szupramaximális koncentrációban (10 μM) alkalmazott OR-1896 és EMD 53998 a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységét jellemző görbét egyaránt balra tolta, az OR-1896 Ca^{2+} -érzékenyítő hatása az EMD 53998-éhoz viszonyítva azonban kisebb volt. 10 μM EMD 53998 meggátolta a szívizomsejtek teljes relaxációját, mivel jelenlétében viszonylag jelentős izomerő igen alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenlétében is mérhető volt. Hasonló hatás levosimendan vagy OR-1896 jelenlétében nem volt megfigyelhető (Papp és mtsai., 2004 alapján).

A levosimendan és az aktív metabolit, OR-1896 hatásmechanizmusainak pontosabb feltérképezése érdekében a vegyületek Ca^{2+} -érzékenyítő (membrán permeabilizált szív-izomsejteken), PDE-gátló (tisztított PDE III és PDE IV izoformákat tartalmazó enzimpreparátumokon) és pozitív inotrop (Langendorff-szerint perfundált tengerimalac szíveken) koncentráció-tartományait is összehasonlítottuk. Kísérleti eredményeink arra utaltak, hogy a levosimendan (és kisebb mértékben az OR-1896) Ca^{2+} -érzékenyítő, PDE III-gátló és pozitív inotrop hatást kiváltó koncentrációtartományai egymást átfedik. A PDE IV izoformát azonban sem a levosimendan, sem az OR-1896 nem gátolta a terápiás koncentráció-tartományban. Eredményeink alapján a levosimendan és OR-1896 pozitív inotrop hatásai Ca^{2+} -érzékenyítő mechanizmussal és igen szelektív PDE III-gátló képességükkel hozhatók összefüggésbe (Kaheinen és mtsai., 2001; Kristof és mtsai., 1998; Szilagi és mtsai., 2005; Szilagi és mtsai., 2004).

A miokardium posztisztkémiás funkciózavara során kialakuló reverzibilis kontraktilis diszfunkció (miokardiális kábulat vagy stunning) Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendannal történő befolyásolását Langendorff-szerint perfundált tengerimalac szíveken tanulmányoztuk. A posztisztkémiás miokardium preparátumok levosimendannal kiváltott kontraktilitás fokozódása a kontrollhoz viszonyítva azonos relatív értékeket ért el. Továbbá, a levosimendan kiváltott pozitív inotrop és luzitrop hatás dóziszfüggésében sem volt eltérés a kontroll és a posztisztkémiás állapotok között. Eredményeink szerint a posztisztkémiás miokardium levosimendan-érzékenysége megtartott (Kristof és mtsai., 1999).

A Ca^{2+} -érzékenyítőkkal szerzett preklinikai eredmények döntő többsége állatkísérletekből származik. Az eredmények humán miokardiumra történő extrapolációját ezért a species-különbségekből fakadó eltérések egyértelműen nehezítik. A humán miokardium a krónikus szívelégtelenség kialakulása során molekuláris átépülésen („remodelling”) megy keresztül. A remodelling folyamata a miofibrilláris elemeket is érinti, ezért a miofibrilláris támadásponttal rendelkező Ca^{2+} -érzékenyítők kontraktilis hatásainak tanulmányozásakor indokolt humán miokardium mintákat is használni. A miofibrilláris struktúra által generált erőt – implantációra nem került donor szívekből előállított – szívizomsejteken és NYHA IV stádiumú szívelégtelenség miatt explantált szívekből nyert szívizomsejteken mértük. A donor szívekből nyert szívizomsejteken és a szívelégtelenségből nyert szívizomsejteken kontroll (drog-mentes) körülmények között meghatározott maximális Ca^{2+} -aktivált erő egymástól szignifikánsan nem különbözött. A szubmaximális Ca^{2+} -koncentrációnál mért erőértékek azonban arra utaltak, hogy szívelégtelenségben a donor szívekhez képest szignifikánsan fokozódott a miofibrilláris rendszer Ca^{2+} -érzékenysége. A humán szívizomsejtek Ca^{2+} -érzékenyítőkre adott válaszait az OR-1896 segítségével vizsgáltuk. Az OR-1896 által keltett Ca^{2+} -érzékenyítés relatív mértéke, mind donor szívizomsejteken, mind szívelégtelenségből származó szívizomsejteken összevethető volt azzal, amit állatkísérletes körülmények között korábban tapasztaltunk (Szilagi és mtsai., 2004). A szívelégtelenségben, drog-mentes körülmények között tapasztalt fokozott Ca^{2+} -érzékenység a vegyület Ca^{2+} -érzékenyítő hatását nem függesztette fel (29. ábra). Eredményeink ezért alátámasztják azt a feltételezést, hogy a levosimendan aktív metabolitjaként ismert OR-1896 hozzájárul az egyszerű levosimendan



29. ábra. Az OR-1896 (levosimendan metabolit) kontroll és szívelgtelen betegek szívizomsejtjein egyaránt hatásos volt.

A 10 μM koncentrációban alkalmazott OR-1896 a kontraktilis erő Ca^{2+} -érzékenységét jellemző görbét hasonló mértékben tolta balra egészséges egyénekből és szívelgtelenségben szenvedő betegekből származó szívizomsejteken (Papp és mtsai., 2004 alapján).

koncentrációban alkalmazott levosimendan a $+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ és a $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ értékeit szintén növelte. A levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatását permeabilizált kardiomiociták szubmaximális Ca^{2+} -koncentráción mért izometriás erő fokozódása jellemezte. A β -mimetikus izoproterenollal végzett stimulációt követően azonban, mely fokozta a cTnI foszforilációját, levosimendan jelenlétében nem alakult ki a kontraktilitás fokozódása. Továbbá, a levosimendan izolált miocitákon sem növelte az izometriás erőt, ha annak alkalmazása előtt a szívizomsejteket a PKA katalitikus alegysége jelenlétében inkubáltuk. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a levosimendan vékony filamentumon keresztül megvalósuló Ca^{2+} -érzékenyítő hatását a kontraktilis filamentumok foszforilációja modulálja. Ez az interakció befolyásolhatja a szer terápiás hatásait is (Bodi és mtsai., 2003).

A levosimendan klinikai bevezetése óta jelentős számú preklinikai és klinikai tanulmány elemezte a gyógyszer használhatóságát. A vizsgálatok alapján egy összetett hatásmechanizmusú vegyület képe körvonalazódik. A klinkailag észlelt hemodinamikai hatások feltételezhetően nem egyszerűsíthetők le egyetlen gyógyszer molekula egyetlen biológiai receptorra kifejtett hatásával (Papp és mtsai., 2005). Saját vizsgálataink alátámasztják, hogy levosimendan, és annak szerkezeten belül kialakuló metabolitja (OR-1896), a vékony filamentum cTnC molekuláin kívül feltételezhetően aktiválja a vaszkuláris simaizmok ATP-szenzitív K^+ -csatornáit is, és ezáltal vazodilatációt vált ki (Erdei és mtsai., 2006). Legújabbban azonban az is felmerült, hogy a mitokondriális ATP-szenzitív K^+ -csatornák aktiválása révén a vegyület kardioprotektív hatásokat is kifejthet (Nieminen és mtsai., 2009; Papp és mtsai., 2012; Pollesello és Papp, 2007).

alkalmazást követő több napig tartó kedvező hemodinamikai változásokhoz. Anorganikus foszfát jelenlétében és alacsony pH-n végzett méréseink eltérő hatásokat igazoltak, ilyenkor az OR-1896 jelenlétében értékelhető Ca^{2+} -érzékenyítést ugyanis nem tudtunk kimutatni (Papp és mtsai., 2004).

A Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan izolált és β -adrenerg stimulációval kombinált kontraktilis hatásait tengerimalacokból származó szívpreparátumokon tanulmányoztuk. Narkotizált állatokon végzett echocardiographia során a levosimendan maximális dózisa a bal kamrai hátsó izomfal mozgási sebességét szisztolék alatt és a diasztolék alatt egyaránt fokozta. A Langendorff-szerint perfundált szíveken telítő

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban a DEOEC Kardiológiai Intézet igazgatójának, Dr. Édes István professzor úrnak, és előző munkahelyemen: a DEOEC Élettani Intézetében a korábbi igazgatónak, Dr. Kovács László akadémikus úrnak tartozom köszönettel. Mindkettőjüktől felbecsülhetetlen értékű szakmai és emberi támogatást kaptam. Nekik köszönhető, hogy mindkét munkahelyemen a tudomány iránt elkötelezett, ugyanakkor egymásra odafigyelő, baráti közösségekben tevékenykedhettem, mely ösztönzött és alkotói légkört teremtett.

Köszönettel tartozom kiváló munkatársaimnak, s egyben nagyszerű barátaimnak segítő munkájukért, építő kritikáikért, hasznos tanácsaikért. Örömmel dolgoztam együtt tehetséges és lelkes fiatal kollégákkal, doktorandusz hallgatókkal és diákkörösökkel is, akiknek együttműködését szintén köszönöm. A kiadványban bemutatott munka nem jöhetett volna létre alkotó közreműködésük nélkül. A közösen végzett munka egyaránt szolgálta saját és hallgatóim tudományos pályafutását, melyet tudományos diákköri pályamunkák és PhD disszertációk is dokumentálnak. Laboratóriumi asszisztenseink fáradhatatlan, lelkiismeretes munkája ezúton is köszönetet érdemel. Hálával tartozom Dr. Kékesi Violetának a kiadvány lektorálásért, és hasznos tanácsaiért.

Köszönöm Ger J. M. Stienen professzornak, és Dr. Jolanda van der Veldennek az immár két évtizede tartó partneri kapcsolatot.

Végül hálával és köszönettel tartozom családomnak azért a szerető légkörért, mellyel körülvesznek. Türelmük és bátorításuk meghatározó szerepet játszott e munka elkészültében.

Összefoglalás

Munkacsoportunk celluláris fiziológiai és biokémiai módszerek kombinációját alkalmazza szívpreparátumok vizsgálatára. Elsődleges céljaink között a szívizomzat összehúzódásáért felelős azon molekuláris folyamatok feltárása szerepel, melyek kóros körülmények között a szív pumpafunkciójának csökkenéséhez vezetnek. Céljaink elérése érdekében membránpermeabilizált izolált szívizomsejteken rutinszerűen végzünk közvetlen erőméréseket. Ez a módszer a Ca^{2+} -függő aktív erő és a Ca^{2+} -független passzív erőkomponens kvantitatív értékelését és az aktin-miozin interakció kinetikai elemzését is lehetővé teszi. Párhuzamosan végrehajtott biokémiai/molekuláris biológiai vizsgálatok segítségével összefüggéseket keresünk a kontraktilis fehérjerendszer összetétele és a szívizomsejtek mechanikai viselkedése között. A miofilamentális fehérjékről a fenti stratégia révén nyert információk hozzájárultak: 1. az élettani körülmények között, 2. a miokardiális iszkémia/reperfúzió során, 3. a krónikus szívelégtelenség, és különös tekintettel diasztolés szívelégtelenség alatt, és 4. a Ca^{2+} -érzékenyítő pozitív inotrop szerek kapcsán nyerhető ismeretek bővítéséhez.

Eredményeink arra utalnak, hogy a Frank-Starling mechanizmus aktiválódása során a kereszt kötési kinetika nem változik. Ezzel összhangban a miokardiális erő hosszfüggő fokozódása a legjobban olyan modellek segítségével magyarázható, melyek a szarkomerek hosszának növekedéséhez az aktin-miozin kereszt kötések számának emelkedését rendelik.

A szívizom iszkémiás/reperfúziós anyagcserezavarához kapcsolódó vizsgálataink a Ca^{2+} -aktivált intracelluláris proteáz μ -calpain, mint a szívizom proteolízis potenciális mediátorát illusztrálták. Rágcsálókból származó és humán eredetű szívizom preparátumokon végzett vizsgálati eredményeink számos regulatorikus fehérje (pl. troponin I és troponin T), és strukturális funkcióval rendelkező fehérje (pl. titin, fodrin, dezmin, és alfa-aktinin) károsodásának esélyét vetették fel, jóllehet a fehérjebomlás mértéke az egyes fehérjék vonatkozásában nem volt azonos. A posztisztkémiás miokardium funkcióvesztése kapcsolódhat ezen fehérjék részleges bomlásához. Mérési adataink új információkkal szolgáltak az iszkémiás viszonyok között akkumulálódó metabolitok (H^+ , anorganikus foszfát, és MgADP), és a nitro-oxidatív ágensek által humán szívizomsejteken indukált stressz mechanikai következményeiről is. Ezek a vizsgálatok az iszkémiás kontraktúra létrejöttében és a posztisztkémiás szívizom gyengülésében az iszkémiás metabolitok és fehérjeoxidatív eltérések jelentőségét mutatták. Összességében, mérési eredményeink betekintést engedtek a miokardiális iszkémiával és reperfúzióval kapcsolatos kontraktilis diszfunkciót eredményező összetett kórfolyamatokba.

A munkacsoportunk által vizsgált további terület a krónikus szívelégtelenség kialakulásához kapcsolódott. Számos európai laboratóriummal közösen végzett kollaboratív vizsgálatunk több olyan posztisztkémiás fehérjeeltérésre hívta fel a figyelmet, melyek a szívelégtelenség progressziója szempontjából funkcionális jelentőségű lehet. Ezek között fontosnak látszanak a kontraktilis fehérjék foszforilációs állapotában bekövetkező azon változások, melyek a szisztolés szívelégtelenségben a szívizomsejtek jól

definiálható mechanikai funkcióeltéréssel (pl. fokozott Ca^{2+} -érzékenységgel) járnak. Munkacsoportunk a témakörhöz kapcsolódó egyik legjelentősebb észrevétele a szív-izomsejtek passzív erejének fokozódása volt, mely szereppel bírhat a diasztolés szív-elégtelenség patogenezisében.

Különböző állati és human eredetű szívpreparátumok felhasználásával pozitív inotrop hatású vegyületek hatásmechanizmusait is tanulmányoztuk. Kísérletes tevékenységünk ezért nem csak a szívbetegségekhez köthető kóreredetre, hanem a gyógyszeres beavatkozás újszerű lehetőségeire is kiterjedt.

MYOCARDIAL SARCOMERDYNAMICS UNDER PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Zoltán Papp

Division of Clinical Physiology, Institute of Cardiology,
Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen

Our research team combines cellular physiological and biochemical methods in cardiac muscle preparations. The primary aims are to elucidate the molecular background of myocardial force production and to pinpoint cardiac protein alterations leading to impaired cardiac pump function. To these ends, we routinely perform direct force measurements in single isolated demembrated cardiomyocyte preparations. This method allows the quantitative characterization of Ca^{2+} -activated active force production, the Ca^{2+} -independent passive force component and the kinetic characteristics of the actin-myosin interaction. Parallel biochemical/molecular biological assays assist the recognition of relationships between cardiomyocyte mechanical function and the composition of the contractile protein machinery. Using the above strategy we perform investigations on myofilament protein functions: 1/ under physiologic conditions, 2/ during myocardial ischemia/reperfusion, 3/ in association with chronic heart failure with specific emphasis on diastolic heart failure, and 4/ in the presence of Ca^{2+} -sensitizer positive inotropic drugs.

Our results suggest that cross-bridge turnover rates are not modulated during the operation of the Frank-Starling mechanism. Consequently, the length dependent augmentation of myocardial force production is best explained by models that relate an increased number of actin-myosin cross-bridges to increased sarcomere lengths.

In relation to ischemic/reperfusion injury our results illustrated μ -calpain – a Ca^{2+} -activated intracellular protease – as a potential mediator of proteolysis during myocardial reperfusion injury. Our studies in rodent and human myocardial preparations demonstrated that regulatory (e. g. troponin I and troponin T) and structural (titin, fodrin, desmin and alpha-actinin) elements of the contractile protein machinery have comparable, although different susceptibilities for the proteolytic damage, and implicated that mechanical alterations of the postischemic myocardium can be associated with proteolytic changes of the contractile protein system. In addition, our previous research activities provided new information on the mechanical consequence of accumulating intracellular metabolites during ischemia (e. g. H^+ , inorganic phosphate and MgADP), and on the mechanism of nitro-oxidative agents-evoked cardiac depressions in human ventricular cardiomyocytes. These findings underscored the significance of ischemic metabolites and contractile protein oxidation during the development of postischemic contractile failure and in ischemic myocardial contracture. Taken together, the above

results provided insights into the complex molecular mechanisms contributing to the contractile failure during myocardial ischemia and reperfusion.

Another field of research of our team is related to the remodelling process during the development of chronic heart failure. In collaboration with a set of different European laboratories we have described several post-synthetic protein modifications and their impacts on the mechanical function in the failing heart. Of note, these studies revealed significant alterations in the phosphorylation level of the contractile protein machinery in association with well-defined contractile changes (i. e. increased Ca^{2+} -sensitivity of force production) in systolic heart failure. In addition, one of the most significant contributions of our team in this field was the recognition of the significance of an increased passive force component (leading to increased cardiomyocyte passive stiffness) in the pathogenesis of diastolic heart failure.

Cardiac preparations of animal and human hearts were also employed to analyze the mechanisms of action of different cardiotoxic agents. Hence, our research activity did not only contribute to the elucidation of the pathogenesis of various cardiac diseases but also served the establishment of novel pharmacological interventions to treat mechanical dysfunctions of the heart.

Irodalom

- [1] Adhikari, B. B., M. Regnier, A. J. Rivera, K. L. Kreutziger, and D. A. Martyn. 2004. Cardiac length dependence of force and force redevelopment kinetics with altered cross-bridge cycling. *Biophys. J.* 87:1784-1794.
- [2] Ajiro, Y., N. Hagiwara, Y. Katsube, N. Sperelakis, and H. Kasanuki. 2002. Levosimendan increases L-type Ca^{2+} current via phosphodiesterase-3 inhibition in human cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 435:27-33.
- [3] Allen, D. G., and J. C. Kentish. 1985. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. *J. Mol. Cell Cardiol.* 17:821-840.
- [4] Allen, D. G., P. G. Morris, C. H. Orchard, and J. S. Pirollo. 1985. A nuclear magnetic resonance study of metabolism in the ferret heart during hypoxia and inhibition of glycolysis. *J. Physiol.* 361:185-204.
- [5] Allen, D. G., and C. H. Orchard. 1987. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ. Res.* 60:153-168.
- [6] Allshire, A., H. M. Piper, K. S. Cuthbertson, and P. H. Cobbold. 1987. Cytosolic free Ca^{2+} in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem. J.* 244:381-385.
- [7] Barinaga, M. 1998. Signaling path may lead to better heart-failure therapies. *Science* 280:383.
- [8] Barta, J., A. Toth, I. Edes, M. Vaszily, J. G. Papp, A. Varro, and Z. Papp. 2005. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol. Cell Biochem.* 278:1-8.
- [9] Bers, D. M. 2001. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands,
- [10] Bodi, A., S. Szilagy, I. Edes, and Z. Papp. 2003. The cardiotoxic effects of levosimendan in guinea pig hearts are modulated by beta-adrenergic stimulation. *Gen. Physiol. Biophys.* 22:313-327.
- [11] Bodor, G. S., A. E. Oakeley, P. D. Allen, D. L. Crimmins, J. H. Ladenson, and P. A. Anderson. 1997. Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96:1495-1500.
- [12] Boknik, P., J. Neumann, G. Kaspereit, W. Schmitz, H. Scholz, U. Vahlensieck, and N. Zimmermann. 1997. Mechanisms of the contractile effects of levosimendan in the mammalian heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280:277-283.
- [13] Bolli, R., and E. Marban. 1999. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* 79:609-634.
- [14] Borbely, A., I. Falcao-Pires, L. van Heerebeek, N. Hamdani, I. Edes, C. Gavina, A. F. Leite-Moreira, J. G. Bronzwaer, Z. Papp, J. van der Velden, G. J. Stienen, and W. J. Paulus. 2009a. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res* 104:780-786.
- [15] Borbely, A., A. Toth, I. Edes, L. Virag, J. G. Papp, A. Varro, W. J. Paulus, d. V. van, G. J. Stienen, and Z. Papp. 2005a. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc. Res.* 67:225-233.
- [16] Borbely, A., d. V. van, Z. Papp, J. G. Bronzwaer, I. Edes, G. J. Stienen, and W. J. Paulus. 2005b. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111:774-781.
- [17] Borbely, A., L. van Heerebeek, and W. J. Paulus. 2009b. Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circ Res* 104:12-14.
- [18] Bremel, R. D., and A. Weber. 1972. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nat. New Biol.* 238:97-101.
- [19] Brenner, B. 1988. Effect of Ca^{2+} on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:3265-3269.
- [20] Campbell, K. 1997. Rate constant of muscle force redevelopment reflects cooperative activation as well as cross-bridge kinetics. *Biophys. J.* 72:254-262.

- [21] Canton, M., S. Menazza, F. L. Sheeran, P. Polverino de Laureto, F. Di Lisa, and S. Pepe. 2011. Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57:300-309.
- [22] Canton, M., I. Neverova, R. Menabo, J. Van Eyk, and F. Di Lisa. 2004. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286:H870-H877.
- [23] Canton, M., A. Skyschally, R. Menabo, K. Boengler, P. Gres, R. Schulz, M. Haude, R. Erbel, F. Di Lisa, and G. Heusch. 2006. Oxidative modification of tropomyosin and myocardial dysfunction following coronary microembolization. *Eur. Heart J.* 27:875-881.
- [24] Cazorla, O., A. Freiburg, M. Helmes, T. Centner, M. McNabb, Y. Wu, K. Trombitas, S. Labeit, and H. Granzier. 2000. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ. Res.* 86:59-67.
- [25] Ceconi, C., P. Bernocchi, A. Boraso, A. Cargnoni, P. Pepi, S. Curello, and R. Ferrari. 2000. New insights on myocardial pyridine nucleotides and thiol redox state in ischemia and reperfusion damage. *Cardiovasc. Res.* 47:586-594.
- [26] Croall, D. E., and G. N. DeMartino. 1991. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 71:813-847.
- [27] De Matteis, M. A., and J. S. Morrow. 2000. Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 13):2331-2343.
- [28] de Tombe, P. P. 1998. Altered contractile function in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 37:367-380.
- [29] de Tombe, P. P., and H. E. ter Keurs. 1991. Lack of effect of isoproterenol on unloaded velocity of sarcomere shortening in rat cardiac trabeculae. *Circ. Res.* 68:382-391.
- [30] Di Lisa, F., R. De Tullio, F. Salamino, R. Barbato, E. Melloni, N. Siliprandi, S. Schiaffino, and S. Pontremoli. 1995. Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem. J.* 308 (Pt 1):57-61.
- [31] Duncan, J. G., R. Ravi, L. B. Stull, and A. M. Murphy. 2005. Chronic xanthine oxidase inhibition prevents myofibrillar protein oxidation and preserves cardiac function in a transgenic mouse model of cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289:H1512-H1518.
- [32] Ebus, J. P., Z. Papp, R. Zaremba, and G. J. Stienen. 2001. Effects of MgATP on ATP utilization and force under normal and simulated ischaemic conditions in rat cardiac trabeculae. *Pflugers Arch.* 443:102-111.
- [33] Édes, I. 2000. A szív- és simaizom Ca²⁺-anyagcseréje: elmélet, klinikum Golden Book
- [34] Edes, I. F., A. Toth, G. Csanyi, M. Lomnicka, S. Chlopicki, I. Edes, and Z. Papp. 2008. Late-stage alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy (Tgalphaq*44). *J. Mol. Cell Cardiol.*
- [35] Eisner, D. A., C. G. Nichols, S. C. O'Neill, G. L. Smith, and M. Valdeolmillos. 1989. The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cells. *J. Physiol.* 411:393-418.
- [36] Elliott, A. C., G. L. Smith, D. A. Eisner, and D. G. Allen. 1992. Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts. *J. Physiol.* 454:467-490.
- [37] Endoh, M. 1998. Changes in intracellular Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization as mechanisms of action of physiological interventions and inotropic agents in intact myocardial cells. *Jpn Heart J.* 39:1-44.
- [38] Endoh, M. 2001. Mechanism of action of Ca²⁺ sensitizers--update 2001. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 15:397-403.
- [39] Erdei, N., Z. Papp, P. Pollesello, I. Edes, and Z. Bagi. 2006. The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the K(ATP) and BK(Ca) channels in rat isolated arterioles. *Br. J. Pharmacol.* 148:696-702.
- [40] Fabiato, A., and F. Fabiato. 1979. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol. (Paris)* 75:463-505.

- [41] Fan, D., T. Wannenburg, and P. P. de Tombe. 1997. Decreased myocyte tension development and calcium responsiveness in rat right ventricular pressure overload. *Circulation* 95:2312-2317.
- [42] Ferdinandy, P. 2006. Peroxynitrite: just an oxidative/nitrosative stressor or a physiological regulator as well? *Br. J. Pharmacol.* 148:1-3.
- [43] Ferdinandy, P., H. Danial, I. Ambrus, R. A. Rothery, and R. Schulz. 2000. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ. Res.* 87:241-247.
- [44] Ferdinandy, P., D. Panas, and R. Schulz. 1999. Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. *Am. J. Physiol.* 276:H1861-H1867.
- [45] Fitzsimons, D. P., and R. L. Moss. 1998. Strong binding of myosin modulates length-dependent Ca^{2+} activation of rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 83:602-607.
- [46] Flashman, E., C. Redwood, J. Moolman-Smook, and H. Watkins. 2004. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ. Res.* 94:1279-1289.
- [47] Follath, F., J. G. Cleland, H. Just, J. G. Papp, H. Scholz, K. Peuhkurinen, V. P. Harjola, V. Mitrovic, M. Abdalla, E. P. Sandell, and L. Lehtonen. 2002. Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet* 360:196-202.
- [48] Freiburg, A., K. Trombitas, W. Hell, O. Cazorla, F. Fougerousse, T. Centner, B. Kolmerer, C. Witt, J. S. Beckmann, C. C. Gregorio, H. Granzier, and S. Labeit. 2000. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ. Res.* 86:1114-1121.
- [49] Fuchs, F., and D. A. Martyn. 2005. Length-dependent Ca^{2+} activation in cardiac muscle: some remaining questions. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26:199-212.
- [50] Fukuda, N., H. Kajiwara, S. Ishiwata, and S. Kurihara. 2000. Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. *Circ. Res.* 86:E1-E6.
- [51] Gao, W. D., D. Atar, P. H. Backx, and E. Marban. 1995. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca^{2+} responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ. Res.* 76:1036-1048.
- [52] Gao, W. D., D. Atar, Y. Liu, N. G. Perez, A. M. Murphy, and E. Marban. 1997. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ. Res.* 80:393-399.
- [53] Gao, W. D., Y. Liu, and E. Marban. 1996a. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation* 94:2597-2604.
- [54] Gao, W. D., Y. Liu, R. Mellgren, and E. Marban. 1996b. Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca^{2+} -dependent proteolysis? *Circ. Res.* 78:455-465.
- [55] Gao, W. D., C. I. Murray, Y. Tian, X. Zhong, J. F. Dumond, X. Shen, B. A. Stanley, D. B. Foster, D. A. Wink, S. B. King, J. E. Van Eyk, and N. Paolucci. 2012. Nitroxyl(HNO)-Mediated Disulfide Bond Formation Between Cardiac Myofilament Cysteines Enhances Contractile Function. *Circ. Res.*
- [56] Giordano, F. J. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* 115:500-508.
- [57] Goll, D. E., W. R. Dayton, I. Singh, and R. M. Robson. 1991. Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J. Biol. Chem.* 266:8501-8510.
- [58] Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83:731-801.
- [59] Gregorio, C. C., H. Granzier, H. Sorimachi, and S. Labeit. 1999. Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:18-25.

- [60] Haikala, H., J. Kaivola, E. Nissinen, P. Wall, J. Levijoki, and I. B. Linden. 1995a. Cardiac troponin C as a target protein for a novel calcium sensitizing drug, levosimendan. *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:1859-1866.
- [61] Haikala, H., E. Nissinen, E. Etemadzadeh, J. Levijoki, and I. B. Linden. 1995b. Troponin C-mediated calcium sensitization induced by levosimendan does not impair relaxation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25:794-801.
- [62] Hamdani, N., A. Borbely, S. P. Veenstra, V. Kooij, W. Vrydag, R. Zaremba, C. Dos Remedios, H. W. Niessen, M. C. Michel, W. J. Paulus, G. J. Stienen, and J. van der Velden. 2010. More severe cellular phenotype in human idiopathic dilated cardiomyopathy compared to ischemic heart disease. *J. Muscle Res Cell Motil* 31:289-301.
- [63] Hamdani, N., M. de Waard, A. E. Messer, N. M. Boontje, V. Kooij, S. van Dijk, A. Versteilen, R. Lamberts, D. Merkus, C. Dos Remedios, D. J. Duncker, A. Borbely, Z. Papp, W. Paulus, G. J. Stienen, S. B. Marston, and J. van der Velden. 2008. Myofibrillar dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J. Muscle Res Cell Motil* 29:189-201.
- [64] Hamdani, N., W. J. Paulus, L. van Heerebeek, A. Borbely, N. M. Boontje, M. J. Zuidwijk, J. G. Bronzwaer, W. S. Simonides, H. W. Niessen, G. J. Stienen, and J. van der Velden. 2009. Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction. *Eur Heart J.* 30:1863-1872.
- [65] Hasenfuss, G., L. A. Mulieri, B. J. Leavitt, and N. R. Alpert. 1994. Influence of isoproterenol on contractile protein function, excitation-contraction coupling, and energy turnover of isolated nonfailing human myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 26:1461-1469.
- [66] Haywood, G. A., P. S. Tsao, H. E. der Leyen, M. J. Mann, P. J. Keeling, P. T. Trindade, N. P. Lewis, C. D. Byrne, P. R. Rickenbacher, N. H. Bishopric, J. P. Cooke, W. J. McKenna, and M. B. Fowler. 1996. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 93:1087-1094.
- [67] Heineke, J., and J. D. Molkentin. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:589-600.
- [68] Hertelendi, Z., A. Toth, A. Borbely, Z. Galajda, I. Edes, A. Tosaki, and Z. Papp. 2009. The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes. *J. Cell Mol Med* 13:2200-2209.
- [69] Hertelendi, Z., A. Toth, A. Borbely, Z. Galajda, J. van der Velden, G. J. Stienen, I. Edes, and Z. Papp. 2008. Oxidation of myofibrillar protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca²⁺ sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal* 10:1175-1184.
- [70] Hoar, P. E., C. W. Mahoney, and W. G. Kerrick. 1987. MgADP- increases maximum tension and Ca²⁺ sensitivity in skinned rabbit soleus fibers. *Pflugers Arch.* 410:30-36.
- [71] Hofmann, P. A., and F. Fuchs. 1987. Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C. *Am. J. Physiol.* 253:C541-C546.
- [72] Isayama, T., S. R. Goodman, and I. S. Zagon. 1993. Localization of spectrin isoforms in the adult mouse heart. *Cell Tissue Res.* 274:127-133.
- [73] Kaheinen, P., P. Pollesello, J. Levijoki, and H. Haikala. 2001. Levosimendan increases diastolic coronary flow in isolated guinea-pig heart by opening ATP-sensitive potassium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37:367-374.
- [74] Kanski, J., A. Behring, J. Pelling, and C. Schoneich. 2005. Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H371-H381.
- [75] Katrukha, A. G., A. V. Bereznikova, V. L. Filatov, T. V. Esakova, O. V. Kolosova, K. Pettersson, T. Lovgren, T. V. Bulargina, I. R. Trifonov, N. A. Gratsiansky, K. Pulkki, L. M. Voipio-Pulkki, and N. B. Gusev. 1998. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin. Chem.* 44:2433-2440.

- [76] Katz, A. M., and M. R. Zile. 2006. New molecular mechanism in diastolic heart failure. *Circulation* 113:1922-1925.
- [77] Kentish, J. C. 1986. The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *J. Physiol.* 370:585-604.
- [78] Kentish, J. C. 1991. Combined inhibitory actions of acidosis and phosphate on maximum force production in rat skinned cardiac muscle. *Pflugers Arch.* 419:310-318.
- [79] Kloner, R. A., R. Bolli, E. Marban, L. Reinlib, and E. Braunwald. 1998. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 97:1848-1867.
- [80] Konhilas, J. P., T. C. Irving, and P. P. de Tombe. 2002. Length-dependent activation in three striated muscle types of the rat. *J. Physiol.* 544:225-236.
- [81] Koretsune, Y., and E. Marban. 1990. Relative roles of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent mechanisms in hypoxic contractile dysfunction. *Circulation* 82:528-535.
- [82] Kristof, E., G. Sziget, Z. Papp, A. Bodi, N. A. Ball, R. A. Walsh, and I. Edes. 1999. The effects of levosimendan on the left ventricular function and protein phosphorylation in post-ischemic guinea pig hearts. *Basic Res. Cardiol.* 94:223-230.
- [83] Kristof, E., G. Sziget, Z. Papp, A. Bodi, A. Facsko, L. Kovacs, J. G. Papp, E. G. Kranias, and I. Edes. 1998. Cardiac responses to calcium sensitizers and isoproterenol in intact guinea pig hearts. Effects on cyclic AMP levels, protein phosphorylation, myoplasmic calcium concentration, and left ventricular function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 853:316-319.
- [84] Lamb, G. D., and G. S. Posterino. 2003. Effects of oxidation and reduction on contractile function in skeletal muscle fibres of the rat. *J. Physiol.* 546:149-163.
- [85] MacFarlane, N. G., and D. J. Miller. 1992. Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ. Res.* 70:1217-1224.
- [86] Malhotra, A., S. S. Margossian, and H. S. Slayter. 1986. Physico-chemical properties of rat and dog cardiac alpha-actinin. *Biochim. Biophys. Acta* 874:347-354.
- [87] Marban, E., Y. Koretsune, M. Corretti, V. P. Chacko, and H. Kusuoka. 1989. Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation* 80:IV17-IV22.
- [88] Matsumura, Y., E. Saeki, M. Inoue, M. Hori, T. Kamada, and H. Kusuoka. 1996. Inhomogeneous disappearance of myofilament-related cytoskeletal proteins in stunned myocardium of guinea pig. *Circ. Res.* 79:447-454.
- [89] McAuliffe, J. J., L. Z. Gao, and R. J. Solaro. 1990. Changes in myofibrillar activation and troponin C Ca^{2+} binding associated with troponin T isoform switching in developing rabbit heart. *Circ. Res.* 66:1204-1216.
- [90] McDonough, J. L., D. K. Arrell, and J. E. Van Eyk. 1999. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 84:9-20.
- [91] McKillop, D. F., and M. A. Geeves. 1993. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.* 65:693-701.
- [92] Mercadier, J. J., A. M. Lompre, C. Wisnewsky, J. L. Samuel, J. Bercovici, B. Swynghedauw, and K. Schwartz. 1981. Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 49:525-532.
- [93] Mihm, M. J., C. M. Coyle, B. L. Schanbacher, D. M. Weinstein, and J. A. Bauer. 2001. Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc. Res.* 49:798-807.
- [94] Mittmann, C., T. Eschenhagen, and H. Scholz. 1998. Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 39:267-275.
- [95] Moiseyev, V. S., P. Poder, N. Andrejevs, M. Y. Ruda, A. P. Golikov, L. B. Lazebnik, Z. D. Kobalava, L. A. Lehtonen, T. Laine, M. S. Nieminen, and K. I. Lie. 2002. Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial

- infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN). *Eur Heart J.* 23:1422-1432.
- [96] Molkenkin, J. D., J. R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant, and E. N. Olson. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-228.
- [97] Mudd, J. O., and D. A. Kass. 2008. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451:919-928.
- [98] Murphy, A. M., H. Kogler, D. Georgakopoulos, J. L. McDonough, D. A. Kass, J. E. Van Eyk, and E. Marban. 2000. Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science* 287:488-491.
- [99] Nadal-Ginard, B., and V. Mahdavi. 1989. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J. Clin. Invest* 84:1693-1700.
- [100] Neagoe, C., M. Kulke, F. del Monte, J. K. Gwathmey, P. P. de Tombe, R. J. Hajjar, and W. A. Linke. 2002. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106:1333-1341.
- [101] Nieminen, M. S., P. Pollesello, G. Vajda, and Z. Papp. 2009. Effects of levosimendan on the energy balance: preclinical and clinical evidence. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 53:302-310.
- [102] Opie, L. H. 1992. Cardiac metabolism--emergence, decline, and resurgence. Part II. *Cardiovasc. Res.* 26:817-830.
- [103] Opie, L. H. 2004. Heart physiology, from cell to circulation. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
- [104] Palmer, S., and J. C. Kentish. 1998. Roles of Ca²⁺ and crossbridge kinetics in determining the maximum rates of Ca²⁺ activation and relaxation in rat and guinea pig skinned trabeculae. *Circ. Res.* 83:179-186.
- [105] Papp, Z., J. Barta, and G. J. Stienen. 2001. Troponin I degradation and myocardial stunning. *Circulation* 104:E157.
- [106] Papp, Z., Borbély, A., Édes, I. 2007. Változások a szív kontraktilis fehérjeszerkezetében diastolés szívelégtelenség során. *Lege Artis Medicinae* 17:441-445.
- [107] Papp, Z., K. Csapo, P. Pollesello, H. Haikala, and I. Edes. 2005. Pharmacological mechanisms contributing to the clinical efficacy of levosimendan. *Cardiovasc. Drug Rev* 23:71-98.
- [108] Papp, Z., and I. Édes. 2000. A myocardialis ischaemia és reperfúzió patofiziológiája. *Lege Artis Medicinae* 45 501-511.
- [109] Papp, Z., I. Edes, S. Fruhwald, S. G. De Hert, M. Salmenpera, H. Leppikangas, A. Mebazaa, G. Landoni, E. Grossini, P. Caimmi, A. Morelli, F. Guarracino, R. H. Schwinger, S. Meyer, L. Algotsson, B. G. Wikstrom, K. Jorgensen, G. Filippatos, J. T. Parissis, M. J. Gonzalez, A. Parkhomenko, M. B. Yilmaz, M. Kivikko, P. Pollesello, and F. Follath. 2012. Levosimendan: Molecular mechanisms and clinical implications: Consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int. J. Cardiol.* 159:82-87.
- [110] Papp, Z., A. Szabo, J. P. Barends, and G. J. Stienen. 2002. The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* 543:177-189.
- [111] Papp, Z., d. V. van, A. Borbely, I. Edes, and G. J. Stienen. 2004. Effects of Ca²⁺ -sensitizers in permeabilized cardiac myocytes from donor and end-stage failing human hearts. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 25:219-224.
- [112] Papp, Z., d. V. van, and G. J. Stienen. 2000. Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc. Res.* 45:981-993.
- [113] Pataricza, J., J. Hohn, A. Petri, A. Balogh, and J. G. Papp. 2000. Comparison of the vasorelaxing effect of cromakalim and the new inodilator, levosimendan, in human isolated portal vein. *J. Pharm. Pharmacol.* 52:213-217.
- [114] Pate, E., and R. Cooke. 1989. A model of crossbridge action: the effects of ATP, ADP and Pi. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10:181-196.

- [115] Patterson, S. W., and E. H. Starling. 1914. On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. *J. Physiol.* 48 357-379.
- [116] Perez, N. G., K. Hashimoto, S. McCune, R. A. Altschuld, and E. Marban. 1999. Origin of contractile dysfunction in heart failure: calcium cycling versus myofilaments. *Circulation* 99:1077-1083.
- [117] Piper, H. M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize. 1998. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 38:291-300.
- [118] Piroddi, N., A. Belus, S. Eiras, C. Tesi, d. V. van, C. Poggesi, and G. J. Stienen. 2006. No direct effect of creatine phosphate on the cross-bridge cycle in cardiac myofibrils. *Pflugers Arch.* 452:3-6.
- [119] Pollesello, P., M. Ovaska, J. Kaivola, C. Tilgmann, K. Lundstrom, N. Kalkkinen, I. Ulmanen, E. Nissinen, and J. Taskinen. 1994. Binding of a new Ca²⁺ sensitizer, levosimendan, to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modelling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study. *J. Biol. Chem.* 269:28584-28590.
- [120] Pollesello, P., and Z. Papp. 2007. The cardioprotective effects of levosimendan: preclinical and clinical evidence. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 50:257-263.
- [121] Regnier, M., C. Morris, and E. Homsher. 1995. Regulation of the cross-bridge transition from a weakly to strongly bound state in skinned rabbit muscle fibers. *Am. J. Physiol.* 269:C1532-C1539.
- [122] Richardson, F. L., M. H. Stromer, T. W. Huiatt, and R. M. Robson. 1981. Immunoelectron and immunofluorescence localization of desmin in mature avian muscles. *Eur. J. Cell. Biol.* 26:91-101.
- [123] Rundell, V. L., V. Manaves, A. F. Martin, and P. P. de Tombe. 2005. Impact of beta-myosin heavy chain isoform expression on cross-bridge cycling kinetics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:H896-H903.
- [124] Russell, B., D. Motlagh, and W. W. Ashley. 2000. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J. Appl. Physiol.* 88:1127-1132.
- [125] Schlotthauer, K., J. Schattmann, D. M. Bers, L. S. Maier, U. Schutt, K. Minami, H. Just, G. Hasenfuss, and B. Pieske. 1998. Frequency-dependent changes in contribution of SR Ca²⁺ to Ca²⁺ transients in failing human myocardium assessed with ryanodine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:1285-1294.
- [126] Schulz, R., K. L. Dodge, G. D. Lopaschuk, and A. S. Clanachan. 1997. Peroxynitrite impairs cardiac contractile function by decreasing cardiac efficiency. *Am. J. Physiol.* 272:H1212-H1219.
- [127] Sorsa, T., S. Heikkinen, M. B. Abbott, E. Abusamhadneh, T. Laakso, C. Tilgmann, R. Serimaa, A. Annala, P. R. Rosevear, T. Drakenberg, P. Pollesello, and I. Kilpelainen. 2001. Binding of levosimendan, a calcium sensitizer, to cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 276:9337-9343.
- [128] Stapleton, M. T., and A. P. Allshire. 1998. Modulation of rigor and myosin ATPase activity in rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30:1349-1358.
- [129] Stienen, G. J., Z. Papp, and R. Zaremba. 1999. Influence of inorganic phosphate and pH on sarcoplasmic reticular ATPase in skinned muscle fibres of *Xenopus laevis*. *J. Physiol.* 518 (Pt 3):735-744.
- [130] Szent-Györgyi, A. 1942. The contraction of myosin threads. *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* 1:17-26.
- [131] Szent-Györgyi, A. 1943a. The crystallization of myosin and some of its properties and reactions. *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* III:
- [132] Szent-Györgyi, A. 1943b. Observations on actomyosin. *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* 86-92.
- [133] Szent-Györgyi, A. 1945. Studies on muscle. *Acta Physiol. Scand.* 9:25.
- [134] Szent-Györgyi, A. 1949. Free energy relations and contraction of actomyosin. *Biol. Bull.* 140-161.

- [135] Szilagyi, S., P. Pollesello, J. Levijoki, H. Haikala, I. Bak, A. Tosaki, A. Borbely, I. Edes, and Z. Papp. 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.
- [136] Szilagyi, S., P. Pollesello, J. Levijoki, P. Kaheinen, H. Haikala, I. Edes, and Z. Papp. 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.
- [137] Tesi, C., F. Colomo, S. Nencini, N. Piroddi, and C. Poggesi. 2000. The effect of inorganic phosphate on force generation in single myofibrils from rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.* 78:3081-3092.
- [138] Tskhovrebova, L., and J. Trinick. 2003. Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:679-689.
- [139] Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima. 2011. Oxidative stress and heart failure. *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301:H2181-2190.
- [140] Uhlmann, R., R. H. Schwinger, I. Lues, and E. Erdmann. 1995. EMD 53998 acts as Ca²⁺-sensitizer and phosphodiesterase III-inhibitor in human myocardium. *Basic Res Cardiol.* 90:365-371.
- [141] van der Velden, J. 1998. Correlation between Contractile Protein Composition and Energetic and Mechanical Properties of the Heart Amsterdam, the Netherlands
- [142] van der Velden, J., N. M. Boontje, Z. Papp, L. J. Klein, F. C. Visser, J. W. de Jong, V. J. Owen, P. B. Burton, and G. J. Stienen. 2002. Calcium sensitivity of force in human ventricular cardiomyocytes from donor and failing hearts. *Basic Res. Cardiol.* 97 Suppl. 1:118-1126.
- [143] van der Velden, J., N. A. Narolska, R. R. Lamberts, N. M. Boontje, A. Borbely, R. Zaremba, J. G. Bronzwaer, Z. Papp, K. Jaquet, W. J. Paulus, and G. J. Stienen. 2006. Functional effects of protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium. *Cardiovasc. Res.* 69:876-887.
- [144] van der Velden, J., Z. Papp, N. M. Boontje, R. Zaremba, J. W. de Jong, P. M. Janssen, G. Hasenfuss, and G. J. Stienen. 2003a. The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca²⁺-sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc. Res.* 57:505-514.
- [145] van der Velden, J., Z. Papp, N. M. Boontje, R. Zaremba, J. W. de Jong, P. M. Janssen, G. Hasenfuss, and G. J. Stienen. 2003b. Myosin light chain composition in non-failing donor and end-stage failing human ventricular myocardium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 538:3-15.
- [146] van der Velden, J., Z. Papp, R. Zaremba, N. M. Boontje, J. W. de Jong, V. J. Owen, P. B. Burton, P. Goldmann, K. Jaquet, and G. J. Stienen. 2003c. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc. Res.* 57:37-47.
- [147] Van Eyk, J. E., F. Powers, W. Law, C. Larue, R. S. Hodges, and R. J. Solaro. 1998. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ. Res.* 82:261-271.
- [148] van Heerebeek, L., A. Borbely, H. W. Niessen, J. G. Bronzwaer, d. V. van, G. J. Stienen, W. A. Linke, G. J. Laarman, and W. J. Paulus. 2006. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113:1966-1973.
- [149] van Heerebeek, L., N. Hamdani, M. L. Handoko, I. Falcao-Pires, R. J. Musters, K. Kupreishvili, A. J. Ijsselmuiden, C. G. Schalkwijk, J. G. Bronzwaer, M. Diamant, A. Borbely, J. van der Velden, G. J. Stienen, G. J. Laarman, H. W. Niessen, and W. J. Paulus. 2008. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 117:43-51.
- [150] Ventura-Clapier, R., and V. Veksler. 1994. Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ. Res.* 74:920-929.

- [151] Wang, W., C. J. Schulze, W. L. Suarez-Pinzon, J. R. Dyck, G. Sawicki, and R. Schulz. 2002. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 106:1543-1549.
- [152] Wannenburg, T., G. H. Heijne, J. H. Geerdink, H. W. Van Den Dool, P. M. Janssen, and P. P. de Tombe. 2000. Cross-bridge kinetics in rat myocardium: effect of sarcomere length and calcium activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279:H779-H790.
- [153] Wannenburg, T., P. M. Janssen, D. Fan, and P. P. de Tombe. 1997. The Frank-Starling mechanism is not mediated by changes in rate of cross-bridge detachment. *Am. J. Physiol.* 273:H2428-H2435.
- [154] Weinstein, D. M., M. J. Mihm, and J. A. Bauer. 2000. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294:396-401.
- [155] Wilkins, B. J., Y. S. Dai, O. F. Bueno, S. A. Parsons, J. Xu, D. M. Plank, F. Jones, T. R. Kimball, and J. D. Molkenin. 2004. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 94:110-118.
- [156] Winkelmann, J. C., and B. G. Forget. 1993. Erythroid and nonerythroid spectrins. *Blood* 81:3173-3185.
- [157] Wolff, M. R., K. S. McDonald, and R. L. Moss. 1995. Rate of tension development in cardiac muscle varies with level of activator calcium. *Circ. Res.* 76:154-160.
- [158] Wolledge, R. C., N. A. Curtin, and E. Homsher. 1985. Energetic aspects of muscle contraction. *Monogr Physiol. Soc.* 41 1-357.
- [159] Yokoshiki, H., Y. Katsube, M. Sunagawa, and N. Sperelakis. 1997. Levosimendan, a novel Ca²⁺ sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K⁺ channel in rat arterial myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 333:249-259.
- [160] Yoshida, K., M. Inui, K. Harada, T. C. Saido, Y. Sorimachi, T. Ishihara, S. Kawashima, and K. Sobue. 1995. Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ. Res.* 77:603-610.
- [161] Zhang, R., J. Zhao, and J. D. Potter. 1995. Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca²⁺ affinity of cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 270:30773-30780.
- [162] Zile, M. R., C. F. Baicu, and D. D. Bonema. 2005. Diastolic heart failure: definitions and terminology. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 47:307-313.



Papp Zoltán 1965-ben született Vásárosnaményban. A Debreceni Orvostudományi Egyetemen 1989-ben szerzett orvosi diplomát. Oktató-kutató munkáját kezdetben a Debreceni Egyetem Élettani Intézetében, majd 2000-tól a Kardiológiai Intézet Klinikai Fiziológiai Tanszékén bontakoztatta ki. 1995-ben PhD-fokozatot, 2010-ben MTA doktori címet szerzett. A szív működés kórtani sajátosságaira irányuló tudományos kutatásait kiváló hazai és külföldi tanítómesterek támogatták. A szívizomsejtek elektrofiziológiai sajátosságait Leuvenben (Belgium) a Katholieke Universiteit Élettani Intézetében Edward Carmeliet és Karin Sipido professzorok mellett tanulmányozta, míg a szívizomsejtek mechanikai tulajdonságait

Amszterdamban (Hollandia) a Vrije Universiteit Élettani Intézetében Ger J. M. Stienen professzorral közösen vizsgálta. Kísérletes megközelítéseiben sejtélettani és biokémiai módszereket ötvöz. Célja, hogy a szív pumpafunkciójában jelentkező zavarok okait a szívizomsejtekben észlelhető molekuláris eltérések szintjén azonosítsa. Vizsgálati eredményei a hirtelen fellépő (pl. akut miokardiális infarktusz) és a lassan kifejlődő (pl. krónikus szívelégtelenség) szívizom-rendellenességek természetének pontosabb megértését, és újszerű kezelési módszerek bevezetését segítik elő.

A Papp Zoltán által irányított Klinikai Fiziológiai Tanszék oktatási-kutatási tevékenysége az ezredfordulót követően nemzetközileg is ismertté vált, melyet számos hazai és nemzetközi elismerés, jelentős számú PhD-fokozatot szerzett hallgató, és a tanszék kiterjedt tudományos kapcsolatrendszere egyaránt tanúsítanak. Papp Zoltán 2010 és 2013 között a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar oktatási dékánhelyettese, emellett több tudományos testület tagja és választott tisztségviselője. Megbízatai közül kiemelkedik a Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, melynek 2008 és 2014 között vezetőségi tagja, 2012-től az alapkutató-sokért felelős szekció vezetője.

Papp Zoltán tevékenységének központi motívuma a fiatalok sikeres kutatóvá válásának támogatása oly módon, hogy ez a mindennapi munkavégzés kapcsán is örömteli legyen. Ennek tágabb nyilvánosság számára is emlékezetes megjelenítése volt „stand-up comedy” elemekkel átszőtt előadása 2010. december 3-án a Debreceni Egyetem OEC Tudományos Diákköri Konferenciájának záró rendezvényén.



A kiadvány megjelenését
a TÁMOP-4.2.3/08/1/KMR-2008-0003

Semmelweis Egyetem Piramis Projekt
támogatta



Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.