

borbely.attila.1_300_24

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A diasztolés diszfunkció kialakulását meghatározó miokardiális változások
a szívelégtelenség különböző klinikai formáiban**

Dr. Borbély Attila



Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Kardiológiai Intézet, Kardiológiai Tanszék és Klinikai Fiziológiai Tanszék

Debrecen

2025

TARTALOMJEGYZÉK

A fontosabb rövidítések jegyzéke	4
I. BEVEZETÉS	6
1.1. A szívelégtelenség definíciója, klinikai formái	6
1.2. A szívelégtelenség epidemiológiája, klinikai és társadalmi jelentősége	6
1.3. HFrEF és HFpEF: eltérő etiológia és patofiziológia	7
1.4. Hemodinamikai változások HFrEF-ben és HFpEF-ben.....	9
1.5. A HFrEF és a HFpEF gyógyszeres kezelése	11
1.6. A szívizomzatban bekövetkező strukturális és funkcionális változások a szívelégtelenség különböző formáiban.....	13
1.6.1. A szívizomzat kontraktilitását meghatározó tényezők HFrEF-ben és HFpEF-ben 13	
1.6.2. A miofilamentális fehérjék transzkripció és poszttranszlációs módosulásai szívelégtelenségben - korábbi kutatási eredmények.....	15
1.6.3. A mieloperoxidáz enzim (MPO) szerepe a kardiovaszkuláris megbetegedésekben, oxidatív fehérjekárosodások a szívizom kontraktilis fehérjerendszerében	19
1.6.4. A női nem és a stressz szerepe kardiovaszkuláris megbetegedésekben	23
1.7. Új gyógyszeres lehetőség a szív pumpafunkciójának javítására: miozin aktivátorok ..	24
2. CÉLKITŰZÉSEK	27
3. MÓDSZEREK	28
3.1. Szívizomminták.....	28
3.2. Kontraktilis erő mérése izolált-szívizomsejt mérőrendszer segítségével.....	29
3.3. Fény- és elektronmikroszkópos kvantitatív hisztomorfometria	31
3.4. A miofilamentális fehérjék és a titin izoforma összetételének és foszforilációjának vizsgálata.....	31
3.5. MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérése	31
3.6. Fehérje SH-oxidáció, karboniláció és foszforiláció meghatározása	32
3.6.1. A miofilamentális fehérjék SH tartalmának meghatározása Ellman-reakcióval....	32
3.6.2. Fehérje oxidáció meghatározása SH-csoport biotinálási módszerrel.....	32
3.7. A Ca^{2+} szint változások és szarkomerhossz rövidülések egyidejű mérése	33
3.8. A kontraktilis paraméterek és Ca^{2+} tranziensek jellemzése	34
3.9. Patkánymodell, <i>in vivo</i> kísérletek.....	34
3.9.1. Konvencionális echokardiográfia.....	34
3.9.2. Strain echokardiográfia	35
3.9.3. Elektrokardiográfia.....	36
3.10. Adatelemzés és statisztika	36

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	38
4.1. Strukturális és funkcionális különbségek HFrEF-ben és HFpEF-ben.....	38
4.2. A fibrózis, a keringő glikációs végtermékek (AGEs) és a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ szerepe a diasztolés diszfunkcióban	44
4.3. A β-blokkoló kezelés eltérő molekuláris hatásai HFrEF-ben és HFpEF-ben.....	47
4.4. A titin izoforma összetétel és foszforiláció szerepe a szívelégtelenségben megfigyelhető kóros szívizomsejt passzív feszülésben.....	50
4.5. A miofilamentális fehérjék oxidatív módosulásainak szerepe a bal kamrai diasztolés diszfunkció kialakulásában	54
4.5.1. A mieloperoxidáz enzim (MPO) funkcionális hatásainak vizsgálata humán bal kamrai szívizomsejteken	54
4.5.2. Az MPO-inhibitor (MPO-I) és a metionin (Met) kivédi, a dithiotreitol (DTT) részlegesen revertálja az MPO-okozta kontraktilis diszfunkciót	56
4.5.3. A Met gátolja az MPO klorinációs aktivitását, azonban a peroxidáz aktivitásra nincs hatással.....	58
4.5.4. Az $\text{MPO} + \text{H}_2\text{O}_2$ kezelés hatása a miofilamentális fehérjék SH-tartalmára	59
4.5.5. Az MPO hatása a szívizomfehérjék karbonilációjára	60
4.6. Az ovariektómia és az akut stressz hatása patkány bal kamrai szívizomsejtek kontraktilis funkciójára	63
4.6.1. Az ovariektómia és a stressz hatása a női nemi hormonok szintjére.....	63
4.6.2. Az ovariektómia befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis funkcióját.....	63
4.6.3. Az ovariektómia és stressz hatása a miofilamentális fehérjék összetételére és foszforilációs állapotára	63
4.6.4. A szívizomsejt kontraktilis funkció összefüggése a miokardiális fehérjék foszforilációjával, valamint a női nemi hormonok szintjével	65
4.7. In vitro kísérletek - az omecantiv mecarbil (OM), az EMD-53998 (EMD) és a levosimendan (Levo) hatásainak vizsgálata intakt emlős szívizomsejtek kontraktilis paramétereire	68
4.7.1. Az OM és EMD csökkentette, míg a Levo nem befolyásolja az intakt szívizomsejtek nyugalmi szarkomerhosszát.....	68
4.7.2. Az OM, EMD és Levo eltérő módon befolyásolja a bal kamrai szívizomsejtek kinetikai paramétereit a kontrakció és relaxáció során	68
4.7.3. Az OM egyedi módon változtatja meg a Ca^{2+} -szarkomerhossz összefüggést	70
4.7.4. A diasztolés és szisztolés szarkomer dinamika kölcsönhatásainak vizsgálata.....	71

4.8. In vivo kísérletek - Danicamtiv	76
4.8.1. A danicamtiv csökkenti a végszisztolés átmérőt, de nem befolyásolja a végdiasztolés átmérőt	76
4.8.2. A danicamtiv javítja a bal kamrai kontraktilitást	76
4.8.3. A szisztolé és diasztolé időtartama megváltozik danicamtiv hatására	77
4.8.4. A kontrakció kinetikája jelentősen lassul, azonban a bal kamrai strain paraméterek javulnak a danicamtiv kezelést követően	78
4.8.5. A danicamtiv diasztolés diszfunkciót okoz	79
5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	85
6. A KUTATÁSI EREDMÉNYEK TUDOMÁNYOS ÉS TÁRSADALMI HASZNOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI, A KUTATÁS JELENTŐSÉGE	87
7. IRODALOMJEGYZÉK	88
8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	100
8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	100
8.2. A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények	101
8.3. A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények	105
8.4. Könyvfejezetek.....	105
9. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK	107
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108
FÜGGELÉK	109

A gyakrabban használt és fontosabb rövidítések jegyzéke

ABAH - 4-aminobenzhidrazid, MPO-inhibitor (MPO-I)

ACE - angiotenzin-konvertáló enzim

AGEs - glikációs végtermékek

ARB - angiotenzin receptor-blokkoló

ARNI - angiotenzin receptor-neprilizin inhibitor

AS - aorta sztenózis

ANP - atriális (atrial, A-típusú) nátriuretikus peptid

AT1 - angiotenzin II 1-es típusú receptor

ATI - angiotenzin I

ATII - angiotenzin II

BB - béta-receptor blokkoló

BKEF - bal kamrai ejekciós frakció

BNP - agyi (brain, B-típusú) nátriuretikus peptid

cGMP - ciklikus guanozin-monofoszfát

Cis - cisztein

CVF - kollagén-térfogat arány

DAN - danimactiv

DM - diabétesz mellitusz

-dP/dt - a bal kamrai diasztolés nyomáscsökkenés sebessége

EF - ejekciós frakció

ESC - Európai Kardiológus Társaság

F_{aktív} - szívizomsejt aktív erő

F_{passzív} - szívizomsejt passzív erő, vagy szívizomsejt passzív feszülés

G_i - inhibitorikus G fehérje

G_s - stimulatorikus G fehérje

HFmrEF - szívelégtelenség enyhén csökkent ejekciós frakcióval

HFpEF - szívelégtelenség megőrzött ejekciós frakcióval

HFrEF - szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval

H₂O₂ - hidrogén peroxid

IVRT - izovolumetriás relaxációs idő

k_{tr} - aktin-miozin ciklussebesség

n_{Hill} - a kontraktilis fehérjerendszeren belül érvényesülő kooperativitást jellemző állandó

NP - nátriuretikus peptid

Levo - levosimendan

LVEDP - bal kamrai végdiasztolés nyomás

Met - metionin

MetSO - metionin-szulfoxid

MPO - mieloperoxidáz enzim

MyD - szívizomsejt átmérő

MV E - transzmitrális korai áramlási csúcssebesség

MV A - transzmitrális késői/pitvari áramlási csúcssebesség

N2B - a titin fehérje rövidebb és merevebb izoformája

N2BA - a titin fehérje hosszabb és rugalmasabb izoformája

NO - nitrogén-oxid

NT-proBNP - N-terminális agyi (brain, B-típusú) nátriuretikus peptid

NYHA - New York Heart Association

OM - omecamtiv mecarbil

pCa₅₀ - kontraktilis rendszer kalciumérzékenysége

PCWP - pulmonális kapilláris éknyomás

PKA - proteinkináz A

PKG - proteinkináz G

RAAS - Renin-Angiotenzin-Aldoszteron Rendszer

ROS - reaktív oxidatív szabadgyökök

SET - szisztolés ejekciós idő

SH - szulfhidril

SGLT2 - nátrium-glükóz kotranszporter 2

TCM - Takotsubo-kardiomiopátia

TnI - troponin I

TnT - troponin T

I. BEVEZETÉS

1.1. A szívelégtelenség definíciója, klinikai formái

A szívelégtelenség a szív strukturális és/vagy funkcionális károsodása következtében létrejövő komplex klinikai szindróma, mely során a betegeknél típusos panaszok és tünetek lépnek fel. A szívelégtelenség tünetei nyugalomban vagy terhelés hatására az alacsony perctérfogat és/vagy az emelkedett intrakardiális nyomás következtében jönnek létre.

Az Európai Kardiológus Társaság (ESC) 2021-ben kiadott szakmai ajánlása alapján a bal kamrai ejekciós frakció (BKEF) értéke szerint a szívelégtelenség három klinikai formáját különítjük el: 1. szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval: $BKEF \leq 40\%$ (heart failure with reduced ejection fraction, *HFrEF*), 2. szívelégtelenség enyhén csökkent ejekciós frakcióval: $BKEF 41-49\%$ (heart failure with mildly reduced ejection fraction, *HFmrEF*) és 3. szívelégtelenség megőrzött ejekciós frakcióval: $BKEF \geq 50\%$ (heart failure with preserved ejection fraction, *HFpEF*) (1. táblázat).¹

HF típus			HFrEF	HFmrEF	HFpEF
		1	Szívelégtelenségre jellemző panaszok ± tünetek	Szívelégtelenségre jellemző panaszok ± tünetek	Szívelégtelenségre jellemző panaszok ± tünetek
		2	$BKEF \leq 40\%$	$BKEF 41-49\%$	$BKEF \geq 50\%$
	Kritériumok	3	-	-	A bal kamrai diasztolés diszfunkció/emelkedett töltőnyomás jelenlétével összhangban álló, strukturális és/vagy funkcionális rendellenességekre utaló objektív bizonyítékok, ideértve az emelkedett nátriuretikus peptidszinteket (BNP vagy NT-proBNP)*

1. táblázat A csökkent, enyhén csökkent és megőrzött ejekciós frakcióval járó szívelégtelenség definíciója és diagnosztikai kritériumai

HF: szívelégtelenség; HFrEF: szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval; HFmrEF: szívelégtelenség enyhén csökkent ejekciós frakcióval; HFpEF: szívelégtelenség megőrzött ejekciós frakcióval; BKEF: bal kamrai ejekciós frakció; BNP: B-típusú nátriuretikus peptid; NT-proBNP: N-terminális-B-típusú nátriuretikus peptid.

* minél több rendellenesség ismerhető fel, annál nagyobb a HFpEF valószínűsége. (McDonagh TA és munkatársai, *Eur. Heart J.*, 2021, 42: 3599–3726. alapján)

1.2. A szívelégtelenség epidemiológiája, klinikai és társadalmi jelentősége

A szívelégtelenség progresszív, rokkantságot okozó, magas morbiditással és mortalitással járó betegség. Napjainkban világszerte kb. 64 millió, Európában 15 millió szívelégtelen beteg él.² A szívelégtelenség prevalenciája a nyugati társadalmakban 1-2% közé tehető, a 65 év feletti populációban eléri 6-10%-ot, az évente diagnosztizált új esetek száma 1-5 eset/1000 lakos, mely

évtizedenként megduplázódik.³ A szívelégtelenség mellett, hogy jelentősen rontja a betegek életminőségét, kezelése magas közvetlen és közvetett költséggel is jár (kórházi kezelések, gyógyszerek és a munkaképesség elvesztése), óriási társadalmi, gazdasági terhet ró a betegekre, gondozóikra és az egészségügyi rendszerekre.⁴

A rendelkezésre álló nem gyógyszeres, gyógyszeres, eszközös és sebészi kezelési eljárások ellenére mindhárom szívelégtelenség fenotípus halálozása továbbra is rendkívül magas, a felismerést követő első évben megközelíti a malignus betegségek mortalitását (30-40%), az ötödik évben pedig elérheti a 60-70%-ot is.⁵ Közvetlenül a kórházi elbocsátást követően a HFpEF prognózisa jobb, ugyanakkor a hosszú távú kimenetel és a kórházi újrafelvételek száma a HFrEF-el megegyező. Az elmúlt évtizedben végzett epidemiológiai vizsgálatok alapján egyértelművé vált, hogy az összhalálozás és a kardiovaszkuláris halálozás a HFrEF csoportban magasabb a HFmrEF és a HFpEF csoporthoz képest, a nem kardiovaszkuláris okból bekövetkező halálozás és hospitalizáció ugyanakkor a HFpEF és a HFmrEF betegekben gyakoribb.⁶ A HFrEF betegek túlélése az elmúlt két-három évtizedben szignifikánsan javult, azonban a HFpEF-ben szenvedőké érdemben nem változott.⁷ Ezen jelentős különbség hátterében nagyrészt az állhat, hogy a HFrEF kialakulásához vezető kórfolyamatok viszonylag jól ismertek, HFpEF patofiziológiája ugyanakkor továbbra is igen ellentmondásos.⁸ A kórfolyamatok pontosabb megértése nagymértékben hozzájárulhat a HFpEF korai felismeréséhez és a jelenleginél hatékonyabb kezelési stratégiák kidolgozásához.

1.3. HFrEF és HFpEF: eltérő etiológia és patofiziológia

A szív strukturális és/vagy funkcionális rendellenességeihez, a bal kamra szisztolés és/vagy diasztolés diszfunkciójához számos betegség vezethet. A szívelégtelenség legfontosabb rizikófaktorai a hipertónia, a koronária betegség, a 2-es típusú diabétesz, az elhízás, a dohányzás, az alkohol- és kábítószer fogyasztás, valamint az irradiáció és bizonyos kemoterápiás szerek alkalmazása.

A HFrEF legfontosabb okait a jelenleg érvényben lévő etiológiai felosztás alapján a szívizomzat közvetlen károsodása, a kóros kamrai telődési viszonyok és az aritmiák képezik.¹ A szívizomzat károsodásáért a klinikai gyakorlatban leggyakrabban az ischaemiás szívbetegség és a primer szívizombetegségek, az un. kardiomiopátiák tehetők felelőssé. A szívizomzat toxikus ágensek hatására létrejövő, immun/gyulladásos, metabolikus/infiltratív, az endokrin betegségek által okozott károsodásai ugyancsak kiemelt jelentőségűek. Kóros telődési viszonyokhoz vezető kórállapothoz leggyakrabban a hipertónia, a szívbillentyűk, a perikardium és az endomiokardium betegségei vezetnek. A pitvari és kamrai aritmiák (pl. pitvarfibrilláció

és pitvari flutter, pitvari tachycardia, kamrai extraszisztolé, kamrai tachycardia), valamint alacsony kamrafrekvenciával járó ritmus- és vezetési zavarok (szinuszcsemó-betegség, pitvar-kamrai blokk) fennállási idejüktől függően szintén szívelégtelenség kialakulását eredményezhetik. A HFrEF patofiziológiájában a szervezet neurohormonális rendszereinek - ezeken belül a szimpatikus idegrendszer és a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) - aktivációja kiemelt szerepet játszik. A tartósan emelkedett neurohumorális és vazokonstriktor ágensek hatására a szívizomzat kóros strukturális és funkcionális átépülése, ún. remodelling jön létre. HFrEF-ben a remodelling excentrikus megjelenésű és főként szisztolés funkciózavart eredményez. Az érintett neurohumorális rendszerek gátlószerei (angiotenzin konvertáló enzim (ACE)-gátlók, angiotenzin receptor-blokkolók (ARB-k) vagy angiotenzin receptor neprilizin inhibitorok (ARNI), béta-blokkolók, mineralokortikoid receptor antagonisták (MRA)) és a nátrium-glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) gátlók a HFrEF kezelésének alappilléreit képezik, ezeket a gyógyszereket - kontraindikáció vagy intolerancia hiányában - minden HFrEF betegnek kapnia kell (I. osztályú ajánlás, A evidencia szint).¹

A HFpEF etiológiai szempontból is különbözik a HFrEF-től.⁹ A HFpEF-ben szenvedő betegek általában idősebbek, nagyrészt nők, köztük gyakoribb az elhízás, a hipertónia, a pitvarfibrilláció, ugyanakkor ritkább a koronária betegség előfordulása. A HFpEF betegeknél rendszerint számos kísérőbetegséget (COPD, vashiány, anémia, veseelégtelenség, depresszió) is fel lehet ismerni. A HFpEF klinikai megjelenése, a betegségben megfigyelhető strukturális és hemodinamikai jellemzők is nagymértékben eltérnek a HFrEF-ben észleltektől (2. táblázat).

	HFrEF	HFpEF
Nem	Férfi > Nő	Nő > Férfi
Átlag életkor (év)	50–70	60–80
Etiológia	Miokardiális infarktus Dilatatív kardiomiopátia	Hipertónia Cukorbetegség Pitvarfibrilláció Tranziens iszkémia
Kórlefolyás	Perzisztens	Gyakran epizodikus
Bal kamrai remodelling megnövekedett kamratérfogattal	+++	0
Bal kamrai remodelling koncentrikus bal kamra hipertrofiával	±	++
Bal pitvari volumen index	Emelkedett	Emelkedett

2. táblázat A HFrEF és a HFpEF klinikai és patofiziológiai jellemzőinek összehasonlítása

HFrEF: szívelégtelenség csökkent ejekciós frakcióval; HFpEF: szívelégtelenség megőrzött ejekciós frakcióval.

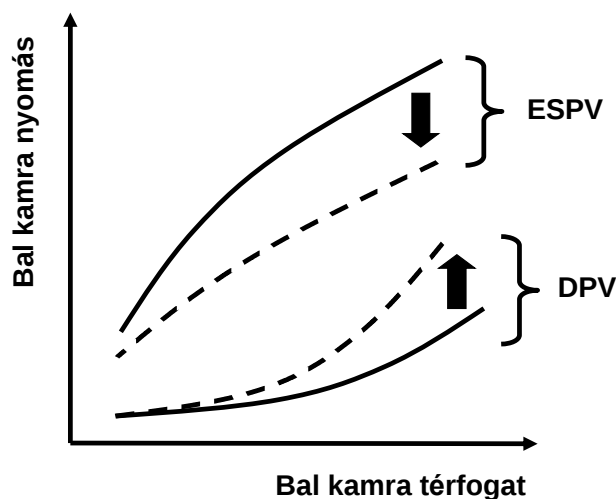
A diabétesz mellitusz (DM) előfordulása szívelégtelenségben egyre nő,¹⁰ a szívelégtelenségben szenvedő cukorbeteg halálozási és hospitalizációs aránya továbbra is különösen magas.¹¹ A DM a szívelégtelen betegek 20-35%-ában fordul elő, HFpEF-ben ez az

arány még magasabb. A 2-es típusú DM és a HFpEF gyakran együttesen fordul elő, hiszen mindkét állapothoz magasvérnyomás betegség, elhízás és idős kor társul. A DM önmagában is közvetlenül károsítja a szívizomzat felépítését és működését, melynek legkorábbi jele a diasztolés funkció romlása. A jelenség patofiziológiája a több mint három évtizedes klinikai- és alapkutató ellenére sem kellően tisztázott,¹² mely nagyban megnehezíti új és hatékony kezelési stratégiák kidolgozását.

Ismert, hogy a hiperglikémia az extracelluláris mátrixban, a szívizom anyagcseréjében, a szívizom kontraktilis rendszerében és a szívizomzatot ellátó erekben számos komplex maladaptív folyamatot indít el. DM-ben az extracelluláris mátrix összetétele megváltozik: az I-es típusú kollagén felszaporodása és a kollagén lebontásáért felelős mátrix metalloproteinázok csökkent expressziója következtében az intersticiális és a perivaszkuláris fibrózis növekedése figyelhető meg.¹³ A glikációs végtermékek (AGEs) olyan fehérjék vagy lipidek, amelyek aldóz cukrokkal való reakciójuk következtében nem enzimátikus úton glikálódnak, majd oxidálódva közel irreverzibilis keresztkötéseket hoznak létre.¹⁴ Lerakódásuk közvetlen és közvetett módon is hozzájárul a balkamrai szívizomzat-feszülés növekedéséhez.

1.4. Hemodinamikai változások HFrEF-ben és HFpEF-ben

A HFrEF-ben a bal kamra szisztolés pumpafunkciójának romlását (a kontrakciós erő és a BKEF csökkenését) hangsúlyozzák, míg a HFpEF-ben definíció szerint a bal kamra relaxációs zavarát - érdemi szisztolés funkcióvesztés nélkül - emelik ki, mely változások bal kamrai nyomás-térfogat összefüggések segítségével is illusztrálhatóak (1. ábra).

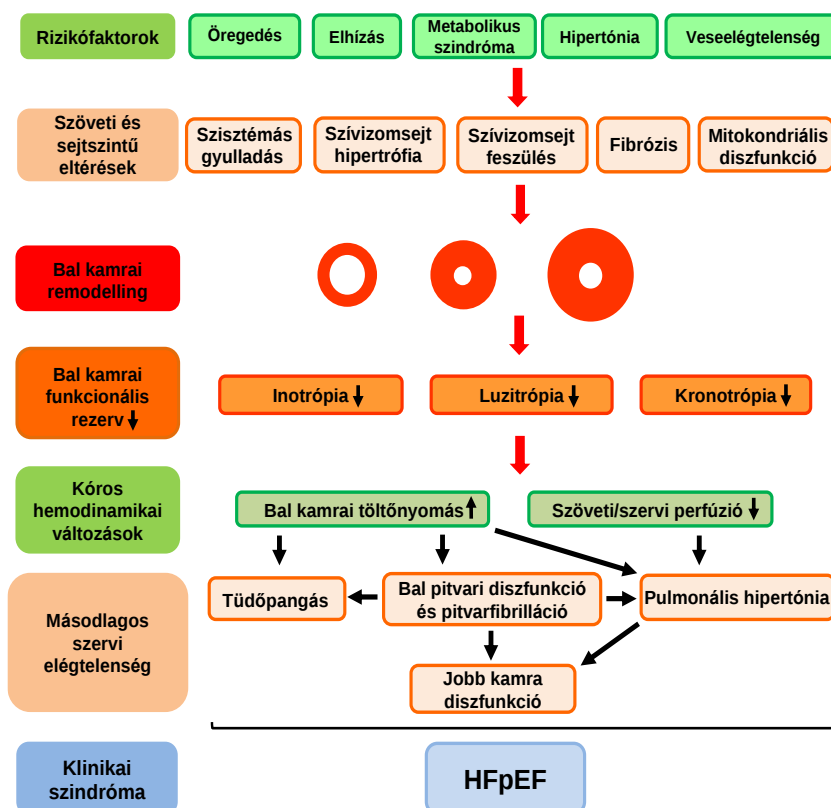


1. ábra A HFrEF és HFpEF illusztrálása nyomás-térfogat diagramm segítségével

HFrEF-ben a bal kamra szisztolés funkciójának beszűkülése a végszisztolés nyomás-térfogat összefüggés (ESPV) meredekségének csökkenésével, míg HFpEF-ben a diasztolés funkció romlása a nyomás-térfogat (DPV) összefüggés meredekségének fokozódásával ábrázolható.

A klinikai gyakorlatban a diasztolés diszfunkció kvantitatívan a transzmitrális korai (MV E, mm/s) és késői pitvari (MV A, mm/s) áramlási csúcssebesség, az E/A arány, a bal kamrai diasztolés nyomáscsökkenés és bal kamrai diasztolés telődés echokardiográfiás paramétereivel jellemezhető. A diasztolés nyomáslejtő abnormalitása a $-dp/dt$ csúcsértékének csökkenésében, az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) és az ehhez tartozó időállandó (τ) megnyúlásában tükröződik.

A HFpEF-ben szenvedő betegek nagy része nyugalomban panaszmentes, fizikai terhelés hatására azonban légszomjérzés, fulladás, esetleg súlyos kisvérköri pangás alakulhat ki. Terhelés hatására a bal kamrai végdiasztolés volumen HFpEF-ben változatlan marad, a pulmonális kapilláris éknyomás (PCWP) viszont nagymértékben emelkedik. Utóbbiak miatt a betegek nehezen tolerálják az elő- és utóterhelés fokozódását, a diasztolés idő csökkenését (tachycardia) vagy a pitvari kontrakció kiesését (pitvarfibrilláció). A kórosan emelkedett bal kamrai töltőnyomás pulmonális pangáshoz, pitvarfibrilláció, pulmonális hipertónia, valamint jobb kamra diszfunkció kialakulásához vezet (2. ábra).¹⁵



2. ábra A HFpEF komplex patofiziológiája

A HFpEF-ben megfigyelhető diasztolés diszfunkció hátterében a szívizomzat kóros relaxációja és megnövekedett passzív feszülése áll. A relaxációs zavart gyakran akut esemény (iszkémia, gyulladás), a csökkent tágulékonyságot pedig leggyakrabban krónikus folyamat (szívizomsejt hipertrófia, fibrózis) okozza. HFpEF-ben a diasztolés diszfunkció mellett a szisztolés funkció kismértékű károsodása (csökkent inotrópia és luzitrópia), valamint kronotróp inkompetencia is megfigyelhető. Mindezek következtében csökken a bal kamrai funkcionális rezerv kapacitás, mely szintén hozzájárul a klinikai tünetek és a terhelési intolerancia kialakulásához. (Pfeffer MA és munkatársai, *Circ. Res.*, 2019, 124 (11): 1598-1617. alapján)

1.5. A HFrEF és a HFpEF gyógyszeres kezelése

Az utóbbi évtizedekben az intenzív kutatásoknak köszönhetően a szívelégtelenség gyógyszeres terápiája jelentős fejlődésen ment keresztül.¹⁶ A bázisterápiát képező gyógyszerek közös jellemzője, hogy csökkentik a mortalitást, a hospitalizációk számát, így javítják a betegség prognózisát. A RAAS-gátló vegyületek közül kiemelendők az angiotenzin-konvertáz enzim (ACE)-gátlók, melyek az ACE mediálta angiotenzin I (ATI) és angiotenzin II (ATII) átalakulás folyamatát gátolják. Az ACE-gátlók vazodilatáció révén csökkentik a bal kamrai utóterhelést, az afterload-ot, de a só- és vízretenció csökkentése révén a bal kamrai előterhelésre, a preload-ra is hatással vannak.¹⁷ A direkt kardiális hatások közül fontos az antiproliferatív, antifibrotikus és anti-remodelling hatás.¹⁸ ACE-gátló intolerancia esetén az ATII receptorának (AT1) közvetlen gátlására angiotenzin-receptor blokkolók (ARB-k) alkalmazásával nyílik lehetőség.¹⁹ A HFrEF-ben számos evidencia áll rendelkezésre a nátriuretikus peptidekhez (NP, pitvari és agyi nátriuretikus peptid: ANP és BNP) köthető útvonalak szerepéről is. Ezen peptid hormonok aktív formáinak pozitív hatásai közül kiemelendő a nátriurézis, a RAAS gátlása, valamint az antiapoptotikus és antiremodellációs hatások. A nátriuretikus peptidek lebontásáért felelős neutrális endopeptidáz, neprilizin gátlásával az aktív forma szintje növelhető, ezáltal számos pozitív hatás érhető el, ahogyan ezt mára több nagy klinikai tanulmány is igazolta.^{20,21} Ennek megfelelően ARB-vel kombinálva a neprilizin inhibitor szakubitril a HFrEF bázisterápiájában szintén alkalmazandó megközelítés, mivel ilyenkor a RAAS gátlás és a NP útvonal befolyásolása egymást erősítve jön létre. Az MRA-k a nátrium-reabszorpció gátlásán keresztül hatékonyan képesek fokozni a nátrium ürítést, továbbá hosszú távon szintén csökkentik a mortalitást, illetve a kórházi kezelések számát is.²² A szimpatikus idegrendszer túlaktivációja szelektív β_1 -receptor blokkolók segítségével valósítható meg, melyek ugyan rövid távon negatív inotróp hatásúak, de hosszabb távon mindezt ellensúlyozzák a mortalitáscsökkentő hatások (pl. remodelláció és RAAS-gátlás, katekolamin okozta miokardiális toxicitás csökkentés).^{23,24} Az SGLT2 gátlók 2021-ben több mérföldkő tanulmány pozitív eredményei alapján bekerültek a HFrEF bázisterápiájába.^{25,26} Az SGLT2 gátlók hatásmechanizmusa még továbbra sem teljesen tisztázott, azonban az ismert, hogy a vese csökkenő glükóz és nátrium-reabszorpciója hozzájárul ezen szerek diuretikus hatásához, következtetésképp hatékonyan csökkentik az intersticiális ödémát és preload-ot is.²⁷

A HFrEF első vonalbeli gyógyszeres kezelését tehát *négy gyógyszercsoport* képezi: 1. ACE-gátlók vagy angiotenzin receptor neprilizin inhibitor (ARNI); 2. béta-receptor blokkolók (BB); 3. mineralokortikoid receptor antagonisták (MRA); 4. nátrium-glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) gátlók.

Azon HF_rEF betegek számára, akik az első vonalbeli gyógyszerek ellenére panaszosak maradnak, ún. *másodvonalbeli gyógyszerek* állnak rendelkezésre. Ebbe a csoportba tartoznak a diuretikumok, az angiotenzin receptor blokkolók (ARB-k), az ivabradin, a direkt vazodilatátor kombináció (hydralazin+nitrát), a digoxin és a szolubilis guanilat cikláz stimulátor vericiguat.

Az elmúlt két évtizedben végzett számos klinikai vizsgálat (perindopril (PEP CHF),²⁸ irbesartan (I-Preserve),²⁹ candesartan (CHARM Preserved),³⁰ spironolakton (TOPCAT),³¹ nebivolol (SENIORS),³² angiotenzin receptor-neprilysin inhibitor LCZ696 (PARAGON-HF),³³ vericiguat (SOCRATES-PRESERVED),³⁴ ivabradin (EDIFY),³⁵ ellenére a HF_pEF kezelésére 2021-ig nem állt rendelkezésünkre olyan bizonyítékokon alapuló terápia, amely a betegek prognózisát lényegesen javítaná. Ennek oka leginkább az, hogy a kórkép patofiziológiája kellő részletességgel továbbra sem ismert. Emiatt nem sikerült olyan klinikai szempontból fontos gyógyszer támadáspontokat azonosítani, mely HF_pEF esetén - a HF_rEF gyógyszeres kezelésében már elért - eredményességet biztosíthatna. Az érvényben lévő szakmai ajánlások szerint a HF_pEF kezelésének a vérnyomás normalizálására, a bal kamra hipertrófia regressziójának elősegítésére (ACE-gátlók, ARB-k, MRA-k), a tachycardia megelőzésére (β -blokkolók), a normál pitvari kontrakció fenntartására (antiarritmiás szerek, abláció) és a pangásos tünetek csökkentésére (diuretikumok) kell irányulnia. A RAAS-re ható szerek HF_pEF-ben tapasztalt relatív hatástalansága és az újabb kutatási eredmények tehát arra hívják fel a figyelmet, hogy a két kórkép kapcsán a miokardium működésének humorális szabályozása is nagymértékben eltérő. HF_pEF-ben a specifikus etiológia tisztázása, a kardiovaszkuláris és nem kardiovaszkuláris társbetegségek azonosítása és megfelelő kezelése, a nátrium- és vízretenció megakadályozására diuretikumok adása javasolt. Örömteli, hogy 2021-ben a HF_{mr}EF és a HF_pEF betegek kezelésére két SGLT2 gátló (empagliflozin (EMPEROR-Preserved) és dapagliflozin (DELIVER)) is hatékonynak bizonyult a kardiovaszkuláris halálozás és a szívelégtelenség miatti kórházi felvételek számának csökkentésében.^{36,37}

Az eddigiekben azt kívántam megvilágítani, hogy a szívelégtelenség kialakulásának középpontjában a bal kamrai szisztolés és/vagy diasztolés funkció hanyatlása áll. Arra is hangsúlyt kívántam fektetni, hogy a jelenlegi gyógyszeres kezelések a szív összehúzódásait és elernyedéseit közvetlenül nem befolyásolják. A hagyományosnak tekintett és széles körben elterjedt β -mimetikus pozitív inotróp hatású gyógyszerekkel kapcsolatban komoly klinikai tapasztalat halmozódott fel, mely a klinikusokat alkalmazásuk korlátozására inti. Az új hatásmechanizmusú, miozin-aktivátor pozitív inotrópokkal kapcsolatban jelenleg még kevés a meggyőző preklinikai és klinikai tapasztalat.

Kutatómunkám során elsősorban olyan erőfeszítéseket kívántam tenni, melyek segítségével a bal kamrai szisztolés és diasztolés funkció HFpEF-ben és HFrEF-ben jelentkező eltérései sejt- és molekuláris szinteken is értelmezhetővé válnak. Kutatási eredményeink a szívelégtelenség jövőbeli kezeléséhez és a pumpafunkció gyógyszeres támogatásához nyújtanak újszerű támpontokat.

1.6. A szívizomzatban bekövetkező strukturális és funkcionális változások a szívelégtelenség különböző formáiban

1.6.1. A szívizomzat kontraktilitását meghatározó tényezők HFrEF-ben és HFpEF-ben

A szív összehúzódásait a szívizomsejtek kontraktilis fehérjerendszerei (ún. miofilamentumok) hozzák létre, melyek szarkomerekbe rendeződve koordinálják a sejtrövidülésekhez és ezáltal erő- és kamrai nyomás-növekedésekhez vezető folyamatokat. A szisztoléhoz a szívizomsejtek intracelluláris kalciumion (Ca^{2+}) koncentrációjának emelkedni kell, míg a relaxáció a Ca^{2+} koncentráció diasztolés szintre történő csökkenését feltételezi. A szívizomsejt kontrakciója és relaxációja tehát az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció tranziens emelkedésének és csökkenésének (röviden a Ca^{2+} tranziensnek) a függvénye. Az ún. vékony (dominánsan aktin) és vastag (dominánsan miozin) miofilamentumok Ca^{2+} -szabályozott interakciója (aktin-miozin ciklus) hatására ébredő erő- és sejthossz-változásokra, mint a szívizomsejt aktív tulajdonságaira hivatkozunk. A szívizomsejt Ca^{2+} -független mechanikai viselkedését, passzív tulajdonságokként jelölik meg. Utóbbiak a szívizomsejt nyújthatóságát, rugalmasságát tükrözik, melyek a miofilamentumokon kívül a szívizomsejtek citoskeletális rendszereinek köszönhetők. A szívizomsejtek aktív és passzív tulajdonságait számos paraméter: pl. az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció, a miofilamentális és citoskeletális fehérjék mennyisége és összetétele, azok foszforiláltsága, oxidatív állapota, a szarkomerek hossza (pl. kamratágulat kapcsán), továbbá különböző élettani és kóros jeltovábbító mechanizmusok együttesen határozzák meg. A szívizomszövet szisztolés és diasztolés működésére a szívizomsejteken kívül az extracelluláris mátrix (pl. a kötőszövet szerveződése, a kollagén lerakódással járó fibrózis stb.), a perikardiális tér, a keringés hemodinamikai paraméterei és szervezetben érvényesülő neurohumorális kontroll egyaránt hatást gyakorol. Mindazonáltal a szív szisztolés és diasztolés funkcióinak megértéséhez és a kóros kontraktilitás javításához csak a szívizomsejtekben érvényesülő folyamatokon keresztül juthatunk el. Kutatómunkám során a szív diasztolés funkcióját befolyásoló celluláris tényezők feltárásának kiemelt figyelmet szenteltem.

A HFrEF-ben észlelt csökkent szívizomsejt-kontraktilitás hátterében a sejtszintű Ca^{2+} mozgásokért felelős fehérjemolekulák szerkezeti, funkcionális változásai, a kontraktilis fehérjerendszer megváltozott Ca^{2+} érzékenysége és az aktin-miozin keresztkötési ciklus kóros működése egyaránt állhat.

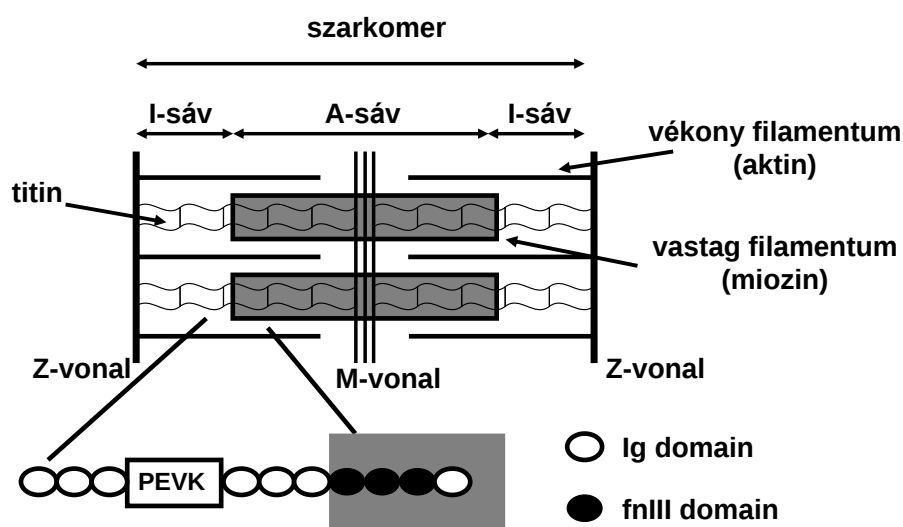
A HFrEF-re jellemző diasztolés diszfunkció során a bal kamra telődése lassú, és a pitvari komponens arányának fokozódása ellenére is csak részleges. Mindezek a kamrafal merevségét tükrözik, mely a szívizomsejtek és az extracelluláris mátrix szerkezet és/vagy passzív funkcióváltozásai következtében jöhetnek létre. Az intracelluláris elemek közül elsősorban a citoskeleton felépítésében szerepet játszó óriásfehérjét, a titint és a mikrotubuláris fehérjéket övezi figyelem, míg az extracelluláris mátrixban a kollagén és az elasztin bír megkülönböztetett jelentőséggel.

A *szívizomsejtek* mechanikai tulajdonságai a miofibrilláris struktúra elemi egységeinek (szarkomerek) hossz-függő viselkedésétől és a Ca^{2+} -szabályozott aktin-miozin interakcióitól elválaszthatatlanok. A szívizomsejtek nyújtása kapcsán tapasztalt erőnövekedés Ca^{2+} jelenlétében a Frank-Starling-mechanizmusról, míg Ca^{2+} hiányában a relaxált izom passzív rugalmasságáról ad felvilágosítást. A szívizomsejtek által generált erő Ca^{2+} -függését ép sejtmembránnal (szarkolemma) határolt, intakt szívizom preparátumokon nehéz megítélni, mert az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a szív ciklus alatt folyamatosan és igen gyorsan változik. Ez a tény és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció pontos mérésének technikai nehézségei miatt a miofibrilláris erő Ca^{2+} -függésének tanulmányozására egyszerűbb rendszerekre van szükség. A mérésekhez leggyakrabban szarkolemmájuktól megfosztott, permeabilizált szívizom preparátumokat alkalmaznak. Az ilyen preparátumok mioplazmatikus terében a szabad Ca^{2+} koncentrációja szabályozható, a kialakult erő pedig ellenőrzött szarkomerhosszak mellett egyidejűleg mérhető. Az egyedi szívizomsejten rögzített hossz-feszülés összefüggés (ún. Starling-görbe) csúcspontja, 2,2-2,3 μm körüli szarkomerhossznál alakul ki, itt maximális a miozin és az aktin közötti interakció hatékonysága. A szívizom esetében a szarkomerhossz ritkán haladja meg a 2,2-2,4 μm értéket, a szívizom masszív elasztikus rendszerei (kollagén, titin) ugyanis megakadályozzák a miofilamentumok túlzott megnyúlását.

A *titin*, vagy más néven konnektin 3000 kDa-t meghaladó molekulatömegével az eddig ismert legnagyobb méretű izomfehérje. A titin szarkomeren belüli pozícióját és sematikus felépítését a **3. ábra** illusztrálja.

A titin molekuláris „rugóként” működve felelős a szívizomsejtek Ca^{2+} független passzív erejének ($F_{\text{passzív}}$) kialakításáért. A titin a fél szarkomeren végighúzódik, kiterjedése a Z lemeztől az M sávig terjed, biztosítja a szarkomer magas fokú rendezettségét.³⁸ Az óriásfehérje

több miofilamentális és regulatórikus fehérjével áll kapcsolatban (pl. miozin nehéz láncok, miozin-kötő C fehérje, miomezin, T-cap fehérje, α -aktinin, aktin, calpain), részt vesz jelátviteli folyamatokban, mechanoszenzorként érzékelni képes a diasztolés megnyúlás és a szisztolés kontrakció alatt bekövetkező erőváltozásokat.³⁹ Szerepe van a korai diasztolés visszarendeződésben, valamint a Frank-Starling mechanizmusra jellemző hosszfüggő aktivációban is.⁴⁰



3. ábra A titin szarkomeren belüli pozíciója és sematikus szerkezete

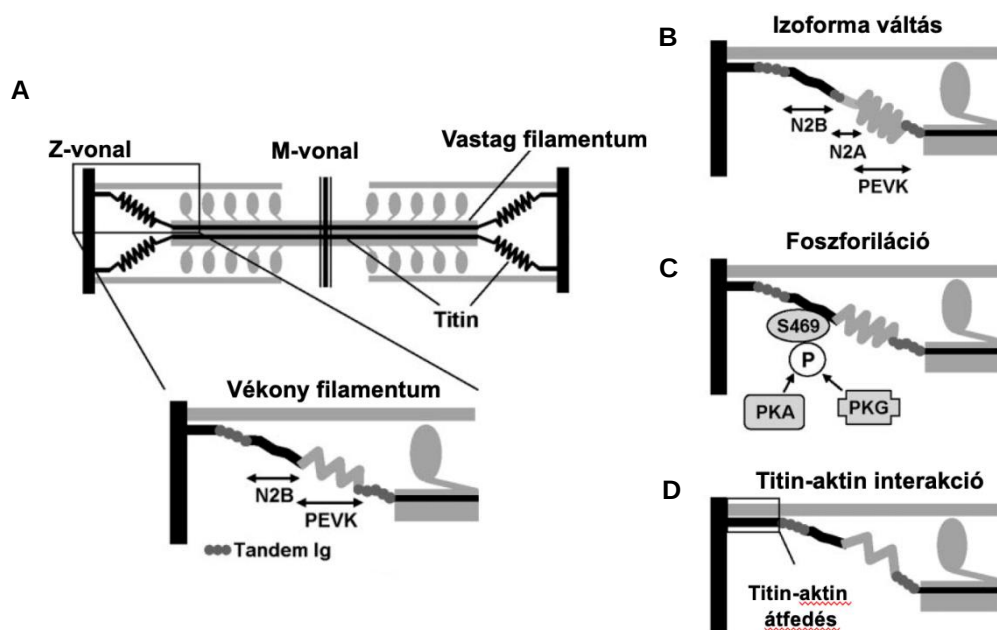
Minden egyes titin fehérje áthidal egy fél szarkomert (a Z-vonalaktól az M-vonalig). A titin filamentumok szerkezetében immunoglobulin (Ig) és III-as típusú fibronektin III (fnIII) domáinek és kevésbé strukturált PEVK szekvenciák (prolin (P), glutamát (E), valin (V) és lizin (K)) ismétlődnek. A titin a szarkomer I-vonalhoz tartozó területén csak immunoglobulin domáinek találhatók.

1.6.2. A miofilamentális fehérjék transzkripciós és poszttranszlációs módosulásai szívelégtelenségben - korábbi kutatási eredmények

Szívelégtelenség során a kontraktilis fehérjék expresszióját, foszforilációs és oxidációs állapotát érintő változásokról számos adat áll rendelkezésünkre.

Emlős szívizomban szövet-specifikus alternatív „splicing” mechanizmussal a titin két izoformája található meg: a hosszabb és rugalmasabb N2BA (~3,2-3,7 MDa) és a rövidebb és merevebb N2B (~3 MDa),⁴¹ melyek aránya egészséges humán szívizomzatban 35:65-re tehető. Rágcsálószívből ugyanakkor szinte kizárólag a rövidebb és merevebb N2B izoforma fordul elő. A titin fehérje nyújthatóságáért a szarkomer I sávjában található, ~1 MDa-os szakasz a felelős, amely a proximális és disztális immunoglobulinszerű (Ig) doméneket, a PEVK (prolinban, glutaminsavban, valinban és lizinben gazdag) régiót, valamint az N2B elemet tartalmazza. Az N2BA izoforma N2A elemet is tartalmaz, ezen kívül egy további, ún. középső Ig doménnel és változó hosszúságú PEVK régióval rendelkezik, melyek biztosítják ezen

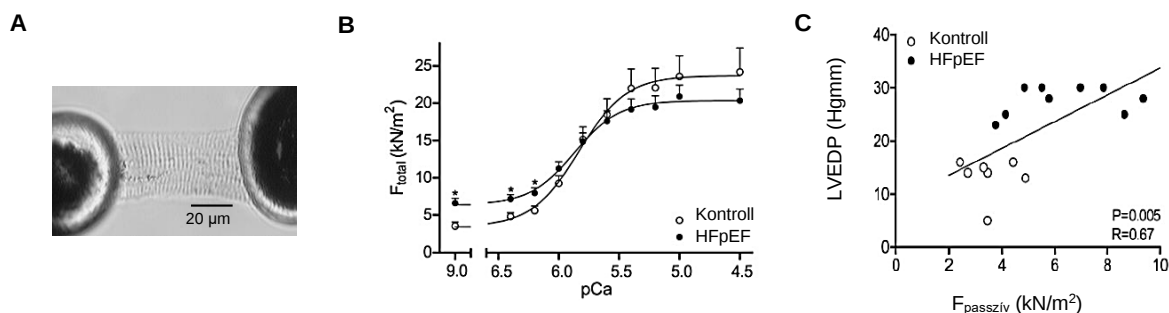
izoforma magasabb fokú rugalmasságát.⁴⁰ Az N2BA és N2B titin izoformák arányának megváltozása (titin izoforma váltás) hatással van a szívizomsejtek passzív feszülésére (4. ábra).⁴²



4. ábra A titin izoforma-váltás, foszforyláció és titin-aktin kölcsönhatás révén módosítja a szívizomsejtek merevségét

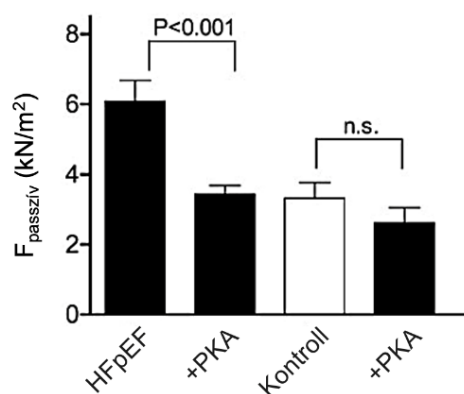
A. A szarkomer szerkezete az N2B titin izoforma I-sávjában található régiójának részletes nézetével, amely mutatja a tandem immunglobulin (Tandem Ig), N2B és rugalmas PEVK szegmenseket. **B-D.** Az N2B titin izoformáról az N2BA titin izoformára való váltás (**B**) az S469-nél a PKG vagy PKA általi foszforyláció (**C**) csökkenti, míg a Z-korongnál a szélesebb titin-aktin átfedés valószínűleg növeli a rugalmas PEVK szegmens merevségét (**D**) (Borbély A. és munkatársai, *Circ. Res.*, 2009, 104:12-14. alapján)

Külföldi kollaborációs partnereinkkel végzett korábbi vizsgálatainkban elsőként mutattunk rá, hogy a HFpEF kialakulásában központi szerepet játszó diasztolés diszfunkció hátterében a szívizomzat kóros relaxációja és a szívizomsejtek Ca^{2+} -tól független ún. passzív feszülés értékének megnövekedése felismerhető. 2005-ben publikált tanulmányunkban HFpEF-ben szenvedő betegek *in vivo* meghatározott hemodinamikai paramétereit, valamint a betegekből diagnosztikus szívkatéterezés során nyert endomiokardiális biopsziák felhasználásával az *in vitro* mért szívizomsejt-funkciót, a miofilamentális fehérje-összetételt és a fibrózis mértékét vizsgáltuk.⁴³ Kimutattuk, hogy a biopsziákból izolált, membránfosztott szívizomsejtekben mért $F_{\text{passzív}}$ kóros mértékben emelkedett. Vizsgálataink legérdekesebb eredményeként összefüggést találtunk a magas $F_{\text{passzív}}$ és a bal kamra diasztolés funkcióját jellemző *in vivo* mért paraméterek (pl. bal kamrai végdiasztolés nyomás, miokardiális stiffness modulus) között (5. ábra).



5. ábra HFpEF-ben szenvedő betegekből diagnosztikus szívkatéterezés során nyert endomiokardiális biopsziákból *in vitro* mért szívizomsejt-funkció és az *in vivo* meghatározott hemodinamikai paraméterek
A. HFpEF-ben szenvedő beteg endomiokardiális biopsziájából izolált, membránfosztott szívizomsejt, melyet érzékeny erőmérő és elektromágneses motor közé rögzítettünk. **B.** Megnövekedett szívizomsejt passzív feszülés HFpEF-ben (* $p < 0,05$ vs. Kontroll). **C.** Összefüggés a szívizomsejt passzív feszülés ($F_{\text{passzív}}$) és a bal kamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP) között. (Borbély A. és munkatársai, *Circulation*, 2005, 111(6):774-781. alapján)

Az emelkedett $F_{\text{passzív}}$ -ot a β -adrenerg útvonal kulcsenzimével, a protein kináz A-val (PKA) történt kezelés a kontroll csoportban mért értékre csökkentette (**6. ábra**).



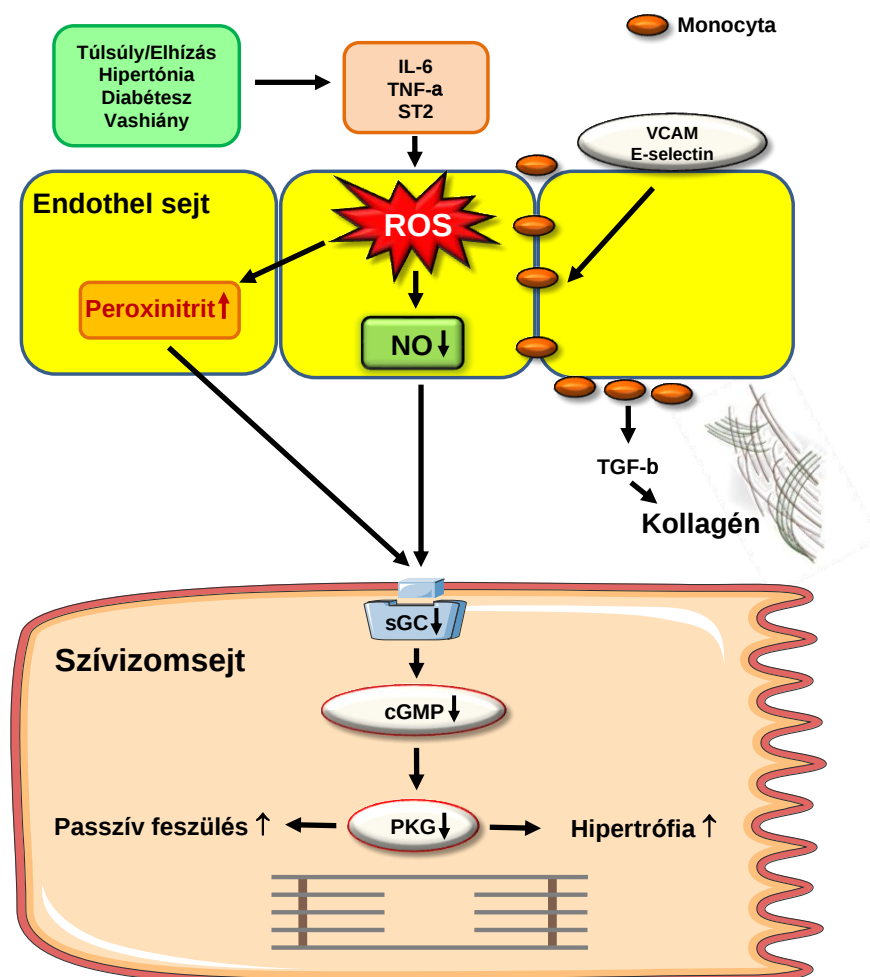
6. ábra A proteinkináz A (PKA) hatása a HFpEF szívizomsejtek passzív feszülésére ($F_{\text{passzív}}$)

A PKA csökkenti a HFpEF szívizomsejtek emelkedett $F_{\text{passzív}}$ -ját, míg a kontroll csoportban (Kontroll) alkalmazott hasonló eljárás hatástalan volt. (Borbély A. és munkatársai, *Circulation*, 2005;111(6):774-781. alapján)

Tekintettel arra, hogy a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ -ot membránfosztott szívizomsejteken határoztuk meg, az emelkedett $F_{\text{passzív}}$ hátterében a miofilamentális fehérjék, feltételezhetően a titin izoforma összetételében és/vagy foszforilációjában bekövetkező változások állhatnak. Irodalmi adatok alapján ugyanakkor a titint érő oxidatív károsodások is fontos szerepet játszhatnak az $F_{\text{passzív}}$ szabályozásában: például az N2Bus régióban oxidáció hatására létrejövő diszulfid hidak növelik a szívizomsejtek passzív feszülését.⁴⁴

A HFpEF betegekből diagnosztikus szívkatéterezés során nyert endomiokardiális biopsziák elemzése során az is kiderült, hogy szívizomsejtek mellett az őket körülvevő extracelluláris mátrixban és a szívizomzat mikrovaskuláris rendszerében is számos kóros eltérés jön létre (**7. ábra**). A HFpEF-ben megfigyelhető endotheliális diszfunkció hátterében nagy valószínűséggel az endothelium gyulladásos folyamatai állnak. HFpEF-ben megváltozik az extracelluláris mátrix összetétele is: az intersticiális térben növekszik az I-es típusú kollagén

lerakódása, elsősorban perivaszkuláris fibrózis alakul ki. Emellett a kollagén lebontásáért felelős mátrix metalloproteinázok expressziójának csökkenését is kimutatták.



7. ábra A szívizomzatban létrejövő változások HFpEF-ben

A HFpEF társbetegségei egy proinflammatorikus állapothoz, a szisztémás gyulladásos markerek (interleukin (IL)-6, tumor nekrosis faktor (TNF)- α , szolubilis ST2 (sST2)) plazmaszintjének emelkedéséhez vezetnek. Ezek hatására a koronária endothel sejtek reaktív oxigén gyököket (ROS) és adhéziós molekulákat (vaszkuláris sejt adhéziós molekula (VCAM) és E-selectin) termelnek. A ROS és a keletkező peroxinitrit hatására az endothel sejtekben csökken a nitrogén-monoxid (NO) képződése, mely a szolubilis guanil cikláz (sGC) aktivitás, a ciklikus guanin-monofoszfát (cGMP) koncentráció és ez által a protein kináz G (PKG) aktivitás csökkenéséhez vezet. Az alacsony PKG aktivitás a szarkomer elasztikus tulajdonságáért felelős óriás szarkomerfehérje, a titin merevebb és rövidebb, N2B izomformájának hipofoszforilációja a szívizomsejtek passzív feszülésének növekedéséhez, valamint szívizomsejt hipertrófiához vezet. Az adhéziós molekulák hatására a monocyták szubendotheliális migrációja következik be, melyek transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) termelése révén növelik a fibroblasztok miofibroblasztokká történő átalakulását. (Paulus WJ, JACC, 2013, (62)4: 263-271. alapján)

A fentiekben vázlatosan ismertetett hemodinamikai paramétereket, a bal kamra morfológiát, a szívizomsejtek passzív feszülését, az extracelluláris mátrix szerkezetét és a mikrovaskulátúra különböző szintjeit érintő változások együttesen, de vélhetően nem mindig egységes mértékben járulnak hozzá a HFpEF-ben megfigyelhető miokardiális diszfunkcióhoz. Továbbá, az elmúlt években a mitokondriális és energetikai diszfunkciók feltételezett kóroki szerepe is a HFpEF kutatások előterébe került. Mindazonáltal a szívizomsejt hipertrófia, a

csökkent NO termelődés, a következményes PKG alulműködés következtében létrejövő fokozott szívizomsejt merevség ($F_{\text{passzív}}$ növekedés) és a fibrózis jelenleg is kiemelt figyelmet érdemel a bal kamrai diasztolés diszfunkció elemzésekor. A felsorolt résztényezők HFpEF-hez rendelhető patofiziológiai jelentősége azonban pillanatnyilag még vitatott.

1.6.3. A mieloperoxidáz enzim (MPO) szerepe a kardiovaszkuláris megbetegedésekben, oxidatív fehérjekárosodások a szívizom kontraktilis fehérjerendszerében

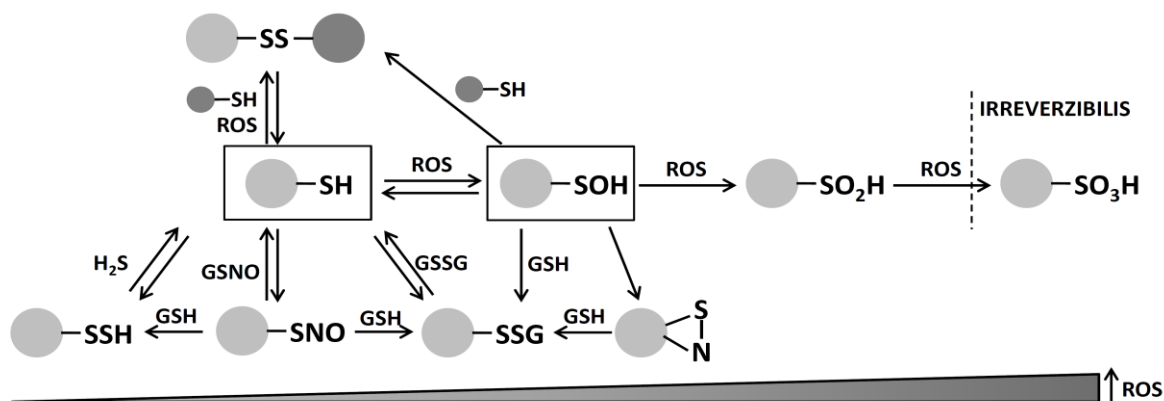
A mieloperoxidáz enzim egy olyan lizoszomális hemfehérje, mely a szívizomban a fehérvérsejtek aktivációjakor szabadul fel. Az enzimműködés következtében oxidatív szabad gyökök keletkeznek, melyek hozzájárulnak a szervezet védekezőképességéhez, de a szívszövetet is károsíthatják. Az MPO ígéretes biomarker számos kardiovaszkuláris megbetegedésben, mivel az enzimnek fontos szerepet tulajdonítanak a miokardiális infarktust követő bal kamrai remodelling kialakulásában.^{45,46} Az MPO plazmakoncentrációja ugyanakkor nem különbözik iszkémiás és non-iszkémiás kardiomiopátiában, ami az enzim általános szerepére utal.⁴⁷

Szívelégtelenségben a reaktív oxigén gyökök (ROS) a kontraktilis rendszer erőgeneráló képességét nemcsak indirekt módon (Ca^{2+} homeosztázis zavara, kinázok aktiválása), hanem a miofilamentális fehérjék funkciójának direkt károsítása révén is képesek csökkenteni. Mindez hozzájárulhat a szisztolés és/vagy diasztolés diszfunkciót létrejöttéhez.^{43,48} A kontraktilis rendszer oxidatív károsodása a szarkomerek szintjén, egyes fehérje-aminosav-oldalláncok poszttranszlációs módosításaival valósul meg, melyeket az alábbiakban részletezem.

Az aminosavláncon belüli metionin (Met) oxidációja során metionin-szulfoxid (MetSO) keletkezik, amely enzimatikusan, a MetSO-reduktáz segítségével képes visszaalakulni a kiindulási aminosavvá.⁴⁹ A MetSO azonban nagyobb mértékű oxidatív károsodás hatására irreverzibilisen metionin-szulfonná alakulhat.⁵⁰

A cisztein (Cis) aminosav fehérjén belüli szabad SH csoportjainak oxidációjakor intra- vagy intermolekuláris *diszulfid hidak* ($\text{RS-SR}'$) keletkezhetnek az instabil szulfénsav (R-S-OH) intermediéren keresztül, vagy anélkül. A szulfénsav további ROS hatására szulfínsavvá ($\text{R-SO}_2\text{H}$), majd szulfonsavvá ($\text{R-SO}_3\text{H}$) alakul. Oxidált glutationnal történő reakcióban glutationilált tiol (RS-SG), hidrogén-szulfid hatására szulfhidrált tiol (R-SSH), NO hatására S-nitrozilált tiol (R-S-NO) képződik, míg nitroxil (HNO) hatására szulfinamid, vagy diszulfid jön létre.⁴⁸ Az S-glutathionilálás és diszulfid-képződés reverzibilis, míg a szulfon sav keletkezése irreverzibilis reakció.⁵¹ Nem minden, Cis-t érintő oxidatív poszttranszlációs módosítás vezet a kontraktilis funkció csökkenéséhez: enyhe oxidatív stresszt követően a fehérjék S-nitrozilálása

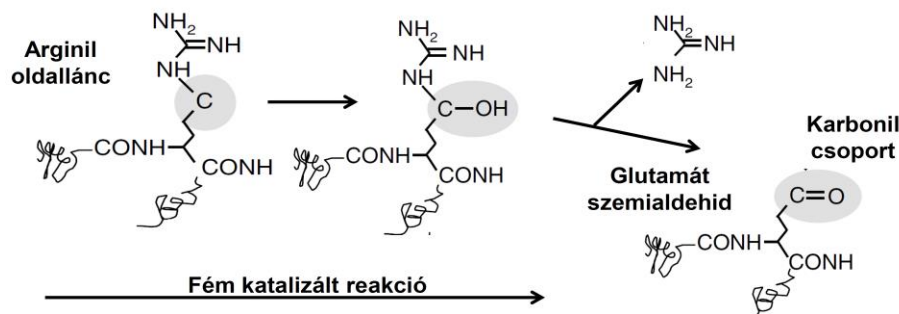
(SNO) kardioprotektív, HNO hatására pedig a kalcium-érzékenység és kontraktilis erő növekedése figyelhető meg (8. ábra).



8. ábra A cisztein oxidatív poszttranszlációs módosításai

A cisztein szabad SH csoportjának reverzibilis átalakulása diszulfiddá (-SS-), vagy szulfénssavvá (-SOH). Protektív mechanizmusok: szulfhidráció (-SSH), S-nitroziláció (-SNO) és S-glutathioniláció (-SSG). A szulfénssav intermedier reakciói: diszulfid, szulfenilamid (-S-N-), valamint szulfínsav (-SO₂H) és szulfonsav (SO₃H) képződés. (A ciszteinhez kapcsolódó polipeptidláncot vázlatosan szürke korongok jelölik.) (Chung és munkatársai, *Circ. Res.* 2013, 112(2): 382-922. alapján)

Nagyobb mértékű oxidatív stressz hatására a szívizomfehérjék *karbonilációja* következik be. Direkt oxidációval a fehérjék lizin, arginin, prolin és threonin aminosav oldalláncain alakulhatnak ki karbonil csoportok. A fém katalizált reakció során aldehidek és ketonok keletkeznek, például glutamát-szemialdehid argininből.⁵² Cisztein, lizin és hisztidin aminosavakon is kialakulhatnak karbonilszármazékok lipidek, karbohidrátok és előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end-products, AGEs) oxidálásával keletkező reaktív karbonil gyökökkel történő másodlagos reakció során (9. ábra).⁵³



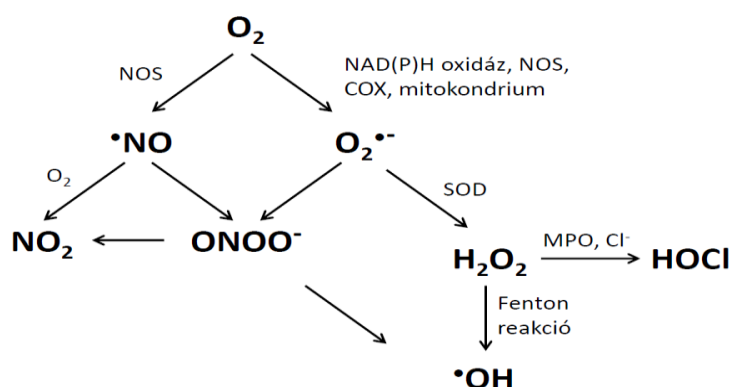
9. ábra Fehérje aminosav oldalláncok karbonilációjának mechanizmusa

(Nyström T, *EMBO Journal*, 2005, 24(7):1311-1317. alapján)

A tirozin aminosavak oxidatív hatásra nitrálódhatnak és klorinálódhatnak. A 3-klorotirozin az mieloperoxidáz (MPO)-működés specifikus markere,⁵⁴ míg nitrotirozin keletkezhet MPO és ONOO⁻ (peroxinitrit) reakciói során is.⁵⁵ MPO hatására a tirozin aminosav

tirozil gyökké is oxidálódhat, majd két tirozil gyök ditirozinná összekapcsolódva fehérje kereszthidakat képez.⁵⁶

Az MPO szubsztrátja, a hidrogén peroxid (H_2O_2) egy stabil és membránpermeabilis molekula, melynek *in vivo* koncentrációja nagymértékben függ a képződési és lebomlási sebességétől.⁵⁷ A H_2O_2 semlegesítését magas H_2O_2 koncentrációnál a kataláz enzim, míg alacsony H_2O_2 koncentrációknál a glutation-peroxidáz enzim végzi. Amennyiben nem semlegesítődik, úgy fémionokkal (vas, réz) reakcióba lépve $\cdot\text{OH}$ -t, a mieloperoxidáz (MPO) enzim ko-szubsztrátjaként pedig hipoklórossavat (HOCl) hoz létre (10. ábra).⁵⁸

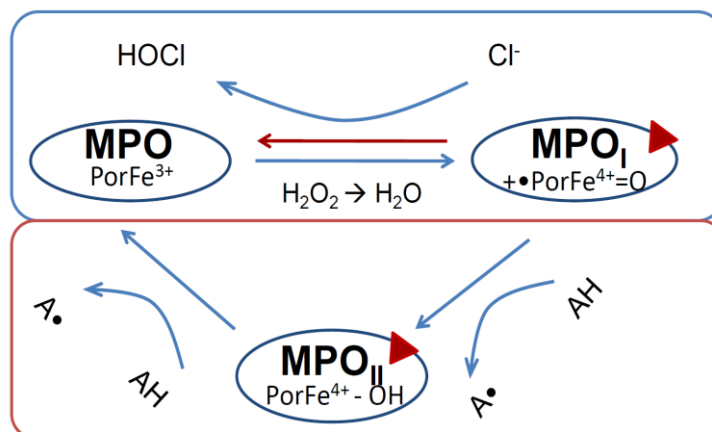


10. ábra Szabadgyökök képződése

Reaktív oxigén és nitrogén intermedierek keletkezése ($\text{O}_2^{\cdot-}$: szuperoxid, H_2O_2 : hidrogén peroxid, $\cdot\text{OH}$: hidroxil gyök, NOS: nitrogén-monoxid szintáz, COX: ciklooxigenáz, $\cdot\text{NO}$: nitrogén-monoxid, SOD: szuperoxid-dizmutáz, NO_2 : nitrogén-dioxid, ONOO^- : peroxinitrit, MPO: mieloperoxidáz, HOCl: hipoklórossav. (Kalyanaraman B, *Redox Biology*, 2013, 1(1):244-257. alapján)

A H_2O_2 szívízomra kifejtett hatásai két csoportba sorolhatók: 1. *direkt* fehérje oxidáció, melynek során a szulfhidril (SH)-csoport oxidáció és/vagy karboniláció megy végbe (aktin, miozin könnyűlánc-1 (MLC-1)); 2. *indirekt* hatások, amikor a H_2O_2 másodlagos messengerként protein kinázokat aktivál (redox signaling, protein-kináz C delta (PKC δ), troponin I (TnI) foszforiláció).⁵⁷ A H_2O_2 koncentrációfüggő módon bal kamrai diszfunkciót okoz patkány szívben⁵⁷ és diszulfid-hídképződést indukál aktin és tropomiozin (Tm) esetében.⁵⁷

Az MPO működése során ROS-t képez, halogenizációs (klorinációs), illetve peroxidáz ciklusán keresztül (11. ábra). Mivel a halogenizációs ciklus két-elektronos oxidációja során hipotiocianát (HOSCN)⁵⁹ és kis mennyiségű hipobrómossav (HOBr) mellett *in vivo* leginkább, kísérleti körülményeink között pedig kizárólag a nagy reaktivitású HOCl keletkezik, ezért a továbbiakban az MPO ezen aktivitására, mint *klorinációs aktivitásra* hivatkozunk. A *peroxidáz aktivitás* működése során reaktív nitrogén intermedierek (nitrozónium ion (NO^+), nitrit, NO_2), tirozil-gyök és ditirozin keletkeznek.



11. ábra A mieloperoxidáz enzim (MPO) klorinációs (fent) és peroxidáz (lent) aktivitása

Mindkét ciklus első lépése a H_2O_2 redukálása vízzé, miközben az enzimben található hem-vas a nyugalmi Fe^{3+} (ferri) állapotból Fe^{4+} (ferril) állapotba kerül (Compound I, $\cdot\text{Fe}^{4+}=\text{O}$). Ebből az aktivált állapotból az enzim két-elektronos oxidációval (halogenizációs ciklus), vagy két egymást követő egy elektronos oxidációval (peroxidáz ciklus) tud natív állapotába visszatérni. Utóbbi esetben a Compound II ($\text{Fe}^{4+}-\text{OH}$) állapot is közbeiktatásra kerül.

Az MPO működése az MPO-inhibitor (MPO-I) 4-aminobenzhidrazid (ABAH) segítségével gátolható. Az ABAH oxidálódik az MPO Compound I és II által, és a képződő gyökök az enzimet a klorinációs és peroxidáz cikluson kívül álló, lassú turnovervel rendelkező Compound III-ba taszítják, így mindkét említett aktivitás gátlódik.⁶⁰ Az MPO gátlása ígéretes terápiás célpont lehet a reperfüziós károsodás kivédésében és/vagy csökkentésében.

A miofilamentális fehérjék módosulása a szívizom iszkémia-reperfüziós károsodása, valamint reaktív oxigén gyökök (ROS) és egyes gyulladásos citokinek kóros mértékű felszabadulása során is bekövetkezhet. Egy korábbi munkánkban a miofibrilláris rendszer peroxinitrit-indukált funkcionális károsodásának hátterében álló folyamatokat vizsgáltuk humán szívizomsejteken.⁴³ Peroxinitrit kezeléseket követően a maximális Ca^{2+} -aktivált erő csökkenésével párhuzamosan a szívizomsejtek harántcsíkolatának nagymértékű elmosódását, valamint az $F_{\text{passzív}}$ növekedését tapasztaltuk. A kontraktilis változásokat az aktív erőgeneráló keresztkötések számának csökkenésével magyaráztuk. Megállapítottuk, hogy a peroxinitrit inkább strukturális, mint regulatórikus változásokat okoz a kontraktilis rendszerben, hiszen sem az erőgenerálás Ca^{2+} -érzékenysége és a kontraktilis fehérjerendszeren belül uralkodó kooperativitásra ($p\text{Ca}_{50}$ és n_{Hill}), sem az aktin-miozin ciklus sebességére (k_{tr}) nem volt szignifikáns hatással. Az α -aktinin nitrálódás mértéke és a humán szívizomsejtek Ca^{2+} -aktivált erőgenerálása között fordított arányosságot mutattunk ki. Az MPO enzim működése következtében képződő ROS szívizomsejtekre kifejtett közvetlen hatásairól azonban viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. A miofilamentális fehérjék, valamint az óriás szarkomer fehérje, a titin oxidatív változásainak diasztolés diszfunkcióban betöltött szerepe szintén nagyrészt ismeretlen.

1.6.4. A női nem és a stressz szerepe kardiovaszkuláris megbetegedésekben

A biológiai nem fontos szereppel bír a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában, az alkalmazott terápia hatékonyságában, valamint a mortalitásban.⁶¹ A menopauza előtt álló nők esetén kisebb a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának valószínűsége a menopauzán már átesett nőkhez, valamint a férfiakhoz viszonyítva. Menopauza előtt álló nőknél kisebb a BK hipertrófia és remodelling incidenciája, valamint az iszkémia/reperfúziós károsodás mértéke.⁶² A HFpEF előfordulása viszont gyakoribb idős nők esetében, melyhez hozzájárul az elhízás és a diabétesz magasabb prevalenciája, valamint a női szívizomzat emelkedett intrinzik feszülése is.⁶³ Ezen megfigyelések a női nemi hormonok (ösztrogén és progeszteron) kardioprotektív hatását valószínűsítik.

Az ösztrogén hatását magreceptorain ($ER\alpha$ és $ER\beta$), valamint membránreceptorán (GPR30) keresztül fejt ki. Az ösztrogénreceptorok kimutathatóak szívizomsejtekben, fibroblasztokban, endotél- és érfal simaizom sejtekben nőkben és férfiakban egyaránt.⁶³ Az ösztrogénreceptorok upregulációját mutatták ki hipertrófiában és szívelégtelenségben, míg $ER\beta$ knockout egéren megnövekedett bal kamra hipertrófiát és fibrózist,⁶³ valamint nagyobb iszkémia/reperfúziós károsodást és nekrozist észleltek.⁶² Az ösztrogén elősegíti az NO mediált vazodilatációt, iszkémia/reperfúziós károsodás során az L-típusú Ca^{2+} csatornákat S-nitrozilálva csökkenti a sejtek Ca^{2+} túltöltődését, a ROS termelődés és az apoptózis csökkentésén keresztül antiinflammatorikus és antioxidáns hatású.⁶⁴

Stressz állapotokban - mint a kortizol prekursora - a mellékvese progeszteron termelése és szekréciója nemtől és ösztrogéntől függetlenül emelkedik.⁶⁵ A progeszteron gyulladásos reakció gátlása révén csökkenti az iszkémia/reperfúziós károsodás mértékét,⁶⁶ emellett a repolarizáció felgyorsításával antiaritmikus hatást fejt ki,⁶⁷ és képes gátolni az szívizomsejtek apoptózisát.⁶⁸

Az ismert kardiovaszkuláris rizikófaktorok mellett a pszichoszociális stressz is káros hatást gyakorol a kardiovaszkuláris rendszerre. Ennek egyik megnyilvánulása a Takotsubo-kardiomiopátia (TCM, stressz kardiomiopátia, „broken heart” szindróma).⁶⁹ TCM-ban a katekolamin szint ugrásszerű emelkedése után a BK apikális hipokinézise és ballonszerű tágulata következik be, melynek hátterében a β_2 -adrenerg receptorok stimulatorikus G fehérjéről (G_s)-ről inhibitorikus G fehérjére (G_i) történő átkapcsolódását⁷⁰ és az ennek hatására bekövetkező szívizomsejt kontraktilitás csökkenését valószínűsítik. A szimpatikus idegrendszer aktiválódása a β -adrenerg jelátvitelen keresztül központi szerepet játszik a szívizomsejtek kontraktilis funkciójának és Ca^{2+} érzékenységének szabályozásában. A kontraktilis fehérjék (miozinkötő C-fehérje (MyBP-C), troponin-I (TnI), titin) PKA-mediált

foszforilációja befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis működését.^{71,72} A menopauzához köthető hormonális változások szívizomsejt mechanikára kifejtett hatásai azonban nagyrészt feltáratlanok.

1.7. Új gyógyszeres lehetőség a szív pumpafunkciójának javítására: miozin aktivátorok

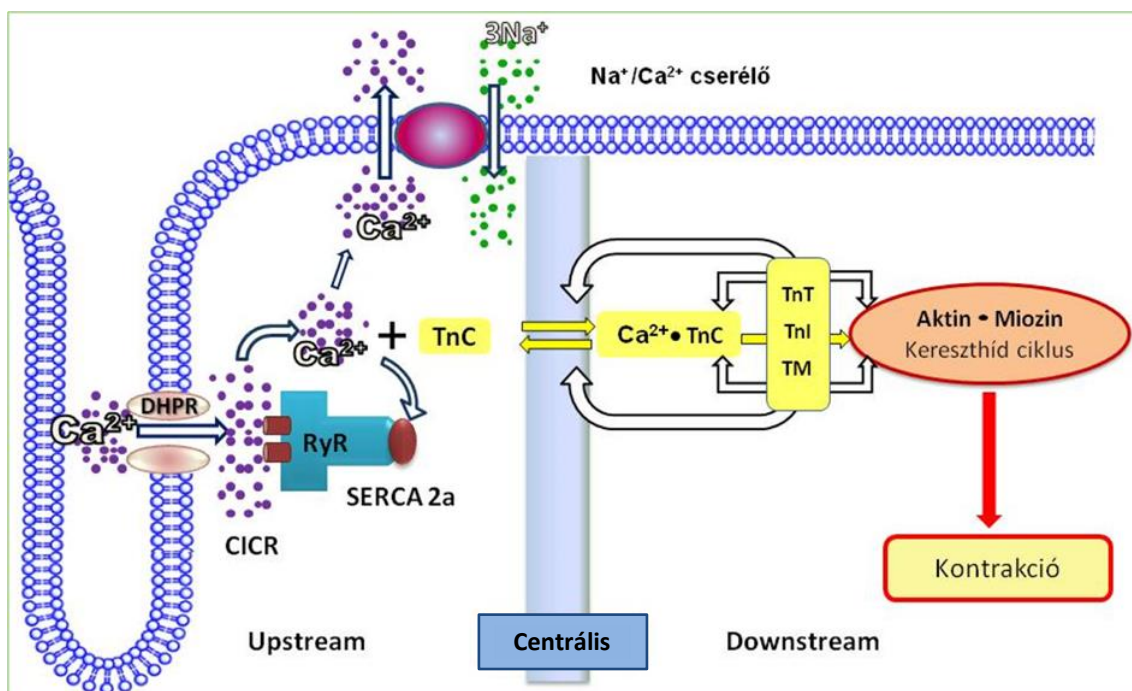
A szívelégtelenség progressziója során az optimális gyógyszeres és eszközös kezelés ellenére a betegek állapota gyakorta romlik, előrehaladott szívelégtelenség („advanced heart failure”) alakul ki. Ebben a betegcsoportban a definitív terápiát a szívtranszplantáció, illetve bizonyos betegek esetében a mechanikus keringéstámogatás jelenti.¹ Ezek a terápiás modalitások az igen szigorú kritériumok miatt sajnos csak kevés beteg számára érhetőek el. A betegek nagyobb hányadánál a konzervatív, gyógyszeres kezelés kerül alkalmazásra, melynek egyik hatékony eszköze lehet a pozitív inotróp/inodilátor kezelés (12. ábra).⁷³ Ezen szerek hosszútávú használata azonban növeli a mortalitást és nem képes csökkenteni a hospitalizációk számát sem.^{74,75} A jelenlegi kutatások célja ezért olyan szelektív, a szívizom kontraktilitást fokozó (pozitív inotróp) gyógyszerek kifejlesztése, amelyek már a HFrEF korábbi stádiumában is alkalmazhatók és elsődlegesen a szív pumpafunkciójának javítását célozzák.

A konvencionális, „upstream” mechanizmusú pozitív inotróp szerek (dobutamin, dopamin, milrinon, adrenalin, noradrenalin és szívglikozidok) az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt szignáltranszdukciós és/vagy receptorális útvonalak módosításával befolyásolják. Ezek a szerek a dobutamin a β_1 -receptorok aktiválásán keresztül olyan foszforilációs folyamatokat iniciálnak, melyek végső soron a szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedéséhez vezetnek, egyúttal fokozzák a miokardium energiaigényét és oxigénfelhasználását. A hatásukra sokszor kialakuló intracelluláris Ca^{2+} -túltöltöttség pitvari és kamrai aritmiák kialakulásának kedvez.

A „centrális” mechanizmusú gyógyszer, levosimendan (Levo) növeli a troponin C (TnC) Ca^{2+} iránti affinitását, az ATP-szenzitív K^+ -csatornák aktiválásán keresztül pedig vazodilatációt vált ki, ezért ezt a szert inodilátornak is nevezik. A Levo nagyobb plazmakoncentrációk esetén foszfodiészteráz-3 (PDE3)-gátló hatást is mutat.

A „downstream” mechanizmusú szerek nem befolyásolják az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, így mentesek a konvencionális pozitív inotróp szerek mellékhatásaitól, energetikailag is kedvezőbbek a szívizomsejteknek. Ezen gyógyszercsoport egy korábbi képviselője az EMD 53998 (EMD), mely egy enantiomer molekula. Egyik párja downstream mechanizmus útján hat, míg a másik PDE3-gátló hatással rendelkezik. Ide tartozik az omecantiv mecarbil (OM)

és a danicamtiv, melyek a miozin-ATPáz aktivitásának fokozásával hatnak, ezért miozin-aktivátoroknak is nevezik őket.⁷⁶



12. ábra. A pozitív inotróp szerek csoportosítása és hatásmechanizmusuk (magyarázat a szövegben) (Ca^{2+} : kalcium; CICR: Ca^{2+} -indukálta Ca^{2+} -felszabadulás; DHPR: dihidropiridin-receptor; RyR: rianodin-receptor; SERCA2a: szarkoplazmatikus retikulum ATP-áz; TnC, TnI és TnT: troponin C, I és T; TM: tropomiozin) (módosítva Endoh M., *Circ. J.*, 2008, 72:1915-1925. alapján)

Az OM és a danicamtiv szelektíven kötődnek a kardiális típusú miozin S1 régiójához, és fokozzák ATP-hidrolizáló képességét. Ez gyorsítja az ADP és P_i képződését, valamint a P_i disszociációját a miozinefejről, így felgyorsítva a ciklus sebességhatározó lépését és a miozin-ADP komplex keletkezését. Ez az átalakulás elősegíti a miozin gyengén kötött konformációjából az erősen kötött konformációs állapotba történő átmenetét, amit a kontaktilis erőgenerálás fokozódása követ. Teoretikusan így növekszik az egy ciklus alatti aktin-miozin interakciók száma, lehetővé téve a nagyobb erő kifejtését az oxigénfelhasználás növekedése nélkül.⁷⁷ Preklinikai vizsgálatok során igazolták, hogy az OM jelentősen képes fokozni a patkányból izolált szívműködés kontrakciós erejét, a kontrakciós idő kisfokú elnyújtása révén, mindezt a szisztolés intracelluláris Ca^{2+} tranziens befolyásolása nélkül. *In vivo* vizsgálatok során OM hatására különböző szívelégtelenség-állatmodellekben a bal kamra funkció javult az oxigénfelhasználás fokozódása nélkül. Az első dóziskereső klinikai vizsgálat, illetve az ATOMIC-HF vizsgálat során intravénás OM kezelést hasonlítottak össze placeboval,⁷⁸ míg a COSMIC-HF vizsgálatban per os kezelést alkalmaztak, mindkettőben HFrEF betegekkel.⁷⁹ A vizsgálatokban az OM javította a szisztolés funkciót, növelte a

szisztolés ejekciós időt (SET), jól tolerálható és biztonságos volt, de kismértékű plazma troponin I (TnI) növekedést okozott, ami nem függött össze az alkalmazott dózissal. A GALACTIC-HF vizsgálatban az OM-al kezelt betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt az elsődleges összetett végpont, de a kardiovaszkuláris halálozásban nem volt különbség.⁸⁰ A danicamtiv, mint új miozin-aktivátor, hasonló hatásokat mutatott, de szélesebb terápiás ablakot és nagyobb kontraktilis funkció-javító potenciált ígért. Fázis I. klinikai vizsgálatok alapján a danicamtiv biztonságos, és szívelégtelen betegekben javította a bal kamra szisztolés funkcióját.⁸¹ A danicamtivra vonatkozó preklinikai és klinikai adatok ugyanakkor továbbra sem egyértelműek, különösen ennek az új miotrópnak a diasztolés funkcióra kifejtett hatásaira vonatkozóan léteznek bizonytalanságok.⁸²

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a szívelégtelenség különböző klinikai formáiban a szívizomzatban bekövetkező kóros molekuláris és sejtszintű változások tanulmányozását, valamint az új miozin aktivátorok szívizom kontraktilitásra kifejtett hatásainak vizsgálatát tűztük ki célul.

Az alábbi konkrét kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen hasonlóságok/különbségek ismerhetők fel a HFrEF-ben és HFpEF-ben szenvedő betegek szívizomzatában?
2. Hogyan és milyen mértékben járul hozzá a bal kamrai diasztolés diszfunkcióhoz a szöveti fibrózis, a glikációs végtermékek jelenléte és a szívizomsejt passzív feszülés-növekedése diabéteszes és nem diabéteszes HFrEF és HFpEF betegekben?
3. Mi lehet a β -blokkoló kezelés eltérő klinikai hatásainak molekuláris magyarázata HFrEF-ben és HFpEF-ben?
4. Felelőssé tehető-e a titin izoforma összetételében és/vagy foszforilációjában bekövetkező változások a szívelégtelenségben kóros mértékben megnövekedett szívizomsejt passzív feszülésért?
5. Hogyan és milyen mértékben járulnak hozzá a MPO peroxidáz és klorinációs aktivitásának következtében létrejövő oxidatív miofilamentális fehérjemódosulások a bal kamrai szisztolés és diasztolés diszfunkcióhoz? Revertálhatóak vagy kivédhetőek-e a MPO-indukált funkcionális hatások és biokémiai változások?
6. A női nemi hormonok hiánya és az akut stressz hatással van-e a bal kamrai izolált szívizomsejtek erőgenerálására? Milyen poszttranszlációs miofilamentális fehérjemódosulások magyarázhatják a szívizomsejtek kontraktilis funkciójában bekövetkező változásokat?
7. Milyen hatással van az OM izolált, intakt szívizomsejtek szisztolés és diasztolés funkciójára, a kontrakció kinetikájára, valamint az intracelluláris Ca^{2+} -tranzienstre *in vitro*?
8. Hogyan befolyásolja az új típusú miozin-aktivátor, a danicamtiv a szív ciklus időtartamait, a szisztolés és diasztolés funkciót *in vivo*?

3. MÓDSZEREK

3.1. Szívizomminták

Komperatív tanulmányainkban szívkatéteres vizsgálat során diagnosztikus céllal vett bal kamrai endomiokardiális biopsziákat, az oxidatív miofilamentális fehérjekárosodás szerepét vizsgáló kutatásainkban humán szívűtétek (szívtranszplantáció, bal kamrai aneurysma rezekció) során végstádiumú szívelégtelenségben, aorta sztenózisban szenvedő betegekből, valamint technikai okok miatt fel nem használt donor szívekből származó bal kamrai szívizomminták vizsgálatát végeztük. A donorok kórtörténetében kardiovaszkuláris megbetegedés nem szerepelt, a halál oka baleset, szubarachnoidális vérzés, agyi kontúzió és vérzéses stroke volt. A betegek az agyhalál megállapítása előtt rövid ideig intravénás dobutamin, furosemid és plazmatérfogató növelő kezelésen kívül más gyógyszeres terápiában nem részesültek. A szívek eltávolítást követően kardioplégias oldatba (110 mM NaCl, 16 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 1,2 mM CaCl₂, 5 mM NaHCO₃, pH 7,4) kerültek, majd a bal kamrai szívűmintákat folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztás után felhasználásig -80°C-on tároltuk. A humán szívűzommintákon végzett kísérleteink a Helsinki Deklarációban megfogalmazott irányelveknek megfelelően, a Magyar Egészségügyi Minisztérium (engedély szám: No. 323-8/2005-1018EKU) és a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek.

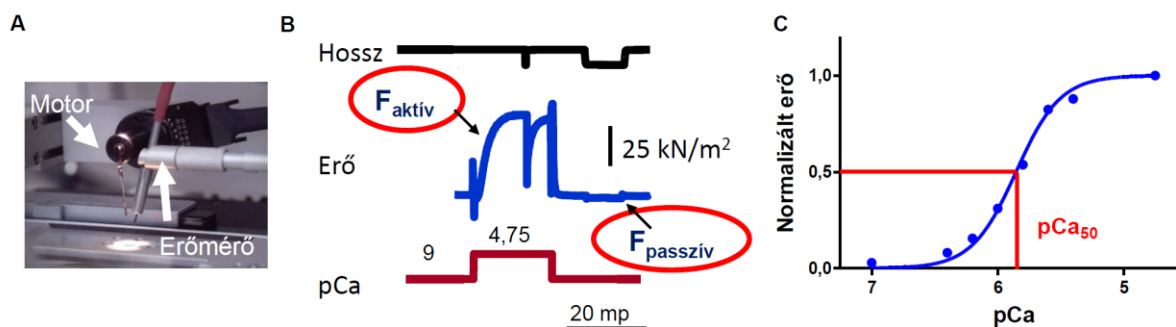
Az akut stressz és női nemi hormonok hatását az eszéki J.J. Strossmayer Egyetem Orvostudományi Karának Orvosi Biológia Intézetében létrehozott, ovariectomizált (OVX) patkánymodellen vizsgáltuk (16 nőstény Sprague-Dawley patkány). Kontrollként életkorban megegyező, nem operált nőstény patkányok szolgáltak. 28 hetes korban kontroll és OVX állatokat akut stressz kezelésnek vetettek alá (cold restrained stress, kontroll-S és OVX-S csoport). Altatást és vérvételt követően a szívet kimetszették, a bal kamrát leválasztották, folyékony nitrogénbe helyezték, majd -80°C-on tárolták. A kísérleti protokollt az Eszéki Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. A minták szállítása az Eszéki Orvostudományi Egyetem és a Debreceni Egyetem között meglévő mintaszállítási egyezmény alapján történt (DETTI/22-3/2013).

Az OM-al folytatott *in vitro* vizsgálataink során ivarérett, kutatási célra tenyésztett, hím és nőstény kutyákból olyan enzimatikusan izolált, bal kamrai szívűzomsejteket használtunk, melyek intakt membránrendszerrel rendelkeztek. Az elektrofiziológiai tulajdonságok szempontjából a kutyából izolált szívűzomsejtek meggyőzően alkalmazhatóak az emberi

szívizomsejtek modellezésére. A vizsgálatok a Debreceni Egyetem Állatetikai Bizottsága által jóváhagyott protokollok szerint történtek (4-1/2019/DEMÁB).

3.2. Kontraktilis erő mérése izolált-szívizomsejt mérőrendszer segítségével

A szívizomsejtek izolálása során a fagyasztott bal kamrai szívizom minták darabjait először felolvasztottuk, majd proteáz inhibitorokat is tartalmazó izoláló oldatban mechanikai szövethomogenizátor segítségével diszpergáltuk. Ezt követően a szívizomsejteket 0,5%-os Triton-X-100 detergenssel kiegészített izoláló oldat segítségével permeabilizáltuk. Az erőmérések során a szívizomsejtek végeit szilikon ragasztó segítségével egy érzékeny erőmérőhöz és egy mozgatható elektromágneses motorhoz rögzítettük, a preparátumok átlagos szarkomer hosszát $2,3 \mu\text{m}$ -re állítottuk be (**13. ábra**). A méréseket az erőmérő rendszerhez kapcsolt, kamerával ellátott fénymikroszkóp 15°C -os tárgyasztalán végeztük. Az erőparaméterek meghatározása aktiváló, illetve relaxáló oldatokban történt, melyek pCa értéke (a Ca^{2+} koncentráció negatív tízes alapú logaritmus $(-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}])$) 4,5, illetve 9 volt. A köztes Ca^{2+} koncentrációjú oldatokat az aktiváló és relaxáló oldatok megfelelő arányú elegyítésével hoztuk létre a Fabiato és Fabiato által kidolgozott módszer alapján.⁸³ Az izometriás erőt a szívizomsejtek relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő átmozgatását követően mértük. Az erő kifejlődése után egy elektromágneses motor segítségével a preparátum hosszát az eredeti hossz 80%-ára (20%-kal) csökkentettük, majd 2 ms múlva visszaállítottuk az eredeti sejthosszat („release-restretch”). Ezen manőver során a képződött aktin-miozin keresztkötések felszakadtak, az erő a maximális értékről nullára esett (totál erő ($F_{\text{totál}}$)), majd a jelenlévő Ca^{2+} jelenlétében újraépült. A Ca^{2+} -független, passzív erőkomponenst ($F_{\text{passzív}}$) relaxáló oldatban hasonló, de hosszabb (8 s) manőver alkalmazásával határoztuk meg. Az $F_{\text{totál}}$ -ból kivonva az $F_{\text{passzív}}$ -ot kiszámítható a szívizomsejt Ca^{2+} -függő aktív ereje ($F_{\text{aktív}}$). Az $F_{\text{aktív}}$ és $F_{\text{passzív}}$ értékeket a preparátum keresztmetszetére normalizálva, kN/m^2 -ben adtuk meg. A szubmaximális Ca^{2+} koncentrációjú oldatokban mért $F_{\text{aktív}}$ -ot az aktiváló oldatban ($\text{pCa } 4,75$) kapott erőértékhez viszonyítva ábrázoltuk, és így egy szigmoid görbét kaptunk. A görbe illesztésével $F = F_{\text{max}}[\text{Ca}^{2+}]^{\text{nHill}} / (\text{pCa}_{50}^{\text{nHill}} + [\text{Ca}^{2+}]^{\text{nHill}}) + F_{\text{passzív}}$, a vizsgált szívizomsejt kontraktilis fehérjerendszere kvantitatív szempontból jellemezhető volt (az összefüggésben az F egy adott Ca^{2+} koncentrációhoz tartozó „steady-state” erő, az F_{max} a maximális erő, az nHill a fehérjerendszerben uralkodó kooperativitást jellemző konstans, a Ca^{2+} érzékenységet pedig a félmáximális erő létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} koncentrációt (pCa_{50}) adta meg). Az illesztést minden egyes szívizomsejt kapcsán megvalósítottuk, a meghatározott paraméterekből átlagokat számoltunk.



13. ábra Membránfosztott szívizomsejtek kontraktilis erejének mérése

A. Az izometriás erőmérő rendszer központi része, bal oldalon a mozgatható elektromágneses motor, jobb oldalon az érzékeny erőmérő. B. A Ca^{2+} függő aktív erő ($F_{\text{aktív}}$) és Ca^{2+} független passzív erő ($F_{\text{passzív}}$) meghatározása. C. A Ca^{2+} érzékenységet jellemző pCa_{50} paraméter meghatározása a szívizomsejtek normalizált Ca^{2+} -erő összefüggését ábrázoló szigmoid görbe segítségével.

A proteinkináz A (PKA) $F_{\text{passzív}}$ -ra gyakorolt hatásának értékeléséhez a humán szívizomsejteket PKA katalitikus alegységével (100 U/ml) és antioxidáns dithiotreitollal (DTT, 6 mmol/l) kiegészített relaxáló oldatban 40 percig inkubáltuk. A proteinkináz G (PKG) hatásának tanulmányozására $F_{\text{passzív}}$ méréseket végeztünk PKG1 α -t (0,1 U/ml), guanozin cGMP-t (10 $\mu\text{mol/l}$) és DTT-t (6 mmol/l) tartalmazó relaxáló oldatban történő inkubációk előtt és azt követően. Ezt követően a szívizomsejteket a fent leírtak szerint PKA-val inkubáltuk, és $F_{\text{passzív}}$ -jukat újra megmértük. A vékony filamentum $F_{\text{passzív}}$ -hoz való hozzájárulásának vizsgálatához a HFrEF és HFpEF szívizomsejteket 40 percig inkubáltunk az aktin-fedő fehérjével, a gelsolinnal (0,05 mg/ml; FX-45 klón), majd ezt követően PKA-kezelést végeztünk. Az ún. gyenge keresztídhöz való kölcsönhatás hozzájárulásának vizsgálatára a szívizomsejtek $F_{\text{passzív}}$ -ját 2,3-butanedione monoxime-ot (BDM) tartalmazó relaxáló oldatban (40 mmol/l 5 percig) is megmértük.

Az MPO funkcionális hatásának tanulmányozása során az $F_{\text{aktív}}$ -ot, az $F_{\text{passzív}}$ -ot, valamint pCa_{50} -et az MPO-szubsztrát H_2O_2 (30 μM , 15 perc), MPO+ H_2O_2 (MPO 8 U/l), MPO+ H_2O_2 +MPO-I (4-aminobenzhidrazid, 50 μM) és MPO+ H_2O_2 +Metionin (Met, 10 mM) kezelések előtt, illetve azokat követően is meghatároztuk. Az MPO+ H_2O_2 által kiváltott hatások revertálhatóságát a redukálószer dithiotreitollal (DTT, 10 mM, 30 perc) alkalmazásával vizsgáltuk. A különböző kezelések $F_{\text{aktív}}$ -ra és $F_{\text{passzív}}$ -ra kifejtett hatásait a kezelés előtt mért (kezeletlen) értékekhez viszonyítva, százalékos formában adtuk meg. A kapott értékeket az izoláló oldatban inkubált (15 perc) szívizomsejtek erőgenerálásához viszonyítottuk (idő kontroll). Az egyes kezelések során 3-4 szívből származó 5-12 szívizomsejtet használtunk.

Az akut stressz és az ovariectomia szívizomsejt funkcióra kifejtett hatásainak vizsgálatokor - a humán szívizomzaton folytatott kísérletekhez hasonlóan - az $F_{\text{aktív}}$ -ot, az

$F_{\text{passzív}}$ -ot, valamint a pCa_{50} -et mértük a kontroll, stressznek kitett kontroll (kontroll-S), ovariectomizált (OVX) és stressznek kitett ovariectomizált (OVX-S) állatcsoportokban.

3.3. Fény- és elektronmikroszkópos kvantitatív hisztomorfometria

Az endomiokardiális szívizomminták strukturális elemzése során reprezentatív mintákon meghatároztuk a szívizomsejt átmérőt (MyD), von Gieson elastica festett szívizommetszeteken a kollagéntartalmat (kollagén térfogat arány - CVF), a miofibrilláris sűrűséget és a glikációs végtermékek (AGEs) lokalizációját és intenzitását.

3.4. A miofilamentális fehérjék és a titin izoforma összetételének és foszforilációjának vizsgálata

A szívizomminták miozin nehéz lánc, dezmin, aktin, troponin T (TnT), tropomiozin, troponin I (TnI), miozin könnyű lánc 1 és 2 (MLC-1 és MLC-2) tartalmát és ezen fehérjék degradációját egydimenziós SDS poliakrilamid elektroforézis segítségével vizsgáltuk. A fehérjék foszforilációs állapotát ProQ[®] Diamond foszfoprotein gélfestékkel vizsgáltuk, míg a fehérjemennyiség meghatározását SYPRO Ruby, vagy Coomassie blue festékkel végeztük. A fehérjék foszforilációs szintjét fehérje mennyiségre normalizáltuk és egy belső kontrollhoz viszonyítva, százalékos értékben kifejezve adtuk meg.

A titin izoformák elkülönítésére agarózzal megerősített 2%-os SDS géleket használtunk, az izoforma expressziót és foszforilációt SYPRO Ruby és ProQ Diamond festési eljárásokkal vizsgáltuk. Az eredményeket izoforma (N2B/N2BA) és foszforilált izoforma (P-N2B/P-N2BA) arányokként fejeztük ki.

3.5. MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérése

Az MPO klorinációs és peroxidáz aktivitásának mérését speciális, kereskedelmi forgalomban elérhető kitek segítségével végeztük. A *klorinációs aktivitást* mérő esszé működése során az MPO által generált hipoklorit (OCl^-) alakítja át a nonfluoreszcens szubsztrátot erős fluoreszcenciával rendelkező fluoreszcinné, míg a *peroxidáz aktivitást* mérő esszé esetén az MPO a nonfluoreszcens ADHP-t fluoreszcens resorufinná alakítja. A keletkező fluoreszcencia intenzitás-növekedést különböző hullámhosszon detektáltuk. A fluoreszcencia intenzitás értékeket a telítést megelőzően lineáris regresszióval illesztettük, a függvény meredeksége szolgált az MPO aktivitásának meghatározására. Az MPO hiányában mért értéket háttérnek tekintettük, az enzimaktivitást erre normalizáltuk. Az $MPO+H_2O_2$ aktivitás értékeit tekintettük 100%-nak, ehhez hasonlítottuk az MPO-I, valamint a Met hatását.

3.6. Fehérje SH-oxidáció, karboniláció és foszforiláció meghatározása

A humán és patkány bal kamrai szívizomszövetből nyert szívizom homogenizátumokat *in vitro* alkalmazott enzim (MPO), enzim gátló (MPO inhibitor), oxidáló (H_2O_2 , dithiodipiridin (DTDP)) és redukáló (DTT, metionin) szerekkel történt kezelések előtt és azokat követően molekulatömegük szerint szétválasztottuk (SDS-gélelektroforézis). Ezt követően a miofilamentális fehérjék izoforma összetételét, oxidatív módosulásait speciális festési eljárások és/vagy Western immunoblot technika segítségével vizualizáltuk. A miofilamentális fehérjék oxidációs (Ellman reakció, SH csoport oxidáció) és karbonilációs állapotának meghatározására (Oxy-blot technika) az ismert módszereket permeabilizált szívizomsejtekre adaptáltuk.

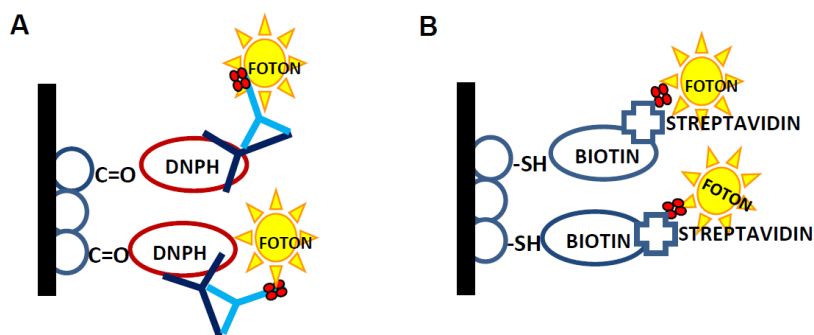
3.6.1. A miofilamentális fehérjék SH tartalmának meghatározása Ellman-reakcióval

Az MPO hatására a miofilamentális fehérjerendszeren bekövetkező SH-oxidációt Ellman-reakció segítségével vizsgáltuk. A membránfosztott bal kamrai, humán szívizomsejteket 15 percen keresztül izoláló oldatban inkubáltuk (idő kontroll), vagy $30\ \mu M\ H_2O_2$ -t, illetve $38\ U/l\ MPO+H_2O_2$ -t tartalmazó izoláló oldatban kezeltük. Mosási lépéseket követően a mintákat Ellman-reagensben inkubáltuk, amely a fehérjék SH csoportjával reagálva sárga színű 2-nitro-5-tiobenzoesavat (NTB) hoz létre. Az NTB abszorbanciáját $412\ nm$ -en mértük. Az ismert SH tartalmú N-acetil-L-cisztein (NAC) standard sor Ellman-reagenssel történő inkubáció után mért abszorbancia értékeit használtuk kalibrációs görbeként (exponenciális illesztés). A minták SH tartalmát $1\ mg$ liofilizált szívizom homogenizátumra vonatkoztatva adtuk meg, 100%-nak tekintve az idő kontroll (izoláló oldat) minták SH-tartalmát.

3.6.2. Fehérje oxidáció meghatározása SH-csoport biotinálási módszerrel

Az SH-biotinálás során membránfosztott szívizomsejteket izoláltunk, majd H_2O_2 -ot vagy $MPO+H_2O_2$ -ot tartalmazó izoláló oldatban kezeltük. Pozitív kontrollként az oxidálószer DTDP-vel kezelt minták szolgáltak. A miofilamentális fehérjék SH csoportjait biotinnal jelöltük, majd mosást követően mintapufferben szolubilizáltuk. Centrifugálást követően a fehérjekoncentrációt a felülúszóból dot-blot módszerrel határoztuk meg. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) során a miofilamentális fehérjék méret szerinti elválasztásához 0,5% agarózzal erősített 2 és 4%-os, valamint 10%-os és 15%-os poliakrilamid géleket, ezen kívül 4-15%-os grádiens géleket használtunk. Nitrocellulóz membránra történő transzfert követően a fehérjemennyiséget fluoreszcens fehérje festékkel (Sypro Ruby Protein Blot Stain)

határoztuk meg. A biotinnal jelölt SH csoportokat tormaperoxidázzal konjugált streptavidinnel mutattuk ki, majd a mosás után kapott jeleket felerősített kemilumineszcens módszer (ECL) segítségével tettük láthatóvá (14. ábra).



14. ábra A fehérje karboniláció vizsgálata Oxyblot™ technikával (A) és az SH-oxidáció vizsgálata SH-csoport biotinálással (B)

C=O - karbonil csoport; DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazin; SH - szulfhidril csoport

3.6.3. Fehérje karboniláció vizsgálata

Humán, bal kamrai szívizom mintákat H_2O_2 és MPO kezelésnek vetettük alá. Pozitív kontrollként Fenton-reagenssel kezelt mintákat alkalmaztunk. A mintákat mintapufferben oldottuk fel, centrifugálást követően a felülúszót felhasználva elvégeztük a karbonil- csoportok derivatizálását. A derivatizált és neutralizált minták fehérjetartalmát centrifugálást követően dot-blot módszer segítségével határoztuk meg. A fehérjék elválasztására gélelektroforézist végeztünk, a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a pontos fehérjemennyiséget Sypro Ruby fehérje blotfestékekkel határoztuk meg. Ezt követően a gyártó által előírt módon a derivatizált karbonil csoportokat felismerő elsődleges, valamint másodlagos antitestet alkalmaztuk. A karbonilált fehérjéket ECL módszerrel tettük láthatóvá (14. ábra). Az OxyBlot™ módszerrel meghatározott fehérje karbonilációt fehérjemennyiségre normalizáltuk, majd a karboniláció mértékét karbonilációs index formájában adtuk meg. (KI=1 - nek tekintettük az ún. idő kontroll minták karboniláltsági állapotát).

3.7. A Ca^{2+} szint változások és szarkomerhossz rövidülések egyidejű mérése

A szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} -szintjét Fura-2 AM Ca^{2+} érzékeny ráciometrikus fluoreszcens festékekkel követtük. Olyan téglalap alakú sejteket választottunk ki, amelyek vizuális ellenőrzés során a téringerlésre szabályos összehúzódásokat produkáltak és morfológiailag is épnek tűntek. A téringerlés során szobahőmérsékleten 0,1 Hz-es frekvenciát alkalmaztunk. A Fura-2 Ca^{2+} telítettség függvényében eltérő hullámhosszokon gerjeszthető,

Ca^{2+} kötött formában 340 nm-en, míg Ca^{2+} hiányában 380 nm-en rendelkezik excitációs maximummal. Így a 340, illetve 380 nm-en gerjesztett Fura-2 festék fluoreszcencia arányainak a változása jól tükrözi az intracelluláris térben létrejövő Ca^{2+} -szint változását. A fluoreszcens emissziót mindkét hullámhossz esetében 510 nm felett detektáltuk, és a rögzített jeleket a FeliX szoftver segítségével 120 Hz-en digitalizáltuk. A Felix GX szoftver a szarkomerhossz moduljának segítségével választottuk ki a szívizomsejt azon régióját is, mely abban segített, hogy nyomon követhessük az összehúzódások alatti szarkomerhossz változásokat. A kísérleti protokoll a következő volt: szobahőmérsékleten a szívizomsejteket először 0,1 Hz-en legalább 2-3 percig stimuláltuk, annak érdekében, hogy minden kísérlet elején elérjünk egy állandósult „steady-state” állapotot. Az egyes kísérletben alkalmazott gyógyszerekkel OM-al (0,03 μM , 0,1 μM , 0,3 μM vagy 1 μM végkoncentrációban), Levo-nal (1 μM) vagy EMD-vel (1 μM) 5-8 percig inkubáltuk a sejteket, majd ismételt téringerléseket kezdtünk és rögzítettük a kontrakciókat és a Fura-2 arány változásait.

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

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

3.9. Patkánymodell, *in vivo* kísérletek

Az *in vivo* kísérleteket 8-12 hetes felnőtt Sprague-Dawley patkányokon ($n=14$, súly: $417,90 \pm 51,95$ g) végeztük. Az echokardiográfia során folyamatosan három elvezetéses EKG monitorizálás történt. A danicamtivot iv. 2 mg/kg dózisban, egyszeri bolusban adtuk be az előzőleg kanülált farokvénába.

3.9.1. Konvencionális echokardiográfia

A transzthorakális echokardiográfiát (TTE) a Vevo 3100 képalkotó rendszerrel végeztük, amely a Vevo Imaging Station-t tartalmazta, és egy magas frekvenciájú transzducerrel (MX250, 14-28 MHz) volt felszerelve. Az echokardiográfia a danicamtiv iv. beadása után 5 perccel kezdődött és legfeljebb 15 percig tartott. Az adatgyűjtést B-, 2D-, M- és Doppler-módban

végeztük, paraszternális hosszú- és rövidtengelyű (PSLAX és PSAX), valamint szupraszternális (SST) és csúcsi 4 üregű (A4C) nézetekből. A vizsgálatokat az American Society of Echocardiography iránymutatásai szerint végeztük el. A szívfrekvenciát (HR, ütés/perc) az EKG monitorizálás során számítottuk oly módon, hogy öt másodpercre jutó szív ciklusokat megszámoltuk és ebből kalkuláltuk az egy percre vonatkoztatott átlagfrekvenciát. A falvastagságot és a BK átmérőket M-módban, a papilláris izmok középső szintjén, PSLAX és PSAX nézetekből, a bal pitvari maximális átmérőt (mm), az aorta gyök átmérőt (mm) szintén M-módú felvételekből mértük. A végdiasztolés átmérőt (EDD, mm) és a végszisztolés átmérőt (ESD, mm), PSLAX M-módú felvételeken az endo- és epikardiális határok manuális jelölésével határoztuk meg. A BK térfogatát diasztolében és szisztolében (EDV, illetve ESV; μL) a szoftver a következőképpen számította ki: $(7,0/(2,4+EDD))*EDD^3$, illetve $(7,0/(2,4+ESD))*ESD^3$. A BKEF (%) $100*(EDV-ESV)/EDV$ érték szerint mértük. Továbbá vizsgáltuk frakcionált rövidülést (FS; %), a pulzustérfogatot (μl), a CO-t (ml/perc). Az endokardiális falösszehúzódnak kinetikájának mérésére az BK hátsó falán mért M-mód képre illesztettünk egy egyenest és ebből számítottuk a meredekségnek megfelelően a sebességet (Mvel, mm/s).

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

3.9.2. Strain echokardiográfia

A strain paraméterek meghatározását az előre felvett felvételek elemzésével offline végeztük. A hagyományos echokardiográfia során nagy képkockasebességű (>200 fps) B-mód

felvételeket rögzítettünk, mind a PLAX és PSAX nézetből. A képeket lassított felvételben (1/8) értékeltük a VevoStrain[®] kiterjesztéssel felszerelt VevoLAB[®] szoftver segítségével. A hosszanti és radiális strain paramétereket a PLAX nézetből, míg a cirkumferenciális strain paramétereket a PSAX nézet képeiből értékeltük, a papilláris izmokat kihagyva. A kamra határait meghatároztuk, és a speckle-tracking rendszer a körvonalazott kamra melletti körkörös területeket rendelte hozzá. Az iv. danicamtiv beadása után elemeztük a radiális szisztolés csúcs- és átlagsebesség értékeket (cm/s), a globális longitudinális strain (GLS; %), a globális cirkumferenciális strain (GCS; %)

3.9.3. Elektrokardiográfia

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

3.10. Adatelemzés és statisztika

A membránfosztott szívizomsejtek erőgenerálását egy Magyarországon egyedülálló, személyre szabott erőmérő rendszer segítségével mértük (National Instruments). Az eredmények értékeléséhez és ábrázolásához Excel (Microsoft, 2007) és GraphPad Prism 5.0 programokat használtunk. Az adatokat az ábrákon és a szövegben átlag $\pm$ SEM formájában tüntettük fel. Statisztikai elemzésére varianciaanalízist (ANOVA, Bonferroni- és Dunnet-posthoc teszt), vagy többszintű kevert-hatás lineáris regressziós analízist, Ca²⁺-erő összefüggések összehasonlításához Student-féle páros és párosítatlan *t*-tesztet alkalmaztunk.

A kemilumineszcens (antitestek), fluoreszcens (Sypro Ruby-fehérjemennyiség, Pro Q Diamond-foszforiláció), valamint Coomassie jelek intenzitásának meghatározására a görbe alatti terület mérését ImageJ és Magic Plot programok segítségével végeztük. A fehérje foszforiláció, nemi hormonok és szívizomsejt funkció közötti összefüggéseket lineáris regresszióval határoztuk meg. Az eredmények kiértékelése és grafikonok elkészítése a GraphPad Prism 9.0 szoftverben történt (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Az *in vitro* mérések során az egyes csoportokban a kísérletek száma 7 és 11 között változott 6 különböző szívből. A háttér fluoreszcencia-intenzitási szinteket a mérések végén egy szívizomsejt nélküli régióból nyertük és manuálisan kivontuk a fluoreszcencia-

intenzitásokat. Tizennégy patkányt vizsgáltunk a danicamtiv iv. kezelése előtt és után. Minden kísérlet esetében a kapott eredményeket értékeltük a normalitás szempontjából (Kolmogorov-Smirnov normalitási teszt), majd páros t -tesztekkel, vagy közöséges egyirányú ANOVA-val, vagy Kruskal-Wallis-teszttel többszörös összehasonlítással elemeztük. A mérési adatokat $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ értékeként adtuk meg.

Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak egy változást, ha p értéke kisebb volt, mint 0,05.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

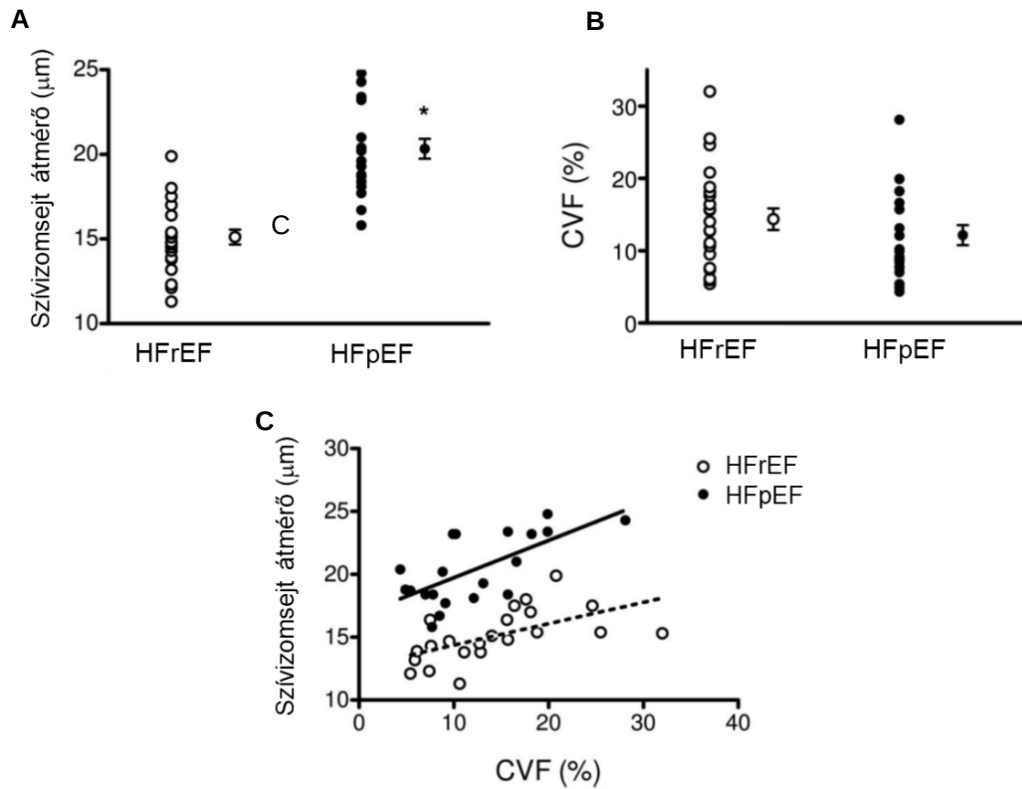
4.1. Strukturális és funkcionális különbségek HFrEF-ben és HFpEF-ben

Ebbe a vizsgálatba olyan szívelégtelenségben szenvedő betegeket ($n=58$) vontunk be, akik akut szívelégtelenség tüneteivel kerültek kórházi felvételre.⁸⁴ Minden betegnél az iszkémiás és a gyulladásos kóreredit kizárására koronarográfia és endomiokardiális biopszia vétel történt. Mindazokat a betegeket, akiknél a koronarográfia szignifikáns koszorúér-szűkületet, valamint a szövettani vizsgálat infiltratív vagy gyulladásos kórereditet igazolt, kizártuk a vizsgálatból ($n=14$). A fennmaradó 44 beteget a BKEF alapján HFrEF betegcsoportba ($n=22$, BKEF= $34\pm 2\%$), valamint az ESC Diasztolés Szívelégtelenség Munkacsoportjának ajánlása szerint⁸⁵ megőrzött BKEF-el és kórosan emelkedett bal kamrai végdiasztolés nyomással (LVEDP) jellemezhető HFpEF ($n=22$, BKEF= $62\pm 2\%$) betegcsoportba osztottuk.

A HFpEF csoportban több beteg szenvedett magasvérnyomás betegségben és volt elhízott, mint a HFrEF betegek között. A HFpEF betegekben szignifikánsan magasabb LVEDP-t, szívindexet, bal kamrai falvastagságot, bal kamrai tömeg index/végdiasztolés nyomás hányadost (LVMI/LVEDP) és alacsonyabb végdiasztolés térfogat indexet (EDVI) mértünk, mint a HFrEF betegcsoportban.

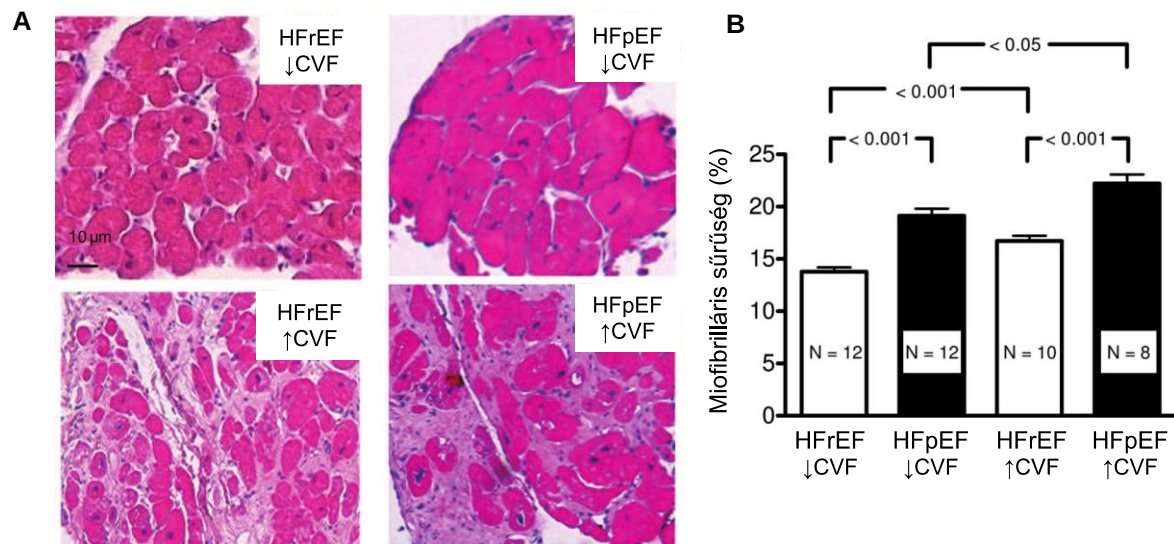
A két betegcsoportból származó szívizombiopsziák fénymikroszkópos feldolgozásának eredményei alapján a HFpEF betegekben szignifikánsan, mintegy 25%-kal nagyobb átmérőjű szívizomsejteket találtunk, mint a HFrEF betegekben ($20,3\pm 0,6\ \mu\text{m}$ vs. $15,1\pm 0,4\ \mu\text{m}$; $p<0,001$). A kollagén térfogat arány (CVF), az intersticiális fibrózis mértéke nem különbözött a két betegcsoportban. Ha a szívizomsejtek átmérőjét a CVF függvényében ábrázoltuk szignifikáns összefüggést találtunk a két paraméter között. Ez arra utal, hogy a szívizomsejtek átmérő növekedésével párhuzamosan a fibrózis mértéke is progrediál mindkét betegcsoportban (**15. ábra**).

A miofibrilláris sűrűség és a CVF közötti kapcsolatot tovább szemlélteti a **16. ábra**. Az átlagos CVF-et használtuk a HFrEF és HFpEF betegek alacsony (átlag alatti) vagy magas (átlag feletti) CVF csoportokra való felosztásához. Mind a HFpEF-ben, mind az HFrEF-ben a legnagyobb miofibrilláris sűrűség magas CVF esetén figyelhető meg. Mind alacsony, mind magas CVF esetén a legnagyobb miofibrilláris sűrűség HFpEF-ben figyelhető meg.



15. ábra Szívizomsejt átmérő és kollagén térfogat arány (CVF) HFrEF-ben és HFpEF-ben

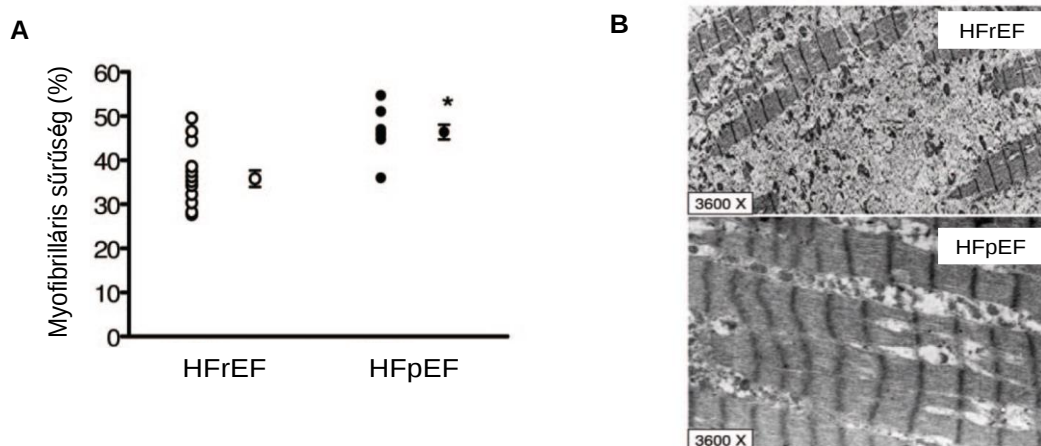
A. A szívizomsejt átmérő nagyobb volt a HFpEF-ben (* $p < 0,001$). **B.** A kollagén térfogat arány (CVF) egyéni értékei. **C.** A szívizomsejt átmérő és a CVF közötti kapcsolat. A CVF adott szintjein a szívizomsejt átmérő nagyobb volt HFpEF-ben, és hasonlóan nőtt HFrEF-ben és HFpEF-ben a fibrózis előrehaladtával. (van Heerebeek L. és munkatársai, *Circulation*, 2006, 113(16): 1966-1973. alapján)



16. ábra HFrEF és HFpEF szívizomzat (endomiokardiális biopsziák) fénymikroszkópos szövettani képei és miofibrilláris sűrűség a két szívelégtelenség fenotípusban

A. Az alacsony kollagén térfogat aránnyal (CVF) rendelkező HFrEF, a magas CVF-el rendelkező HFrEF, az alacsony CVF-el rendelkező HFpEF és a magas CVF-el rendelkező HFpEF reprezentatív szövettani példái. A CVF-től függetlenül a miofibrilláris sűrűség nagyobb volt HFpEF-ben. **B.** HFrEF és HFpEF esetén a miofibrilláris sűrűség nagyobb volt magas CVF esetén. Alacsony és magas CVF esetén a miofibrilláris sűrűség nagyobb volt a HFpEF-ben. A számok az oszlopokban az egyes csoportokban lévő betegek számát jelzik. (van Heerebeek L. és munkatársai, *Circulation*, 2006, 113(16): 1966-1973. alapján)

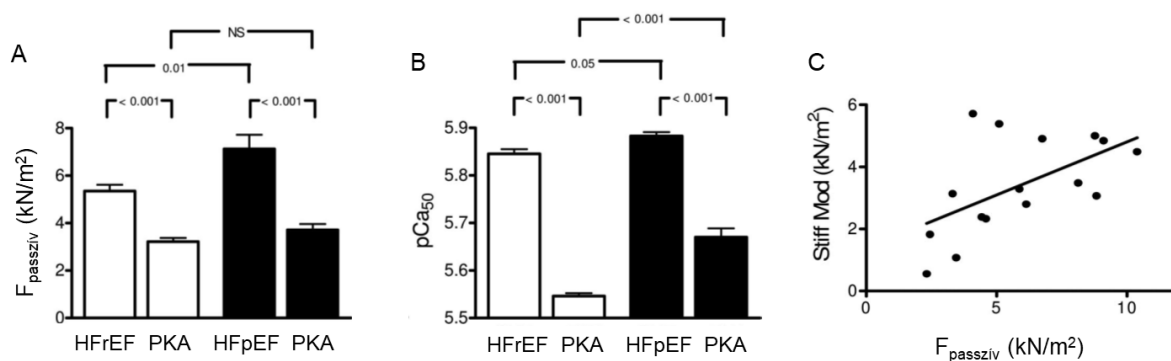
Az elektronmikroszkópos hisztomorfometria segítségével meghatározott miofibrilláris sűrűség nagymértékű csökkenését, a miofibrillumok eltűnését találtuk a HFrEF-ben, míg ez a HFpEF-ben nem volt megfigyelhető ($36\pm 2\%$ vs. $46\pm 2\%$; $p<0,001$) (17. ábra). A mitokondriumok négyzetmikrométerenkénti száma és a kapilláris bazális membrán vastagsága hasonló volt az HFrEF és a HFpEF esetén.



17. ábra Miofibrilláris sűrűség HFrEF-ben és HFpEF-ben

A. A miofibrilláris sűrűség magasabb volt a HFpEF-ben (* $p<0,001$). **B.** Elektronmikroszkópos felvételek, amelyek a miofibrillumok eltűnését mutatják HFrEF-ben (fent). (van Heerebeek L. és munkatársai, *Circulation*, 2006, 113(16): 1966-1973. alapján)

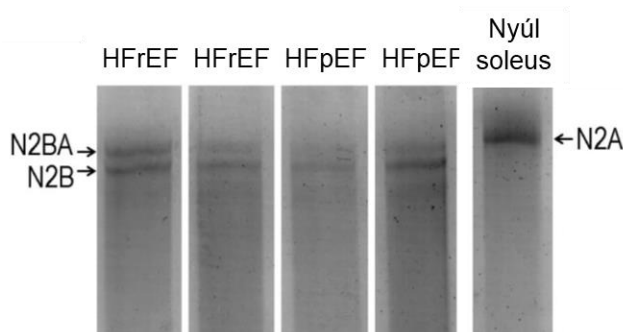
A szívizomsejtek kontraktilis funkciójának megítélésére a szívizombiopsziákból mechanikusan izolált, membránjaiktól megfosztott szívizomsejteken izometriás erőmérést végeztünk (18. ábra). A HFpEF-ben szenvedő betegek szívizomsejtjeinek $F_{passzív}$ értéke szignifikánsan magasabb volt, mint a HFrEF betegeké ($7,1\pm 0,6$ kN/m² vs. $5,3\pm 0,3$ kN/m²; $p<0,01$). PKA kezelés hatására az $F_{passzív}$ szignifikáns mértékben csökkent mindkét betegcsoportban, az $F_{passzív}$ csökkenése nagyobb volt ($p<0,01$) a HFpEF-ben, mint az HFrEF-ben, mivel az $F_{passzív}$ hasonlóan alacsony szintre csökkent az HFrEF-ben ($3,2\pm 0,2$ kN/m²) és a HFpEF-ben ($3,7\pm 0,3$ kN/m²). A maximális aktivációnál mért F_{total} nem változott a PKA után egyik csoportban sem. HFpEF betegek szívizomsejtjeinek Ca^{2+} érzékenysége szignifikánsan nagyobb volt, mint a HFrEF betegekből származóké. PKA kezelés hatására a pCa_{50} mindkét csoportban jelentősen csökkent, de a Ca^{2+} érzékenység nagyobb mértékű csökkenését tapasztaltuk HFrEF-ben. A HFpEF betegeknél az $F_{passzív}$ korrelált a betegekben *in vivo* mért szívizom stiffness modulussal ($r=0,56$; $p=0,02$) és LVEDP-vel ($r=0,52$, $p=0,001$). Ezek az összefüggések hiányoztak HFrEF-ben.



18. ábra Szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ és Ca^{2+} érzékenység (pCa_{50}) változása HFrEF-ben és HFpEF-ben proteinkináz A (PKA) kezelés hatására

A. Az $F_{\text{passzív}}$ magasabb volt HFpEF-ben. A PKA-kezelés csökkentette az $F_{\text{passzív}}$ -ot HFrEF-ben és HFpEF-ben. **B.** A pCa_{50} magasabb volt HFpEF-ben, mint HFrEF-ben, és mindkét csoportban csökkent a PKA után. **C.** Az $F_{\text{passzív}}$ és a szívizom stiffness modulus (Stiff Mod) közötti kapcsolat HFpEF betegekben ($r=0,56$, $p=0,02$). (van Heerebeek L. és munkatársai, *Circulation*, 2006, 113(16): 1966-1973. alapján)

Funkcionális méréseinket követően arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a PKA melyik célfehérjéjének módosulása állhat a HFpEF betegek szívizomsejtjein mért $F_{\text{passzív}}$ kóros mértékű növekedésének hátterében. Ennek érdekében a titin izoformák elkülönítését végeztük el - technikai okok miatt több betegből összevont - endomiokardiális biopsziás anyagon (**19. ábra**). A HFpEF szívizomzat titin N2BA/N2B aránya (17/83; az arány SEM-értéke 0,02) alacsonyabb volt ($p<0,05$), mint a HFrEF szívizomzaté (35/65; az arány SEM-értéke 0,13). Az elvégzett egydimenziós gélelektroforézis tehát a rövidebb és merevebb N2B titin izoforma arányának növekedését igazolta a HFpEF betegek szívizomzatában.



19. ábra Titin gélelektroforézis HFrEF-ben és HFpEF-ben szenvedő betegek szívizomzatából

A rugalmas N2BA és a merev N2B titin izoforma elválasztása HFrEF (1. és 2. sáv) és HFpEF (3. és 4. sáv) szívizomzatban. Molekulatömeg-markerként a 3600 kDa-os N2A izoformát expresszáló nyúl soleus-izom (5. sáv). (van Heerebeek L. és munkatársai, *Circulation*, 2006, 113(16): 1966-1973. alapján)

A fenti eredmények alapján megállapítottuk, hogy a HFpEF és HFrEF betegek klinikai jellemzői között számos különbség figyelhető meg. A HFpEF betegek nagyobb hányada szenvedett magasvérnyomás betegségben, cukorbetegségben és volt elhízott. A két betegcsoport a hemodinamikai paraméterek tekintetében is eltérő volt.

A szívizomzat struktúrális és funkcionális jellemzőinek összehasonlításakor HFrEF-ben alacsonyabb miofibrilláris sűrűséget és Ca^{2+} érzékenységet, míg HFpEF-ben szívizomsejt hipertrófiát, a szívizomsejtek megnövekedett passzív feszülését és a Ca^{2+} érzékenység fokozódását figyeltük meg.

Bal kamra hipertrófia jelentlétéről már beszámoltak HFpEF-ben,⁴³ ezt jelen vizsgálatban a normálisnál magasabb LVMI is megerősítette. Utóbbit HFrEF-ben is megfigyeltünk, de a HFpEF-el ellentétben ehhez csak kisebb mértékű szívizomsejt átmérő növekedés társult, mely összhangban van a két szívelégtelenség fenotípusra jellemző koncentrikus és excentrikus bal kamrai remodellingel: koncentrikus bal kamrai hipertrófiában (HFpEF) a szívizomsejtek transzverzális irányban nőnek, miközben a sejtek hossza állandó marad, míg excentrikus hipertrófiában (HFrEF) a szívizomsejtek arányos hosszanti és a transzverzális irányú növekedése figyelhető meg.⁸⁶

A szívizomsejt átmérő növekedését HFrEF-ben kollagénlerakódás kísérte. HFpEF-ben a kollagénlerakódás a szívizomsejt átmérő további növekedésével járt együtt. Mivel a kollagénlerakódás és a szívizomsejt hipertrófia kialakulása mind az HFrEF-ben, mind a HFpEF-ben jelen volt, az ACE-gátlók, az ARB-k és az MRA-k alkalmazása, amelyek a szívizomfibrózis és a maladaptív hipertrófia ellen hatnak, mindkét szívelégtelenség fenotípusban indokoltnak tűnik. A CHARM vizsgálatban (Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity) az ARB kandezartán kedvező hatásairól nemcsak HFrEF-ben, hanem HFpEF-ben is beszámoltak.³⁰

A CVF-tól függetlenül a HFpEF betegek szívizomsejt átmérője meghaladta a HFrEF betegek átmérőértékeit. Ez a különbség HFpEF-ben valószínűleg a hipertónia jelenlétével függött össze, amely a HFpEF betegek 73%-ában, míg a HFrEF betegek csupán 13%-ában volt megfigyelhető. A HFpEF betegek 60%-a cukorbetegségben szenvedett, 50%-uk pedig elhízott volt. A diabétesz és az inzulinrezisztencia kísérleti modelljeiben a szív hipertrófiájának kialakulásáról már korábban beszámoltak.^{87,88}

A HFpEF betegekben mért $F_{\text{passzív}}$ 34%-kal magasabb volt, mint a HFrEF betegekben mérhető passzív erő érték. A magasabb $F_{\text{passzív}}$ háttérében a Ca^{2+} anyagcsere megváltozása, vagy miofilamentális és citoskeletális fehérjék módosulása állhat. Mivel a kísérletek előtt a szívizomsejteket Triton X-100-ban inkubáltuk, a szarkolemmális és szarkoplazmatikus membránok integritása sérült, így a Ca^{2+} anyagcsere megváltozása nem járulhatott hozzá a magasabb $F_{\text{passzív}}$ kialakulásához. Korábbi vizsgálatunkban HFpEF betegek endomiokardiális biopsziáiban nem találtunk változást a miofilamentális fehérjék expressziójában vagy foszforilációjában,⁴³ ezért a magasabb $F_{\text{passzív}}$ -ot a citoskeletális fehérjék megváltozott

expressziójának vagy foszforilációjának tulajdonítottuk. Mivel a PKA korrigálta az $F_{\text{passzív}}$ -ot, az érintett citoskeletális fehérjéknek foszforilációs helyekkel kell rendelkezniük. A titin rendelkezik foszforilációs helyekkel, és PKA általi foszforilációja csökkenti az $F_{\text{passzív}}$ -ot izolált szívizomrostokban, különösen a titin merev, N2B izoformájának overexpressziója esetén.^{89,90} A jelen vizsgálatban a HFpEF betegek endomiokardiális biopsziás mintáiban a merev N2B titin izoforma magasabb expresszióját figyeltük meg. Az $F_{\text{passzív}}$ csökkenése a PKA után nagyobb volt a HFpEF-ben, mint HFrEF-ben, mely szintén összhangban áll HFpEF betegek biopsziás mintáiban mért magasabb N2B-expresszióval. A titin izoforma expressziójának hasonló eltolódását a rugalmas N2BA izoformáról a merev N2B izoforma felé korábban már igazolták kísérleti körülmények között létrehozott hipertónia modellben.⁹¹

A HFpEF betegekben mért $F_{\text{passzív}}$ és az LVEDP, valamint a szívizom stiffness modulus között mind a jelen, mind egy korábbi vizsgálatunkban korrelációt mutattunk ki.⁴³ Mivel a PKA korrigálta a magas $F_{\text{passzív}}$ -ot, a szívizom PKA-aktivitásának adrenoceptor-stimulációval történő növelése javíthatja a balkamra diasztolés funkcióját HFpEF-ben. Az izoproterenol adása során javuló diasztolés bal kamra funkciót mutattak ki hipertrófiás kardiomiopátiában szenvedő betegeknél,⁹² akik gyakran szenvednek HFpEF-ben is. A PKA mellett érdekes lenne a PKG hatásának vizsgálata is, hiszen a PKG miokardiális aktivitása nitrogén-oxid és foszfodiészteráz 5A-gátlók hatására növelhető, a képződő nitrogén-oxid pedig javítja a diasztolés bal kamra funkciót egészséges, hipertrófiás és elégtelenné váló szívekben is,⁹³ a szildenafil pedig kedvező hatású szívizom hipertrófiában.

HFpEF betegeken 20%-kal nagyobb volt a miofilamentális sűrűség, mint a HFrEF betegeken, mely szintén hozzájárulhatott a HFpEF-ben mért magasabb $F_{\text{passzív}}$ -hoz. Az $F_{\text{passzív}}$ PKA hatására hasonló szintre csökkent HFpEF-ben és HFrEF-ben, ami ellene szól annak, hogy a magasabb miofilamentális sűrűség lenne a felelős a HFpEF-ben megfigyelt emelkedett $F_{\text{passzív}}$ -ért. Az alacsonyabb miofilamentális sűrűség HFrEF-ben a miofilamentális lebomlásból eredhetett. Bár a miofilamentális sűrűség alacsonyabb volt HFrEF-ben, maximális aktiváláskor a szívizomsejtek hasonló F_{total} -al rendelkeztek, melynek hátterében megváltozott titin izoformák vagy a foszforilációból eredő fokozott aktin-miozin kölcsönhatás állhat.

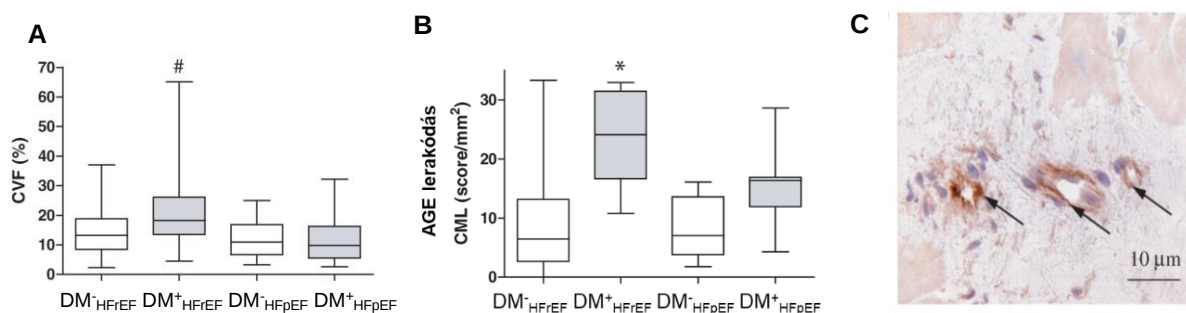
Összességében kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a bal kamrai szívizomzat felépítése és működése eltér HFrEF-ben és HFpEF-ben. A megfigyelt változások összhangban állnak a szívizomzat csökkent kontraktilitásával HFrEF-ben és magyarázhatják a kamraizomzat kóros relaxációját, illetve túgulékonyságának csökkenését HFpEF-ben. A különbségek alátámasztják a két szívelégtelenség fenotípus klinikai elkülönítését.

4.2. A fibrózis, a keringő glikációs végtermékek (AGEs) és a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ szerepe a diasztolés diszfunkcióban

Ebben a tanulmányunkban nem diabéteszes és diabéteszes szívelégtelen betegek endomiokardiális biopsziáinak felhasználásával azt vizsgáltuk, hogy a fibrózis, a keringő AGEs és a szívizomsejtek passzív feszülése hogyan és milyen mértékben járul hozzá a betegekben *in vivo* megfigyelhető bal kamrai diasztolés diszfunkció kialakulásához.⁹⁴

Hasonló gyógyszeres kezelésben részesülő nem-cukorbeteg és cukorbeteg, ép koszorúér-státusszal rendelkező HFpEF (n=28) és HFrEF (n=36) betegből származó bal kamrai endomiokardiális biopsziákat dolgoztunk fel, akik közül 16, illetve 10 beteg volt diabéteszes. Meghatároztuk a szívizomminták AGEs és kollagén tartalmát, valamint a biopsziákból izolált szívizomsejteken az $F_{\text{passzív}}$ -ot.

A diabéteszes betegekben *in vivo* emelkedett diasztolés feszülést mértünk tekintet nélkül a bal kamrai szisztolés funkcióra. HFrEF-ben szenvedő diabéteszes betegekben nagyobb CVF-t találtunk ($22,4 \pm 2,2\%$ vs. $14,6 \pm 1,0\%$, $p < 0,001$) (20. ábra). A diabéteszes HFrEF betegekben nagyobb mértékű AGEs lerakódást figyeltünk meg ($24,1 \pm 3,8$ vs. $8,8 \pm 2,5$ score/mm²; $p = 0,005$), mint a diabéteszes HFpEF betegekben ($15,7 \pm 2,7$ vs. $8,2 \pm 2,5$ score/mm², $p = \text{NS}$). Az AGEs lerakódásával párhuzamosan a diabéteszes HFrEF csoportban a mikroerekben az endotheliális gyulladás markerének, az E-szelektinnek a növekvő expresszióját is kimutattuk.



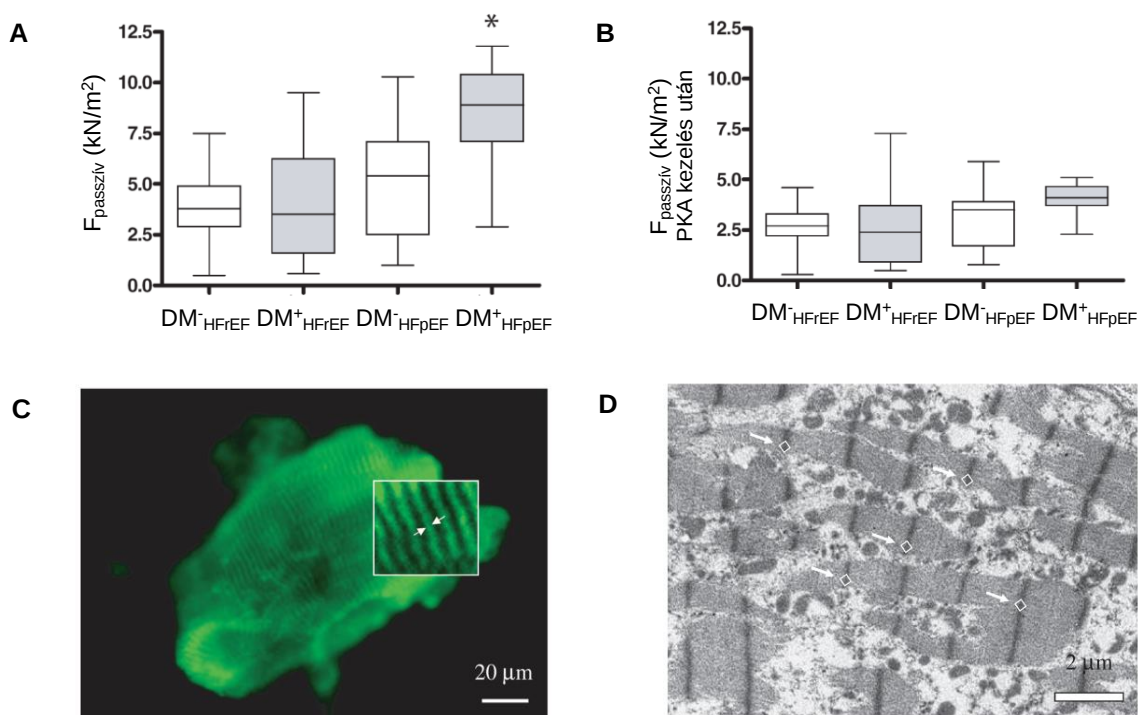
20. ábra Miokardiális fibrózis, glikációs végtermékek (AGEs) lerakódás nem diabéteszes és diabéteszes HFrEF és HFpEF betegekben

A. Magasabb miokardiális fibrózis diabéteszes HFrEF (DM⁺HFrEF) betegekben (# $p < 0,001$). **B.** Magasabb AGEs lerakódás diabéteszes HFrEF (DM⁺HFrEF) betegekben (* $p < 0,01$). **C.** Reprezentatív példa az AGE lerakódására DM⁺HFrEF betegek kis miokardiális ereiben (nyilak). CML: N-(karboximetil)lizin; CVF: kollagén térfogat arány. (van Heerebeek L. és munkatársai, *Circulation*, 2008, 117(1): 43-51. alapján)

HFpEF betegekben a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ szignifikánsan magasabbnak bizonyult ($8,5 \pm 0,9$ vs. $5,1 \pm 0,7$ kN/m², $p = 0,006$) (21. ábra). A PKA-val történt kezelés után az $F_{\text{passzív}}$ csökkent, különösen a DM⁺HFpEF betegekben, és ezáltal az $F_{\text{passzív}}$ értékei összehasonlíthatóvá váltak az összes betegcsoportban. A DM⁺HFpEF szívizomsejteken mért magasabb $F_{\text{passzív}}$ -hoz a szarkomer Z-vonal kiszélesedése társult, amely mind a α -aktininre festett immunfluoreszcens

(+16,9%, $p=0,045$), mind az elektronmikroszkópos képeken (+15,2%, $p<0,001$) szignifikánsan nagyobb volt a DM^+_{HFpEF} -ben, mint a DM^-_{HFpEF} -ben. A HFpEF betegekben az $F_{passzív}$ korrelált a stiffness modulussal ($r=0,55$, $p=0,022$) és a diabétesz időtartamával ($r=0,35$, $p=0,04$).

Bár a diabéteszben megfigyelhető szívizom diszfunkció leggyakoribb oka továbbra is a koszorúér-betegség, a hiperglikémia, inzulinrezisztencia és hiperlipidémia közvetlenül is hathatnak a szívizomra:⁹⁵ pl. a szívizom energianyeréséhez a glükóz felhasználásról a zsírsav-oxidációra áll át.⁹⁶ A diabétesz által kiváltott szívizom diszfunkció első klinikai leírásakor a fő jellemzők a bal kamrai tágulat és a szisztolés bal kamrai diszfunkció voltak, ezért ezt az állapotot dilatatív kardiomiopátiának minősítették. Később a diasztolés bal kamrai diszfunkciót a diabétesz okozta szívizom-diszfunkció korai megnyilvánulásaként azonosították.⁹⁷ A jelen vizsgálat megerősítette, hogy a diabéteszes betegekben jelentős koszorúér-betegség hiányában is növekszik a diasztolés bal kamrai merevség.



21. ábra PKA kezelés hatása a szívizomsejt $F_{passív}$ -ra nem diabéteszes és diabéteszes HFrEF-ben és HFpEF-ben szenvedő betegekben

A. A $F_{passív}$ magasabb a DM^+_{HFpEF} betegekben (* $p<0,01$). **B.** A protein-kináz A (PKA) adása után az $F_{passív}$ összehasonlítható minden betegcsoportban. **C.** Reprezentatív példa α -aktininre festett és a Z-vonal vastagság mérésére használt immunfluoreszcens szívizomsejtekről (a nyilak a Z-vonalakat jelzik). **D.** Elektronmikroszkópos Z-vonal vastagság-mérés reprezentatív példája (a nyilak a Z-vonalakat jelzik). (van Heerebeek L. és munkatársai, *Circulation*, 2008, 117(1): 43-51. alapján)

A krónikus miokardiális mikrovaszkuláris gyulladás - sejtes infiltráció hiányában is - gyakran megfigyelhető lezajlott miokarditisz után HFrEF betegekben.⁹⁸ Ismert, hogy a gyulladás elősegíti az AGE felhalmozódását,⁹⁹ a tartós mikrovaszkuláris gyulladás pedig N-(karboximetil)lizin (CML) lerakódáshoz vezet a kis intramiokardiális erekben. Jelen vizsgálatban nem figyeltünk meg intersticiális CML lerakódást, melynek hátterében - szemben a kezeletlen rágszáló diabétesz modellekkel - a betegek jobb glikémiás kontrollja (antidiabetikus és inzulin kezelés) állhat. Az endotheliális AGE lerakódás klinikai jelentőségét korábban már igazolták hipertóniás betegekben, akiknél a keresztkötés-bontó kezelés javította az endothelfunkciót.¹⁰⁰

Jelen vizsgálatban magasabb CVF-et figyeltünk meg a DM^{+}_{HFrEF} , mint a DM^{+}_{HFpEF} betegekben. A DM^{+}_{HFrEF} betegekben a fibroblasztok aktiválódása a korábban említett AGE lerakódás, a protein kináz C aktiválódása vagy a magas intracelluláris glükózkoncentráció következménye lehetett.^{101,102}

A DM^{+}_{HFpEF} betegekben magasabb stiffness modulust mértünk, mint a DM^{-}_{HFpEF} betegekben. A magasabb stiffness modulus inkább a szívizomsejtek $F_{passzív}$ -jával és kevésbé az AGEs lerakódással függött össze. Az emelkedett $F_{passzív}$ proteinkináz A általi korrekciója a miofilamentális vagy citoszkeletális fehérjék foszforilációs deficitjére utal.^{43,84} A DM^{+}_{HFpEF} szívizomsejtekben a magas $F_{passzív}$ -hoz a Z-vonal kiszélesedése társult. A Z-vonal kiszélesedését nebulin vagy izom-LIM fehérje knockout transzgénikus egerekben már leírták.^{103,104} A jelen tanulmány ugyanakkor az első, amely Z-vonal megvastagodásáról számol be humán szívizomzatban, ennek hátterben a citoszkeletális fehérjék megváltozott tulajdonságai állhatnak.

Eredményeink arra utalnak, hogy diabéteszes szívelégtelen betegekben a szívizom megnövekedett diasztolés feszüléséért eltérő mechanizmusok felelősek: HFrEF-ben elsősorban a fibrózis és az AGEs lerakódása, míg HFpEF-ben a hipertrófiás szívizomsejtek kórosan emelkedett passzív feszülése játszhat szerepet. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a diabétesz két különböző útvonal aktiválása révén károsíthatja a szív kontraktilis funkcióját: a "AGEs lerakódás-gyulladás-fibrózis" útvonal a HFrEF-re, a "szívizomsejt hipertrófia-megnövekedett szívizomsejt passzív feszülés" útvonal a HFpEF-re jellemző. Ugyanakkor HFrEF-ben a "AGEs lerakódás-gyulladás-fibrózis" útvonal aktiválódása nemcsak a diasztolés, hanem a szisztolés funkciót is rontja. Mivel a két betegcsoportban az éhgyomri vércukorszint, HbA1c érték, valamint a diabétesz fennállásának ideje is hasonló volt, a szisztolés funkció romlásáért valószínűleg a háttérben álló vírusos miokarditisz vagy toxikus szívizom károsodás tehető felelőssé.

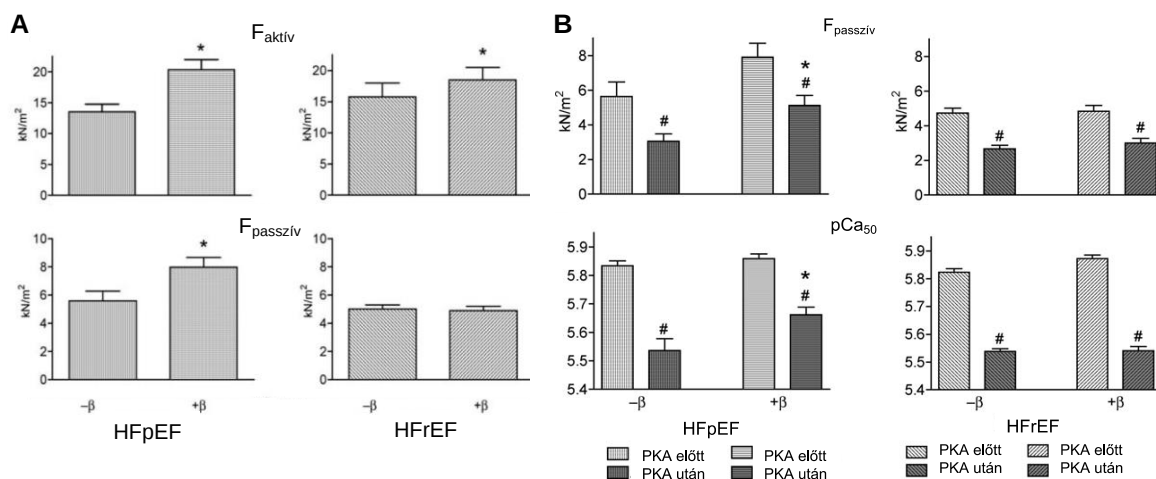
4.3. A β -blokkoló kezelés eltérő molekuláris hatásai HFrEF-ben és HFpEF-ben

Arra a kérdésre, hogy a HFrEF-ben és HFpEF-ben a bal kamrai szívizomzat felépítésében és működésében korábban ismertett különbségek magyarázhatják-e a β -blokkolókkal folytatott klinikai tanulmányok eltérő kimenetelét (egyértelműen pozitív hatás HFrEF-ben, nem meggyőző eredmények HFpEF-ben) β -blokkoló kezelésben igen és abban nem részesülő HFpEF és HFrEF betegekből nyert bal kamrai szívizommintákat hasonlítottunk össze.¹⁰⁵

A szignifikáns koszorúér-betegségben nem szenvedő, β -blokkoló kezelésben nem és abban részesülő betegeket négy csoportra osztottuk: β -HFpEF (n=16), β +HFpEF (n=16), β -HFrEF (n=17) és β +HFrEF (n=22). A betegek szívizommintáiban hisztomorfometriai módszerrel meghatároztuk a miokardiális CVF-t, a szívizomsejt átmérőt, ProQ Diamond festési eljárással a miofilamentális fehérjék foszforilációját, valamint Western immunoblot segítségével a β -adrenerg jelátviteli útvonal és a szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisában kulcsszerepet játszó fehérjék expresszióját. A biopsziákból izolált, membránfosztott szívizomsejteken erőméréseket hajtottunk végre.

A β -blokkoló kezelés szívizomzatra kifejtett hatásai egyrészt hasonlóak voltak a két betegcsoportban, másrészt jellegzetesnek mutatkoztak HFpEF-re vagy HFrEF-re. A miokardiális CVF szignifikánsan alacsonyabb volt a HFpEF-ben, mint a HFrEF-ben ($p < 0,0001$), HFpEF-ben a β -blokkoló kezelés alacsonyabb miokardiális CVF-el társult ($p = 0,0007$). A szívizomsejtek átmérője szignifikánsan nagyobb volt HFpEF-ben, mint HFrEF-ben ($p < 0,0001$), a β -blokkoló terápia HFpEF-ben járt együtt a szívizomsejt átmérő csökkenésével ($p < 0,0001$). A miofibrilláris sűrűség szintén magasabb volt HFpEF-ben, mint HFrEF-ben ($p < 0,0001$), de nem volt összefüggésben a β -blokkoló terápiával.

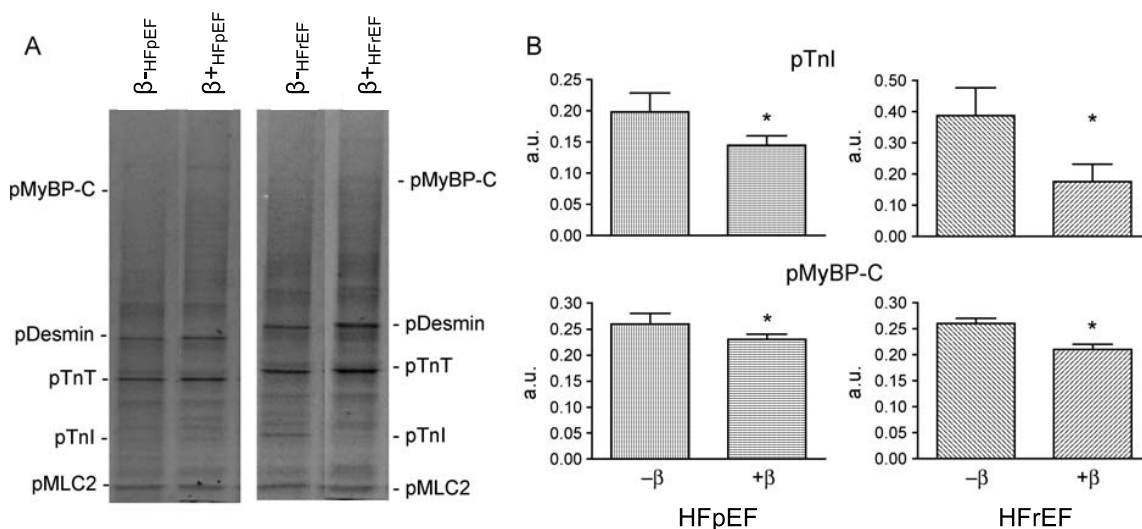
A β -blokkolóval kezelt HFrEF és HFpEF betegekből magasabb $F_{\text{aktív}}$ és $p\text{Ca}_{50}$ értékeket mértünk ($p = 0,01$ és $p = 0,008$). A kezelés HFpEF-ben növelte ($p = 0,03$), HFrEF-ben nem változtatta meg az $F_{\text{passzív}}$ -ot (22. *ábra*). A PKA kezelést követően a szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ mind a négy betegcsoportban csökkent, de a β -blokkolót kapó HFpEF betegekből szignifikánsan magasabb maradt ($p = 0,001$). A $p\text{Ca}_{50}$ PKA kezelést követően az $F_{\text{passzív}}$ -hoz hasonló tendenciát követett: mind a négy csoportban csökkent, és a β -blokkolót kapó HFpEF-betegeknél magasabb maradt ($p = 0,007$). Az *in vivo* β -blokkoló kezelés tehát az izolált szívizomsejtek kiindulási és PKA-indukált kontraktilis funkcióinak összetett *in vitro* változásaival járt együtt, amely különbözött a HFpEF és a HFrEF betegcsoportok között.



22. ábra β -blokkoló kezelésben nem ($-\beta$) és abban részesülő ($+\beta$) HFpEF és HFrEF betegek endomiokardiális biopsziáiból izolált, membránfosztott szívizomsejteken mért aktív (F_{aktiv}), passzív (F_{passziv}) erőértékek, valamint a Ca^{2+} érzékenység (pCa_{50}) változása PKA kezelés hatására

A. A β -blokkoló terápia mind a HFpEF-ben, mind a HFrEF-ben növelte a F_{aktiv} -ot, de csak a HFpEF-ben növelte az F_{passziv} -ot (* $p < 0,05$, $-\beta$ vs. $+\beta$). B. A proteinkináz A (PKA) kezelés szignifikánsan csökkentette az F_{passziv} -ot és a pCa_{50} -et minden csoportban, de az F_{passziv} és a pCa_{50} magasabb maradt a β^{+}_{HFpEF} betegeknél (* $p < 0,01$, $-\beta$ vs. $+\beta$; # $p < 0,01$, PKA előtt vs. PKA után). (Hamdani N. és munkatársai, *Eur. Heart J.*, 2009, 30(15): 1863-1872. alapján)

A β -blokkoló kezelés mind a HFpEF, mind a HFrEF betegeknél a troponin I (TnI) és a miozinkötő fehérje C (MyBP-C) alacsonyabb foszforilációjával járt együtt, de nem volt hatással más miofilamentális fehérjék foszforilációs státuszára (23. ábra).



23. ábra Miofilamentális fehérje összetétel és foszforiláció vizsgálata β -blokkoló kezelésben nem és abban részesülő HFpEF és HFrEF betegeknél

A. Reprezentatív Pro-Q Diamond-festésű gélek β^{-}_{HFpEF} , β^{+}_{HFpEF} , β^{-}_{HFrEF} és β^{+}_{HFrEF} szívizommintákról; B. A troponin I (TnI) és a miozinkötő C fehérje (MyBP-C) foszforilációs státusza szignifikánsan alacsonyabb volt β^{+}_{HFpEF} és a β^{+}_{HFrEF} betegeknél a β^{-}_{HFpEF} és a β^{-}_{HFrEF} betegekhez képest. (* $p < 0,05$, $-\beta$ vs. $+\beta$) (Hamdani N. és munkatársai, *Eur. Heart J.*, 2009, 30(15): 1863-1872. alapján)

A β -adrenerg receptor jelátvitelében részt vevő fehérjék közül a $\beta 1AR$, a GRK2 és a GRK5 expressziója magasabb volt HFrEF-ben, mint a HFpEF-ben, de a β -blokkoló kezelés nem befolyásolta. A β -blokkoló kezelés HFpEF-ben csökkentette az aktiváló G fehérje (G_s)

expresszióját, ugyanakkor a gátló G fehérje (G_i) expressziója kizárólag HFrEF-ben csökkent. A szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+} -ATPáz (SERCA2a) és a foszfolamban (PLB) expressziós szintjében a β -blokkoló kezeléssel kapcsolatos különbségeket nem figyeltünk meg HFrEF és HFpEF között.

Jelen tanulmányban a CVF kizárólag a β -blokkolóval kezelt HFpEF betegek esetében volt alacsonyabb, a HFrEF betegekben nem. Ez a megfigyelés alátámasztja a korábbi tanulmányok eredményeit, amelyek az előrehaladott miokardiális fibrózist HFrEF-ben a β -blokkoló terápia rossz kimenetelének fontos előrejelzőjeként azonosították.^{106,107} A β^{+}_{HFpEF} betegekben megfigyelt alacsonyabb CVF értékkel párhuzamosan a szívizomsejt hipertrófia csökkenése is megfigyelhető volt. Spontán hipertóniás patkányokban a bisoprolol nem, az ACE-gátló perindopril azonban visszafordította a szívizomsejt hipertrófiát.¹⁰⁸ Ez a vizsgálat arra utal, hogy β^{+}_{HFpEF} betegekben a szívizomsejt hipertrófia visszafejlődésében esetleg a csökkent RAAS aktivitás játszhat szerepet.

A HFpEF betegcsoportban magasabb $F_{passzív}$ -ot figyeltünk meg a β^{+}_{HFpEF} , mint a β^{-}_{HFpEF} betegekben. A PKA *in vitro* adagolása után β^{+}_{HFpEF} betegeknél az $F_{passzív}$ még mindig magasabb maradt, ami arra utal, hogy a β -blokkoló kezelés hatása HFpEF-ben nemcsak a hipofoszforilációval, hanem a miofilamentális fehérjék strukturális vagy egyéb poszttranszlációs módosításával is összefügg. A β^{+}_{HFpEF} szívizomsejtekben megfigyelt, PKA-t követő tartós pCa_{50} emelkedés szintén azt támasztja alá, hogy a β -blokkoló terápia a miofilamentális fehérjék további módosításait idézi elő.

Vizsgálatunk során jelentős különbségeket találtunk a β_1AR és a GRK2 proteinek expressziójában a betegcsoportok között: a β -blokkolók kezeléstől függetlenül mindkét fehérje miokardiális expressziója magasabb volt HFrEF-ben, mint HFpEF-ben. A β -adrenerg rendszer különböző komponensei közül a G_s fehérje kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb volt a β -blokkolót kapó HFpEF betegeknél. A β_2AR - G_s jelátvitel downregulációja előnyös lehet, mivel kedvez a β_2AR - G_i jelátvitelnek, amelyről ismert, hogy antiapoptotikus hatást fejt ki.¹⁰⁹ A normál bal kamrai kontraktilis funkció miatt a megnövekedett β_2AR - G_i jelátvitelből eredő esetleges negatív inotróp hatások kevésbé tűnnek jelentősnek a HFpEF betegek esetében.

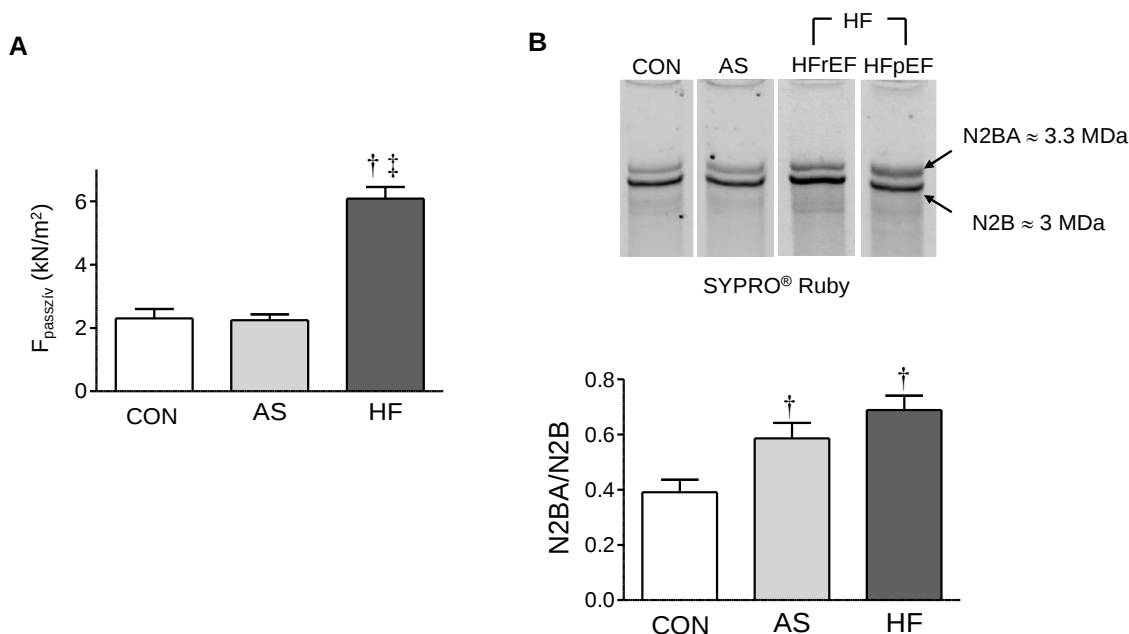
A HFpEF-ben és HFrEF-ben alkalmazott β -blokkoló kezelés molekuláris hatásaiban észlelt különbségek összefüggésben állhatnak a β -blokkoló gyógyszerekkel - a két betegcsoportban - végzett klinikai tanulmányok eltérő eredményeivel.

4.4. A titin izoforma összetétel és foszforiláció szerepe a szívelégtelenségben megfigyelhető kóros szívizomsejt passzív feszülésben

Korábbi tanulmányainkban kimutattuk, hogy HFpEF betegeknél a megnövekedett bal kamrai fal feszülés létrejöttéért az intersticiális fibrózis és a szívizomsejtek megnövekedett passzív ereje tehető felelőssé. Jelen tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy milyen mértékben tehető felelőssé a titin izoforma összetételben és/vagy foszforilációban bekövetkező változások az ejekciós frakció alapján nem differenciált és differenciált szívelégtelenségben megfigyelhető kóros mértékben megnövekedett $F_{\text{passzív}}$ -ért.¹¹⁰

Szívelégtelenségben (HF), aorta stenosisban (AS) szenvedő betegek és megőrzött szívfunkcióval rendelkező egyének (CON) bal kamrai biopsziáiból izolált szívizomsejteken erőméréseket hajtottunk végre és a mintákban meghatároztuk a titin és titin izoformák expresszióját és foszforilációját. A biopsziákat szívkathéterezés során (44 HF, 3 CON), műtéti úton (25 AS, 4 CON) és explantált szívekből (4 HF, 8 CON) nyertük. A vizsgálatba bevont személyek ép koszorúerekkel rendelkeztek.

A HF betegcsoportban mért szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ ($6,1 \pm 0,4$ kN/m²) szignifikánsan nagyobb volt, mint a CON ($2,3 \pm 0,3$ kN/m²; $p < 0,01$) vagy az AS ($2,2 \pm 0,2$ kN/m²; $p < 0,001$) csoportokban (24. ábra).

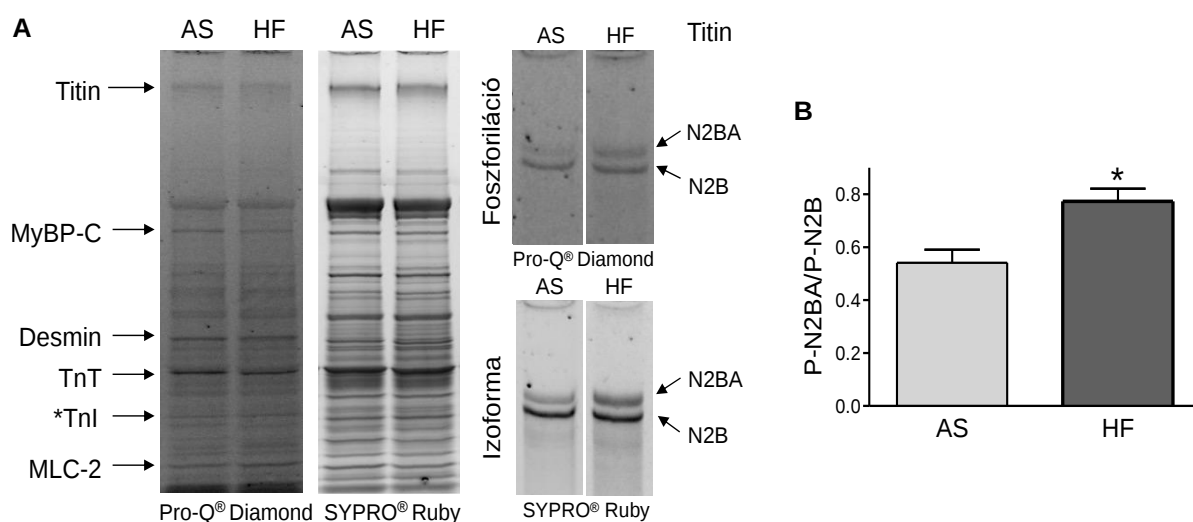


24. ábra Megőrzött szívfunkcióval rendelkező egyének (CON), szívelégtelenségben (HF) és aorta stenosisban (AS) szenvedő betegekből izolált szívizomsejteken mért $F_{\text{passzív}}$ és a szívizommintákban meghatározott titin izoforma expresszió és foszforiláció

A. Magasabb szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ a HF betegeknél a CON csoporthoz ($\dagger p < 0,01$ vs. CON) és az AS betegekhez képest ($\ddagger p < 0,001$ vs. AS). **B.** Magasabb N2BA/N2B arány a HF és AS betegeknél, mint a CON csoportban ($\dagger p < 0,05$ vs. CON). (Borbély A. és munkatársai, *Circ. Res.*, 2009, 104(6): 780-786. alapján)

A titin izoformák összetétele eltérő volt a HF (N2BA/N2B=0,73±0,06) és a CON csoport között (N2BA/N2B=0,39±0,05; $p<0,001$), de nem különbözött a HF és az AS betegcsoportokban (N2BA/N2B=0,59±0,06).

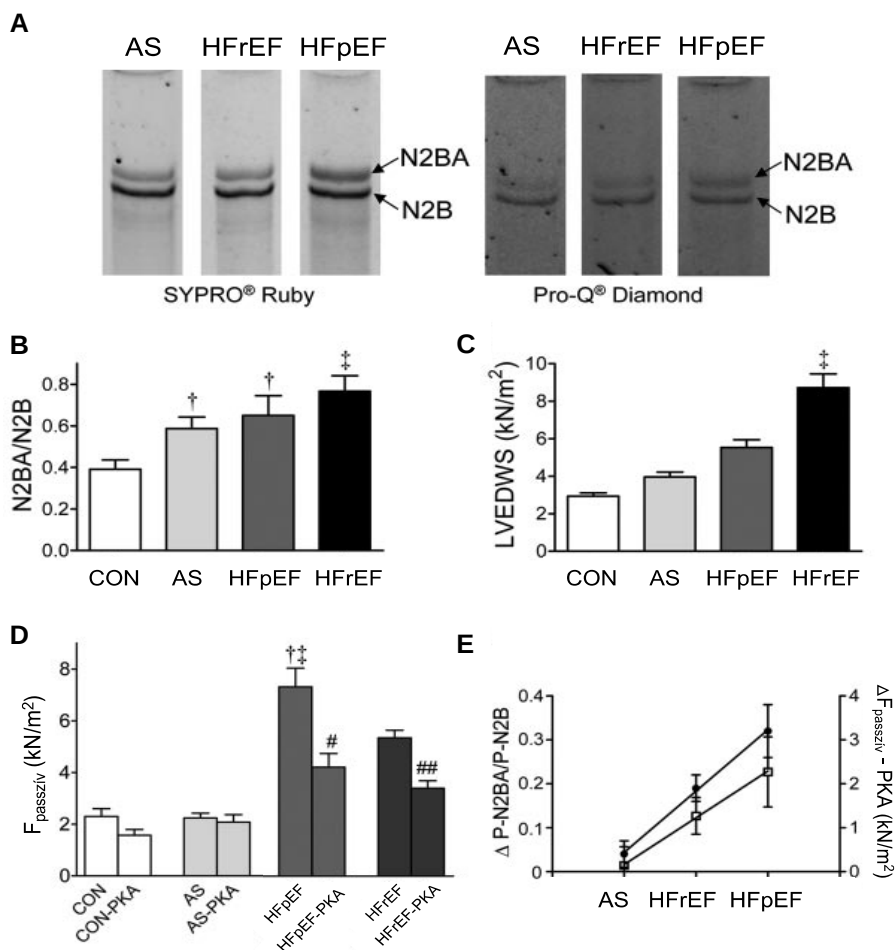
A titin összfoszforilációja hasonló volt a HF és az AS csoportban, de a merev N2B titin izoforma relatív foszforilációja szignifikánsan alacsonyabb volt a HF (P-N2BA/P-N2B=0,77±0,05), mint az AS csoportban (P-N2BA/P-N2B=0,54±0,05; $p<0,01$) (25. ábra). A foszforilált és az összes fehérje aránya hasonló volt a miozin-kötő C fehérje, a dezmin, a troponin T és a miozin könnyű lánc-2 esetében. Egyedül a troponin I foszforilált és teljes fehérje aránya volt alacsonyabb HF-ben, mint AS-ban (0,12±0,01 vs. 0,16±0,02; $p=0,048$).



25. ábra Miofilamentális fehérjék és a titin óriásfehérje izoforma összetételének és foszforilációjának vizsgálata aorta stenosisban (AS) és szívelégtelenségben (HF) szenvedő betegekben

A. A miofilamentális fehérjék (bal oldali panel) és a titin izoformák (jobb oldali panel) foszforilációjának összehasonlítása egy AS és HF beteg között szekvenciális gélelektroforézissel, ProQ Diamond foszfoprotein és SYPRO Ruby fehérjefestéssel. **B.** Magasabb P-N2BA/P-N2B arány HF-ben, mint AS-ban (* $p<0,01$). (Borbély A. és munkatársai, *Circ. Res.*, 2009, 104(6): 780-786. alapján)

Mivel korábbi tanulmányainkban az $F_{\text{passzív}}$ különösen a HFpEF betegek bal kamrai szívmusculatából izolált szívmusclesejtekben volt emelkedett, ezért összehasonlítottuk a titin izoformák expresszióját és foszforilációját HFpEF és HFrEF betegek alcsoportjaiban (26. ábra). Az N2BA/N2B arány (0,77±0,07) és az *in vivo* mért LVEDWS is a HFrEF betegekben volt a legmagasabb (8,7±0,7 kN/m²). Az $F_{\text{passzív}}$ (7,4±0,7 kN/m²) és a PKA által indukált $F_{\text{passzív}}$ csökkenés (-3,2±0,6 kN/m²) a HFpEF betegekben volt a legnagyobb. Az N2B titin izoforma hipofoszforilációja szintén HFpEF-ben volt a legkifejezettebb, mely magyarázhatja mind a magasabb $F_{\text{passzív}}$ -ot, mind az $F_{\text{passzív}}$ nagyobb PKA-indukált csökkenését is.



26. ábra Titin izoforma expresszió, titin izoforma foszforiláció és szívizomsejt $F_{\text{passzív}}$ AS, HFpEF és HFrEF betegekben

A. A titin izoformák foszforilációjának összehasonlítása AS, HFpEF és HFpEF betegekben szekvenciális gélelektroforézissel, SYPRO Ruby protein és ProQ Diamond foszforprotein festéssel. **B.** Magasabb N2BA/N2B arány az AS, HFpEF és HFrEF betegekben, mint a CON csoportban ($\dagger p < 0,05$ vs. CON, $\ddagger p < 0,001$ vs. CON). **C.** Magasabb LVEDWS a HFrEF betegekben, mint a CON, AS és HFpEF csoportokban ($\ddagger p < 0,001$ vs. CON, AS vagy HFpEF). **D.** Magasabb $F_{\text{passzív}}$ a HFpEF betegekben, mint a CON, AS és HFrEF betegekben ($\ddagger p < 0,001$ vs. CON vagy AS; $\dagger p < 0,01$ vs. HFrEF). *In vitro* PKA kezelést követően az $F_{\text{passzív}}$ csökkent a HFpEF ($\# p < 0,0001$ vs. HFpEF) és HFrEF szívizomsejtben ($\#\# p < 0,0001$ vs. HFrEF) is. **E.** Az N2B izoforma hipofoszforiláció mértéke (P-N2BA/P-N2B) ($\square$) és az $F_{\text{passzív}}$ PKA-indukált csökkenésének ($\bullet$) párhuzamos trendjei AS, HFpEF és HFpEF betegekben. (Borbély A. és munkatársai, *Circ. Res.*, 2009, 104(6): 780-786. alapján)

Jelen vizsgálatban az $F_{\text{passzív}}$ kétszer olyan magas volt a szívelégtelenségben, mint AS-ben szenvedő betegek szívizomsejtjeiben. PKA vagy PKG adását követően a magas $F_{\text{passzív}}$ jelentősen csökkent, de változatlan maradt BDM vagy gelsolin *in vitro* adagolása után. A PKA- és PKG-indukált $F_{\text{passzív}}$ csökkenés a miofilamentális fehérjék foszforilációs deficitjére utal. Eddig csak a troponin I-et és a titint azonosították a PKA és a PKG közös miofilamentális célfehérjéként.^{41,111} Jelen vizsgálatban a troponin I foszforilációs deficitjét figyeltük meg szívelégtelen szívizomban. A miofilamentális Ca^{2+} érzékenység egyidejű növekedése elősegítheti a diasztolés aktin-miozin interakciót.¹¹² A kereszthidak kialakulást gátló BDM expozícióját követően az $F_{\text{passzív}}$ ugyanakkor változatlan maradt. A PKA azon képessége

alapján, hogy a vékony filamentunok gelsolinnal történő eltávolítását követően képes volt csökkenteni az $F_{\text{passzív}}$ -ot, a titin foszforilációjának szerepét feltételezte szívelégtelen szívműködés magas $F_{\text{passzív}}$ -jának kialakításában.

A szívelégtelenségben és az AS-ban szenvedő betegek alcsoportjaiban a miokardiális titin izoforma expressziója (N2BA/N2B arány) és az LVEDWS között szoros korrelációt figyeltünk meg. A rugalmas N2BA titin izoforma magasabb expressziója arra utal, hogy a titin izoforma váltás kompenzációs mechanizmus, amelynek során az N2BA izoforma magasabb expressziója kompenzálja a megemelkedett LVEDWS értéket. A titin izoforma váltás kompenzatorikus szerepét korábban már dilatatív kardiomiopátiában szenvedő betegeknél is kimutatták, akiknél az N2BA/N2B arány korrelált az LVEDVI/LVEDP aránnyal, a bal kamra végdiasztolés disztenziájának mérőszámával, valamint a terhelés alatti maximális oxigénfogyasztással.¹¹³

Mivel a titin izoformák expressziója hasonló volt a szívelégtelen és AS betegek szívműködésében, az $F_{\text{passzív}}$ közötti különbség más mechanizmusokkal magyarázható. A titin összfoszforilációja hasonló, a relatív titin izoforma-foszforiláció azonban eltérő volt a szívelégtelen és AS szívműködésben: a szívelégtelenségben kevesebb N2B izoforma foszforilálódott, mint az AS miokardiumban. Korábban kimutatták, hogy a rugalmas N2BA titin izoformához képest a merev N2B titin izoforma hipofoszforilációja jelentősebb mértékben növeli az $F_{\text{passzív}}$ -ot.⁹⁰ A merev, N2B titin izoforma hipofoszforilációja tehát magyarázhatja a szívelégtelen szívműködésben megfigyelhető magasabb $F_{\text{passzív}}$ -ot. A titin izoformák foszforilációjának eltolódása az N2BA és N2B titin izoformák foszforilációs helyeinek térbeli elkülönülésével, valamint a proteinkinázok és foszfodiészterázok kompartmentális aktivitásában bekövetkező változásokkal magyarázható.^{114,115} Az N2B egyedi szekvencia tartalmazza a foszforilációs helyet, amely közvetíti az $F_{\text{passzív}}$ csökkenését.¹¹⁶ Az N2BA izoformában a hely közelebb van a Z-koronghoz.¹¹⁷ A PKA-t az A-kináz lehorgonyzó fehérjék (AKAP) a transzverzális tubulusokba irányítják,¹¹⁴ amelyek szintén a Z-korong szomszédságában vannak. Szívelégtelenségben a PKA AKAP általi célzása károsodik,¹¹⁸ ami a környező miofilamentális fehérjék foszforilációjának csökkenéséhez vezet.¹¹⁴ A titin izoforma foszforiláció eltolódása szívelégtelenségben nemcsak a cAMP, hanem a cGMP megváltozott helyi elérhetőségéből is eredhet, mivel a szívizom foszfodiészteráz 5 aktivitása is erősen kompartmentalizált.¹¹⁹

A fenti kísérletek eredményei alapján megállapítottuk, hogy a merev N2B titin izoforma hipofoszforilációja fontos szerepet játszik a szívelégtelen betegek szívműködésének kórosan emelkedett passzív feszülésében.

4.5. A miofilamentális fehérjék oxidatív módosulásainak szerepe a bal kamrai diasztolés diszfunkció kialakulásában

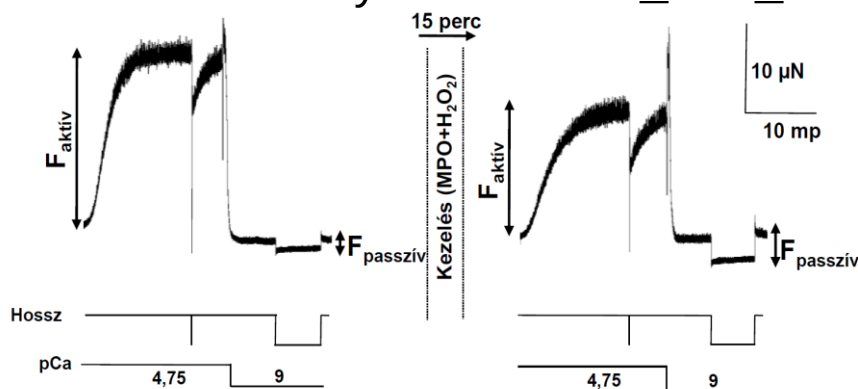
4.5.1. A mieloperoxidáz enzim (MPO) funkcionális hatásainak vizsgálata humán bal kamrai szívizomsejteken

A celluláris kontraktilis diszfunkció kialakulásában a kontraktilis fehérjerendszer foszforilációs változásai mellett azok oxidatív módosulásai is szerepet játszhatnak. A miofilamentális fehérjék, valamint az óriás szarkomer fehérje, a titin oxidatív változásainak diasztolés diszfunkcióban betöltött szerepe nagyrészt ismeretlen. Vizsgálatunkban ezért az MPO, az MPO gátlószerének (MPO-inhibitor) és különböző antioxidánsoknak a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára kifejtett hatásait tanulmányoztuk.¹²⁰

Egy *in vitro* humán kísérleti modellrendszer létrehozását követően meghatároztuk az mieloperoxidáz enzim (MPO) és szubsztrátjának, a hidrogén peroxidnak (H_2O_2) a hatását membránfosztott szívizomsejtek kontraktilis paramétereire. Antioxidáns szerrel (metionin, Met) és MPO-inhibitorral történő szimultán és utókezelések alkalmazásával megvizsgáltuk a létrejövő funkcionális változások revertálhatóságát. Az MPO és a H_2O_2 funkcionális hatásainak pontosabb feltárására biokémiai és molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. Meghatároztuk az MPO peroxidáz és klorinációs aktivitását Met és MPO-inhibitor jelenlétében. Humán bal kamrai szívizomszövetből nyert homogenizátumokat *in vitro* H_2O_2 , H_2O_2 és MPO, 2,2'-dithiodipiridin (DTDP) és Met kezeléseknél tettük ki. A miofilamentális fehérjék és az óriás szarkomerfehérje, a titin izoforma összetételét (N2BA és N2B), az azokban a fenti kezelésekre bekövetkező oxidációs változásokat Ellman-reakcióval és SH csoport oxidációs módszerrel (biotinálás), a karbonilációs állapotban bekövetkező változásokat Oxyblot technikával vizsgáltuk.

Az MPO-val végzett kísérletek előtt egy olyan H_2O_2 koncentráció meghatározására törekedtünk, amely már rendelkezik önálló funkcionális hatással, de ez a hatás MPO jelenlétében fokozódik. Az inkubációk során alkalmazott koncentrációk közül a 30 μM -os H_2O_2 oldat csökkentette szignifikánsan a szívizomsejtek aktív erejét (a kezelés előtti érték $64,5 \pm 2\%$ -ára, $n=3$), így ezt a H_2O_2 dózist használtuk további kísérleteinkben.

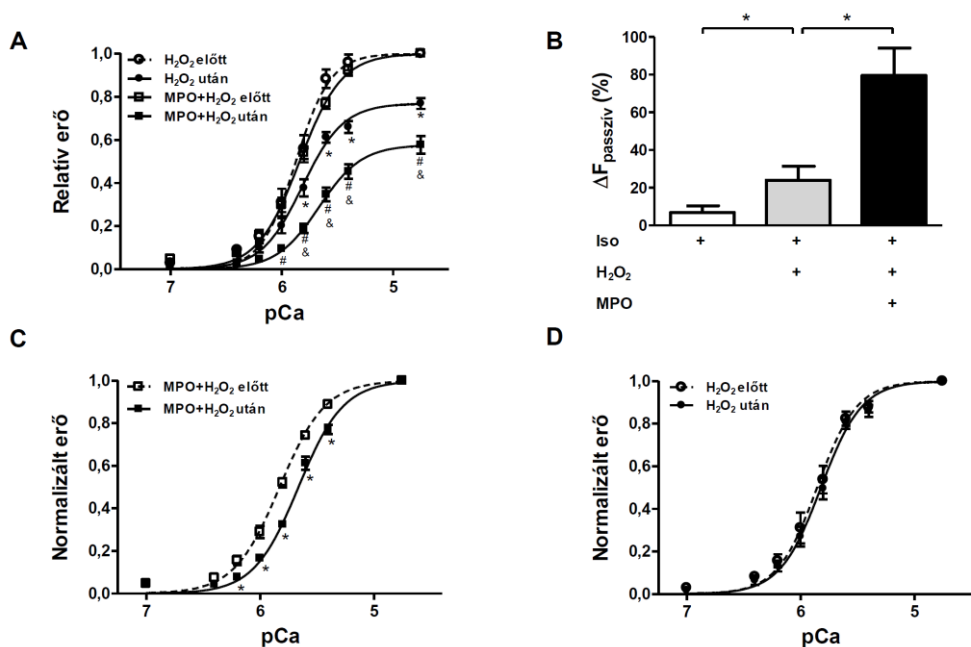
MPO (8 U/l) és H_2O_2 (30 μM) együttes alkalmazásakor (15 perc) a membránfosztott humán, bal kamrai szívizomsejtek maximális $F_{aktív}$ -jának (pCa 4,75) szignifikáns csökkenését (a kezelés előtti érték $57,7 \pm 4,1\%$ -ára, $n=12$) és az $F_{passzív}$ (pCa 9,0) jelentős növekedését (a kezeletlen szívizomsejteken mért érték $179,6 \pm 14,6\%$ -ára, $n=12$) tapasztaltuk (27. ábra).



27. ábra Mieloperoxidáz és hidrogén-peroxid (MPO+H₂O₂) kezelés hatása membránfosztott humán szívizomsejtek erőgenerálására

A szívizomsejt erőmérés során rögzített eredeti regisztrátum, melyen megfigyelhető a maximális Ca²⁺ tartalmú aktiváló oldatban (pCa 4,75) mért Ca²⁺-függő aktív erő (F_{aktív}) csökkenése és a Ca²⁺ mentes relaxáló oldatban (pCa 9) mért Ca²⁺-független passzív erőkomponens (F_{passzív}) növekedése 15 perces MPO+H₂O₂ kezelés hatására. (Kalász J. és munkatársai, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 84: 116-127. alapján)

Amennyiben a kezeléseket előtt és után a szubmaximális Ca²⁺ koncentrációjú aktiváló oldatokban mért erőértékeket a kezeléseket előtti maximális (F_{aktív}, pCa 4,75) erőértékekhez viszonyítottuk (relatív Ca²⁺-erő összefüggés), úgy a MPO+H₂O₂ kezelést követően bekövetkező erőcsökkenés szignifikánsan nagyobb volt a H₂O₂ kezeléshez viszonyítva (**28. ábra**). Az MPO+H₂O₂ hatására létrejövő F_{passzív} növekedés ugyancsak nagyobb volt a H₂O₂ kezelést követően tapasztalt F_{passzív} növekedésnél (79,6±14,6% vs. 23,9±7,4%, p<0,001).



28. ábra A mieloperoxidáz (MPO) és a hidrogén-peroxid (H₂O₂) károsítja a humán, membránfosztott szívizomsejtek funkcióját

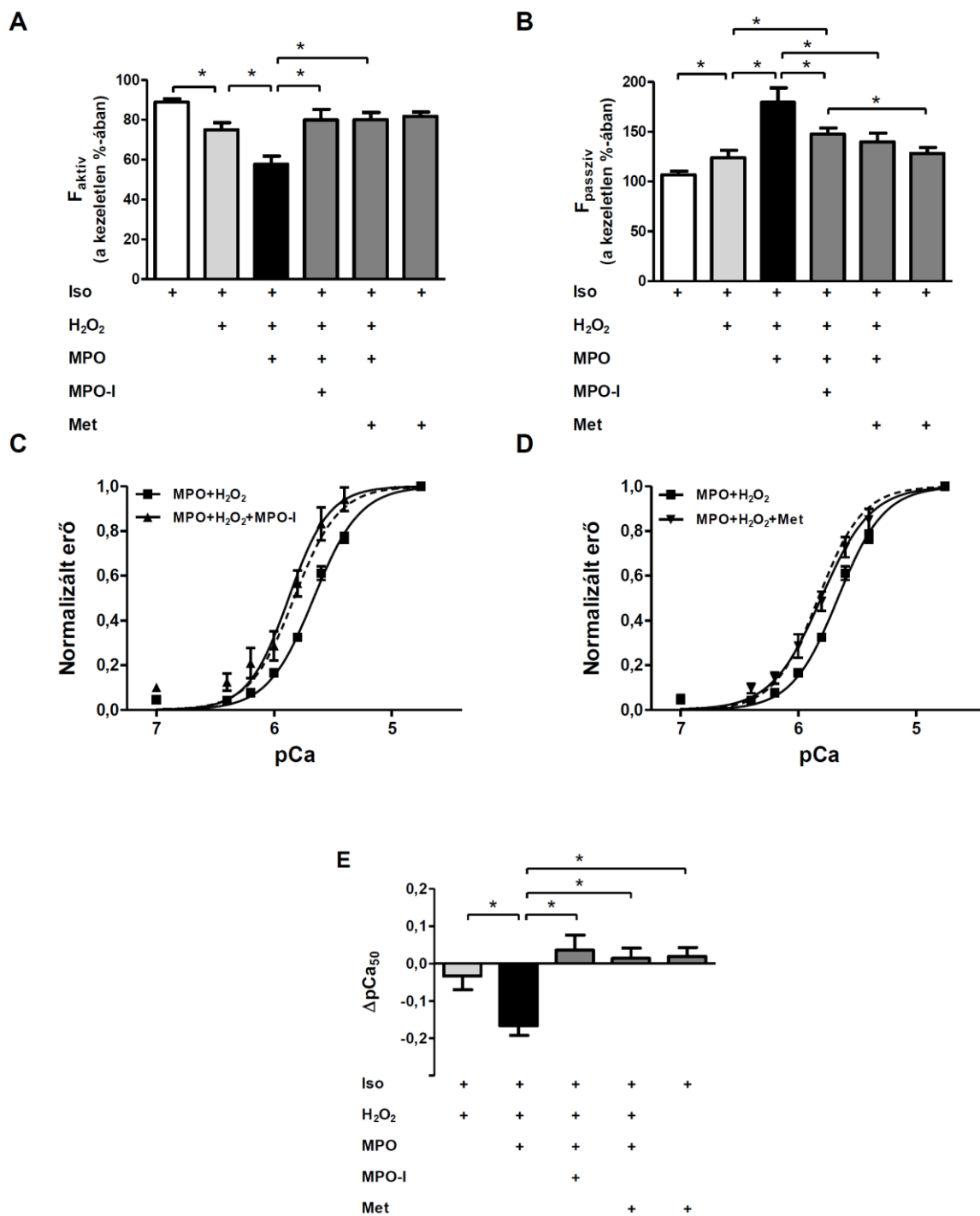
A. Relatív Ca²⁺-erő összefüggés H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelés előtt és után (n=7 és n=12). A kezelés után mért erőértékeket a kezelés előtti erőértékekhez viszonyítva fejeztük ki (*vs. H₂O₂ előtt, # vs. MPO+H₂O₂ előtt, & vs. H₂O₂ után; *,#, & p<0,05) **B.** F_{passzív} változásai 15 perces Iso (idő kontroll), H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelést követően. **C.** A normalizált erő-pCa összefüggés MPO+H₂O₂ kezelés hatására jobbra tolódik (a Ca²⁺ érzékenység csökken). **D.** A H₂O₂ önmagában nincs hatással a szívizomsejtek Ca²⁺ érzékenységére. (Kalász J. és munkatársai, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 84: 116-127. alapján)

MPO+H₂O₂ kezelést követően a normalizált erő-pCa összefüggés szignifikáns jobbra tolódását, azaz a Ca²⁺ érzékenység (pCa₅₀) csökkenését tapasztaltuk (5,83±0,02 vs. 5,66±0,02, p<0,001). Ezzel szemben a H₂O₂-kezelés a pCa₅₀ értéket nem befolyásolta (5,85±0,05 vs. 5,82±0,03, p=0,55). A Ca²⁺ érzékenységi görbe meredekségét jellemző Hill-koefficiens (n_{Hill}) egyik kezelés hatására sem változott. Sem a H₂O₂, sem a MPO+H₂O₂ kezelés nem eredményezett fénymikroszkóppal észlelhető strukturális változást a szívizomsejtek harántcsíkolatában.

4.5.2. Az MPO-inhibitor (MPO-I) és a metionin (Met) kivédi, a dithiotreitol (DTT) részlegesen revertálja az MPO-okozta kontraktilis diszfunkciót

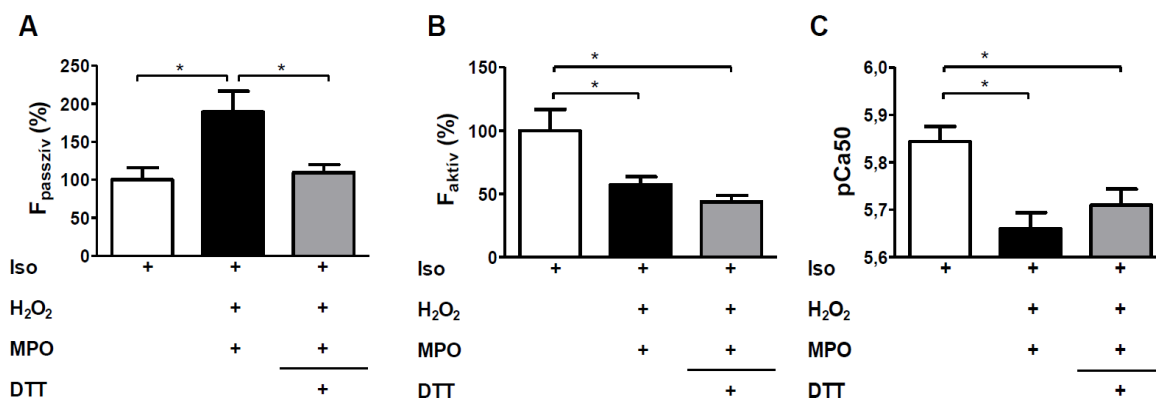
Az MPO+H₂O₂ kezelés szívizomsejtekre kifejtett káros funkcionális hatásainak kivédhetőségét az MPO-I 4-aminobenzhidrazid (50 µM), valamint az antioxidáns Met (10 mM) és a redukálószer DTT (10 mM) segítségével vizsgáltuk. Mind az MPO-I, mind a Met kivédte az MPO hatására létrejövő F_{aktív} csökkenést (MPO: 57,7±4,1%, MPO-I: 80,0±5,3%, Met: 80,1±3,6%, p<0,001 vs. MPO) és F_{passzív} növekedést (MPO: 179,6±14,6%, MPO-I: 147,7±6,1% és Met: 139,9±8,7%, p<0,05 vs. MPO). Az MPO-I és Met jelenlétében mért F_{aktív} és F_{passzív} összevethető volt a H₂O₂ kezelés után meghatározott erőértékekkel. Az MPO-I és a Met jelenlétében a Ca²⁺ érzékenységi görbe jobbra tolódása (a pCa₅₀ csökkenése) nem volt megfigyelhető (pCa₅₀ értékek MPO-I: 5,88±0,07 vs. MPO: 5,66±0,02, p<0,05, illetve Met: 5,81±0,04 vs. MPO: 5,66±0,02, p<0,001) (29. ábra).

A redukálószer DTT, MPO kezelést követően visszafordította az MPO által indukált F_{passzív} növekedést (ΔF_{passzív} MPO: 89,3±27,3% vs. DTT: 19,7±10,4%, p<0,05), ugyanakkor az F_{aktív} (MPO: 57,3±6,4% vs. DTT: 43,8±5,1%, p=n.s.) és a pCa₅₀ (5,66±0,03 vs. 5,69±0,03, p=n.s.) MPO hatására bekövetkező csökkenését a DTT nem volt képes revertálni (30. ábra).



29. ábra: A mieloperoxidáz kontraktilis funkciót károsító hatása kivédhető MPO inhibitor (MPO-I) vagy metionin (Met) alkalmazásával.

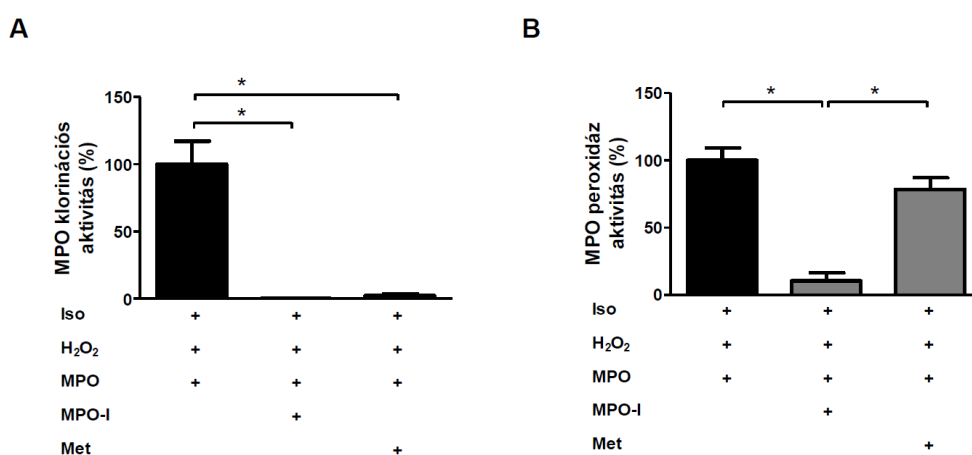
A-B. Membránfosztott szívizomsejtek maximális Ca^{2+} függő aktív (F_{aktiv}) és Ca^{2+} független (pCa 9) passzív ($F_{\text{passzív}}$) erőértékei H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelést követően, illetve MPO-I és Met jelenlétében. Az erőértékeket a kezelés előtt rögzített kiindulási erőértékek százalékában adtuk meg, a kezelések hatását az Iso kezelt (időkontroll) mintákhoz viszonyítottuk. Az MPO-I (C) és a Met (D) kivédi a Ca^{2+} érzékenységi görbe MPO hatására bekövetkező jobbra tolódását. A szaggatott vonalak az Iso-ban mért Ca^{2+} érzékenységet jelölik. E. A Ca^{2+} érzékenységet jellemző pCa₅₀ érték változásai H₂O₂, MPO+H₂O₂, MPO-I és Met kezeléseket után. (*p<0,05) (Kalász J. és munkatársai, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 84:116-127. alapján)



30. ábra A redukálószer DTT hatása az MPO kezeléssel átesett szívmusclek passzív ($F_{\text{passzív}}$, **A**) és aktív erejére ($F_{\text{aktív}}$, **B**), valamint Ca^{2+} érzékenységre (pCa₅₀, **C**). (Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk, * $p < 0,05$) (Kalász J. és munkatársai, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 84: 116-127. alapján)

4.5.3. A Met gátolja az MPO klorinációs aktivitását, azonban a peroxidáz aktivitásra nincs hatással

Az MPO funkcionális hatásainak hátterében álló biokémiai mechanizmusok feltérképezéséhez meghatároztuk az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását MPO-I és Met jelenlétében. Az MPO-I az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását is gátolta (a kiindulási aktivitás $0,3 \pm 0,2\%$, illetve $10,4 \pm 6\%$ -ára, $p < 0,001$). Ezzel szemben a Met csak az MPO klorinációs aktivitását csökkentette ($2,3 \pm 1,3\%$ -ra, $p < 0,001$), az enzim peroxidáz aktivitására nem volt hatással ($78,4 \pm 8,6\%$, $p = \text{n.s.}$) (**31. ábra**). Eredményeink arra utalnak, hogy az MPO szívmusclejt funkciót károsító hatásai az enzim klorinációs aktivitásán keresztül valósulnak meg.

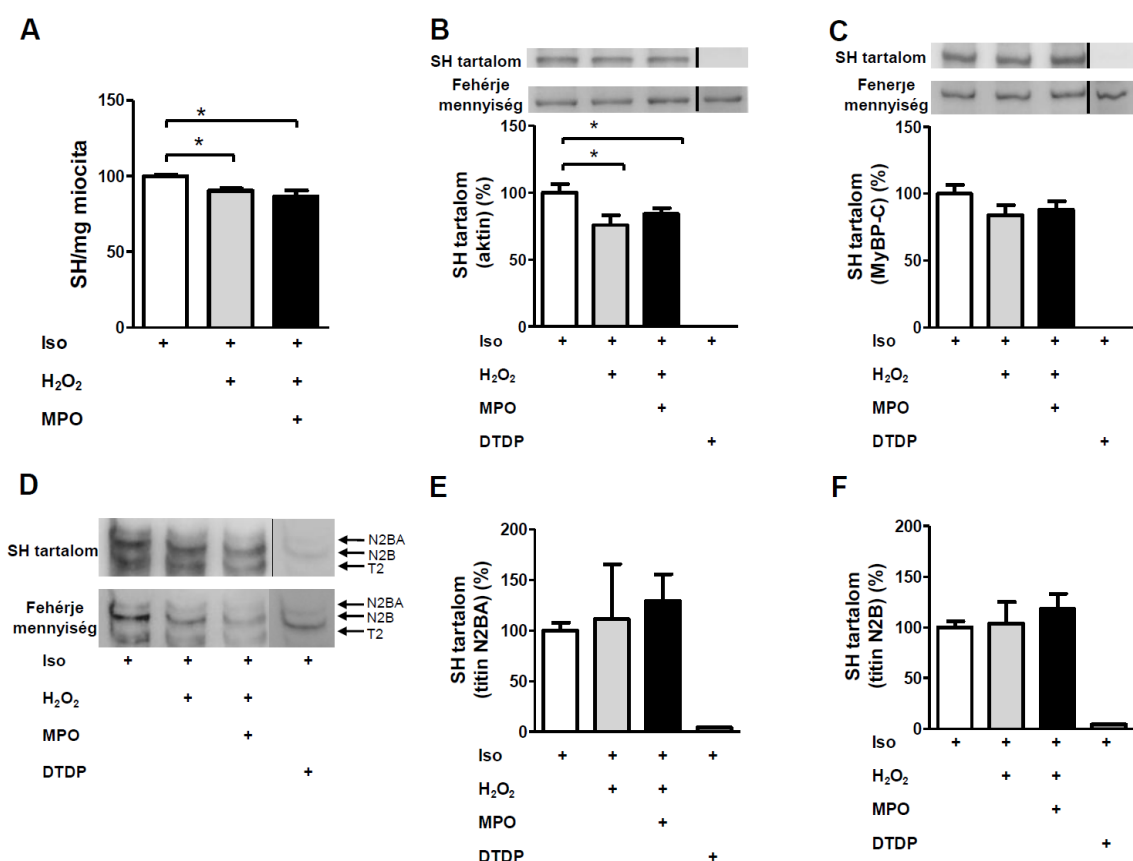


31. ábra MPO-inhibitor (MPO-I) és metionin (Met) hatása a mieloperoxidáz (MPO) klorinációs és peroxidáz aktivitására

A. A Met szelektíven gátolja az MPO klorinációs aktivitását. **B.** A Met az MPO peroxidáz aktivitására nincs hatással. Az egyes gátlószerek jelenlétében mért értékeket az MPO (Iso és H₂O₂ jelenlétében mért) aktivitásának százalékában adtuk meg (* $p < 0,05$). (Kalász J. és munkatársai, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 84: 116-127. alapján)

4.5.4. Az MPO+H₂O₂ kezelés hatása a miofilamentális fehérjék SH-tartalmára

Biokémiai kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az MPO működése során keletkező oxidánsok hogyan károsítják a szívizomsejtek fehérjerendszerét. A miofilamentális fehérjék SH tartalmát Ellman-reakcióval vizsgáltuk. A H₂O₂ és kombinált MPO+H₂O₂ kezelés során is kismértékű, de szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a fehérjék össz SH-csoport tartalmában (90,4±1,5%, p<0,05, illetve 86,7±4%, p<0,01) (32. ábra). Ezt követően SH biotinálási módszer segítségével kísérletet tettünk az SH oxidáción átesett fehérjék azonosítására. H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelés hatására szignifikánsan csökkent az aktin SH tartalma (75,9±7,1%-ra, p<0,01, valamint 84,2±4,4%-ra, p<0,05, az Iso-ban kezelt minták SH tartalmához viszonyítva). Ezzel szemben MyBP-C és az óriás szarkomer fehérje, a titin rugalmasabb (N2BA) és rigidebb (N2B) izoformájának SH tartalma egyik kezelést követően sem változott jelentősen.

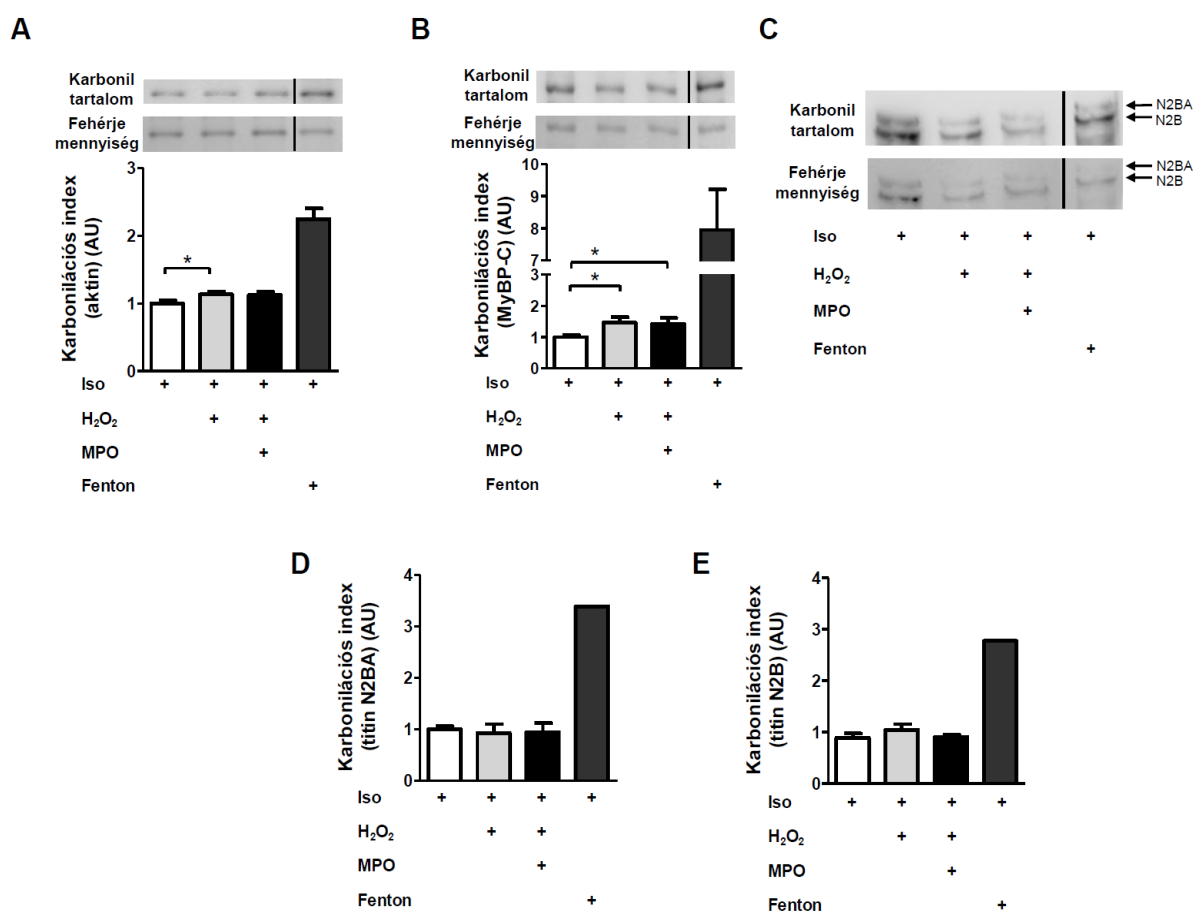


32. ábra A mieloperoxidáz (MPO) és a H₂O₂ azonos hatást fejt ki miofilamentáris fehérjék szulfhidril (SH) csoportjaira

A. Szívizomsejtek össz-SH tartalmának meghatározása H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezelés után Ellman reakcióval. B-F. A fehérje biotinálási módszerrel vizsgált SH tartalom meghatározás eredményei kemilumineszcens SH, valamint a fluoreszcensen meghatározott fehérjemennyiségi jellel aktin, miozin kötő C fehérje (MyBP-C), a titin N2BA, valamint a titin N2B izoformájának esetében H₂O₂ és MPO+H₂O₂ kezeléseket követően (T2 jelöli a titin degradációs termékét). Pozitív kontrollként az oxidálószer dithiodipiridinnel (DTDP, 2,5 mM, 2 perc) kezelt minták szolgáltak. Az SH tartalom mértékét az Iso-ban meghatározott SH tartalom (idő kontroll) százalékában adtuk meg. (*p<0,05 vs. Iso) (Kalász J. és munkatársai, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 84:116-127. alapján)

4.5.5. Az MPO hatása a szívizomfehérjék karbonilációjára

A miofilamentális fehérjék karbonilációjának vizsgálatakor H_2O_2 kezelés hatására kismértékű, de szignifikáns növekedést tapasztaltunk az aktin karbonil-csoport tartalmában (karbonilációs index (KI)= $1,1 \pm 0,046$, $p < 0,05$), ez az érték azonban nem változott MPO hozzáadását követően (KI= $1,1 \pm 0,052$, $p = 0,9$ vs. H_2O_2) (33. ábra). Az aktinhoz hasonlóan kismértékű, de szignifikáns növekedést mértünk a MyBP-C fehérje karbonilációjában mind H_2O_2 (KI= $1,5 \pm 0,2$, $p < 0,05$), mind pedig MPO+ H_2O_2 kezelés után (KI= $1,4 \pm 0,2$, $p < 0,05$ vs. idő kontroll). Az óriásfehérje titin N2BA és N2B izoformájának karbonilációja nem változott H_2O_2 és MPO+ H_2O_2 kezelést követően sem (N2BA- H_2O_2 : KI= $0,9 \pm 0,2$, $p = 0,47$ vs. Iso és MPO: $1,0 \pm 0,2$, $p = 0,68$ vs. Iso, N2B- H_2O_2 : KI= $1,0 \pm 0,1$, $p = 0,36$ vs. Iso és MPO: KI= $0,9 \pm 0,1$, $p = 0,64$ vs. Iso)



33. ábra A mieloperoxidáz (MPO) és H_2O_2 kezelés hatására nő az aktin, valamint a miozin-kötő C fehérje (MyBP-C) karbonilációja

Reprezentatív, kemilumineszcensen (karboniláció) és fluoreszcensen (fehérjemennyiség) detektált membránképek. A-E. A H_2O_2 és MPO+ H_2O_2 kezelés hatására létrejövő karboniláció mértéke aktin, MyBP-C és a titin N2BA, valamint N2B izoformájának esetében. Pozitív kontrollként Fenton-reagenssel ($FeSO_4$, H_2O_2 és aszkorbinsav) kezelt minták szolgáltak. A fehérjekarboniláció mértékét karbonilációs index formájában fejeztük ki (KI=1, az Iso-ban kezelt minták karbonilációja). (* $p < 0,05$) (Kalász J. és munkatársai, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 84: 116-127. alapján)

Az MPO hatását izolált, humán szívizomsejteken vizsgálva megállapítottuk, hogy 1. a MPO az *in vitro* kísérleti körülmények között rontotta a kalciumfüggő izometriás erőgenerálást, növelte az $F_{\text{passzív}}$ -ot és csökkentette a pCa_{50} -et; 2. az MPO által kiváltott funkcionális változások kivédhetők MPO-inhibitorral, valamint az antioxidáns metionin alkalmazásával; 3. az aktin fehérje SH-oxidációja, valamint az aktin és a MyBP-C karbonilációja H_2O_2 és H_2O_2 +MPO kezelés hatására növekedett; 4. az MPO által kiváltott funkcionális hatásokat feltehetően az MPO klorinációs aktivitása közvetíti.

Méréseink során az $MPO+H_2O_2$ kezelés $F_{\text{aktív}}$ -ra kifejtett jelentős károsító hatásának hátterében a reakcióban képződő erős oxidáns, a HOCl állhat. Egy korábbi vizsgálatban a HOCl kezelés (10 és 50 μM , 1 perc) - az $MPO+H_2O_2$ kezelés hatásához hasonlóan - szignifikánsan csökkentette a maximális erőt.¹²¹ Az $F_{\text{passzív}}$ H_2O_2 hatására kismértékben, míg H_2O_2 +MPO hatására jelentős mértékben fokozódott. Ezen eredményeink összefüggésben állnak a korábbi megfigyeléssel, miszerint membránfosztott patkány trabekulák esetében a H_2O_2 alacsony koncentrációban (10 μM) nem növelte az $F_{\text{passzív}}$ -ot, míg a HOCl-val történő kezelés (10 μM és 50 μM) annak szignifikáns emelkedését okozta.¹²² Korábbi eredmények alapján oxidatív stressz hatására diszulfid hidak képződnek a titin molekulák N2B unique sequence régiójában (N2B-U_s), melynek hatására nő a fehérje rigiditása.⁴⁴ Jelen tanulmányunkban nem sikerült biokémiai módszerekkel kimutatni a titin fehérje H_2O_2 +MPO kezelést követő SH oxidációját és karbonilációját, funkcionális méréseinkben azonban a DTT szignifikánsan csökkentette a szívizomsejtek H_2O_2 +MPO kiváltotta $F_{\text{passzív}}$ növekedését. Az MPO hatás redukálószerrel történő revertálhatósága annak oxidatív természetére utal.

H_2O_2 +MPO kezelés hatására a pCa_{50} szignifikáns csökkenését tapasztaltunk, amely ellentmondásban áll egy korábbi tanulmány eredményeivel, ahol HOCl kezelést követően a pCa_{50} érték emelkedését mutatták ki.¹²² Az eltérő eredmények hátterében az eltérő kísérleti elrendezés (permeabilizált szívizomsejt vs. trabecula) és az eltérő alkalmazott dózisok állhatnak. A H_2O_2 kezelés nem befolyásolta a pCa_{50} -et, így azt feltételezzük, hogy inkább strukturális, mintsem regulatórikus változásokat okoz a miofilamentumok szintjén, akár az erőgeneráló kereszthidak számának csökkentése által.

Az MPO gátlás potenciális negatív immunológiai következményei ellenére az MPO-inhibitorok jelenleg is számos CV megbetegedés (miokardiális infarktus, HFpEF) kezelésére klinikai kipróbálás alatt állnak. Az általunk alkalmazott MPO-I, a 4-aminobenzhidrazid és az antioxidáns, HOCl scavenger aminosav, a Met is képes volt megakadályozni azt, hogy az MPO kifejtse káros funkcionális hatásait, amiből arra következtetünk, hogy az észlelt változásokért az MPO klorinációs aktivitása tehető felelőssé. A HOCl károsító mechanizmusának nagy

reakciósebessége miatt azonban a HOCl keletkezésének gátlása hatékonyabb lehet, mint a már létrejött HOCl közömbösítése. Az MPO inhibitorral és Met-nal két ponton is sikeresen kivédtük az MPO oxidatív hatásait. A redukálószer DTT azonban a csak részlegesen volt képes visszafordítani az MPO-indukált mechanikai változásokat: az $F_{\text{passzív}}$ -ot a kiindulási értékre csökkentette, azonban az $F_{\text{aktív}}$ -ot és a pCa_{50} értéket érdemben nem befolyásolta. Az MPO által közvetített oxidatív hatások sokfélesége⁴⁸ miatt valószínűsíthető, hogy esetünkben több, különböző reakció eltérő poszttranszlációs módosításokat eredményezett a szívizomfehérjéken. Jelen tanulmányunkban a H_2O_2 +MPO hatására megfigyelt szívizom SH oxidáció összhangban áll a szívizom szeleteken nagydózisú HOCl által kiváltott SH oxidációval.¹²³ Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy oxidatív hatások jelentősen módosíthatják az aktin és miozin filamentumok szerkezetét.¹²⁴ Kísérleteinkben aktin esetében szignifikáns SH tartalom csökkenést tapasztaltunk, azonban ennek mértéke nem növekedett MPO hatására, így ez önmagában nem magyarázza a szívizomsejtek aktív erejének csökkenését.

Egy, a munkacsoportunk által korábban használt miokardiális infarktus egér modellben a Ca^{2+} érzékenység csökkenéséhez az aktin és MHC karbonilációja társult, míg magas koncentrációban alkalmazott H_2O_2 az aktin karbonilációját idézte elő.¹²⁵ Jelen tanulmányunkban 0,1 mM-nál magasabb H_2O_2 dózist annak MPO gátló hatása miatt nem alkalmaztunk.⁶⁰ A használt 30 μ M-os kezelést követően az aktin és MyBP-C esetében kismértékű növekedést tapasztaltunk a karbonilációs indexben. Mivel ezen paraméterben további növekedést nem észleltünk az MPO kezelés hatására, így az MPO-indukált funkcionális hatásokat nem tudtuk egy-egy konkrét szívizomfehérje SH oxidációjával, vagy karbonilációjával magyarázni. Azok hátterében az MPO hatására létrejövő egyéb fehérjemódosulások (pl. klorináció, nitrálás, Met oxidáció, szulfonsav-képződés, fehérjedegradáció) állhatnak.

Jelen tanulmányunkban az MPO hatására a szívizomsejtek kontraktilis funkciója romlott. Újabb tanulmányok eredményei alapján az enyhe oxidatív stressz ugyanakkor kardioprotektív hatású is lehet, sőt akár javíthatja is a kontraktilis apparátus teljesítményét.^{51,126} Összességében elmondható, hogy az oxidatív ágensek szívizomra kifejtett hatása nagyban függ azok erősségétől és természetétől, valamint a miofilamentumok redox környezetétől. Eredményeink arra utalnak, hogy az MPO szívizomsejt funkciót károsító hatása az enzim klorinációs aktivitásán keresztül valósul meg, mely MPO-inhibitorral és Met-nal kivédhető. Mindezek alapján az MPO gátlása egy ígéretes célpont lehet a gyulladáshoz társuló miokardiális kontraktilis diszfunkció kivédésében.

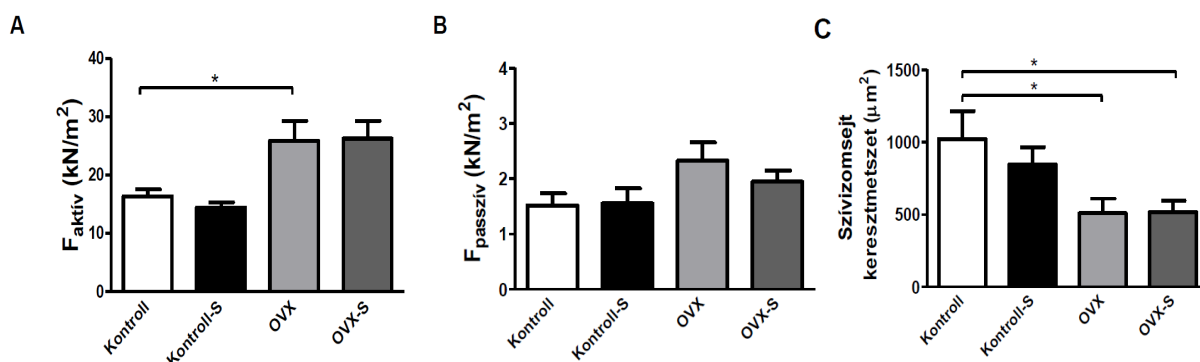
4.6. Az ovariectomia és az akut stressz hatása patkány bal kamrai szívizomsejtek kontraktilis funkciójára

4.6.1. Az ovariectomia és a stressz hatása a női nemi hormonok szintjére

Vizsgálatunk során az OVX állatok ösztrogén szintje nem érte el az alsó detekciós értéket (4,9 pg/ml), amely sikeres ovariectomiára utalt. A szérumban a progeszteron szint szignifikánsan magasabb (több mint háromszoros) volt a Kontroll-S (35,6±4,8 ng/ml), valamint az OVX-S (21,9±4,0 ng/ml) patkányokban ($p < 0,001$ Kontroll-S vs. Kontroll; $p < 0,01$ OVX-S vs. OVX). Az akut stressz hatására a Kontroll-S, illetve az OVX-S csoportban a progeszteron szintben bekövetkező emelkedés (25,6 ng/ml, ill. 19,1 ng/ml) hasonló mértékű volt.¹²⁷

4.6.2. Az ovariectomia befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilis funkcióját

Az $F_{\text{aktív}}$ szignifikánsan nagyobb volt az OVX, valamint OVX-S állatok esetében a Kontroll, illetve a Kontroll-S állatokhoz viszonyítva (25,9±3,4 kN/m² és 26,3±3,0 kN/m² vs. 16,4±1,2 kN/m² és 14,4±0,9 kN/m², $p < 0,05$) (34. ábra). Ezzel szemben az akut stressz nem befolyásolta az $F_{\text{aktív}}$ -ot sem a Kontroll, sem az OVX állatcsoportban. A stressz hatására a pCa₅₀-ben bekövetkező csökkenés nem volt szignifikáns. Sem az ovariectomia, sem pedig a stressz nem befolyásolta az $F_{\text{passzív}}$ -ot. Méréseink alapján az OVX, illetve az OVX-S állatok felhasznált szívizomsejtjeinek keresztmetszete jelentősen kisebb volt.



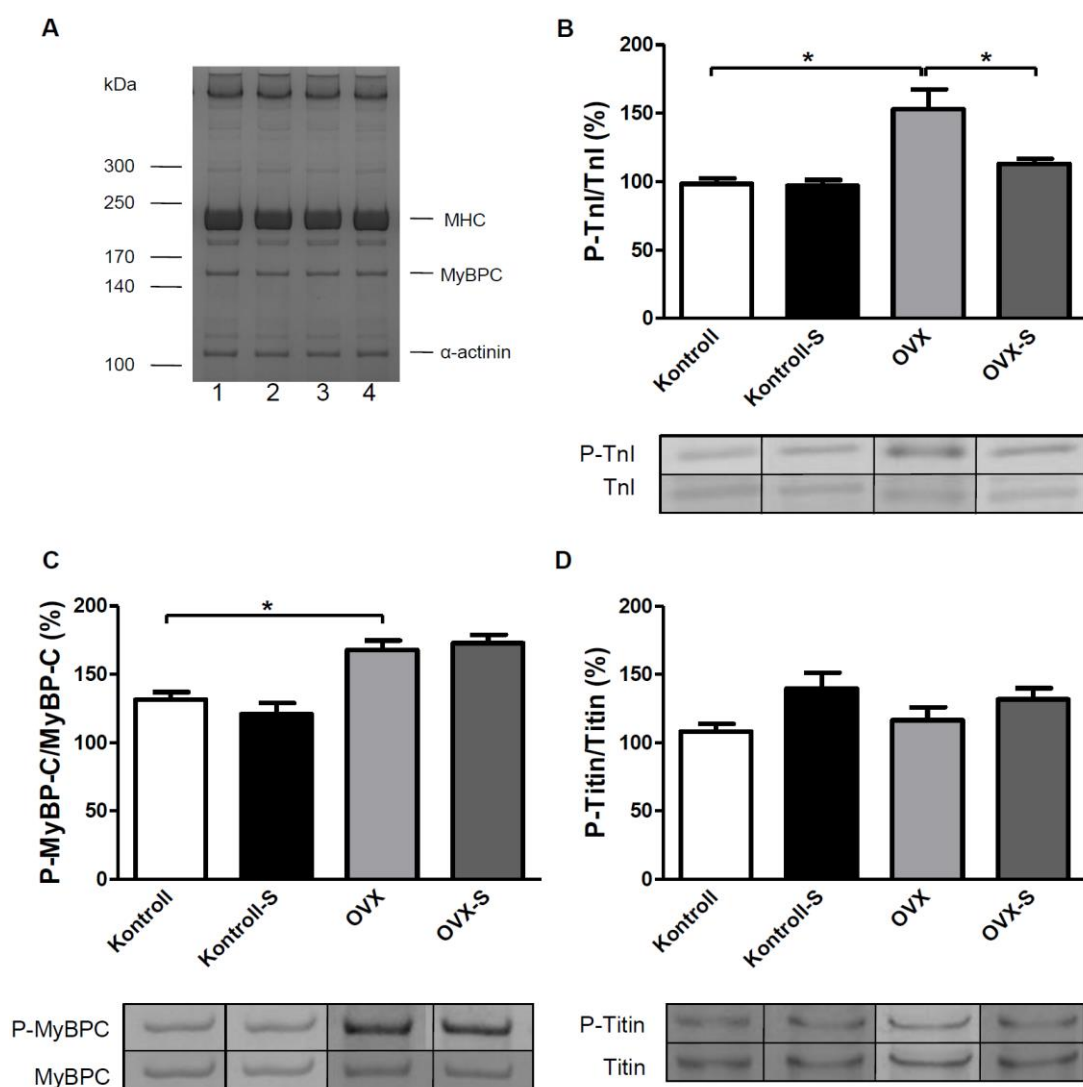
34. ábra Az ovariectomia és a stressz hatása a szívizomsejtek kontraktilis funkciójára

A. Az ovariectomián átesett állatokból izolált szívizomsejtek (OVX, OVX-S) aktív ereje ($F_{\text{aktív}}$) emelkedett. B. Az ovariectomia és a stressz nem befolyásolta a szívizomsejtek passzív erejét ($F_{\text{passzív}}$) C. Az OVX állatcsoportokban mért szívizomsejtek keresztmetszete kisebb. (Kalász J. és munkatársai, *Croat. Med. J.*, 2014, 55(3): 239-249. alapján)

4.6.3. Az ovariectomia és stressz hatása a miofilamentális fehérjék összetételére és foszforilációs állapotára

Ezen kísérletek során nem találtunk lényeges különbséget a miofilamentális fehérje-összetételben a Kontroll és OVX csoportok között. A TnI foszforilációja szignifikánsan magasabb volt az OVX állatokban a Kontroll csoporthoz viszonyítva (153±14,4% vs. 98,5±4%,

$p < 0,001$), ez azonban nem mutatott összefüggést a szívizomsejteken mért pCa_{50} -el ($r = 0,27$, $p = 0,73$). Az OVX-S állatcsoportban mérhető TnI foszforiláció ($113 \pm 3,6\%$) összevethető volt a Kontroll és Kontroll-S csoportokban meghatározott értékekkel. A MyBP-C foszforilációja szignifikánsan magasabbnak adódott OVX állatokban a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($167,7 \pm 7\%$ vs. $131,4 \pm 5,5\%$, $p < 0,001$), azonban az OVX-S állatokban további, szignifikáns emelkedés nem volt megfigyelhető. A funkcionális méréseknél tapasztalt változatlan $F_{passzív}$ értékeknek megfelelően nem találtunk különbséget a titin foszforilációban a négy állatcsoport között (35. ábra).

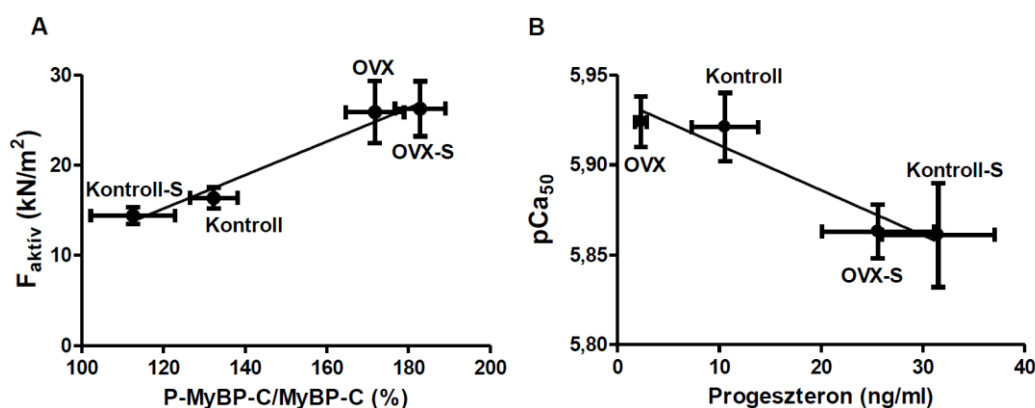


35. ábra Fehérjeösszetétel és fehérjefoszforiláció a Kontroll és ovariektómizált (OVX) állatok szívizommintáiban

A. Változatlan fehérjeösszetétel a Kontroll (1), a Kontroll-S (2), OVX (3) és OVX-S (4) állatok bal kamrai szívizomszövetében. (Coomassie blue mennyiségi fehérjefestés, 4%-os poliakrilamid gél 0,5%-os agarózzal erősítve, MHC - miozin nehézlánc). **B.** Emelkedett troponin-I összfoszforiláció (P-TnI) az OVX csoportban. **C.** A miozin-kötő C fehérje összfoszforilációja (P-MyBP-C) emelkedett az OVX és OVX-S állatokban. **D.** Változatlan titin összfoszforiláció a négy állatcsoportban. (A fehérjefoszforilációt fehérjemennyiségre normalizáltuk és egy belső kontroll százalékában fejeztük ki, $p < 0,05$). (Kalász J. és munkatársai, *Croat. Med. J.*, 2014, 55(3): 239-249. alapján)

4.6.4. A szívizomsejt kontraktilis funkció összefüggése a miokardiális fehérjék foszforilációjával, valamint a női nemi hormonok szintjével

A szívizomsejtek funkcionális paramétereit a fehérje foszforiláció értékeivel összevetve szignifikáns korrelációt találtunk az $F_{\text{aktív}}$, valamint a MyBP-C foszforiláció között ($r=0,99$, $p<0,05$). A titin foszforiláció ugyanakkor nem mutatott összefüggést a szívizomsejteken meghatározott $F_{\text{passzív}}$ -al ($r=0,14$, $p=0,86$). A szérumban mért progeszteron szint és a szívizomsejteken meghatározott pCa_{50} értékek között szignifikáns, inverz korreláció volt megfigyelhető ($r=0,96$, $p<0,05$) (36. ábra).



36. ábra Összefüggés a fehérjefoszforiláció, a progeszteron szint és a szívizomsejtek kontraktilis funkciója között

A. Korreláció a miozin-kötő C fehérje (MyBP-C) összfoszforilációja és a szívizomsejtek aktív ereje ($F_{\text{aktív}}$) között ($r=0,99$, $p<0,05$, lineáris regresszió) **B.** A szívizomsejtek Ca^{2+} érzékenysége (pCa_{50}) inverz korrelációt mutat a szérumban mért progeszteron szinttel ($r=0,96$, $p<0,05$, lineáris regresszió). (Kalász J. és munkatársai, *Croat. Med. J.*, 2014, 55(3): 239-249. alapján)

Kísérleteink során kimutattuk, hogy 1. a stressznek kitett állatcsoportokban (kontroll-S, OVX-S) a szérumban mért progeszteron szint több mint háromszor magasabb, mint a kontroll és OVX állatokban, 2. az OVX állatokból származó szívizomsejtek $F_{\text{aktív}}$ -ja szignifikánsan magasabb a kontroll állatokéhoz képest, 3. $F_{\text{passzív}}$ és pCa_{50} nem különbözik az egyes állatcsoportok között, azonban akut stresszt követően pCa_{50} jelzett csökkenése figyelhető meg, 4. a szérumban mért progeszteron szint inverz korrelációt mutat a pCa_{50} értékekkel, 5. a miofilamentális fehérjék összetétele nem különbözik a vizsgált állatcsoportokban, ugyanakkor a MyBP-C foszforilációja szignifikánsan magasabb az OVX állatokban.

Ismert, hogy stressz hatására a szérumban mért progeszteron szint nemtől függetlenül jelentősen megemelkedik, melynek hátterében a hormon mellékvesekéregből történő szekréciója áll.¹²⁸ A progeszteronszint jelentős emelkedése az általunk vizsgált állatmodellben is megfigyelhető volt a stressznek kitett Kontroll, és OVX-en átesett állatcsoportban.

A progeszteron receptorok (PR) bal kamrai szívizommintákban történő kimutatására irányuló kísérletek mind egér,¹²⁹ mind pedig humán szövetekben negatív eredménnyel

zárultak.¹³⁰ Ezzel szemben humán pitvari szívizomzatban ösztrogén hatására a PR mRNS szintjének növekedését igazolták, melyet fehérjeszinten is sikerült kimutatni posztmenopauzás nőkben, ugyanakkor a PR-expresszió fokozódása a férfiakból származó szövetekben nem volt igazolható.¹³¹ Irodalmi adatok a progeszteron CV hatásait egyre inkább nem genomi útvonalak aktiválódásával hozzák összefüggésbe.¹³² Az, hogy ezek a gyors szignáltranszdukciós utak is szerepet kapnak a progeszteron válaszban, felveti az akut stressz által kiváltott progeszteronszint emelkedés esetleges hatásait a szívizomsejtek kontraktilis működésére és/vagy annak szabályozására.

A stressz hatására felszabaduló katekolamin többlet a β -adrenerg jelátviteli úton keresztül a PKA aktiválódásához vezet. A TnI PKA-mediált foszforilációja a miofilamentális rendszer Ca^{2+} érzékenységének csökkenése révén befolyásolja a kontraktilis funkciót.⁷¹ Jelen tanulmányunkban nem találtunk jelentős különbséget a pCa_{50} értékek között a négy állatcsoportban. A stressz hatására bekövetkező, kismértékű pCa_{50} csökkenés a stressznek kitett Kontroll-S, illetve az OVX-S állatcsoportok esetében nem járt együtt a TnI fehérje foszforilációs állapotának változásával. Az ellentmondó eredményeket az általunk használt nem kináz- és foszforilációs hely specifikus festési eljárás is magyarázhatja. Kísérleteink során ugyanis az egyes fehérjék összfoszforilációs szintjét határoztuk meg, mely nem ad információt a különböző protein-kinázok (PKA, PKC- β II, δ , ϵ) által mediált specifikus foszforilációs helyekről. Utóbbiak foszforilációja ugyanis akár ellentétes módon is befolyásolhatja a miofilamentális rendszer Ca^{2+} érzékenységet.¹³³ Meg kell jegyezni azt is, hogy a kontraktilis fehérjék PKA-függő alap foszforilációs szint rágcsálók esetében magasabb, mint a nagyobb emlősök esetében, ami megnehezíti a kisebb különbségek kimutatását.¹³⁴

Kísérleteink során szignifikáns összefüggést találtunk a szérum progeszteron szint és a szívizomsejtek pCa_{50} értékei között. Ez arra utal, hogy a Kontroll-S, illetve az OVX-S állatokban megfigyelt kismértékű, nem szignifikáns pCa_{50} csökkenés kiváltója az emocionális stresszprotokoll volt. A megfigyelésünk alapján azonban nem dönthető el egyértelműen, hogy a pCa_{50} -re a stressz indukált progeszteron, vagy a stressz hatására kialakuló β -adrenerg túlsúly volt hatással. Feridooni és munkatársai a progeszteron akut hatásait vizsgálva egér szíven ugyancsak a Ca^{2+} érzékenység csökkenését figyelték meg a nőstények esetében progeszteron adását követően, mely változás progeszteron receptor antagonistával kivédhetőnek bizonyult. A progeszteron ugyanakkor hím állatokban nem befolyásolta a Ca^{2+} érzékenységet.¹³⁵

Ovariektómiát követően a β -adrenerg receptorok up-regulációja és a β -adrenerg jelátviteli út stimulációja következik be,¹³⁶ mely a szíven pozitív inotróp hatást közvetít, emeli a szívfrekvenciát és a kontraktilitást.¹³⁷ Kísérletes körülmények között az ovariektómia növeli

mind az alap és az izoprenalin-indukálta kontrakciót, valamint a β_1 -adrenerg receptor expresszióját.¹³⁸ A β_1 -adrenerg receptor stimulációja G_s proteineket aktiválva a cAMP koncentráció növekedéséhez és PKA aktiválódáshoz vezet. A PKA képes foszforilálni a miofilamentális fehérjéket, többek között a MyBP-C-t, mely gyorsítja az aktin-miozin kereszthidak kialakulásának kinetikáját¹³⁹ és növeli a kalcium aktiválta maximális erőt.¹⁴⁰ Kísérleteinkben is az $F_{aktív}$ szignifikáns növekedést tapasztaltunk OVX állatokban, melynek hátterében az ovariektómia hatására bekövetkező β_1 -adrenerg stimuláció következtében kialakuló MyBP-C foszforiláció állhat. A női szívizomsejtekben fiziológiásan is kisebb és lassabb kontrakciókat, valamint alacsonyabb Ca^{2+} tranzienseket mutattak ki, melyek hozzájárulhatnak a nők esetében megfigyelhető alacsonyabb CV rizikóhoz.¹⁴¹

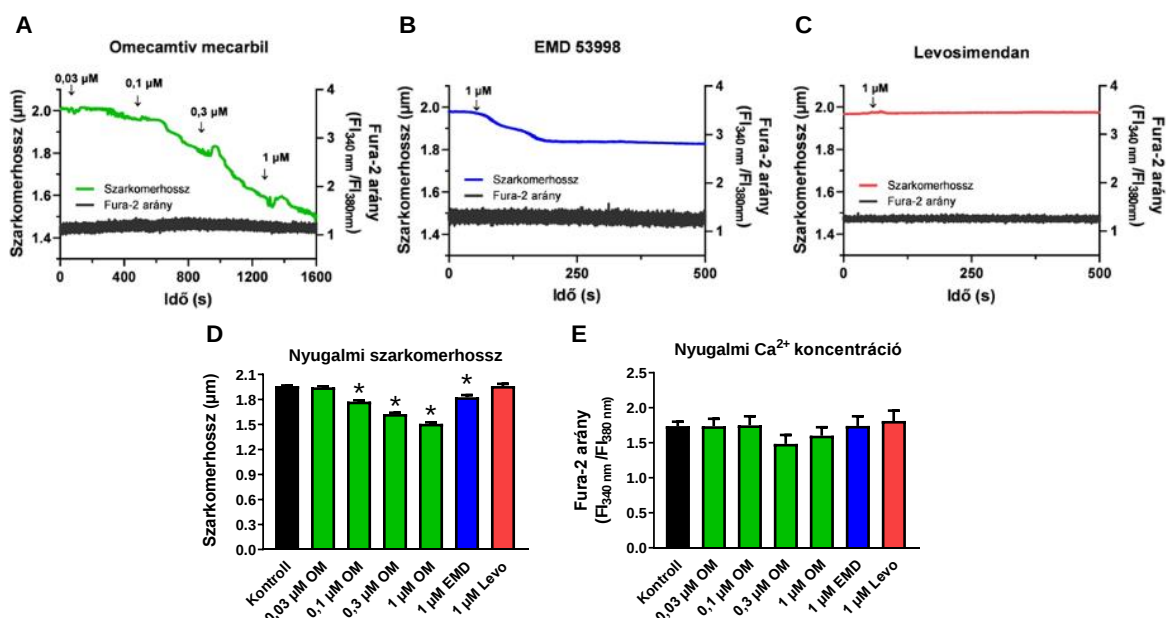
Munkánk során nem találtunk különbséget az egyes állatcsoportok között sem az $F_{passzív}$ értékekben, sem pedig annak fő regulátorának, a titin fehérjének a foszforilációs állapotában. Patkány trabekula preparátumokon, illetve szívizommintákon végzett kísérletekben az ovariektómia ugyancsak nem volt hatással a szívizom merevségre, a kollagén tartalomra, valamint a titin izoforma arányra.¹⁴² Nőkben azonban a bal kamra szívizomzat nagyobb merevsége hozzájárulhat a diasztolés diszfunkció gyakoribb előfordulásához.

A tanulmányunkban alkalmazott stressz forma (hideg és immobilizáció) a mindennapi életben viszonylag ritkán fordul elő. Az akut, főként emocionális vagy fizikai stressz hatására létrejövő, a klinikai gyakorlatban is gyakran megfigyelhető, döntő többségében posztmenopauzális nőkben kialakuló Takotsubo-kardiomiopátia (TCM) a bal kamra és szívcsúcs átmeneti, az esetek többségében teljesen reverzibilis falmozgászavara. A betegek szérumában háromszor magasabb katecholamin koncentráció mutatható ki, mint MI-ban szenvedő betegeknél.¹⁴³ Ueyama és munkatársai a TCM patkánymodelljében kimutatták, hogy az OVX állatok között nagyobb mértékben csökkent a bal kamra funkció azokban az egyedekben, akik nem részesültek ösztrogénpótlásban.¹⁴⁴ A TCM patofiziológiája máig nem ismert teljes mértékben, azonban a közelmúlt kutatásai kimutatták, hogy a korai szövődmények (akut szívelégtelenség, malignus kamrai ritmuszavarok, hirtelen halál) kialakulása mellett a szívfunkció tartós károsodását is eredményezheti egyes betegeknél. A TCM lehetséges kiváltó okainak alaposabb megismerése az elmúlt években jelentősen megváltoztatta ennek a korábban benignusnak vélt kórállapotnak a klinikai megítélését. Ezáltal egyre nagyobb igény mutatkozik a TCM háttérben álló akut és késői folyamatok részletes feltérképezésére, az adekvát, specifikus terápia kidolgozására.

4.7. In vitro kísérletek - az omecamtiv mecarbil (OM), az EMD-53998 (EMD) és a levosimendan (Levo) hatásainak vizsgálata intakt emlős szívműködés paramétereire

4.7.1. Az OM és EMD csökkentette, míg a Levo nem befolyásolja az intakt szívműködés nyugalmi szarkomerhosszát

A OM kezelés hatására a szívműködés nyugalmi szarkomerhossza (SL) koncentráció-függő módon, jelentős mértékben csökkent (37. ábra).¹⁴⁵ Hasonlóan az 1 μM EMD a nyugalmi SL szignifikáns csökkenését idézte elő, míg a Levo nem befolyásolta azt. Az intracelluláris nyugalmi Ca^{2+} koncentráció az OM, EMD és Levo kezelése során változatlan maradt.



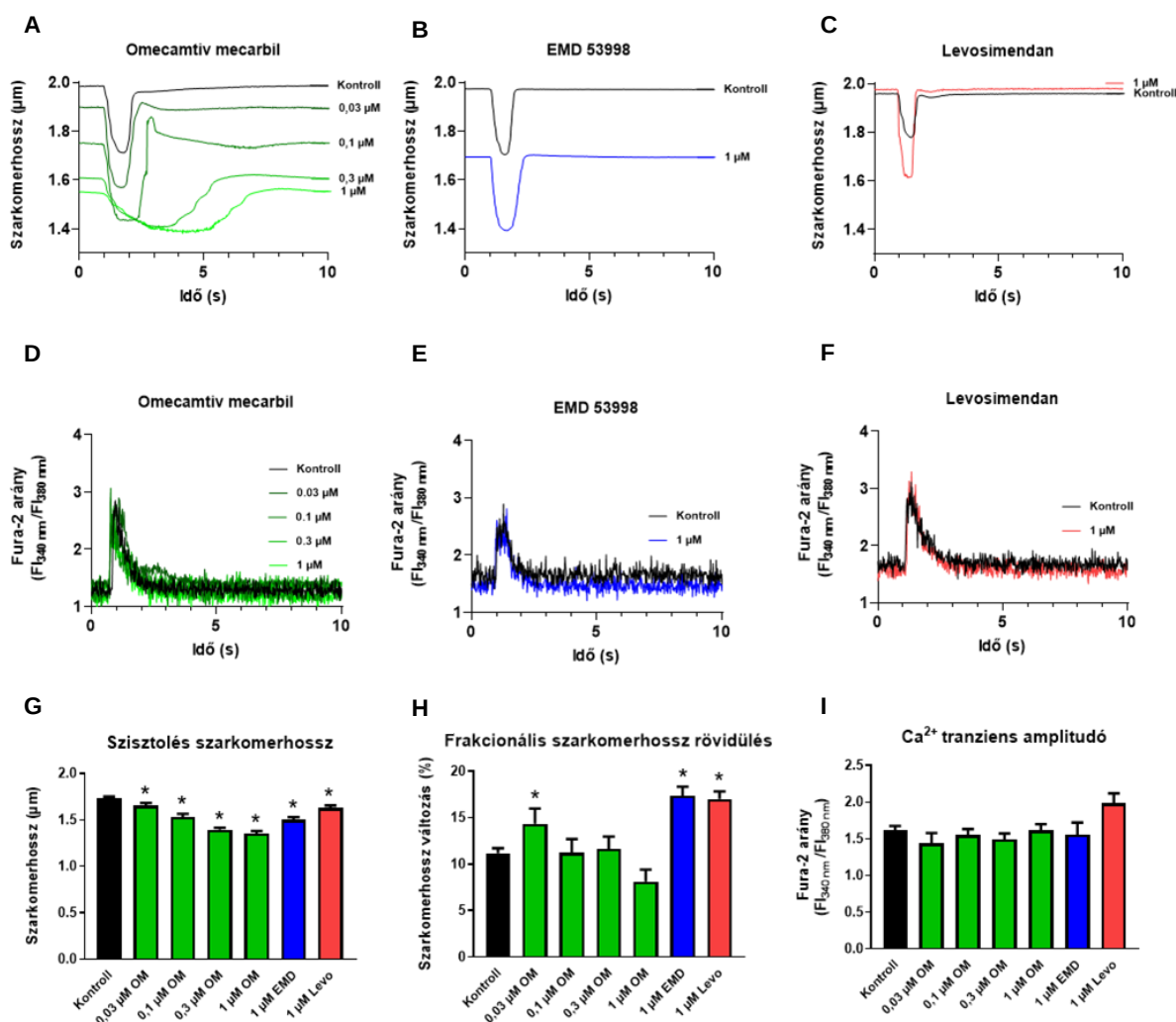
37. ábra Az OM, az EMD és a Levo eltérő hatása a szívműködés nyugalmi szarkomerhosszára (SL)

A-B. Az OM és az EMD is jelentősen csökkentette a nyugalmi SL-t izolált bal kamrai szívműködésben. Az OM-et téringelés nélkül, kumulatív módon adtuk hozzá a sejtekhez az egyes koncentrációk eléréséig, míg az EMD-t és a Levo-t (C) egyetlen koncentrációban (1 μM) alkalmaztuk. A nyugalmi SL-t és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt egyidejűleg rögzítettük. Az EMD, Levo és OM egyes hozzáadott dózisait a nyílak jelzik. Az RSL csökkent OM (A, D) és EMD (B, D) jelenlétében is, míg a Levo nem befolyásolta azt (C, D). E. Mindezen változások a Ca^{2+} koncentráció változása nélkül jöttek létre. (* $p < 0.05$ vs. kezelés előtt, ahol az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értéket jelölik) (Ráduly AP. és munkatársai, *ESC Heart Failure*, 2023, 10(2): 1326-1335. alapján)

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

Téringelést követően a szisztolés SL szignifikánsan csökkent 0,03 μM , 0,01 μM , 0,3 μM és 1 μM OM koncentrációk alkalmazásakor (38. ábra). Az OM-hez hasonlóan az EMD ($1,51 \pm 0,03$ μm -re, $p < 0,05$) és Levo ($1,63 \pm 0,03$ μm , $p < 0,05$) is jelentősen csökkentette a szisztolés SL-t. Az OM 0,03 μM -os koncentrációban növelte a frakcionális szarkomerhossz rövidülést (FSL) ($14,34 \pm 1,64\%$ vs. $11,17 \pm 0,55\%$), de magasabb gyógyszerkoncentrációknál nem volt rá jelentős hatással. 1 μM -os koncentrációban az EMD és a Levo is szignifikánsan növelte ezt a paramétert

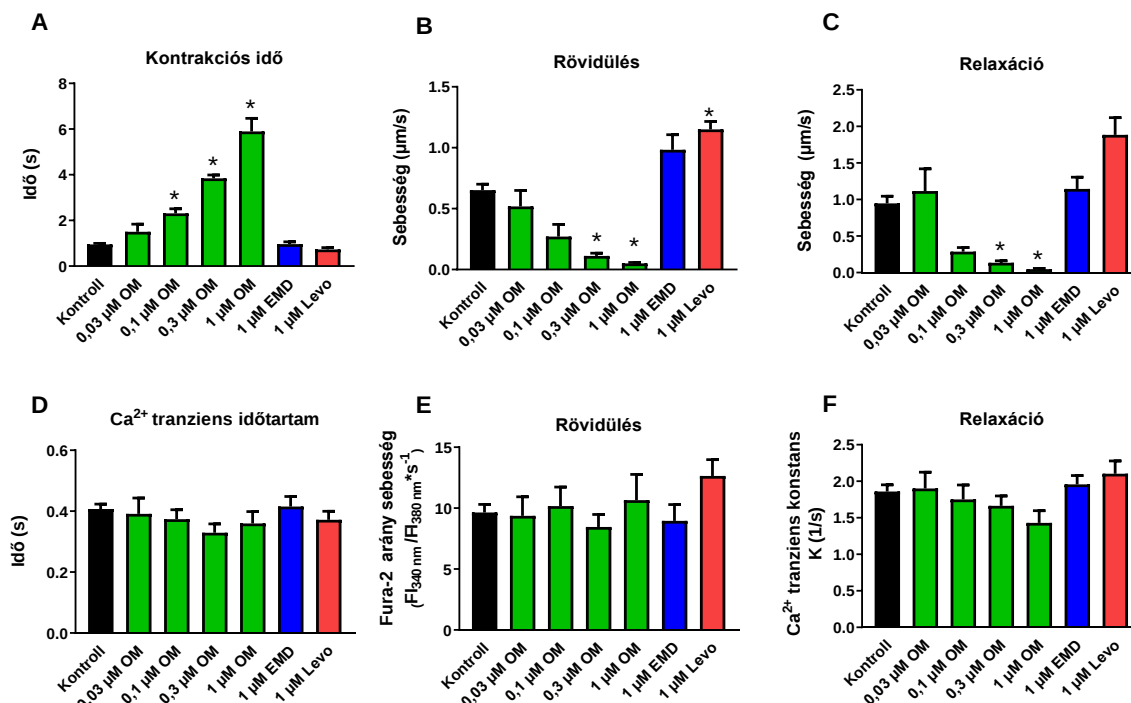
($17,36 \pm 0,98\%$ (EMD) és $17,02 \pm 0,80\%$ (Levo) vs. $11,17 \pm 0,55\%$, $p < 0,05$). A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóit egyik alkalmazott gyógyszer sem befolyásolta.



38. ábra. Az OM, az EMD és a Levo hatása a szarkomerhosszakra és az intracelluláris Ca^{2+} tranziensekre téringert követően

Az OM-et (**A**) különböző koncentrációkban ($0,03 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$) alkalmaztuk. A steady-state állapotot 5-8 percen belül értük el, majd ezt követően a kontraktilis paramétereket rögzítettük. Az EMD-t (**B**) és a Levo-t (**C**) egyetlen $1 \mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmaztuk. Az intracelluláris Ca^{2+} tranzienseket (**D-F**) a kezelések előtt és után (a jelzett gyógyszer-koncentrációk mellett) követtük nyomon. A reprezentatív példák eredményei OM (**A, D**), EMD (**B, E**) vagy Levo (**C, F**) jelenlétében láthatók. A szisztolés csúcs szarkomerhosszak (**G**), a szarkomerek frakcionált rövidülésének (**H**), a Ca^{2+} tranziensek amplitúdóinak (**I**) változásait oszlopdiagramokon mutatjuk be, ahol az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értéket jelölik. A szignifikáns különbségeket csillagok jelzik, ha $p < 0,05$ vs. kezelés előtt. (Ráduly AP. és munkatársai, *ESC Heart Failure*, 2023, 10(2): 1326-1335. alapján)

Az OM koncentráció növekedésével a kontrakciós idő progresszív megnyúlása volt megfigyelhető, míg az EMD és a Levo nem befolyásolta ezt a paramétert (39. ábra). Az OM koncentráció növekedésével (0,03 μM , 0,1 μM , 0,3 μM és 1 μM) a kontraktilis válaszok, a kontrakciók és a relaxációk sebességének jelentős fokú lassulása volt megfigyelhető. Az OM-lal és az EMD-vel ellentétben a Levo növelte, mind az összehúzódások, mind a relaxációk kinetikáját. A Ca^{2+} tranziensek időtartamát, az IC Ca^{2+} -tranziensek felfutásainak és lecsengésének kinetikáját egyik gyógyszeres kezelés sem befolyásolta.



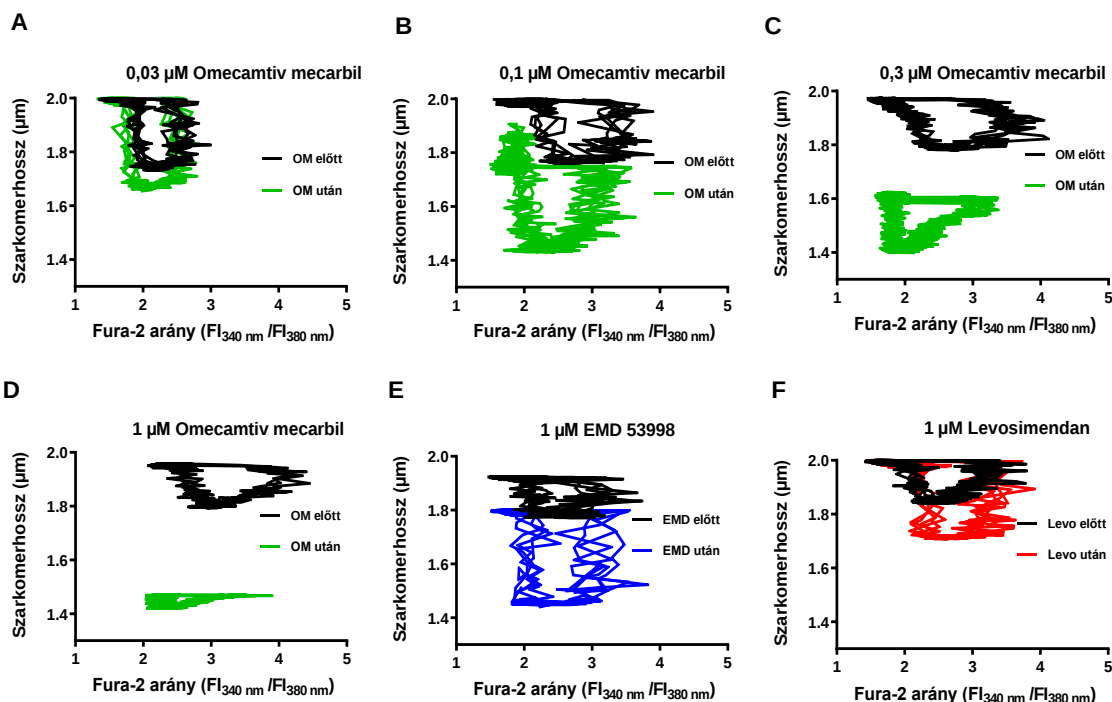
39. ábra Az OM, az EMD és a Levo hatása a szívműködés összehúzódásának és relaxációjának kinetikájára

A. Az összehúzódások időtartama fokozatosan hosszabbodott az OM-koncentráció növekedésével, de változatlan maradt az EMD vagy a Levo alkalmazása során. **B.** Az összehúzódások kinetikája a magasabb OM-koncentrációk (0,3 μM és 1 μM) hatására lelassult. **C.** A relaxációs sebesség szintén nagymértékben csökkent a magas OM koncentrációk alkalmazásakor. **D.** Az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek időtartamát egyik szer sem befolyásolta. **E.** Az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek kialakulásának kinetikája nem változott a kezelések során. **F.** Az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek lecsengése (K sebességállandó) szintén változatlan maradt a gyógyszeres kezelések során. ($p < 0,05$ vs. kezelés előtt, az oszlopok az átlag $\pm$ SEM értéket jelölik) (Ráduly AP. és munkatársai, *ESC Heart Failure*, 2023, 10(2): 1326-1335. alapján)

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

A kontraktilis válaszok és az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek közötti kapcsolat további jellemzése érdekében a SL-t a Ca^{2+} -koncentráció függvényében ábrázoltuk (40. ábra). Ezek a Ca^{2+} -SL összefüggések nem különböztek alacsony koncentrációjú (0,03 μM) OM kezelés előtt és után. 0,1 μM , 0,3 μM vagy 1 μM OM alkalmazását követően azonban a hurokdiagrammok jelentősen és fokozatosan lefelé tolódtak, ami arra utal, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítő hatás mind a szisztolés, mind a diasztolés intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnál jelen van. 1 μM EMD

jelenlétében a Ca^{2+} -SL összefüggés hasonló volt, mint a $0,1 \mu\text{M}$ OM alkalmazása során. A Ca^{2+} -SL kapcsolat a Levo jelenlétében a rövidebb szisztolés SL-ak felé tolódott, ami a szer szisztolé során kiváltott Ca^{2+} -érzékenyítő hatására utal.



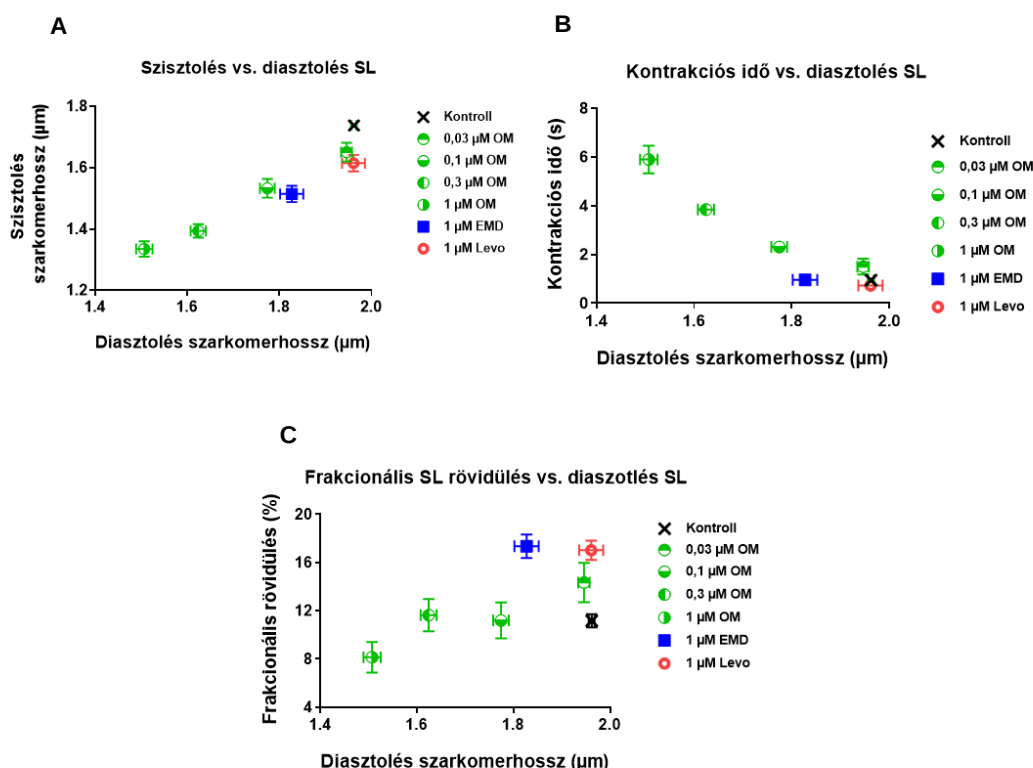
40. ábra Az intracelluláris (IC) Ca^{2+} és a szarkomerhossz (SL) összefüggések változásai OM, EMD vagy Levo kezelés hatására

Az SL értékeket az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció függvényében ábrázoltuk. Minden panel esetében négy egymást követő szív ciklus látható kezelés előtt és után. **A-D.** Téringerlés hatására az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció gyors növekedése volt megfigyelhető, amelyet összehúzódás követett (SL csökkenése). Ezt követően az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a diasztolés (alacsony) szintre állt vissza, amit relaxáció követett (SL növekedése). A Ca^{2+} -SL összefüggések az OM-koncentráció növekedésével fokozatosan lefelé tolódtak, ami a teljes szív ciklus alatti Ca^{2+} -érzékenyítő hatásra utal. **E.** Az EMD által kiváltott Ca^{2+} érzékenység hasonló volt a $0,1 \mu\text{M}$ OM által kiváltotthoz. **F.** A Levo nem változtatta meg a diasztolés SL-t, de fokozta az SL csökkenését a szisztolé során. (Ráduly AP. és munkatársai, *ESC Heart Failure*, 2023, 10(2): 1326-1335. alapján)

4.7.4. A diasztolés és szisztolés szarkomer dinamika kölcsönhatásainak vizsgálata

A három szer különböző hatásmechanizmusainak szemléltetése érdekében a szisztolés válaszok paramétereit az OM, EMD vagy Levo kezelések során a megfelelő diasztolés SL függvényében fejeztük ki. Ez a megközelítés igazolta az OM és az EMD hatásai közötti hasonlóságokat, különösen, amikor a diasztolés és a szisztolés SL, vagy az összehúzóási időtartamok közötti összefüggéseket elemeztük (**41. ábra**). A diasztolés SL-FSL összefüggések ugyanakkor az OM és az EMD hatásmechanizmusai közötti különbségekre is felhívták a figyelmet. Az EMD jelentősebb FSL növekedést volt képes kiváltani, mint az OM, és látszólag kisebb diasztolés SL csökkenés árán. A Levo alkalmazása mellett észlelt változatlan diasztolés SL a szer OM-tól és EMD-től eltérő Ca^{2+} -érzékenyítő hatására utal.

In vitro vizsgálatainkban enzimatikusan izolált, intakt membránrendszerrel rendelkező kutyából származó szívműködési sejteken számos hasonlóságot és jelentős különbségeket azonosítottunk az OM, az EMD és a Levo kontraktilis funkcióra kifejtett hatásai között. Eredményeink alapján az OM pozitív inotróp hatásának hátterében elsősorban az összehúzódások idejének megnyúlása, nem pedig a kinetikai paraméterek gyorsulása, vagy a frakcionált SL-rövidülés növekedése áll.



41. ábra A szisztolés paraméterek és a diasztolés szarkomerhossz (SL) összefüggései

A. Mind a szisztolés, mind a diasztolés SL értékek csökkentek az OM-koncentráció növekedésével és az EMD hatására, azonban a Levo csak a szisztolés értéket befolyásolta. **B.** A kontrakciók időtartama nőtt az OM-koncentráció növekedésével és az EMD kezelést követően, de nem változott a Levo alkalmazása után. **C.** A frakcionális szarkomer rövidülés érdemben nem változott, viszont a diasztolés SL csökkent OM kezelést követően. EMD és Levo hatására a frakcionális szarkomer rövidülés szignifikáns mértékben nőtt. (Ráduly AP. és munkatársai, *ESC Heart Failure*, 2023, 10(2): 1326-1335. alapján)

Megállapítottuk, hogy az OM, az EMD és a Levo az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek jelentős változásának hiányában is markáns változásokat idéz elő a szívműködési sejtek kontrakciójában és relaxációjában, ami mind a három vegyület esetében arra enged következtetni, hogy valamilyen fokban növelik a szívműködési sejtek Ca^{2+} érzékenységét. Ugyanakkor a Ca^{2+} érzékenység fokozódásához vezető mechanizmusok az OM, az EMD és a Levo esetében bizonyos fokban különbözőek, és ennek megfelelően eltérő típusú kontraktilis válaszokat eredményeztek. Mivel a Levo és az EMD is gátolja a PDE3-at, a változatlan intracelluláris Ca^{2+} -szint ezen szerek jelenlétében potenciálisan azzal magyarázható, hogy ezek

a szerek az általunk alkalmazott koncentrációkban a többi (PDE3-on kívüli) PDE izoformát kutya szívizomsejtekben nem gátolják.^{146–148}

Az OM alacsony (diasztolés) intracelluláris Ca^{2+} koncentráció esetén a szívizomsejtek SL-csökkenését idézte elő téringerlés hiányában is. A SL-csökkenés mértéke hasonló volt téringerlést követően a stimulált szívizomsejtekben mérhető diasztolés SL-hoz, ami arra utal, hogy az aktin-miozin kölcsönhatás OM-függő aktiválásához nem volt szükség Ca^{2+} -ra. Ezek az eredmények összhangban vannak a nyúlból származó szívizomsejtek bazális miozin ATPáz aktivitásának növekedésével OM-kezelést követően,⁷⁷ valamint a patkányokból nyert permeabilizált szívizomsejteknek diasztolés Ca^{2+} szintek mellett létrejövő izometrikus erejének a fokozódásával.¹⁴⁹ Az OM-hez hasonlóan az EMD is csökkentette a nyugalmi SL-t, ami a két, miozinhoz kötődő, azt szelektíven befolyásoló szer hasonló hatásaira utal, míg ez az effektus a vékony filamentumra szelektíven ható Levo esetében eltér. Vizsgálatunkból az is tisztán látható, hogy a diasztolés és szisztolés SL-ok, valamint a kontrakciós időtartamok csökkenése szoros összefüggést mutat a növekvő OM-koncentrációkkal. A diasztolés SL csökkenése felelős azért, hogy magasabb OM-koncentrációk esetében a frakcionált SL-rövidülés nem mutatott jelentős növekedést annak ellenére, hogy a szisztolés szarkomerhosszak jelentősen csökkentek. Eredményeink alapján a frakcionált SL-rövidülés növekedését az OM által kiváltott nyugalmi SL-csökkenés korlátozhatja magasabb OM-koncentrációnál.¹⁴⁹

Az általunk alkalmazott OM-koncentráció tartományában (0,01-1 μM), mely megfelelt a klinikai tanulmányokban alkalmazott OM-plazmaszinteknek, a nyugalmi SL csökkenését tapasztaltuk.^{78–80} Az OM multicentrikus, placebo kontrolllos, III. fázis klinikai vizsgálatában (GALACTIC-HF) a gyógyszer plazma szintje szerinti dózistitrlási stratégiát alkalmaztak. A cél a legalább 200 ng/ml-es (0,5 μM) plazmakoncentráció elérése és az 1000 ng/ml (2,5 μM) feletti koncentráció elkerülése volt. Fontos megjegyezni, hogy korábbi humán tanulmányok során a >1200 ng/ml-es (3 μM) OM-koncentráció (háromszor magasabb, mint az *in vitro* kísérleteinkben általunk alkalmazott maximális koncentráció) esetén a szisztolés időtartam jelentős megnyúlását tapasztalták, mely diasztolé során a koronáriakeringés romlásához, potenciálisan miokardiális iszkémia kialakulásához vezethetett.^{76,150} Az OM állatkísérletekben és humán tanulmányokban egyaránt a SET növekedését okozta.^{76,78,79,151} Az első emberen végzett, dóziseszkalációs vizsgálatban az OM dózisfüggő módon növelte a SET-t, a SV-t, FS-t és a BKEF-t is. A SET megnyújtása a gyógyszer egyik legjelentősebb hatása: a szer alacsony citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció mellett is fenntarthatja a kontrakciót. Annak ellenére, hogy az *in vitro* észlelt erő kifejtés kinetikája lassult, az OM *in vivo* nem befolyásolta az időegység

alatt létrejövő nyomásváltozás maximumát (dP/dt_{max}), ami arra utal, hogy az OM farmakokinetikai tulajdonságai *in vitro* és *in vivo* némileg eltérőek lehetnek.¹⁵¹

Nagy OM-koncentráció mellett a szívizomsejtek összehúzódásainak időtartama majdnem hatszorosára nőtt, ami a kontraktilis rendszer elhúzódó aktiválódására utalt.^{152,153} Permeabilizált patkány szívizomsejteken egy korábbi tanulmányunkban megfigyeltük, hogy mind a félmaximális kontrakció eléréséhez szükséges időtartam ($t_{1/2}$), mind pedig az aktin-miozin kereszthidak kinetikáját jellemző sebességi állandó (k_{tr}) jelentősen növekedett. Mindez, összhangban jelen megfigyeléseinkkel, szintén a miozin filamentumok csökkent kinetikájára utalt.^{149,154,155} Összességében az OM által kiváltott Ca^{2+} érzékenység-fokozódás hozzájárulhat az erősebb, lassabb és elhúzódó összehúzódásokhoz.

Fontos megemlíteni, hogy az OM által kiváltott kontrakciós időtartam-növekedés nem volt azonos az EMD alkalmazása során, mely vélhetően a szerek miozin molekulán lévő eltérő kötőhelyeivel magyarázható. Az OM kapcsolódási pontja a miozin S1 doménjén valószínűleg az aktin-kötő felület és a nukleotid-kötő zseb közelében lévő hasadékban található. Ez a hely vélhetően ideális támadáspont a szívizomzat miozin motorjának, mind az enzimatis, mind a mechanikai tulajdonságainak allosztérikus modulációjához. Habár EMD kötőhelye nem azonos az OM miozin S1 doménen lévő kötőhelyével, ennek ellenére az EMD adagolása szintén képes növelni a miozin ATPáz aktivitását.^{156,157}

Jelen vizsgálatban az OM hatására az intakt szívizomsejtek relaxációja jelentősen csökkent, különösen nagyobb (0,3 és 1 μM) koncentrációknál, az EMD és a Levo ugyanakkor azt nem, vagy csak kismértékben korlátozta. Ez összhangban áll korábbi vizsgálatunk eredményével, mely során az OM jelentősen megnyújtotta a permeabilizált patkány szívizomsejtek relaxációját és megnövelte $F_{passzív}$ -ot. Szívelégtelenségben a szívizomsejtek Ca^{2+} -homeosztázisának zavara elsősorban a SR megváltozott működésére vezethető vissza: a SERCA csökkent aktivitásának következtében csökken a citoplazmatikus Ca^{2+} -visszavétel.¹⁵⁸ Eredményeink alapján a relaxáció már kis OM-koncentrációknál (0,1-0,3 μM) is károsodott, ez a hatás nagy OM-koncentrációnál (1 μM) még kifejezettebbé vált. Szívelégtelenségben az OM által kiváltott diasztolés diszfunkciót az emelkedett nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szint potenciálisan súlyosbíthatja. Mindezzel összhangban, a diasztolés funkció romlását - amelyet az izovolumetrikus relaxáció időállandójának (τ) és a bal kamrai nyomáscsökkenés sebességének (dP/dt_{max}) csökkenése tükröz - korábban kimutatták térfogat-túlterheléssel járó szívelégtelenség patkány modelljében intravénás OM-kezelést követően.¹⁵⁹ Ugyanakkor egészséges önkéntesekben az OM nem rontotta a diasztolés funkciót az utóbbi vizsgálatban alkalmazott koncentrációhoz hasonló plazmakoncentrációban. Az OM esetleges diasztolés

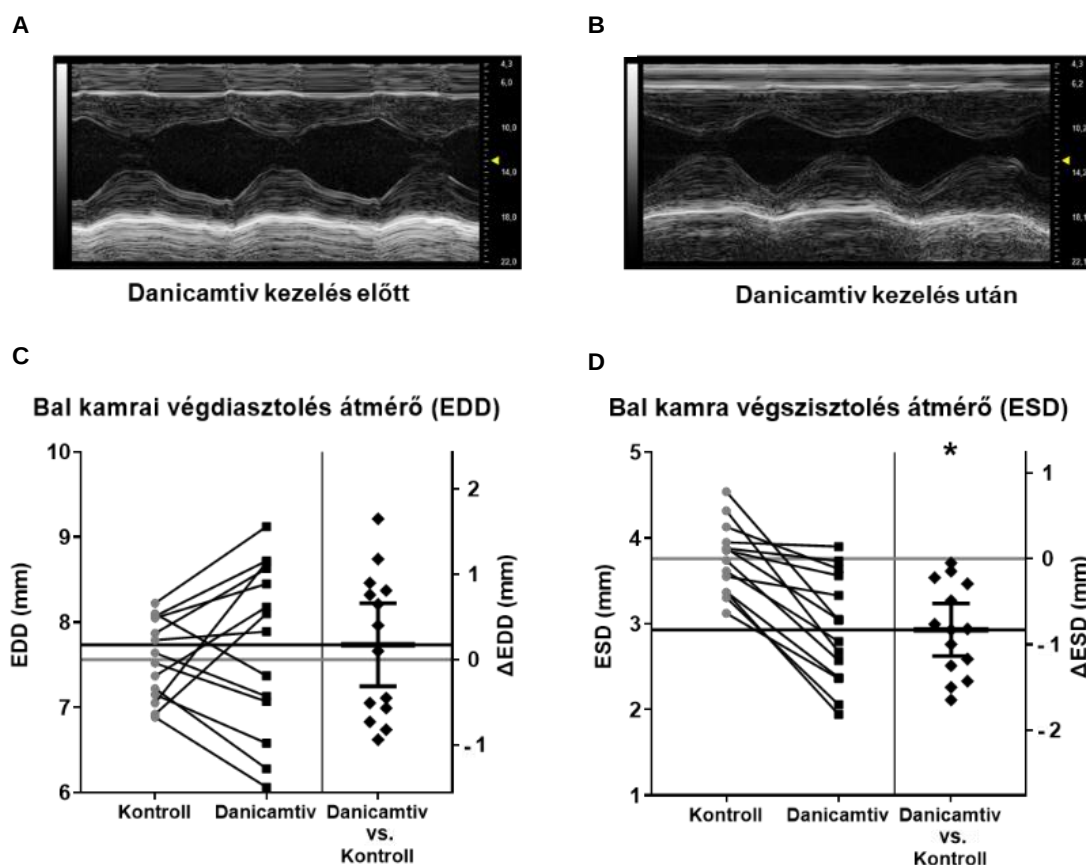
diszfunkciót okozó hatását COSMIC-HF tanulmányban is vizsgálták. A post-hoc elemzés során az IVRT növekedése igazolódott az E/A arány, vagy az E-hullám változása nélkül. A GALACTIC-HF-ben a diasztolés funkciót részletesen nem vizsgálták, pedig ez adataink tükrében fontosnak tűnik a szer biztonságos *per os* alkalmazása érdekében HFrEF-ben szenvedő betegekben is.

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

4.8. In vivo kísérletek – Danicamtiv

4.8.1. A danicamtiv csökkenti a végszisztolés átmérőt, de nem befolyásolja a végdiasztolés átmérőt

A danicamtiv miokardiális funkcióra kifejtett hatásait echokardiográfiával követtük nyomon altatott patkányokban. 2 mg/kg danicamtiv iv. beadása után a bal kamrai ESD jelentős csökkenését ($2,93 \pm 0,17$ mm vs. $3,76 \pm 0,11$ mm, $p < 0,001$) tapasztaltuk, azonban a bal kamrai EDD-t nem változott ($7,56 \pm 0,12$ mm vs. $7,74 \pm 0,26$ mm, $p = 0,45$) (reprezentatív M-mód ábrák: 42. ábra).¹⁶⁰



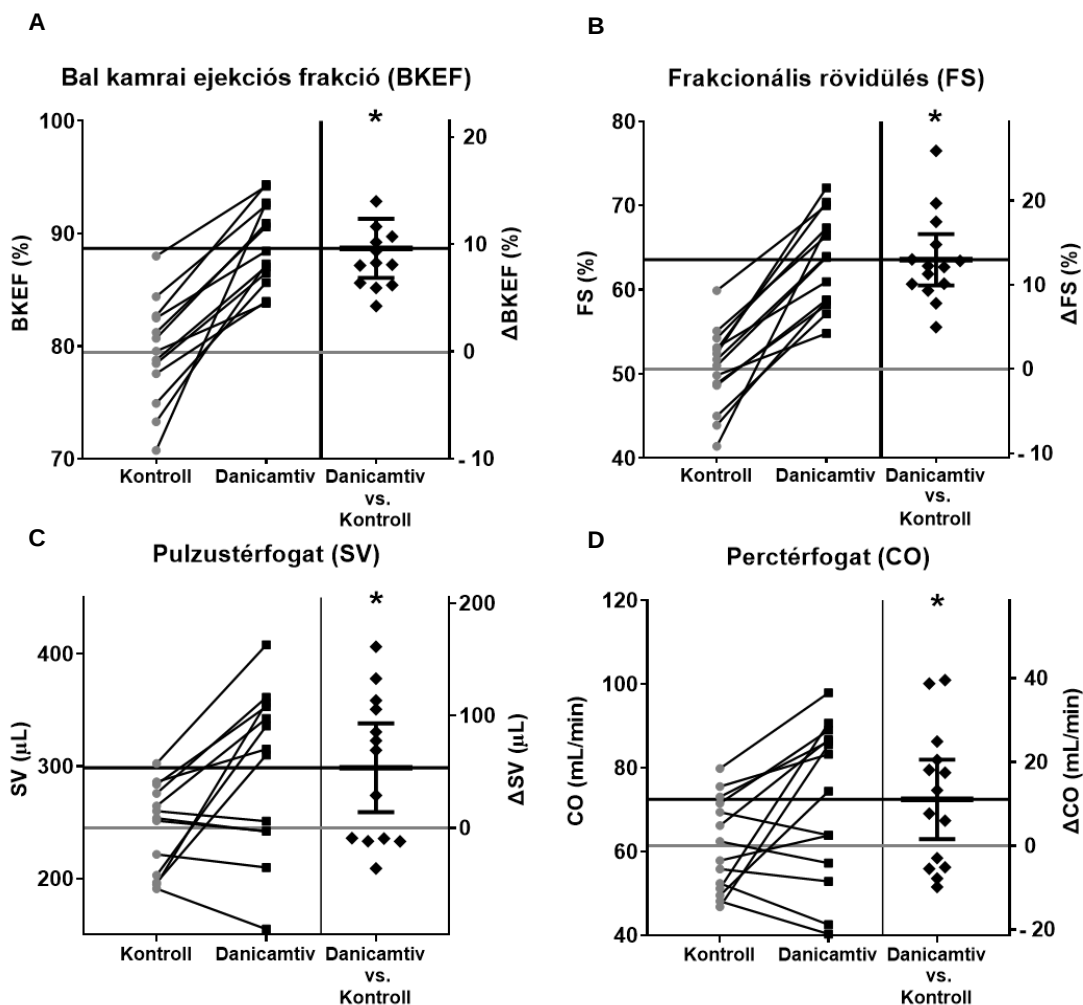
42. ábra A danicamtiv hatása az bal kamrai méretekre a szív ciklusok során

Patkány BK-ról készült parasternalis hossztenyelyi metszet (PLAX) reprezentatív M-módú echokardiográfias felvételei az iv. danicamtiv kezelés előtt (A) és után (B). A danicamtiv hatására az EDD nem változott (C), de az ESD jelentősen csökkent (D). Az ábra jobb oldalán az egyéni különbségek láthatók. A középső vízszintes vonal jelzi a különbségek átlagát, míg az ezzel egybeeső vékonyabb fekete vonal (ezen, és a többi hasonló grafikonon) a danicamtiv utáni mérések átlagát mutatja. A másik szürke vonal a kezelés előtti mérések átlagát mutatja. Az ábra jobb oldalán a függőleges vonal és a két rövidebb vízszintes vonal a 95%-os konfidencia intervallumot jelzi, mely, ha nem érinti a 0 értéket, akkor statisztikailag szignifikáns különbséget jelez. (Ráduly AP. és munkatársai, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(1): 446. alapján)

4.8.2. A danicamtiv javítja a bal kamrai kontraktilitást

A releváns bal kamrai kontraktilis paraméterek, beleértve a BKEF-et ($89,36 \pm 0,99\%$ vs. $79,76 \pm 1,24\%$, $p < 0,001$), a FS-t ($63,57 \pm 1,47\%$ vs. $50,58 \pm 1,30\%$, $p < 0,001$) és a SV-t

($290,56 \pm 20,26 \mu\text{l}$ vs. $243,89 \pm 0,07 \mu\text{l}$, $p=0,01$) szignifikánsan javultak a danicamtiv kezelést követően (43. ábra). Emellett a CO is jelentősen nőtt ($72,45 \pm 5,04 \text{ ml/perc}$ vs. $61,40 \pm 2,99 \text{ ml/perc}$, $p=0,03$), ami alátámasztja a gyógyszerjelölt pozitív inotróp hatását.

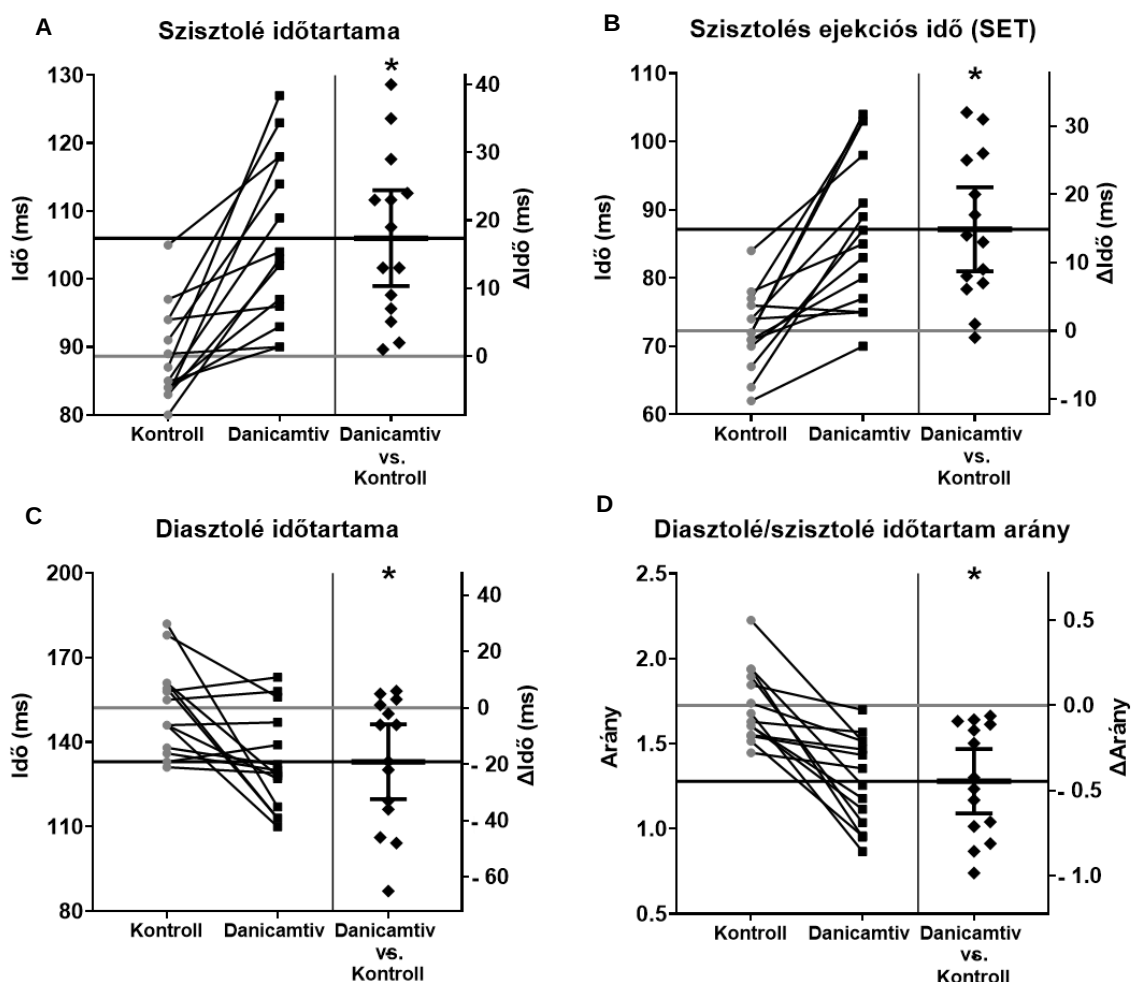


43. ábra A danicamtiv javítja a bal kamra szisztolés funkcióját és hemodinamikai paramétereit

A bal kamrai ejekciós frakció (BKEF) (A), frakcionális rövidülés (FS) (B), a pulzustérfogat (SV) (C) és a perctérfogat (CO) (D) növekedett danicamtiv alkalmazásakor (a kiindulási értékektől való szignifikáns különbségeket csillagok (*) jelzik). (Ráduly AP. és munkatársai, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(1): 446. alapján)

4.8.3. A szisztolés és diasztolés időtartama megváltozik danicamtiv hatására

A danicamtiv szív ciklus különböző időtartamaira kifejtett hatását is megvizsgáltuk, mely során mind a szisztolés időtartama ($106 \pm 3,30 \text{ ms}$ vs. $88,64 \pm 1,83 \text{ ms}$, $p=0,0001$), mind a SET szignifikáns megnyúlását tapasztaltuk ($87,14 \pm 3,05 \text{ ms}$ vs. $72,28 \pm 1,53$, $p<0,001$) (44. ábra). Az echokardiográfiával mért paraméterekből kalkulált diasztolés időtartam szignifikánsan csökkent ($133 \pm 4,66 \text{ ms}$ vs. $152,2 \pm 4,19 \text{ ms}$, $p=0,008$), amit a diasztolés és a szisztolés időtartam arányának jelentős csökkenése kísért ($1,28 \pm 0,07$ vs. $1,73 \pm 0,06$ -re, $p<0,001$).

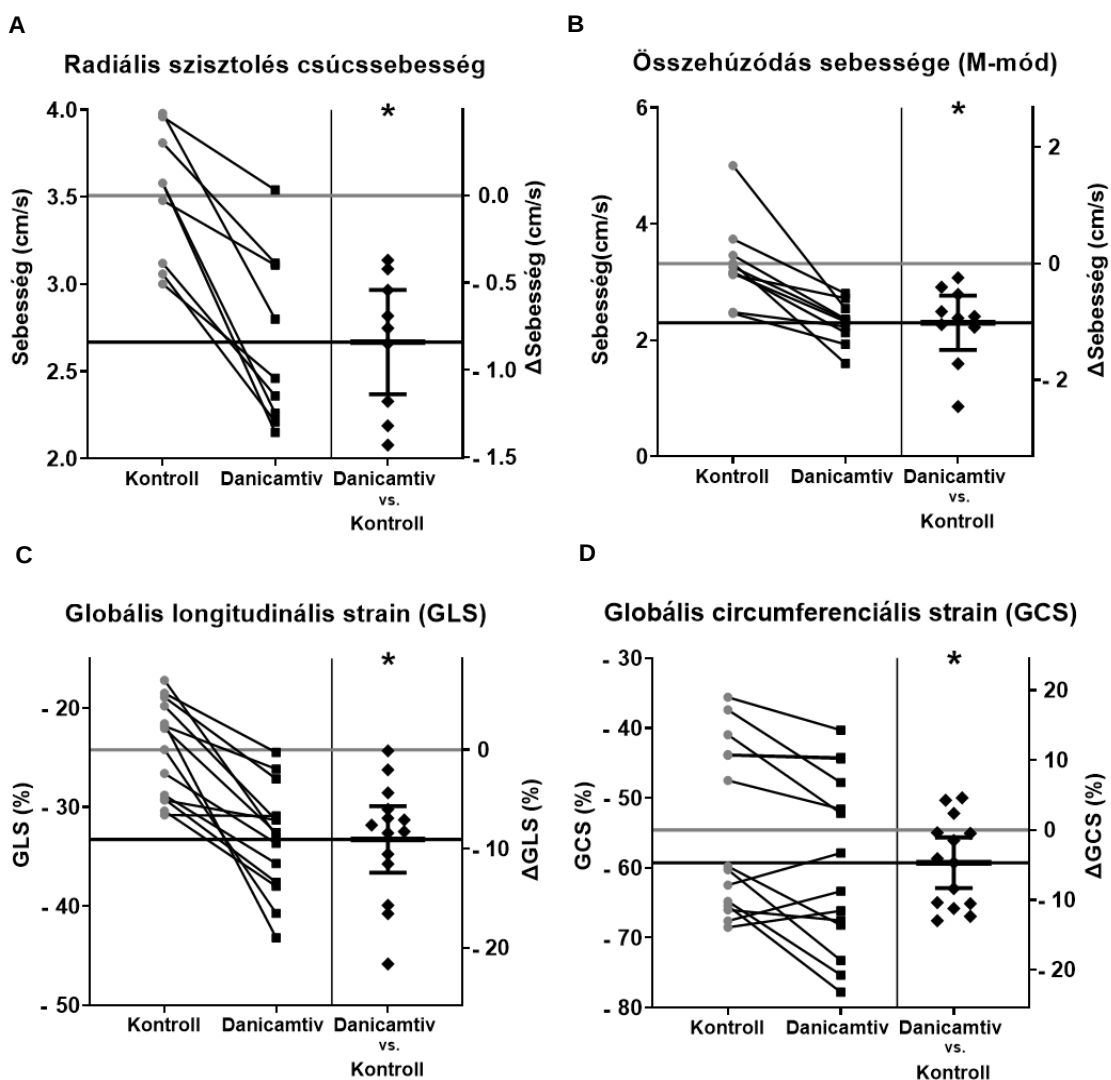


44. ábra A szisztolé és diasztolé időtartama megváltozik danicamtiv hatására

A danicamtiv növelte a szisztolé időtartamát (A), elnyújtotta szisztolés ejekciós időt (B) és csökkentette a diasztolé időtartamát (C), valamint felborította a diasztolé és szisztolé arányát (D). A danicamtiv alkalmazásakor a kiindulási értékektől való szignifikáns különbségeket csillagok (*) jelzik. (*= $p < 0,05$) (Ráduly AP. és munkatársai, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(1): 446. alapján)

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

A danicamtiv hatását a szívműködés dinamikájára strain echokardiográfia segítségével részletesebben is megvizsgáltuk. A BK-i radiális szisztolés csúcssebesség ($2,67 \pm 0,17$ cm/s vs. $3,50 \pm 0,13$ cm/s, $p < 0,001$) és az összehúzóási sebesség (M-módban mért meredekség) ($2,30 \pm 0,11$ cm/s vs. $3,32 \pm 0,23$ cm/s, $p = 0,008$) szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető (45. ábra). A danicamtiv kezelés hatására azonban, mind a globális longitudinális strain ($-24,22 \pm 1,30$ vs. $-33,27 \pm 1,45\%$, $p < 0,001$), mind a globális cirkumferenciális strain ($-59,29 \pm 3,36\%$ vs. $-54,58 \pm 3,28\%$, $p = 0,02$) paraméterek szignifikánsan csökkentek, ami az BK szisztolés funkció javulására utal.



45. ábra Az echocardiographiával mérhető bal kamrai összehúzódnást jellemző kinetikai, illetve strain echocardiographiás paraméterek változása danicamtiv kezelés hatására

A BK-i radiális szisztolés csúcssebesség és kontrakció sebesség (M-mód meredekség) szignifikánsan csökkent danicamtiv hatására (A, B) A globális longitudinális és cirkumferenciális strain szintén szignifikánsan csökkent danicamtiv hatására (C, D). (*= $p < 0,05$) (Ráduly AP. és munkatársai, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(1): 446. alapján)

A danicamtiv kezelések során kialakult aorta- vagy pulmonális artériás átlag- és csúcssebességekben, illetve átlag- és csúcsgradiensekben nem volt szignifikáns változás (3. táblázat).

4.8.5. A danicamtiv diasztolés diszfunkciót okoz

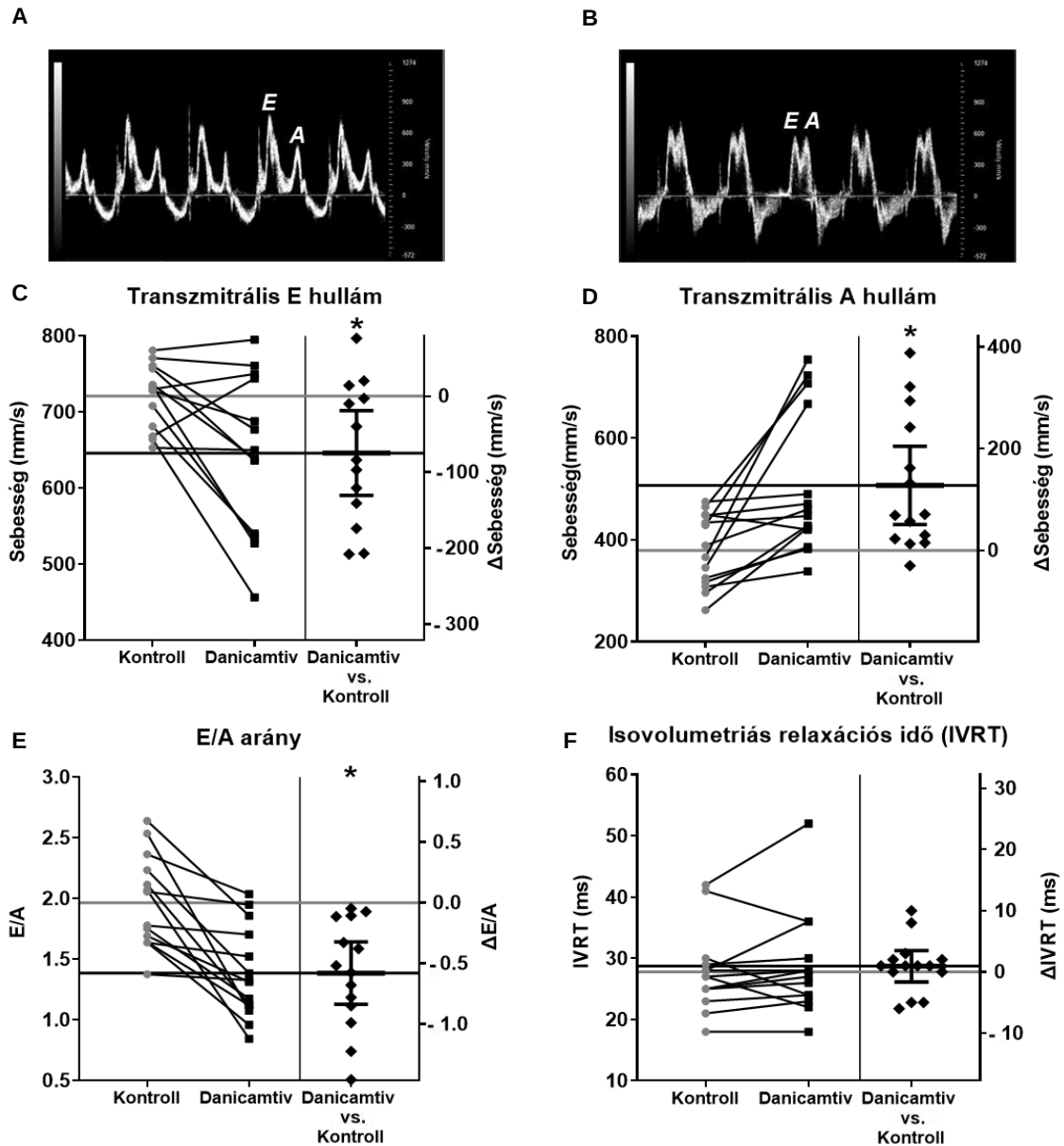
A danicamtiv hatására a korai (E) transzmitrális beáramlási sebesség szignifikánsan csökkent ($645,92 \pm 29,17$ mm/s vs. $720,92 \pm 11,87$ mm/s, $p = 0,013$) és a késői (A) transzmitrális beáramlási sebesség pedig jelentősen növekedett ($506,93 \pm 37,81$ mm/s vs. $379,24 \pm 19$ mm/s, $p = 0,003$). Az E/A arány ennek megfelelően jelentősen csökkent ($1,97 \pm 0,10$ vs. $1,38 \pm 0,10$, $p = 0,0003$) (46. ábra), amely a bal kamrai töltőnyomás emelkedését jelezheti.

Paraméterek	Kontroll (n = 14)	Danicamtiv (n = 14)	P érték (Kontroll vs. Danicamtiv)
Echokardiográfia			
BK térfogat - szisztolé (μL)	61,53 ± 423	35,7 ± 4,77	<0,001
BK térfogat - diasztolé (μL)	305,4 ± 11,2	326,1 ± 23,9	0,327
BK anterior falvastagság - szisztolé (mm)	3,17 ± 0,09	3,49 ± 0,14	0,034
BK anterior falvastagság - diasztolé (mm)	1,76 ± 0,22	1,65 ± 0,26	0,171
BK posterior falvastagság - szisztolé (mm)	3,24 ± 0,12	3,69 ± 0,09	0,003
BK posterior falvastagság - diasztolé (mm)	1,93 ± 0,08	1,92 ± 0,08	0,867
Aorta szisztolés csúcssebesség (mm/s)	899,3 ± 35,7	936,7 ± 41,2	0,276
Aorta szisztolés átlagsebesség (mm/s)	547,8 ± 29,8	511,1 ± 35,4	0,213
Aorta csúcsnyomásgárdiensi (mmHg)	3,30 ± 0,26	3,59 ± 0,31	0,248
Aorta átlagnyomásrádiensi (mmHg)	1,30 ± 0,15	1,11 ± 0,17	0,178
Pulmonális véna pitvari reverz áramlási sebesség (mm/s)	136,7 ± 11,4	201,1 ± 24,9	0,008
Pulmonális véna pitvari reverz áramlás időtartama (ms)	20,27 ± 0,77	28,10 ± 2,24	0,004
Mitrális E hullám lassulási idő (ms)	57,57 ± 2,53	51,09 ± 2,63	0,134
Mitrális billentyű szeptális e' (mm/s)	40,47 ± 2,44	36,36 ± 2,36	0,051
Mitrális billentyű szeptális a' (mm/s)	35,21 ± 1,74	42,24 ± 2,27	0,070
Mitrális billentyű szeptális e'/a'	1,21 ± 0,11	0,874 ± 0,10	0,014
Tei index	0,60 ± 0,04	0,50 ± 0,03	<0,001
E/e' arány	18,79 ± 1,31	19,53 ± 1,69	0,549
Izovolumetrikus összehúzóási idő (ms)	14,50 ± 0,53	14,50 ± 0,91	0,999
Izovolumetrikus relaxációs idő (ms)	27,79 ± 1,77	28,71 ± 2,22	0,450
Elektrokardiográfia			
Szívfrekvencia (bpm)	251 ± 15	249 ± 14	0,715
PQ intervallum(ms)	48 ± 4	51 ± 4	0,245
QRS időtartam (ms)	17 ± 3	17 ± 2	0,869
QT intervallum (ms)	42 ± 2	42 ± 1	0,577
T hullám amplitúdó (mV)	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,477

3. táblázat Echokardioráfiával és elektrokardiográfiával mért paraméterek danicamtiv kezelés mellett (Bal kamra (BK)) (Ráduly AP. és munkatársai, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(1): 446. alapján)

A szöveti doppler (TDI) sebességek (azaz a mitrális billentyű szeptumának korai (a') és késői (e') szöveti sebességei) a mitrális E és A hullám sebességéhez hasonlóan változtak. A TDI e'/a' arány változásai tovább erősítik a danicamtiv beadásakor megváltozott mitrális beáramlási mintázatot. Mindazonáltal az izovolumetriás relaxációs idő (IVRT) ezzel egy időben

változatlan maradt. Ezen túlmenően a pulmonális véna pitvari reverz áramlási sebességének ($201,10 \pm 24,85$ mm/s vs. $136,70 \pm 11,35$ mm/s, $p=0,008$) és az áramlás időtartamának ($28,10 \pm 2,24$ ms vs. $20,27 \pm 0,77$ ms, $p=0,004$) jelentős növekedése volt megfigyelhető (3. táblázat), ami a bal kamra diasztolés funkciójának romlását és a bal pitvar kontrakció erősségének fokozódását jelezheti.



46. ábra A danicamtiv hatása a diasztolés funkcióra

Korai és késői pitvari beáramlás arányának (E/A) meghatározására danicamtiv kezelés előtt (A) és azt követően (B). A danicamtiv rontotta a bal kamra diasztolés funkcióját (C-F). (Ráduly AP. és munkatársai, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(1): 446. alapján)

In vivo vizsgálataink fókuszában egy eddig kevésbé ismert, új típusú miozin aktivátor, a danicamtiv állt. Eredményeink hozzájárulnak a szer szisztolés és diasztolés funkcióra kifejtett

hatásainak pontosabb megismeréséhez, további vizsgálatok tervezéséhez, mely a hatóanyag klinikai alkalmazása szempontjából is releváns lehet.

A célzott, betegségmódosító terápiák a jelenlegi szívelégtelenség irányelvekben a kardiomiopátiák kezelésére szolgáló új stratégiákként jelennek meg.¹ A mavacamten nevű miozin-inhibitor a szívizomsejtek hiperkontraktilis állapotának befolyásolásával a hipertrófiás kardiomiopátia remodelációját is mérsékelheti.^{161,162} A dilatatív kardiomiopátiára (DCM) azonban a mai napig nincs specifikus terápia. Ez a tény és az OM-lal szerzett tapasztalatok ösztönözték a második miozin-aktivátor, a danicamtiv kifejlesztését és a klinikai kipróbálását.^{162,163}

A direkt miozin-aktivátorok kötőhelye a β -miozin nehézlánc S1-doménjén található a kutya és rágcsáló szívizomzatban egyaránt. Fontos megjegyezni, hogy a szívizomsejtekben a danicamtiv (az OM-hoz hasonlóan) nincs hatással az intracelluláris Ca^{2+} tranziensekre, ami arra utal, hogy kizárólag a fenti hatásmechanizmus felelős a kardiotonikus hatásáért. Ebből következik, hogy a danicamtiv által kiváltott kontraktilis válaszok kutyákban és patkányokban közel hasonlóak lesznek az OM-hoz.¹⁶⁴ Mivel a modern echokardiográfiás technikák kiváló minőségű képalkotást tesznek lehetővé kisemlősökben, méréseinket patkánymodellen hajtottuk végre.¹⁶⁵

A HFrEF-ben lejártszódó patofiziológiai folyamatok a kontraktilitás jelentős csökkenéséhez vezetnek, ami a pulzustérfogat csökkenésével jár.¹⁶⁶ A pozitív inotróp szereket több évtizede alkalmazzák a pumpafunkció javítása érdekében, mind akut, mind krónikus HFrEF-ben.^{167–169} A hagyományos pozitív inotróp szerek hosszú távon növelik az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, az oxigénfogyasztást és sajnos a mortalitást is.^{74,170,171} Ezzel szemben a direkt miozin-aktivátorok allosztérikus hatást gyakorolnak a miozin ATPáz-ra, így változatlan intracelluláris Ca^{2+} tranziens esetén több aktin-miozin interakció alakulhat ki, ez a mechanizmus pedig feltehetően elkerüli a fenti mellékhatásokat.

In vivo tanulmányunkban átfogó echocardiográfiás elemzéssel kimutattuk, hogy a danicamtiv jelentős hatást gyakorol, mind a szisztolés, mind a diasztolés funkcióra patkányszívekben. A fenti adatok és a szív S1 miozinján OM és danicamtiv alkalmazásával végzett preklinikai vizsgálat eredményei arra utalnak, hogy a miozin ATPáz sebességét még diasztolés Ca^{2+} szint mellett is növelik a direkt miozin-aktivátorok.^{161,172}

A bal kamrai kontraktilitást jellemző paraméterek közül danicamtiv hatására jelentősen javult az EF és az FS, továbbá a nem invazívan meghatározott SV, így következményesen a CO is. Ezen kedvező hatások összevethetőek az OM-lal. Ellentétben az OM-lal, amely humán alkalmazás során az EDD-t és az ESD-t is csökkentette,⁷⁶ a danicamtiv csak az ESD-t

csökkentette, az EDD-t nem befolyásolta jelentős mértékben patkányszívekben. Ezek az eredmények összhangban vannak a szívelégtelen kutyákon végzett preklinikai adatokkal, és részben egy fázis 2a klinikai vizsgálat eredményeivel is, ahol az EDD kevésbé tűnt érzékenynek a danicamtivra, mint az ESD.⁸² Egy nemrégiben humán mesterséges szívizomszöveten a danicamtiv és az OM hatásait összehasonlító vizsgálatban a danicamtiv hatására a szisztolés funkciót jellemző paraméterekben kifejezetten javulás volt megfigyelhető a relaxációhoz képest.⁸¹ A megnövekedett bal kamrai töltőnyomást köztudottan a pitvari kontraktilis funkció növekedése kompenzálja. A danicamtiv esetében ezt a jelenséget jól tükrözte a transzmitrális A-hullám jelentős növekedése, az E-hullám, az E/A arány, valamint a szöveti dopplerrel mért e'/a' arány is jelentős mértékű csökkenése.

A GALACTIC HF vizsgálatban az OM-kezelés hatására a szívfrekvencia kisméretékben csökkent, melyet a javuló kontraktilis funkció következtében létrejövő pozitív hatásokkal hoztak összefüggésbe. *In vivo* kísérleteinkben, hasonlóan az ATOMIC HF, a COSMIC-HF és a danicamtivval végzett fázis IIa vizsgálatokhoz, a szívfrekvencia nem változott. Ahogyan az OM-lal végzett nagy klinikai vizsgálatokban is igazolták, a SET növekedése a miozin-aktivátorok egyik specifikus hatása.^{77,172} Kísérleteink során a változatlan szívfrekvencia mellett megjelenő SET megnyúlása eredményezte a szisztolés időtartam növekedését. Ennek következtében a diasztolés időtartam rövidül, így a diasztolés és a szisztolés időtartam arányának változása potenciálisan hatással lehet a koronária perfúzióra. Az OM humán fázis II. és III. vizsgálatokban megfigyelt hatásaival ellentétben patkányszívben az izovolumetriás összehúzóási időt (IVCT) és az IVRT-t a danicamtiv nem befolyásolta. A danicamtiv fázis IIa vizsgálatában csak extrém magas dózisok (>3500 ng/ml) esetében figyelték meg az IVRT megnyúlását.⁸² A SET növekedése együtt járt a miokardiális teljesítményindex (Tei-index) javulásával.

Fontos megjegyezni, hogy a strain echokardiográfiát különösen kisállatokban ritkábban alkalmazzák, bár nagyon érzékeny módszer a bal kamra funkció változásainak kimutatására. A szívizom sebesség és a strain TDI-vel is mérhető, bár a speckle tracking 2D-strain-t jobb technikának tartják, mivel a TDI-vel ellentétben a kapott eredmények szögfüggetlenek. Általánosságban elmondható, hogy a 2D-strain segítségével nyert adatok jó korrelációt mutatnak a mágneses rezonanciás képalkotással (MRI), a szívizom deformációjának és térfogatának elemzésének arany standard módszerével.¹⁷³ Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a danicamtiv jelentősen csökkenti a szívizom összehúzóási sebességét, amit egy 2D-strain paraméter, a radiális szisztolés csúcssebesség jelentős csökkenése is megerősített. A PLAX-ban nyert M-mód képen az összehúzóás felszállószára illesztett egyenes meredeksége is csökkent,

amely szintén megerősíti, hogy a szívizomösszehúzódás kinetikája lassult. Emellett úgy tűnik, hogy a 2D-strain echokardiográfia érzékenyebb módszer a BK funkció pontos meghatározására, mint az EF klasszikus módszerekkel történő mérése.¹⁷⁴ Kimutatták, hogy a GLS vagy a GCS korábban jelzi szisztolés diszfunkciót még akkor is, ha az EF normál tartományban van. Jelen vizsgálatunkban a danicamtiv BK szisztolés funkcióra gyakorolt hatását nemcsak a standard módszerekkel (EF, FS, SV, CO), hanem 2D-strain echokardiográfiával is értékeltük. A danicamtivval kezelt patkányszívekben szignifikánsan alacsonyabb (negatívabb) GLS és GCS értékeket mértünk, ami tovább erősíti a gyógyszer BK kontraktilitásra gyakorolt pozitív hatását.

Kísérleti eredményeink szívelégtelenségre történő extrapolálhatóságát korlátozhatja az a tény, hogy vizsgálatainkat egészséges állatokon végeztük. Ugyanakkor adataink összhangban vannak a szívelégtelenség kutyamodelljében és a danicamtivval végzett 2a fázisú vizsgálatban megfigyelt eredményekkel.⁸²

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

A danicamtiv az OM-hez hasonlóan a Ca^{2+} homeosztázis befolyásolása nélkül javítja a BK-i szisztolés funkciót. Vizsgálatunk során pitvari aritmia, malignus kamrai ritmuszavar, vagy vezetési zavar megjelenését nem tapasztaltuk, amely szintén támogatja azt a tényt, hogy a danicamtiv független a konvencionális pozitív inotróp szerekre jellemző mellékhatásoktól. Fontos megjegyezni, hogy kutatócsoportunk egy korábbi *in vivo* vizsgálata során, ahol szintén egészséges patkányokon alkalmaztunk OM-kezelést, egy úgynevezett alternáló elektromechanikus jelenség alakult ki, amelyet a danicamtiv esetében nem tapasztaltunk.¹⁷² Bár a danicamtiv is befolyásolja a BK-i diasztolés funkciót, ez a hatás kevésbé szembetűnő, mint az OM alkalmazásakor. Ez a különbség bizonyos mértékig összefügghet a danicamtiv által kiváltott pitvari kontraktilitás fokozódásával. Ezen kívül a diasztolés diszfunkció osztályhatásként jelenik meg a direkt miozin-aktivátorok alkalmazása során. Eredményeink alapján a danicamtivval kezelt betegeknél nagy figyelmet kell fordítani a bal kamra diasztolés funkciójának rendszeres ellenőrzésére.

5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A bal kamrai szívizomzat felépítése és működése jelentősen eltér HFrEF-ben és HFpEF-ben. A szívizomzat strukturális és funkcionális jellemzőinek összehasonlításakor HFrEF-ben alacsonyabb miofibrilláris sűrűséget és miofilamentális Ca^{2+} érzékenységet, míg ezekhez képest HFpEF-ben a szívizomsejtek hipertrófiáját, a szívizomsejtek nagyobb passzív feszülését (az $F_{\text{passzív}}$ növekedését) és fokozott Ca^{2+} érzékenységét (pCa_{50}) figyeltük meg. Ezen változások összhangban állnak a szívizomzat csökkent kontraktilitásával HFrEF-ben és magyarázhatják a kamraizomzat kóros relaxációját, illetve tágulékonyságának csökkenését HFpEF-ben. A megfigyelt különbségek alátámasztják a két szívelégtelenség fenotípus klinikai elkülönítését.
2. A miokardális fibrózis, a kóros szívizomsejt passzív feszülés, a glikációs végtermékek (AGEs) lerakódása és az endotél diszfunkció együttesen, de különböző mértékben fordulnak elő diabéteszes HFrEF és HFpEF betegekben. Eredményeink arra utalnak, hogy HFrEF-ben elsősorban a fibrózis és az AGEs lerakódása, míg HFpEF-ben a hipertrófiás szívizomsejtek kórosan emelkedett passzív feszülése játszhat fontos szerepet a kamrai kontraktilitás változásaiban.
3. A β -blokkoló kezelés HFpEF-ben észlelt - HFrEF-től elmaradó - klinikai hatékonysága összefüggésben állhat a szívizomsejtek szívelégtelenség-specifikus remodelációival. Eredményeink szerint, a két szívelégtelenség formában az átépülés máshogy érinti a β -adrenerg jelátviteli útvonalat és a celluláris Ca^{2+} homeosztázist.
4. A merev N2B titin izoforma hipofoszforilációja kiemelt szerepet játszik a szívelégtelen betegek szívizomsejtjeinek kórosan emelkedett passzív feszülésében.
5. A mieloperoxidáz enzim (MPO) hatására képződő oxidánsok a csökkentik a szívizomsejt aktív erejét, és annak Ca^{2+} érzékenységét, valamint növelik a szívizomsejtek passzív feszülését. Ezek a hatások károsíthatják a bal kamra kontraktilis funkcióját. Az MPO hatásai az enzim klorinációs aktivitásán keresztül valósulnak meg. Az MPO gátlása ígéretes célpont lehet a miokardiális kontraktilis diszfunkció kivédésében emelkedett MPO szinttel járó kardiovaszkuláris kórfolyamatokban.

6. Az akut stressz hatására jelentős mértékben növekszik a szérumban a progeszteronszint, mind nem ovariectomizált, mind ovariectomizált nőstény patkányokban. Az ösztrogén hiányában a miozin-kötő C fehérje (MyBP-C) foszforilációja által növekedhet a bal kamrai izolált szívizomsejtek a Ca^{2+} -aktivált erőgenerálása. A szérumban a progeszteron szint növekedésével párhuzamosan csökken a miofilamentális rendszer Ca^{2+} érzékenysége.
7. Omecamtiv mecarbil (OM) hatására az *in vitro* követett szívizomsejt kontrakciók a szisztolés funkció javulását tükrözik, mely változatlan Ca^{2+} tranziensek mellett, a szisztolés szarkomerhossz csökkenésének és jelentős részben a kontrakciók elnyúlásának köszönhető. Nagyobb OM koncentrációk hatására a diasztolés szarkomerhosszak jelentős csökkenése, a kontrakciók kinetikai paramétereinek lassulása és a kontrakció idejének szignifikáns növekedése figyelhető meg. Az észlelt változások az OM alkalmazásakor diasztolés diszfunkció kialakulásához vezethetnek.
8. Danicamtiv hatására az *in vivo* meghatározott bal kamrai kontraktilitás és szisztolés funkció jelentős mértékben javul, a kontrakciók kinetikája azonban jelentősen lassul. A szisztolés időtartamának megnyúlása következtében a diasztolés időtartama lerövidül, amely miokardiális iszkémia kialakulásához vezethet a szer alkalmazása során.

A miozin aktivátorok (OM és danicamtiv) esetén felmerülő potenciális diasztolés funkció romlás korlátozhatja ezen új gyógyszercsoport klinikai alkalmazhatóságát.

6. A KUTATÁSI EREDMÉNYEK TUDOMÁNYOS ÉS TÁRSADALMI HASZNOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI, A KUTATÁS JELENTŐSÉGE

Kísérleti eredményeink hozzájárulhatnak a szívelégtelenség eltérő klinikai formáiban a szívizomzatban végbemenő strukturális, funkcionális, biokémiai és molekuláris változások pontosabb megértéséhez. A bal kamra szisztolés és diasztolés funkciójának romlásáért felelős patofiziológiai és molekuláris folyamatok alaposabb megismerése potenciálisan terápiás jelentőséggel bírhat korszerűbb szívelégtelenség kezelési stratégiák kidolgozásában. *In vitro* és *in vivo* kísérleteink eredményei elősegíthetik a miozin aktivátorok klinikai alkalmazásának optimalizálását.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJ V, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*; 2021;**42**:3599–3726.
2. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review*; 2017;**3**:7–11.
3. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart (British Cardiac Society)*; 2007;**93**:1137–1146.
4. Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP. The annual global economic burden of heart failure. *International Journal of Cardiology*; 2014;**171**:368–376.
5. Tsao CW, Lyass A, Enserro D, Larson MG, Ho JE, Kizer JR, Gottdiener JS, Psaty BM, Vasan RS. Temporal Trends in the Incidence of and Mortality Associated With Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *JACC Heart Failure*; 2018;**6**:678–685.
6. Chioncel O, Lainscak M, Seferovic PM, Anker SD, Crespo-Leiro MG, Harjola V-P, Parissis J, Laroche C, Piepoli MF, Fonseca C, Mebazaa A, Lund L, Ambrosio GA, Coats AJ, Ferrari R, Ruschitzka F, Maggioni AP, Filippatos G. Epidemiology and one-year outcomes in patients with chronic heart failure and preserved, mid-range and reduced ejection fraction: an analysis of the ESC Heart Failure Long-Term Registry. *European Journal of Heart Failure*; 2017;**19**:1574–1585.
7. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *The New England Journal of Medicine*; 2006;**355**:251–259.
8. Ferrari R, Böhm M, Cleland JGF, Paulus WJS, Pieske B, Rapezzi C, Tavazzi L. Heart failure with preserved ejection fraction: uncertainties and dilemmas. *European Journal of Heart Failure*; 2015;**17**:665–671.
9. Anker SD, Usman MS, Anker MS, Butler J, Böhm M, Abraham WT, Adamo M, Chopra VK, Cicoira M, Cosentino F, Filippatos G, Jankowska EA, Lund LH, Moura B, Mullens W, Pieske B, Ponikowski P, Gonzalez-Juanatey JR, Rakisheva A, Savarese G, Seferovic P, Teerlink JR, Tschöpe C, Volterrani M, Haehling S von, Zhang J, Zhang Y, Bauersachs J, Landmesser U, Zieroth S, et al. Patient phenotype profiling in heart failure with preserved ejection fraction to guide therapeutic decision making. A scientific statement of the Heart Failure Association, the European Heart Rhythm Association of the European Society of Cardiology, and the European Society of Hypertension. *European Journal of Heart Failure*; 2023;**25**:936–955.
10. Dunlay SM, Givertz MM, Aguilar D, Allen LA, Chan M, Desai AS, Deswal A, Dickson VV, Kosiborod MN, Lekavich CL, McCoy RG, Mentz RJ, Piña IL. Type 2 Diabetes Mellitus and Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association and the Heart Failure Society of America: This statement does not represent an update of the 2017 ACC/AHA/HFSA heart failure guideline update. *Circulation*; 2019;**140**:e294–e324.
11. Pop-Busui R, Januzzi JL, Bruemmer D, Butalia S, Green JB, Horton WB, Knight C, Levi M, Rasouli N, Richardson CR. Heart Failure: An Underappreciated Complication of Diabetes. A Consensus Report of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*; 2022;**45**:1670–1690.
12. Namburete EI, Dippenaar A, Conceição EC, Feliciano C, Nascimento MMP do, Peronni KC, Silva WAJ, Ferro JJ, Harrison LH, Warren RM, Bollela VR. Phylogenomic assessment of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Beira, Mozambique. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*; 2020;**121**:101905.

13. Hoeven KH van, Factor SM. A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation*; 1990;**82**:848–855.
14. Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjesen PA, Hildebrandt P, Mehlsen J, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*; 1999;**22**:1186–1190.
15. Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circulation Research*; 2019;**124**:1598–1617.
16. Lam CSP, Docherty KF, Ho JE, McMurray JJ V, Myhre PL, Omland T. Recent successes in heart failure treatment. *Nature Medicine*; 2023;**29**:2424–2437.
17. Ma TKW, Kam KKH, Yan BP, Lam Y-Y. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *British Journal of Pharmacology*; 2010;**160**:1273–1292.
18. Zhang Y-Y, Yu Y, Yu C. Antifibrotic Roles of RAAS Blockers: Update. *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 2019;**1165**:671–691.
19. Heran BS, Musini VM, Bassett K, Taylor RS, Wright JM. Angiotensin receptor blockers for heart failure. *The Cochrane database of systematic reviews*; 2012;**2012**:CD003040.
20. Solomon SD, Claggett B, Packer M, Desai A, Zile MR, Swedberg K, Rouleau J, Shi V, Lefkowitz M, McMurray JJ V. Efficacy of Sacubitril/Valsartan Relative to a Prior Decompensation: The PARADIGM-HF Trial. *JACC Heart Failure*; 2016;**4**:816–822.
21. Velazquez EJ, Morrow DA, DeVore AD, Duffy CI, Ambrosy AP, McCague K, Rocha R, Braunwald E. Angiotensin–Neprilysin Inhibition in Acute Decompensated Heart Failure. *New England Journal of Medicine* 2019;**380**:539–548.
22. Chang J, Ambrosy AP, Vardeny O, Spall HGC Van, Mentz RJ, Sauer AJ. Mineralocorticoid Antagonism in Heart Failure: Established and Emerging Therapeutic Role. *JACC Heart Failure*; 2024;**12**:1979–1993.
23. Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circulation Research*; 2013;**113**:739–753.
24. Barrese V, Taglialatela M. New advances in beta-blocker therapy in heart failure. *Frontiers in Physiology*; 2013;**4**:323.
25. McMurray JJ V, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, Ponikowski P, Sabatine MS, Anand IS, Bělohávek J, Böhm M, Chiang C-E, Chopra VK, Boer RA de, Desai AS, Diez M, Drozd J, Dukát A, Ge J, Howlett JG, Katova T, Kitakaze M, Ljungman CEA, Merkely B, Nicolau JC, O’Meara E, Petrie MC, Vinh PN, Schou M, Tereshchenko S, et al. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *The New England Journal of Medicine*; 2019;**381**:1995–2008.
26. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, Januzzi J, Verma S, Tsutsui H, Brueckmann M, Jamal W, Kimura K, Schnee J, Zeller C, Cotton D, Bocchi E, Böhm M, Choi D-J, Chopra V, Chuquiere E, Giannetti N, Janssens S, Zhang J, Gonzalez Juanatey JR, Kaul S, Brunner-La Rocca H-P, Merkely B, Nicholls SJ, Perrone S, Pina I, et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *The New England Journal of Medicine*; 2020;**383**:1413–1424.
27. Talha KM, Anker SD, Butler J. SGLT-2 Inhibitors in Heart Failure: A Review of Current Evidence. *International Journal of Heart Failure*; 2023;**5**:82–90.
28. Cleland JGF, Tendera M, Adamus J, Freemantle N, Polonski L, Taylor J. The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *European Heart Journal*; 2006;**27**:2338–2345.
29. Massie BM, Carson PE, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Zile MR, Anderson S, Donovan M, Iverson E, Staiger C, Ptaszynska A. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *The New England Journal of Medicine*; 2008;**359**:2456–2467.

30. Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ V, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet (London, England)*; 2003;**362**:777–781.
31. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, Harty B, Heitner JF, Kenwood CT, Lewis EF, O'Meara E, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SD, Sweitzer NK, Yang S, McKinlay SM. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *The New England Journal of Medicine*; 2014;**370**:1383–1392.
32. Flather MD, Shibata MC, Coats AJS, Veldhuisen DJ Van, Parkhomenko A, Borbola J, Cohen-Solal A, Dumitrascu D, Ferrari R, Lechat P, Soler-Soler J, Tavazzi L, Spinarova L, Toman J, Böhm M, Anker SD, Thompson SG, Poole-Wilson PA. Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *European Heart Journal*; 2005;**26**:215–225.
33. Solomon SD, McMurray JJ V, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, Martinez F, Packer M, Pfeffer MA, Pieske B, Redfield MM, Rouleau JL, Veldhuisen DJ van, Zannad F, Zile MR, Desai AS, Claggett B, Jhund PS, Boytsov SA, Comin-Colet J, Cleland J, Düngen H-D, Goncalvesova E, Katova T, Kerr Saraiva JF, Lelonek M, Merkely B, Senni M, Shah SJ, Zhou J, et al. Angiotensin-Neprilysin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *The New England Journal of Medicine*; 2019;**381**:1609–1620.
34. Pieske B, Maggioni AP, Lam CSP, Pieske-Kraigher E, Filippatos G, Butler J, Ponikowski P, Shah SJ, Solomon SD, Scalise A-V, Mueller K, Roessig L, Gheorghiade M. Vericiguat in patients with worsening chronic heart failure and preserved ejection fraction: results of the SOLuble guanylate Cyclase stimulator in heart failure patientS with PRESERVED EF (SOCRATES-PRESERVED) study. *European Heart Journal*; 2017;**38**:1119–1127.
35. Komajda M, Isnard R, Cohen-Solal A, Metra M, Pieske B, Ponikowski P, Voors AA, Dominjon F, Henon-Goburdhun C, Pannaux M, Böhm M. Effect of ivabradine in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the EDIFY randomized placebo-controlled trial. *European Journal of Heart Failure*; 2017;**19**:1495–1503.
36. Solomon SD, Boer RA de, DeMets D, Hernandez AF, Inzucchi SE, Kosiborod MN, Lam CSP, Martinez F, Shah SJ, Lindholm D, Wilderäng U, Öhrn F, Claggett B, Langkilde AM, Petersson M, McMurray JJ V. Dapagliflozin in heart failure with preserved and mildly reduced ejection fraction: rationale and design of the DELIVER trial. *European Journal of Heart Failure*; 2021;**23**:1217–1225.
37. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, Brunner-La Rocca H-P, Choi D-J, Chopra V, Chuquiere-Valenzuela E, Giannetti N, Gomez-Mesa JE, Janssens S, Januzzi JL, Gonzalez-Juanatey JR, Merkely B, Nicholls SJ, Perrone S V, Piña IL, Ponikowski P, Senni M, Sim D, Spinar J, Squire I, Taddei S, Tsutsui H, Verma S, Vinereanu D, Zhang J, Carson P, et al. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *The New England Journal of Medicine*; 2021;**385**:1451–1461.
38. Linke WA, Krüger M. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology*; 2010;**25**:186–198.
39. Linke WA. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovascular Research*; 2008;**77**:637–648.
40. LeWinter MM, Granzier H. Cardiac titin: a multifunctional giant. *Circulation*; 2010;**121**:2137–2145.
41. Krüger M, Linke WA. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 2009;**46**:490–498.
42. Borbély A, Heerebeek L van, Paulus WJ. Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circulation Research*; 2009. p. 12–14.

43. Borbély A, Velden J van der, Papp Z, Bronzwaer JGF, Edes I, Stienen GJM, Paulus WJ. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 2005;**111**:774–781.
44. Grützner A, Garcia-Manyes S, Kötter S, Badilla CL, Fernandez JM, Linke WA. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophysical Journal*; 2009;**97**:825–834.
45. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, Winterbourn CC. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*; 2007;**49**:1993–2000.
46. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators of Inflammation*; 2008;**2008**:135625.
47. Sinning C, Schnabel R, Peacock WF, Blankenberg S. Up-and-coming markers: myeloperoxidase, a novel biomarker test for heart failure and acute coronary syndrome application? *Congestive Heart Failure (Greenwich, Conn)*; 2008;**14**:46–48.
48. Steinberg SF. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circulation Research*; 2013;**112**:393–405.
49. Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*; 2003;**25**:259–274.
50. Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology & Medicine*; 1995;**18**:93–105.
51. Chung HS, Wang S-B, Venkatraman V, Murray CI, Eyk JE Van. Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circulation Research*; 2013;**112**:382–392.
52. Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal*; 2005;**24**:1311–1317.
53. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*; 2003;**9**:169–176.
54. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *The Journal of Clinical Investigation*; 1997;**99**:2075–2081.
55. Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, Vliet A van der. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *The Journal of Biological Chemistry*; 1996;**271**:19199–19208.
56. Heinecke JW, Li W, Daehnke HL 3rd, Goldstein JA. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*; 1993;**268**:4069–4077.
57. Liu X, Zweier JL. A real-time electrochemical technique for measurement of cellular hydrogen peroxide generation and consumption: evaluation in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radical Biology & Medicine*; 2001;**31**:894–901.
58. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*; 2013;**1**:244–257.
59. Lane AE, Tan JTM, Hawkins CL, Heather AK, Davies MJ. The myeloperoxidase-derived oxidant HOSCN inhibits protein tyrosine phosphatases and modulates cell signalling via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. *The Biochemical Journal*; 2010;**430**:161–169.
60. Malle E, Furtmüller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug

- development? *British Journal of Pharmacology*; 2007;**152**:838–854.
61. Fazal L, Azibani F, Vodovar N, Cohen Solal A, Delcayre C, Samuel J-L. Effects of biological sex on the pathophysiology of the heart. *British Journal of Pharmacology*; 2014;**171**:555–566.
 62. Murphy E, Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*; 2007;**75**:478–486.
 63. Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Seeland U, Hetzer R. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circulation Journal: official journal of the Japanese Circulation Society*; 2010;**74**:1265–1273.
 64. Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*; 2006;**5**:425–438.
 65. Kalil B, Leite CM, Carvalho-Lima M, Anselmo-Franci JA. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress*; 2013;**16**:452–460.
 66. Dhote V V, Balaraman R. Gender specific effect of progesterone on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sciences*; 2007;**81**:188–197.
 67. Cheng J, Zhang J, Ma X, Su D. Frequency-dependent acceleration of cardiac repolarization by progesterone underlying its cardiac protection against drug-induced proarrhythmic effects in female rabbits. *European Journal of Pharmacology*; 2012;**689**:172–178.
 68. Morrissy S, Xu B, Aguilar D, Zhang J, Chen QM. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. *Aging Cell*; 2010;**9**:799–809.
 69. Komamura K, Fukui M, Iwasaku T, Hirotsu S, Masuyama T. Takotsubo cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *World Journal of Cardiology*; 2014;**6**:602–609.
 70. Singh T, Khan H, Gamble DT, Scally C, Newby DE, Dawson D. Takotsubo Syndrome: Pathophysiology, Emerging Concepts, and Clinical Implications. *Circulation*; 2022;**145**:1002–1019.
 71. Velden J van der, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, Jong JW de, Owen VJ, Burton PBJ, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJM. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovascular Research*; 2003;**57**:37–47.
 72. Gresham KS, Stelzer JE. The contributions of cardiac myosin binding protein C and troponin I phosphorylation to β -adrenergic enhancement of in vivo cardiac function. *The Journal of Physiology*; 2016;**594**:669–686.
 73. Endoh M. Cardiac Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ sensitizers. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* 2008;**72**:1915–1925.
 74. O'Connor CM, Gattis WA, Uretsky BF, Adams KFJ, McNulty SE, Grossman SH, McKenna WJ, Zannad F, Swedberg K, Gheorghiade M, Califf RM. Continuous intravenous dobutamine is associated with an increased risk of death in patients with advanced heart failure: insights from the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *American Heart Journal*; 1999;**138**:78–86.
 75. Tacon CL, McCaffrey J, Delaney A. Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Intensive Care Medicine*; 2012;**38**:359–367.
 76. Teerlink JR, Clarke CP, Saikali KG, Lee JH, Chen MM, Escandon RD, Elliott L, Bee R, Habibzadeh MR, Goldman JH, Schiller NB, Malik FI, Wolff AA. Dose-dependent augmentation of cardiac systolic function with the selective cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil: a first-in-man study. *Lancet (London, England)* 2011;**378**:667–675.
 77. Malik FI, Hartman JJ, Elias KA, Morgan BP, Rodriguez H, Brejc K, Anderson RL, Sueoka SH,

- Lee KH, Finer JT, Sakowicz R, Baliga R, Cox DR, Garard M, Godinez G, Kawas R, Kraynack E, Lenzi D, Lu PP, Muci A, Niu C, Qian X, Pierce DW, Pokrovskii M, Suehiro I, Sylvester S, Tochimoto T, Valdez C, Wang W, Katori T, et al. Cardiac myosin activation: a potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science* 2011;**331**:1439–1443.
78. Teerlink JR, Felker GM, McMurray JJ V, Ponikowski P, Metra M, Filippatos GS, Ezekowitz JA, Dickstein K, Cleland JGF, Kim JB, Lei L, Knusel B, Wolff AA, Malik FI, Wasserman SM. Acute Treatment with Omecamtiv Mecarbil to Increase Contractility in Acute Heart Failure: The ATOMIC-AHF Study. *Journal of the American College of Cardiology* 2016;**67**:1444–1455.
79. Teerlink JR, Felker GM, McMurray JJ V, Solomon SD, Adams KFJ, Cleland JGF, Ezekowitz JA, Goudev A, Macdonald P, Metra M, Mitrovic V, Ponikowski P, Serpytis P, Spinar J, Tomcsányi J, Vandekerckhove HJ, Voors AA, Monsalvo ML, Johnston J, Malik FI, Honarpour N. Chronic Oral Study of Myosin Activation to Increase Contractility in Heart Failure (COSMIC-HF): a phase 2, pharmacokinetic, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)* 2016;**388**:2895–2903.
80. Teerlink JR, Diaz R, Felker GM, McMurray JJ V, Metra M, Solomon SD, Adams KF, Anand I, Arias-Mendoza A, Biering-Sørensen T, Böhm M, Bonderman D, Cleland JGF, Corbalan R, Crespo-Leiro MG, Dahlström U, Echeverria LE, Fang JC, Filippatos G, Fonseca C, Goncalvesova E, Goudev AR, Howlett JG, Lanfear DE, Li J, Lund M, Macdonald P, Mareev V, Momomura S-I, O'Meara E, et al. Cardiac Myosin Activation with Omecamtiv Mecarbil in Systolic Heart Failure. *The New England Journal of Medicine*; 2021;**384**:105–116.
81. Shen S, Sewanan LR, Jacoby DL, Campbell SG. Danicamtiv Enhances Systolic Function and Frank-Starling Behavior at Minimal Diastolic Cost in Engineered Human Myocardium. *Journal of the American Heart Association* 2021; e020860.
82. Voors AA, Tamby J-F, Cleland JG, Koren M, Forgosh LB, Gupta D, Lund LH, Camacho A, Karra R, Swart HP, Pellicori P, Wagner F, Hersherberger RE, Prasad N, Anderson R, Anto A, Bell K, Edelberg JM, Fang L, Henze M, Kelly C, Kurio G, Li W, Wells K, Yang C, Teichman SL, Rio CL Del, Solomon SD. Effects of danicamtiv, a novel cardiac myosin activator, in heart failure with reduced ejection fraction: experimental data and clinical results from a phase 2a trial. *European Journal of Heart Failure* 2020;**22**:1649–1658.
83. Fabiato A, Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *Journal de Physiologie*; 1979;**75**:463–505.
84. Heerebeek L van, Borbely A, Niessen HWM, Bronzwaer JGF, Velden J van der, Stienen GJM, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*; 2006;**113**:1966–1973.
85. Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, Keulenaer G De, Leite-Moreira AF, Borbely A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*; 2007;**28**:2539–2550.
86. Gerdes AM. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *Journal of Cardiac Failure*; 2002;**8**:S264-8.
87. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*; 2002;**109**:121–130.
88. Pravata VM, Omelková M, Stavridis MP, Desbiens CM, Stephen HM, Lefeber DJ, Gecz J, Gundogdu M, Öunap K, Joss S, Schwartz CE, Wells L, Aalten DMF van. An intellectual disability syndrome with single-nucleotide variants in O-GlcNAc transferase. *European Journal of Human*

- Genetics*; 2020;**28**:706–714.
89. Lim CC, Sawyer DB. Modulation of cardiac function: titin springs into action. *The Journal of General Physiology*; 2005;**125**:249–252.
 90. Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *The Journal of General Physiology*; 2005;**125**:257–271.
 91. Warren CM, Jordan MC, Roos KP, Krzesinski PR, Greaser ML. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovascular Research*; 2003;**59**:86–94.
 92. Udelson JE, Cannon RO 3rd, Bacharach SL, Rumble TF, Bonow RO. Beta-adrenergic stimulation with isoproterenol enhances left ventricular diastolic performance in hypertrophic cardiomyopathy despite potentiation of myocardial ischemia. Comparison to rapid atrial pacing. *Circulation*; 1989;**79**:371–382.
 93. Paulus WJ, Bronzwaer JGF. Myocardial contractile effects of nitric oxide. *Heart Failure Reviews*; 2002;**7**:371–383.
 94. Heerebeek L van, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JGF, Diamant M, Borbély A, Velden J van der, Stienen GJM, Laarman GJ, Niessen HWM, Paulus WJ. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*; 2008;**117**:43–51.
 95. Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circulation Research*; 2006;**98**:596–605.
 96. Young ME, McNulty P, Taegtmeier H. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. *Circulation United States*; 2002;**105**:1861–1870.
 97. Zarich SW, Arbuckle BE, Cohen LR, Roberts M, Nesto RW. Diastolic abnormalities in young asymptomatic diabetic patients assessed by pulsed Doppler echocardiography. *Journal of the American College of Cardiology*; 1988;**12**:114–120.
 98. Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Kühl U, Rauch U, Seeberg B, Schultheiss H-P. Differential aspects of endothelial function of the coronary microcirculation considering myocardial virus persistence, endothelial activation, and myocardial leukocyte infiltrates. *Circulation*; 2005;**111**:1784–1791.
 99. Baidoshvili A, Krijnen PAJ, Kupreishvili K, Ciurana C, Bleeker W, Nijmeijer R, Visser CA, Visser FC, Meijer CJLM, Stoker W, Eijssman L, Hinsbergh VWM van, Hack CE, Niessen HWM, Schalkwijk CG. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine depositions in intramyocardial blood vessels in human and rat acute myocardial infarction: a predictor or reflection of infarction? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 2006;**26**:2497–2503.
 100. Zieman SJ, Melenovsky V, Clattenburg L, Corretti MC, Capriotti A, Gerstenblith G, Kass DA. Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. *Journal of Hypertension*; 2007;**25**:577–583.
 101. Asbun J, Villarreal FJ. The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*; 2006;**47**:693–700.
 102. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*; 2005. p. 1615–1625.
 103. Witt CC, Burkart C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H, Labeit S. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *The EMBO Journal*; 2006;**25**:3843–3855.
 104. Hoshijima M. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*; 2006;**290**:H1313–25.

105. Hamdani N, Paulus WJ, Heerebeek L van, Borbély A, Boontje NM, Zuidwijk MJ, Bronzwaer JGF, Simonides WS, Niessen HWM, Stienen GJM, Velden J van der. Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction. *European Heart Journal*; 2009;**30**:1863–1872.
106. Yamada T, Fukunami M, Ohmori M, Iwakura K, Kumagai K, Kondoh N, Minamino T, Tsujimura E, Nagareda T, Kotoh K. Which subgroup of patients with dilated cardiomyopathy would benefit from long-term beta-blocker therapy? A histologic viewpoint. *Journal of the American College of Cardiology*; 1993;**21**:628–633.
107. Suwa M, Ito T, Kobashi A, Yagi H, Terasaki F, Hirota Y, Kawamura K. Myocardial integrated ultrasonic backscatter in patients with dilated cardiomyopathy: prediction of response to beta-blocker therapy. *American Heart Journal*; 2000;**139**:905–912.
108. Onodera T, Okazaki F, Miyazaki H, Minami S, Ito T, Seki S, Taniguchi M, Taniguchi I, Mochizuki S. Perindopril reverses myocyte remodeling in the hypertensive heart. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*; 2002;**25**:85–90.
109. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation*; 1999;**100**:2210–2212.
110. Borbély A, Falcao-Pires I, Heerebeek L van, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JGF, Papp Z, Velden J van der, Stienen GJM, Paulus WJ. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circulation Research*; 2009;**104**:780–786.
111. Layland J, Li J-M, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*; 2002;**540**:457–467.
112. Flagg TP, Cazorla O, Remedi MS, Haim TE, Tones MA, Bahinski A, Numann RE, Kovacs A, Schaffer JE, Nichols CG, Nerbonne JM. Ca²⁺-independent alterations in diastolic sarcomere length and relaxation kinetics in a mouse model of lipotoxic diabetic cardiomyopathy. *Circulation Research*; 2009;**104**:95–103.
113. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NMP, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*; 2004;**110**:155–162.
114. Fink MA, Zakhary DR, Mackey JA, Desnoyer RW, Apperson-Hansen C, Damron DS, Bond M. AKAP-mediated targeting of protein kinase A regulates contractility in cardiac myocytes. *Circulation Research*; 2001;**88**:291–297.
115. Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circulation Research*; 2004;**95**:67–75.
116. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circulation Research*; 2002;**90**:1181–1188.
117. Wu Y, Bell SP, Trombitas K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM, Granzier H. Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation*; 2002;**106**:1384–1389.
118. Zakhary DR, Moravec CS, Bond M. Regulation of PKA binding to AKAPs in the heart: alterations in human heart failure. *Circulation*; 2000;**101**:1459–1464.
119. Takimoto E, Belardi D, Tocchetti CG, Vahebi S, Cormaci G, Ketner EA, Moens AL, Champion HC, Kass DA. Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation*; 2007;**115**:2159–2167.

120. Kalász J, Pásztor ET, Fagyas M, Balogh Á, Tóth A, Csató V, Édes I, Papp Z, Borbely A. Myeloperoxidase impairs the contractile function in isolated human cardiomyocytes. *Free Radical Biology & Medicine*; 2015;**84**:116–127.
121. Miller DJ, MacFarlane NG. Intracellular effects of free radicals and reactive oxygen species in cardiac muscle. *Journal of Human Hypertension*; 1995;**9**:465–473.
122. MacFarlane NG, Miller DJ. Effects of the reactive oxygen species hypochlorous acid and hydrogen peroxide on force production and calcium sensitivity of rat cardiac myofilaments. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*; 1994;**428**:561–568.
123. Fliss H. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 1988;**84**:177–188.
124. Wilson GJ, Remedios CG dos, Stephenson DG, Williams DA. Effects of sulphhydryl modification on skinned rat skeletal muscle fibres using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *The Journal of Physiology*; 1991;**437**:409–430.
125. Balogh A, Santer D, Pásztor ET, Tóth A, Czuriga D, Podesser BK, Trescher K, Jaquet K, Erdodi F, Edes I, Papp Z. Myofilament protein carbonylation contributes to the contractile dysfunction in the infarcted LV region of mouse hearts. *Cardiovascular Research*; 2014;**101**:108–119.
126. Gao WD, Murray CI, Tian Y, Zhong X, DuMond JF, Shen X, Stanley BA, Foster DB, Wink DA, King SB, Eyk JE Van, Paolocci N. Nitroxyl-mediated disulfide bond formation between cardiac myofilament cysteines enhances contractile function. *Circulation Research*; 2012;**111**:1002–1011.
127. Balog M, Miljanović M, Blažetić S, Labak I, Ivić V, Viljetić B, Borbely A, Papp Z, Blažeković R, Vari SG, Fagyas M, Heffer M. Sex-specific chronic stress response at the level of adrenal gland modified sexual hormone and leptin receptors. *Croatian Medical Journal*; 2015;**56**:104–113.
128. Fajer AB, Holzbauer M, Newport HM. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. *The Journal of Physiology*; 1971;**214**:115–126.
129. Uotinen N, Puustinen R, Pasanen S, Manninen T, Kivineva M, Syväla H, Tuohimaa P, Ylikomi T. Distribution of progesterone receptor in female mouse tissues. *General and Comparative Endocrinology*; 1999;**115**:429–441.
130. Asavasupreechar T, Saito R, Miki Y, Edwards DP, Boonyaratankornkit V, Sasano H. Systemic distribution of progesterone receptor subtypes in human tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 2020;**199**:105599.
131. Kararigas G, Becher E, Mahmoodzadeh S, Knosalla C, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific modification of progesterone receptor expression by 17 β -oestradiol in human cardiac tissues. *Biology of Sex Differences*; 2010;**1**:2.
132. Nakamura H, Kurokawa J, Bai C-X, Asada K, Xu J, Oren R V, Zhu ZI, Clancy CE, Isobe M, Furukawa T. Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway: an in vitro patch-clamp and computational modeling study. *Circulation*; 2007;**116**:2913–2922.
133. Solaro RJ, Velden J van der. Why does troponin I have so many phosphorylation sites? Fact and fancy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 2010;**48**:810–816.
134. Hamdani N, Waard M de, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, Dijk S van, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Remedios C Dos, Duncker DJ, Borbely A, Papp Z, Paulus W, Stienen GJM, Marston SB, Velden J van der. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*; 2008;**29**:189–201.
135. Feridooni HA, MacDonald JK, Ghimire A, Pyle WG, Howlett SE. Acute exposure to progesterone attenuates cardiac contraction by modifying myofilament calcium sensitivity in the female mouse heart. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*; 2017;**312**:H46–H59.
136. Thawornkaiwong A, Preawnim S, Wattanapernpool J. Upregulation of beta 1-adrenergic

- p>receptors in ovariectomized rat hearts.
- Life Sciences*
- ; 2003;
- 72**
- :1813–1824.
137. Kam KWL, Qi JS, Chen M, Wong TM. Estrogen reduces cardiac injury and expression of beta1-adrenoceptor upon ischemic insult in the rat heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 2004;**309**:8–15.
 138. Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao Y, Yan C, Gu S. Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Experimental Physiology*; 2008;**93**:1034–1043.
 139. Tong CW, Stelzer JE, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. Acceleration of crossbridge kinetics by protein kinase A phosphorylation of cardiac myosin binding protein C modulates cardiac function. *Circulation Research*; 2008;**103**:974–982.
 140. Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circulation Research*; 2000;**86**:51–58.
 141. Parks RJ, Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*; 2013;**465**:747–763.
 142. Bupha-Intr T, Oo YW, Wattanapermpool J. Increased myocardial stiffness with maintenance of length-dependent calcium activation by female sex hormones in diabetic rats. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*; 2011;**300**:H1661-8.
 143. Lyon AR, Citro R, Schneider B, Morel O, Ghadri JR, Templin C, Omerovic E. Pathophysiology of Takotsubo Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*; 2021;**77**:902–921.
 144. Ueyama T, Hano T, Kasamatsu K, Yamamoto K, Tsuruo Y, Nishio I. Estrogen attenuates the emotional stress-induced cardiac responses in the animal model of Tako-tsubo (Ampulla) cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 2003;**42 Suppl 1**:S117-9.
 145. Ráduly AP, Tóth A, Sárkány F, Horváth B, Szentandrassy N, Nánási PP, Csanádi Z, Édes I, Papp Z, Borbély A. Omecamtiv mecarbil augments cardiomyocyte contractile activity both at resting and systolic Ca(2+) levels. *ESC Heart Failure*; 2023;**10**:1326–1335.
 146. Beier N, Harting J, Jonas R, Klockow M, Lues I, Haeusler G. The novel cardiotonic agent EMD 53 998 is a potent ‘calcium sensitizer’. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 1991;**18**:17–27.
 147. Oli K, Tekle-Haimanot R, Forsgren L, Ekstedt J. Rheumatic heart disease prevalence among schoolchildren of an Ethiopian rural town. *Cardiology*; 1992;**80**:152–155.
 148. Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Edes I, Papp Z. The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *European Journal of Pharmacology* 2004;**486**:67–74.
 149. Nagy L, Kovács Á, Bódi B, Pásztor ET, Fülöp GÁ, Tóth A, Édes I, Papp Z. The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat. *British Journal of Pharmacology* 2015;**172**:4506–4518.
 150. Cleland JGF, Teerlink JR, Senior R, Nifontov EM, Mc Murray JJ V, Lang CC, Tsyrlin VA, Greenberg BH, Mayet J, Francis DP, Shaburishvili T, Monaghan M, Saltzberg M, Neyses L, Wasserman SM, Lee JH, Saikali KG, Clarke CP, Goldman JH, Wolff AA, Malik FI. The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *Lancet (London, England)*; 2011;**378**:676–683.
 151. Shen Y-T, Malik FI, Zhao X, Depre C, Dhar SK, Abarzúa P, Morgans DJ, Vatner SF. Improvement of cardiac function by a cardiac Myosin activator in conscious dogs with systolic

- heart failure. *Circulation Heart Failure* 2010;**3**:522–527.
152. Poggesi C, Tesi C, Stehle R. Sarcomeric determinants of striated muscle relaxation kinetics. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 2005;**449**:505–517.
153. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews*; 2000;**80**:853–924.
154. Liu Y, White HD, Belknap B, Winkelmann DA, Forgacs E. Omecamtiv Mecarbil modulates the kinetic and motile properties of porcine β -cardiac myosin. *Biochemistry*; 2015;**54**:1963–1975.
155. Wang Y, Ajtai K, Burghardt TP. Analytical comparison of natural and pharmaceutical ventricular myosin activators. *Biochemistry* 2014;**53**:5298–5306.
156. Gambassi G, Capogrossi MC, Klockow M, Lakatta EG. Enantiomeric dissection of the effects of the inotropic agent, EMD 53998, in single cardiac myocytes. *The American Journal of Physiology*; 1993;**264**:H728-38.
157. Radke MB, Taft MH, Stapel B, Hilfiker-Kleiner D, Preller M, Manstein DJ. Small molecule-mediated refolding and activation of myosin motor function. *eLife* 2014;**3**:e01603.
158. Denniss AL, Dashwood AM, Molenaar P, Beard NA. Sarcoplasmic reticulum calcium mishandling: central tenet in heart failure? *Biophysical Reviews* 2020;**12**:865–878.
159. Wilson K, Guggilam A, West TA, Zhang X, Trask AJ, Cismowski MJ, Tombe P de, Sadayappan S, Lucchesi PA. Effects of a myofilament calcium sensitizer on left ventricular systolic and diastolic function in rats with volume overload heart failure. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2014;**307**:H1605-17.
160. Ráduly AP, Sárkány F, Kovács MB, Bernát B, Juhász B, Szilvássy Z, Porszász R, Horváth B, Szentandrassy N, Nánási P, Csanádi Z, Édes I, Tóth A, Papp Z, Priksz D, Borbély A. The Novel Cardiac Myosin Activator Danicamtiv Improves Cardiac Systolic Function at the Expense of Diastolic Dysfunction In Vitro and In Vivo: Implications for Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*; 2022;**24**.
161. Olivetto I, Oreziak A, Barriales-Villa R, Abraham TP, Masri A, Garcia-Pavia P, Saberi S, Lakdawala NK, Wheeler MT, Owens A, Kubanek M, Wojakowski W, Jensen MK, Gimeno-Blanes J, Afshar K, Myers J, Hegde SM, Solomon SD, Sehnert AJ, Zhang D, Li W, Bhattacharya M, Edelberg JM, Waldman CB, Lester SJ, Wang A, Ho CY, Jacoby D. Mavacamten for treatment of symptomatic obstructive hypertrophic cardiomyopathy (EXPLORER-HCM): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2020;**396**:759–769.
162. Lehman SJ, Crocini C, Leinwand LA. Targeting the sarcomere in inherited cardiomyopathies. *Nature Reviews Cardiology* 2022;**19**:353–363.
163. Teerlink JR, Diaz R, Felker GM, McMurray JJ V, Metra M, Solomon SD, Legg JC, Büchele G, Varin C, Kurtz CE, Malik FI, Honarpour N. Omecamtiv Mecarbil in Chronic Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: Rationale and Design of GALACTIC-HF. *JACC Heart Failure* 2020;**8**:329–340.
164. Nánási PP, Horváth B, Tar F, Almássy J, Szentandrassy N, Jost N, Baczkó I, Bányász T, Varró A. Canine Myocytes Represent a Good Model for Human Ventricular Cells Regarding Their Electrophysiological Properties. *Pharmaceuticals* 2021;**14**.
165. Zacchigna S, Paldino A, Falcão-Pires I, Daskalopoulos EP, Dal Ferro M, Vodret S, Lesizza P, Cannatà A, Miranda-Silva D, Lourenço AP, Pinamonti B, Sinagra G, Weinberger F, Eschenhagen T, Carrier L, Kehat I, Tocchetti CG, Russo M, Ghigo A, Cimino J, Hirsch E, Dawson D, Ciccarelli M, Olivetti M, Linke WA, Cuijpers I, Heymans S, Hamdani N, Boer M de, Duncker DJ, et al. Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovascular Research*; 2021;**117**:43–59.
166. Francis GS, Tang WHW. Pathophysiology of congestive heart failure. *Reviews in Cardiovascular*

Medicine; 2003;**4 Suppl 2**:S14-20.

167. Fitzky BU, Witsch-Baumgartner M, Erdel M, Lee JN, Paik YK, Glossmann H, Utermann G, Moebius FF. Mutations in the Delta7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1998;**95**:8181–8186.
168. Alsulami K, Marston S. Small Molecules acting on Myofilaments as Treatments for Heart and Skeletal Muscle Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;**21**.
169. Bernier TD, Buckley LF. Cardiac Myosin Activation for the Treatment of Systolic Heart Failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2021;**77**:4–10.
170. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *The New England Journal of Medicine*; 1991;**325**:1468–1475.
171. Ahmad T, Miller PE, McCullough M, Desai NR, Riello R, Psotka M, Böhm M, Allen LA, Teerlink JR, Rosano GMC, Lindenfeld J. Why has positive inotropy failed in chronic heart failure? Lessons from prior inotrope trials. *European Journal of Heart Failure* 2019;**21**:1064–1078.
172. Fülöp GÁ, Oláh A, Csipo T, Kovács Á, Pórszász R, Veress R, Horváth B, Nagy L, Bódi B, Fagyas M, Helgadottir SL, Bánhegyi V, Juhász B, Bombicz M, Priks D, Nanasi PJ, Merkely B, Édes I, Csanádi Z, Papp Z, Radovits T, Tóth A. Omecamtiv mecarbil evokes diastolic dysfunction and leads to periodic electromechanical alternans. *Basic Research in Cardiology* 2021;**116**:24.
173. Perk G, Tunick PA, Kronzon I. Non-Doppler two-dimensional strain imaging by echocardiography—from technical considerations to clinical applications. *Journal of the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography* 2007;**20**:234–243.
174. Stokke TM, Hasselberg NE, Smedsrud MK, Sarvari SI, Haugaa KH, Smiseth OA, Edvardsen T, Remme EW. Geometry as a Confounder When Assessing Ventricular Systolic Function: Comparison Between Ejection Fraction and Strain. *Journal of the American College of Cardiology*; 2017;**70**:942–954.

8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

(A közlemények felsorolása tematikusan, az értekezésben felhasznált sorrendnek megfelelően történt.)

1. van Heerebeek L, **Borbély A**, Niessen HWM, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJM, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ: Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 113 (16), 1966-1973, 2006. IF: 10,94 Független citáció: 497
2. van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JGF, Diamant M, **Borbély A**, van der Velden J, Stienen GJM, Laarman GJ, Niessen HWM, Paulus WJ: Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*. 117 (1), 43-51, 2008. IF: 14,595 Független citáció: 548
3. Hamdani N, Paulus WJ, van Heerebeek L, **Borbély A**, Boontje NM, Zuidwijk MJ, Bronzwaer JGF, Simonides WS, Niessen HWM, Stienen GJM, van der Velden J: Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction. *Eur. Heart J*. 30 (15), 1863-1872, 2009. IF: 9,8 Független citáció: 36
4. **Borbély A**, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Édes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JGF, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJM, Paulus WJ: Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ. Res*. 104 (6), 780-786, 2009. IF: 9,214 Független citáció: 225
5. Kalász J, Pásztorné Tóth E, Fagyas M, Balogh Á, Tóth A, Csató V, Édes I, Papp Z, **Borbély A**: Myeloperoxidase impairs the contractile function in isolated human cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med*. 84, 116-127, 2015. IF: 5,784 Független citáció: 11
6. Kalász J, Pásztorné Tóth E, Bódi B, Fagyas M, Tóth A, Bhattoa H, Vári S, Balog M, Blažetić S, Heffer M, Papp Z, **Borbély A**: Single acute stress-induced progesterone and ovariectomy alter cardiomyocyte contractile function in female rats. *Croat. Med. J*. 55 (3), 239-249, 2014. IF: 1,305 Független citáció: 11
7. Ráduly A, Tóth A, Sárkány F, Horváth B, Szentandrassy N, Nánási P, Csanádi Z, Édes I, Papp Z, **Borbély A**: Omecamtiv mecarbil augments cardiomyocyte contractile activity both at resting and systolic Ca^{2+} levels. *ESC Heart Failure*. 10 (2), 1326-1335, 2023. IF:3,2 Független citáció: 4
8. Ráduly A, Sárkány F, Kovács M, Bernát B, Juhász B, Szilvássy Z, Pórszász R, Horváth B, Szentandrassy N, Nánási P, Csanádi Z, Édes I, Tóth A, Papp Z, Priksz D, **Borbély A**: The Novel Cardiac Myosin Activator Danicamtiv Improves Cardiac Systolic Function at the Expense of Diastolic Dysfunction In Vitro and In Vivo: Implications for Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci*. 24 (1), 446, 2023. IF: 4,9 Független citáció: 8

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 59,738 (CIT: 1340)

8.2. A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények

1. Kaheinen P, Pollesello P, Hertelendi Z, **Borbély A**, Szilágyi S, Édes I, Nissinen E, Haikala H, Papp Z: Positive inotropic effect of levosimendan is correlated to its stereoselective Ca^{2+} -sensitizing effect but not to stereoselective phosphodiesterase inhibition.. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98 (1), 74-78, 2006. IF: 1,788 Független citáció: 23
2. Velden J, Narolska N, Lamberts R, Boontje N, **Borbély A**, Zaremba R, Bronzwaer J, Papp Z, Jaquet K, Paulus W, Stienen G: Functional effects of protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium. *Cardiovasc. Res.* 69 (4), 876-887, 2006. IF: 5,826 Független citáció: 53
3. Paulus W, Tschöpe C, Sanderson J, Rusconi C, Flachskampf F, Rademakers F, Marino P, Smiseth O, De Keulenaer G, Leite-Moreira A, **Borbély A**, Édes I, Handoko M, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser A, Brutsaert D: How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart. J.* 28 (20), 2539-2550, 2007. IF: 7,924 Független citáció: 2138
4. Papp Z, **Borbély A**, Édes I: Változások a szív kontraktilis fehérjéinek szerkezetében diasztolés szívelégtelenség során. *LAM.* 17 (6-7), 441-445, 2007. IF: - Független citáció: -
5. Édes I, Czuriga D, Csányi G, Chlopicki S, Recchia F, **Borbély A**, Galajda Z, Édes I, Velden J, Stienen G, Papp Z: Rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine, and porcine cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293 (1), R20-R29, 2007. IF: 3,661 Független citáció: 33
6. Heerebeek L, Hamdani N, Handoko M, Falcao-Pires I, Musters R, Kupreishvili K, Ijsselmuiden A, Schalkwijk C, Bronzwaer J, Diamant M, **Borbély A**, Velden J, Stienen G, Laarman G, Niessen H, Paulus W: Response to Letter Regarding Article, "Diastolic Stiffness of the Failing Diabetic Heart: Importance of Fibrosis, Advanced Glycation End Products, and Myocyte Resting Tension". *Circulation.* 117 e484, 2008. IF: - Független citáció: 37
7. Hertelendi Z, Tóth A, **Borbély A**, Galajda Z, Velden J, Stienen G, Édes I, Papp Z: Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca^{2+} sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid. Redox Signal.* 10 (7), 1175-1184, 2008. IF: 6,19 Független citáció: 40
8. Hamdani N, de Waard M, Messer A, Boontje N, Kooij V, Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Dos Remedios C, Duncker D, **Borbély A**, Papp Z, Paulus W, Stienen G, Marston S, Velden J: Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 29 (6-8), 189-201, 2008. IF: 2 Független citáció: 47
9. Hertelendi Z, Tóth A, **Borbély A**, Galajda Z, Édes I, Tótsaki Á, Papp Z: The peroxynitrite evoked contractile depression can be partially reversed by antioxidants in human cardiomyocytes. *J. Cell. Mol. Med.* 13 (8B), 2200-2209, 2009. IF: 5,228 Független citáció: 3
10. **Borbély A**, Heerebeek L, Paulus W: Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circ. Res.* 104 (1), 12-14, 2009. IF: 9,214 Független citáció: 27
11. Molnár A, **Borbély A**, Czuriga D, Mányiné Siket I, Szilágyi S, Hertelendi Z, Pásztorné Tóth E, Balogh Á, Galajda Z, Szerafin T, Jaquet K, Papp Z, Édes I, Tóth A: Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 284 (2), 1031-1039, 2009. IF: 5,328 Független citáció: 10

12. **Borbély A**, Papp Z, Édes I, Paulus W: Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacol Rep.* 61 (1), 139-145, 2009. IF: 2,086 Független citáció: 46
13. Hamdani N, Paulus W, Heerebeek L, **Borbély A**, Boontje N, Zuidwijk M, Bronzwaer J, Simonides W, Niessen H, Stienen G, Velden J: Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction. *Eur. Heart J.* 30 (15), 1863-1872, 2009. IF: 9,8 Független citáció: 36
14. **Borbély A**, Édes I, Papp Z: Cukorbetegség és szívizom összehúzódási zavar: pathogenezis és kezelési lehetőségek az új alapkutatási eredmények tükrében. *Diabetol. Hung.* 19 (1), 7-16, 2010. IF: - Független citáció: -
15. Czuriga I, Czuriga D, **Borbély A**: Diastolés szívelégtelenség = Diastolic heart failure. *Orvoscépzés.* 85 (1), 49-54, 2010. IF: - Független citáció: -
16. Hamdani N, **Borbély A**, Veenstra S, Kooij V, Vrydag W, Zaremba R, Remedios C, Niessen H, Michel M, Paulus W, Stienen G, Velden J: More severe cellular phenotype in human idiopathic dilated cardiomyopathy compared to ischemic heart disease. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 31 (4), 289-301, 2010. IF: 1,933 Független citáció: 16
17. Falcao-Pires I, Hamdani N, **Borbély A**, Gavina C, Schalkwijk C, Velden J, Heerebeek L, Stienen G, Niessen H, Leite-Moreira A, Paulus W: Diabetes Mellitus Worsens Diastolic Left Ventricular Dysfunction in Aortic Stenosis Through Altered Myocardial Structure and Cardiomyocyte Stiffness. *Circulation.* 124 (10), 1151-1159, 2011. IF: 14,739 Független citáció: 148
18. Czuriga D, Paulus W, Czuriga I, Édes I, Papp Z, **Borbély A**: Cellular mechanisms for diastolic dysfunction in the human heart. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (13), 2532-2538, 2012. IF: 2,69 Független citáció: 14
19. Papp Z, Czuriga D, Balogh L, Balogh Á, **Borbély A**: How cardiomyocytes make the heart old. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (13), 2515-2521, 2012. IF: 2,69 Független citáció: 9
20. **Borbély A**, Dimitrow P: Editorial: cardiovascular and metabolic diseases: from mechanisms to novel therapeutical implications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (13), 2433-2434, 2012. IF: - Független citáció: -
21. Czuriga I, **Borbély A**, Czuriga D, Papp Z, Édes I: Szívelégtelenség megőrzött ejekciós frakcióval (diasztolés szívelégtelenség). *Orvosi Hetilap.* 153 (51), 2030-2040, 2012. IF: - Független citáció: 4
22. **Borbély A**, Édes I: Apixaban: a legújabb orális antikoaguláns Magyarországon pitvarfibrillációban szenvedő betegek kezelésére. *LAM.* 23 181-187, 2013. IF: - Független citáció: -
23. Papp Z, Velden J, **Borbély A**, Édes I, Stienen G: Altered myocardial force generation in end-stage human heart failure. *ESC Heart Failure.* 1 (2), 160-165, 2014. IF: - Független citáció: 7
24. Papp Z, **Borbély A**, Walter J: CrossTalk opposing view: the late sodium current is not an important player in the development of diastolic heart failure (heart failure with a preserved ejection fraction). *J. Physiol.-London.* 592 (3), 415-417, 2014. IF: - Független citáció: 5
25. Papp Z, **Borbély A**, Paulus W: Rebuttal from Zoltán Papp, Attila Borbély and Walter J. Paulus. *J. Physiol.-London.* 592 (3), 421-422, 2014. IF: - Független citáció: -
26. Balog M, Miljanović M, Blažetić S, Labak I, Ivić V, Viljetić B, **Borbély A**, Papp Z, Blazeković R, Vári S, Fagyas M, Heffer M: Sex-specific chronic stress response at the level of adrenal gland modifies sexual hormone and leptin receptors. *Croat. Med. J.* 56 (2), 104-113, 2015. IF: 1,483 Független citáció: 11
27. Úri K, Fagyas M, Kertész A, **Borbély A**, Jenei C, Bene O, Csanádi Z, Paulus W, Édes I, Papp Z, Tóth A, Lizanecz E: Circulating ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development. *J. Renin-Angio-Aldo S.* 17 (4), 1-11, 2016. IF: 1,396 Független citáció: 86

28. Pitha J, Králová L, Hubáček J, Sekerková A, Lánská V, Adámková V, Dorobantu M, Nicolescu R, Steiner R, Ivić V, **Borbély A**, Papp Z, Vári S: Smoking impairs and circulating stem cells favour the protective effect of the T allele of the connexin37 gene in ischemic heart disease: a multinational study. *Atherosclerosis*. 244 73-78, 2016. IF: 4,239 Független citáció: 5
29. Nyolczas N, Heltai K, **Borbély A**, Habon T, Járαι Z, Sziliczei E, Stadler P, Faludi R, Herczeg B, Papp E, Lakatos F, Nagy K, Katona A, Kovács I, Tomcsányi J, Nagy A, Sepp R: Magyar Szívelégtelenség Regiszter 2015?2016:Kezdeti eredmények. *Orv. hetil.* 158 (3), 94-100, 2017. IF: 0,322 Független citáció: 6
30. Pözl G, Altenberger J, Baholli L, Beltrán P, **Borbély A**, Comin-Colet J, Delgado J, Fedele F, Fontana A, Fruhwald F, Giamouzis G, Giannakoulas G, Garcia-González M, Gustafsson F, Kaikkonen K, Kivikko M, Kubica J, von Lewinski D, Löfman I, Malfatto G, Manito N, Martínez-Sellés M, Masip J, Merkely B, Morandi F, Mølgaard H, Oliva F, Pantev E, Papp Z, Perna G, Pfister R, Piazza V, Bover R, Rangel-Sousa D, Recio-Mayoral A, Reinecke A, Rieth A, Sarapohja T, Schmidt G, Seidel M, Störk S, Vrtovec B, Wikström G, Yerly P, Pollesello P: Repetitive use of levosimendan in advanced heart failure: need for stronger evidence in a field in dire need of a useful therapy. *Int. J. Cardiol.* 243 389-395, 2017. IF: 4,034 Független citáció: 15
31. **Borbély A**, Clemens M, Jenei C, Daragó A, Erdei N, Hertelendi Z, Fülöp T, Csanádi Z, Édes I: Szívtranszplantáció vagy abláció?: tachycardia-indukálta cardiomyopathia. *Cardiol. Hung.* 47 125-131, 2017. IF: - Független citáció: -
32. Nagy V, **Borbély A**, Kohút S, Mohay S, Eke N, Andrassy G, Borbola J, Édes I: Koenzim-Q10: evidenciákon alapuló alkalmazások Magyarországon. *Cardiol. Hung.* 48 211-218, 2018. IF: - Független citáció: -
33. Szegedi A, P. Szabó R, Pethő Á, Kertész A, Maros T, **Borbély A**, Édes I, Csanádi Z: Peritoneális dialízis, mint "bridge" terápia a szívtranszplantációig. *Cardiol. Hung.* 48 184-186, 2018. IF: - Független citáció: 1
34. Oliva F, Comin-Colet J, Fedele F, Fruhwald F, Gustafsson F, Kivikko M, **Borbély A**, Pözl G, Tschöpe C: Repetitive levosimendan treatment in the management of advanced heart failure. *Eur. Heart J. Suppl.* 20 (suppl.), I11-I20, 2018. IF: 1,321 Független citáció: 17
35. Kurczina A, Kracsó B, Balogh L, Rác Á, Vágó H, Clemens M, Csanádi Z, **Borbély A**: Non-compact cardiomyopathia, avagy a baljós trabekuláltság. *Cardiol. Hung.* 49 (2), 65-70, 2019. IF: - Független citáció: -
36. Ráduly A, Kothalawala E, **Borbély A**: Előrelépés a szívelégtelenség kezelésében. *Háziorv. Továbbk. Szle.* 25 797-802, 2020. IF: - Független citáció: -
37. Sárkány F, Ráduly A, **Borbély A**: Az intravénás vaspótlás jelentősége krónikus szisztolés szívelégtelenségben. *Orvostovábbk. szle.* 28 (3), 41-46, 2021. IF: - Független citáció: -
38. Dauw J, Lelonek M, Zegri-Reiriz I, Paredes-Paucar C, Zara C, George V, Cobo-Marcos M, Knappe D, Shchekochikhin D, Lekhakul A, Klincheva M, Frea S, Miró Ò, Barker D, **Borbély A**, Nasr S, Doghmi N, Espriella R, Singh J, Bovololo V, Fialho I, Ross N, Heuvel M, Benkouar R, Findeisen H, Alhaddad I, Al Balbissi K, Barge-Caballero G, Ghazi A, Bruckers L, Martens P, Mullens W: Rationale and Design of the Efficacy of a Standardized Diuretic Protocol in Acute Heart Failure Study. *ESC Heart Failure*. 8 (6), 4685-4692, 2021. IF: 3,612 Független citáció: 17
39. Jenei C, Kádár R, Balogh L, **Borbély A**, Györy F, Péter A, Daragó A, Csanádi Z: Role of 3D echocardiography-determined atrial volumes in distinguishing between pre-capillary and post-capillary pulmonary hypertension. *ESC Heart Failure*. 8 (5), 3975-3983, 2021. IF: 3,612 Független citáció: 5

40. Ráduly A, Tóth A, Papp Z, **Borbély A**: Új lehetőség a szisztolés szívelégtelenség (HFrEF) kezelésében: omecamtiv-mecarbil. *Cardiol. Hung.* 51 (2), 118-124, 2021. IF: - Független citáció: 1
41. Sepp R, Hategan L, Csányi B, Borbás J, Tringer A, Pálincás E, Nagy V, Takács H, Latinovics D, Nyolczas N, Pálincás A, Faludi R, Rábai M, Szabó G, Czuriga D, Balogh L, Halmosi R, **Borbély A**, Habon T, Hegedűs Z, Nagy I: The Genetic Architecture of Hypertrophic Cardiomyopathy in Hungary: analysis of 242 Patients with a Panel of 98 enes. *Diagnostics.* 12 (5), 1-12, 2022. IF: 3,6 Független citáció: 7
42. Fagyas M, Nagy B, Ráduly A, Mányiné Siket I, Mártha L, Erdősi G, Sipka S, Enyedi E, Szabó A, Pólik Z, Kappelmayer J, Papp Z, **Borbély A**, Szabó T, Balla J, Balla G, Bai P, Bácsi A, Tóth A: The majority of severe COVID-19 patients develop anti-cardiac autoantibodies. *GeroScience.* 44 2347-2360, 2022. IF: 5,6 Független citáció: 20
43. Ráduly A, Sárkány F, Kovács M, Juhász B, Horváth B, Szentandrassy N, Nánási P, Édes I, Csanádi Z, Tóth A, Papp Z, Priksz D, **Borbély A**: A kardiális miozinaktivátorok klinikai alkalmazhatósága a preklinikai vizsgálatok tükrében. *Cardiol. Hung.* 53 (5), 476-483, 2023. IF: - Független citáció: -
44. Papp Z, Sárkány F, Ráduly A, Pásztor D, Máté B, Tóth A, **Borbély A**: Mi az eredményesebb stratégia: a miozin aktivációja vagy gátlása? *Cardiol. Hung.* 53 (4), 331-336, 2023. IF: - Független citáció: 1
45. Papp Z, Pollesello P, **Borbély A**: Recognizing early signs in the translational phase is essential for drug development in cardiovascular medicine. *ESC Heart Failure.* 10 (4), 2147-2149, 2023. IF: - Független citáció: -
46. Szabó K, Tóth A, Nagy L, Rácz V, Pólik Z, Hódosi K, Nagy A, Barta J, **Borbély A**, Csanádi Z: Add-on Sacubitril/Valsartan Therapy Induces Left Ventricular Remodeling in Non-responders to Cardiac Resynchronization Therapy to a Similar Extent as in Heart Failure Patients Without Resynchronization. *Cardiol Ther.* 13 (1), 149-161, 2024. IF: 3 Független citáció: -
47. Tóth E, Fagyas M, Nagy B, Mányiné Siket I, Szőke B, Mártha L, Mahdi M, Erdősi G, Pólik Z, Kappelmayer J, Papp Z, **Borbély A**, Szabó T, Balla J, Balla G, Bácsi A, Szekanecz Z, Bai P, Tóth A: Distinct subsets of anti-pulmonary autoantibodies correlate with disease severity and survival in severe COVID-19 patients. *GeroScience.* 46 (2), 1561-1574, 2024. IF: 5,3 Független citáció: -
48. Solymossi B, Muk B, Sepp R, Habon T, **Borbély A**, Heltai K, Majoros Z, Járari Z, Vágány D, Szatmári Á, Sziliczei E, Bánfi-Bacsárdi F, Nyolczas N: Incidence and predictors of heart failure with improved ejection fraction category in a HFrEF patient population. *ESC Heart Failure.* 11 (2), 783-794, 2024. IF: 3,2 (2023) Független citáció: 4
49. Dauw J, Charaya K, Lelonek M, Zegri-Reiriz I, Nasr S, Paredes-Paucar C, **Borbély A**, Erdal F, Benkouar R, Cobo-Marcos M, Barge-Caballero G, George V, Zara C, Ross N, Barker D, Lekhakul A, Frea S, Ghazi A, Knappe D, Doghmi N, Klincheva M, Fialho I, Bovolo V, Findeisen H, Alhaddad I, Galluzzo A, Espriella R, Tabbalat R, Miró Ò, Singh J, Nijst P, Dupont M, Martens P, Mullens W: Protocolized Natriuresis-Guided Decongestion Improves Diuretic Response: the Multicenter ENACT-HF Study. *Circ: Heart Failure.* 17 1-10, 2024. IF: 7,8 (2024) Független citáció: 29
50. Ráduly A, Sárkány F, Kurczina A, Csanádi Z, Papp Z, **Borbély A**: Az intravénás vaspótlás jelentősége csökkent ejekciós frakciójú szívelégtelenségben. *Cardiol. Hung.* 54, 200-205, 2024. IF: - Független citáció: -
51. Szabó K, Tóth A, **Borbély A**, Csanádi Z, Nagy L: A kardiális reszinkronizációs kezelésre adott válasz újraértelmezése és a terápiás hatékonyság javításának lehetősége *Cardiol. Hung.* 54, 227-233, 2024. IF: - Független citáció: -

52. Ráduly A, Nagy L, Bódi B, Papp Z, **Borbély A**: Biomarkers in heart failure: Traditional and emerging indicators for prognosis. *ESC Heart Failure*. doi: 10.1002/ehf2.15168. Online ahead of print. (Editorial) (2025)

A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények impakt faktora: 129,616 (CIT: 2921)

A PhD fokozat megszerzését követő összes közlemény impakt faktora: 189,354 (CIT: 4261)

8.3. A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények

1. Papp Z, Velden J, **Borbély A**, Édes I, Stienen G: Effects of Ca²⁺-sensitizers in permeabilized cardiac myocytes from donor and end-stage failing human hearts. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 25 (3), 219-224, 2004. IF: 1,721 Független citáció: 9
2. **Borbély A**, Tóth A, Édes I, Virág L, Papp GJ, Varró A, Paulus WJ, van der Velden J, Stienen GJM, Papp Z: Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc. Res.* 67 (2), 225-233, 2005. IF: 5,283 Független citáció: 68
3. **Borbély A**, Velden J, Papp Z, Bronzwaer J, Édes I, Stienen G, Paulus W: Cardiomyocyte Stiffness in Diastolic Heart Failure. *Circulation.* 111 (6), 774-781, 2005. IF: 11,632 Független citáció: 409
4. Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H, Bak I, Tósaki Á, **Borbély A**, Édes I, Papp Z: Two inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46 (3), 369-376, 2005. IF: 1,313 Független citáció: 32

A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények impakt faktora: 19,949 (CIT: 518)

Valamennyi közlemény összesített impakt faktora: 209,303 (CIT: 4779)

(A hivatkozások (CIT) mindig független hivatkozásokat jelölnek.)

8.4. Könyvfejezetek

1. **Borbély A**, Habon T, Édes I: Idült pangásos szívelégtelenség In: Tulassay, Z (szerk.) *Klinikai belgyógyászat Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó* (2017) 839 pp. 159-163
2. **Borbély A**, Barta J, Kertész A és mtsai: III.2. Szívelégtelenség gyógyszeres kezelése In: Csanádi, Z és Czuriga, D (szerk.) *A szív és a verőerek betegségei, Debreceni Egyetem Kiadó* (2019) pp. 129-143
3. Barta J, **Borbély A**, Hertelendi Z, Gergely Sz: III.3. Szívizombetegségek In: Csanádi, Z és Czuriga, D (szerk.) *A szív és a verőerek betegségei, Debreceni Egyetem Kiadó* (2019) pp. 143-151
4. **A Borbély**, J Barta, A Kertész et al: III.2. Pharmacotherapy in heart failure In: *Cardiovascular Diseases Edited by Z Csanádi and D Czuriga, Debreceni Egyetem Kiadó* (2020) pp. 130-145
5. J Barta, **A Borbély**, Z Hertelendi, Sz Gergely. III.3 Cardiomyopathies In: *Cardiovascular Diseases Edited by Z Csanádi and D Czuriga, Debreceni Egyetem Kiadó* (2020) pp.145-153

6. **Borbély A**, Nyolczas N: Meghatározása és formái In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 519-519
7. **Borbély A**, Nyolczas N: Gyakoriság In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 519-520
8. **Borbély A**, Nyolczas N: Kóreredet In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 520-522
9. **Borbély A**, Nyolczas N: Kórlefolyás In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 525-526
10. **Borbély A**, Nyolczas N: Kórjóslat In: Tulassay, Zs (szerk.) A belgyógyászat alapjai 1-2. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó (2022) pp. 532-533

9. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Borbély Attila tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása (2025.02.21)
MTA V. Orvosi Tudományok Osztálya

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk²	<u>59</u>			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		<u>32</u>	<u>4451</u>	<u>5119</u>
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		<u>8</u>	<u>4</u>	<u>4</u>
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		<u>3</u>	<u>61</u>	<u>87</u>
összefoglaló közlemény		<u>13</u>	<u>122</u>	<u>154</u>
rövid közlemény		<u>3</u>	<u>65</u>	<u>84</u>
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	<u>9</u>			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvrészlet		<u>9</u>	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		<u>9</u>	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)		<u>59</u>	<u>4703</u>	<u>5448</u>
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	<u>68</u>		<u>4703</u>	<u>5448</u>
V. További tudományos művek	<u>5</u>			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratban megjelent teljes folyóiratcikket is		<u>3</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		<u>2</u>	0	<u>1</u>
Olthalmak (szabadalmak)		0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	<u>1</u>		0	<u>1</u>
Összes hivatkozás¹			<u>4708</u>	<u>5456</u>
Hirsch index⁶	<u>23</u>			
g index⁶	<u>49</u>			
Speciális tudománymetriai adatok	Száma		Összes hivatkozás	
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	<u>8</u>		<u>935</u>	
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	<u>15</u>		<u>65</u>	
A tudományos fokozat (PhD 2005) elnyerése utáni teljes tudományos folyóiratcikkek száma	<u>55</u>		<u>4838</u>	
Az utolsó 10 év (2015-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	<u>29</u>		<u>304</u>	
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	<u>2343</u>		42,94%	
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben			<u>112</u>	
Jelentés, guideline	0		0	
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0		0	

Megjegyzések:

1 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

2 lektorált, tudományos folyóiratban

3 a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

4 konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

5 nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

6 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója

7 közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Édes Istvánnak és Prof. Dr. Csanádi Zoltánnak a Kardiológiai Intézet korábbi és jelenlegi vezetőjének a lehetőséget, hogy már orvostanhallgatóként bekapcsolódhattam az intézetben folyó kutatómunkába. Nagyon köszönöm mindazt a kivételes és önzetlen támogatást, mellyel a klinikai munka mellett is lehetővé tették kutatásaim folytatását.

Mérhetetlen hálával és köszönettel tartozom PhD témavezetőmnek, Prof. Dr. Papp Zoltánnak, a Klinikai Fiziológiai Tanszék vezetőjének, aki bizalmával, folyamatos, töretlen biztatásával és emberi példamutatásával kutatómunkámhoz az ösztönzést és a kiemelkedő színvonalú szakmai háttérrel biztosította, és akinek támogatását és barátságát a mai napig élvezhetem. Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Tóth Attilának jószándékú iránymutatásáért, türelméért és a kísérletek során nyújtott hasznos gyakorlati tanácsaiért. Köszönettel tartozom a Klinikai Fiziológiai Tanszék minden jelenlegi és korábbi munkatársának, legfőképpen PhD hallgatóimnak, Kalász Juditnak és Dr. Ráduly Arnold Péternek kitartó munkájukért, önzetlen segítségükért, mellyel nagymértékben hozzájárultak a fent ismertetett kutatási eredmények létrejöttéhez. Hálásan köszönöm Pásztorné Tóth Enikő, Mányiné Siket Ivetta, Pólik Zsófia és Dr. Fagyas Miklós segítségét a kísérletek elvégzésében.

Az amszterdami VU medical center Élettani Intézetében PhD hallgatóként, majd vendégkutatóként töltött közel két év alatt Prof. Dr. Walter J. Paulus, Prof. Dr. Ger J.M. Stienen és Prof. Dr. Jolanda van der Velden szakmai irányítása alatt dolgozhattam. Bizalmuk, segítőkészségük, emberségük, gyakorlatiasságuk, tisztánlátásuk sokszor volt segítségemre, melyért hálás köszönettel tartozom. Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Nazha Hamdaninak, Loek van Heerebeeknek és Ines Falcao-Piresnek munkámhoz nyújtott segítségüket.

Hálásan köszönöm kollegáimnak, a Kardiológiai Intézet valamennyi munkatársának a munkámhoz nyújtott szakmai és gyakorlati támogatást.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családom, szüleim, gyermekeim és legfőképpen Feleségem segítségét, támogatását, megértését, szeretetét, végtelen türelmét, a nyugodt családi háttér biztosítását, mely szavakkal nehezen kifejezhető és nélkülözhetetlen volt ezen munka létrejöttéhez.

FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló 8 legfontosabbnak ítélt közlemény

(A közlemények az értekezésben felhasznált sorrendnek megfelelően szerepelnek.)

Myocardial Structure and Function Differ in Systolic and Diastolic Heart Failure

Loek van Heerebeek, MD; Attila Borbély, MD; Hans W.M. Niessen, MD, PhD;
 Jean G.F. Bronzwaer, MD, PhD; Jolanda van der Velden, PhD; Ger J.M. Stienen, PhD;
 Wolfgang A. Linke, PhD; Gerrit J. Laarman, MD, PhD; Walter J. Paulus, MD, PhD

Background—To support the clinical distinction between systolic heart failure (SHF) and diastolic heart failure (DHF), left ventricular (LV) myocardial structure and function were compared in LV endomyocardial biopsy samples of patients with systolic and diastolic heart failure.

Methods and Results—Patients hospitalized for worsening heart failure were classified as having SHF ($n=22$; LV ejection fraction (EF) $34\pm2\%$) or DHF ($n=22$; LVEF $62\pm2\%$). No patient had coronary artery disease or biopsy evidence of infiltrative or inflammatory myocardial disease. More DHF patients had a history of arterial hypertension and were obese. Biopsy samples were analyzed with histomorphometry and electron microscopy. Single cardiomyocytes were isolated from the samples, stretched to a sarcomere length of $2.2\ \mu\text{m}$ to measure passive force (F_{passive}), and activated with calcium-containing solutions to measure total force. Cardiomyocyte diameter was higher in DHF (20.3 ± 0.6 versus $15.1\pm0.4\ \mu\text{m}$, $P<0.001$), but collagen volume fraction was equally elevated. Myofibrillar density was lower in SHF ($36\pm2\%$ versus $46\pm2\%$, $P<0.001$). Cardiomyocytes of DHF patients had higher F_{passive} (7.1 ± 0.6 versus $5.3\pm0.3\ \text{kN/m}^2$; $P<0.01$), but their total force was comparable. After administration of protein kinase A to the cardiomyocytes, the drop in F_{passive} was larger ($P<0.01$) in DHF than in SHF.

Conclusions—LV myocardial structure and function differ in SHF and DHF because of distinct cardiomyocyte abnormalities. These findings support the clinical separation of heart failure patients into SHF and DHF phenotypes. (*Circulation*. 2006;113:1966-1973.)

Key Words: myocardium ■ heart failure ■ diastole ■ hypertrophy ■ collagen

Despite an increasing awareness that heart failure (HF) can occur in the presence of a normal left ventricular (LV) ejection fraction (EF),^{1,2} it remains uncertain whether HF with normal LVEF and with reduced LVEF are indeed distinct HF phenotypes.^{3,4} Although global LV systolic performance is preserved,⁵ HF patients with normal LVEF have reduced LV long-axis shortening,⁶ depressed tissue Doppler myocardial systolic velocity,⁷ and deranged ventriculoarterial coupling.⁸ Furthermore, HF with normal LVEF is frequently referred to as diastolic heart failure (DHF) because of the presence of diastolic LV dysfunction evident from slow LV relaxation and high LV stiffness.⁹ Diastolic LV dysfunction, however, is not unique to patients with DHF but also occurs in HF patients with reduced LVEF, or systolic heart failure (SHF), in whom it correlates better with symptoms than LVEF.¹⁰

Because hemodynamic features apparently fail to identify SHF and DHF as distinct HF phenotypes, a comparative

Editorial p 1922 Clinical Perspective p 1973

analysis of the structure and function of LV myocardium procured from both types of HF was proposed recently.^{11,12} The present study performed this analysis by investigating LV endomyocardial biopsy samples from SHF and DHF patients. Histological structure and contractile function of the biopsy samples were compared with histomorphometry, transmission electron microscopy, and force measurements of single cardiomyocytes.

Methods

Patients

Fifty-eight patients hospitalized for worsening HF were referred for cardiac catheterization and LV endomyocardial biopsy procurement because of suspicion of infiltrative or inflammatory myocardial disease. Coronary angiography showed significant ($>50\%$) coronary stenoses in 10 patients, and histological analysis of the biopsy

Received September 7, 2005; revision received January 31, 2006; accepted February 9, 2006.

From the Department of Physiology (L.v.H., A.B., J.v.d.V., G.J.M.S., W.J.P.), Pathology (H.W.M.N.), and Cardiology (J.G.F.B.), Institute for Cardiovascular Research, VU Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; Physiology and Biophysics Unit (W.A.L.), University of Muenster, Muenster, Germany; and the Department of Cardiology (G.J.L.), O.L.V.G., Amsterdam, the Netherlands.

The online-only Data Supplement can be found with this article at <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/CIRCULATIONAHA.105.587519/DC1>.

Correspondence to Professor Dr Walter J. Paulus, MD, PhD, Laboratory of Physiology, VU Medical Center, Van der Boechorststraat 7, 1081 BT Amsterdam, The Netherlands. E-mail wj.paulus@vumc.nl

© 2006 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.587519

Clinical, Hemodynamic, Echocardiographic, and Combined Hemodynamic-Echocardiographic Characteristics of SHF and DHF Patients

	SHF (n=22)	DHF (n=22)	P, SHF vs DHF
Age, y	59.1±3.9	67.8±2.2	0.058
Sex (M/F)	15/7	13/9	0.536
Hypertension	3/22	16/22	<0.001
Diabetes mellitus	5/22	11/22	0.063
Obesity	0/22	10/22	<0.001
Medication			
ACEI	17/22	15/22	0.503
β-Blocker	12/22	10/22	0.551
Diuretic	19/22	18/22	0.684
CCB	2/22	7/22	0.065
ARB	1/22	4/22	0.159
Digoxin	7/22	4/22	0.302
Amiodarone	2/22	5/22	0.222
Statin	4/22	10/22	0.055
Nitrate	1/22	2/22	0.554
Hemodynamics			
Heart rate, bpm	82±4	74±2	0.095
LVPSP, mm Hg (Con: 120±6)	122±5	172±7*	<0.001
LVEDP, mm Hg (Con: 10±1)	22±2*	26±2*	0.103
LVEDVI _{angio} , mL/m ² (Con: 72±4)	120±7*	83±4	<0.001
LVEF, % (Con: 70±3%)	34±2*	62±2	<0.001
CI, L · min ⁻¹ · m ⁻² (Con: 3.1±0.2)	2.2±0.1*	2.7±0.1	<0.01
LV dP/dt _{max} , mm Hg/s (Con: 1993±88)	954±109*	1517±75*	<0.001
LV dP/dt _{min} , mm Hg/s (Con: 2320±149)	1076±124*	1698±96*	<0.001
τ, ms (Con: 38±2)	65±7*	68±5*	0.756
Echocardiography			
LVEDVI _{echo} , mL/m ² (Con: 65±4)	127±9*	82±6	<0.001
E, m/s (Con: 0.65±0.03)	0.94±0.1*	0.76±0.07	0.177
A, m/s (Con: 0.61±0.04)	0.78±0.09	0.86±0.08*	0.515
E/A ratio (Con: 1.13±0.05)	1.43±0.21*	1.02±0.14	0.110
Deceleration time, ms (Con: 219±7)	161±9*	226±12	<0.001
LVWT, mm (Con: 8.0±0.5)	9.0±0.3	11.4±0.3*	<0.001
Hemodynamics and echocardiography			
LVMI, g/m ² (Con: 92±3)	124±7*	141±5*	0.059
LVMI/LVEDVI ratio (Con: 1.27±0.04)	1.09±0.1	1.74±0.1*	<0.001
Myocardial stiffness modulus, kN/m ² (Con: 2.2±0.3)	3.09±0.36*	5.95±0.48*	<0.001

M indicates male; F, female; ACEI, ACE inhibitors; CCB, calcium channel blockers; ARB, angiotensin II receptor blockers; HR, heart rate; and Con, control population.

*P<0.05 vs control population.

samples revealed myocardial infiltration or inflammation in 4 patients. These 14 patients were excluded from the study.

The remaining 44 patients were classified as SHF (n=22) if LVEF was <45% and as DHF (n=22) if they satisfied the “European Study Group on DHF” criteria, ie, signs and symptoms of congestive HF, LVEF >45%, and an LV end-diastolic pressure (LVEDP) >16 mm Hg.¹³ All DHF patients also satisfied criteria for definite DHF.¹⁴ Hemodynamic data were derived from LV angiograms, high-fidelity LV pressure catheters, and thermodilution cardiac outputs. They included LV peak systolic pressure (LVPSP), LVEDP, LV end-diastolic volume index (LVEDVI_{angio}), LVEF, cardiac index

(CI), LV dP/dt_{max}, LV dP/dt_{min}, and the time constant of LV relaxation (τ; Table). Doppler echocardiographic data (Table) included LVEDVI_{echo}, mitral early velocity (E), mitral atrial velocity (A), E/A ratio, deceleration time, and LV wall thickness. LVEDVI_{echo} correlated with LVEDVI_{angio} (r=0.44; P=0.009). Hemodynamic and echocardiographic data were combined for LV mass index (LVMI), LVMI/LVEDVI ratio, and myocardial stiffness modulus (Table). The Table compares hemodynamic, echocardiographic, and combined hemodynamic-echocardiographic data of SHF patients with DHF patients and of SHF or DHF patients with normal values derived from an age- and gender-matched control population. Data

were indexed for body surface area. In obese patients, indexation of LV mass for body surface area underestimates LV hypertrophy.¹⁵ Because obesity was prominent in DHF, the reported LVMI value in DHF probably underestimated the degree of LV hypertrophy. The local ethics committee approved the study protocol. Written informed consent was obtained from all patients, and there were no complications related to catheterization or biopsy procurement.

Quantitative Histomorphometry: Light Microscopy

Histomorphological analysis of biopsy samples was performed on elastica van Gieson and hematoxylin-and-eosin-stained, 4- μ m-thick sections of tissue placed in 5% formalin. Images of these sections were acquired with a projection microscope ($\times 50$). Subsequent image analysis with Slidebook 4.0 software (3I, Denver, Colo) was performed to determine cardiomyocyte diameter (MyD; μ m) and extent of reactive interstitial fibrosis, which was expressed as collagen volume fraction (CVF; %). Areas of reparative and perivascular fibrosis were excluded. As previously validated,^{16,17} MyD was determined perpendicularly to the outer contour of the cell membrane at the nucleus level in 15 representative myocytes of the section, and CVF was calculated as the sum of all connective tissue areas divided by the sum of all connective tissue and muscle areas averaged over 4 to 6 representative fields of the section. In our laboratory, normal values of MyD and CVF for LV endomyocardial biopsy material are 13.1 ± 0.3 μ m and $5.4 \pm 2.2\%$, respectively.

Quantitative Histomorphometry: Electron Microscopy

Endomyocardial biopsy samples were fixed in 2% (vol/vol) glutaraldehyde for 30 minutes and 1.5% (wt/vol) osmium tetroxide for 10 minutes, dehydrated with acetone, and embedded in Epon812. Ultrathin sections were collected on 300-mesh Formavar-coated nickel grids. The sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and were examined in a Jeol-1200EX electron microscope. Quantitative analysis was performed with the abovementioned automated image analyzer. Cardiomyocyte myofibrillar density, number of mitochondria, and capillary basement membrane thickness were determined. Myofibrillar density was calculated as the sum of myofibrillar areas related to total cellular area in 4 to 6 representative myocytes, and capillary basement membrane thickness was averaged over 6 measurements.

Force Measurements in Isolated Cardiomyocytes

Force measurements were performed in single, mechanically isolated cardiomyocytes as described previously.^{17,18} Biopsy samples (5 mg wet weight) were defrosted in relaxing solution (in mmol/L: free Mg 1, KCl 100, EGTA 2, Mg-ATP 4, and imidazole 10; pH 7.0), mechanically disrupted, and incubated for 5 minutes in relaxing solution supplemented with 0.2% Triton X-100 to remove all membrane structures. In addition, cells were washed twice in relaxing solution, after which single cardiomyocytes were attached with silicone adhesive between a force transducer and a piezoelectric motor. Sarcomere length of isolated cardiomyocytes was adjusted to 2.2 μ m, and myocytes were subjected to both relaxing and activating solutions. Their $pCa(-\log[Ca^{2+}])$ ranged from 9.0 (relaxing) to 4.5 (maximal activation), which was used to calculate maximal calcium-activated isometric force. All force values were normalized for myocyte cross-sectional area. Exposure to a series of solutions with intermediate pCa yielded the baseline force-pCa relation. On transfer of the myocyte from relaxing to activating solution, isometric force started to develop. Once a steady state force level was reached, the cell was shortened within 1 ms to 80% of its original length (slack test) to determine the baseline of the force transducer. The distance between the baseline and the steady force level is the total force (F_{total}). After 20 ms, the cell was restretched and returned to the relaxing solution, in which a second slack test of 10-seconds' duration was performed to determine passive force ($F_{passive}$). After the baseline force-pCa relation was established, myocytes were incubated for 40 minutes in relaxing solution supplemented with the catalytic subunit of protein kinase A (PKA, 100 U/mL; Sigma, batch 12K7495, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) and 6 mmol/L dithiothreitol

(MP Biochemicals, Eschwegh, Germany). Subsequently, a second force-pCa relation was determined. pCa_{50} , a measure of Ca^{2+} sensitivity of the contractile apparatus, corresponded to the $[Ca^{2+}]$ at which $F_{total} - F_{passive}$ reached 50% of the value observed at maximal activation. $F_{passive}$, F_{total} at maximal activation, and pCa_{50} of normal human cardiomyocytes are 3.5 ± 0.4 kN/m², 24.2 ± 3.1 kN/m², and 5.82 ± 0.02 , respectively.¹⁷

Titin Isoform Gel Electrophoresis

Titin isoform gel electrophoresis was performed on myocardial samples ($n=4$) of DHF patients and on myocardial samples ($n=5$) of SHF patients. Endomyocardial biopsy samples of either DHF or SHF patients needed to be pooled to provide sufficient tissue to perform the titin isoform gel electrophoresis. Because no previous study had determined titin isoforms on LV myocardial biopsy samples, the assay was validated by the repetition of titin isoform gel electrophoresis on LV myocardium of explanted dilated cardiomyopathic hearts ($n=3$), which have been studied previously.^{19,20} The N2BA/N2B titin isoform ratio observed in the explanted myocardium (39/61) was similar to previously reported values (42/58)¹⁹ and higher than previously reported values of normal human myocardium (30/70).²¹ Tissue samples were homogenized in 50 to 100 μ L of Tris-SDS buffer (pH 6.8) containing 8 μ g/mL leupeptin (Peptide-Institute, Osaka, Japan). Titin isoforms were separated on agarose-strengthened 2% SDS-polyacrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue. Gels were digitized, and the optical volume of protein bands was determined with Total Laboratory software (Phoretix, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).

Data Analysis

The time constant of LV relaxation (τ) was derived from an exponential curve fit with zero-asymptote pressure to the pressure data points of isovolumic LV relaxation. To assess LV myocardial material properties, a radial myocardial stiffness modulus was calculated.^{16,17,22} Agreement between myocardial stiffness modulus and diastolic LV stiffness indices derived from multiple beat analyses during caval occlusion was previously established in SHF patients.²²

Values are given as mean $\pm$ SEM. A 2-tailed test with a probability value <0.05 was considered significant. SHF and DHF groups were compared by an unpaired t test. Effects of CVF and PKA in SHF and DHF were analyzed respectively by 2-factor ANOVA and by 2-factor repeated-measures ANOVA. Bonferroni-adjusted t tests served as subsequent multicomparison tests. The significance for categorical data were determined by the χ^2 test. Relations between 2 continuous variables were assessed with linear regression analysis. Statistical analysis was performed with SPSS (version 9.0; SPSS Inc, Chicago, Ill).

The authors had full access to the data and take full responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Results

Clinical and Hemodynamic Characteristics

More DHF patients had a history of arterial hypertension and were obese (body mass index >30 kg/m²; Table). Use of medications was similar in both patient groups. LVPSP, LVEF, CI, LVdP/dt_{max}, LVdP/dt_{min}, deceleration time, and myocardial stiffness modulus were higher in DHF patients. In both SHF and DHF, LVMI was higher than in the control population. In SHF patients, the elevated LVMI was compensatory to preserve LV wall thickness at the larger LVEDVI (eccentric LV hypertrophy). In DHF patients, the elevated LVMI resulted in significant increases in LV wall thickness and in LVMI/LVEDVI ratio (concentric LV hypertrophy).

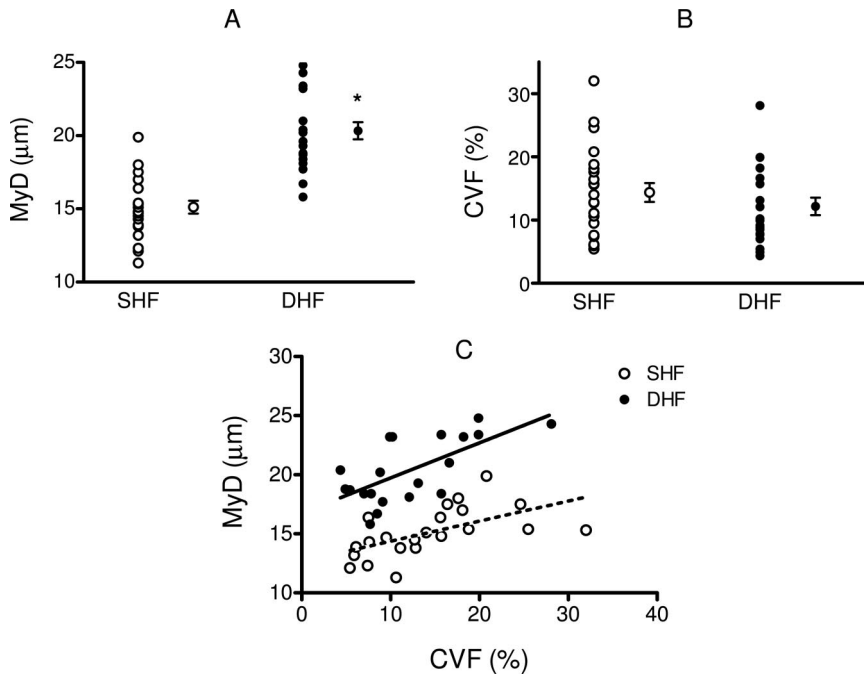


Figure 1. A, Individual values of MyD. MyD was larger in DHF ($P < 0.001$). B, Individual values of CVF. C, Relations between MyD and CVF. At corresponding levels of CVF, MyD was larger in DHF and increased similarly in SHF and DHF as fibrosis progressed.

Quantitative Histomorphometry of LV Myocardium

MyD was significantly larger in DHF ($20.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$) than in SHF patients ($15.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$; $P < 0.001$; Figure 1A). CVF was equally elevated in SHF ($14.4 \pm 1.5\%$) and DHF ($12.2 \pm 1.4\%$; Figure 1B). At each level of CVF, MyD was larger in DHF (Figure 1C). As CVF rose, MyD increased linearly in both SHF ($r = 0.58$, $P = 0.005$) and DHF ($r = 0.67$, $P = 0.001$; Figure 1C).

The relation between MyD and CVF is further illustrated in Figure 2, which used mean CVF to divide SHF and DHF patients into low ($< \text{mean}$) or high ($> \text{mean}$) CVF groups. Representative histological examples of SHF with low CVF, SHF with high CVF, DHF with low CVF, and DHF with high CVF are depicted in Figure 2A. In both DHF and SHF, the

largest MyD is observed at high CVF (Figure 2B). In both low and high CVF, the largest MyD is observed in DHF (Figure 2B). Myofibrillar density was significantly lower in SHF ($36 \pm 2\%$) than in DHF ($46 \pm 2\%$; $P < 0.001$; Figure 3A). Myofibrillar loss in SHF is illustrated in Figure 3B. The number of mitochondria per micrometer squared and capillary basement membrane thickness were comparable in SHF and DHF.

Force Measurements of Single Cardiomyocytes

When single cardiomyocytes were stretched to a sarcomere length of $2.2 \mu\text{m}$, F_{passive} was higher in DHF ($7.1 \pm 0.6 \text{ kN/m}^2$) than in SHF ($5.3 \pm 0.3 \text{ kN/m}^2$; $P < 0.01$; Figure 4A). F_{total} at

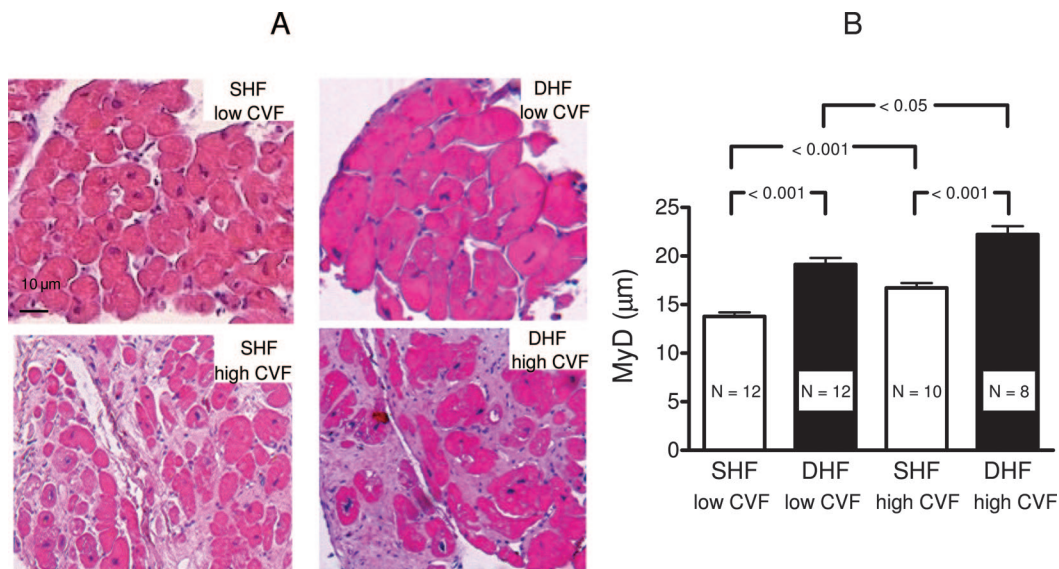


Figure 2. A, Histological images of LV myocardium. Irrespective of CVF, MyD was larger in DHF. B, In SHF and DHF, MyD was larger at high CVF. For low and high CVF, MyD was larger in DHF. Numbers in bars indicate number of individuals in each group.

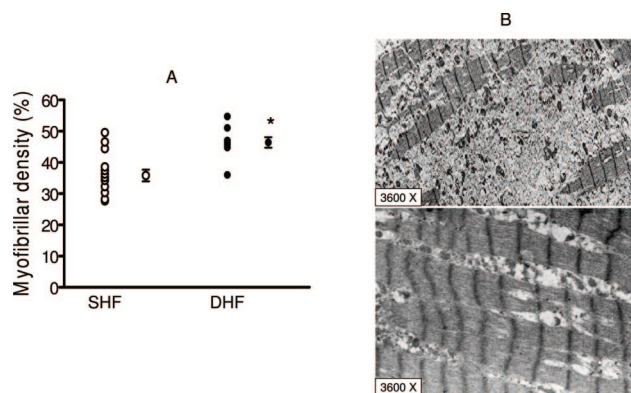


Figure 3. A, Individual values of myofibrillar density. Myofibrillar density was higher in DHF (* $P<0.001$). B, Electron microscopic images showing myofibrillar loss in SHF (top).

maximal activation was comparable in both patient groups (Figure 4B). pCa_{50} was higher in DHF (5.88 ± 0.01) than in SHF (5.84 ± 0.01 ; $P<0.05$; Figure 4C). Average force-pCa relations of pooled cardiomyocytes of SHF and DHF patient groups are shown in the Figure of the online-only Data Supplement (panel A). As previously reported,¹⁷ $F_{passive}$ cor-

related with myocardial stiffness modulus ($r=0.56$; $P=0.02$; Figure 4D) and with LVEDP ($r=0.52$, $P=0.001$) in DHF patients. These correlations were absent in SHF. After PKA treatment, the drop in $F_{passive}$ was larger ($P<0.01$) in DHF than in SHF because $F_{passive}$ fell to a similarly low level in SHF (3.2 ± 0.2 kN/m²) and DHF (3.7 ± 0.3 kN/m²; Figure 4A). F_{total} at maximal activation failed to change after PKA in either group (Figure 4B). pCa_{50} fell significantly in both groups (Figure 4C). The effect of PKA treatment on the average force-pCa relations of pooled cardiomyocytes of SHF and DHF patient groups is shown in the Figure of the online-only Data Supplement (panels B and C). To explain the higher $F_{passive}$ of DHF cardiomyocytes, titin isoform separation was performed on pooled endomyocardial biopsy material (Figure 4E). The titin N2BA/N2B ratio of DHF myocardium (17/83; SEM of the ratio 0.02) was lower ($P<0.05$) than that of SHF myocardium (35/65; SEM of the ratio 0.13).

Discussion

A comparative analysis of LV myocardium in SHF and DHF revealed the following: (1) MyD is larger in DHF, but CVF is similar. (2) At each level of CVF, MyD is larger in DHF, but MyD increases similarly in both SHF and DHF as fibrosis

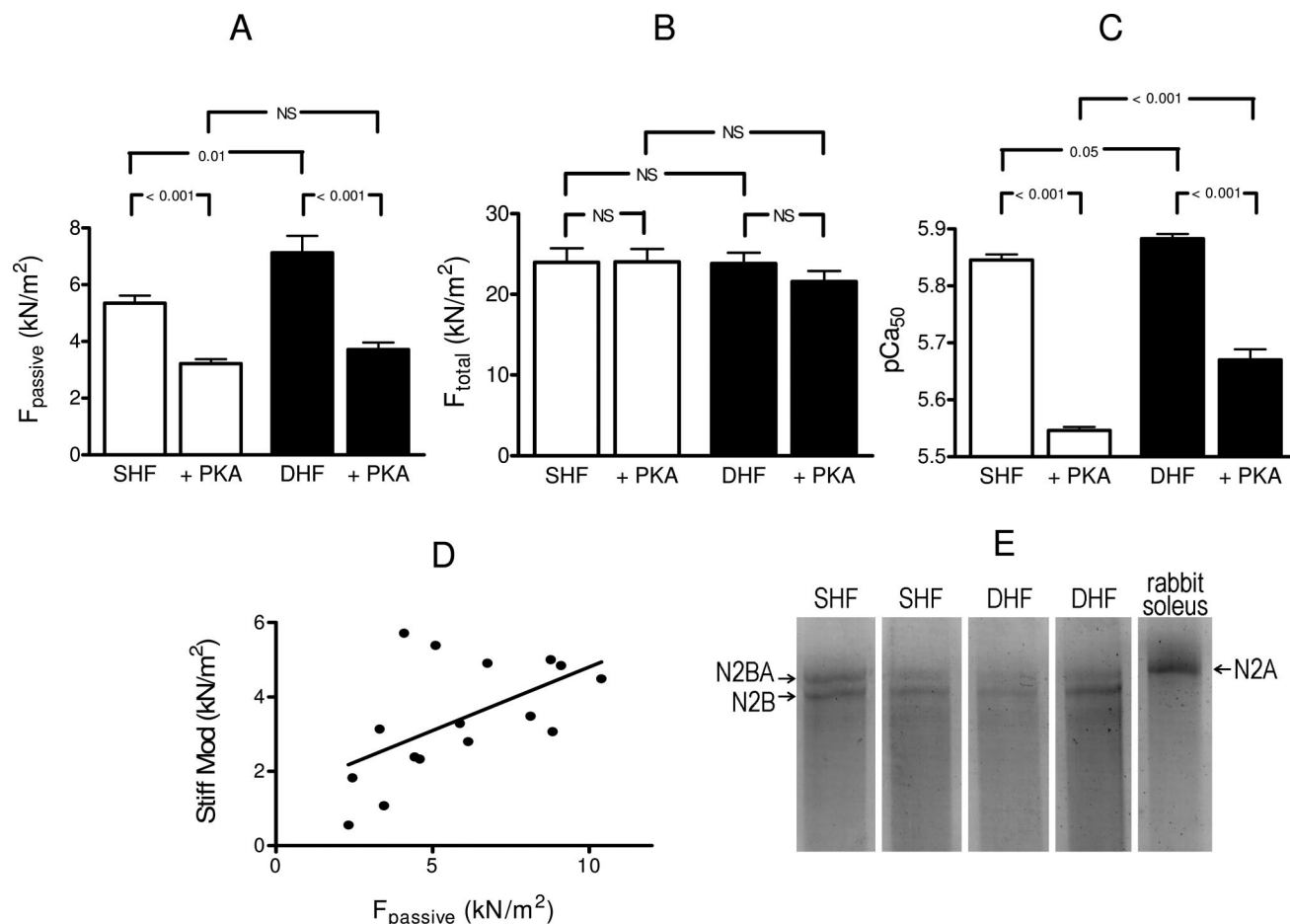


Figure 4. A, $F_{passive}$ was higher in DHF. PKA treatment reduced $F_{passive}$ in SHF and DHF. B, F_{total} at maximal activation was similar in SHF and DHF and failed to change after PKA. C, pCa_{50} was higher in DHF than in SHF and fell in both groups after PKA. D, Relation between $F_{passive}$ and myocardial stiffness modulus (Stiff Mod) in DHF patients ($r=0.56$, $P=0.02$); E, Titin gel electrophoresis of SHF (lanes 1 and 2) and of DHF myocardium (lanes 3 and 4) and as a molecular weight marker, also of rabbit soleus muscle (lane 5), which expresses the 3600-kDa N2A isoform.

progresses. (3) Myofibrillar density is lower in SHF. (4) F_{passive} of single cardiomyocytes is higher in DHF, and after administration of PKA to the cardiomyocytes, the drop in F_{passive} is larger in DHF. (5) Calcium sensitivity of single cardiomyocytes is higher in DHF, but F_{total} at maximal activation is similar.

Cardiomyocyte Hypertrophy

The present study provides histological evidence of considerable cardiomyocyte hypertrophy in DHF. LV hypertrophy had already been reported in DHF^{17,23–25} and was confirmed in the present study by the higher than normal LVMI. LV hypertrophy in DHF became especially evident when LVEDVI was accounted for by expressing LV hypertrophy as an LVMI/LVEDVI ratio.^{23,24} A higher than normal LVMI was also observed in SHF, but in contrast to DHF, it only resulted in a minor increase in MyD as it was compensatory to normalize LV wall thickness in a dilated LV. The considerable increase of MyD in DHF and the minor increase of MyD in SHF resemble the previously reported cardiomyocyte remodeling in concentric and eccentric human or animal LV hypertrophy.²⁶ In concentric LV hypertrophy, cardiomyocytes grow in a transverse direction while keeping cell length constant, whereas in eccentric hypertrophy, cardiomyocytes grow proportionally in longitudinal and transverse directions. This difference in cardiomyocyte remodeling correlates with distinct patterns of peptide growth factor induction in both conditions.²⁷

The increase of MyD in SHF was accompanied by collagen deposition (Figure 2B). In DHF, collagen deposition was associated with a similar additional increase in MyD (Figure 2B). Because collagen deposition and myocyte hypertrophy development were present in both SHF and DHF, use of ACE inhibitors, angiotensin II receptor blockers, and aldosterone antagonists, which oppose myocardial fibrosis and maladaptive hypertrophy, appears justified in both HF phenotypes. Indeed, the CHARM trial (Candesartan in Heart Failure—Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity) using the angiotensin II receptor blocker candesartan reported beneficial effects not only in SHF but also in DHF.²⁸

At each level of CVF, MyD of DHF patients exceeded MyD of SHF patients (Figure 1C). This excess cardiomyocyte hypertrophy in DHF probably related to a history of arterial hypertension, which was present in 73% of DHF patients and only in 13% of SHF patients. Arterial hypertension in DHF patients was also evident at cardiac catheterization from their high LVPSP (172 ± 7 mm Hg). The importance of arterial hypertension for the development of DHF was recently demonstrated in the first DHF large-animal model, in which arterial hypertension was created in old dogs by wrapping of both kidneys.²⁹ Sixty percent of the DHF patients in the present study had diabetes mellitus, and 50% were obese. In experimental models of diabetes mellitus and insulin resistance, development of cardiac hypertrophy has also been reported.^{30,31}

Higher F_{passive} in DHF

When single cardiomyocytes of DHF patients were stretched to a sarcomere length of $2.2 \mu\text{m}$, F_{passive} was 34% higher than

in cardiomyocytes of SHF patients. Higher F_{passive} of cardiomyocytes can result from altered calcium handling or from modified myofilamentary and cytoskeletal proteins. Because the cardiomyocytes were incubated in Triton X-100 before the experiments, the integrity of sarcolemmal and sarcoplasmic membranes was disrupted. Altered calcium handling was therefore excluded as a cause of the higher F_{passive} . In a previous study, no changes in myofilamentary protein expression or phosphorylation were found in endomyocardial biopsy samples of DHF patients.¹⁷ The higher F_{passive} is therefore also unrelated to myofilamentary proteins and must be attributed to altered expression or phosphorylation of cytoskeletal proteins. Because PKA corrected F_{passive} , the cytoskeletal protein involved must have phosphorylation sites. Titin has phosphorylation sites, and its phosphorylation by PKA lowers F_{passive} in isolated cardiac muscle strips, especially when the stiff isoform of titin (N2B) is overexpressed.^{32,33} The present study observed a higher expression of the stiff N2B titin isoform in pooled endomyocardial biopsy samples of DHF patients. If future studies can confirm this titin isoform shift in myocardial samples of individual DHF patients, the higher F_{passive} observed in cardiomyocytes of DHF patients could be attributed to this titin isoform shift. Furthermore, the fall in F_{passive} after PKA was larger in DHF than in SHF (Figure 4A). This larger fall after PKA was also consistent with the higher N2B expression in the pooled endomyocardial biopsy samples of DHF patients. A similar shift in titin isoform expression from the compliant N2BA to the stiff N2B isoform was previously reported in experimental hypertensive myocardium.³⁴ It remains to be investigated whether lower baseline phosphorylation of titin contributed to the higher F_{passive} in DHF.

Cardiomyocyte F_{passive} of DHF patients correlated with LVEDP and with myocardial stiffness modulus in both the present and a previous study.¹⁷ Because PKA corrected the high F_{passive} (Figure 4A), raising myocardial PKA activity by β -adrenoceptor stimulation could improve LV diastolic function in DHF. Improved diastolic LV function during administration of isoproterenol has indeed been demonstrated in patients with hypertrophic cardiomyopathy,³⁵ who frequently have DHF. At present, it is unclear whether only PKA can phosphorylate titin or whether protein kinase C and protein kinase G are also effective. Protein kinase G is especially of interest, because myocardial activity of PKG can be increased by nitric oxide and by phosphodiesterase 5A-inhibitors. Nitric oxide is known to improve diastolic LV function in normal, hypertrophied, and failing hearts,³⁶ and sildenafil has recently been shown to favorably modify cardiac hypertrophy.³⁷

DHF patients had 20% higher myofilamentary density than SHF patients. This higher myofilamentary density could have contributed to the higher F_{passive} in DHF. Reduction by PKA of F_{passive} to a similar level in DHF and SHF, however, argues against higher myofilamentary density accounting for the higher F_{passive} in DHF. The lower myofilamentary density in SHF could have resulted from myofilamentary breakdown, as occurs in coxsackie myocarditis,³⁸ or from reduced myofilamentary synthesis, as occurs in alcoholic cardiomyopathy.³⁹ Although myofilamentary density was lower in SHF, cardiomyocytes had comparable F_{total} at maximal activation, possi-

bly because of enhanced actomyosin interaction resulting from altered titin isoforms or phosphorylation.³²

Study Limitations

The origin of DHF is diverse, including coronary artery disease, arterial hypertension, hypertrophic cardiomyopathy, and infiltrative cardiomyopathy.¹³ Because patients with coronary artery disease and infiltrative cardiomyopathy were excluded, LV pressure overload induced by arterial hypertension became the most prevalent cause of DHF in the present study. Because of this patient selection and because of the limited size of the patient groups, caution is needed before the current observations are extrapolated to the HF population at large.

Because cardiomyocytes were incubated before the experiments with 0.2% Triton X-100, the integrity of sarcolemmal and sarcoplasmic membranes was disrupted, and cardiomyocytes became dependent on externally supplied calcium for force development. Under these conditions, an effect of disturbed Ca^{2+} handling or of cytosolic Ca^{2+} overload on F_{passive} or F_{total} could not be studied.

Assessment of myocardial structure and function was performed on a limited number of LV biopsy samples and could have overlooked LV myocardial tissue heterogeneity. The extent of LV myocardial tissue heterogeneity was previously addressed in explanted hearts¹⁸ and in surgically procured biopsy samples.⁴⁰ In those studies, the variability of force measurements in cardiomyocytes isolated from different portions of the heart was always $\leq 5\%$. Variability of the titin N2BA/N2B ratios was also $\leq 5\%$ when myocardial samples procured from different locations within the LV were compared.⁴¹ The present study observed a shift from the compliant N2BA to the stiff N2B titin isoform in pooled endomyocardial biopsy samples of DHF patients. Biopsy samples needed to be pooled to provide sufficient tissue for the titin isoform gel electrophoresis. Before the higher F_{passive} observed in cardiomyocytes of DHF patients is attributed to this titin isoform shift, the shift must be confirmed in myocardial samples of individual DHF patients.

Characterization of the extracellular matrix in both types of HF was limited to measurement of CVF and did not include eventual shifts in collagen isotypes and cross-linking. Because half of the DHF patients had diabetes mellitus, collagen cross-links formed by advanced-glycation end products⁴² could also have contributed to the high myocardial stiffness observed in this group.

Conclusions

The present study observes the LV myocardium in SHF and DHF to differ in both cellular architecture and function and suggests SHF and DHF to be associated with phenotypically distinct cardiomyocyte abnormalities. These differences support the clinical discrimination of HF patients into SHF and DHF groups.

Disclosures

None.

References

1. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: part I: diagnosis, prognosis and measurements of diastolic function. *Circulation*. 2002;105:1387–1393.
2. Owan TE, Redfield MM. Epidemiology of diastolic heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 2005;47:320–332.
3. Sanderson JE. Diastolic heart failure: fact or fiction? *Heart*. 2003;89:1281–1282.
4. Burkhoff D, Maurer SM, Packer M. Heart failure with a normal ejection fraction, is it really a disorder of diastolic function? *Circulation*. 2003;107:656–658.
5. Baicu CF, Zile MR, Aurigemma GP, Gaasch WH. Left ventricular systolic performance, function, and contractility in patients with diastolic heart failure. *Circulation*. 2005;111:2306–2312.
6. Yip G, Wang M, Zhang Y, Fung JWH, Ho PY, Sanderson JE. Left ventricular long axis function in diastolic heart failure is reduced in both diastole and systole: time for a redefinition? *Heart*. 2002;87:121–125.
7. Yu CM, Lin H, Yang H, Kong SL, Zhang Q, Lee SWL. Progression of systolic abnormalities in patients with “isolated” diastolic heart failure and diastolic dysfunction. *Circulation*. 2002;105:1195–1201.
8. Kawaguchi M, Hay I, Fetters B, Kass DA. Combined ventricular systolic and arterial stiffening in patients with heart failure and preserved ejection fraction. implications for systolic and diastolic reserve limitations. *Circulation*. 2003;107:714–720.
9. Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH. Diastolic heart failure: abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med*. 2004;350:1953–1959.
10. Skaluba SJ, Litwin SE. Mechanisms of exercise intolerance. insights from tissue Doppler imaging. *Circulation*. 2004;109:972–977.
11. Kass DA, Bronzwaer JGF, Paulus WJ. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ Res*. 2004;94:1533–1542.
12. Redfield MM. Understanding “diastolic” heart failure. *N Engl J Med*. 2004;350:1930–1931.
13. European Study Group on Diastolic Heart Failure. How to diagnose diastolic heart failure. *Eur Heart J*. 1998;19:990–1003.
14. Vasan RS, Levy D. Defining diastolic heart failure: a call for standardized diagnostic criteria. *Circulation*. 2000;101:2118–2121.
15. Palmieri V, de Simone G, Arnett DK, Bella JN, Kitzman DW, Oberman A, Hopkins PN, Province MA, Devereux RB. Relation of various degrees of body mass index in patients with systemic hypertension to left ventricular mass, cardiac output, and peripheral resistance (the Hypertension Genetic Epidemiology Network Study). *Am J Cardiol*. 2001;88:1163–1168.
16. Bronzwaer JGF, Heymes C, Visser CA, Paulus WJ. Myocardial fibrosis blunts nitric oxide synthase-related preload reserve in human dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H10–H16.
17. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JGF, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005;111:774–781.
18. Van der Velden J, Klein LJ, Zaremba R, Boontje NM, Huybregts MA, Stooker W, Eijssman L, de Jong JW, Visser CA, Visser FC, Stienen GJ. Effects of calcium, inorganic phosphate and pH on isometric force in single skinned cardiomyocytes from donor and failing human hearts. *Circulation*. 2001;104:1140–1146.
19. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*. 2004;95:708–716.
20. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110:155–162.
21. Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*. 2002;106:1333–1341.
22. Bronzwaer JGF, Zeitz C, Visser CA, Paulus WJ. Endomyocardial nitric oxide synthase and the hemodynamic phenotypes of human dilated cardiomyopathy and of athlete’s heart. *Cardiovasc Res*. 2002;55:270–278.
23. Kitzman DW, Little WC, Brubaker PH, Anderson RT, Hundley WG, Marburger CT, Brosnihan B, Morgan TM, Stewart KP. Pathophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure. *JAMA*. 2002;288:2144–2150.
24. Brucks S, Little WC, Chao T, Kitzman DW, Wesley-Farrington D, Gandhi S, Shihabi ZK. Contribution of left ventricular diastolic dys-

- function to heart failure regardless of ejection fraction. *Am J Cardiol*. 2005;95:603–606.
25. Zile MR, Gaasch WH, Carroll JD, Feldman MD, Aurigemma GP, Schaefer GL, Ghali JK, Liebson PR. Heart failure with a normal ejection fraction: is measurement of diastolic function necessary to make the diagnosis of diastolic heart failure? *Circulation*. 2001;104:779–782.
 26. Gerdes AM. Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Fail*. 2002;8:S264–S268.
 27. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation*. 1995;92:2385–2390.
 28. Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J; CHARM Investigators and Committees. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet*. 2003;362:777–781.
 29. Munagala VK, Hart CYT, Burnett JC, Meyer DM, Redfield MM. Ventricular structure and function in aged dogs with renal hypertension: a model of experimental diastolic heart failure. *Circulation*. 2005;111:1128–1135.
 30. Abel ED, Kaulbach HC, Tian R, Hopkins JC, Duffy J, Doetschman T, Minnemann T, Boers ME, Hadro E, Oberste-Berghaus C, Quist W, Lowell BB, Ingwall JS, Kahn BB. Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after deletion of GLUT4 from the heart. *J Clin Invest*. 1999;104:1703–1714.
 31. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2002;109:121–130.
 32. Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol*. 2005;125:257–271.
 33. Lim CC, Sawyer DB. Modulation of cardiac function: titin springs into action. *J Gen Physiol*. 2005;125:249–252.
 34. Warren CM, Jordan MC, Roos KP, Krzesinski PR, Greaser ML. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res*. 2003;59:86–94.
 35. Udelsom JE, Cannon RO III, Bacharach SL, Rumble TF, Bonow RO. Beta-adrenergic stimulation with isoproterenol enhances left ventricular diastolic performance in hypertrophic cardiomyopathy despite potentiation of myocardial ischemia: comparison to rapid atrial pacing. *Circulation*. 1989;79:371–382.
 36. Paulus WJ, Bronzwaer JGF. Myocardial contractile effects of nitric oxide. *Heart Fail Rev*. 2002;7:371–383.
 37. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2005;11:214–222.
 38. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med*. 1999;5:320–326.
 39. Vihert AM, Tsipenko VA, Cherpachenko NM. Alcoholic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol*. 1986;8:3A–11A.
 40. van der Velden J, Klein LJ, van der Bijl M, Huybregts MA, Stooker W, Witkop J, Eijssman L, Visser CA, Visser FC, Stienen GJ. Isometric tension development and its calcium sensitivity in skinned myocyte-sized preparations from different regions of the human heart. *Cardiovasc Res*. 1999;42:706–719.
 41. Neagoe C, Opitz CA, Makarenko I, Linke WA. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003;24:175–189.
 42. Herrmann KL, McCulloch AD, Omens JH. Glycated collagen cross-linking alters cardiac mechanics in volume-overload hypertrophy. *Am J Physiol*. 2003;284:H1277–H1284.

CLINICAL PERSPECTIVE

Approximately half of the heart failure patient population has a left ventricular (LV) ejection fraction greater than 45%. These patients are frequently referred to as diastolic heart failure (DHF) patients in contrast to patients with an LV ejection fraction less than 45%, who are referred to as systolic heart failure (SHF) patients. The separation of heart failure patients into these 2 phenotypes is challenged because DHF patients can have subtle abnormalities of systolic LV function that are not appreciated from an LV ejection fraction measurement. Moreover, SHF patients can have diastolic LV dysfunction, which often predicts their exercise intolerance better than LV ejection fraction. Because hemodynamic features apparently fail to support DHF and SHF as distinct heart failure phenotypes, the structure and function of LV myocardium of DHF and SHF patients were compared. LV myocardium was procured by an endomyocardial biopsy technique in DHF and SHF patients without coronary artery disease. Myocardial collagen volume fraction was equally elevated in DHF and SHF patients. Cardiomyocytes of DHF and SHF patients were structurally different: cardiomyocyte diameter was larger and myofibrillar density higher in the DHF patients. Furthermore, isolated single cardiomyocytes were functionally different: when stretched to the same sarcomere length, passive force was higher in the DHF patients, and when activated with calcium-containing solutions, calcium sensitivity was also higher in the DHF patients. These distinct cardiomyocyte abnormalities support DHF and SHF as separate heart failure phenotypes. Regression of cardiomyocyte hypertrophy and reduction of cardiomyocyte passive force are potential targets for a specific DHF treatment strategy.

Diastolic Stiffness of the Failing Diabetic Heart

Importance of Fibrosis, Advanced Glycation End Products, and Myocyte Resting Tension

Loek van Heerebeek, MD; Nazha Hamdani, PhD; M. Louis Handoko, MD; Ines Falcao-Pires, PhD; René J. Musters, PhD; Koba Kupreishvili, MD; Alexander J.J. Ijsselmuiden, MD, PhD; Casper G. Schalkwijk, PhD; Jean G.F. Bronzwaer, MD, PhD; Michaela Diamant, MD, PhD; Attila Borbely, MD; Jolanda van der Velden, PhD; Ger J.M. Stienen, PhD; Gerrit J. Laarman, MD, PhD; Hans W.M. Niessen, MD, PhD; Walter J. Paulus, MD, PhD

Background—Excessive diastolic left ventricular stiffness is an important contributor to heart failure in patients with diabetes mellitus. Diabetes is presumed to increase stiffness through myocardial deposition of collagen and advanced glycation end products (AGEs). Cardiomyocyte resting tension also elevates stiffness, especially in heart failure with normal left ventricular ejection fraction (LVEF). The contribution to diastolic stiffness of fibrosis, AGEs, and cardiomyocyte resting tension was assessed in diabetic heart failure patients with normal or reduced LVEF.

Methods and Results—Left ventricular endomyocardial biopsy samples were procured in 28 patients with normal LVEF and 36 patients with reduced LVEF, all without coronary artery disease. Sixteen patients with normal LVEF and 10 with reduced LVEF had diabetes mellitus. Biopsy samples were used for quantification of collagen and AGEs and for isolation of cardiomyocytes to measure resting tension. Diabetic heart failure patients had higher diastolic left ventricular stiffness irrespective of LVEF. Diabetes mellitus increased the myocardial collagen volume fraction only in patients with reduced LVEF (from $14.6 \pm 1.0\%$ to $22.4 \pm 2.2\%$, $P < 0.001$) and increased cardiomyocyte resting tension only in patients with normal LVEF (from 5.1 ± 0.7 to 8.5 ± 0.9 kN/m², $P = 0.006$). Diabetes increased myocardial AGE deposition in patients with reduced LVEF (from 8.8 ± 2.5 to 24.1 ± 3.8 score/mm²; $P = 0.005$) and less so in patients with normal LVEF (from 8.2 ± 2.5 to 15.7 ± 2.7 score/mm², $P = \text{NS}$).

Conclusions—Mechanisms responsible for the increased diastolic stiffness of the diabetic heart differ in heart failure with reduced and normal LVEF: Fibrosis and AGEs are more important when LVEF is reduced, whereas cardiomyocyte resting tension is more important when LVEF is normal. (*Circulation*. 2008;117:43-51.)

Key Words: diastole ■ diabetes mellitus ■ heart failure ■ collagen ■ myocytes

Increased diastolic left ventricular (LV) stiffness is recognized as the earliest manifestation of LV dysfunction induced by diabetes mellitus (DM)¹⁻⁵ and frequently becomes the main functional deficit of the diabetic heart, because many diabetic patients present with heart failure (HF) and normal LV ejection fraction (LVEF).^{6,7} This excessive diastolic LV stiffness also modifies ischemic LV dysfunction, as is evident from the reduced LV remodeling and increased incidence of HF after acute myocardial infarction.^{8,9}

Clinical Perspective p 51

In the absence of coronary artery disease, excessive diastolic LV stiffness of the diabetic heart has been related to

myocardial fibrosis¹⁰ and to circulating advanced glycation end products (AGEs),¹¹ although associations of histological and biochemical data with in vivo LV function are largely lacking. Furthermore, the contribution of an elevated cardiomyocyte resting tension (F_{passive}) to this increased diastolic LV stiffness has not been assessed. In patients with HF and normal LVEF (HFNEF), F_{passive} of cardiomyocytes isolated from LV endomyocardial biopsy samples was recently demonstrated to be elevated and to be an important determinant of LV stiffness.¹² In patients with HF and reduced LVEF (HFREF), F_{passive} was lower and failed to correlate with LV stiffness.¹³ The high F_{passive} in HFNEF was paralleled by cardiomyocyte hypertrophy and concentric LV remodeling.^{12,13} Because myocardial

Received July 17, 2007; accepted October 26, 2007.

From the Departments of Physiology (L.v.H., N.H., M.L.H., I.F.-P., R.J.M., A.B., J.v.d.V., G.J.M.S., W.J.P.), Cardiology (J.G.F.B.), Endocrinology (M.D.), and Pathology and Surgery (K.K., H.W.M.N.), Institute for Cardiovascular Research, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; Department of Cardiology (A.J.J.I., G.J.L.), Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam, the Netherlands; and Department of Internal Medicine (C.G.S.), University of Maastricht, Maastricht, the Netherlands.

Correspondence to Professor Dr Walter J. Paulus, MD, PhD, ICaR-VU, VU University Medical Center, Van der Boechorststraat 7, 1081 BT Amsterdam, the Netherlands. E-mail wj.paulus@vumc.nl

© 2008 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728550

hypertrophy is associated with insulin resistance,¹⁴ and because HFNEF is common in patients with type 2 DM,⁷ high F_{passive} could be an important contributor to the excessive diastolic LV stiffness of the diabetic heart.

Using LV endomyocardial biopsy samples, we therefore compared myocardial fibrosis, AGE deposition, and F_{passive} of isolated cardiomyocytes between diabetic (DM^+) and nondiabetic (DM^-) HFNEF patients ($\text{DM}^+_{\text{HFNEF}}$ and $\text{DM}^-_{\text{HFNEF}}$) and between DM^+ and DM^- HFREF patients ($\text{DM}^+_{\text{HFREF}}$ and $\text{DM}^-_{\text{HFREF}}$). All patients had been hospitalized for worsening HF and had no evidence of coronary artery disease on their coronary angiogram or of myocardial infiltration or active inflammation in their LV endomyocardial biopsy samples.

Methods

Patients

The study population consisted of 90 patients hospitalized for worsening HF between October 2003 and December 2006. Patients were referred for cardiac catheterization and LV endomyocardial biopsy procurement because of suspicion of infiltrative or inflammatory myocardial disease. Fifty-eight patients had new-onset HF, and 32 had acute decompensation superimposed on chronic HF. Modes of presentation were similar in HFNEF versus HFREF patients and in DM^+ versus DM^- patients. Patients were studied after medical compensation. No patient had undergone cardiac transplantation. Coronary angiography showed epicardial coronary artery stenoses in 20 patients; these patients were excluded from the present study. Histological analysis of the biopsy samples revealed active inflammatory infiltration or myocardial deposits in 6 patients. The histologically positive biopsy sample rate of 8.6% of the study population is comparable to the rate found in previous studies, which reported active lymphocytic infiltration in 8.3% of patients with dilated cardiomyopathy¹⁵ and amyloid deposits in 6.3% of patients with LV restrictive physiology¹⁶ of hemodynamic severity comparable to that of the present study population. Patients with a positive biopsy sample were also excluded from the present study. The final study cohort, therefore, consisted of 64 patients. For 44 of these 64 patients, data on myocardial collagen volume fraction (CVF) and cardiomyocyte F_{passive} were included in previous studies.^{12,13}

In accordance with a recent consensus document on the diagnosis of HFNEF,¹⁷ patients had HFNEF ($n=28$) if LVEF was $>50\%$, LV end-diastolic volume index was $<97 \text{ mL/m}^2$, and LV end-diastolic pressure was $>16 \text{ mm Hg}$.¹⁷ Patients had HFREF ($n=36$) if LVEF was $<45\%$. A patient had DM if a history of DM was evident from use of glucose-lowering medications and/or insulin or if fasting plasma glucose was $\geq 7.0 \text{ mmol/L}$.¹⁸ No patient was using thiazolidinediones. Three HFREF patients had type 1 DM, and 7 HFREF and all 16 HFNEF patients had type 2 DM. In $\text{DM}^+_{\text{HFREF}}$ and $\text{DM}^+_{\text{HFNEF}}$ patients who were not undergoing insulin therapy, fasting insulin plasma levels were elevated (20.1 ± 4.3 and $22.4 \pm 3.0 \mu\text{U/mL}$, respectively). The local ethics committee approved the study protocol. Written informed consent was obtained from all patients.

Quantitative Histomorphometry

Light and Electron Microscopy

Light microscopic quantification of cardiomyocyte diameter and CVF has been described and validated previously.^{12,13} Biopsy samples used for CVF averaged 2.8 ± 0.2 samples per patient. The same automated image analyzer was also used for electron microscopic quantification¹³ of the sarcomeric Z-line thickness of cardiomyocytes. For each patient, 30 Z-line-thickness measurements were averaged.

Immunohistochemistry

Deposition of AGEs was inferred from measurement of the AGE N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine (CML). Development of the anti-CML

monoclonal antibody and immunohistochemical staining techniques for CML and E-selectin used in the present study have been described previously.^{19,20} AGE and E-selectin positivity was scored for intensity. The sum of all positivities times their score was subsequently divided by the area of the slide to yield an immunohistochemical score per square millimeter (score/mm^2).

Immunofluorescence Light Microscopy

For analysis of Z-line thickness, fixed slides with isolated cardiomyocytes were stained with anti- α -actinin for 60 minutes at room temperature (1:50, mAb, Monosan, Uden, the Netherlands). After they were washed in PBS-Tween, the cells were incubated for 30 minutes with rabbit anti-mouse AlexaFluor 488 secondary antibody (1:40, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Calif) and again washed in PBS-Tween. Slides were covered and sealed by mounting medium and ultrathin glass cover slips. Z-line-thickness analysis was performed under a 3D Marianas wide-field deconvolution microscopy workstation (Intelligent Imaging Innovations, Denver, Colo). For each patient, 3-dimensional stacks (step size in $z=0.2 \mu\text{m}$) of isolated cardiomyocytes were made, and 30 Z-line-thickness measurements were averaged.

Force Measurements in Isolated Cardiomyocytes

Force measurements were performed in single, mechanically isolated cardiomyocytes as described previously.^{12,13} Biopsy samples (5 mg wet weight) were defrosted in relaxing solution, mechanically disrupted, and incubated for 5 minutes in relaxing solution supplemented with 0.2% Triton X-100 to remove all membrane structures. Single cardiomyocytes were subsequently attached with silicone adhesive between a force transducer and a piezoelectric motor (2.7 ± 0.4 cardiomyocytes per patient). Sarcomere length of isolated cardiomyocytes was adjusted to $2.2 \mu\text{m}$. To assess reversibility of elevated F_{passive} , myocytes were also incubated in relaxing solution supplemented with the catalytic subunit of protein kinase A (100 U/mL; Sigma, St Louis, Mo; batch 12K7495). After 40 minutes of incubation with protein kinase A, F_{passive} measurements were repeated. Force values were normalized for myocyte cross-sectional area.

Data Analysis

LV end-diastolic volume, LV end-diastolic volume index, LV stroke volume, and LVEF were derived from biplane LV angiograms. Effective arterial elastance was equal to LV end-systolic pressure divided by angiographic LV stroke volume. Total arterial compliance equaled angiographic LV stroke volume divided by aortic pulse pressure.

LV diastolic internal diameter (LVIDd), diastolic septal and posterior wall thicknesses (SWTd and PWTd, respectively), relative wall thickness (RWT), LV mass (LVM), and LV mass index were derived from 2-dimensional echocardiograms. LV mass and relative wall thickness were calculated in accordance with the recent recommendations for cardiac chamber quantification,²¹ as follows:

$$\text{LVM} = 0.8 \times \{1.04[(\text{LVIDd} + \text{PWTd} + \text{SWTd})^3 - \text{LVIDd}^3]\} + 0.6 \text{ g}$$

and

$$\text{RWT} = 2 \times \text{PWTd} / \text{LVIDd}$$

To calculate LV peak systolic wall stress (LVPSs) and LV myocardial stiffness modulus (SM), hemodynamic, angiographic, and 2D echocardiographic data were combined. Circumferential LVPSs was computed with a thick-wall ellipsoid model of the LV as follows²²:

$$\text{LVPSs} = \text{LVPS} \times D / (2 \text{PWTs}) \\ \times [1 - (\text{PWTs}/D) - (D^2/2L^2)] \times 1.332 \text{ dyne/cm}^2$$

where LVPS is LV peak systolic pressure, PWTs is the corresponding systolic echocardiographic posterior wall thickness, and D and L

are the corresponding angiographic LV systolic diameter and length, respectively.

To assess diastolic LV material properties, a radial LV SM was derived.²³ SM was defined as the increment of radial stress ($\Delta\sigma$) divided by the increment of radial strain ($\Delta\epsilon$) ($SM = \Delta\sigma/\Delta\epsilon$). $\Delta\sigma$ is equal but opposite in sign to the increment of LV pressure (LVP) at the endocardium ($-\Delta LVP$), and $\Delta\epsilon$ equals the increment in 2-dimensional echocardiographic posterior wall thickness (PWT) relative to the instantaneous PWT ($\Delta PWT/PWT$). Early diastolic LV relaxation pressure was extrapolated from the exponential curve fit to isovolumic LV pressure decay, which was used to calculate τ , the time constant of isovolumic LV pressure decay. Early diastolic LV relaxation pressure was subtracted from measured LVP to yield residual LV diastolic pressure (LVP_{res}). Substitution of LVP by LVP_{res} allowed the SM to also be calculated in early diastole, when LVP is still declining.²³ Because $\Delta PWT/PWT = \Delta \ln PWT$, SM equals the slope of a plot of LVP_{res} against corresponding $\Delta \ln PWT$ data points.

Values are given as mean $\pm$ SEM. Data of the DM^{-}_{HFREF} , DM^{+}_{HFREF} , DM^{-}_{HFNEF} , and DM^{+}_{HFNEF} groups were analyzed by 2-factor ANOVA testing for DM status, HFREF/HFNEF status, and their interaction. Subsequent comparisons (DM^{-}_{HFREF} versus DM^{+}_{HFREF} and DM^{-}_{HFNEF} versus DM^{+}_{HFNEF}) were performed with a Bonferroni adjusted *t* test. Single comparisons were assessed by an unpaired Student *t* test. Relations between 2 continuous variables were assessed with linear regression analysis. Statistical analysis was performed with SPSS version 9.0 (SPSS Inc, Chicago, Ill).

The authors had full access to and take full responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Results

DM and LV Function

As evident from the higher LV end-diastolic pressure at similar LV end-diastolic volume index, LV end-diastolic distensibility was reduced in DM^{+}_{HFREF} and DM^{+}_{HFNEF} patients (Figure 1A). SM was also higher in DM^{+}_{HFREF} and DM^{+}_{HFNEF} patients than in DM^{-}_{HFREF} and DM^{-}_{HFNEF} patients, respectively (Table; Figure 1B).

Myocardial AGE Deposition and Fibrosis

AGE deposition was inferred from CML immunostaining and occurred mainly in the wall of small intramyocardial vessels (Figure 2A). In 2-factor ANOVA, CML deposition depended on the presence of DM ($P < 0.001$) but not on HFNEF/HFREF status. CML deposition was especially evident when DM^{+}_{HFREF} patients were compared with DM^{-}_{HFREF} patients (24.1 ± 3.8 versus 8.8 ± 2.5 score/mm², $P = 0.005$) and was less evident when DM^{+}_{HFNEF} patients were compared with DM^{-}_{HFNEF} patients (15.7 ± 2.7 versus 8.2 ± 2.5 score/mm², $P = NS$; Figure 2B). CML deposition correlated with the myocardial SM in HFREF ($r = 0.48$, $P = 0.014$). The DM-induced rise in myocardial CML deposition in HFREF was paralleled by a rise in E-selectin expression from 3.6 ± 0.9 to 9.2 ± 1.9 score/mm² ($P = 0.022$). E-selectin is a marker of inflammatory endothelial activation (Figure 2C).

In 2-factor ANOVA, myocardial CVF depended on DM ($P = 0.006$) and on HFNEF/HFREF status ($P < 0.001$). More-

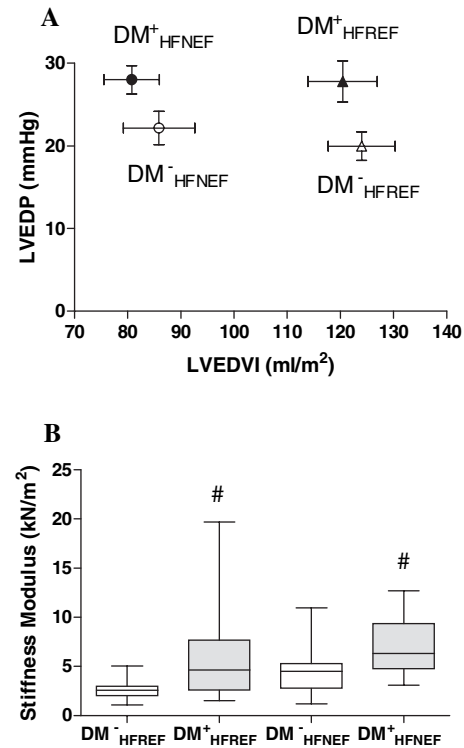


Figure 1. A, LV end-diastolic pressure (LVEDP)–LV end-diastolic volume index (LVEDVI) relations in DM^{+}_{HFREF} , DM^{+}_{HFNEF} , DM^{-}_{HFREF} , and DM^{-}_{HFNEF} patients. Reduced LV end-diastolic distensibility in DM^{+}_{HFREF} and DM^{+}_{HFNEF} patients is evident from higher LVEDP at similar LVEDVI. B, Higher LV SM in DM^{+}_{HFREF} and DM^{+}_{HFNEF} patients ($\#P < 0.001$).

over, the effect of DM on CVF depended on HFNEF/HFREF status ($P = 0.007$). CVF was higher when DM^{+}_{HFREF} patients were compared with DM^{-}_{HFREF} patients ($22.4 \pm 2.2\%$ versus $14.6 \pm 1.0\%$, $P < 0.001$) and was similar when DM^{+}_{HFNEF} patients were compared with DM^{-}_{HFNEF} patients ($11.6 \pm 1.1\%$ versus $11.7 \pm 1.1\%$, $P = NS$; Figure 2D). In HFREF patients, CVF correlated with SM ($r = 0.37$, $P = 0.039$) and with plasma glycohemoglobin ($r = 0.61$, $P = 0.0014$).

Myocyte $F_{passive}$, Myocyte Hypertrophy, and LV Remodeling

In all cardiomyocytes, $F_{passive}$ was measured at the same sarcomere length of $2.2 \mu m$ (Figure 3A). In 2-factor ANOVA, $F_{passive}$ depended on DM ($P = 0.009$) and on HFNEF/HFREF status ($P < 0.001$). Similar to myocardial CVF, the effect of DM on $F_{passive}$ was dependent on HFNEF/HFREF status ($P = 0.021$). $F_{passive}$ of DM^{+}_{HFNEF} cardiomyocytes was higher than $F_{passive}$ of DM^{-}_{HFNEF} cardiomyocytes (8.5 ± 0.9 versus 5.1 ± 0.7 kN/m², $P = 0.006$), whereas $F_{passive}$ of DM^{+}_{HFREF} cardiomyocytes was comparable to $F_{passive}$ of DM^{-}_{HFREF} cardiomyocytes (3.9 ± 0.5 versus 3.7 ± 0.4 kN/m², $P = NS$; Figure 3B). Higher $F_{passive}$ of DM^{+}_{HFNEF} cardiomyocytes was unrelated to isolation-associated cell damage, because active force development at a saturating calcium concentration ($pCa = 4.5$) was comparable in DM^{+}_{HFNEF} (14.7 ± 1.3 kN/m²) and DM^{-}_{HFNEF} (16.9 ± 1.9 kN/m²) cardiomyocytes. After administration of protein kinase A, $F_{passive}$

Table. Clinical and Hemodynamic Characteristics

	DM ⁻ _{HFREF} (n=26)	DM ⁺ _{HFREF} (n=10)	DM ⁻ _{HFNEF} (n=12)	DM ⁺ _{HFNEF} (n=16)	P	
					DM ⁻ vs DM ⁺	HFREF vs HFNEF
Age, y	60.2±3.4	62.4±4.1	63.2±4.1	65.3±2.7	NS	NS
Sex, M/F	10/16	7/3	6/6	9/7	NS	NS
Hypertension	3/26	1/10	10/12	13/16	NS	<0.001
DM1/DM2	...	3/7	...	0/16	...	...
Fasting glucose, mmol/L	4.97±0.23	7.10±0.56*	5.78±0.28	8.64±0.94§	<0.001	0.048
Glycated hemoglobin, %	5.54±0.20	7.04±0.58*	5.50±0.04	7.26±0.51§	<0.001	NS
Body mass index, kg/m ²	26.4±0.95	28.9±1.71	25.9±1.86	32.6±1.98‡	0.007	NS
DM duration, y	...	6.9±0.7	...	6.4±0.4	...	...
Creatinine, μmol/L	94.3±4.0	101.0±3.0	94.8±4.0	96.2±3.0	NS	NS
GFR, mL·min ⁻¹ ·1.73 m ⁻²	75±3.0	69±1.5	74±3.0	72±1.7	NS	NS
Microalbuminuria	...	3/10	...	3/16	...	...
Medication						
ACEI	20/26	9/10	9/12	13/16	NS	NS
β-Blocker	14/26	4/10	5/12	8/16	NS	NS
Diuretic	24/26	10/10	11/12	16/16	NS	NS
CCB	1/26	2/10	3/12	5/16	NS	NS
ARB	3/26	0/10	2/12	3/16	NS	NS
Digoxin	10/26	5/10	3/12	2/16	NS	0.035
Amiodarone	2/26	1/10	2/12	3/16	NS	NS
Statin	4/26	5/10	6/12	10/16	NS	NS
Insulin	...	3/10	...	5/16	...	...
LVPSP, mm Hg	117.4±3.4	126.4±8.2	166.0±8.5	172.0±9.7	NS	<0.001
LVEDP, mm Hg	19.9±1.7	27.8±2.5*	22.2±1.9	28.0±1.7	0.002	NS
RAP, mm Hg	6.7±1.0	9.5±1.9	8.1±1.0	8.4±1.2	NS	NS
τ, ms	66.5±10	63.0±8.5	58.3±5.3	72.5±5.7	NS	NS
Ea, mm Hg/mL	2.2±0.2	2.5±0.7	2.3±0.2	2.7±0.3	NS	NS
PP, mm Hg	49.1±2.9	51.2±6.2	82.9±5.0	97.9±7.6	NS	<0.001
Total arterial compliance, mL/mm Hg	1.7±0.2	1.4±0.2	1.4±0.2	1.0±0.1	NS	NS
SVR, dyne·sec ⁻¹ ·cm ⁻⁵	1832±101	1963±114	1781±158	1913±263	NS	NS
LVEDV, mL	236.6±12.5	226.1±17.6	176.3±17.8	148.0±10.9	NS	<0.001
LVEDVI, mL/m ²	127.9±6.6	117.8±7.2	88.0±7.2	77.0±4.2	NS	<0.001
LVEF, %	33.0±1.8	26.0±2.9	60.5±2.2	60.2±3.2	NS	<0.001
CO, L/min	3.9±0.2	3.6±0.2	5.3±0.6	5.1±0.1	NS	<0.001
CI, L·min ⁻¹ ·m ⁻²	2.1±0.1	1.9±0.1	2.7±0.3	2.7±0.1	NS	<0.001
LVIDd, cm	7.1±0.1	6.9±0.2	5.4±0.2	5.1±0.1	NS	<0.001
PWTd, mm	9.0±0.3	10.3±0.4*	10.3±0.4	11.4±0.3	0.002	0.002
RWT	0.25±0.01	0.30±0.02*	0.40±0.02	0.45±0.02‡	0.005	<0.001
LVM, g	298.8±18.1	338.6±16.3	227.9±14.6	231.0±10.6	NS	<0.001
LVMI, g/m ²	163.1±10.1	181.2±1.1	114.6±5.5	121.3±4.4	NS	<0.001
LVMI/LVEDVI, g/mL	1.3±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1	1.6±0.1	NS	NS
LVPSs, dyne/cm ²	243.4±8.0	255.0±7.0	137.8±8.4	130.3±9.9	NS	<0.001
SM, kN/m ²	2.5±0.2	6.3±2.0‡	4.5±0.8	7.4±0.7	<0.001	<0.001

M indicates male; F, female; DM1, type 1 DM; DM2, type 2 DM; GFR, glomerular filtration rate; ACEI, ACE inhibitors; CCB, calcium channel blockers; ARB, angiotensin II receptor blockers; LVPSP, LV peak systolic pressure; LVEDP, LV end-diastolic pressure; RAP, right atrial pressure; Ea, effective arterial elastance; PP, aortic pulse pressure; SVR, systemic vascular resistance; LVEDV, LV end-diastolic volume; LVEDVI, LV end-diastolic volume index; CO, cardiac output; CI, cardiac index; LVIDd, LV diastolic internal diameter; PWTd, diastolic posterior wall thickness; RWT, relative wall thickness; LVM, LV mass; LVMI, LV mass index; and LVPSs, LV peak systolic wall stress.

Values are number of patients unless otherwise indicated.

*P<0.05 vs DM⁻_{HFREF}; †P<0.001 vs DM⁻_{HFREF}; ‡P<0.05 vs DM⁻_{HFNEF}; §P<0.01 vs DM⁻_{HFNEF}; ||P<0.001 vs DM⁻_{HFNEF}. For all variables listed, 2-factor ANOVA showed no significant interaction between DM status and HFNEF-HFREF status.

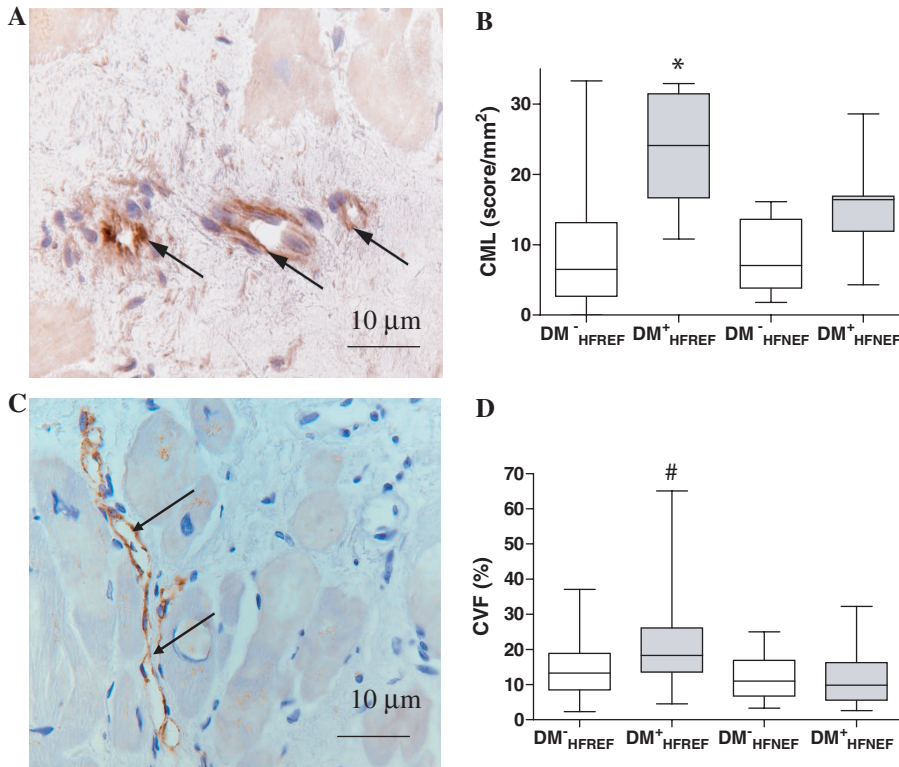


Figure 2. A, Representative example of CML deposition in small myocardial vessels (arrows) of DM⁺HFREF patients. B, Higher CML deposition score in DM⁺HFREF patients (* $P < 0.01$). C, Representative example of endothelial (arrows) E-selectin expression in DM⁺HFREF patients. D, Higher CVC in DM⁺HFREF patients (# $P < 0.001$).

fell, especially in DM⁺HFREF cardiomyocytes (from 8.5 ± 0.9 to 4.0 ± 0.3 kN/m², $P < 0.001$), and the values of F_{passive} became comparable in all patient groups (Figure 3C). The higher F_{passive} in DM⁺HFREF than in DM⁻HFREF cardiomyocytes was paralleled by widening of the sarcomeric Z line, which was significantly larger in DM⁺HFREF than in DM⁻HFREF both on immunofluorescent images stained for α -actinin (+16.9%, $P = 0.045$; Figure 3D) and on electron microscopy images (+15.2%, $P < 0.001$; Figure 3E). In HFREF patients, F_{passive} correlated with SM ($r = 0.55$, $P = 0.022$) and with the duration of DM ($r = 0.35$, $P = 0.04$).

In control conditions, F_{passive} rose progressively from HFREF to DM⁻HFREF and to DM⁺HFREF (Figure 3B). This trend was paralleled by the rise in cardiomyocyte diameter, PWTd, and relative wall thickness. Cardiomyocyte diameter rose from 16.0 ± 1.5 μ m in HFREF to 19.8 ± 1.7 μ m in DM⁻HFREF and 22.4 ± 0.9 μ m in DM⁺HFREF cardiomyocytes ($r = 0.98$, $P < 0.001$). PWTd rose from 9.4 ± 0.3 mm in HFREF to 10.3 ± 0.4 mm in DM⁻HFREF and 11.4 ± 0.3 mm in DM⁺HFREF ($r = 0.98$, $P = 0.037$). Relative wall thickness rose from 0.27 ± 0.01 in HFREF to 0.40 ± 0.02 in DM⁻HFREF and 0.45 ± 0.02 in DM⁺HFREF ($r = 0.97$, $P = 0.03$). The progressive rise in relative wall thickness indicates a shift from eccentric to concentric LV remodeling.

Discussion

The prevalence of DM in heart failure is increasing,^{24,25} and mortality and hospitalization rates in diabetic patients with heart failure remain particularly high.^{26–28} Although coronary artery disease is the most important contributor to the myocardial dysfunction observed in DM, DM-related

disturbances such as hyperglycemia, insulin resistance, and hyperlipidemia can also act directly on the myocardium²⁹ and induce myocardial dysfunction because of a shift in myocardial energy production from glucose utilization to fatty acid oxidation.^{30–32} In the first clinical description of DM-induced myocardial dysfunction, LV dilatation and systolic LV dysfunction were prominent features,³³ and DM-induced myocardial dysfunction was therefore classified as a dilated cardiomyopathy. Subsequently, diastolic LV dysfunction was recognized as an earlier manifestation of DM-induced myocardial dysfunction.^{1–5} The present study confirmed diastolic LV stiffness to be greater in failing hearts of diabetic patients in the absence of significant coronary artery disease. Mechanisms responsible for this DM-induced diastolic myocardial stiffening were identified in endomyocardial biopsy samples of these patients. The main finding of the present study is that DM elevated diastolic LV stiffness by different mechanisms in HFREF and HFNEF patients. In HFREF, DM elevated diastolic LV stiffness through myocardial AGE deposition and fibrosis, whereas in HFNEF, DM increased diastolic LV stiffness mainly through higher F_{passive} of hypertrophied cardiomyocytes.

Myocardial AGE Deposition and Fibrosis

DM⁺HFREF patients had higher diastolic LV stiffness than DM⁻HFREF patients. This higher diastolic LV stiffness was related to both AGE deposition and interstitial fibrosis. AGE deposition results from long-standing hyperglycemia and affects diastolic LV stiffness by direct and indirect mechanisms.^{29,34,35} AGE cross-linking of collagen increases its tensile strength, and this altered biophysical

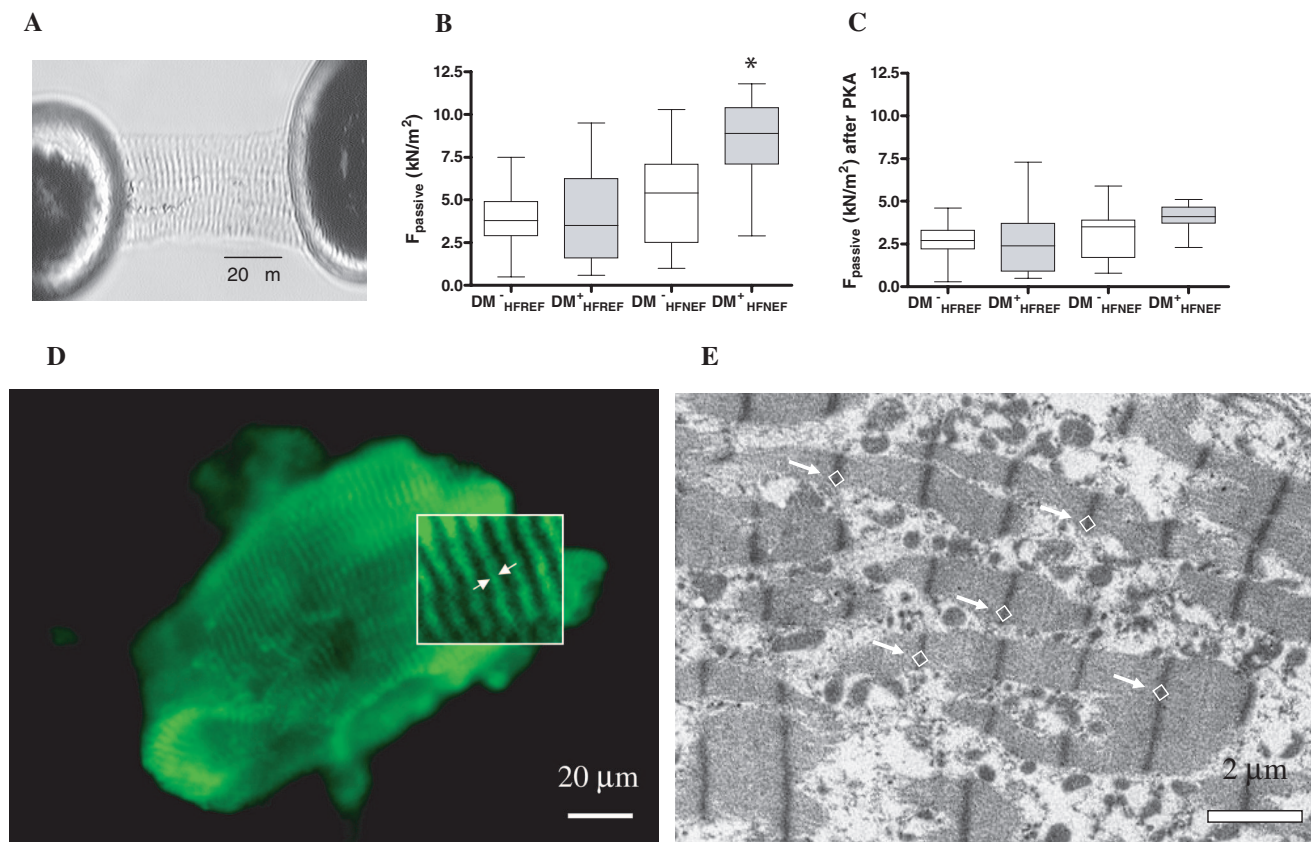


Figure 3. A, Cardiomyocyte mounted between force transducer and piezoelectric motor to measure F_{passive} . B, F_{passive} is higher in DM⁺HFREF patients (* $P < 0.01$). C, After protein kinase A (PKA) administration, F_{passive} is comparable in all patient groups. D, Representative example of immunofluorescent image of cardiomyocytes, stained for α -actinin and used for Z-line-thickness measurement (arrowheads indicate Z lines). E, Representative example of electron microscopical Z-line-thickness measurement (arrowheads indicate Z lines).

property of collagen increases diastolic LV stiffness. AGE deposition can also indirectly augment diastolic LV stiffness through enhanced collagen formation and reduced nitric oxide bioavailability. Enhanced collagen formation in the presence of AGEs was observed in the present study. AGEs quench endothelially produced nitric oxide, and low myocardial nitric oxide bioavailability was previously demonstrated to increase diastolic LV stiffness in HFREF patients.³⁶

Previous myocarditis, not DM, is the most likely cause of the dilated cardiomyopathy in the majority of the DM⁺HFREF patients, because fasting glucose, glycohemoglobin, and DM duration were all similar in the DM⁺HFREF and DM⁺HFREF groups. Even in the absence of cellular infiltration, patients with postmyocarditis HFREF frequently have persistent myocardial microvascular inflammation.³⁷ Inflammation facilitates AGE deposition,^{20,38} and persistent microvascular inflammation could therefore explain the preferential CML deposition in small intramyocardial vessels of DM⁺HFREF patients. In rodent DM animal models, AGE deposition also occurs in the myocardial interstitium.³⁹ Failure to observe interstitial CML deposition in the present study probably relates to better glycemic control in patients treated with glucose-lowering medication or insulin than in untreated rodent animal models. The clinical importance of endothelial AGE deposition was

recently confirmed in hypertensive patients in whom a cross-link breaker improved endothelial function.⁴⁰

In the present study, we observed a higher CVF in DM⁺HFREF than in DM⁻HFREF patients. Activation of fibroblasts in DM⁺HFREF patients may have resulted from the aforementioned AGE deposition, protein kinase C activation, or high intracellular glucose concentrations.^{35,41}

Cardiomyocyte Resting Tension

DM⁺HFREF patients had a higher SM than DM⁻HFREF patients. The higher SM related more to cardiomyocyte F_{passive} and less to AGE deposition. Correction of high cardiomyocyte F_{passive} by protein kinase A suggests a phosphorylation deficit of myofilamentary or cytoskeletal proteins,^{12,13} because the cardiomyocytes had been pretreated with Triton X-100 to remove all membranes. High F_{passive} of DM⁺HFREF cardiomyocytes was accompanied by Z-line widening. Z-line widening has been observed in transgenic mice after nebulin or muscle LIM protein knockout.^{42,43} The present study is the first to report Z-line widening in humans, and because of the simultaneous elevation of F_{passive} , it suggests that Z-line widening results from altered elastic properties of cytoskeletal proteins, which pull at and open up adjacent Z lines. In a previous study comparing HFREF with HFNEF,¹³ a significant correlation was observed between cardiomyocyte hypertrophy and F_{passive} .

In the present study, F_{passive} rose progressively from HFREF to $\text{DM}^{-}_{\text{HFNEF}}$ and to $\text{DM}^{+}_{\text{HFNEF}}$, and this rise was paralleled by an increase in cardiomyocyte diameter and a shift from eccentric to concentric LV remodeling. Because LV peak systolic pressure and peak systolic wall stress were similar in $\text{DM}^{+}_{\text{HFNEF}}$ and $\text{DM}^{-}_{\text{HFNEF}}$, excess cardiomyocyte hypertrophy in $\text{DM}^{+}_{\text{HFNEF}}$ was unrelated to pressure overload and was probably induced by insulin resistance.¹⁴ All of the $\text{DM}^{+}_{\text{HFNEF}}$ patients had type 2 DM and elevated fasting insulin plasma levels. Furthermore, hyperinsulinemia is known to stimulate prohypertrophic signaling in insulin-responsive tissues such as the myocardium.²⁹

Study Limitations

The clinical characteristics of the HFNEF patients in the present study differed from clinical characteristics observed in epidemiological studies. In the present study, HFNEF patients were younger (mean age 64 years) and less often female (46%) than in epidemiological studies,⁴⁴ in which patients are typically older (mean age 76 years) and more often female (55%). Patient recruitment from tertiary referral because of suspicion of inflammatory or infiltrative myocardial disease explains this discrepancy.

In the present study, diastolic LV material properties were analyzed by a radial LV SM. Use of a radial LV SM avoids geometric assumptions of LV shape. Furthermore, substitution of measured LVP by LVP_{res} enables early diastole to be included in the LV stiffness analysis, because it corrects for the upward displacement of the early diastolic LV pressure-volume relation.⁴⁵ In a previous study⁴⁶ of HFREF patients, close agreement was observed between the radial LV SM and the LV chamber stiffness constant derived from a curve fit to multiple LV end-diastolic pressure-volume points during balloon caval occlusion.

Higher LV end-diastolic pressure at similar or smaller LV end-diastolic volume can result from altered myocardial material properties and from external constraints on the LV by the right ventricle or the pericardium.⁴⁷ Right ventricular constraints because of the shared interventricular septum are prominent in patients with hypertrophic cardiomyopathy but not in patients with HFNEF, who usually have hypertensive heart disease.⁴⁷ Right atrial pressure was determined as a measure of intrapericardial pressure or pericardial constraint and was comparable in all patient groups.

Because of microvascular CML deposition, a relative reduction of the number of microvessels in hypertrophied myocardium could have lowered the CML score in the $\text{DM}^{+}_{\text{HFNEF}}$ patients. A similar CML score in $\text{DM}^{-}_{\text{HFNEF}}$ and $\text{DM}^{-}_{\text{HFREF}}$ patients, however, argues against such an artifact. Isolation of cardiomyocytes and assessment of myocardial tissue properties were performed on a limited number of samples procured by an endomyocardial biopsy technique and potentially overlook tissue heterogeneity. The extent of tissue heterogeneity was assessed in the present and previous^{12,48} studies. Sampling-related variability was <5% for

cardiomyocyte force measurements and <15% for histomorphometric data.

Development of HFNEF results from diastolic LV dysfunction,⁴⁴ deficient chronotropic or vasomotor responses,^{49,50} and arterial stiffening.⁴⁵ In DM, not only diastolic LV dysfunction but also arterial stiffness becomes a more important contributor to HFNEF.

Conclusions

In the absence of coronary artery disease, the failing diabetic heart has an elevated diastolic LV stiffness. Mechanisms responsible for this increase in diastolic LV stiffness differ between HFREF and HFNEF patients. Deposition of AGEs and deposition of collagen are important determinants of the increased LV stiffness in diabetic patients with HFREF, whereas high cardiomyocyte F_{passive} is the main determinant of the increased LV stiffness in diabetic patients with HFNEF.

Disclosures

None.

References

1. Zarich SW, Arbuckle BE, Cohen LR, Roberts M, Nesto RW. Diastolic abnormalities in young asymptomatic diabetic patients assessed by pulsed Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12:114–120.
2. Avendano G, Dharamsey S, Dasmahapatra A, Agarwal R, Reddi A, Regan T. Left ventricular diastolic function in hypertension and role of plasma glucose and insulin: comparison with diabetic heart. *Circulation.* 1996;93:1396–1402.
3. Diamant M, Lamb HJ, Groeneveld Y, Endert EL, Smit JW, Bax JJ, Romijn JA, de Roos A, Radder JK. Diastolic dysfunction is associated with altered myocardial metabolism in asymptomatic normotensive patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:328–335.
4. Rutter MK, Parise H, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Meigs JB, Nesto RW, Wilson PWF, Vasan RS. Impact of glucose intolerance and insulin resistance on cardiac structure and function: sex-related differences in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2003;107:448–454.
5. Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2004;25:543–567.
6. Kitzman DW, Gardin JM, Gottdiener JS, Arnold A, Boineau R, Aurigemma G, Marino EK, Lyles M, Cushman M, Enright PL; Cardiovascular Health Research Group. Importance of heart failure with preserved systolic function in patients ≥ 65 years of age. *Am J Cardiol.* 2001;87:413–419.
7. Klapholz M, Maurer M, Lowe AM, Messineo F, Meisner JS, Mitchell J, Kalman J, Phillips RA, Steingart R, Brown EJ Jr, Berkowitz R, Moskowitz R, Soni A, Mancini D, Bijou R, Sehhat K, Varshneya N, Kukin MK, Katz SD, Sleeper LA, Le Jemtel TH; New York Heart Failure Consortium. Hospitalization for heart failure in the presence of a normal left ventricular ejection fraction: results of the New York heart failure registry. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1432–1438.
8. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, Turi ZG, Strauss HW, Willerson JT, Robertson T; MILIS Study Group. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. *J Am Coll Cardiol.* 1989;14:49–57.

9. Solomon SD, St John SM, Lamas GA, Plappert T, Rouleau JL, Skali H, Moye L, Braunwald E, Pfeffer MA; Survival And Ventricular Enlargement (SAVE) Investigators. Ventricular remodeling does not accompany the development of heart failure in diabetic patients after myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:1251–1255.
10. Van Hoeben KH, Factor SM. A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation*. 1990;82:848–855.
11. Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjesen PA, Hildebrandt P, Mehlsen J, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1999;22:1186–1190.
12. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JGF, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005;111:774–781.
13. van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 2006;113:1966–1973.
14. Iltercil A, Devereux RB, Roman MJ, Parancas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Howard BV. Associations of insulin levels with left ventricular structure and function in American Indians: the Strong Heart Study. *Diabetes*. 2002;51:1543–1547.
15. Wojnicz R, Nowalany-Kozielecka E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM, Wodnicki J. Randomised, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two year follow-up results. *Circulation*. 2001;104:39–45.
16. Schoenfeld MH, Supple EW, Dec GW Jr, Fallon JT, Palacios IF. Restrictive cardiomyopathy versus constrictive pericarditis: role of endomyocardial biopsy in avoiding unnecessary thoracotomy. *Circulation*. 1987;75:1012–1017.
17. Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbely A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL. How to diagnose diastolic heart failure? A consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction (HFNEF) by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007;28:2539–2550.
18. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:3160–3167.
19. Schalkwijk CG, Baidoshvili A, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW, Niessen HW. Increased accumulation of the glycoxidation product N epsilon-(carboxymethyl)lysine in hearts of diabetic patients: generation and characterisation of a monoclonal anti-CML antibody. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1636:82–89.
20. Baidoshvili A, Krijnen PAJ, Kupreishvili K, Ciurana C, Bleeker W, Nijmeijer R, Visser CA, Visser FC, Meijer CJLM, Stooker W, Eijlsman L, Van Hinsbergh VWM, Hack CE, Niessen HWM, Schalkwijk CG. N^ε-(carboxymethyl)lysine depositions in intramyocardial arteries in human acute myocardial infarction: a predictor or reflection of infarction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2497–2503.
21. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John Sutton M, Stewart W. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiography*. 2006;7:79–108.
22. Paulus WJ, Heyndrickx GR, Buyl P, Goethals MA, Andries E. Wide-range load shift of combined aortic valvuloplasty-arterial vasodilation slows isovolumic relaxation of the hypertrophied left ventricle. *Circulation*. 1990;81:886–898.
23. Paulus WJ, Grossman W, Serizawa T, Bourdillon PD, Pasipoularides A, Mirsky I. Different effects of two types of ischemia on myocardial systolic and diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1985;248:H719–H728.
24. Kamallesh M, Nair G. Disproportionate increase in prevalence of diabetes among patients with congestive heart failure due to systolic dysfunction. *Int J Cardiol*. 2005;99:125–127.
25. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2006;355:251–259.
26. Bertoni AG, Hundley WG, Massing MW, Bonds DE, Burke GL, Goff DC Jr. Heart failure prevalence, incidence and mortality in the elderly with diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:699–703.
27. Murcia AM, Hennekens CH, Lamas GA, Jimenez-Navarro M, Rouleau JL, Flaker GC, Goldman S, Skali H, Braunwald E, Pfeffer MA. Impact of diabetes on mortality in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Arch Intern Med*. 2004;164:2273–2279.
28. Held C, Gerstein HC, Yusuf S, Zhao F, Hilbrich L, Anderson C, Sleight P, Teo K; for the ONTARGET/TRANSCEND Investigators. Glucose levels predict hospitalization for congestive heart failure in patients at high cardiovascular risk. *Circulation*. 2007;115:1371–1375.
29. Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res*. 2006;98:596–605.
30. Taegtmeier H, McNulty P, Young ME. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: part 1. *Circulation*. 2002;105:1727–1733.
31. Lopaschuk GD. Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Fail Rev*. 2002;7:149–159.
32. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007;115:3213–3223.
33. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol*. 1972;30:595–602.
34. Kass DA, Bronzwaer JGF, Paulus WJ. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ Res*. 2004;94:1533–1542.
35. Asbun J, Villarreal FJ. The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:693–700.
36. Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwaer JGF, Shah AM, Paulus WJ. Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;99:3009–3016.
37. Vallbracht KB, Schwimbeck PL, Kühl U, Rauch U, Seeberg B, Schultheiss HP. Differential aspects of endothelial function of the coronary microcirculation considering myocardial virus persistence, endothelial activation, and myocardial leukocyte infiltrates. *Circulation*. 2005;111:1784–1791.
38. Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N-epsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest*. 1999;104:103–113.
39. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, Tikellis C, Ritchie RH, Twigg SM, Cooper ME, Burrell LM. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res*. 2003;92:785–792.
40. Zieman SJ, Melenovsky V, Clattenburg L, Corretti MC, Capriotti A, Gerstenblith G, Kass DA. Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. *J Hypertens*. 2007;25:577–583.
41. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*. 2005;54:1615–1625.
42. Witt CC, Burkart C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H, Labeit S. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J*. 2006;25:3843–3855.
43. Hoshijima M. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin and associated structures. *Am J Physiol*. 2006;290:H1313–H1325.
44. Lam CS, Roger VL, Rodeheffer RJ, Bursi F, Borlaug BA, Ommen SR, Kass DA, Redfield MM. Cardiac structure and ventricular-vascular function in persons with heart failure and preserved ejection fraction from Olmsted County, Minnesota. *Circulation*. 2007;115:1982–1990.
45. Kawaguchi M, Hay I, Fetics B, Kass DA. Combined ventricular systolic and arterial stiffening in patients with heart failure and preserved ejection fraction: implications for systolic and diastolic reserve limitations. *Circulation*. 2003;107:714–720.
46. Bronzwaer JGF, Zeitz C, Visser CA, Paulus WJ. Endomyocardial nitric oxide synthase and the hemodynamic phenotypes of human dilated cardiomyopathy and of athlete's heart. *Cardiovasc Res*. 2002;55:270–278.
47. Pak PH, Maughan L, Baughman KL, Kass DA. Marked discordance between dynamic and passive diastolic pressure-volume relations in idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1996;94:52–60.
48. Bronzwaer JGF, Heymes C, Visser CA, Paulus WJ. Myocardial fibrosis blunts nitric oxide synthase-related preload reserve in human dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol*. 2003;284:H10–H16.
49. Melenovsky V, Borlaug BA, Rosen B, Hay I, Ferruci L, Morell CH, Lakatta EG, Najjar SS, Kass DA. Cardiovascular features of heart

failure with preserved ejection fraction versus nonfailing hypertensive left ventricular hypertrophy in the urban Baltimore community: the role of atrial remodeling/dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:198–207.

50. Borlaug BA, Melenovsky V, Russell SD, Kessler K, Pacak K, Becker LC, Kass DA. Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation.* 2006;114:2138–2147.

CLINICAL PERSPECTIVE

Mortality among diabetic patients with heart failure is high. Diabetes mellitus–related metabolic disturbances contribute importantly to their myocardial dysfunction. Increased diastolic left ventricular (LV) stiffness is an early manifestation of myocardial dysfunction and frequently becomes an important functional deficit, because many diabetic patients present with heart failure and normal LV ejection fraction. Excessive diastolic LV stiffness of the diabetic heart is usually attributed to myocardial fibrosis or to myocardial deposition of advanced glycation end products. Hypertrophied cardiomyocytes isolated from LV biopsy samples of heart failure patients with normal LV ejection fraction have a high resting tension, which correlates with greater in vivo diastolic LV stiffness. This increased resting tension could be an important contributor to the increased diastolic LV stiffness of the diabetic heart. With the use of LV endomyocardial biopsy samples, the present study assessed myocardial fibrosis, myocardial advanced glycation end product deposition, and resting tension of isolated cardiomyocytes in diabetic patients with heart failure and either normal or reduced LV ejection fraction. All patients were free of coronary artery disease and had an elevated diastolic LV stiffness. The mechanisms responsible for the elevated diastolic LV stiffness differed between heart failure patients with normal and reduced LV ejection fraction. Myocardial deposition of collagen and advanced glycation end products was more important in patients with reduced ejection fraction, whereas a high cardiomyocyte resting tension was more important in patients with normal ejection fraction. These mechanistic studies suggest that correction of high cardiomyocyte resting tension, possibly through regression of cardiomyocyte hypertrophy, may be an important therapeutic target for diabetic patients with heart failure and normal ejection fraction.

Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction

Nazha Hamdani¹, Walter J. Paulus^{1*}, Loek van Heerebeek¹, Attila Borbély¹, Nicky M. Boontje¹, Marian J. Zuidwijk¹, Jean G.F. Bronzwaer², Warner S. Simonides¹, Hans W. M. Niessen³, Ger J. M. Stienen¹, and Jolanda van der Velden¹

¹Laboratory for Physiology, Institute for Cardiovascular Research, VU University Medical Center, van der Boechorststraat 7, 1081 BT Amsterdam, the Netherlands; ²Department of Cardiology, Institute for Cardiovascular Research, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; and ³Department of Pathology and Cardiac Surgery, Institute for Cardiovascular Research, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands

Received 8 December 2008; revised 17 March 2009; accepted 21 April 2009; online publish-ahead-of-print 31 May 2009

Aims

Left ventricular (LV) myocardial structure and function differ in heart failure (HF) with normal (N) and reduced (R) LV ejection fraction (EF). This difference could underlie an unequal outcome of trials with β -blockers in heart failure with normal LVEF (HFNEF) and heart failure with reduced LVEF (HFREF) with mixed results observed in HFNEF and positive results in HFREF. To investigate whether β -blockers have distinct myocardial effects in HFNEF and HFREF, myocardial structure, cardiomyocyte function, and myocardial protein composition were compared in HFNEF and HFREF patients without or with β -blockers.

Methods and results

Patients, free of coronary artery disease, were divided into β^-_{HFNEF} ($n = 16$), β^+_{HFNEF} ($n = 16$), β^-_{HFREF} ($n = 17$), and β^+_{HFREF} ($n = 22$) groups. Using LV endomyocardial biopsies, we assessed collagen volume fraction (CVF) and cardiomyocyte diameter (MyD) by histomorphometry, phosphorylation of myofilamentary proteins by ProQ-Diamond phosphostained 1D-gels, and expression of β -adrenergic signalling and calcium handling proteins by western immunoblotting. Cardiomyocytes were also isolated from the biopsies to measure active force (F_{active}), resting force (F_{passive}), and calcium sensitivity ($p\text{Ca}_{50}$). Myocardial effects of β -blocker therapy were either shared by HFNEF and HFREF, unique to HFNEF or unique to HFREF. Higher F_{active} , higher $p\text{Ca}_{50}$, lower phosphorylation of troponin I and myosin-binding protein C, and lower β_2 adrenergic receptor expression were shared. Higher F_{passive} , lower CVF, lower MyD, and lower expression of stimulatory G protein were unique to HFNEF and lower expression of inhibitory G protein was unique to HFREF.

Conclusion

Myocardial effects unique to either HFNEF or HFREF could contribute to the dissimilar outcome of β -blocker therapy in both HF phenotypes.

Keywords

β -blockers • Heart failure • Myocardium • Diastole • Hypertrophy

Introduction

Over the past two decades, it became evident that more than 50% of all heart failure (HF) patients suffer of HF with normal left ventricular (LV) ejection fraction (EF).¹ In heart failure with normal LVEF (HFNEF) and in heart failure with reduced LVEF (HFREF), LV

structure adapts differently with concentric LV remodelling in HFNEF and eccentric LV remodelling in HFREF.^{2–4} Corresponding differences were observed at the myocardial ultrastructural level with prominent cardiomyocyte hypertrophy in HFNEF and low myofibrillar density in HFREF.⁴ When cardiomyocytes were isolated from LV myocardium, cardiomyocyte resting tension (F_{passive}) was also

* Corresponding author. Tel: +31 20 4448133, Fax: +31 20 4448255, Email: wj.paulus@vumc.nl

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2009. For permissions please email: journals.permissions@oxfordjournals.org.

higher in HFNEF than in HFREF.^{4–6} These structural and functional differences between LV myocardium in HFNEF and HFREF could underlie the unequal outcome of trials using β -blockers, angiotensin converting enzyme inhibitors (ACE-I), or angiotensin II receptor blockers (ARB) which usually yielded positive results in HFREF and mixed results in HFNEF.^{7,8} In line with this unequal outcome of trials, prognosis of HFREF patients improved over the last two decennia, whereas no such trend was observed in HFNEF patients.¹

Large clinical trials have convincingly shown that β -blocker therapy reduces mortality and improves LV function in HFREF patients.^{9–11} In HFNEF patients, favourable effects of β -blocker therapy on mortality and LV function have not been convincingly demonstrated. After hospital discharge, HFNEF patients had improved survival when using β -blockers¹² and in a community-based registry, carvedilol use was accompanied by similar 1 year mortality in HFNEF and HFREF patients but less reduction in hospitalizations in HFNEF patients.¹³ In the SWEDIC trial, carvedilol had no effect on mortality or hospitalizations, but ameliorated E/A ratio of HFNEF patients.¹⁴ In a similar study, however, 6 months of atenolol use had no effect on diastolic LV function of HFNEF patients with unchanged pulmonary capillary wedge pressure.¹⁵ Because of these inconsistent results, the use of β -blockers in HFNEF patients is further evaluated in clinical trials, such as the Japanese DHF study.¹⁶

To investigate whether HF therapy has indeed disparate effects on LV myocardial structure and function in HFNEF and HFREF, the present study compared LV myocardial structure, function, and protein composition in HFNEF and HFREF patients with and without β -blockers. The current widespread use of ACE-I precluded a similar comparison in patients with and without ACE-I. Endomyocardial biopsies procured in the four patient groups were used for: (i) histomorphometry of light and electron microscopic images to determine cardiomyocyte diameter (MyD), collagen volume fraction (CVF), and myofibrillar density; (ii) isolation of single cardiomyocytes to measure active force (F_{active}), resting force (F_{passive}), and Ca^{2+} -sensitivity (pCa_{50}), and (iii) protein analysis to assess phosphorylation of myofibrillar proteins and the expression of proteins involved in β -adrenergic signalling and in Ca^{2+} -handling.

Methods

The Supplementary methods section provides a detailed description of the methodology used for quantitative histomorphometry, force measurements in isolated cardiomyocytes, and protein analysis.

Patients

All patients included in the study ($n = 71$) had been hospitalized for worsening HF and were referred for cardiac catheterization and LV biopsy procurement because of suspicion of infiltrative or inflammatory myocardial disease. No patient had significant ($>50\%$) coronary artery stenoses, a history of myocardial infarction, percutaneous coronary intervention, or coronary bypass surgery. Histological analysis of the biopsies showed no myocardial infiltration or inflammation. The local ethics committee approved the study protocol of Vrij Universiteit medical center (Vumc). Written informed consent was obtained from all patients, and there were no complications related to catheterization or biopsy procurement. Patients were classified as HFREF if $\text{LVEF} < 40\%$ and as HFNEF if $\text{LVEF} > 50\%$ and LV end-diastolic pressure (LVEDP) > 16 mmHg.¹⁷ Patients with a $\text{LVEF} > 40\%$ but $< 50\%$ were not included.

The patients had either new-onset HF or acute decompensation superimposed on chronic HF. Sixty-four percent of patients had new-onset HF and 36% had acute decompensation superimposed on chronic HF. Patients were studied after medical compensation.

Data analysis

Values are given as mean $\pm$ SEM of the observations in each patient group. Data of the $\beta^{-}\text{HFNEF}$, $\beta^{+}\text{HFNEF}$, $\beta^{-}\text{HFREF}$, and $\beta^{+}\text{HFREF}$ groups were compared by two-factor ANOVA testing for β -blocker use, HFNEF/HFREF status, and their interaction (Tables 1 and 2). Subsequent comparisons ($\beta^{-}\text{HFREF}$ vs. $\beta^{+}\text{HFREF}$ and $\beta^{-}\text{HFNEF}$ vs. $\beta^{+}\text{HFNEF}$) were performed with a Bonferroni adjusted t -test. The analyses were performed in GraphPad Prism version 4 and SPSS 12.0.

Results

Clinical and haemodynamic characteristics

Clinical, haemodynamic, and echocardiographic data are presented in Table 1. Patients on β -blocker therapy had lower heart rate and LVEDP in both HFNEF and HFREF groups. Heart failure with normal LVEF patients were older and more frequently suffered of arterial hypertension with a concomitant higher use of calcium channel and ARB. Heart failure with normal LVEF patients also had higher LV peak systolic pressure, LVEDP, LVEF, $\text{LVdP/dt}_{\text{max}}$, $\text{LVdP/dt}_{\text{min}}$, LV wall thickness, LV mass index/LV end-diastolic volume index (LVMI/LVEDVI) ratio, and smaller LVEDVI.

Histomorphometry

Histomorphometric data are summarized in Table 2 and Figure 1. Myocardial CVF was significantly lower in HFNEF than in HFREF ($P < 0.0001$) and only in HFNEF was β -blocker therapy associated with lower myocardial CVF ($P = 0.0007$). Myocyte diameter was significantly higher in HFNEF than in HFREF ($P < 0.0001$) and only in HFNEF was β -blocker therapy associated with reduced MyD ($P < 0.0001$). Myofibrillar density was also higher in HFNEF than HFREF ($P < 0.0001$), but was unrelated to β -blocker therapy.

Force measurements in isolated cardiomyocytes

Single cardiomyocytes were attached between a force transducer and a motor (Figure 2A and B) and their sarcomere length was adjusted to $2.2 \mu\text{m}$. Force measurements are summarized in Table 2 and Figure 2C. F_{active} and pCa_{50} were similar in HFNEF and HFREF, but F_{passive} was higher in HFNEF ($P = 0.0006$). In both HFNEF and HFREF patients, β -blocker therapy resulted in a significant increase in F_{active} ($P = 0.01$) and pCa_{50} ($P = 0.008$). Only in HFNEF patients did β -blocker therapy raise F_{passive} ($P = 0.03$). After protein kinase A (PKA) administration to the cardiomyocytes, F_{active} was comparable in all four patient groups. After PKA, F_{passive} fell in all four groups but remained significantly higher in HFNEF patients with β -blockers ($P = 0.001$) (Figure 3A). pCa_{50} followed a trend similar to F_{passive} by decreasing in all four groups and by remaining higher in HFNEF patients with β -blockers ($P = 0.007$) (Figure 3B). Hence, *in vivo* β -blocker therapy was associated with multiple *in vitro* changes in baseline and PKA-stimulated contractile function of isolated cardiomyocytes, which differed between HFNEF and HFREF groups.

Table 1 Clinical, haemodynamic, and echocardiographic characteristics

	β^- HFNEF	β^+ HFNEF	β^- HFREF	β^+ HFREF	β^- vs. β^+	HFNEF vs. HFREF	Interaction
<i>n</i>	16	16	17	22			
Age (year)	66 $\pm$ 3	68 $\pm$ 4	54 $\pm$ 5	60 $\pm$ 3	NS	0.01	NS
Sex (M/F)	11/5	8/8	10/7	17/5	NS	NS	NS
Hypertension	11/16	11/16	4/17	1/22	NS	<0.0001	NS
Diabetes mellitus	8/16	3/16	6/17	8/22	NS	NS	NS
Obesity (BMI > 30 kg/m ²)	6/16	4/16	4/17	2/22	NS	NS	NS
Medication							
ACE-I	9	7	12	15	NS	NS	NS
Diuretic	12	9	14	18	NS	NS	NS
CCB	5	3	0	3	NS	0.04	NS
ARB	3	4	0	1	NS	0.03	NS
Digoxin	1	4	4	8	NS	NS	NS
Amiodarone	3	2	1	4	NS	NS	NS
Statin	4	6	2	5	NS	NS	NS
Nitrate	2	0	0	1	NS	NS	NS
Haemodynamics							
Heart rate (b.p.m.)	77 $\pm$ 10	70 $\pm$ 8.6	89 $\pm$ 17	72 $\pm$ 19	0.008	NS	NS
LVPSP (mmHg)	169 $\pm$ 29	168 $\pm$ 39	120 $\pm$ 17	116 $\pm$ 22	NS	<0.0001	NS
LVEDP (mmHg)	29 $\pm$ 7	25 $\pm$ 6	25 $\pm$ 8	20 $\pm$ 9	0.02	0.01	NS
LVEDVI (mL/m ²)	81 $\pm$ 18	79 $\pm$ 14	127 $\pm$ 32	133 $\pm$ 30	NS	<0.0001	NS
LVEF (%)	53 $\pm$ 15	63 $\pm$ 10	31 $\pm$ 10	30 $\pm$ 9	NS	<0.0001	NS
LVdP/dt _{max} (mmHg/s)	1547 $\pm$ 248	1480 $\pm$ 219	938 $\pm$ 400	902 $\pm$ 223	NS	0.0005	NS
LVdP/dt _{min} (mmHg/s)	1655 $\pm$ 381	1752 $\pm$ 134	1058 $\pm$ 458	1000 $\pm$ 259	NS	0.0007	NS
Echocardiography							
LVWT (mm)	11.4 $\pm$ 2.0	11.3 $\pm$ 1.6	9.5 $\pm$ 1.6	8.8 $\pm$ 1.8	NS	<0.0001	NS
LVMI/LVEDVI ratio	1.8 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.4	NS	<0.0001	NS

n, number of patients; M, male; F, female; BMI, body mass index; ACE-I, angiotensin converting enzyme inhibitors; CCB, calcium channel blockers; ARB, angiotensin II receptor blockers; b.p.m., beats per minute; LVPSP, LV peak systolic pressure; LVEDP, LV end-diastolic pressure; LVEDVI, LV end-diastolic volume index; LVEF, LV ejection fraction; LVWT, LV wall thickness; LVMI, LV mass index.

Protein analysis

Myofilament protein phosphorylation

To explore changes in myofilamentary protein phosphorylation related to β -blocker therapy, Pro-Q Diamond-stained gels of biopsies were obtained as shown in Figure 4A. Phosphorylation status of myofilamentary proteins did not differ between HFNEF and HFREF groups. β -blocker therapy was associated with lower phosphorylation of troponin I (TnI) and of myosin-binding protein C (MyBP-C) in both HFNEF and HFREF patients (Figure 4B) and had no effect on phosphorylation status of other myofilamentary proteins (Table 2). Effect of β -blocker therapy on phosphorylation status of desmin differed with opposite changes in HFNEF and HFREF patients ($P < 0.05$).

β -Adrenergic signalling proteins

Expression levels of proteins involved in β -adrenergic receptor signalling were determined by western immunoblotting (Table 2). Expression of β_1 AR, GRK2, and GRK5 was higher in HFREF than in HFNEF, but unaffected by β -blocker therapy. β -Blocker therapy was related to downregulated expression of β_2 AR in

HFREF and HFNEF. Effects of β -blocker therapy on expression of Gs and Gi differed in HFNEF and HFREF with Gs downregulated in HFNEF and Gi downregulated in HFREF.

Calcium-handling proteins

Expression levels of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) and phospholamban (PLB) were determined by western immunoblotting (Table 2). No differences related to HFNEF–HFREF status or to β -blocker therapy were observed. The ratio of SERCA2a/PLB was higher in HFREF (1.0 ± 0.2) than in HFNEF (0.5 ± 0.08 ; $P = 0.02$) and unaffected by β -blocker therapy in both groups.

Discussion

In endomyocardial biopsies of HFNEF or HFREF patients, β -blocker therapy was associated not only with structural and functional myocardial changes shared by both HF phenotypes, but also by changes unique to each HF phenotype. The shared effects of β -blocker therapy consisted of enhanced pCa₅₀, higher F_{active} at saturated [Ca²⁺], lower phosphorylation status of TnI

Table 2 Histomorphometry, cardiomyocyte force measurements, and protein analysis

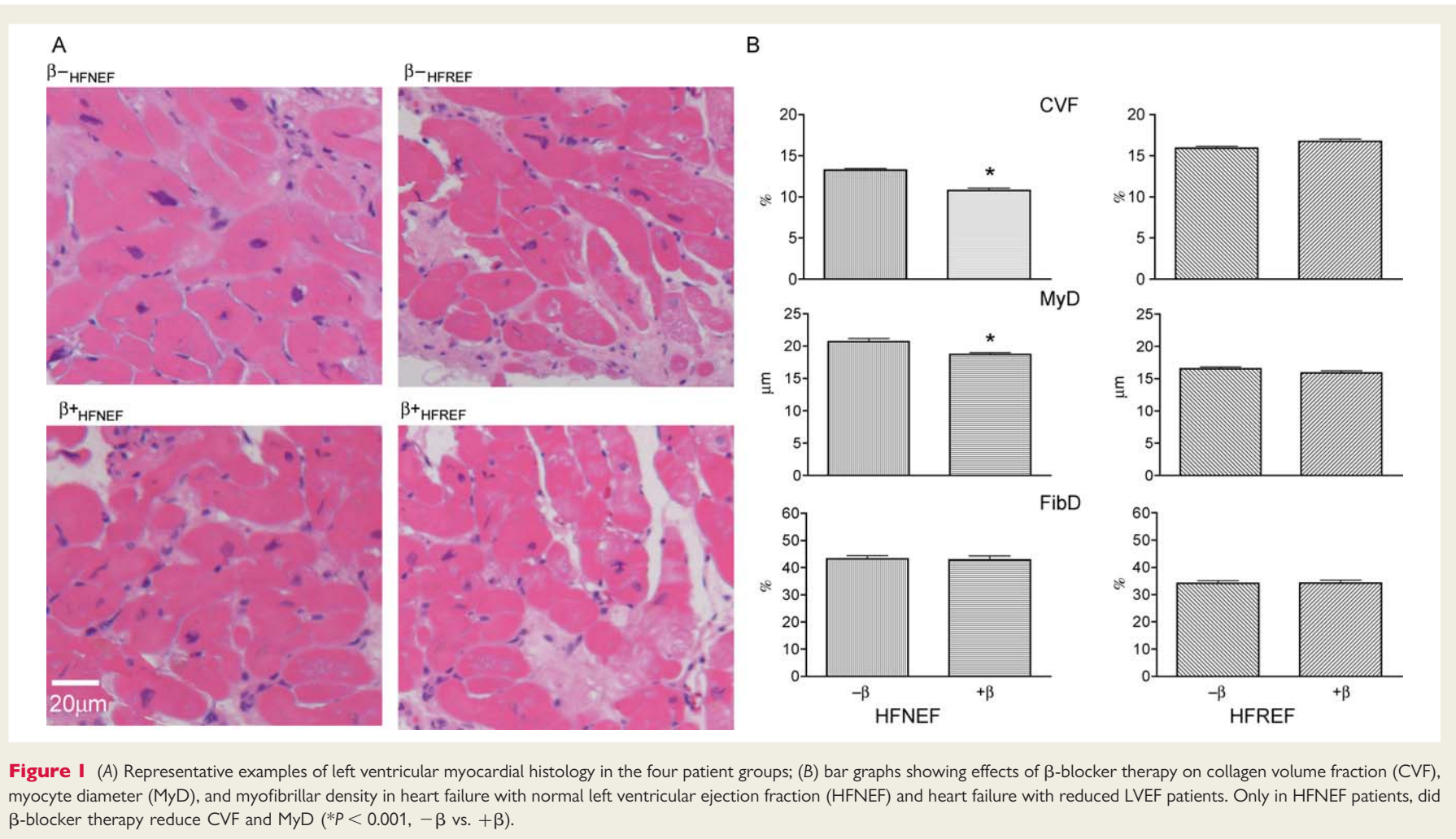
	β^- HFNEF	β^+ HFNEF	β^- HFREF	β^+ HFREF	β^- vs. β^+	HFNEF vs. HFREF	Interaction
Histomorphometry							
<i>n</i>	16	16	16	22			
CVF (%)	13.2 ± 1.2	10.8 ± 0.8	15.9 ± 0.8	16.7 ± 1.4	0.0007	<0.0001	<0.0001
MyD (μm)	20.7 ± 2	18.7 ± 1.2	16.5 ± 1.2	16.0 ± 1.4	<0.0001	<0.0001	0.04
FibD (%)	43.2 ± 4.8	42.8 ± 5.6	34.1 ± 4.0	34.2 ± 4.7	NS	<0.0001	NS
Cardiomyocyte force measurements							
<i>n</i>	8	10	10	11			
Before PKA							
F_{active} (kN/m ²)	13.2 ± 4.8	17.7 ± 3.8	15.1 ± 6.3	17.0 ± 5.6	0.01	NS	NS
F_{passive} (kN/m ²)	5.6 ± 2.3	8.0 ± 2.2	4.7 ± 0.9	4.8 ± 1.0	0.03	0.0006	0.02
pCa ₅₀	5.83 ± 0.06	5.86 ± 0.06	5.82 ± 0.03	5.87 ± 0.03	0.008	NS	NS
After PKA							
F_{active} (kN/m ²)	15.5 ± 4.5	18.2 ± 4.4	17.4 ± 7.0	19.9 ± 7.0	NS	NS	NS
F_{passive} (kN/m ²)	3.0 ± 1.1	5.1 ± 1.9	2.7 ± 0.6	3.0 ± 1.0	0.001	0.0004	0.007
pCa ₅₀	5.54 ± 0.1	5.66 ± 0.09	5.54 ± 0.06	5.54 ± 0.07	0.007	0.01	0.009
Phosphorylation of myofilament proteins							
<i>n</i>	9	6	7	7			
pTnI (a.u.)	0.20 ± 0.09	0.15 ± 0.02	0.39 ± 0.20	0.18 ± 0.15	0.02	NS	NS
pTnT (a.u.)	1.03 ± 0.40	1.15 ± 0.30	1.14 ± 0.30	0.90 ± 0.30	NS	NS	NS
pMyBP-C (a.u.)	0.26 ± 0.06	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.01	NS	NS
pDesmin (a.u.)	0.86 ± 0.30	1.01 ± 0.17	1.06 ± 0.25	0.79 ± 0.26	NS	NS	0.04
pMLC-2 (a.u.)	0.34 ± 0.10	0.38 ± 0.09	0.37 ± 0.26	0.41 ± 0.20	NS	NS	NS
Expression of the β -adrenergic signaling proteins							
<i>n</i>	12	8	10	10			
β_1 AR (a.u.)	0.45 ± 0.31	0.35 ± 0.16	0.90 ± 0.56	0.80 ± 0.60	NS	0.01	NS
β_2 AR (a.u.)	0.32 ± 0.15	0.28 ± 0.13	0.33 ± 0.05	0.18 ± 0.02	0.01	NS	NS
GRK2 (a.u.)	0.89 ± 0.80	0.84 ± 0.50	3.60 ± 3.80	3.2 ± 2.80	NS	0.004	NS
GRK5 (a.u.)	9.40 ± 3.00	9.30 ± 6.50	40.0 ± 26.0	29.9 ± 10.5	NS	0.0006	NS
Gs (a.u.)	4.00 ± 3.30	1.50 ± 0.60	1.4 ± 0.90	1.1 ± 0.60	0.03	0.03	0.09
Gi (a.u.)	0.80 ± 0.60	0.70 ± 0.45	1.75 ± 0.40	1.02 ± 0.60	0.04	0.0008	0.1
Expression of calcium handling proteins							
<i>n</i>	9	6	7	6			
SERCA2a	10.2 ± 5.0	8.8 ± 4.6	10.1 ± 8.0	7.5 ± 4.1	NS	NS	NS
PLB	19.3 ± 7.6	22.6 ± 7.0	15.3 ± 9.0	18.8 ± 15.0	NS	NS	NS
SERCA2a/PLB	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2	1.2 ± 1.0	0.9 ± 0.5	NS	0.02	NS

n, number of patients; CVF, collagen volume fraction; MyD, myocyte diameter; FibD, myofibrillar density; F_{passive} , passive tension; F_{active} , active tension; pCa₅₀, calcium sensitivity; PKA, protein kinase A; pTnI, phosphorylated troponin I; pTnT, phosphorylated troponin T; pMyBP-C, phosphorylated myosin-binding protein C; pDesmin, phosphorylated desmin; pMLC-2, phosphorylated myosin light chain-2; β_1 AR, beta1-adrenergic receptor; β_2 AR, beta2-adrenergic receptor; GRK2, G-coupled receptor kinase 2; GRK5, G-coupled receptor kinase 5; Gs, G-stimulatory; Gi, G-inhibitory; SERCA2a, sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺-ATPase (SERCA2a); PLB, phospholamban.

and MyBP-C, and lower expression of β_2 AR. Effects of β -blocker therapy unique to HFNEF were reduced interstitial fibrosis, regression of cardiomyocyte hypertrophy, elevated F_{passive} before and after PKA, elevated pCa₅₀ after PKA, and reduced expression of Gs. An effect of β -blocker therapy unique to HFREF was the reduced expression of Gi. Effect of β -blocker therapy on phosphorylation status of desmin also differed between HFNEF and HFREF with opposite changes in both groups.

Myocardial effects of β -blocker therapy present in both heart failure with normal left ventricular ejection fraction and heart failure with reduced left ventricular ejection fraction

Chronic β -blocker therapy was associated with increased pCa₅₀ of cardiomyocytes isolated from biopsies of both HFNEF and



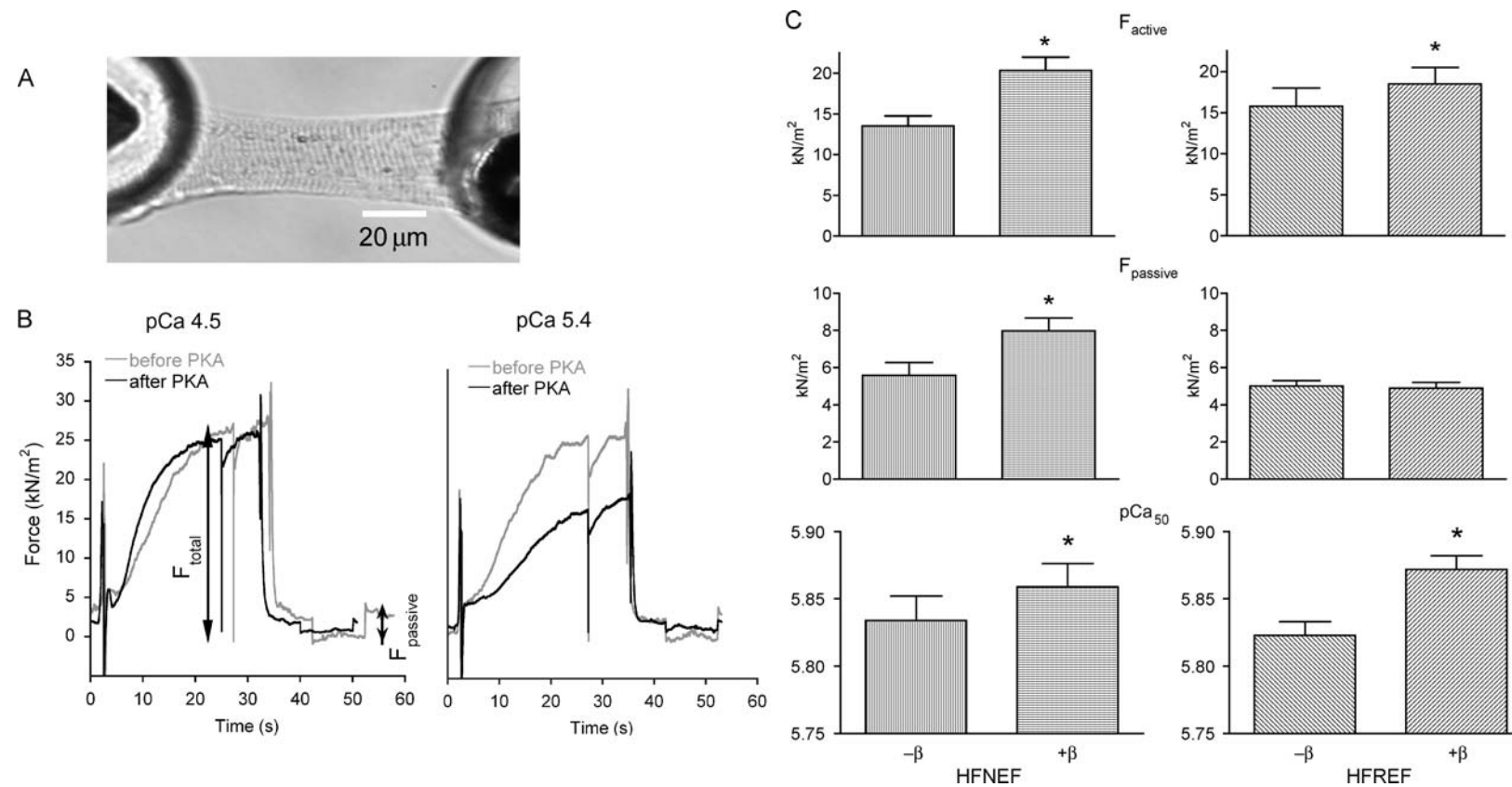


Figure 2 (A) Single cardiomyocyte from a heart failure with reduced left ventricular ejection fraction (HFREF) patient glued between a force transducer and a piezoelectric motor; (B) contraction–relaxation sequence recorded in a single cardiomyocyte of a HFREF patient before (grey line) and after (black line) treatment with protein kinase A, during maximal activation (pCa 4.5) and submaximal activation (pCa 5.4); (C) bar graphs showing effects of β -blocker therapy on F_{active} , $F_{passive}$ and pCa_{50} of single cardiomyocytes. β -blocker therapy increased F_{active} and pCa_{50} in both HFNEF and HFREF and increased $F_{passive}$ only in HFNEF (* $P < 0.05$, $-\beta$ vs. $+\beta$).

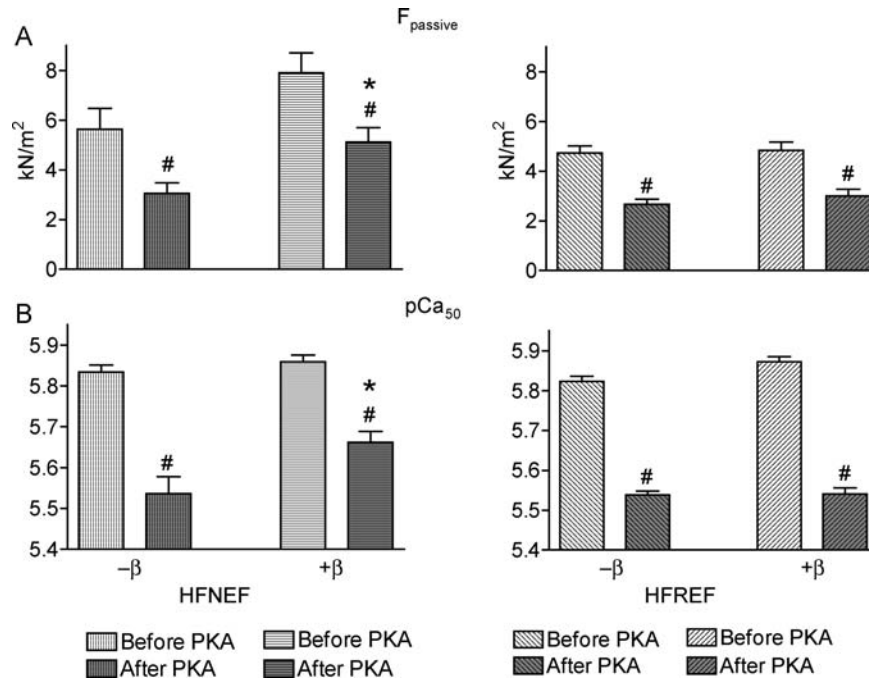


Figure 3 (A) Protein kinase A (PKA) treatment significantly reduced F_{passive} in all groups but F_{passive} remained higher in the β +HFNEF patients; (B) PKA treatment significantly reduced pCa_{50} in all groups but pCa_{50} remained higher in the β +HFNEF patients (* $P < 0.01$, $-\beta$ vs. $+\beta$; # $P < 0.01$, before PKA vs. after PKA).

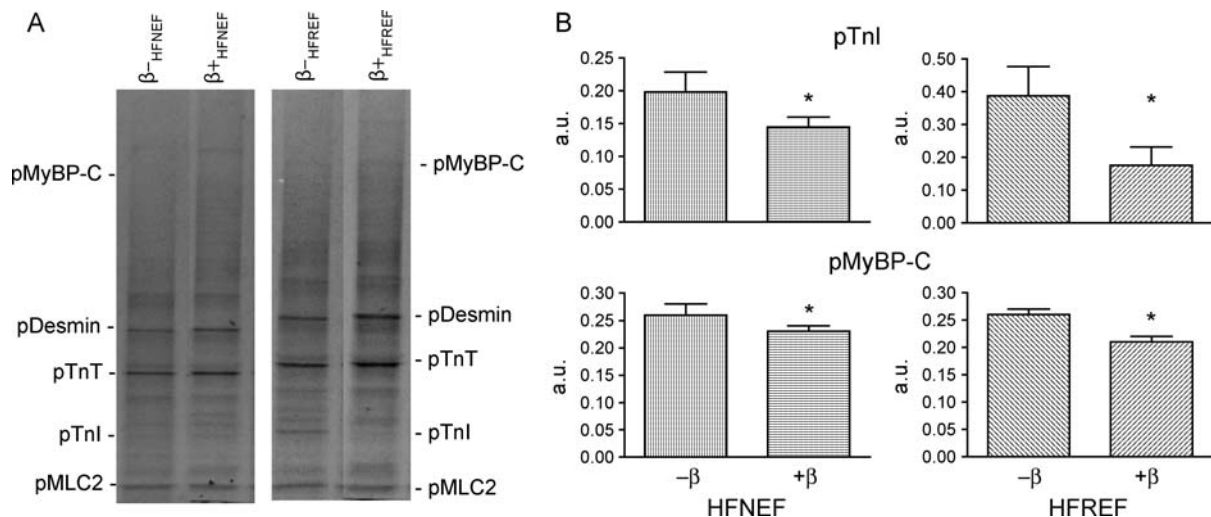


Figure 4 (A) Representative Pro-Q Diamond-stained gels of a β -HFNEF, β +HFNEF, β -HFREF, and β +HFREF myocardial sample; (B) phosphorylation status of TnI and of MyBP-C was significantly lower in β +HFNEF and β +HFREF patients compared with, β -HFNEF and β -HFREF patients, respectively. (* $P < 0.05$, $-\beta$ vs. $+\beta$).

HFREF patients. Increased pCa_{50} implies improved cardiomyocyte contractile performance within the physiological range of Ca^{2+} concentrations and could be explained by the observed fall in phosphorylation status of TnI.¹⁸ Chronic β -blocker therapy increased F_{active} at saturated $[\text{Ca}^{2+}]$. Although this Ca^{2+}

concentration is outside the physiological range, higher F_{active} also reflects an increased cardiomyocyte force generating capacity. The present study observed reduced phosphorylation of MyBP-C in both β -blocker therapy groups. This reduction could relate to the lack of preload dependence of $\text{LV dP/dt}_{\text{max}}$, which was

evident in both β -blocker therapy groups from the unchanged LV $dP/dt_{\max}$ despite lower LVEDP. Preload dependence of early LV pressure rise was recently demonstrated in transgenic mice to derive from phosphorylation of MyBP-C.^{19,20} Reduced phosphorylation of MyBP-C during chronic β -blocker therapy could have resulted both from lower PKA activity and from lower activity of Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase (CaM-kinase). CaM-kinase can phosphorylate MyBP-C and its activity is also enhanced by β -adrenergic receptor stimulation.^{21–23}

In longitudinal studies performing serial haemodynamic investigations in HFREF patients, before and during chronic β -blocker therapy, improved myocardial contractile performance was evident from higher LVEF and lower LV filling pressures.^{24–28} The present study confirmed lower LVEDP with β -blocker therapy in both HFNEF and HFREF groups. The enhanced pCa_{50} and increased F_{active} observed in isolated cardiomyocytes of β -blocker treated patients suggested improved cardiomyocyte contractile performance to contribute to the *in vivo* lowering of LVEDP induced by β -blocker therapy. The enhanced pCa_{50} and increased F_{active} could also have contributed to the lower LVEDP in the HFNEF patient group despite the increased F_{passive} of the β +HFNEF cardiomyocytes.

In sequential right ventricular biopsies of patients with dilated cardiomyopathy, cardiac β -receptor density increased during metoprolol²⁵ and carvedilol therapy.²⁷ A subsequent study using explanted hearts corroborated these findings and also observed restoration of cardiac β -receptor density by carvedilol treatment.²⁹ In the present study, which used LV biopsies, chronic β -blocker therapy had no effect on β_1 AR expression but downregulated β_2 AR expression. The present study, however, did not look at β AR density in membrane fractions but at β AR protein expression in homogenates. Downregulation of β_2 AR is beneficial for cardiac contractile performance because of less negative inotropy resulting from coupling of β_2 AR to Gi proteins.³⁰ Coupling of β_2 AR to Gi was recently also suggested to cause the apical LV dysfunction in patients with Takotsubo cardiomyopathy.³¹

Previous investigations²⁷ demonstrated that β -blocker therapy induced LV functional improvement in HFREF patients by altering expression of genes responsible for cardiomyocyte contractility. The present study also related LV functional amelioration during β -blocker therapy to improved cardiomyocyte contractility and did so in both HFREF and HFNEF patient groups. In contrast to previous studies, contractility of single cardiomyocytes was directly assessed and its improvement was evident from both higher pCa_{50} and F_{active} and linked to lower phosphorylation of TnI and MyBP-C and to reduced expression of β_2 AR.

Myocardial effects of β -blocker therapy unique to heart failure with normal left ventricular ejection fraction

Only in HFNEF patients, CVF was lower in the group with β -blockers. The absence of an effect of β -blockers on CVF in HFREF patients supports previous studies, which identified high myocardial fibrosis as an important predictor for poor outcome on β -blocker therapy in HFREF.^{32,33} The lower CVF observed in β +HFNEF patients was paralleled by a reduction of cardiomyocyte

hypertrophy evident from lower MyD. In spontaneously hypertensive rats, the β -blocker bisoprolol did not reverse cardiomyocyte hypertrophy in contrast to the ACE-I perindopril.³⁴ This study suggests that reduced renin–angiotensin system activity could possibly be involved in the observed regression of cardiomyocyte hypertrophy in the β +HFNEF patients. Both the reduced cardiomyocytes diameter (MyD) and lower CVF could have contributed to the lower LVEDP in HFNEF patients treated with β -blockers. In our previous study,⁵ we observed that both passive cardiomyocyte stiffness and CVF contribute to increased LVEDP. Hence, although F_{passive} was increased in the β +HFNEF, the lower LVEDP in this patient group probably resulted from less cardiomyocyte hypertrophy and lower CVF.

Previous longitudinal studies showed LV mass to decrease in both HFNEF¹⁵ and HFREF patients^{24,26,28} as a result of β -blocker therapy. Because of smaller LVEDVI, reduction of LV mass resulted in unaltered relative wall thickness in HFREF patients. In HFNEF patients, LV volumes remained unchanged and reduction of LV mass resulted in decreased relative wall thickness. The present study also observed unchanged LVMI/LVEDVI ratio in the HFREF group and a trend for reduced LVMI/LVEDVI ratio in the HFNEF group. The reversal of LV remodelling with β -blocker therapy therefore parallels the regression of cardiomyocyte hypertrophy observed in the present study with unchanged MyD in HFREF and decreased MyD in HFNEF.

Skinned cardiomyocytes isolated from biopsies of HFNEF patients have an elevated F_{passive} , which was higher than F_{passive} of HFREF cardiomyocytes⁴ or of normal cells.⁵ *In vitro* administration of PKA corrected the high F_{passive} of HFNEF cardiomyocytes, which was therefore attributed to phosphorylatable myofilamentary proteins.⁴ Within the HFNEF patient group, the present study observed higher F_{passive} in β +HFNEF patients than in β -HFNEF patients. After *in vitro* administration of PKA, F_{passive} was still higher in β +HFNEF patients. This finding suggests the effect of β -blocker therapy on cardiomyocyte F_{passive} in HFNEF relates not only to hypophosphorylation but also to structural or other posttranslational modifications of myofilamentary proteins. The persistent elevation of pCa_{50} after PKA observed in β +HFNEF cardiomyocytes also supports β -blocker therapy to induce additional modifications of myofilamentary proteins.

Heart failure with reduced LVEF is usually associated with reduced β_1 AR density and translocation of GRK2 to the plasma membrane. These changes in β -adrenergic signalling were not observed in a recently published HFNEF rat model.³⁵ Although the present study did not look at β AR density in membrane fractions but at β AR protein expression in homogenates, it found important differences in the expression of β_1 AR and GRK2 proteins between patient groups with higher myocardial expression of both proteins in HFREF than in HFNEF irrespective of the use of β -blockers. This unequal expression of β -adrenergic signalling proteins in both HF phenotypes could explain changes in other components of the β -adrenergic system by β -blocker therapy unique for each HF phenotype. Of the different components of the β -adrenergic system, Gs protein was significantly lower in HFNEF patients with β -blockers. Downregulation of β_2 AR-Gs signalling could be beneficial as it would favour β_2 AR-Gi signalling, which is known to exert antiapoptotic effects.³⁶ Because of normal

contractile LV function, potential negative inotropic effects resulting from increased β_2 AR-Gi signalling are less important for HFNEF patients.

Myocardial effects of β -blocker therapy unique to heart failure with reduced left ventricular ejection fraction

The reduced expression of Gi in HFREF patients treated with β -blockers could be beneficial, because Gi is upregulated in HFREF patients with a dilated hypocontractile LV and contributes to the blunted inotropic response to adrenergic stimulation observed in these patients.^{37,38} Desmin phosphorylation responded differently to β -blocker therapy with increased phosphorylation in HFNEF and decreased phosphorylation in HFREF. Most previous studies on myoflamentary proteins looked at desmin expression and not at desmin phosphorylation. Desmin loss has been observed in ischaemic cardiomyopathy,³⁹ disrupted desmin in doxorubicin-induced cardiotoxicity,⁴⁰ and desmin accumulation in restrictive cardiomyopathy.⁴¹ Only one study reported on desmin phosphorylation and linked desmin phosphorylation to myofibrillar disarray in cardiomyopathic hamster hearts.⁴² Based on this study, the reduced desmin phosphorylation in β +HFREF could be beneficial, as it would limit myofibrillar disarray in HFREF hearts.

Limitations

Patient recruitment of the present study was based on referral for diagnostic endomyocardial biopsy procurement. This resulted in a cross-sectional, non-randomized study design. Ethical restrictions only allowed for diagnostic biopsy procurement. This prevented a serial, randomized study design because follow-up biopsies would no longer serve diagnostic purposes. The cross-sectional, non-randomized study design could cause untreated patients to systematically differ from treated patients because of the presence of certain comorbidities for which β -blockers were contraindicated. Such comorbidities, which could have significantly confounded the study results, were however unlikely. Failure to use β -blockers in the β -HFREF group resulted mainly from the referring physician non-adhering to current guidelines as the majority of these patients (14/17) were started on β -blocker therapy during the same hospitalization. Furthermore, β -blockers were used in the β +HFNEF group for control of arterial hypertension (14/16) and/or previous atrial tachyarrhythmias (4/16). Prevalence of arterial hypertension was, however, similar in the β +HFNEF and β -HFNEF groups (Table 1) and, at the time of study, all patients were in regular sinus rhythm. The comparable LVEF in the β -HFREF and β +HFREF groups probably also resulted from patient recruitment based on referral for diagnostic endomyocardial biopsy procurement. This recruitment procedure introduced a bias consisting of more frequent referral for endomyocardial biopsy procurement in patients with a poor functional response to β -blocker therapy.

Conclusions

Myocardial effects associated with β -blocker therapy are either shared by HFNEF and HFREF groups, unique to HFNEF or unique to HFREF. The chronic β -blocker therapy consisted of

carvedilol 12.7 ± 3.0 mg b.i.d. and bisoprolol 5.6 ± 0.8 mg b.i.d. and was on average started 12 months prior to the study. Higher pCa_{50} , higher F_{active} , lower Tnl phosphorylation, and lower β_2 AR expression are shared and beneficial for cardiomyocyte contractile performance. Lower MyD and higher $F_{passive}$ are unique to HFNEF and probably relate to the hypertrophied and stiff cardiomyocytes characteristic of HFNEF. Unchanged CVF in HFREF confirms poor clinical outcome of β -blocker therapy in HFREF patients with intense myocardial fibrosis, whereas lower Gi in HFREF contributes to improve myocardial contractile performance. Unequal outcome of β -blocker therapy in HFNEF and HFREF could relate to myocardial effects of β -blocker therapy, which are unique to either HFNEF or HFREF.

Supplementary material

Supplementary material is available at *European Heart Journal* online.

Funding

This study was supported by ICar-VU PhD fellowship (2005 to Dr van der Velden).

Conflict of interest: none declared.

References

- Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2006;**355**:251–259.
- Kitzman DW, Little WC, Brubaker PH, Anderson RT, Hundley WG, Marburger CT, Brosnihan B, Morgan TM, Stewart KP. Pathophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure. *JAMA* 2002;**288**:2144–2150.
- Zile MR, Gaasch WH, Carroll JD, Feldman MD, Aurigemma GP, Schaefer GL, Ghali JK, Liebson PR. Heart failure with a normal ejection fraction: is measurement of diastolic function necessary to make the diagnosis of diastolic heart failure? *Circulation* 2001;**104**:779–782.
- van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 2006;**113**:1966–1973.
- Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 2005;**111**:774–781.
- van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbely A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 2008;**117**:43–51.
- Massie BM, Carson PE, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Zile MR, Anderson S, Donovan M, Iverson E, Staiger C, Ptaszynska A, the I-PRESERVE Investigators. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2008;**359**:2456–2467.
- Davis BR, Kostis JB, Simpson LM, Black HR, Cushman WC, Einhorn PT, Farber MA, Ford CE, Levy D, Massie BM, Nawaz S, ALLHAT Collaborative Research Group. Heart failure with preserved and reduced left ventricular ejection fraction in the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial. *Circulation* 2008;**118**:2259–2267.
- MERIT-HF Study group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;**353**:2001–2007.
- CIBIS-II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999;**353**:9–13.
- Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacs P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL, for the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;**344**:1651–1658.
- Dobre D, van Veldhuisen DJ, Dejongste MJ, Lucas C, Cleuren G, Sanderman R, Ranchor AV, Haaijer-Ruskamp FM. Prescription of beta-blockers in patients

- with advanced heart failure and preserved left ventricular ejection fraction. Clinical implications and survival. *Eur J Heart Fail* 2007;**9**:280–286.
13. Massie BM, Nelson JJ, Lukas MA, Greenberg B, Fowler MB, Gilbert EM, Abraham WT, Lottes SR, Franciosa JA. Comparison of outcomes and usefulness of carvedilol across a spectrum of left ventricular ejection fractions in patients with heart failure in clinical practice. *Am J Cardiol* 2007;**99**:1263–1268.
 14. Bergström A, Andersson B, Edner M, Nylander E, Persson H, Dahlström U. Effect of carvedilol on diastolic function in patients with diastolic heart failure and preserved systolic function. Results of the Swedish Doppler-echocardiographic study (SWEDIC). *Eur J Heart Fail* 2004;**6**:453–461.
 15. Nodari S, Metra M, Dei Cas L. Beta-blocker treatment of patients with diastolic heart failure and arterial hypertension. A prospective, randomized, comparison of the long-term effects of atenolol vs. nebivolol. *Eur J Heart Fail* 2003;**5**:621–627.
 16. Hori M, Kitabatake A, Tsutsui H, Okamoto H, Shirato K, Nagai R, Izumi T, Yokoyama H, Yasumura Y, Ishida Y, Matsuzaki M, Oki T, Sekiya M. Rationale and design of a randomized trial to assess the effects of beta-blocker in diastolic heart failure: Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF). *J Card Fail* 2005;**11**:542–547.
 17. Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbely A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL. How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;**28**:2539–2550.
 18. Kranias EG, Garvey JL, Srivastava RD, Solaro RJ. Phosphorylation and functional modifications of sarcoplasmic reticulum and myofibrils in isolated rabbit hearts stimulated with isoprenaline. *Biochem J* 1985;**226**:113–121.
 19. Stelzer JE, Patel JR, Walker JW, Moss RL. Differential roles of cardiac myosin-binding protein C and cardiac troponin I in the myofibrillar force responses to protein kinase A phosphorylation. *Circ Res* 2007;**101**:503–511.
 20. Nagayama T, Takimoto E, Sadayappan S, Mudd JO, Seidman JG, Robbins J, Kass DA. Control of in vivo left ventricular contraction/relaxation kinetics by myosin binding protein C: protein kinase A phosphorylation-dependent and -independent regulation. *Circulation* 2007;**116**:2399–2408.
 21. Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE Jr, Thiel W, Guatimosim S, Song LS, Madu EC, Shah AN, Vishnivetskaya TA, Atkinson JB, Gurevich VV, Salama G, Lederer WJ, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 2005;**11**:409–417.
 22. Curran J, Hinton MJ, Rios E, Bers DM, Shannon TR. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res* 2007;**100**:391–398.
 23. Sipido KR. CaM or cAMP: linking beta-adrenergic stimulation to 'leaky' RyRs. *Circ Res* 2007;**100**:296–298.
 24. Hall SA, Cigarroa CG, Marcoux L, Risser RC, Grayburn PA, Eichhorn EJ. Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol* 1995;**25**:1154–1161.
 25. Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P, Bristow MR. Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation* 1996;**94**:2817–2825.
 26. Lowes BD, Gill EA, Abraham WT, Larrain JR, Robertson AD, Bristow MR, Gilbert EM. Effects of carvedilol on left ventricular mass, chamber geometry, and mitral regurgitation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 1999;**83**:1201–1205.
 27. Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT, Minobe WA, Larrabee P, Ferguson D, Wolfel EE, Lindenfeld JA, Tsvetkova T, Robertson AD, Quaife RA, Bristow MR. Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med* 2002;**346**:1357–1365.
 28. Palazzuoli A, Bruni F, Puccetti L, Pastorelli M, Angori P, Pasqui AL, Auteri A. Effects of carvedilol on left ventricular remodeling and systolic function in elderly patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2002;**4**:765–770.
 29. Reiken S, Wehrens XH, Vest JA, Barbone A, Klotz S, Mancini D, Burkhardt D, Marks AR. Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation* 2003;**107**:2459–2466.
 30. Xiao RP, Zhang SJ, Chakir K, Avdonin P, Zhu W, Bond RA, Balke CW, Lakatta EG, Cheng H. Enhanced G(i) signaling selectively negates beta2-adrenergic receptor (AR)—but not beta1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation* 2003;**108**:1633–1639.
 31. Lyon AR, Rees PS, Prasad S, Poole-Wilson PA, Harding SE. Stress (Takotsubo) cardiomyopathy—a novel pathophysiological hypothesis to explain catecholamine-induced acute myocardial stunning. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008;**5**:22–29.
 32. Yamada T, Fukunami M, Ohmori M, Iwakura K, Kumagai K, Kondoh N, Minamino T, Tsujimura E, Nagareda T, Kotoh K. Which subgroup of patients with dilated cardiomyopathy would benefit from long-term beta-blocker therapy? A histologic viewpoint. *J Am Coll Cardiol* 1993;**21**:628–633.
 33. Suwa M, Ito T, Kobashi A, Yagi H, Terasaki F, Hirota Y, Kawamura K. Myocardial integrated ultrasonic backscatter in patients with dilated cardiomyopathy: prediction of response to beta-blocker therapy. *Am Heart J* 2000;**139**:905–912.
 34. Onodera T, Okazaki F, Miyazaki H, Minami S, Ito T, Seki S, Taniguchi M, Taniguchi I, Mochizuki S. Perindopril reverses myocyte remodeling in the hypertensive heart. *Hypertens Res* 2002;**25**:85–90.
 35. Nishio M, Sakata Y, Mano T, Ohtani T, Takeda Y, Miwa T, Hori M, Masuyama T, Kondo T, Yamamoto K. Beneficial effects of bisoprolol on the survival of hypertensive diastolic heart failure model rats. *Eur J Heart Fail* 2008;**10**:446–453.
 36. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 1999;**100**:2210–2212.
 37. Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Doring V, Kalmar P, Hoppner W. Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res* 1992;**70**:688–696.
 38. Bohm M, Eschenhagen T, Gierschik P, Larisch K, Lensche H, Mende U, Schmitz W, Schnabel P, Scholz H, Steinfath M, Erdmann E. Radioimmunochemical quantification of Gi alpha in right and left ventricles from patients with ischaemic and dilated cardiomyopathy and predominant left ventricular failure. *J Mol Cell Cardiol* 1994;**26**:133–149.
 39. Di Somma S, Di Benedetto MP, Salvatore G, Agozzino L, Ferranti F, Esposito S, La Dogana P, Scarano MI, Caputo G, Cotrufo M, Santo LD, de Divitiis O. Desmin-free cardiomyocytes and myocardial dysfunction in end stage heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004;**6**:389–398.
 40. Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* 2005;**111**:1601–1610.
 41. Zhang J, Kumar A, Stalker HJ, Viridi G, Ferrans VJ, Horiba K, Fricker FJ, Wallace MR. Clinical and molecular studies of a large family with desmin-associated restrictive cardiomyopathy. *Clin Genet* 2001;**59**:248–256.
 42. Huang X, Li J, Foster D, Lemanski SL, Dube DK, Zhang C, Lemanski LF. Protein kinase C-mediated desmin phosphorylation is related to myofibril disarray in cardiomyopathic hamster heart. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;**227**:1039–1046.

Circulation Research

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Hypophosphorylation of the Stiff N2B Titin Isoform Raises Cardiomyocyte Resting Tension in Failing Human Myocardium

Attila Borbély, Ines Falcao-Pires, Loek van Heerebeek, Nazha Hamdani, István Édes,
Cristina Gavina, Adelino F. Leite-Moreira, Jean G.F. Bronzwaer, Zoltán Papp,
Jolanda van der Velden, Ger J.M. Stienen and Walter J. Paulus

Circ. Res. 2009;104;780-786; originally published online Jan 29, 2009;

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193326

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas,
TX 75214

Copyright © 2009 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7330. Online
ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/cgi/content/full/104/6/780>

Subscriptions: Information about subscribing to Circulation Research is online at
<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters
Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax:
410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Hypophosphorylation of the Stiff N2B Titin Isoform Raises Cardiomyocyte Resting Tension in Failing Human Myocardium

Attila Borbély,* Ines Falcao-Pires,* Loek van Heerebeek, Nazha Hamdani, István Édes, Cristina Gavina, Adelino F. Leite-Moreira, Jean G.F. Bronzwaer, Zoltán Papp, Jolanda van der Velden, Ger J.M. Stienen, Walter J. Paulus

Abstract—High diastolic stiffness of failing myocardium results from interstitial fibrosis and elevated resting tension (F_{passive}) of cardiomyocytes. A shift in titin isoform expression from N2BA to N2B isoform, lower overall phosphorylation of titin, and a shift in titin phosphorylation from N2B to N2BA isoform can raise F_{passive} of cardiomyocytes. In left ventricular biopsies of heart failure (HF) patients, aortic stenosis (AS) patients, and controls (CON), we therefore related F_{passive} of isolated cardiomyocytes to expression of titin isoforms and to phosphorylation of titin and titin isoforms. Biopsies were procured by transvascular technique (44 HF, 3 CON), perioperatively (25 AS, 4 CON), or from explanted hearts (4 HF, 8 CON). None had coronary artery disease. Isolated, permeabilized cardiomyocytes were stretched to 2.2- μm sarcomere length to measure F_{passive} . Expression and phosphorylation of titin isoforms were analyzed using gel electrophoresis with ProQ Diamond and SYPRO Ruby stains and reported as ratio of titin (N2BA/N2B) or of phosphorylated titin (P-N2BA/P-N2B) isoforms. F_{passive} was higher in HF ($6.1 \pm 0.4 \text{ kN/m}^2$) than in CON ($2.3 \pm 0.3 \text{ kN/m}^2$; $P < 0.01$) or in AS ($2.2 \pm 0.2 \text{ kN/m}^2$; $P < 0.001$). Titin isoform expression differed between HF (N2BA/N2B = 0.73 ± 0.06) and CON (N2BA/N2B = 0.39 ± 0.05 ; $P < 0.001$) and was comparable in HF and AS (N2BA/N2B = 0.59 ± 0.06). Overall titin phosphorylation was also comparable in HF and AS, but relative phosphorylation of the stiff N2B titin isoform was significantly lower in HF (P-N2BA/P-N2B = 0.77 ± 0.05) than in AS (P-N2BA/P-N2B = 0.54 ± 0.05 ; $P < 0.01$). Relative hypophosphorylation of the stiff N2B titin isoform is a novel mechanism responsible for raised F_{passive} of human HF cardiomyocytes. (*Circ Res.* 2009;104:780-786.)

Key Words: myocardium ■ heart failure ■ diastole ■ titin

Diastolic left ventricular (LV) dysfunction importantly contributes to heart failure (HF) with either reduced LV ejection fraction (EF) (HFREF) or with normal LV ejection fraction (HFNEF).¹ In HFREF, diastolic LV dysfunction correlates with exercise intolerance²; in HFNEF, diastolic LV dysfunction is an essential diagnostic feature.^{3,4} Diastolic LV dysfunction has usually been attributed to interstitial fibrosis because of an imbalance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors.^{5,6} Recently high resting tension (F_{passive}) of cardiomyocytes has also been implicated in diastolic LV dysfunction.⁷⁻⁹ Cardiomyocytes from patients with HFNEF have higher F_{passive} than cardiomyocytes from patients with HFREF and cardiomyocytes from both HF groups have higher F_{passive} than cardiomyocytes from controls (CON).⁷⁻⁹ In vitro administration of protein kinase (PK)A to HF cardiomyocytes lowers their elevated F_{passive} to the level

observed in CON cardiomyocytes,^{7,8} whereas F_{passive} of CON cardiomyocytes does not respond to PKA.⁷

Alterations in cardiomyocyte F_{passive} have been attributed to the giant cytoskeletal protein titin,⁸ which can modulate F_{passive} through isoforms shifts¹⁰⁻¹² and phosphorylation status.¹³⁻¹⁷ In explanted hearts of HFREF patients with ischemic or nonischemic cardiomyopathy,¹⁰⁻¹² myocardial titin isoform expression shifts from the stiff N2B to the compliant N2BA isoform with a resultant rise of the N2BA/N2B ratio. In pooled endomyocardial biopsy samples of HFNEF patients, the N2BA/N2B ratio is lower than in HFREF patients,⁸ and the corresponding higher expression of the stiff N2B isoform could explain the higher F_{passive} in HFNEF cardiomyocytes. Correction of the high F_{passive} of skinned HF cardiomyocytes by PKA suggests a phosphorylation deficit of titin or of other myofilamentary proteins to be also involved.

Original received August 12, 2008; resubmission received December 23, 2008; accepted January 21, 2009.

From the Department of Physiology (A.B., I.F.-P., L.v.H., N.H., J.v.d.V., G.J.M.S., W.J.P.) and Cardiology (J.G.F.B.), Institute for Cardiovascular Research, VU University Medical Center Amsterdam, The Netherlands; Institute of Cardiology (A.B., I.É., Z.P.), University of Debrecen Medical and Health Science Center, Debrecen, Hungary; and Department of Physiology (I.F.-P., C.G., A.F.L.-M.), Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal.

*Both authors contributed equally to this study.

Correspondence to Prof Dr Walter J. Paulus, MD, PhD, Laboratory of Physiology, VU University Medical Center Amsterdam, Van der Boechorststraat 7, 1081 BT Amsterdam, The Netherlands. E-mail wj.paulus@vumc.nl

© 2009 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193326

Table. Clinical and Hemodynamic Patient Data

	CON (n=7)	AS (n=25)	HFNEF (n=17)	HFREF (n=27)
Age, yr	61±5	67±3	66±3	56±3
LVEF, %	65±3	65±2	61±4	28±2‡§¶
LVEDVI, mL/m ²	75±7	56±4	82±5	130±7‡§¶
LVEDP, mm Hg	11±1	21±1‡	24±1‡	22±2‡
LVMI, g/m ²	98±4	132±6*	113±5	161±8‡¶
LV Stiff Mod, kN/m ²	2.2±0.2	6.0±0.3‡	6.1±0.7‡	5.0±0.8
LVEDWS, kN/m ²	2.9±0.2	4.0±0.3‡	5.5±0.4‡	8.7±0.7‡§¶

**P*<0.05 vs CON, †*P*<0.01 vs CON, ‡*P*<0.001 vs CON, §*P*<0.001 vs AS, ¶*P*<0.001 vs HFNEF.

Phosphorylation of the cardiac-specific N2B spring element of titin by PKA reduces F_{passive} of rat cardiomyocytes¹³ and of rat cardiac myofibrils.¹⁴ This phosphorylation-induced reduction of F_{passive} is titin isoform-dependent, with the largest effect observed in rat ventricular myocardium, which has an N2BA/N2B ratio of ≈ 0.1 , and the smallest effect in bovine atrial myocardium, which has an N2BA/N2B ratio of ≈ 9 .¹⁶ Apart from phosphorylation by PKA, the cardiac-specific N2B spring element of titin can also be phosphorylated by PKG, with a similar reduction of cardiomyofibrillar stiffness.¹⁵ Lower cardiomyocyte F_{passive} after PKA or PKG can result not only from phosphorylation of titin but also from less diastolic actin-myosin interaction of weakly bound crossbridges. An effect of weakly bound crossbridges on cardiomyocyte F_{passive} is unlikely in normal myocardium but possible in failing myocardium because of its increased myofilamentary calcium sensitivity.^{18,19}

The present study investigates the importance for the high F_{passive} in HF cardiomyocytes of: (1) titin isoform expression; (2) titin phosphorylation; (3) titin isoform phosphorylation; (4) phosphorylation of other myofilamentary proteins; and (5) formation of weakly bound crossbridges. All measurements were performed using human LV myocardial samples derived from transvascular biopsies, surgical biopsies, and explanted hearts. Transvascular procurement allowed HF patients with less advanced HF to be included in the study.

Patients and Methods

Patients

The HF group consisted of 48 patients and was composed of 2 subgroups: (1) 44 patients hospitalized for worsening HF (New York Heart Association [NYHA] class IV) and referred for cardiac catheterization and transvascular endomyocardial biopsy because of suspicion of infiltrative or inflammatory myocardial disease; and (2) 4 patients with end-stage dilated cardiomyopathy referred for cardiac transplantation. In all HF patients, coronary angiography revealed absence of significant (>50% luminal diameter reduction) coronary artery stenoses and histological examination of the biopsies or of the explanted hearts ruled out active inflammatory or infiltrative myocardial disease. Treatment consisted of angiotensin converting enzyme inhibitors (48/48), diuretics (48/48) and β -blockers (25/48). The 44 HF patients referred for cardiac catheterization and endomyocardial biopsy consisted of 27 HFREF patients and of 17 HFNEF patients. Their hemodynamic data are listed in the Table. The 4 HF patients referred for cardiac transplantation all had HFREF. Their hemodynamic data were not included in the Table because of the long time interval between hemodynamic evaluation

and cardiac transplantation. All patients with HFREF had a LVEF <45%. All patients with HFNEF satisfied the criteria for the diagnosis of HFNEF as recently proposed in a consensus document of the Heart Failure and Echocardiography associations of the European Society of Cardiology.⁴

The CON group consisted of 15 patients and was composed of 3 subgroups: (1) 3 patients with normal LV function and major ventricular arrhythmias; (2) 4 patients with normal LV function and mitral stenosis; and (3) 8 explanted donor hearts. Transvascular LV biopsies were obtained in the first subgroup. In the second subgroup, perioperative transmural LV biopsies were obtained at the time of mitral valve replacement. The endomyocardial portion of the transmural biopsy was used to allow for comparison with the endomyocardial biopsies of the HF patients. No patient had significant (>50% luminal diameter reduction) coronary artery disease. Donors did not undergo hemodynamic evaluation before explantation and their hemodynamic data were therefore not included in the Table.

The AS group consisted of 25 patients with significant and symptomatic aortic valve stenosis (mean aortic valve area: 0.5 ± 0.3 cm²). Patients had syncope, angina, and/or dyspnea ($\leq$ NYHA class II). Their hemodynamic data are also listed in the Table. No patient had significant (>50% luminal diameter reduction) coronary artery disease. In the AS group, LV myocardial samples were procured perioperatively at the time of aortic valve replacement by transmural biopsy. The endomyocardial portion of the transmural biopsy was used to allow for comparison with the endomyocardial biopsies of the HF patients.

The local ethics committee approved the study protocol. Written informed consent was obtained, and there were no complications related to catheterization or biopsy procurement.

F_{passive} Measurements in Isolated Cardiomyocytes

Force measurements were performed in single, mechanically isolated cardiomyocytes as described previously.⁷⁻⁹ Force measurements were obtained in cardiomyocytes isolated from transvascular biopsies (CON: *n*=3; HF: *n*=25) and perioperative biopsies (CON: *n*=4; AS: *n*=18). Biopsy samples (5 mg wet weight) were defrosted in relaxing solution, mechanically disrupted and incubated for 5 minutes in relaxing solution supplemented with 0.2% Triton X-100 to remove all membrane structures. Single cardiomyocytes were subsequently attached with silicone adhesive between a force transducer and a piezoelectric motor (2.7 ± 0.4 cardiomyocytes per patient). Sarcomere length of isolated cardiomyocytes was adjusted to $2.2 \mu\text{m}$. To assess the effect of PKA on the F_{passive} , myocytes were incubated for 40 minutes in relaxing solution supplemented with the catalytic subunit of PKA (100 U/mL; Sigma, batch 12K7495) and dithiothreitol (6 mmol/L; Sigma). To study the effect of PKG, F_{passive} measurements were also performed after incubation of HF cardiomyocytes in relaxing solution containing PKG1 α (0.1 U/mL; Sigma, batch 034K1336), guanosine cGMP (10 $\mu\text{mol/L}$, Sigma) and dithiothreitol (6 mmol/L; Sigma). After 40 minutes of incubation with PKG, F_{passive} measurements were repeated. Thereafter, cardiomyocytes were incubated with PKA, as described above, and their F_{passive} were reassessed. To study the contribution of the thin filament to F_{passive} , HF cardiomyocytes were incubated for 40 minutes with the actin-capping protein gelsolin (0.05 mg/mL; clone FX-45, kindly provided by Prof Dr Henk Granzier [University of Arizona, Tucson]²⁰) and subsequently exposed to PKA. To investigate the involvement of weak crossbridge interaction, F_{passive} of HF cardiomyocytes was also measured in relaxing solution containing 2,3-butanedione monoxime (BDM) (40 mmol/L for 5 minutes; Sigma). Force values were normalized for myocyte cross-sectional area.

Titin Isoform Separation

Titin isoform separation was performed in myocardial samples of 10 HF patients, 9 AS patients, and 8 CON subjects. For 6 HF patients, the myocardial sample was procured by transvascular biopsy and for 4 HF patients the myocardial sample was derived from an explanted heart. For all CON subjects, the myocardial sample was derived from an explanted donor heart. Tissue samples were homogenized in 100

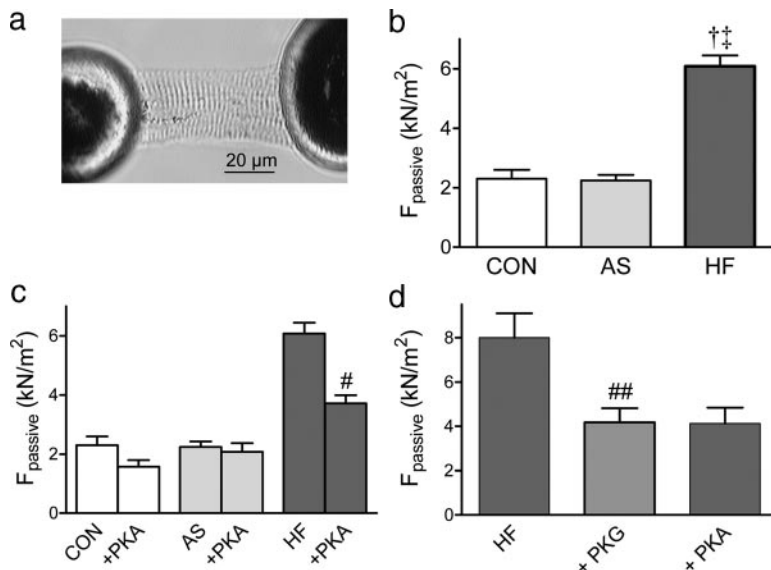


Figure 1. Measurement of cardiomyocyte F_{passive} . a, Single cardiomyocyte attached to a force transducer and an adjustable lever used to stretch the cardiomyocyte to 2.2-μm sarcomere length. b, Higher F_{passive} in cardiomyocytes of HF patients compared to CON group ($\dagger P < 0.01$ vs CON) and AS patients ($\ddagger P < 0.001$ vs AS). c, After in vitro administration of PKA, F_{passive} fell in HF cardiomyocytes ($\# P < 0.0001$ vs HF). d, PKG administration also significantly lowered F_{passive} of HF cardiomyocytes ($\## P < 0.0001$ vs HF; $n = 18$); however, no further decrease in F_{passive} was detected on subsequent PKA treatment.

to 200 μL Tris-sodium dodecyl sulfate buffer (pH 6.8) containing 8 μg/mL leupeptin (Peptin-Institute, Japan) and phosphatase inhibitor cocktails (PIC I [P2850] and PIC II [P5726], 10 μL/mL from each; Sigma). Samples were heated (3 minutes at 99°C) and centrifuged (10 minutes, 13,000g at 0°C). Each sample (≈ 40 μg dry weight) was applied on agarose-strengthened 2% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. The gel was run at 4-mA constant current for ≈ 16 hours. Gels were washed and stained with SYPRO Ruby (Molecular Probes, Eugene, Ore) according to the instructions of the manufacturer. Staining was analyzed with a LAS-3000 system (Fuji Science Imaging Systems) and AIDA Image analyzer software (Isotopen-meßgeräte GmbH, Staubenhardt, Germany).²¹

Myofilamentary Protein and Titin Isoform Phosphorylation

Myofilamentary protein separation and phosphorylation were determined in myocardial samples procured by transvascular biopsy in 8 HF patients and by perioperative biopsy in 7 AS patients. Tissue was dissolved in 1D sample buffer containing 100 mmol/L dithiothreitol, PIC I, PIC II, and protease inhibitor cocktail (10 μL/mL, P 8340, Sigma), heated (3 minutes at 99°C) and centrifuged (10 minutes, 13,000 g at 0°C), and a sample (≈ 35 μg dry weight in 25 μL) was applied on a 3% to 8% gradient gel (Criterion, Bio-Rad). The gel was run at 100 V for 30 minutes followed by 200 V for 50 minutes. The gels were stained for 90 minutes with ProQ Diamond (Molecular Probes). Thereafter, the gels were washed and subsequently stained with SYPRO Ruby (Molecular Probes).²¹ The intensity of the myosin binding protein-C band was used to normalize for differences in protein loading.

Titin isoform phosphorylation was determined in perioperative biopsies of 9 AS patients and in transvascular biopsies of 6 HF patients. Tissue samples were handled as for titin isoform separation. The gels were subsequently stained with ProQ Diamond and with SYPRO Ruby and analyzed as described above.

Statistical Analysis

Values are given as means $\pm$ SEM. Statistical significance was set at $P < 0.05$ and was obtained for multiple comparisons between groups by ANOVA followed by a Bonferroni test. Relationships between 2 continuous variables were assessed with linear regression analysis. Statistical analysis was performed with SPSS (version 9.0, SPSS Inc, Chicago, Ill).

Results

F_{passive} of Isolated Cardiomyocytes

Cardiomyocytes were isolated from myocardial samples of the CON ($n = 7$), AS ($n = 18$), and HF ($n = 25$) groups and

stretched to an identical sarcomere length of 2.2 μm before measuring F_{passive} (Figure 1a). F_{passive} in HF cardiomyocytes (6.1 ± 0.4 kN/m²) was higher than in CON cardiomyocytes (2.3 ± 0.3 kN/m²; $P < 0.01$) or in AS cardiomyocytes (2.2 ± 0.2 kN/m²; $P < 0.001$) (Figure 1b). Following administration of PKA, the high F_{passive} of HF cardiomyocytes fell (Figure 1c). The high F_{passive} of HF cardiomyocytes also fell on administration of PKG and remained unaltered on subsequent treatment with PKA (Figure 1d). The high F_{passive} of HF cardiomyocytes was unaltered after 40 minutes of exposure to gelsolin despite maximal Ca^{2+} activated force falling below 10% of the baseline value. Subsequent administration of PKA continued to induce a significant fall in F_{passive} ($P < 0.05$; $n = 4$). Gelsolin exposure confirms involvement of titin in the high F_{passive} because it removes the thin filament from the cardiomyocytes.²⁰ A contribution of crossbridge cycling to F_{passive} was ruled out by experiments exposing HF cardiomyocytes to BDM. In these experiments BDM failed to alter cardiomyocyte F_{passive} ($n = 4$).

Titin Isoform Expression

Titin isoform expression was determined in myocardial samples of CON ($n = 8$), AS ($n = 9$) and HF patients ($n = 10$) (Figure 2a). HF patients (0.73 ± 0.06 ; $P < 0.001$) and AS patients (0.59 ± 0.06 ; $P < 0.05$) had an N2BA/N2B ratio higher than the CON group (0.39 ± 0.05) (Figure 2b). For 6 HF and all AS patients, myocardial biopsy occurred, respectively, at the time of hemodynamic data acquisition or shortly thereafter. Correlations between N2BA/N2B ratio and hemodynamic variables were limited to this group. A significant correlation ($r = 0.71$; $P < 0.01$) was observed between N2BA/N2B ratio and LV end-diastolic wall stress (LVEDWS) (Figure 2c).

Overall Titin Phosphorylation and Titin Isoform Phosphorylation

Because titin isoform expression differed between HF and CON, unequal titin isoform expression could have contributed to the difference in F_{passive} between HF and CON

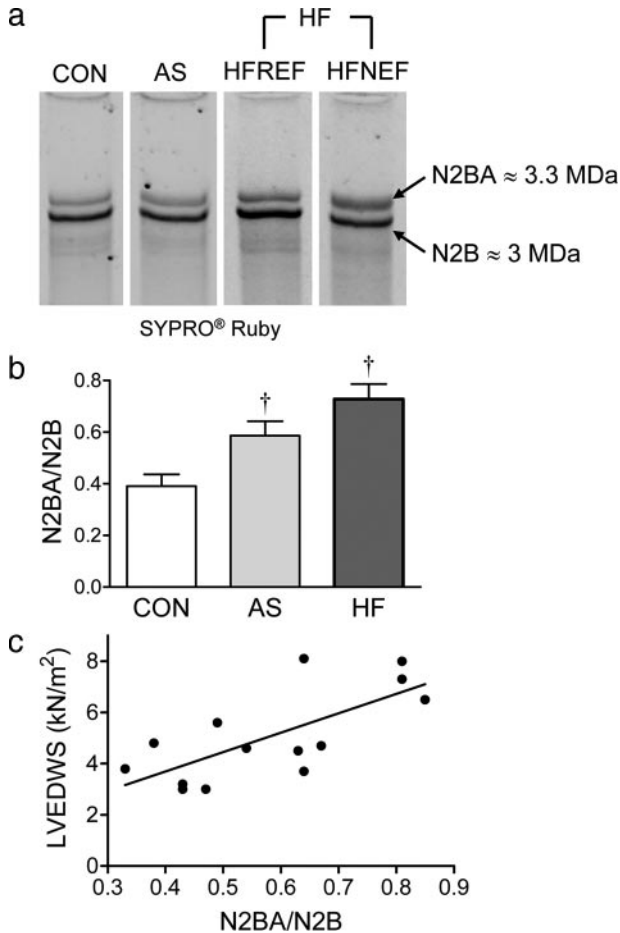


Figure 2. Titin isoform expression. a, Representative examples of titin isoform separation. b, Higher N2BA/N2B ratio in HF and AS patients than in the CON group ($\dagger P < 0.05$ vs CON). c, Correlation between N2BA/N2B ratio and LVEDWS ($r = 0.71$; $P < 0.01$).

cardiomyocytes. However, because titin isoform expression was comparable in HF and AS, mechanisms other than a titin isoform shift had to account for raising F_{passive} in HF cardiomyocytes compared to AS cardiomyocytes. Overall phosphorylation of titin was therefore compared between HF and AS patients (Figure 3a). The ratio of phosphorylated titin to total titin was similar in HF and AS samples (0.29 ± 0.02 versus 0.30 ± 0.02 ; $P = 0.84$). Similar ratios of phosphorylated to total protein were also observed for myosin binding protein-C (0.21 ± 0.02 versus 0.26 ± 0.03 ; $P = 0.23$), desmin (0.35 ± 0.05 versus 0.34 ± 0.05 ; $P = 0.93$), troponin T (0.48 ± 0.04 versus 0.55 ± 0.05 ; $P = 0.32$), and myosin light chain-2 (0.27 ± 0.02 versus 0.31 ± 0.01 ; $P = 0.09$) (values indicate HF versus AS, respectively) (Figure 3a). Only troponin I had a lower ratio of phosphorylated to total protein in HF compared to AS (0.12 ± 0.01 versus 0.16 ± 0.02 ; $P = 0.048$).

Because titin isoform expression and overall titin phosphorylation were comparable in HF and AS patients, the phosphorylation status of the respective N2BA and N2B titin isoforms was subsequently investigated in myocardial samples of HF and AS patients (Figure 3b). The P-N2BA/P-N2B ratio was higher in HF (0.77 ± 0.05) than in AS (0.54 ± 0.05 ; $P < 0.01$) (Figure 3c), consistent with lower phosphorylation of the stiff N2B and higher phosphorylation of the compliant

N2BA titin isoform. Lower phosphorylation of N2B explains the elevated F_{passive} of HF cardiomyocytes because titin phosphorylation was previously shown to lower F_{passive} in an isoform-dependent manner, with a larger fall in F_{passive} when more of the stiff N2B isoform was phosphorylated.¹⁶ The P-N2BA/P-N2B ratio correlated with the N2BA/N2B ratio in AS patients ($r = 0.68$; $P < 0.05$) (Figure 3d). This correlation was absent in HF patients.

HFNEF Versus HFREF

In previous studies, F_{passive} was especially elevated in cardiomyocytes isolated from LV myocardium of HFNEF patients.^{7–9} F_{passive} , titin isoform expression and titin isoform phosphorylation were therefore compared in subgroups of HFNEF and HFREF patients (Figure 4a through 4e), whose hemodynamic characteristics are shown in the Table. HFREF patients had the highest N2BA/N2B ratio (0.77 ± 0.07) (Figure 4b). LVEDWS was also highest in HFREF (8.7 ± 0.7 kN/m²) (Figure 4c). F_{passive} (7.4 ± 0.7 kN/m²) and the PKA-induced decrease in F_{passive} (-3.2 ± 0.6 kN/m²) were largest in HFNEF (Figure 4d). F_{passive} and the PKA-induced absolute change in F_{passive} rose from AS to HFREF and to HFNEF (Figure 4e) ($P < 0.05$ for trend). The deficit of N2B titin isoform phosphorylation followed a similar course also rising from AS to HFREF and to HFNEF (Figure 4e) ($P < 0.05$ for trend). The deficit was expressed as the difference between observed P-N2BA/P-N2B ratio and predicted P-N2BA/P-N2B ratio. The predicted P-N2BA/P-N2B ratio was derived from the observed N2BA/N2B ratio and the equation describing the linear curve fit of Figure 3d. A larger N2B titin isoform phosphorylation deficit in HFNEF patients explains both their higher F_{passive} and their larger PKA-induced fall of F_{passive} .

Discussion

High F_{passive} of HF Cardiomyocytes and Titin

In the present study, F_{passive} was twice as high in human HF cardiomyocytes than in human AS cardiomyocytes. The high F_{passive} of HF cardiomyocytes fell after in vitro administration of PKA or PKG but remained unchanged after in vitro administration of BDM or gelsolin. The PKA- and PKG-induced decrease in F_{passive} suggested a phosphorylation deficit of myofilamentary proteins, which are a target for both PKA and PKG. Only troponin I and titin have so far been identified as myofilamentary proteins targeted by both PKA and PKG.^{15,22} The present study observed a phosphorylation deficit of troponin I in HF myocardium. The concomitant increase in myofilamentary calcium sensitivity could promote diastolic actin–myosin interaction and thereby raise F_{passive} in HF cardiomyocytes.¹⁹ Such an effect of weakly bound cross-bridges on F_{passive} was however ruled out by the unchanged F_{passive} following exposure to BDM, which inhibits cross-bridge cycling. Involvement of the giant cytoskeletal protein titin in the high F_{passive} of HF cardiomyocytes was suggested by unaltered F_{passive} after gelsolin, which removes the thin filament from the cardiomyocytes.^{20,23,24} Effective thin filament removal was evident from the fall in maximal Ca^{2+} -activated force to less than 10% of its baseline value. The ability of PKA to lower F_{passive} after thin filament removal

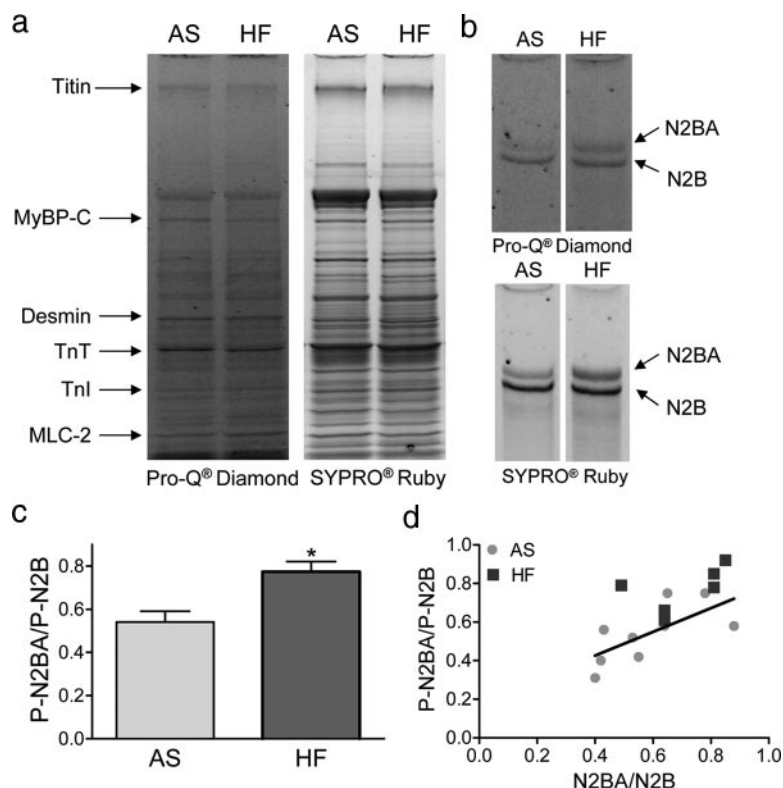


Figure 3. Overall titin and titin isoform phosphorylation. **a**, Comparison between a representative AS and HF patient of phosphorylation of myofilamentary proteins using sequential gel electrophoresis with ProQ Diamond phosphoprotein and SYPRO Ruby protein stain. **b**, Comparison between a representative AS and HF patient of phosphorylation of titin isoforms using sequential gel electrophoresis with SYPRO Ruby and ProQ Diamond phosphoprotein stain. **c**, Higher P-N2BA/P-N2B ratio in HF than in AS (* $P < 0.01$). **d**, Correlation between P-N2BA/P-N2B ratio and N2BA/N2B ratio in AS patients ($r = 0.68$; $P < 0.05$). All HF patients fell above the regression line.

implied phosphorylation of titin to mediate the PKA-induced fall in F_{passive} .

The present study observed titin isoform expression to be comparable in HF and AS myocardium. Mechanisms other than a titin isoform shift therefore had to account for the difference in F_{passive} between HF and AS cardiomyocytes. Overall titin phosphorylation was also similar in HF and AS myocardium. However, relative titin isoform phosphorylation was different, with less N2B isoform phosphorylated in HF than in AS myocardium. Less N2B titin isoform phosphorylation was previously shown to raise F_{passive} ,¹⁶ and the observed hypophosphorylation of the stiff N2B titin isoform relative to the compliant N2BA titin isoform could therefore explain the higher F_{passive} in HF cardiomyocytes.

Titin Isoform Expression

In a subgroup of HF and AS patients, hemodynamic data were obtained either at the time of transvascular biopsy or shortly before perioperative biopsy. In these patient groups, myocardial titin isoform expression could accurately be correlated with hemodynamic variables. The closest correlation observed was between N2BA/N2B ratio and LVEDWS (Figure 2c). The higher expression of the compliant N2BA titin isoform at higher LVEDWS implies titin isoform shifts to be a compensatory mechanism whereby higher expression of the compliant N2BA titin isoform compensates for an elevated LVEDWS. A compensatory role of titin isoform shifts has previously also been suggested in patients with dilated cardiomyopathy, in whom the N2BA/N2B ratio correlated with the LV end-diastolic volume/pressure ratio, a measure of end-diastolic LV distensibility, and with peak oxygen consumption during exercise.¹¹ The time span over

which LVEDWS rises is probably an important determinant for shifts in titin isoform expression because 2 canine dilated cardiomyopathy models with rapid elevation of LVEDWS induced by pacing tachycardia or by intracoronary microembolizations revealed an opposite shift with overexpression of the stiff N2B titin isoform.^{25–27} Furthermore, the correlation observed in the present study between N2BA/N2B ratio and LVEDWS is also consistent with stress-sensing abilities of titin. Stress-sensing abilities of titin reside both in its kinase domain at the M-line²⁸ and in the titin/Tcap/muscle LIM protein complex at the Z-disc.²⁹

Titin Isoform Phosphorylation

Higher F_{passive} in HF than in AS cardiomyocytes was attributed to a shift in isoform phosphorylation with more of the N2BA and less of the N2B titin isoform phosphorylated in HF myocardium. Previous studies indeed demonstrated less reduction in F_{passive} when the compliant N2BA titin isoform is phosphorylated than when the stiff N2B titin isoform is phosphorylated.¹⁶ The present study not only observed higher N2BA titin isoform phosphorylation in HF myocardium but also a loss in HF myocardium of the close relationship between titin isoform expression and titin isoform phosphorylation, which was present in AS myocardium (Figure 3d). The uniformly low F_{passive} observed in AS cardiomyocytes despite the N2BA/N2B titin isoform ratio ranging from 0.4 to 0.9 (Figure 3d), probably resulted from the concordant changes in titin isoform expression and phosphorylation in AS myocardium, whereby higher N2B titin isoform phosphorylation offsets a rise of F_{passive} induced by higher N2B titin isoform expression. In HF myocardium, this concordance between titin isoform expression and phosphorylation

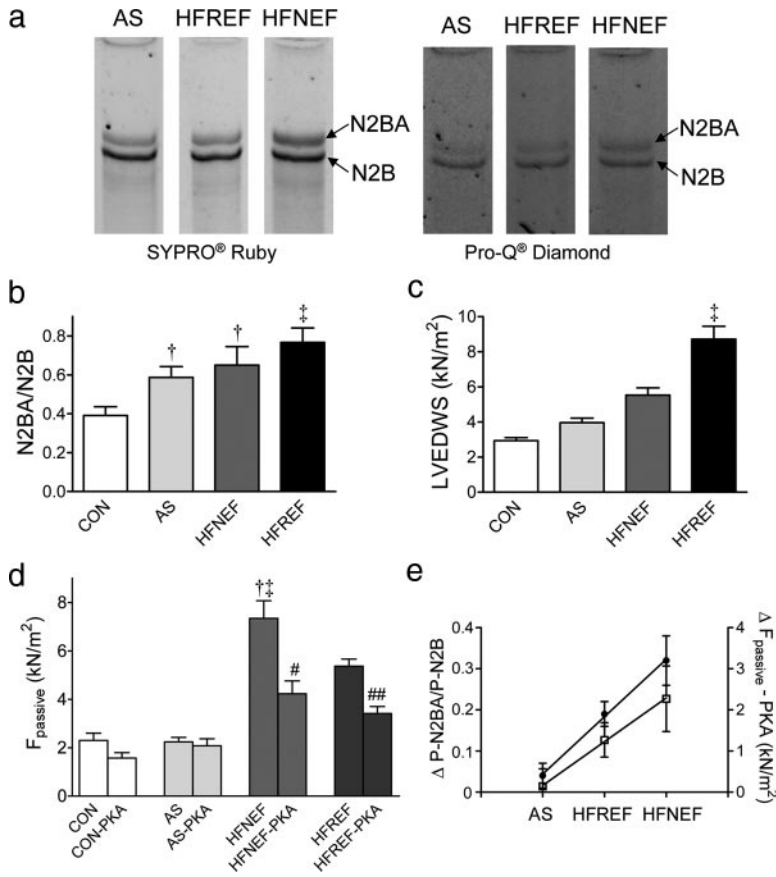


Figure 4. Titin isoform expression, titin isoform phosphorylation, and cardiomyocyte F_{passive} in HFNEF and HFREF patients. **a**, Comparison between representative AS, HFREF, and HFNEF patients of phosphorylation of titin isoforms using sequential gel electrophoresis with SYPRO Ruby and ProQ Diamond phosphoprotein stain. **b**, Higher N2BA/N2B ratio in AS, HFNEF, and HFREF patients than in the CON group ($\dagger P < 0.05$ vs CON, $\ddagger P < 0.001$ vs CON). **c**, Higher LVEDWS in HFREF patients than in CON, AS, and HFNEF groups ($\dagger P < 0.001$ vs CON, AS, or HFNEF). **d**, Higher F_{passive} in HFNEF patients than in CON, AS, and HFREF patients ($\dagger P < 0.001$ vs CON or AS; $\ddagger P < 0.01$ vs HFREF). After in vitro administration of PKA, F_{passive} fell in HFNEF ($\#\# P < 0.0001$ vs HFNEF) and HFREF cardiomyocytes ($\#\# P < 0.0001$ vs HFREF). **e**, Parallel trends in AS, HFREF, and HFNEF patients of the N2B phosphorylation deficit ($\Delta P\text{-N2BA/P-N2B}$) (open squares) and the PKA-induced fall in F_{passive} (filled circles).

was absent. This could be of special relevance to HFNEF myocardium, which had higher N2B titin isoform expression (Figure 4b) and a larger N2B titin isoform phosphorylation deficit (Figure 4e). The latter explained both the larger F_{passive} and the larger response of F_{passive} to PKA in HFNEF cardiomyocytes (Figure 4e).

A shift in titin isoform phosphorylation, as demonstrated in the present study in HF myocardium, can be explained by spatial separation of phosphorylation sites on the N2BA and N2B titin isoforms and by changes in compartmentalized activities of protein kinases and phosphodiesterases.^{30,31} The N2B unique sequence contains the phosphorylation site, which mediates the fall in F_{passive} .^{13,15,32} Immunoelectron micrographs with antibody labeling C-terminal N2B unique sequence revealed the site to be closer to the Z-disc in the N2BA isoform than in the N2B isoform.²⁶ PKA is targeted by A-kinase anchoring proteins (AKAP) to transverse tubules,³⁰ which are also adjacent to the Z disc. In HF, this targeting of PKA by AKAP is disrupted,³³ and this leads to a fall in phosphorylation of surrounding myofilamentary proteins.³⁰ The shift in titin isoform phosphorylation in HF myocardium could result from altered local availability of not only cAMP but also cGMP because in mouse, cardiac muscle phosphodiesterase 5 activity is also highly compartmentalized.³⁴

Conclusions

Because of comparable expression of titin isoforms and similar overall phosphorylation of titin, the 2-fold rise in F_{passive} of HF cardiomyocytes compared to AS cardiomyo-

cytes was attributed to a shift in titin isoform phosphorylation with relative hypophosphorylation of the stiff N2B titin isoform. Relative hypophosphorylation of the stiff N2B titin isoform is a novel mechanism responsible for raising F_{passive} in human HF cardiomyocytes. High cardiomyocyte F_{passive} is an important contributor to the high diastolic LV stiffness of the failing heart, and the present findings could therefore have important therapeutic implications.

Sources of Funding

This study was supported by a grant from the Dutch Heart Foundation (2006B035). A.B. is a recipient of a Mecenatura Grant from the University of Debrecen Medical and Health Science Center, Hungary (Mec-4/2008) and of a basic research fellowship grant from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology (Nice, France). I.F.-P. is a recipient of a grant from the Portuguese Foundation for Science and Technology (SFRH/BD/19538/2004).

Disclosures

None.

References

- Kass DA, Bronzwaer JGF, Paulus WJ. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ Res*. 2004;94:1533–1542.
- Skaluba SJ, Litwin SE. Mechanisms of exercise intolerance. Insights from Tissue Doppler Imaging. *Circulation*. 2004;109:972–977.
- Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH. Diastolic heart failure – abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med*. 2004;350:1953–1959.
- Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbély A, Édes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL. How to diagnose diastolic heart

- failure? A consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction (HFNEF) by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007;28:2539–2550.
5. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, McClure CD, Spinale FG, Zile MR. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases. Relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation*. 2006;113:2089–2096.
 6. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, Donnelly SC, McDonald K. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation*. 2007;115:888–895.
 7. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JGF, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005;111:774–781.
 8. Van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 2006;113:1966–1973.
 9. Van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko L, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JGF, Diamant M, Borbely A, van der Velden J, Stienen GJM, Laarman GJ, Niessen HWM, Paulus WJ. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation endproducts and myocyte resting tension. *Circulation*. 2008;117:52–60.
 10. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*. 2004;95:708–716.
 11. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110:155–162.
 12. Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*. 2002;106:1333–1341.
 13. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 2002;90:1181–1188.
 14. Krüger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*. 2006;27:435–444.
 15. Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios C, Linke WA. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*. 2009;104:87–94.
 16. Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol*. 2005;125:257–271.
 17. Borbely A, van Heerebeek L, Paulus WJ. Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circ Res*. 2009;104:12–14.
 18. Van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJM. Increased Ca^{2+} -sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res*. 2003;57:37–47.
 19. Flagg TP, Cazorla O, Remedi MS, Haim TE, Tones MA, Bahinski A, Numann RE, Kovacs A, Schaffer JE, Nichols CG, Nerbonne JM. Ca^{2+} -independent alterations in diastolic sarcomere length and relaxation kinetics in a mouse model of lipotoxic diabetic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2009;104:95–103.
 20. Trombitás K, Granzier H. Actin removal from cardiac myocytes shows that near Z line titin attaches to actin while under tension. *Am J Physiol*. 1997;273:C662–C670.
 21. Zaremba R, Merkus D, Lamers JML, Paulus WJ, dos Remedios C, Duncker DJ, Stienen GJM, van der Velden J. Quantitative analysis of myofibrillar protein phosphorylation in small cardiac biopsies. *Proteomics Clin Appl*. 2007;1:1285–1290.
 22. Layland J, Li JM, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 2002;540:457–467.
 23. Linke WA, Ivemeyer M, Labeit S, Hinssen H, Rüegg JC, Gautel M. Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophys J*. 1997;73:905–919.
 24. Linke WA, Fernandez JM. Cardiac titin: molecular basis of elasticity and cellular contribution to elastic and viscous stiffness components in myocardium. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002;23:483–497.
 25. Jaber WA, Maniu C, Krysiak J, Shapiro BP, Meyer DM, Linke WA, Redfield MM. Titin isoforms, extracellular matrix, and global chamber remodeling in experimental dilated cardiomyopathy: functional implications and mechanistic insights. *Circ Heart Fail*. 2008;1:192–199.
 26. Wu Y, Bell SP, Trombitás K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM, Granzier H. Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation*. 2002;106:1384–1389.
 27. Rastogi S, Mishra S, Zaca V, Alesh I, Gupta RC, Goldstein S, Sabbah HN. Effect of long-term monotherapy with the aldosterone receptor blocker eplerenone on cytoskeletal proteins and matrix metalloproteinases in dogs with heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007;21:415–422.
 28. Peng J, Raddatz K, Molkenin JD, Wu Y, Labeit S, Granzier H, Gotthardt M. Cardiac hypertrophy and reduced contractility in hearts deficient in the titin kinase region. *Circulation*. 2007;115:743–751.
 29. Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H, Koga Y, Nakamura H, Matsuzaki M, Choi BY, Bae SW, You CW, Han KH, Park JE, Knoll R, Hoshijima M, Chien KR, Kimura A. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:2192–2201.
 30. Fink MA, Zakhary DR, Mackey JA, Desnoyer RW, Apperson-Hansen C, Damron DS, Bond M. AKAP-mediated targeting of protein kinase A regulates contractility in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2001;88:291–297.
 31. Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res*. 2004;95:67–75.
 32. Trombitás K, Wu Y, Labeit D, Labeit S, Granzier H. Cardiac titin isoforms are coexpressed in the half-sarcomere and extend independently. *Am J Physiol*. 2001;281:H1793–H1799.
 33. Zakhary DR, Moravec CS, Bond M. Regulation of PKA binding to AKAPs in the heart. Alterations in human heart failure. *Circulation*. 2000;101:1459–1464.
 34. Takimoto E, Belardi D, Tocchetti CG, Vahebi S, Cormaci G, Ketner EA, Moens AL, Champion HC, Kass DA. Compartmentalization of cardiac β -adrenergic inotropic modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation*. 2007;115:2159–2167.



Original Contribution

Myeloperoxidase impairs the contractile function in isolated human cardiomyocytes

Judit Kalász, Enikő T Pásztor, Miklós Fagyas, Ágnes Balogh, Attila Tóth, Viktória Csató, István Édes, Zoltán Papp, Attila Borbély*

Division of Clinical Physiology, Institute of Cardiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2014

Received in revised form

2 February 2015

Accepted 25 February 2015

Available online 12 March 2015

Keywords:

Cardiomyocyte contractile function

Myeloperoxidase

Hydrogen peroxide

Oxidative posttranslational protein

modifications

Antioxidants

Free radicals

ABSTRACT

We set out to characterize the mechanical effects of myeloperoxidase (MPO) in isolated left-ventricular human cardiomyocytes. Oxidative myofilament protein modifications (sulfhydryl (SH)-group oxidation and carbonylation) induced by the peroxidase and chlorinating activities of MPO were additionally identified. The specificity of the MPO-evoked functional alterations was tested with an MPO inhibitor (MPO-I) and the antioxidant amino acid Met. The combined application of MPO and its substrate, hydrogen peroxide (H_2O_2), largely reduced the active force (F_{active}), increased the passive force ($F_{passive}$), and decreased the Ca^{2+} sensitivity of force production (pCa_{50}) in permeabilized cardiomyocytes. H_2O_2 alone had significantly smaller effects on F_{active} and $F_{passive}$ and did not alter pCa_{50} . The MPO-I blocked both the peroxidase and the chlorinating activities, whereas Met selectively inhibited the chlorinating activity of MPO. All of the MPO-induced functional effects could be prevented by the MPO-I and Met. Both H_2O_2 alone and MPO + H_2O_2 reduced the SH content of actin and increased the carbonylation of actin and myosin-binding protein C to the same extent. Neither the SH oxidation nor the carbonylation of the giant sarcomeric protein titin was affected by these treatments. MPO activation induces a cardiomyocyte dysfunction by affecting Ca^{2+} -regulated active and Ca^{2+} -independent passive force production and myofilament Ca^{2+} sensitivity, independent of protein SH oxidation and carbonylation. The MPO-induced deleterious functional alterations can be prevented by the MPO-I and Met. Inhibition of MPO may be a promising therapeutic target to limit myocardial contractile dysfunction during inflammation.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Oxidative stress-related myofilament protein alterations have been shown to play key roles in the impaired cardiomyocyte contractility in response to myocardial inflammation, ischemia–reperfusion injury, and left-ventricular (LV) remodeling after a myocardial infarction (MI) [1,2]. In particular, reactive oxygen species (ROS) oxidize cellular components [3], leading to cardiomyocyte contractile dysfunction, myocyte apoptosis, or cardiac hypertrophy [4,5].

Myeloperoxidase (MPO; EC 1.11.2.2) is a member of the heme peroxidase superfamily, synthesized by neutrophils, monocytes, and

macrophages, stored in their azurophilic granules, and released in substantial amounts upon leukocyte activation [6]. MPO has beneficial effects on the innate host defense mechanisms [7]. Considerable evidence has emerged to suggest that ROS formation by MPO promotes various deleterious actions in the cardiovascular (CV) system and contributes to the development of CV diseases [6]. Individuals with a total or subtotal MPO deficiency (a defect with a frequency of ≈ 1 in every 2000 to 4000 Caucasians) are protected from CV diseases [6]. An elevated level of circulating MPO is a prognostic marker of mortality and predicts the risks of subsequent major adverse cardiac events in patients with acute coronary syndrome (ACS) [8], particularly in association with a low LV ejection fraction [9]. MPO also contributes to adverse LV remodeling after an MI [10]. MPO exerts adverse effects on the vasculature, oxidizes low-density lipoprotein [11], impairs high-density lipoprotein function [12], and reduces the bioavailability of nitric oxide (NO) [13]. MPO can therefore serve as a valuable biomarker of inflammation in coronary artery disease and ACS [14]. The serum level of MPO correlates positively with the severity of LV dysfunction and seems to be an essential factor in the development and exacerbation of heart failure (HF) [15,16]. Interestingly, the MPO concentration was earlier found not to differ in ischemic and nonischemic cardiomyopathy, suggesting that MPO has an independent pathogenic role in LV dysfunction [17].

Abbreviations: ACS, acute coronary syndrome; ADHP, 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine; APF, 2-(6-(4-aminophenoxy)-3-oxo-3H-xanten-9-yl)benzoic acid; BSA, bovine serum albumin; CI, carbonylation index; CV, cardiovascular; DTDP, dithiodipyridine; DTT, dithiothreitol; ECL, enhanced chemiluminescence; F_{active} , cardiomyocyte active force; $F_{passive}$, cardiomyocyte passive force; HF, heart failure; Iso, isolating solution; LV, left ventricular; MetSO, methionine sulfoxide; MHC, myosin heavy chain; MI, myocardial infarction; MLC-1, myosin light chain-1; MPO, myeloperoxidase; MPO-I, MPO inhibitor (4-aminobenzhydrazide); MyBP-C, myosin-binding protein C; N2B, stiff titin isoform; N2BA, compliant titin isoform; NAC, N-acetyl-L-cysteine; NTB, 2-nitro-5-thiobenzoic acid; PBS, phosphate-buffered saline; ROS, reactive oxygen species; SDS, sodium dodecyl sulfate; SH, sulfhydryl; Tm, tropomyosin

* Corresponding author. Fax: +36 52 255928.

E-mail address: borbelya@med.unideb.hu (A. Borbély).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.036>

0891-5849/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

MPO is known to generate numerous reactive oxidants and diffusible radical species via its peroxidase and chlorinating activities, which are capable of promoting an array of reversible and irreversible posttranslational protein modifications [18,19]. The relative concentrations of chloride and the reducing substrate determine whether MPO uses its substrate hydrogen peroxide (H_2O_2) for peroxidation or chlorination. MPO amplifies the oxidative potential of H_2O_2 [20–22], which may originate from a number of sources in vivo, including leukocyte NADPH oxidases, xanthine oxidase, and uncoupled NO synthase [23,24]. The perfusion of isolated rat hearts with H_2O_2 led to disulfide cross-bridge formation in actin and tropomyosin (Tm) [25]. In one of our previous studies, the sulfhydryl (SH) oxidation of actin and myosin light chain-1 (MLC-1) was suggested as the mechanism in H_2O_2 -evoked depressed cardiomyocyte contractility [26].

MPO is unique in its ability to create hypochlorous acid (HOCl; a potent antimicrobial agent) through its chlorinating activity [22]. Interestingly, the cardiac tissue is highly susceptible to oxidation even by physiological concentrations of HOCl [27]. Importantly, HOCl is much more effective than H_2O_2 in oxidizing proteins in the myocardium [27], it causes SH oxidation [28] and carbonylation in myofilament proteins [29], it disturbs Ca^{2+} homeostasis and Ca^{2+} handling [30], it increases the intracellular Ca^{2+} concentration in isolated rat [31] and rabbit [32] ventricular cardiomyocytes, and it induces cardiomyocyte death in rats [33]. It is also very important to consider how far H_2O_2 or HOCl can diffuse on the cellular scale and whether these substances are capable of penetrating cell membranes. H_2O_2 is stable [34] and membrane permeative [35], but the in vivo concentration of H_2O_2 highly depends on its generation and consumption rates [36,37]. HOCl appears to be more toxic and reactive and can also penetrate through cell membranes, but has a much shorter life span. An in vitro study revealed that HOCl production by neutrophils can be as high as 450 mM/h, which was shown to be less in an in vivo model [38]. MPO generates HOCl in micromolar concentrations [39], but in inflamed tissue it is estimated to be as high as 5 mM [40].

The antioxidant amino acid methionine (Met) acts as a scavenger of HOCl and has been shown to prevent HOCl-induced morphological changes and contractile dysfunction in murine myocytes [41]. Moreover, the fact that MPO-derived chlorinating compounds can serve as specific biomarkers for disease progression has attracted considerable interest in the development of therapeutically useful MPO inhibitors (MPO-I's) [42].

Although the role of MPO-derived oxidants in the pathogenesis of myocardial ischemia and HF is relatively well established, only limited data are available as concerns the exact cellular and subcellular mechanisms through which MPO could directly affect the contractility of myocardial cells, especially at the level of the myofibrillar proteins. In this study, therefore, we set out (1) to characterize the functional effects of MPO and its substrate H_2O_2 on single, permeabilized human cardiomyocytes; (2) to identify the biochemical alterations induced by the peroxidase and chlorinating activities of MPO; (3) to investigate the specificity of the MPO-induced contractile changes by using the MPO-I 4-aminobenzhydrazide and the antioxidant amino acid Met; and (4) to explore the MPO-related reversible and irreversible oxidative myofilament protein modifications in the human LV myocardium.

Materials and methods

Human myocardial samples

LV myocardial tissue was obtained from the hearts of four general organ-donor patients (41- and 46-year-old women and 53- and 57-year-old men). All of these patients were free of any cardiac abnormalities and had not received any medication except

for plasma volume expanders, dobutamine, and furosemide. The cause of death included cerebral contusion, cerebral hemorrhage, and subarachnoidal hemorrhage. All biopsies were transported in cardioplegic solution (pH 7.4; in mM: NaCl 110, KCl 16, MgCl_2 1.6, CaCl_2 1.2, NaHCO_3 5) and were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C at the laboratory. The experiments on human tissues complied in full with the Helsinki Declaration of the World Medical Association and were approved by the Hungarian Ministry of Health (No. 323-8/2005-1018EKU) and by the Institutional Ethics Committee at the University of Debrecen, Hungary.

Force measurements in permeabilized cardiomyocyte preparations

Force measurements were performed as described previously [43]. In brief, frozen tissue samples were first defrosted and mechanically disrupted in cell isolation solution (Iso) (in mM: KCl 100, ethylene glycol tetraacetic acid 2, MgCl_2 1, Na_2ATP 4, imidazole 10; pH 7.0) containing phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 0.5 mM, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), leupeptin (40 μM , Sigma–Aldrich), and E-64 (10 μM , Sigma–Aldrich) protease inhibitors. The mechanically isolated cells were skinned by incubation in Iso supplemented with 0.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma–Aldrich) for 5 min. Triton X-100 was removed by washing at least three times in Iso (1 ml in each washing step) and the skinned myocytes were kept in Iso on ice until the measurements. A skinned single cardiomyocyte was mounted between two thin needles, which were attached to a force transducer element (SensoNor, Horten, Norway) and an electromagnetic motor (Aurora Scientific, Aurora, ON, Canada) through the use of silicone adhesive (DAP, Baltimore, MD, USA) for determination of the mechanical parameters. The measurements were performed at 15°C on the stage of a light microscope. The average sarcomere length was adjusted to 2.3 μm .

The compositions of the relaxing and activating solutions used during force measurements were calculated as described previously [43]. Both solutions were supplemented with protease inhibitors: leupeptin (40 μM) and E-64 (10 μM). The $p\text{Ca}$'s, i.e., the $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$ values of the relaxing and activating solutions (pH 7.2), were 9.0 and 4.75, respectively. Solutions with intermediate free Ca^{2+} levels were obtained by mixing activating and relaxing solutions [44]. Isometric force production was measured after the preparation had been transferred from the relaxing solution to a set of Ca^{2+} -containing solutions. When a steady force level had been reached, the length of the myocyte was reduced by 20% within 2 ms, and the myocyte was then quickly restretched (release–restretch maneuver). As a result, the force first dropped from the peak isometric level to 0 (difference = total peak isometric force, F_{total}) and then started to redevelop. About 6 s after the onset of force redevelopment, the cardiomyocyte was returned to the relaxing solution, in which the length of the myocyte was again reduced by 20% for 8 s to determine the Ca^{2+} -independent passive force component (F_{passive}). The Ca^{2+} -activated isometric force (F_{active}) was calculated by subtracting F_{passive} from F_{total} . F_{active} at submaximal levels of activation was normalized to that at maximal activation ($p\text{Ca}$ 4.75). Thereafter, the normalized force values were plotted against the Ca^{2+} concentration of the activating solutions to create a sigmoidal curve, to determine the Ca^{2+} sensitivity of force production ($p\text{Ca}_{50}$). Maximal active force was also tested at the end of the experiments at $p\text{Ca}$ 4.75. Experiments that yielded a value below 80% of the initial value were discarded.

To determine the mechanical consequences of myofilament protein oxidation, cardiomyocytes were exposed to Iso supplemented with H_2O_2 (30 μM , Sigma–Aldrich) for 15 min, MPO + H_2O_2 (8 U/L, Abcam, Cambridge, UK) for 15 min, MPO + H_2O_2 + MPO-I 4-aminobenzhydrazide (50 μM , Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) for 15 min, or MPO + H_2O_2 + Met (10 mM, Sigma–Aldrich) for 15 min at 15°C . The reversibility of MPO + H_2O_2 -evoked effects was examined

by the application of the reducing agent dithiothreitol (DTT; Sigma–Aldrich, 10 mM, 30 min) to MPO + H₂O₂-treated cardiomyocytes. Force–pCa relationships and pCa₅₀ values were determined before and after the application of these agents. The effects of the applied agents on F_{active} and F_{passive} were expressed relative to their control (untreated, before application of the agent at pCa 4.75 and pCa 9.0, respectively). Changes in F_{active} and F_{passive} upon application of the agents were compared with the force values measured after incubation of the cardiomyocytes in Iso for 15 min (time control).

Measurements of MPO activities

MPO chlorination and peroxidation assay kits (Cayman Chemicals) were used. The chlorination activity assay utilizes a nonfluorescent substrate (APF; 2-(6-(4-aminophenoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid), which is cleaved by the MPO-generated hypochlorite (OCl[−]) to produce highly fluorescent fluorescein. The peroxidase activity assay uses a nonfluorescent substrate (ADHP; 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), which is converted by MPO to the fluorescent resorufin. Fluorescence was detected with a NovoStar microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at λ_{ex} 485 nm and λ_{em} 520 nm in the chlorination assay and at λ_{ex} 544 nm and λ_{em} 590 nm in the peroxidase assay. The reaction solution contained the nonfluorescent substrate (APF (18 μ M) or ADHP (45 μ M)), assay buffer (phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4), and H₂O₂ (30 μ M) or MPO + H₂O₂ (38 U/L) or MPO + H₂O₂ + MPO-I (50 μ M) or MPO + H₂O₂ + Met (10 mM). Activities were measured for 5 min at 24-s intervals. Fluorescence intensities were fitted by linear regression analysis (before saturation) and the slope of this relation was used to calculate MPO activities. Values were corrected for the background (the activity determined in the absence of MPO).

Biochemical assays for the identification of oxidative protein modifications

Ellman's reaction

Overall myofilament SH-group content was determined by Ellman's reaction. Skinned cardiomyocytes were treated with Iso (time control) or with Iso supplemented with H₂O₂ and MPO as described for the mechanical experiments. Washing steps followed the treatments and the cardiomyocytes were then incubated for 15 min in Ellman's reagent (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); Sigma–Aldrich), which reacts with myofilament SH groups and produces the yellow 2-nitro-5-thiobenzoic acid (NTB). The absorbance of NTB was measured with a NovoStar microplate reader at 412 nm. *N*-acetyl-L-cysteine (NAC; Sigma–Aldrich) was used to calibrate the NTB absorbance in relation to the amount of SH groups. A known concentration of NAC was reacted with Ellman's reagent and the absorbance at 412 nm, fitted with a single exponential, served as the calibration curve. The SH contents in 1-mg lyophilized myocardial samples were calculated from the measured absorbance, the tissue weight, and the calibration curve. Measurements were performed in triplicate.

Protein SH oxidation

Cardiomyocytes were isolated from LV myocardial samples (25 mg wet weight) as for the functional measurements and were treated in Iso (150 μ l) containing H₂O₂ (30 μ M) or MPO + H₂O₂ (38 U/L) for 15 min. Cardiomyocytes exposed to dithiodipyridine (DTDP; 2.5 mM, for 2 min) were used as positive controls. Protein SH groups were labeled with EZ-Link Iodoacetyl-LC-Biotin (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, for 60 min in the dark, at room temperature) in a reaction buffer (containing EDTA 5 mM, Tris–HCl 50 mM, pH 8.3, and 0.1 mg/ml biotin) according to the manufacturer's instructions (biotin was dissolved in dimethyl formamide (Sigma–Aldrich) and diluted in reaction buffer to 0.1 mg/ml). After the biotinylation process, the

myocytes were solubilized in sample buffer (containing 8 M urea, 2 M thiourea, 3% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 75 mM DTT, 50 mM Tris–HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, bromophenol blue), 10 μ M E-64, and 40 μ M leupeptin (1 h, under continuous agitation). Protein concentration was determined in the supernatant with a dot-blot-based method, using bovine serum albumin (BSA; Sigma–Aldrich) as a standard. Protein concentration was adjusted to 1 mg/ml. Polyacrylamide gels (2, 4, (strengthened with 0.5% agarose), 10, and 15%) and 4–15% gradient gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were used to separate myofilament proteins before blotting to nitrocellulose membranes. Proteins were quantitated with the fluorescent Sypro ruby protein blot stain (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Membranes were blocked with 10% (w/v) milk powder diluted in PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBST). Biotin-labeled SH groups were probed with peroxidase-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) at a final concentration of 5 ng/ml for 30 min. Signal intensities of biotin-labeled SH groups were visualized by an enhanced chemiluminescence (ECL) method and normalized for those assessed with the Sypro ruby protein blot stain.

Protein disulfide cross-bridge formation

Similar to the experiments by Canton et al. [45], human LV myocardial samples were solubilized in reducing (1 $\times$ Laemmli sample buffer (Sigma–Aldrich) containing 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol (β -ME), 0.0625 M Tris–HCl, pH 6.8) and non-reducing (same buffer without β -ME) sample buffer after H₂O₂ or MPO + H₂O₂ treatment. SDS–PAGE was performed using 10% polyacrylamide gels, and thereafter proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. After the nonspecific binding sites were blocked, the membranes were probed with monoclonal anti-tropomyosin (1:10,000, clone CH1) or monoclonal anti-actin (1:1000, clone HHF35, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) antibodies.

Detection of protein carbonyl groups

Cardiomyocytes from LV myocardial tissue (15 mg wet weight) were incubated with H₂O₂ and MPO, as described above. Cardiomyocytes treated with the Fenton reagent (50 μ M FeSO₄, 6 mM ascorbic acid, and 1.5 mM H₂O₂ for 7 min) were used as positive controls for protein carbonylation. Cardiomyocytes were washed after treatment and solubilized in sample buffer containing 8 M urea, 3% (w/v) SDS, 50 mM Tris–HCl (pH 6.8), 10 μ M E-64, and 40 μ M leupeptin for 1 h by vortexing. The samples were then centrifuged (16,000g for 5 min) and the supernatants were used for carbonyl group derivatization based on the formation of 2,4-dinitrophenylhydrazone from 2,4-dinitrophenylhydrazine (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, Millipore, Billerica, MA, USA). After derivatization (15 min), samples were centrifuged (1000g for 1 min) and the pellet was dissolved in a buffer containing 8 M urea, 2 M thiourea, 3% (w/v) SDS, 75 mM DTT, 50 mM Tris–base (pH 14), 10% (v/v) glycerol, and bromophenol blue (30 min, shaking). Derivatized samples were centrifuged (16,000g for 5 min) and the protein concentrations of the supernatants were determined with a dot-blot-based method, using a BSA standard. The protein concentration of the samples was adjusted to 1 mg/ml. Polyacrylamide gel electrophoresis with 2, 4, (strengthened with 0.5% agarose), 10, and 15% gels and 4–15% gradient gels was carried out to separate myofilament proteins. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and visualized with the Sypro ruby protein blot stain. The membranes were then blocked with 2% (w/v) BSA in PBST for 30 min and probed with primary and secondary antibodies (rabbit anti-DNP antibody 1:150, 1 h, and goat anti-rabbit IgG 1:300, 1 h) diluted in 1% (w/v) BSA–PBST according to the manufacturer's instructions. Protein bands were visualized by the ECL method. Signal intensities determined by OxyBlot assay were normalized for those assessed with the

Sypro ruby protein blot stain. The extent of carbonylation was expressed as carbonylation index (CI = 1 in the time control samples).

Data analysis and statistics

Cardiomyocyte force generation was measured with a custom-built system (utilizing the DAQ platform produced by National Instruments, Austin, TX, USA) and recorded by a custom-built LabVIEW (National Instruments) module. Results were evaluated in Excel (Microsoft, 2007) and GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Ca^{2+} -force relations were fitted to a modified Hill equation,

$$F_{\text{total}} = F_{\text{max}} \left[\text{Ca}^{2+} \right]^{n_{\text{Hill}}} / \left(p\text{Ca}_{50}^{n_{\text{Hill}}} + \left[\text{Ca}^{2+} \right]^{n_{\text{Hill}}} \right) + F_{\text{passive}},$$

where F_{max} is the maximal force, F_{passive} is the passive force, $F_{\text{total}} = F_{\text{max}} + F_{\text{passive}}$, $[\text{Ca}^{2+}]$ is the calculated Ca^{2+} concentration, n_{Hill} is a constant, and $p\text{Ca}_{50}$ corresponds to the $[\text{Ca}^{2+}]$ at which $F_{\text{total}} - F_{\text{passive}} = F_{\text{max}}/2$.

The results of the measurements for each cardiomyocyte were fitted individually. F_{active} and F_{passive} values were normalized to the cardiomyocyte cross-sectional area and expressed in kN/m^2 . The number of experiments in each group varied between 5 and 12 from three or four different hearts.

Western immunoblot assays were performed in triplicate. Intensities of protein bands were quantified by determining the area under the intensity curves by a Gaussian fit using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and Magic Plot (Saint Petersburg, Russia) software. Graphs were created in GraphPad Prism 5.0 software.

Differences between groups were calculated by analysis of variance (followed by Bonferroni's post hoc test) or multilevel mixed-effects linear regression analysis, to appropriately address nonindependence between multiple observations from the same heart. The null hypothesis for all group means being equal was tested, followed by pairwise between-groups comparisons based on the variance-covariance matrix of the fixed effects. Comparisons of normalized $p\text{Ca}$ -force relationships determined upon subsequent applications of the agents were performed with paired and unpaired t tests. Group descriptions were based on the mean and SEM values. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

MPO + H_2O_2 impairs the contractile function in human cardiomyocytes

When permeabilized human LV cardiomyocytes (Fig. 1A) were treated with Iso containing MPO (8 U/L) and H_2O_2 (30 μM), a significant decrease in the maximal Ca^{2+} -dependent ($p\text{Ca}$ 4.75) F_{active} and a marked increase in the Ca^{2+} -independent ($p\text{Ca}$ 9.0) F_{passive} were observed (to 57.7 ± 4.1 and $179.6 \pm 14.6\%$ of untreated, respectively, $n = 12$) (Fig. 1B). The decrease in the isometric force at various free Ca^{2+} concentrations was significantly larger in response to MPO + H_2O_2 application than that in the presence of H_2O_2 alone (Fig. 1C). Incubation of cardiomyocytes with Iso (time control) resulted in only a minor change in F_{active} (to $89.0 \pm 1.6\%$). The MPO-induced increase in F_{passive} was significantly higher than that evoked by H_2O_2 alone ($79.6 \pm 14.6\%$ vs $23.9 \pm 7.4\%$, $p < 0.001$; Fig. 1D). When the peak contractile forces measured at intermediate Ca^{2+} concentrations were normalized to their respective maximum, a significant rightward shift in the $p\text{Ca}$ -force relationship, i.e., a decrease in the Ca^{2+} sensitivity of force production ($p\text{Ca}_{50}$) was observed after MPO + H_2O_2 treatment (from 5.83 ± 0.02 to 5.66 ± 0.02 , $p < 0.001$; Fig. 1E). In contrast, the application of H_2O_2 alone did not alter $p\text{Ca}_{50}$ (5.85 ± 0.05 vs $5.82 \pm$

0.03 , $p = 0.55$; Fig. 1F). The differences in the baseline cardiomyocyte maximal F_{active} , F_{passive} , and $p\text{Ca}_{50}$ were 5.4, 5.5, and 0.9%, respectively. The light microscopic morphology did not reveal visible alterations in the cross-striation pattern of the cardiomyocytes upon MPO + H_2O_2 or H_2O_2 treatment (data not shown).

Met inhibits the chlorinating but not the peroxidase activity of MPO

To identify the biochemical mechanism underlying the functional effects of MPO, we measured its chlorinating and peroxidase activities in the presence of the MPO-I and Met (Fig. 2A and B). The MPO-I diminished both the chlorinating and the peroxidase activities of MPO (to 0.3 ± 0.2 and $10.4 \pm 6.0\%$, respectively, $p < 0.001$, $n = 4$). However, Met selectively inhibited the chlorinating activity of MPO (to $2.3 \pm 1.3\%$, $p < 0.001$, $n = 4$), without significantly affecting its peroxidase activity ($78.4 \pm 8.6\%$, $n = 4$).

MPO-I and Met completely prevent, whereas DTT partially reverses, the MPO-induced cardiomyocyte dysfunction

To assess whether the MPO-I or Met is also able to prevent the deleterious mechanical effects of MPO, cardiomyocytes were incubated with MPO + H_2O_2 in the presence of the MPO-I (50 μM) or Met (10 mM). Both the MPO-I and Met prevented the MPO-induced decrease in F_{active} (to 80.0 ± 5.3 and $80.1 \pm 3.6\%$ of untreated, respectively, $p < 0.001$; Fig. 3A) and the increase in F_{passive} (to 147.7 ± 6.1 and $139.9 \pm 8.7\%$ of untreated, respectively, $p < 0.05$, $n = 5$ or 6; Fig. 3B). F_{active} and F_{passive} measured after the application of the MPO-I or Met to MPO + H_2O_2 were similar to those determined after H_2O_2 treatment. Moreover, the MPO-I (Fig. 3C) or Met (Fig. 3D) completely abolished the rightward shift in the $p\text{Ca}$ -force relationships observed upon combined MPO + H_2O_2 treatment (5.88 ± 0.07 vs 5.66 ± 0.02 , $p < 0.05$, and 5.81 ± 0.04 vs 5.66 ± 0.02 , respectively, $p < 0.001$ vs MPO + H_2O_2 , $n = 5$ or 6). The changes in $p\text{Ca}_{50}$ measured after H_2O_2 , MPO + H_2O_2 , MPO-I, and Met treatments are illustrated in Fig. 3E. The reversibility of the MPO + H_2O_2 -evoked functional alterations was tested by application of the reducing agent DTT (10 mM) to the cardiomyocytes ($n = 6$). The increase in F_{passive} after MPO + H_2O_2 ($\Delta F_{\text{passive}}$ $89.3 \pm 27.3\%$ compared to untreated) was almost completely reversed after DTT treatment ($\Delta F_{\text{passive}}$ $9.7 \pm 10.4\%$ compared to untreated, $p < 0.05$). DTT, however, did not significantly affect F_{active} (to 57.7 ± 4.1 and to $43.8 \pm 5.1\%$ of untreated after MPO + H_2O_2 and DTT administration, respectively, $p = 0.13$; figure not shown).

Effects of MPO + H_2O_2 on the SH oxidation and carbonylation of myofilament proteins

Attempts were made to identify the changes in the oxidative status of myofilament proteins contributing to the MPO-induced cardiomyocyte dysfunction in parallel with the functional measurements. Relative SH contents were determined in human LV skinned cardiomyocytes. The baseline SH content of myofilament proteins in the donor heart samples varied between 98.0 ± 4.6 and $104.1 \pm 3.9\%$ ($p = 0.35$). Ellman's reaction revealed a small but significant decrease in the overall amount of SH groups in response to H_2O_2 (to $90.4 \pm 1.5\%$, $p < 0.05$, $n = 3$) or MPO + H_2O_2 treatment (to $86.7 \pm 4.0\%$, $p < 0.01$, $n = 3$; Fig. 4A). An SH-group biotinylation assay was applied to identify individual myofibrillar proteins affected by MPO-mediated SH oxidation. Samples treated with the oxidative agent DTDP were used as positive controls. H_2O_2 and MPO + H_2O_2 lowered the SH content of actin to similar extents (to $75.9 \pm 7.1\%$, $p < 0.01$, $n = 4$, and $84.2 \pm 4.4\%$, $p < 0.05$ vs time control, respectively, $n = 9$; Fig. 4B). In contrast, the SH contents of myosin-binding protein C (MyBP-C, Fig. 4C) and the more compliant (N2BA) and stiffer (N2B) isoforms of the giant sarcomeric protein titin were not affected by these

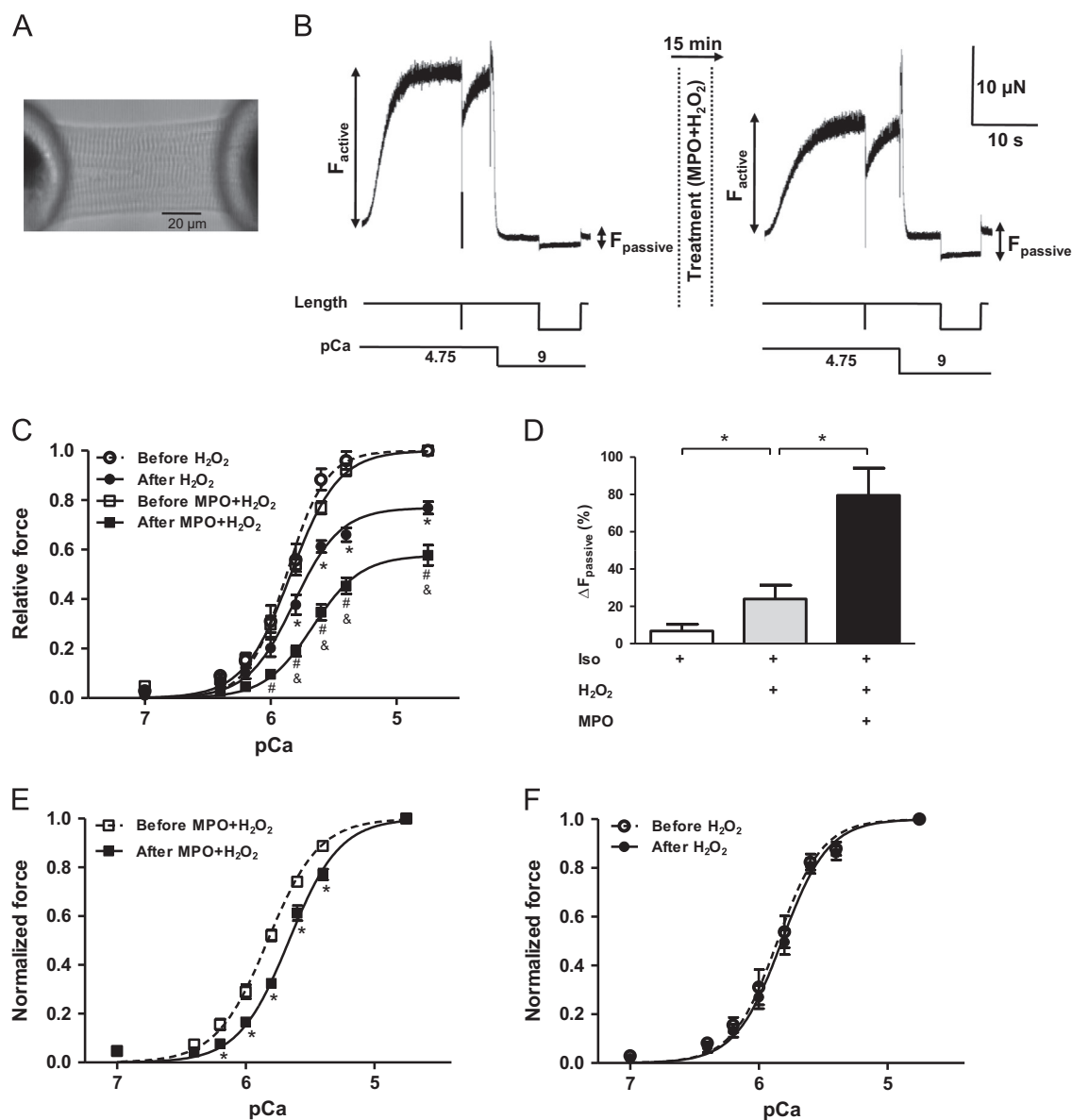


Fig. 1. Myeloperoxidase (MPO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) impair the force generation of human permeabilized cardiomyocytes. (A) A single cardiomyocyte (isolated from a human left-ventricle myocardium) mounted between a sensitive force transducer and an electromagnetic motor. (B) Original force recordings of maximal Ca²⁺-activated active (F_{active}) and Ca²⁺-independent passive (F_{passive}) force components before (left) and after MPO + H₂O₂ treatment (right) at pCa (i.e., $-\log_{10}[\text{Ca}^{2+}]$) 4.75 and pCa 9.0, respectively. MPO + H₂O₂ was applied in Iso for 15 min. (C) pCa–force relationships determined before and after H₂O₂ or MPO + H₂O₂ treatment (number of cardiomyocytes, $n = 7$ and 12, respectively). Force levels are expressed relative to the values measured before the treatments (* $p < 0.05$ vs before H₂O₂, # $p < 0.05$ vs before MPO + H₂O₂, & $p < 0.05$ vs after H₂O₂). (D) Changes in F_{passive} measured in the presence of Iso and after sequential applications of H₂O₂ or MPO + H₂O₂. (E) Significant rightward shift (i.e., decrease in the Ca²⁺ sensitivity of force production (pCa₅₀)) in the normalized pCa–force relationships in response to MPO + H₂O₂, but no change after H₂O₂ treatment (F). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM.

treatments (Figs. 4D–4F). On immunoblots a Tm- and an actin-containing complex was observed at approximately 90-kDa molecular mass under nonreducing conditions (in a buffer not containing β-ME); however, no increase in its intensity or that of Tm and actin could be detected after H₂O₂ and MPO + H₂O₂ treatments (Fig. 5).

Protein carbonylation assays revealed a modest but significant increase in the carbonylation of actin upon H₂O₂ treatment (CI = 1.1 $\pm$ 0.046, $p < 0.05$ vs the time control, $n = 5$), which was not further affected by the addition of MPO (CI = 1.1 $\pm$ 0.052, $p = 0.9$ vs H₂O₂, $n = 11$; Fig. 6A). Similar to actin, a slight, but significant increase in the carbonyl content of MyBP-C was observed both after H₂O₂ (CI = 1.5 $\pm$ 0.2, $p < 0.05$ vs the time control, $n = 2$) and after MPO + H₂O₂ application (CI = 1.4 $\pm$ 0.2, $p < 0.05$ vs the time control, $n = 4$; Fig. 6B). The extent of carbonyl group formation in the N2BA and N2B titin isoforms remained unaltered after H₂O₂ or MPO + H₂O₂

treatment (CI = 0.9 $\pm$ 0.2 and CI = 1.0 $\pm$ 0.2 for N2BA; CI = 1.0 $\pm$ 0.1 and CI = 0.9 $\pm$ 0.1 for N2B, respectively; Figs. 6C–6E).

Discussion

This is the first reported investigation of the direct effects of MPO on the contractile function of single, isolated human myocardial cells. The in vitro model experiments revealed that (1) MPO impairs Ca²⁺-dependent isometric force generation, increases the Ca²⁺-independent F_{passive}, and decreases the Ca²⁺ sensitivity of force production; (2) the MPO-induced functional changes can be prevented by an MPO-I and the antioxidant Met; (3) the levels of SH oxidation in actin and of carbonylation in actin and MyBP-C are increased by the application of

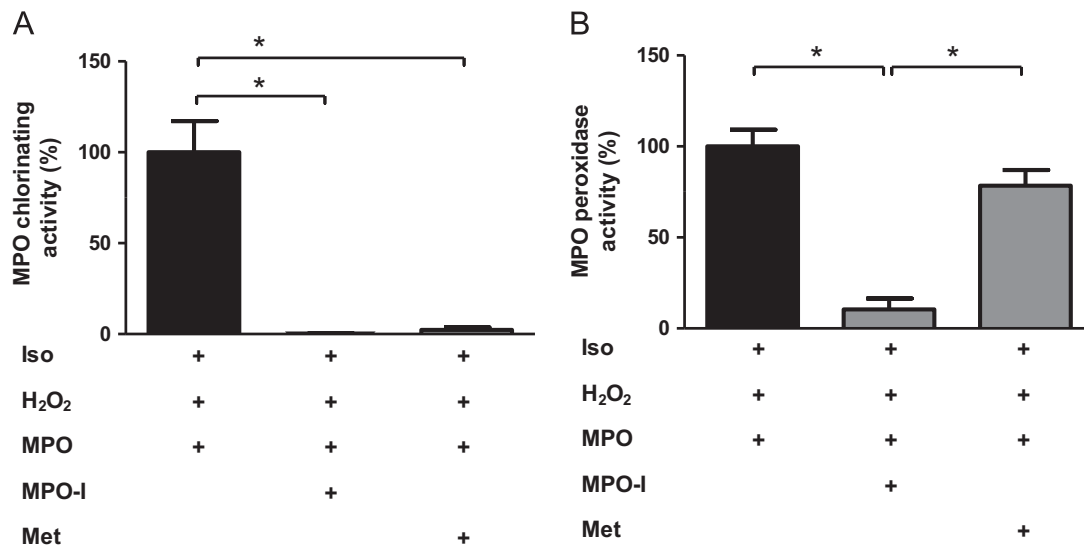


Fig. 2. Similar effects of the MPO inhibitor (MPO-I), but distinct actions of Met on the chlorinating and peroxidase activities of MPO. Met inhibits (A) the chlorinating but not (B) the peroxidase activity of MPO. Values are expressed relative to the MPO activity measured in the presence of Iso and H₂O₂. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, * p < 0.05.

MPO + H₂O₂ or H₂O₂ alone; and (4) the MPO-evoked functional effects are probably mediated by the chlorinating activity of MPO.

Myocardial inflammation and ischemia–reperfusion injury are characterized by enhanced oxidative stress and contractile dysfunction [46]. The application of MPO + H₂O₂ to human cardiomyocytes appreciably reduced the Ca²⁺-activated F_{active} and markedly decreased $p\text{Ca}_{50}$. In contrast, H₂O₂ (30 μM) alone induced a smaller decrease in F_{active} . Consistent with our findings, a lower concentration of H₂O₂ (10 μM) did not result in a decrease in the maximal Ca²⁺-activated force in skinned rat heart preparations [47,48]. This suggests that the action of H₂O₂ on contractile force generation is concentration-dependent. Lower concentrations have no measurable effects, whereas higher concentrations affect the cardiomyocyte contractility. The deleterious effect on F_{active} can be explained by the MPO-mediated H₂O₂-derived production of HOCl. In a previous study, HOCl treatment alone (10 and 50 μM for 1 min) evoked a significant decrease in the maximum Ca²⁺-activated force [47], similar to the result of MPO + H₂O₂ treatment in the present study. Interestingly, neither the H₂O₂- nor the MPO-induced functional changes were related to any deterioration in the cross-striation pattern of the cardiomyocytes under the light microscope. It is important to note, however, that electron microscopy has revealed a myofilament lattice disruption after HOCl treatment [47].

The subtle increase after H₂O₂ application and the marked elevation in the Ca²⁺-independent F_{passive} upon MPO + H₂O₂ treatment in the present study are consistent with the observations that H₂O₂ at low (< 10 μM) concentration did not alter F_{passive} , whereas HOCl (10 and 50 μM) induced a significant rise in F_{passive} of skinned rat trabeculae [48]. It is well established that the giant sarcomeric protein titin plays a key role in the development of F_{passive} in permeabilized cardiomyocytes by acting as a molecular spring in the sarcomere [49]. The cardiomyocyte F_{passive} can be modulated by the titin isoform switch (between the short and stiff N2B and the longer and more compliant N2BA isoform [50]) and by several posttranslational modifications, including phosphorylation [51], SH oxidation [52], and potentially carbonylation. One elegant study demonstrated that the oxidative stress-induced formation of disulfide bridges within the titin molecule (N2B unique sequence, N2B-U_s) reduced the contour length of the N2B-U_s, leading to stiffening of the whole titin molecule [52]. In the present study, neither SH oxidation nor carbonylation of the N2B and N2BA titin isoforms was affected by MPO or H₂O₂ treatment. This may be explained by the distinct sensitivities of the titin N2B isoform,

actin, and MyBP-C to oxidative changes based on the differences in their ultrastructures and SH-group contents. Our results indicate that modifications other than titin SH oxidation or carbonylation might be responsible for the marked elevation in F_{passive} after MPO treatment in human cardiomyocytes.

The significant decrease observed in $p\text{Ca}_{50}$ after MPO + H₂O₂ in this study is in marked contrast with the previous finding of an increase in $p\text{Ca}_{50}$ in skinned rat trabeculae in response to HOCl treatment [48]. This apparently conflicting result might be explained by (1) the different concentration of HOCl produced by the MPO under our experimental conditions, (2) a difference in susceptibility of the myofilaments to HOCl between the two species, and (3) the difference in the experimental setting, permeabilized, single cardiomyocytes presenting a negligible diffusion obstacle in comparison with trabeculae. Further, the pronounced MPO-induced decrease in $p\text{Ca}_{50}$ suggests that different myofilament protein modifications occur and contribute to $p\text{Ca}_{50}$ in the course of MPO and H₂O₂ treatments. Under these experimental conditions H₂O₂ more probably induced a structural, rather than a regulatory, alteration in the contractile apparatus because $p\text{Ca}_{50}$ was not affected. The deleterious effect on the maximal F_{active} and the modest increase in F_{passive} upon H₂O₂ administration imply that the H₂O₂-induced contractile alterations could be explained by a reduction in the number of force-generating cross-bridges due to the diminished longitudinal transmission of force along the sarcomeres. These findings are consistent with the observations of MacFarlane and Miller [53], who exposed chemically skinned rat cardiac muscles to the superoxide anion (from which H₂O₂ formed endogenously through spontaneous or superoxide dismutase-catalyzed dismutation). They also found a dose-dependent reduction in the maximal F_{active} without any alteration in the $p\text{Ca}_{50}$ and concluded that some aspect of the cross-bridge behavior is particularly vulnerable to superoxide [53].

A substantial amount of data indicates that the inhibition of MPO may well be useful in CV pathologies characterized by elevated MPO levels (myocardial inflammation, ischemia–reperfusion injury, and acute MI). Thus, despite the fact that MPO-I's may have adverse effects on the function of MPO in the innate host-defense mechanisms, potential therapeutic interventions through which to inhibit MPO have aroused considerable interest [42]. In the present study, both the MPO-I 4-aminobenzhydrazide (50 μM) and the antioxidant amino acid Met (10 mM) were equally able to prevent all of the MPO-evoked deleterious contractile effects in skinned human cardiomyocytes, the

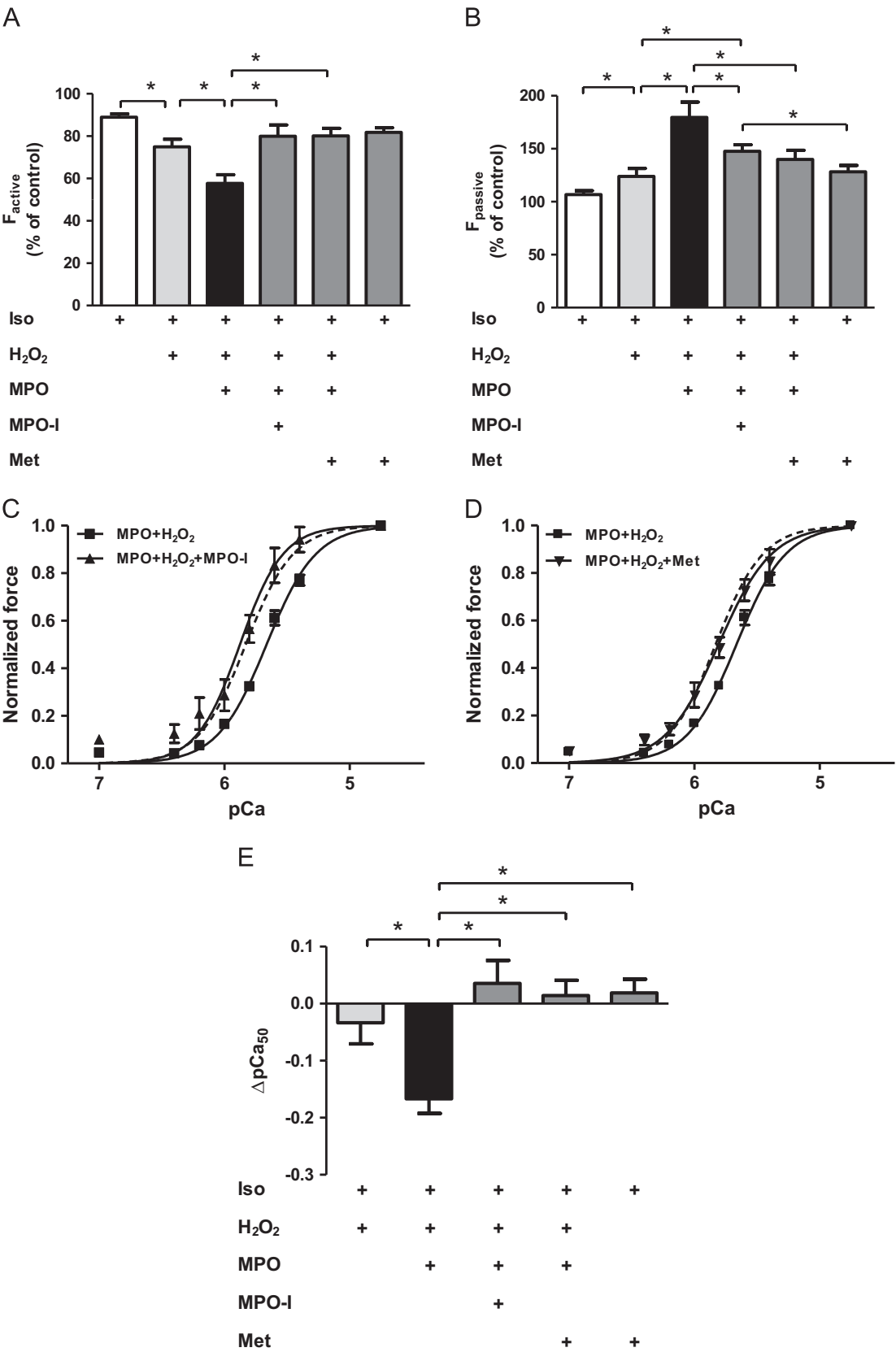


Fig. 3. The MPO-I and Met prevent the MPO-induced changes in isometric force production of human cardiomyocytes. Maximal (pCa 4.75) (A) Ca^{2+} -dependent active (F_{active}) and (B) Ca^{2+} -independent (pCa 9) passive ($F_{passive}$) force in left-ventricular cardiomyocytes treated in isolating solution (Iso) supplemented with H_2O_2 or MPO + H_2O_2 , MPO-I, or Met. Forces are expressed relative to the values measured before the subsequent treatments. The (C) MPO-I and (D) Met prevent the MPO-evoked rightward shift in the normalized pCa -force relationships. Dashed lines indicate force- pCa relationships determined in Iso. (E) Changes in the Ca^{2+} sensitivity of force production (pCa_{50}) upon H_2O_2 , MPO + H_2O_2 , MPO-I, or Met treatment. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, $*p < 0.05$.

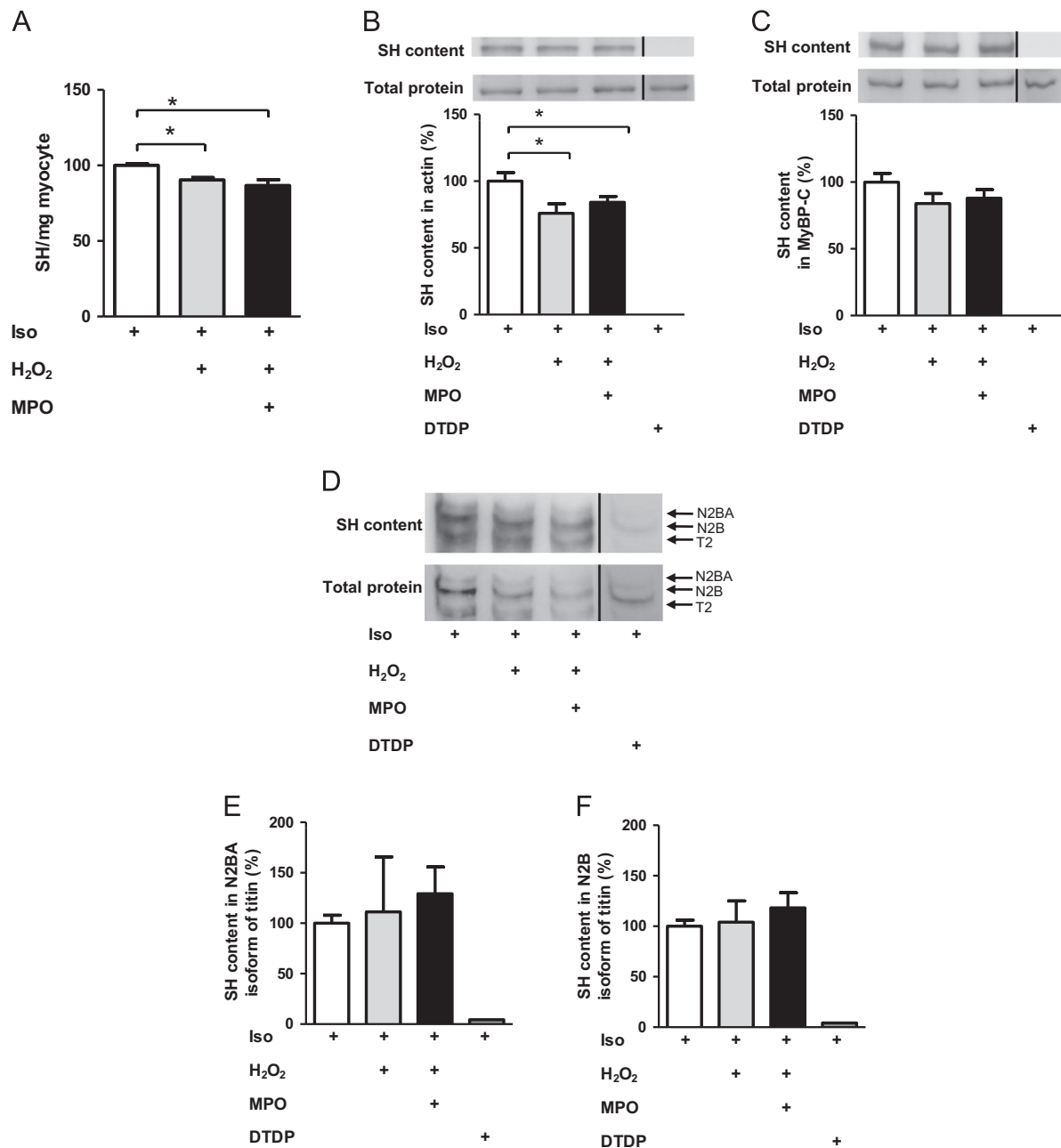


Fig. 4. MPO and H₂O₂ similarly alter SH group oxidation in myofilament proteins. (A) SH-group oxidation in a cardiomyocyte suspension treated in Iso supplemented with H₂O₂ and MPO (Ellman's reaction). (B–E) Representative examples of SH-content determination in (B) actin, (C) myosin-binding protein C (MyBP-C), and (D, E) N2BA and (D, F) N2B titin isoforms after H₂O₂ or MPO + H₂O₂ treatment using a protein biotinylation assay. T2 indicates the titin degradation product. Samples exposed to dithiodipyridine (DTDP; 2.5 mM, for 2 min) were used as positive controls. Total protein amount was determined with the Sypro ruby protein blot stain. Values are expressed relative to the SH-group content determined in Iso (time control). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, * p < 0.05 vs Iso.

latter potentially by scavenging the HOCl generated by MPO. MPO activity assays suggested that the Met-inhibited chlorinating activity is responsible for the MPO-evoked functional changes. HOCl reacts most rapidly with the sulfur-containing residues (Met and Cys) [54]. It is likely, therefore, that the high concentration of Met used in this study diminished the HOCl-evoked oxidative capacity. The oxidation of Met residues results in the generation of Met-sulfoxide (MetSO), a process that may be reversed by MetSO reductase [55]. Met is therefore considered to play a protective role against the deleterious effects of protein oxidation [28]. Interestingly, the incomplete reversion and oxidation of physiologically relevant Met residues have been shown to contribute to the impaired function of proteins [56], including actin [57]. It is important to note that other HOCl-scavenging substances than Met (e.g., glutathione, taurine, and L-ascorbic acid) were also tested recently

in HOCl-scavenging assays [58]. Given the rapid reaction rates of HOCl with biological materials, however, much higher doses of L-ascorbic acid and thiols were required to effectively protect against the direct oxidative damage induced by HOCl. This suggests that inhibiting the generation of HOCl may be a better choice than scavenging HOCl after its generation, for amelioration of HOCl-induced biological damage.

The distinct effect of the reducing agent DTT on F_{active} and F_{passive} after MPO + H₂O₂ treatment found in this study might be explained by different modifications on the structural conformation or functional activity of the contractile and regulatory myofilament proteins. The precise nature of the redox-dependent functional changes upon H₂O₂ and MPO + H₂O₂ treatment is complex and determined also by the type and site of the induced posttranslational modifications on individual proteins within the sarcomere [59]. SH residues of Cys

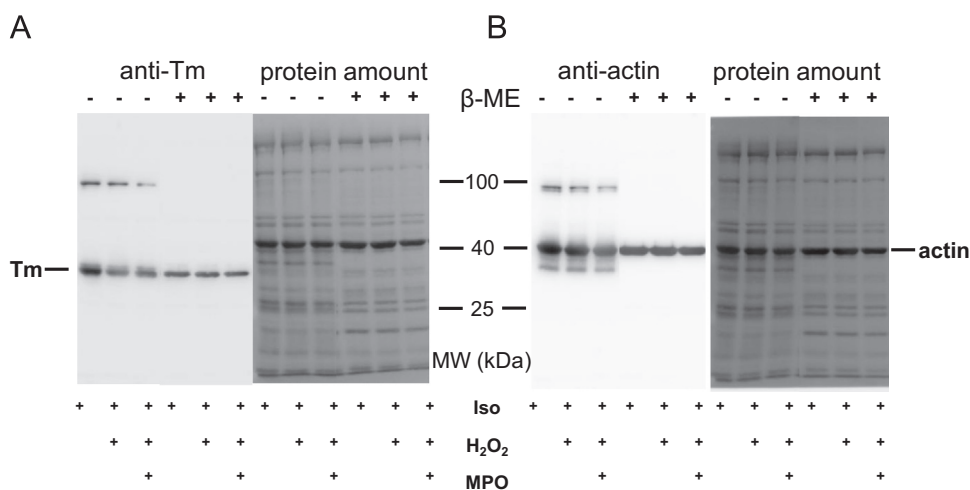


Fig. 5. No additional disulfide cross-bridge formation after H₂O₂ and MPO treatment. Left-ventricular myocardial samples solubilized in nonreducing (– β-ME) or reducing (+ β-ME) sample buffers and probed with anti-tropomyosin (Tm) (left) and anti-actin (right) antibodies after immunoblotting. Protein amount was determined with the Sypro Ruby protein blot stain; MW, molecular weight.

can undergo both reversible and irreversible modifications. The reaction between the Cys thiolate anion and H₂O₂ results in formation of intra- or intermolecular disulfide bonds, which are reversible, but further oxidation can generate sulfinic or sulfonic acid, which are considered irreversible alterations [60]. The HOCl-induced protein carbonylation is thought to be irreversible, whereas methionine oxidation can be reversed by MetSO-reductase [28] or can lead to an irreversible product (methionine-sulfone) [55].

The extent of overall SH oxidation observed after MPO treatment in this study was comparable to that in heart tissue slices exposed to high-dose HOCl [27]. There is biochemical evidence that oxidative modifications modulate the architecture of the myofilament protein actin [61] and myosin [62]. In vitro exposure of permeabilized human LV cardiomyocytes to the oxidative agent DTDP resulted in a decrease in maximal Ca²⁺-activated force production with a parallel reduction in the SH content of actin and MLC-1 [26]. Consistent with this, in the present study H₂O₂ decreased the SH content of actin. However, despite the marked reduction in *F*_{active}, no additional decrease in this parameter was detected after MPO + H₂O₂ application, suggesting that SH oxidation may not be the main contributor to the MPO-evoked decrease in *F*_{active} under these experimental conditions. Moreover, formation of an actin- and a Tm-containing protein complex observed in this study is also unlikely to be responsible for the contractile changes in the cardiomyocytes after H₂O₂ and MPO + H₂O₂ administration. The possible functional consequences of the formed protein complexes require further examinations.

In a mouse model of experimental MI, we recently identified the increased carbonylation of actin and myosin heavy chain (MHC) in the infarcted area [2]. Similar to MPO, in vitro Fenton-based myofilament carbonylation decreased *p*Ca₅₀, irrespective of the phosphorylation status of the myofilaments. Moreover, *p*Ca₅₀ correlated strongly with the myofilament carbonylation levels. In accord with this, a marked (threefold) increase in carbonyl group formation in actin was observed after 1 mM but not after 0.1 mM H₂O₂ treatment [25]. The application of H₂O₂ to cardiomyocytes at a concentration higher than 0.1 mM was hindered by its inhibitory effect on the activity of MPO [42]. H₂O₂ at 30 μM lowered *F*_{active} in parallel with a slight, but significant, increase in the carbonylation of actin and MyBP-C. Similar to SH oxidation, carbonylation of these myofilament proteins was not further affected by the addition of MPO, despite its noteworthy effects on cardiomyocyte active and passive force production. This implies that the physiological effects of MPO-catalyzed oxidative processes are independent of SH-group oxidation or carbonylation of human myocardial proteins.

Oxidative modifications in the myocardium primarily have been considered to result in reduced force generation, as also demonstrated in the present study. However, recent evidence suggests a more complex picture. Reactive oxygen and nitrogen species can activate protective mechanisms and signaling pathways (redox regulation) [60] or even increase cardiac performance [63]. Mild oxidative stress-induced S-nitrosylation at specific Cys residues was shown to be cardioprotective [64]. Subtle increases in ROS production may even enhance cardiac contractility under physiological conditions [65]. Indeed, certain oxidative myofilament modifications can lead to positive functional consequences; for example, nitroxyl (HNO), a reactive nitrogen species related to nitric oxide, induces formation of actin-Tm heterodimers, which correlates with the increase in Ca²⁺ sensitivity and dimeric forms of MHC and MLC-1, which are associated with increased force generation [63]. HNO was also shown to increase maximum tension and Ca²⁺ sensitivity of trabecular sarcomere functioning in situ [66]. These results strongly suggest that the beneficial or deleterious functional outcome is likely to be dictated by the strength and the nature of the oxidizing agent and the redox milieu of the myofilament compartment.

Because isolation of cardiomyocytes and assessment of myofilament properties were performed on LV biopsies of unused donor hearts, possible changes in the phosphorylation and oxidative status of the myofilament proteins occurring before or during tissue sampling may have interfered with the results of this study. In addition, activation of the β-adrenergic signaling and various oxidative pathways might also influence the baseline mechanical and biochemical characteristics of the cardiomyocytes. We have checked the baseline functional parameters of the cells in the study and found no major differences in the cardiomyocyte mechanical properties. Moreover, the baseline myofilament SH contents were also similar in the LV samples used for the cardiomyocyte isolation. These observations are in line with those found in our previous study, in which the reducing agent DTT did not affect *F*_{active} or *p*Ca₅₀ of cardiomyocytes derived from human donor hearts [26].

In this study LV heart samples were frozen and their functional and biochemical properties were evaluated upon thawing. To validate the use of defrosted biopsy samples, in one of our previous studies [67] force recordings of cardiomyocytes isolated from a biopsy sample immediately after procurement were compared to those of cardiomyocytes isolated from a defrosted biopsy of the same patient. These force recordings yielded identical

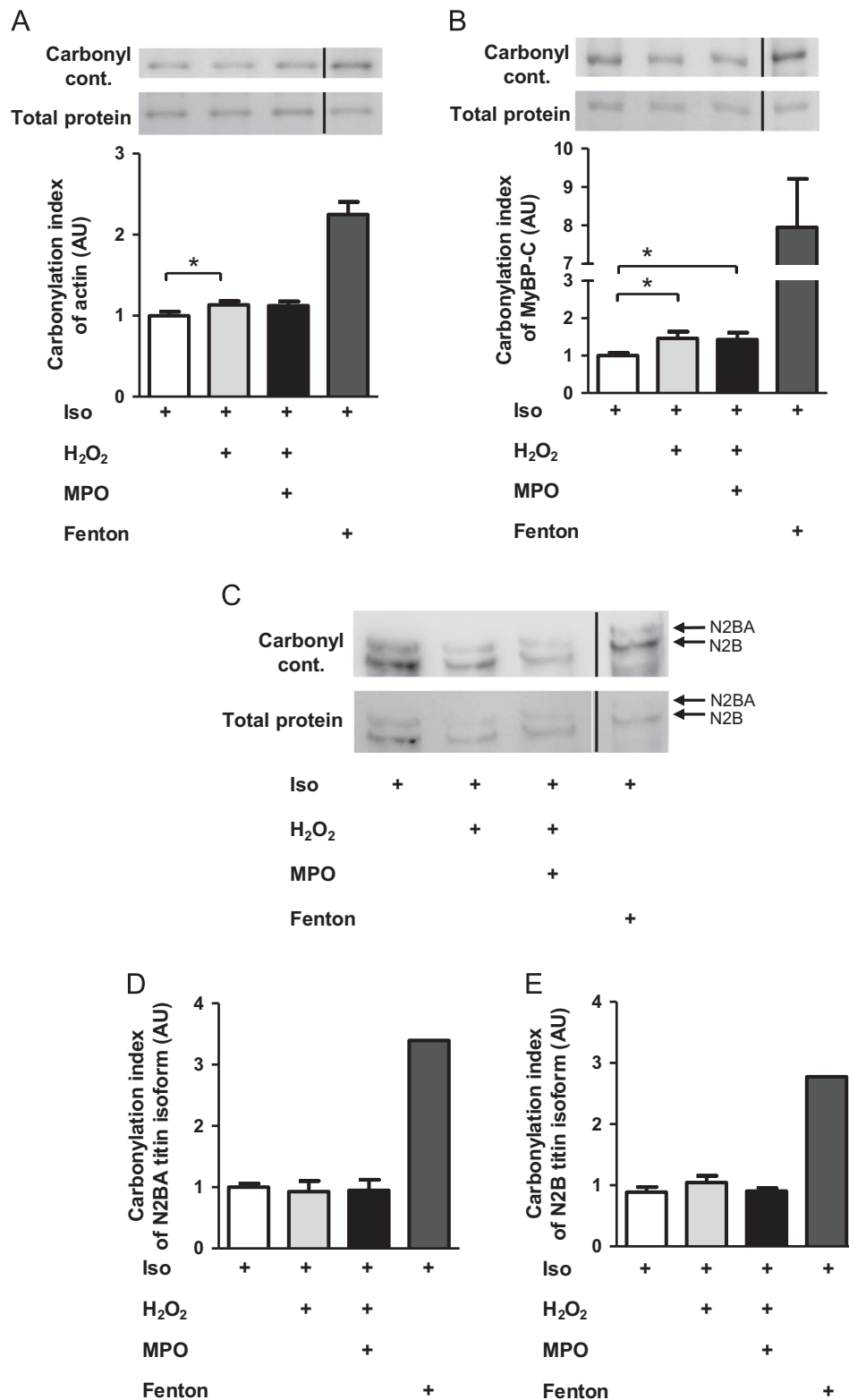


Fig. 6. MPO and H₂O₂ increase the carbonylation of actin and MyBP-C, but not that of titin. Representative examples and measurement of carbonyl group formation in (A) actin, (B) MyBP-C, and (C, D) N2BA and (C, E) N2B titin isoforms treated with Iso supplemented with H₂O₂ or MPO + H₂O₂. Left-ventricular myocardial samples treated with Fenton reagent (FeSO₄, H₂O₂, and ascorbic acid) served as positive controls. Protein carbonylation is expressed as carbonylation index (CI = 1, carbonyl group content measured in Iso). Total protein amount was determined with the Sypro ruby protein blot stain. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, * p < 0.05.

results. In addition, the extent of tissue heterogeneity was also addressed in previous studies using explanted hearts [68,69] or surgically procured biopsies [70]. In these studies the variability of force measurements of cardiomyocytes isolated from different portions of the heart was always less than 5%.

It is also important to note that several additional MPO-sensitive processes, such as protein halogenation [71], protein nitration [72], Met oxidation, sulfonic acid generation (Cys) [73], or protein degradation [28], might be responsible for the observed functional alterations. Further studies are clearly required to

elucidate the relative contributions of these processes to the overall pump function during human cardiac pathologies associated with elevated MPO levels.

Conclusion

MPO-derived oxidants contribute to myocardial contractile dysfunction by decreasing the cardiomyocyte force production and the myofilament Ca^{2+} sensitivity and increasing F_{passive} in human cardiomyocytes. These effects could be prevented by MPO inhibition and the antioxidant Met. The associated functional and biochemical alterations may provide a pharmacological tool for the prevention and/or reversion of MPO-induced contractile protein alterations, which could have therapeutic implications in cardiac pathologies characterized by elevated MPO levels.

Acknowledgments

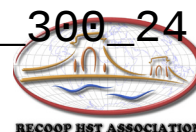
This research was supported by grants from the European Commission (FP7-Health-2010; MEDIA-261409) and the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA PD 108614 and OTKA K 109083), cofinanced by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 “National Excellence Program” and TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045. We thank László Kardos, M.D., for help in the statistical analyses. The monoclonal anti-tropomyosin antibody developed by Jim Jung-Ching Lin was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242, USA.

References

- [1] Sugiyama, S.; Okada, Y.; Sukhova, G. K.; Virmani, R.; Heinecke, J. W.; Libby, P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am. J. Pathol.* **158**:879–891; 2001.
- [2] Balogh, A.; Santer, D.; Pasztor, E. T.; Toth, A.; Czuriga, D.; Podesser, B. K.; Trescher, K.; Jaquet, K.; Erdodi, F.; Edes, I.; Papp, Z. Myofilament protein carbonylation contributes to the contractile dysfunction in the infarcted LV region of mouse hearts. *Cardiovasc. Res.* **101**:108–119; 2014.
- [3] Gutteridge, J. M.; Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**:136–147; 2000.
- [4] Heymes, C.; Bendall, J. K.; Ratajczak, P.; Cave, A. C.; Samuel, J. L.; Hasenfuss, G.; Shah, A. M. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**:2164–2171; 2003.
- [5] Paulus, W. J.; Tschope, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**:263–271; 2013.
- [6] Nicholls, S. J.; Hazen, S. L. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**:1102–1111; 2005.
- [7] Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science* **169**:1095–1097; 1970.
- [8] Brennan, M. L.; Penn, M. S.; Van Lente, F.; Nambi, V.; Shishebor, M. H.; Aviles, R. J.; Goormastic, M.; Pepoy, M. L.; McElean, E. S.; Topol, E. J.; Nissen, S. E.; Hazen, S. L. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N. Engl. J. Med.* **349**:1595–1604; 2003.
- [9] Mocatta, T. J.; Pilbrow, A. P.; Cameron, V. A.; Senthilmohan, R.; Frampton, C. M.; Richards, A. M.; Winterbourn, C. C. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**:1993–2000; 2007.
- [10] Vasilyev, N.; Williams, T.; Brennan, M. L.; Unzek, S.; Zhou, X.; Heinecke, J. W.; Spitz, D. R.; Topol, E. J.; Hazen, S. L.; Penn, M. S. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* **112**:2812–2820; 2005.
- [11] Hazen, S. L.; Heinecke, J. W. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.* **99**:2075–2081; 1997.
- [12] Shao, B.; Oda, M. N.; Oram, J. F.; Heinecke, J. W. Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr. Opin. Cardiol.* **21**:322–328; 2006.

- [13] Abu-Soud, H. M.; Hazen, S. L. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J. Biol. Chem.* **275**:37524–37532; 2000.
- [14] Loria, V.; Dato, I.; Graziani, F.; Biasucci, L. M. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflammation* **2008**:135625; 2008.
- [15] Rudolph, V.; Rudolph, T. K.; Hennings, J. C.; Blankenberg, S.; Schnabel, R.; Steven, D.; Haddad, M.; Knittel, K.; Wende, S.; Wenzel, J.; Munzel, T.; Heitzer, T.; Meinertz, T.; Hubner, C.; Baldus, S. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic. Biol. Med.* **43**:1189–1196; 2007.
- [16] Tang, W. H.; Tong, W.; Troughton, R. W.; Martin, M. G.; Shrestha, K.; Borowski, A.; Jasper, S.; Hazen, S. L.; Klein, A. L. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**:2364–2370; 2007.
- [17] Sinning, C.; Schnabel, R.; Peacock, W. F.; Blankenberg, S. Up-and-coming markers: myeloperoxidase, a novel biomarker test for heart failure and acute coronary syndrome application? *Congestive Heart Failure* **14**:46–48; 2008.
- [18] Podrez, E. A.; Abu-Soud, H. M.; Hazen, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:1717–1725; 2000.
- [19] Heinecke, J. W. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* **91**:12A–16A; 2003.
- [20] Zhang, R.; Brennan, M. L.; Shen, Z.; MacPherson, J. C.; Schmitt, D.; Molenda, C. E.; Hazen, S. L. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J. Biol. Chem.* **277**:46116–46122; 2002.
- [21] Klebanoff, S. J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: role of nitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **14**:351–360; 1993.
- [22] Hansson, M.; Olsson, L.; Nauseef, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **445**:214–224; 2006.
- [23] Cai, H.; Griendling, K. K.; Harrison, D. G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**:471–478; 2003.
- [24] Harrison, D.; Griendling, K. K.; Landmesser, U.; Hornig, B.; Drexler, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* **91**:7A–11A; 2003.
- [25] Canton, M.; Neverova, I.; Menabo, R.; Van Eyk, J.; Di Lisa, F. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**:H870–H877; 2004.
- [26] Hertelendi, Z.; Toth, A.; Borbely, A.; Galajda, Z.; van der Velden, J.; Stienen, G. J.; Edes, I.; Papp, Z. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca^{2+} sensitivity in human cardiomyocytes. *Antioxid. Redox Signaling* **10**:1175–1184; 2008.
- [27] Fliss, H. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Mol. Cell. Biochem.* **84**:177–188; 1988.
- [28] Hawkins, C. L.; Pattison, D. I.; Davies, M. J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* **25**:259–274; 2003.
- [29] Winterbourn, C. C. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* **181**:223–227; 2002.
- [30] Favero, T. G.; Colter, D.; Hooper, P. F.; Abramson, J. J. Hypochlorous acid inhibits Ca^{2+} -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Appl. Physiol.* **84**:425–430; 1998.
- [31] Kuroda, M.; Kaminishi, T.; Uchida, K.; Miyazawa, K.; Tomoike, H.; Doi, K. Ca^{2+} increase and pH decrease induced by hypochlorous acid in single quiescent myocytes isolated from rat ventricles. *Jpn. J. Physiol.* **45**:619–630; 1995.
- [32] Eley, D. W.; Korecky, B.; Fliss, H.; Desilets, M. Calcium homeostasis in rabbit ventricular myocytes: disruption by hypochlorous acid and restoration by dithiothreitol. *Circ. Res.* **69**:1132–1138; 1991.
- [33] Przygodzki, T.; Lapshina, E.; Zavadnik, I.; Sokal, A.; Bryszewska, M. 2,3-Butanedione monoxime does not protect cardiomyocytes under oxidative stress. *Cell Biochem. Funct.* **24**:413–418; 2006.
- [34] Lacy, F.; O'Connor, D. T.; Schmid-Schonbein, G. W. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J. Hypertens.* **16**:291–303; 1998.
- [35] Hampton, M. B.; Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**:3007–3017; 1998.
- [36] Liu, X.; Zweier, J. L. A real-time electrochemical technique for measurement of cellular hydrogen peroxide generation and consumption: evaluation in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:894–901; 2001.
- [37] Mutze, S.; Hebling, U.; Stremmel, W.; Wang, J.; Arnhold, J.; Pantopoulos, K.; Mueller, S. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. *J. Biol. Chem.* **278**:40542–40549; 2003.
- [38] Souza, C. E.; Maitra, D.; Saed, G. M.; Diamond, M. P.; Moura, A. A.; Pennathur, S.; Abu-Soud, H. M. Hypochlorous acid-induced heme degradation from lactoperoxidase as a novel mechanism of free iron release and tissue injury in inflammatory diseases. *PLoS One* **6**:e27641; 2011.
- [39] Spickett, C. M.; Jerlich, A.; Panasenko, O. M.; Arnhold, J.; Pitt, A. R.; Stelmazyńska, T.; Schaur, R. J. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim. Pol.* **47**:889–899; 2000.
- [40] Zhang, C.; Patel, R.; Eiserich, J. P.; Zhou, F.; Kelpke, S.; Ma, W.; Parks, D. A.; Darley-Usmar, V.; White, C. R. Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**:H1469–H1475; 2001.
- [41] Nakamura, T. Y.; Goda, K.; Okamoto, T.; Kishi, T.; Nakamura, T.; Goshima, K. Contractile and morphological impairment of cultured fetal mouse myocytes

- induced by oxygen radicals and oxidants: correlation with intracellular Ca^{2+} concentration. *Circ. Res.* **73**:758–770; 1993.
- [42] Malle, E.; Furtmuller, P. G.; Sattler, W.; Obinger, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br. J. Pharmacol.* **152**:838–854; 2007.
- [43] Borbely, A.; Toth, A.; Edes, I.; Virag, L.; Papp, J. G.; Varro, A.; Paulus, W. J.; van der Velden, J.; Stienen, G. J.; Papp, Z. Peroxynitrite-induced α -actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc. Res.* **67**:225–233; 2005.
- [44] Fabiato, A.; Fabiato, F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol. (Paris)* **75**:463–505; 1979.
- [45] Canton, M.; Menazza, S.; Sheeran, F. L.; Polverino de Laureto, P.; Di Lisa, F.; Pepe, S. Oxidation of myofibrillar proteins in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**:300–309; 2011.
- [46] Vinten-Johansen, J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **61**:481–497; 2004.
- [47] Miller, D. J.; MacFarlane, N. G. Intracellular effects of free radicals and reactive oxygen species in cardiac muscle. *J. Hum. Hypertens.* **9**:465–473; 1995.
- [48] MacFarlane, N. G.; Miller, D. J. Effects of the reactive oxygen species hypochlorous acid and hydrogen peroxide on force production and calcium sensitivity of rat cardiac myofilaments. *Pflügers Arch.* **428**:561–568; 1994.
- [49] van Heerebeek, L.; Franssen, C. P.; Hamdani, N.; Verheugt, F. W.; Somsen, G. A.; Paulus, W. J. Molecular and cellular basis for diastolic dysfunction. *Curr. Heart Failure Rep* **9**:293–302; 2012.
- [50] LeWinter, M. M.; Granzier, H. Cardiac titin: a multifunctional giant. *Circulation* **121**:2137–2145; 2010.
- [51] Borbely, A.; van Heerebeek, L.; Paulus, W. J. Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circ. Res.* **104**:12–14; 2009.
- [52] Grutznier, A.; Garcia-Manyès, S.; Kotter, S.; Badilla, C. L.; Fernandez, J. M.; Linke, W. A. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence. *Biophys. J.* **97**:825–834; 2009.
- [53] MacFarlane, N. G.; Miller, D. J. Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ. Res.* **70**:1217–1224; 1992.
- [54] Szuchman-Sapir, A. J.; Pattison, D. I.; Ellis, N. A.; Hawkins, C. L.; Davies, M. J.; Witting, P. K. Hypochlorous acid oxidizes methionine and tryptophan residues in myoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:789–798; 2008.
- [55] Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med.* **18**:93–105; 1995.
- [56] Oien, D. B.; Canello, T.; Gabizon, R.; Gasset, M.; Lundquist, B. L.; Burns, J. M.; Moskovitz, J. Detection of oxidized methionine in selected proteins, cellular extracts and blood serums by novel anti-methionine sulfoxide antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.* **485**:35–40; 2009.
- [57] Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Gagliano, N.; Di Simplicio, P.; Colombo, R.; Milzani, A. Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin. *Free Radic. Biol. Med.* **32**:927–937; 2002.
- [58] Liu, Z.; Yan, Y.; Wang, S.; Ong, W.-Y.; Ong, C. N.; Huang, D. Assaying myeloperoxidase inhibitors and hypochlorous acid scavengers in HL60 cell line using quantum dots. *Am. J. Biomed. Sci.* **5**:140–153; 2013.
- [59] Steinberg, S. F. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circ. Res.* **112**:393–405; 2013.
- [60] Chung, H. S.; Wang, S. B.; Venkatraman, V.; Murray, C. I.; Van Eyk, J. E. Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ. Res.* **112**:382–392; 2013.
- [61] Milzani, A.; Dalle-Donne, I.; Colombo, R. Prolonged oxidative stress on actin. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**:267–274; 1997.
- [62] Wilson, G. J.; dos Remedios, C. G.; Stephenson, D. G.; Williams, D. A. Effects of sulphhydryl modification on skinned rat skeletal muscle fibres using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *J. Physiol.* **437**:409–430; 1991.
- [63] Gao, W. D.; Murray, C. I.; Tian, Y.; Zhong, X.; DuMond, J. F.; Shen, X.; Stanley, B. A.; Foster, D. B.; Wink, D. A.; King, S. B.; Van Eyk, J. E.; Paolocci, N. Nitroxyl-mediated disulfide bond formation between cardiac myofilament cysteines enhances contractile function. *Circ. Res.* **111**:1002–1011; 2012.
- [64] Kohr, M. J.; Evangelista, A. M.; Ferlito, M.; Steenbergen, C.; Murphy, E. S-nitrosylation of TRIM72 at cysteine 144 is critical for protection against oxidation-induced protein degradation and cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **69**:67–74; 2014.
- [65] Kubin, A. M.; Skoumal, R.; Tavi, P.; Konyi, A.; Perjes, A.; Leskinen, H.; Ruskoaho, H.; Szokodi, I. Role of reactive oxygen species in the regulation of cardiac contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**:884–893; 2011.
- [66] Dai, T.; Tian, Y.; Tocchetti, C. G.; Katori, T.; Murphy, A. M.; Kass, D. A.; Paolocci, N.; Gao, W. D. Nitroxyl increases force development in rat cardiac muscle. *J. Physiol.* **580**:951–960; 2007.
- [67] Borbely, A.; van der Velden, J.; Papp, Z.; Bronzwaer, J. G.; Edes, I.; Stienen, G. J.; Paulus, W. J. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* **111**:774–781; 2005.
- [68] van der Velden, J.; Klein, L. J.; Zaremba, R.; Boontje, N. M.; Huybregts, M. A.; Stooker, W.; Eijssman, L.; de Jong, J. W.; Visser, C. A.; Visser, F. C.; Stienen, G. J. Effects of calcium, inorganic phosphate, and pH on isometric force in single skinned cardiomyocytes from donor and failing human hearts. *Circulation* **104**:1140–1146; 2001.
- [69] van der Velden, J.; Papp, Z.; Zaremba, R.; Boontje, N. M.; de Jong, J. W.; Owen, V. J.; Burton, P. B.; Goldmann, P.; Jaquet, K.; Stienen, G. J. Increased Ca^{2+} -sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc. Res.* **57**:37–47; 2003.
- [70] van der Velden, J.; Klein, L. J.; van der Bijl, M.; Huybregts, M. A.; Stooker, W.; Witkop, J.; Eijssman, L.; Visser, C. A.; Visser, F. C.; Stienen, G. J. Isometric tension development and its calcium sensitivity in skinned myocyte-sized preparations from different regions of the human heart. *Cardiovasc. Res.* **42**:706–719; 1999.
- [71] Davies, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **48**:8–19; 2011.
- [72] Yan, Z.; Liang, F.; Guo, L.; Wang, J.; Wang, X. L.; Cheng, X. L.; Ma, X. L.; Liu, H. R. Myeloperoxidase increased cardiomyocyte protein nitration in mice subjected to nonlethal mechanical trauma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**:531–535; 2010.
- [73] Hawkins, C. L.; Morgan, P. E.; Davies, M. J. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **46**:965–988; 2009.



Single acute stress-induced progesterone and ovariectomy alter cardiomyocyte contractile function in female rats

Judit Kalász¹, Enikő Pásztor Tóth¹, Beáta Bódi¹, Miklós Fagyas¹, Attila Tóth¹, Bhattoa Harjit Pal², Sándor G. Vári³, Marta Balog⁴, Senka Blažetić⁴, Marija Heffer⁴, Zoltán Papp¹, Attila Borbély¹

Aim To assess how ovarian-derived sex hormones (in particular progesterone) modify the effects of single acute stress on the mechanical and biochemical properties of left ventricular cardiomyocytes in the rat.

Methods Non-ovariectomized (control, n=8) and ovariectomized (OVX, n=8) female rats were kept under normal conditions or were exposed to stress (control-S, n=8 and OVX-S, n=8). Serum progesterone levels were measured using a chemiluminescent immunoassay. Left ventricular myocardial samples were used for isometric force measurements and protein analysis. Ca^{2+} -dependent active force (F_{active}), Ca^{2+} -independent passive force (F_{passive}), and Ca^{2+} -sensitivity of force production were determined in single, mechanically isolated, permeabilized cardiomyocytes. Stress- and ovariectomy-induced alterations in myofilament proteins (myosin-binding protein C [MyBP-C], troponin I [TnI], and titin) were analyzed by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis using protein and phosphoprotein stainings.

Results Serum progesterone levels were significantly increased in stressed rats (control-S, 35.6 ± 4.8 ng/mL and OVX-S, 21.9 ± 4.0 ng/mL) compared to control (10 ± 2.9 ng/mL) and OVX (2.8 ± 0.5 ng/mL) groups. F_{active} was higher in the OVX groups (OVX, 25.9 ± 3.4 kN/m² and OVX-S, 26.3 ± 3.0 kN/m²) than in control groups (control, 16.4 ± 1.2 kN/m² and control-S, 14.4 ± 0.9 kN/m²). Regarding the potential molecular mechanisms, F_{active} correlated with MyBP-C phosphorylation, while myofilament Ca^{2+} -sensitivity inversely correlated with serum progesterone levels when the mean values were plotted for all animal groups. F_{passive} was unaffected by any treatment.

Conclusion Stress increases ovary-independent synthesis and release of progesterone, which may regulate Ca^{2+} -sensitivity of force production in left ventricular cardiomyocytes. Stress and female hormones differently alter Ca^{2+} -dependent cardiomyocyte contractile force production, which may have pathophysiological importance during stress conditions affecting postmenopausal women.

¹University of Debrecen, Faculty of Medicine, Institute of Cardiology, Division of Clinical Physiology, Debrecen, Hungary

²University of Debrecen, Faculty of Medicine, Department of Laboratory Medicine, Debrecen, Hungary

³Cedars-Sinai Medical Center, International Research and Innovation Management Program, Los Angeles, CA, USA

⁴J. J. Strossmayer University of Osijek, School of Medicine, Department of Medical Biology, Osijek, Croatia

Received: January 15, 2014

Accepted: May 5, 2014

Correspondence to:

Attila Borbély
University of Debrecen, Institute of Cardiology
Division of Clinical Physiology
Móricz Zsigmond krt. 22
H-4032 Debrecen, Hungary
borbelya@med.unideb.hu

The relation between stress, gender, and cardiovascular diseases is well established (1-4). Some of the known risk factors for cardiovascular disease such as smoking, unhealthy diet, and behavioral and psychosocial stress have deleterious effects on the cardiovascular system via activation of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (5-8). Acute restraint stress is a preferred and widely used method to induce physical stress in animal models (9). Moreover, restraint and immobilization are important as models for psychological stress shown to adversely affect ovarian function (10) and play a pivotal role in the pathomechanism of Takotsubo (stress) cardiomyopathy in postmenopausal women (11).

Gender is a very important factor in the development of cardiovascular diseases. Premenopausal women have better lipid profile, endothelial function (12), and a lower risk to develop coronary artery disease and myocardial infarction (MI) than men. These advantages of female gender, however, are abolished after menopause, which is associated with increased prevalence of left ventricular (LV) hypertrophy, decreased LV ejection fraction and LV contractility (13). One of the explanations for the distinct myocardial responses is the cardioprotective effect of female sex hormones (eg, estrogens) (14,15).

Progesterone performs several actions on the heart: it exerts an antiarrhythmic effect by accelerating cardiac repolarization (16) and has a preventive role in ischemia-reperfusion injury via reducing inflammatory response (17). It has been shown to inhibit cardiomyocyte apoptosis (18), induce vasodilation, and reduce blood pressure via increasing nitric oxide (NO) levels in normotensive and hypertensive patients (19). Importantly, progesterone is produced by both the ovaries and the adrenal gland. Moreover the adrenal progesterone content is similar or even larger than that in the ovaries (20). Adrenal progesterone production and secretion increase along with corticosterone regardless of gender and estradiol under stress conditions (21). Progesterone, being an indirect precursor of cortisol (22), increases in response to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation (23).

In the heart, there are multiple estrogen hormone receptor types (24). The expression of aromatase in the heart suggests that estrogen may be synthesized also within the cardiomyocyte to exert autocrine/paracrine actions (25).

Myocyte contractility seems to be modulated by systemic estrogen levels and altered in cardiomyocytes derived from ovariectomized (OVX) rats (26). In par-

ticular, myofilament Ca^{2+} -sensitivity is increased in isolated myofibrillar preparations from OVX rats, and restored to the basal levels with estrogen supplementation (27,28).

Activation of the sympathetic nervous system plays a central role in the regulation of cardiomyocyte contractile function and myofilament Ca^{2+} -sensitivity through beta-adrenergic receptor stimulation, activating the protein kinase A (PKA). PKA-mediated phosphorylation of Ca^{2+} -handling and myofilament proteins (myosin binding protein-C [MyBP-C], troponin I [TnI], titin) were shown to alter cardiomyocyte contractile function (29,30). It has been suggested that female cardiomyocytes operate at lower levels of intracellular Ca^{2+} than those of males, particularly under inotropic conditions (31). This difference in Ca^{2+} homeostasis may be related to the fact that estrogen suppresses the L-type Ca^{2+} current (32,33) and may reduce the amount of Ca^{2+} released from the sarcoplasmic reticulum (SR) (34), which was shown to be larger in myocytes from OVX rats (35). Not only cardiomyocyte contraction, but relaxation may also be affected by estrogen via altered Ca^{2+} re-uptake into the SR and modified Ca^{2+} efflux via increased sarcolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange (36). Interestingly, despite similar SR Ca^{2+} content in males and females (37), studies using OVX models report conflicting results concerning changes in the expression and activity of the SR Ca^{2+} -ATPase and its regulator protein phospholamban (38-41). Much less is known about the possible effect of progesterone on cardiomyocyte contractile function. We hypothesized that progesterone affected force production of single isolated cardiomyocytes. Therefore, in the present study we aimed to investigate how sex hormones (particularly progesterone) and single acute restraint stress altered cardiomyocyte contractile function and attempted to identify the consequent posttranslational myofilament protein modifications in OVX rats.

METHODS

Animals

The study was conducted using female Sprague-Dawley rats ($n=32$) at the Department of Medical Biology of J. J. Strossmayer University of Osijek, School of Medicine (Osijek, Croatia) between June and September of 2013. Sixteen rats were ovariectomized at the age of 12 weeks. The ovariectomy was performed according to the protocol HUS-QREC-PRD-932 (Issue: 01, Revision 03). The anesthetized rat was placed in ventral recumbency with tail toward the surgeon. Following shaving and swabbing of

the dorsal mid-lumbar area, a 2-3 cm dorsal midline skin incision was made halfway between the caudal edge of the ribcage and the base of the tail. Thereafter, a single incision 5.5-10 mm long was made into the muscle wall on both the right and left sides, and the ovaries and the oviducts were exteriorized through the muscle wall. A hemostat was clamped around the uterine vasculature between the oviduct and uterus. Each ovary and part of the oviduct was removed with single cuts through the oviducts near the ovary. The remaining tissue was replaced into the peritoneal cavity. The muscle incision was not sutured. Age-matched not operated female Sprague-Dawley rats served as controls ($n=16$). Animals were housed in standard cages at room temperature with natural day and night exchange. Standard laboratory food and tap water were available *ad libitum*. At the age of 28 weeks, 8 control and 8 OVX rats were submitted to cold restraint stress: rats were placed and closed in a metal tube with a diameter that did not allow them to move or turn around. The animals were kept under these conditions in a cold room at $+4^{\circ}\text{C}$ for 1 hour (control-S and OVX-S groups). Immediately after the stress, the rats were anesthetized using combined inhalation of isoflurane (Forane®, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, United Kingdom) in a glass chamber and intramuscular administration of ketamine (Ketanest®S, Pfizer Corporation, Wien, Austria, 30 mg/kg body weight) and then sacrificed. Blood was drawn from the heart for plasma measurements. Thereafter, the left ventricles were cut and placed immediately into liquid nitrogen and stored at -80°C . The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Osijek University School of Medicine. The heart tissue samples were transferred according to the regulations stated in the official material transfer agreement between the School of Medicine Osijek and the University of Debrecen (DETI/22-3/2013).

Determination of serum estrogen and progesterone levels

Estradiol was measured using a chemiluminescent immunoassay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) by a specific polyclonal antibody against estradiol. The endogenous estradiol is released from the serum by mesterolone, which competes for the binding sites located on the biotinylated antibodies with estradiol derivative labeled with rutenium complex. The inter-assay coefficient of variation (CV) was $<7\%$ (lower detection limit: 4.9 pg/mL, upper detection limit: 4.3 ng/mL). Progesterone was measured by a chemiluminescent immunoassay (Roche Diagnostics GmbH) using a specific monoclonal antibody

against progesterone. The endogenous progesterone is released from the serum by danazol, which competes for the binding sites located on the biotinylated antibodies with progesterone derivative labeled with rutenium complex. The inter-assay CV was $<5\%$ (lower detection limit: 29.9 pg/mL, upper detection limit: 60.1 ng/mL). Serum glucose concentration was measured by an enzymatic, photometric method (Roche Diagnostics GmbH). As a first step, glucose-6-phosphate is formed from glucose and adenosine triphosphate catalyzed by hexokinase. In the presence of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) the glucose-6-phosphate is oxidized to gluconate-6-phosphate. The rate of formation of NADPH correlates with the glucose concentration and can be measured using photometry. Serum cholesterol was determined by an enzymatic, colorimetric method (Roche Diagnostics GmbH). Formation of H_2O_2 – generated during the oxidation of the cholesterol by cholesterol oxidase – leads to the generation of red quinoneimine stain from 4-aminophenazone and phenol. The intensity of this red stain correlates with the concentration of cholesterol.

Measurement of cardiomyocyte mechanical parameters

Force measurements were performed in single, isolated cardiomyocytes derived from left ventricular (LV) rat myocardium, as described previously (42). Briefly, samples were first defrosted in isolating solution (containing 100 mM KCl, 2 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 4 mM Na_2ATP , 10 mM imidazol; 40 μM leupeptin, 10 μM E64, pH 7.0), then mechanically disrupted and treated with isolating solution supplemented with 0.5% Triton-X-100 to solubilize the membranes and membrane-associated structures. Thereafter, single cardiomyocytes were mounted between a force transducer and an electromagnetic motor with silicone adhesive. Sarcomere length was adjusted to 2.3 μm . Relaxing (containing 37.11 mM KCl, 10 mM BES, 6.41 mM MgCl_2 , 7 mM EGTA, 6.94 mM Na_2ATP , 15 mM Na_2CrP , 40 μM leupeptin, 10 μM E64; pH 7.2) and activating (containing 37.34 mM KCl, 10 mM BES, 6.24 mM MgCl_2 , 7 mM CaEGTA, 6.99 mM Na_2ATP , 15 mM Na_2CrP , 40 μM leupeptin, 10 μM E64; pH 7.2) solutions were used during force measurements with a pCa (ie, $-\log[\text{Ca}^{2+}]$) value of 10 and 4.5, respectively. Solutions with intermediate Ca^{2+} concentrations were prepared by mixing activating and relaxing solutions. Cardiomyocyte active force (F_{active}) and calcium sensitivity of force production (characterized by pCa_{50}) were determined by activations in solutions with different Ca^{2+} concentrations. Cardiomyocyte passive force (F_{passive}) was measured in the relaxing solution.

Determination of myofilament protein phosphorylation

A LV myocardial tissue sample (20 mg) was first handled similarly as for cardiomyocyte isolation, then homogenized in a sample buffer (containing 8 M urea, 2 M thiourea, 3% sodium dodecyl sulfate [SDS], 75 mM DTT, 0.05 M Tris-HCl [pH 6.8], 40 μ M leupeptin, 10 μ M E64, 10% glycerol, bromophenol blue). After centrifugation (16 000 g for 5 minutes) protein concentration was measured from the supernatant with a dot-blot based method, where different dilutions from bovine serum albumine served as standard. Protein concentration of the samples was adjusted to 1 mg/mL. Polyacrylamide gels (2% and 4%, agarose-strengthened or 15%) were used to separate titin, MyBP-C, and TnI, respectively. Phosphorylation status of myofilament proteins was assessed by Pro-Q® Diamond phosphoprotein staining (Invitrogen, Eugene, OR, USA), while protein composition was visualized by Coomassie blue (Reanal, Budapest, Hungary). Separation and identification of myofilament proteins were carried out based on their molecular weight and compared to those of a molecular weight standard (marker 4.6 kDa – 300 kDa).

Data analysis and statistics

F_{active} and F_{passive} values were normalized to cardiomyocyte cross-sectional area and expressed in kN/m². Calcium-force relationship was fitted by a modified Hill equation (42). Intensities of the protein bands were quantified by densitometry using the ImageJ 1.41o (NIH, Bethesda, MD, USA) and Magic Plot Student 2.5.1 (Saint Petersburg, Russia) softwares. Phosphorylation of myofilament proteins was normalized to the protein amount and expressed in percentages relative to an internal control (same LV rat sample on each gel). Statistical significance was calculated by analysis of variance (ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test) and linear regression. GraphPad Prism

5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) software was used. Values are given as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The level of statistical significance was $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of ovariectomy and stress on basic parameters

Basic physical and laboratory parameters measured in the four animal groups are listed in Table 1. Both body weight and heart weight were significantly higher in the OVX-S group than in the control group, but heart-to-body weight ratios did not significantly differ. Serum basal glucose and total cholesterol levels were the same in all groups. Other relevant physiological parameters, such as heart rate and arterial blood pressure, were not assessed in this study.

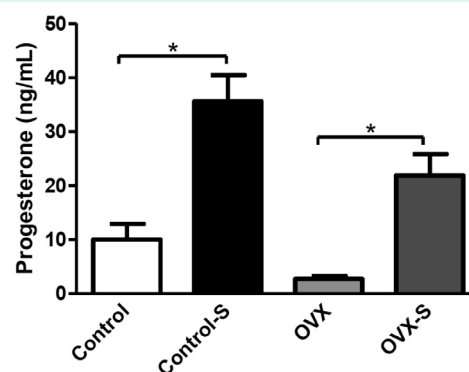


FIGURE 1. Serum progesterone levels measured using a chemiluminescent immunoassay in control and ovariectomized (OVX) rats not exposed and exposed to stress (control and OVX vs control-S and OVX-S, $n = 8$ for all groups). Bars are mean $\pm$ standard error of the mean and significant differences ($P < 0.05$) are denoted by asterisks.

TABLE 1. Basic physical and laboratory parameters measured in control, stressed control (control-S), ovariectomized (OVX), and stressed OVX (OVX-S) animals. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean

	Control	Control-S	OVX	OVX-S	P value
Body weight (g)	288.4 $\pm$ 4.7	286.6 $\pm$ 2.4	297.8 $\pm$ 3.9	328.6 $\pm$ 5.8*†	<0.001
Heart weight (g)	1.1 $\pm$ 0.05	1.1 $\pm$ 0.03	1.2 $\pm$ 0.04	1.3 $\pm$ 0.04*	<0.050
Heart-to-body weight ratio	0.004 $\pm$ 0.0002	0.004 $\pm$ 0.0001	0.004 $\pm$ 0.0001	0.004 $\pm$ 0.0002	N.S.
Progesterone (ng/mL)	10 $\pm$ 2.9	35.6 $\pm$ 4.8*	2.8 $\pm$ 0.5	21.9 $\pm$ 4.0†	<0.001*; <0.01†
Glucose (mmol/L)	11.8 $\pm$ 0.9	9.7 $\pm$ 0.7	9.9 $\pm$ 0.4	10.3 $\pm$ 0.7	N.S.
Cholesterol (mmol/L)	2.4 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1	N.S.

*Significant difference vs control.

†Significant difference vs control-S.

‡Significant difference vs OVX.

Effects of ovariectomy and stress on serum estrogen and progesterone levels

Female sex hormones were measured from the sera of control and OVX animals. No measurable estrogen levels (detection limit was 4.9 pg/mL) were present in all OVX samples, indicating successful ovariectomy. Some of the control animals had measurable estrogen levels (about 25%), which was in accordance with the phases in the animal's estrus cycle (data not shown). Progesterone levels were above the lower detection limit in all animal groups and were significantly increased in stressed control (35.6 ± 4.8 ng/mL) and stressed OVX (21.9 ± 4.0 ng/mL) rats compared to non-stressed control (10 ± 2.9 ng/mL) and OVX (2.8 ± 0.5 ng/mL) groups ($n=8$ rats/group, $P<0.001$ control-S vs control; $P<0.010$ OVX-S vs OVX, Figure 1). The increase in progesterone levels during stress

was comparable in control-S (25.6 ng/mL) and OVX-S (19.1 ng/mL) rats.

Ovariectomy alters cardiomyocyte contractile function

F_{active} , F_{passive} , and calcium sensitivity of force production (pCa_{50}) were determined in cardiomyocytes isolated from LV myocardium of rats at a sarcomere length of $2.3 \mu\text{m}$ ($n=10$ cardiomyocytes per group) (Figure 2A). F_{active} was significantly higher in OVX and OVX-S animals than in control and control-S rats (25.9 ± 3.4 kN/m² and 26.3 ± 3.0 kN/m² vs 16.4 ± 1.2 kN/m² and 14.4 ± 0.9 kN/m², respectively, $P<0.050$). However, no change in F_{active} was observed in control and OVX animals upon stress (Figure 2B). No significant differences in pCa_{50} were found between control and OVX animals, although a trend toward lower pCa_{50} was observed in control-S and OVX-S cardiomyocytes (Figure 2C).

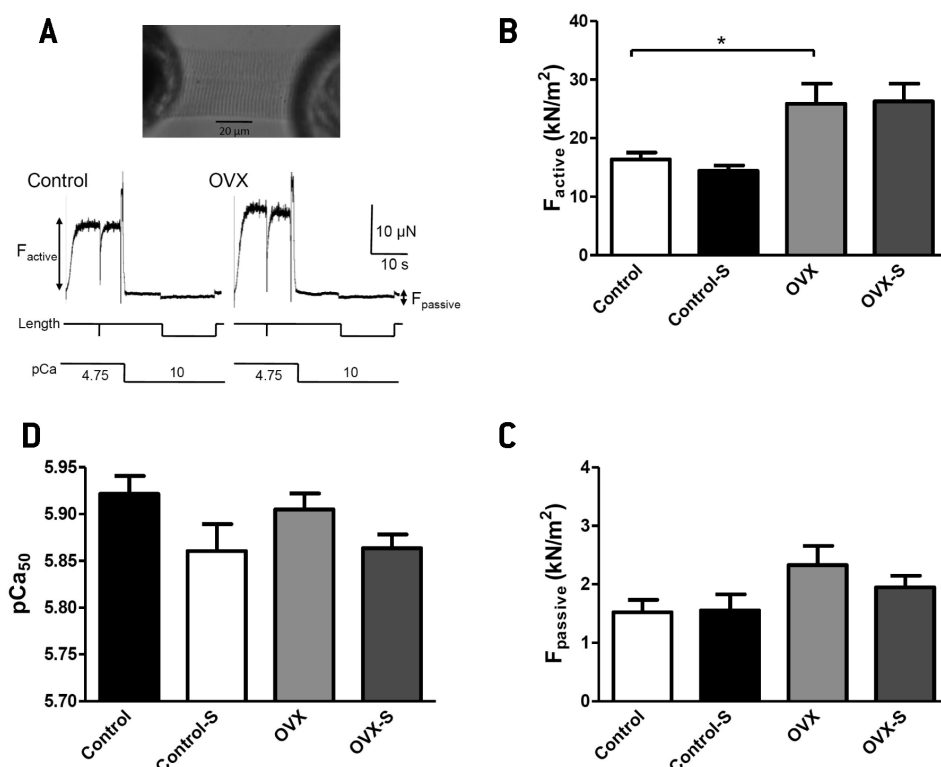


FIGURE 2. Effects of ovariectomy and stress on cardiomyocyte mechanics. (A) Single cardiomyocyte, isolated from rat myocardium, mounted between a sensitive force transducer and an electromagnetic motor (upper panel). Measurements of maximum (pCa [ie, $-\log[Ca^{2+}]$ 4.75] Ca^{2+} -dependent active (F_{active}) and Ca^{2+} -independent (pCa 10) passive (F_{passive}) force levels in control and ovariectomized (OVX) animals (lower panel). (B) Effect of ovariectomy (OVX) and stress (control-S and OVX-S) on cardiomyocyte F_{active} (* $P<0.050$ vs control). (C) Calcium sensitivity of force production (pCa_{50}) determined in skinned cardiomyocytes derived from LV tissue in the four animal groups. (D) Unaltered F_{passive} by ovariectomy or stress (number of cardiomyocytes, $n=10$ per group of 5-7 animals).

Neither ovariectomy nor stress altered F_{passive} in all groups (Figure 2D). There were no changes in cardiomyocyte structure after ovariectomy or stress (data not shown).

Changes in myofilament protein composition and phosphorylation upon ovariectomy and stress

Myofilament protein composition was studied by SDS gel electrophoresis followed by quantitative protein staining. No considerable differences were detected in myocardial protein composition between control and OVX animals (Figure 3A). Using Pro-Q® Diamond phosphoprotein staining, a significant increase in relative total TnI phosphorylation was observed in OVX animals compared to controls ($153 \pm 14.4\%$ vs $98.5 \pm 4\%$, $P < 0.001$). The increased TnI phosphorylation in OVX animals was not accompanied by a decrease in the pCa_{50} measured in the cardio-

myocytes ($r = 0.268$, $P = 0.732$). Phosphorylation of TnI in OVX-S rats ($113.1 \pm 3.6\%$) was similar to the values measured in control and control-S animals (Figure 3B). Phosphorylation of MyBP-C was significantly higher in OVX rats than in controls ($167.7 \pm 7\%$ vs $131.4 \pm 5.5\%$, $P < 0.001$), but it remained unchanged under stress conditions in OVX-S rats ($182.9 \pm 6.2\%$, Figure 3C). In accordance with the unchanged F_{passive} , phosphorylation of titin was the same in the four groups (Figure 3D).

Correlation of cardiomyocyte function with myofilament phosphorylation and sex hormone levels

When phosphorylation of myofilament proteins and cardiomyocyte functional parameters were correlated, a strong positive correlation was observed between cardiomyocyte F_{active} and MyBP-C phosphorylation ($r = 0.986$, $P < 0.050$, Fig-

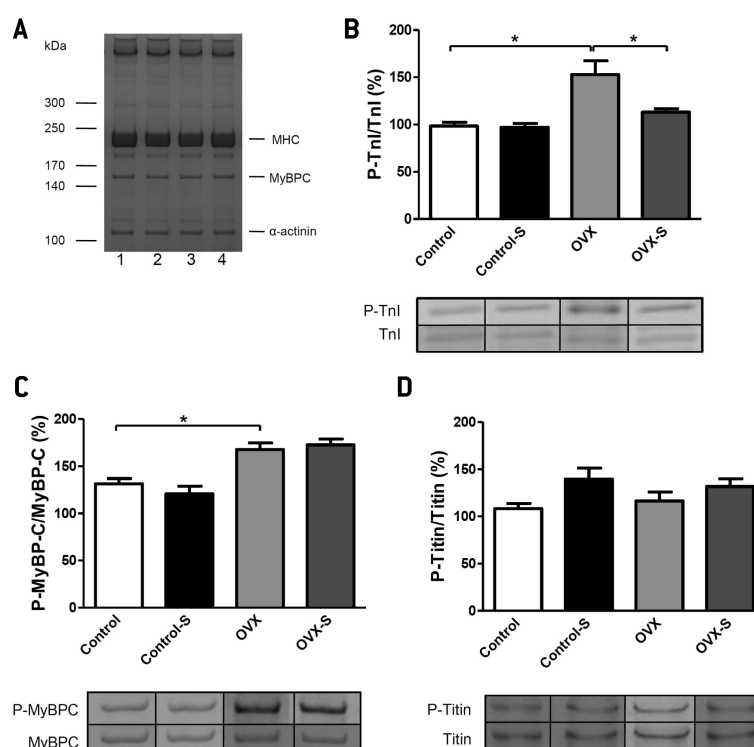


FIGURE 3. Representative examples of myofilament protein composition and protein phosphorylation in the left ventricular (LV) myocardium from control and ovariectomized (OVX) rats. **(A)** Myofilament protein composition in LV tissue homogenate in control – 1, stressed control (control-S) – 2, ovariectomized (OVX) – 3, and stressed-OVX (OVX-S) animals – 4 (Coomassie blue protein staining, MHC – myosin heavy chain). **(B)** Increased overall troponin I phosphorylation (P-TnI) in OVX, but not in OVX-S group ($*P < 0.05$ vs control). **(C)** Elevated myosin binding protein-C phosphorylation (P-MyBP-C) in OVX and OVX-S rats ($*P < 0.05$ vs control). **(D)** Similar titin phosphorylation (P-titin) in the four experimental groups (Phosphorylation of myofilament proteins was normalized to the protein amount and expressed in percentages relative to an internal control).

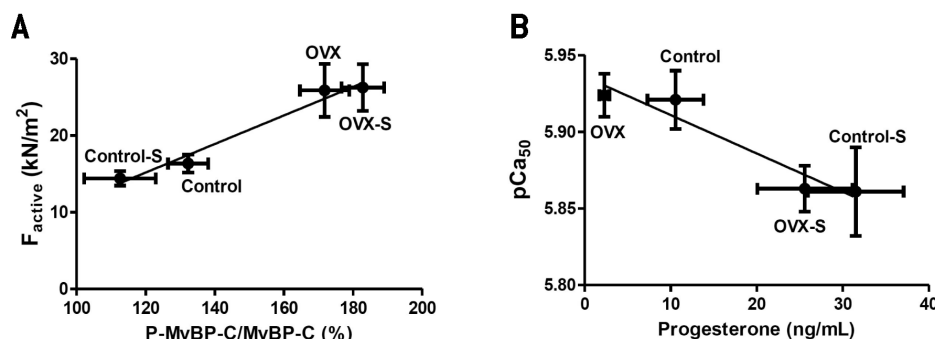


FIGURE 4. Correlations between myofilament phosphorylation, sex hormones, and cardiomyocyte function. **(A)** Strong correlation between myosin-binding protein C (MyBP-C) phosphorylation and cardiomyocyte F_{active} ($r=0.986$, $P<0.05$). **(B)** Calcium sensitivity of force production (pCa_{50}) inversely correlated with serum progesterone levels ($r=0.963$, $P<0.05$). Correlation was assessed by fitting the values by a linear regression.

ure 4A). Titin phosphorylation did not correlate with cardiomyocyte $F_{passive}$ ($r=0.139$, $P=0.861$). Serum progesterone levels and pCa_{50} of the cardiomyocytes measured in the same animals showed a significant inverse correlation ($r=0.963$, $P<0.050$, Figure 4B).

DISCUSSION

Several studies reported divergent effects of stress and female sex hormones on the cardiovascular system, however, their effect on cardiomyocyte contractile function is not fully elucidated. Our study showed that: I. serum progesterone levels were more than three times higher in control-S and OVX-S rats than in control and OVX animals; II. F_{active} of cardiomyocytes was significantly higher in OVX rats than in controls; III. $F_{passive}$ and pCa_{50} was similar in OVX and control animals, although a moderate trend to lower pCa_{50} values was observed in control-S and OVX-S rats; IV. progesterone levels inversely correlated with pCa_{50} of cardiomyocytes; V. no major differences in myofilament protein composition were observed among the four groups, however, overall phosphorylation of TnI and MyBP-C was significantly higher in the OVX group than in controls.

Many studies showed that serum progesterone level increased under stress conditions due to its secretion from the adrenal cortex (20,21,23,43). In accordance with other findings (21), in the present study ovariectomy did not alter the amount of progesterone secreted during stress and the progesterone response under stress conditions.

Progesterone, as an intermediate product in the synthesis of cortisol, also has a crucial role in stress response (44) and

in the regulation of the HPA axis (43). However, it is also important to note that acute and chronic stress have different effects on the activation of the sympathetic nervous system and HPA axis. Acute cold restraint stress applied in the present study has been shown to increase ACTH, and corticosterone levels followed a desensitization of the HPA response to increase stroke volume and decrease the heart rate (45). Based on the presence of progesterone receptors within the myocardium (46), changes in progesterone levels could alter cardiomyocyte contractile properties. Indeed, the present study confirmed a significant correlation between serum progesterone levels and pCa_{50} of cardiomyocytes. This may indicate that the moderate decrease in pCa_{50} observed in control-S and OVX-S animals may be related to the increased progesterone levels. The inverse correlation between serum progesterone levels and myofilament Ca^{2+} -sensitivity may provide a potential explanation for lowered cardiovascular risk in fertile women.

Experimental evidence confirms that ovariectomy induces up-regulation of cardiac β_1 -adrenergic receptor (β_1 -AR) expression, which can be prevented by estrogen and/or progesterone administration (47). β_1 -AR is a major regulator in the cardiac function and its activation increases heart rate and myocardial contractility (48). It was also found that ovariectomy increases the amplitude of the basal and isoprenaline-induced contractions, and induces an increase in β_1 -AR and a decrease in β_2 -AR expression (49). Stimulation of β_1 -AR activates G_s protein, leading to an increase in cAMP concentration. cAMP activates PKA, which phosphorylates myocardial proteins such as MyBP-C (50). Phosphorylation of MyBP-C accelerates cross-bridge kinetics (51) and increases calcium-activated maxi-

mal force production (52). In accordance with this observation, our study also revealed a significant increase in cardiomyocyte F_{active} in OVX rats. Moreover, phosphorylation of MyBP-C correlated with cardiomyocyte F_{active} . Besides MyBP-C phosphorylation, changes in the distribution of the two myosin heavy chain (MHC) isoforms are also shown to be involved in the regulation of active force production (53). Due to limitations of myocardial tissue samples, in the present investigation we could not address this issue. Based on our findings, the increased F_{active} can be explained by the elevated phosphorylation of MyBP-C due to an increased β 1-adrenergic stimulation after ovariectomy. This may indicate that the physiological regulatory effect of MyBP-C phosphorylation on cardiomyocyte active force generation is preserved after ovariectomy and stress.

Besides MyBP-C, phosphorylation of TnI and titin by PKA also alters cardiomyocyte contractile function, resulting in a decrease in pCa_{50} (29) and F_{passive} (54). In this study no major differences were found in pCa_{50} among the groups (only a moderate, non-significant decrease was observed in the control-S and OVX-S groups). Total phosphorylation of TnI, however, was increased in the OVX group, but this was not accompanied by a decrease in pCa_{50} . This could result from the lack of specificity of the phosphoprotein staining for the different phosphorylation sites of the proteins. Therefore, despite the significant increase in total TnI phosphorylation, differences in the phosphorylation of the protein kinase-specific sites (PKA, PKC- β II, δ , ϵ) – which have been shown to have divergent effects on pCa_{50} (55) – cannot be excluded. A modulating effect of ovarian sex hormone deficiency on Ca^{2+} -responsiveness of myofilament activation was demonstrated convincingly in the study by Wattanapernpool (27). In that study, an increase in the myofilament pCa_{50} and a decrease in the maximum myofibrillar ATPase activity was found in eight-week OVX rats at pH 7.0, together with an unchanged maximum ATPase activity and no differences in pCa_{50} at pH 6.5. However, when the study was extended to ten-week OVX rats, parallel to the suppression of maximum ATPase activities, a significant hypersensitivity of myofilaments to Ca^{2+} could also be detected at both pH 7.0 and pH 6.5 in the OVX group. This finding underlies the importance of the time and the progressive nature of myofilament alterations after ovariectomy. We did not detect significant difference in the myofilament Ca^{2+} -sensitivity between control and OVX rats.

In the present study, no correlation between cardiomyocyte F_{passive} and phosphorylation of its main regulator sarcomeric protein, titin was observed. This finding is

consistent with an earlier report demonstrating unchanged passive stiffness in OVX animals (56). No differences were found in the phosphorylation of myofilament proteins between the control and control-S groups. The basal level of PKA-dependent protein phosphorylation in rodent hearts appears to be significantly higher than in large mammals (57). Accordingly, relative changes in the level of PKA-dependent protein phosphorylation under acute stress conditions and/or *in vitro* PKA challenges can be smaller in the hearts of small rodents than in large mammals. Moreover, sympathetic effects of acute stress tend to rapidly desensitize. Taking all this into consideration, we hypothesize that the combination of the above characteristics explains the unchanged phosphorylation level of myofilament proteins in control-S compared to control group.

Stress procedures used in this study induced physiological alterations and pathophysiological changes. However, the effects of this particular stress input (immobilization in combination with cold) may be unlikely in everyday human life. Further studies are necessary to confirm that the observed effects could be generalized for other types of acute stress.

Control animals were not sham-operated. Operation itself may have contributed to the differences between control and OVX groups. In future studies, sham-operated animals have to be used as controls. Type of anesthetics, in particular, application of isoflurane may have affected myocardial parameters (58). Also, the levels of estrogen and progesterone were low, considerably below the lower detection limit of the applied technique.

The present study assessed contractile properties of single, demembrated cardiomyocytes and focused mainly on alterations in the composition and phosphorylation of myofilament proteins. Changes in sarcolemmal, sarcoplasmic, and Ca^{2+} -handling proteins cannot be studied under such experimental conditions as a result of the membrane solubilisation. Single cardiomyocytes may not represent overall myocardial function. Moreover, heart samples were frozen and their functional and biochemical properties were evaluated upon thawing. Nevertheless, this approach was supported by our previous experience, when we did not find significant effects of freezing and thawing on the functional properties of cardiomyocyte preparations independently of the species (30,59).

Single acute stress significantly increased serum progesterone levels in both control and OVX rats. Stress and female

hormones altered cardiomyocyte contractile force generation possibly by increasing Ca^{2+} -activated force production through myosin-binding protein C phosphorylation. The observed functional changes and myofilament modifications may contribute to the lower cardiovascular risk in fertile women.

Funding This research was supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA PD 108614) and co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program' (A.B.). The support of the TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 and the Cedars-Sinai Medical Center's International Research and Innovation Management Program, the Association for Regional Cooperation in the Fields of Health, Science and Technology (RECOOP HST Association) and the participating Cedars – Sinai Medical Center – RECOOP Research Centers (CRRC) is greatly appreciated.

Ethical approval was received from the Ethical Committee of School of Medicine Osijek, Croatia. Material transfer agreement exists between the School of Medicine Osijek and the University of Debrecen (DETI/22-3/2013).

Declaration of authorship JK performed the functional and biochemical experiments (measurement of cardiomyocyte mechanical parameters and determination of myofilament protein phosphorylation) and contributed to the preparation of the manuscript. EPT performed the biochemical experiments (determination of myofilament protein phosphorylation). BB performed the functional experiments (measurements of cardiomyocyte mechanical parameters). MF performed the experiments (determination of serum estrogen and progesterone levels). AT contributed to preparation of the manuscript. BHP contributed directly to the intellectual content of this manuscript. SGV contributed to the project plan, assisted in the execution of the research plan, and provided input in the writing and finalization of the manuscript. MB executed the main experiments. SB made overall contribution to the manuscript. MH was involved in the whole study and executed the main experiments. ZP contributed to the preparation of the manuscript and project coordination. AB contributed to the preparation of the manuscript and project coordination.

Competing interests All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

References

- Ohira T. Psychological distress and cardiovascular disease: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *J Epidemiol.* 2010;20:185-91. [Medline:20431233](#) [doi:10.2188/jea.JE20100011](#)
- Steptoe A, Kivimaki M. Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2012;9:360-70. [Medline:22473079](#) [doi:10.1038/nrcardio.2012.45](#)
- Menezes AR, Lavie CJ, Milani RV, O'Keefe J, Lavie TJ. Psychological risk factors and cardiovascular disease: is it all in your head? *Postgrad Med.* 2011;123:165-76. [Medline:21904099](#) [doi:10.3810/pgm.2011.09.2472](#)
- Du XJ, Fang L, Kiriazis H. Sex dimorphism in cardiac pathophysiology: experimental findings, hormonal mechanisms, and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2006;111:434-75. [Medline:16439025](#) [doi:10.1016/j.pharmthera.2005.10.016](#)
- Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation.* 1999;99:2192-217. [Medline:10217662](#) [doi:10.1161/01.CIR.99.16.2192](#)
- Sgoifo A, Carnevali L, Grippo AJ. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;39:51-60. [Medline:24373860](#) [doi:10.1016/j.neubiorev.2013.12.005](#)
- Kaplan JR, Adams MR, Clarkson TB, Manuck SB, Shively CA, Williams JK. Psychosocial factors, sex differences, and atherosclerosis: lessons from animal models. *Psychosom Med.* 1996;58:598-611. [Medline:8948008](#) [doi:10.1097/00006842-199611000-00008](#)
- Wallace JM, Shively CA, Clarkson TB. Effects of hormone replacement therapy and social stress on body fat distribution in surgically postmenopausal monkeys. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23:518-27. [Medline:10375056](#) [doi:10.1038/sj.ijo.0800865](#)
- Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P, Dhawan R. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci.* 2011;32:993-1005. [Medline:21927881](#) [doi:10.1007/s10072-011-0770-6](#)
- Kaplan JR, Chen H, Appt SE, Lees CJ, Franke AA, Berga SL, et al. Impairment of ovarian function and associated health-related abnormalities are attributable to low social status in premenopausal monkeys and not mitigated by a high-isoflavone soy diet. *Hum Reprod.* 2010;25:3083-94. [Medline:20956266](#) [doi:10.1093/humrep/deq288](#)
- Castillo Rivera AM, Ruiz-Bailen M, Rucabado Aguilar L. Takotsubo cardiomyopathy—a clinical review. *Med Sci Monit.* 2011;17:RA135-47. [Medline:21629203](#) [doi:10.12659/MSM.881800](#)
- Sitruk-Ware R. Progestins and cardiovascular risk markers. *Steroids.* 2000;65:651-8. [Medline:11108872](#) [doi:10.1016/S0039-128X\(00\)00174-4](#)
- Hayward CS, Kelly RP, Collins P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res.* 2000;46:28-49. [Medline:10727651](#) [doi:10.1016/S0008-6363\(00\)00005-5](#)
- Booth EA, Lucchesi BR. Estrogen-mediated protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Toxicol.* 2008;8:101-13. [Medline:18683081](#) [doi:10.1007/s12012-008-9022-2](#)
- Murphy E, Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2007;75:478-86. [Medline:17466956](#) [doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.025](#)
- Cheng J, Zhang J, Ma X, Su D. Frequency-dependent acceleration of cardiac repolarization by progesterone underlying its cardiac protection against drug-induced proarrhythmic effects in female rabbits. *Eur J Pharmacol.* 2012;689:172-8. [Medline:22705061](#) [doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.052](#)
- Dhote VV, Balaraman R. Gender specific effect of progesterone on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci.*

- 2007;81:188-97. [Medline:17585947](#) doi:10.1016/j.jfs.2007.05.010
- 18 Morrissy S, Xu B, Aguilar D, Zhang J, Chen QM. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. *Aging Cell*. 2010;9:799-809. [Medline:20726854](#) doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00619.x
- 19 Thomas P, Pang Y. Protective actions of progesterone in the cardiovascular system: potential role of membrane progesterone receptors (mPRs) in mediating rapid effects. *Steroids*. 2013;78:583-8. [Medline:23357432](#) doi:10.1016/j.steroids.2013.01.003
- 20 Fajer AB, Holzbauer M, Newport HM. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. *J Physiol*. 1971;214:115-26. [Medline:5575348](#)
- 21 Kalil B, Leite CM, Carvalho-Lima M, Anselmo-Franci JA. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress*. 2013;16:452-60. [Medline:23425221](#) doi:10.3109/10253890.2013.777832
- 22 Wirth MM, Meier EA, Fredrickson BL, Schultheiss OC. Relationship between salivary cortisol and progesterone levels in humans. *Biol Psychol*. 2007;74:104-7. [Medline:16904811](#) doi:10.1016/j.biopsycho.2006.06.007
- 23 Holzbauer M, Newport HM. Quantitative estimation of 17alpha-hydroxypregn-4-ene-3,20-dione (17alphaOH-progesterone) in adrenal venous blood and adrenal glands. *J Physiol*. 1968;198:91-102. [Medline:16992317](#)
- 24 Bell JR, Bernasocchi GB, Varma U, Raaijmakers AJ, Delbridge LM. Sex and sex hormones in cardiac stress—mechanistic insights. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;137:124-35. [Medline:23770428](#) doi:10.1016/j.jsbmb.2013.05.015
- 25 Beitelshes AL, Johnson JA, Hames ML, Gong Y, Cooper-Dehoff RM, Wu J, et al. Aromatase gene polymorphisms are associated with survival among patients with cardiovascular disease in a sex-specific manner. *PLoS ONE*. 2010;5:e15180. [Medline:21170323](#) doi:10.1371/journal.pone.0015180
- 26 Curl CL, Wendt IR, Canny BJ, Kotsanas G. Effects of ovariectomy and 17 beta-oestradiol replacement on [Ca²⁺]_i in female rat cardiac myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30:489-94. [Medline:12823264](#) doi:10.1046/j.1440-1681.2003.03864.x
- 27 Watanapernpool J. Increase in calcium responsiveness of cardiac myofilament activation in ovariectomized rats. *Life Sci*. 1998;63:955-64. [Medline:9747896](#) doi:10.1016/S0024-3205(98)00353-1
- 28 Watanapernpool J, Riabroy T, Preawnim S. Estrogen supplement prevents the calcium hypersensitivity of cardiac myofilaments in ovariectomized rats. *Life Sci*. 2000;66:533-43. [Medline:10794070](#) doi:10.1016/S0024-3205(99)00623-2
- 29 van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, et al. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res*. 2003;57:37-47. [Medline:12504812](#) doi:10.1016/S0008-6363(02)00606-5
- 30 Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005;111:774-81. [Medline:15699264](#) doi:10.1161/01.CIR.0000155257.33485.6D
- 31 Curl CL, Wendt IR, Kotsanas G. Effects of gender on intracellular. *Pflugers Arch*. 2001;441:709-16. [Medline:11294254](#) doi:10.1007/s004240000473
- 32 Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Meyer R, Linz KW, Karas RH, et al. Modulation of hypertensive heart disease by estrogen. *Steroids*. 1996;61:201-4. [Medline:8733001](#) doi:10.1016/0039-128X(96)00014-1
- 33 Meyer R, Linz KW, Surges R, Meinardus S, Veas J, Hoffmann A, et al. Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat. *Exp Physiol*. 1998;83:305-21. [Medline:9639341](#)
- 34 Curl CL, Bell JR, Delbridge LM. 'Gain'-ful insight into the cardiomyocyte Ca²(+)-sensitive factor. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:7-9. [Medline:22033435](#) doi:10.1016/j.yjmcc.2011.10.006
- 35 Fares E, Parks RJ, Macdonald JK, Egar JM, Howlett SE. Ovariectomy enhances SR Ca²(+) release and increases Ca²(+) spark amplitudes in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:32-42. [Medline:21939666](#) doi:10.1016/j.yjmcc.2011.09.002
- 36 Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 1994;476:279-93. [Medline:8046643](#)
- 37 Farrell SR, Ross JL, Howlett SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H36-45. [Medline:20453102](#) doi:10.1152/ajpheart.00299.2010
- 38 Chu SH, Goldspink P, Kowalski J, Beck J, Schwartz DW. Effect of estrogen on calcium-handling proteins, beta-adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Sci*. 2006;79:1257-67. [Medline:16647722](#) doi:10.1016/j.lfs.2006.03.037
- 39 Kravtsov GM, Kam KW, Liu J, Wu S, Wong TM. Altered Ca²(+) handling by ryanodine receptor and Na⁺-Ca²(+) exchange in the heart from ovariectomized rats: role of protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C1625-35. [Medline:17166940](#) doi:10.1152/ajpcell.00368.2006
- 40 Bupha-Intr T, Watanapernpool J. Regulatory role of ovarian sex hormones in calcium uptake activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H1101-8. [Medline:16517946](#) doi:10.1152/ajpheart.00660.2005
- 41 Ren J, Hintz KK, Roughead ZK, Duan J, Colligan PB, Ren BH, et al. Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H1800-7. [Medline:12531723](#)
- 42 Borbely A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JG, Varro A, et al. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile

- alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res.* 2005;67:225-33. [Medline:16005301](#) [doi:10.1016/j.cardiores.2005.03.025](#)
- 43 Traslavina GA, Franci CR. The CRH-R(1) receptor mediates luteinizing hormone, prolactin, corticosterone and progesterone secretion induced by restraint stress in estrogen-primed rats. *Brain Res.* 2011;1421:11-9. [Medline:21959177](#) [doi:10.1016/j.brainres.2011.09.004](#)
- 44 Baker ME, Chandsawangbhuwana C, Ollikainen N. Structural analysis of the evolution of steroid specificity in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *BMC Evol Biol.* 2007;7:24. [Medline:17306029](#) [doi:10.1186/1471-2148-7-24](#)
- 45 Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33:1089-98. [Medline:19463853](#) [doi:10.1016/j.neubiorev.2009.05.004](#)
- 46 Kararigas G, Becher E, Mahmoodzadeh S, Knosalla C, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific modification of progesterone receptor expression by 17beta-oestradiol in human cardiac tissues. *Biol Sex Differ.* 2010;1:2. [Medline:21208464](#) [doi:10.1186/2042-6410-1-2](#)
- 47 Thawornkaiwong A, Preawnim S, Wattanapernpool J. Upregulation of beta 1-adrenergic receptors in ovariectomized rat hearts. *Life Sci.* 2003;72:1813-24. [Medline:12586219](#) [doi:10.1016/S0024-3205\(02\)02473-6](#)
- 48 Kam KW, Qi JS, Chen M, Wong TM. Estrogen reduces cardiac injury and expression of beta1-adrenoceptor upon ischemic insult in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:8-15. [Medline:14718598](#) [doi:10.1124/jpet.103.058339](#)
- 49 Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao YL, Yan CD, Gu SL. Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol.* 2008;93:1034-43. [Medline:18469068](#) [doi:10.1113/expphysiol.2007.041939](#)
- 50 Yang Q, Hewett TE, Klevitsky R, Sanbe A, Wang X, Robbins J. PKA-dependent phosphorylation of cardiac myosin binding protein C in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2001;51:80-8. [Medline:11399250](#) [doi:10.1016/S0008-6363\(01\)00273-5](#)
- 51 Tong CW, Stelzer JE, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. Acceleration of crossbridge kinetics by protein kinase A phosphorylation of cardiac myosin binding protein C modulates cardiac function. *Circ Res.* 2008;103:974-82. [Medline:18802026](#) [doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.177683](#)
- 52 Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res.* 2000;86:51-8. [Medline:10625305](#) [doi:10.1161/01.RES.86.1.51](#)
- 53 Mayoux E, Ventura-Clapier R, Timsit J, Behar-Cohen F, Hoffmann C, Mercadier JJ. Mechanical properties of rat cardiac skinned fibers are altered by chronic growth hormone hypersecretion. *Circ Res.* 1993;72:57-64. [Medline:8417847](#) [doi:10.1161/01.RES.72.1.57](#)
- 54 Kruger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006;27:435-44. [Medline:16897574](#) [doi:10.1007/s10974-006-9090-5](#)
- 55 Solaro RJ, van der Velden J. Why does troponin I have so many phosphorylation sites? Fact and fancy. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:810-6. [Medline:20188739](#) [doi:10.1016/j.yjmcc.2010.02.014](#)
- 56 Bupha-Intr T, Oo YW, Wattanapernpool J. Increased myocardial stiffness with maintenance of length-dependent calcium activation by female sex hormones in diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H1661-8. [Medline:21335468](#) [doi:10.1152/ajpheart.00411.2010](#)
- 57 Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, et al. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008;29:189-201. [Medline:19140019](#) [doi:10.1007/s10974-008-9160-y](#)
- 58 Davies LA, Gibson CN, Boyett MR, Hopkins PM, Harrison SM. Effects of isoflurane, sevoflurane, and halothane on myofilament Ca2+ sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca2+ release in rat ventricular myocytes. *Anesthesiology.* 2000;93:1034-44. [Medline:11020759](#) [doi:10.1097/00000542-200010000-00027](#)
- 59 Edes IF, Czuriga D, Csanyi G, Chlopicki S, Recchia FA, Borbely A, et al. Rate of tension redevelopment is not modulated by sarcomere length in permeabilized human, murine, and porcine cardiomyocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R20-9. [Medline:17110532](#) [doi:10.1152/ajpregu.00537.2006](#)

Omecamtiv mecarbil augments cardiomyocyte contractile activity both at resting and systolic Ca^{2+} levels

Arnold Péter Ráduly^{1,2,3}, Attila Tóth^{1,4}, Fruzsina Sárkány^{1,3}, Balázs Horváth^{5,6}, Norbert Szentandrassy^{5,7}, Péter P. Nánási^{5,8}, Zoltán Csanádi^{2,3}, István Édes^{2,3}, Zoltán Papp^{1,4*†}  and Attila Borbély^{1,2,3*†}

¹Division of Clinical Physiology, Department of Cardiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032, Debrecen, Hungary; ²Division of Cardiology, Department of Cardiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032, Debrecen, Hungary; ³Kálmán Laki Doctoral School, University of Debrecen, 4032, Debrecen, Hungary; ⁴HAS-UD Vascular Biology and Myocardial Pathophysiology Research Group, Hungarian Academy of Sciences, 4032, Debrecen, Hungary; ⁵Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032, Debrecen, Hungary; ⁶Faculty of Pharmacy, University of Debrecen, 4032, Debrecen, Hungary; ⁷Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Dentistry, University of Debrecen, 4032, Debrecen, Hungary; and ⁸Department of Dental Physiology and Pharmacology, Faculty of Dentistry, University of Debrecen, 4032, Debrecen, Hungary

Abstract

Aims Heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) is a disease with high mortality and morbidity. Recent positive inotropic drug developments focused on cardiac myofilaments, that is, direct activators of the myosin molecule and Ca^{2+} sensitizers for patients with advanced HFrEF. Omecamtiv mecarbil (OM) is the first direct myosin activator with promising results in clinical studies. Here, we aimed to elucidate the cellular mechanisms of the positive inotropic effect of OM in a comparative *in vitro* investigation where Ca^{2+} -sensitizing positive inotropic agents with distinct mechanisms of action [EMD 53998 (EMD), which also docks on the myosin molecule, and levosimendan (Levo), which binds to troponin C] were included.

Methods Enzymatically isolated canine cardiomyocytes with intact cell membranes were loaded with Fura-2AM, a Ca^{2+} -sensitive, ratiometric, fluorescent dye. Changes in sarcomere length (SL) and intracellular Ca^{2+} concentration were recorded in parallel at room temperature, whereas cardiomyocyte contractions were evoked by field stimulation at 0.1 Hz in the presence of different OM, EMD, or Levo concentrations.

Results SL was reduced by about 23% or 9% in the presence of 1 μM OM or 1 μM EMD in the absence of electrical stimulation, whereas 1 μM Levo had no effect on resting SL. Fractional sarcomere shortening was increased by 1 μM EMD or 1 μM Levo to about 152%, but only to about 128% in the presence of 0.03 μM OM. At higher OM concentrations, no significant increase in fractional sarcomere shortening could be recorded. Contraction durations largely increased, whereas the kinetics of contractions and relaxations decreased with increasing OM concentrations. One-micromole EMD or 1 μM Levo had no effects on contraction durations. One-micromole Levo, but not 1 μM EMD, accelerated the kinetics of cardiomyocyte contractions and relaxations. Ca^{2+} transient amplitudes were unaffected by all treatments.

Conclusions Our data revealed major distinctions between the cellular effects of myofilament targeted agents (OM, EMD, or Levo) depending on their target proteins and binding sites, although they were compatible with the involvement of Ca^{2+} -sensitizing mechanisms for all three drugs. Significant part of the cardiotonic effect of OM relates to the prolongation of systolic contraction in combination with its Ca^{2+} -sensitizing effect.

Keywords Omecamtiv mecarbil; Heart failure with reduced ejection fraction; Myosin activators; Positive inotropy, diastolic dysfunction

Received: 27 September 2022; Revised: 25 November 2022; Accepted: 15 December 2022

*Correspondence to: Attila Borbély and Zoltán Papp, Division of Clinical Physiology, Department of Cardiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary. Telephone: +36703167810. Email: borbelya@med.unideb.hu; pappz@med.unideb.hu

†These authors contributed equally.

Introduction

Heart failure (HF) with reduced ejection fraction (HFrEF) is a complex clinical syndrome resulting from structural and functional impairments of the myocardium and involves contractile dysfunction of left ventricular (LV) cardiomyocytes. Cardiotonic agents are frequently considered for the therapy of acute and chronic HF to counter cardiac pump function. Traditional β -mimetic positive inotropic drugs [i.e. β -receptor agonists and inhibitors of the phosphodiesterase (PDE) III isoenzyme] are effective but potentially harmful. These Ca^{2+} -mobilizing agents augment the amplitude of intracellular Ca^{2+} transients during systoles; therefore, cardiomyocyte contractions and relaxations become larger and faster. Unfortunately, safety concerns limit the applicability of β -mimetic drugs. This is because stimulation of the β -adrenergic cascade increases the oxygen demand of cardiomyocytes that is often hard to tolerate by the failing heart.

In addition to the Ca^{2+} sensitizers, recently, a new group of positive inotropic drugs have been developed for the therapy of HFrEF, which directly modulate the thick myofilaments of cardiac sarcomeres (rather than increasing the intracellular Ca^{2+} transient): the selective cardiac myosin activators.^{1,2} The central concept behind drug developments of these kinds relates to the augmentation of cardiac contractile state without increasing myocardial energy demand. Nevertheless, the relationships between intracellular Ca^{2+} concentration and sarcomeric responses in the presence myofilament targeted agents have not been fully elucidated yet.

A phase II clinical trial on omecamtiv mecarbil (OM) demonstrated a significant increase in LV ejection fraction (EF).^{3,4} Moreover, a large-scale phase III clinical trial has recently revealed lower incidence of a composite endpoint of HF event or death from cardiovascular (CV) causes in patients with chronic HFrEF receiving OM.^{5,6} Nevertheless, slight increases in circulating troponin levels were also occasionally observed in patients on OM, and this raised awareness to possible side effects of the drug. Similarly to OM, a previous drug candidate, the thiadiazinone derivative EMD 53998 (EMD), also exerts positive inotropic effects through a molecular interaction with the myosin motor protein.^{7–9} In contrast to OM and EMD, the frequently used inodilator, levosimendan (Levo), is thought to increase myocardial contractility through myofilament Ca^{2+} sensitization due to its binding to the thin filament protein, troponin C [10]. Of note, the cardiac effects of EMD and Levo might be complicated by the inhibition of the PDE III isoenzyme.^{10,11}

In the present study, we aimed to compare intracellular Ca^{2+} transients with parameters describing cardiomyocyte contractions and relaxations in the presence and absence of increasing OM concentrations, and these effects

were contrasted to those recorded in the presence of supramaximal EMD or Levo concentrations. Our results shed new light on the complex relationships between the extents and kinetics of systolic and diastolic sarcomere length (SL) changes upon OM administrations in a framework where Ca^{2+} sensitization and myosin activation appear to be tightly coupled to each other.

Materials and methods

Animals

Adult mongrel dogs of either sex were used here according to a protocol approved by the local Animal Care Committee (2/2020/DEMÁB). All animals received human care in compliance with the 'Principles of Laboratory Animal Care', formulated by the National Society for Medical Research and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, Revised 1996).

Isolation of canine LV cardiomyocytes

Canine cardiomyocytes were studied since their electrophysiological properties are similar to those of humans. Cardiomyocytes were isolated from the mid-myocardial region of the LV as described previously.^{12,13} Briefly, hearts were isolated from anaesthetized (ketamine-HCl 10 mg/kg, Richter Gedeon, Hungary, xylazine-HCl 1 mg/kg, Eurovet Animal Health BV, The Netherlands) adult mongrel dogs ($N = 6$) weighed 10.6 ± 2.1 kg (7–15 kg) and aged 15.1 ± 4.2 months (10.9–23.9 months). Thereafter, the hearts were subjected to a perfusion system where the left anterior descending coronary artery was cannulated. Single cardiomyocytes were obtained by enzymatic dispersion technique by using a Ca^{2+} -free Joklik solution (Minimum Essential Medium Eagle, Joklik Modification; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) for 5 min, followed by 30-min perfusion with Joklik solution containing 1 mg/mL collagenase (Type II, Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA) and 0.2% bovine serum albumin (Fraction V, Sigma) in the presence of $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . Then cardiomyocytes were grounded, and normal Ca^{2+} concentration was restored progressively. Cardiomyocytes were stored at 15°C until the measurements.

Experimental set-up

Cardiomyocytes were loaded with $5 \mu\text{M}$ Fura-2AM Ca^{2+} -sensitive ratiometric fluorescent dye for 30 min in the presence of Pluronic F-127 (25 mg/mL) to avoid early elimination of

the dye from the intracellular space. Twenty-five milligrams of Pluronic F-127 was dissolved in 1 mL DMSO, and this solvent was used to make a Fura-2AM stock solution. Cells were then incubated for 30 min to allow the intracellular esterases to release Fura-2. Cardiomyocytes were placed in a chamber on the stage of an inverted microscope (Nikon TS-100). The final volume of the chamber filled with Tyrode solution (containing 144 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, and 11 mM dextrose, pH = 7.4) was 1 mL. After sedimentation, a rod-shaped cardiomyocyte with clear striation and acceptable contraction upon field-stimulation was selected for further experiments. Field stimulation was performed at 0.1 Hz (Experimenta Setup, MDE, Heidelberg). Alternating excitation, wavelengths of 340 and 380 nm were used to monitor the fluorescence signals of Ca^{2+} -bound and Ca^{2+} -free Fura-2 dye, respectively. Fluorescent emission was detected above 510 nm in case of both wavelengths, and traces were digitized at 120 Hz using the Felix Software (Ratiometer RM-50 system, Horiba, New Brunswick, NJ, USA).¹⁴

Determination of effects on resting SLs

The experimental protocol was the following: Cardiomyocytes were paced at 0.1 Hz for at least 2–3 min to achieve a steady state at the beginning of each experiment. The resting (unstimulated) SL was continuously measured after this initial conditioning using a high-speed camera. OM (with final concentrations of 0.03, 0.1, 0.3, or 1 μM), Levo (1 μM), or EMD (1 μM) was added for 5–8 mins to the experimental chamber.

Determination of contractile parameters and Ca^{2+} transients

Contractile responses were monitored at 0.1 Hz pacing rates. Multiple parameters of cardiomyocyte contractions, relaxations, and intracellular Ca^{2+} transients were assessed. Resting SL of the cardiomyocytes was measured using a high-speed camera. Fractional sarcomere shortening (FS) was calculated using the following equation: $\text{FS} = (\text{diastolic SL} - \text{systolic SL} / \text{diastolic SL}) * 100$. Duration of contraction (DC; s) was defined as the time period from the beginning till the end of the contraction of the cardiomyocyte. Rates ($\mu\text{m/s}$) of contraction and relaxation were determined by linear fits to the apparently linear phases of contractions and relaxations, respectively. The resting Ca^{2+} level was estimated by the Fura-2 ratio (fluorescent intensity ratio at 340 and 380 nm excitations) at baseline (before cardiomyocyte stimulation). The amplitude of Ca^{2+} transients was defined as the difference between the peak levels of Ca^{2+} transients and resting Ca^{2+} levels (340/380 nm ratio). The rate of Ca^{2+} transient increase was considered as the slope of a line fitted by linear regres-

sion to the ascending phases of Ca^{2+} transients (1/s). The Ca^{2+} transient decay kinetics was fitted to a single exponential and described by its rate constant (K ; 1/s), which was calculated from the following equation: $Y = (Y_0 - \text{plateau}) * \exp(-K * X) + \text{plateau}$, where X = time, Y starts at Y_0 and decays (in one phase) down to plateau level, Y_0 and plateau are in the same units as Y , and K is expressed in the reciprocal of X -axis units.

Data analysis and statistics

Results were evaluated and graphs were created in the GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The number of experiments in each group varied between 6 and 10 from six different hearts. Background fluorescence intensity levels were obtained at the end of the measurements, on a region without cardiomyocytes and were manually subtracted the fluorescence intensities for background correction. Values were evaluated for normality (Kolmogorov–Smirnov normality test) and were then evaluated by paired t -tests, ordinary one-way ANOVA or Kruskal–Wallis test with multiple comparisons as appropriate. Group descriptions are given as mean $\pm$ SEM values. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

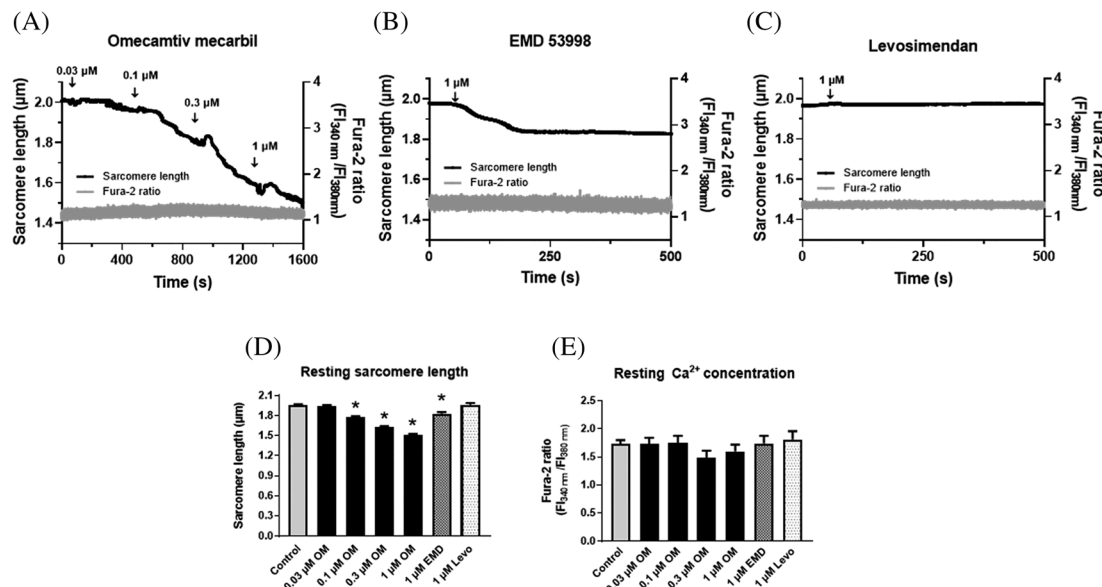
OM and EMD, but not Levo, reduce cardiomyocyte resting SL

A dose-dependent decrease in the resting SL of cardiomyocytes was observed upon OM administrations (i.e. from the drug-free control of $1.96 \pm 0.01 \mu\text{m}$ to 1.94 ± 0.04 , 1.77 ± 0.04 , 1.62 ± 0.05 , or $1.50 \pm 0.05 \mu\text{m}$ at 0.03 μM OM, 0.1 μM OM, 0.3 μM OM, or 1 μM OM, respectively; SL changes at 0.1 μM OM concentrations and beyond were significant) (Figure 1A,D). One-micromole EMD also evoked a significant reduction in resting SL (i.e. to $1.83 \pm 0.08 \mu\text{m}$; Figure 1B,D), whereas Levo did not affect resting SL (Figure 1C,D). Intracellular resting Ca^{2+} concentrations remained unchanged during OM, EMD, or Levo treatments (Figure 1A,C,E).

OM, EMD, and Levo differently affected cardiomyocyte contraction and relaxation kinetics

A significant decrease in the systolic peak SL was observed at 0.03, 0.01, 0.3, or 1 μM OM concentrations ($1.65 \pm 0.03 \mu\text{m}$, $1.53 \pm 0.03 \mu\text{m}$, $1.39 \pm 0.02 \mu\text{m}$, $1.34 \pm 0.03 \mu\text{m}$, respec-

Figure 1 Distinct effects of OM, EMD or Levo on cardiomyocyte resting sarcomere lengths. OM (A) or EMD (B) decreased SL in resting isolated left ventricular canine cardiomyocytes. OM was added without field stimulation in a cumulative manner. EMD or Levo (C) was applied at a single concentration (1 μM). SL (black trace, left axis) and intracellular Ca^{2+} concentration (Fura-2340/380 fluorescent intensity ratio, grey trace, right axis) were recorded simultaneously. Single representative examples are shown in the presence of OM, EMD, or Levo. EMD, Levo, or OM administrations are indicated by arrows. Resting SL decreased in the presence of OM (A,D) or EMD (B,D), whereas Levo did not affect SL (C,D) in the absence of Ca^{2+} concentration changes (E). Significant differences are indicated by asterisks when $P < 0.05$ vs. before treatment. EMD, EMD 53998; FI, fluorescence intensity; Levo, levosimendan; OM, omecamtiv mecarbil.



tively, vs. $1.74 \pm 0.01 \mu\text{m}$ measured under control conditions, $P < 0.05$ for all; Figure 2A,G) in field-stimulated cardiomyocytes. Similarly to OM, EMD significantly decreased the systolic peak SL (i.e. to $1.51 \pm 0.03 \mu\text{m}$, $P < 0.05$; Figure 2B,G). The effects of Levo on systolic peak SL decreases also reached the significance level (i.e. this parameter decreased to $1.63 \pm 0.03 \mu\text{m}$, $P < 0.05$; Figure 2C,G). OM increased fractional sarcomere shortening at 0.03 μM (i.e. to $14.34 \pm 1.64\%$), but not at higher drug concentrations, whereas EMD and Levo significantly increased this parameter at 1 μM (i.e. to $17.36 \pm 0.98\%$ and $17.02 \pm 0.80\%$, respectively, from the drug-free control level of $11.17 \pm 0.55\%$, $P < 0.05$; Figure 2A–C,G,H). The amplitudes of Ca^{2+} transients were not affected by any of the applied drugs (Figure 2D–F,I).

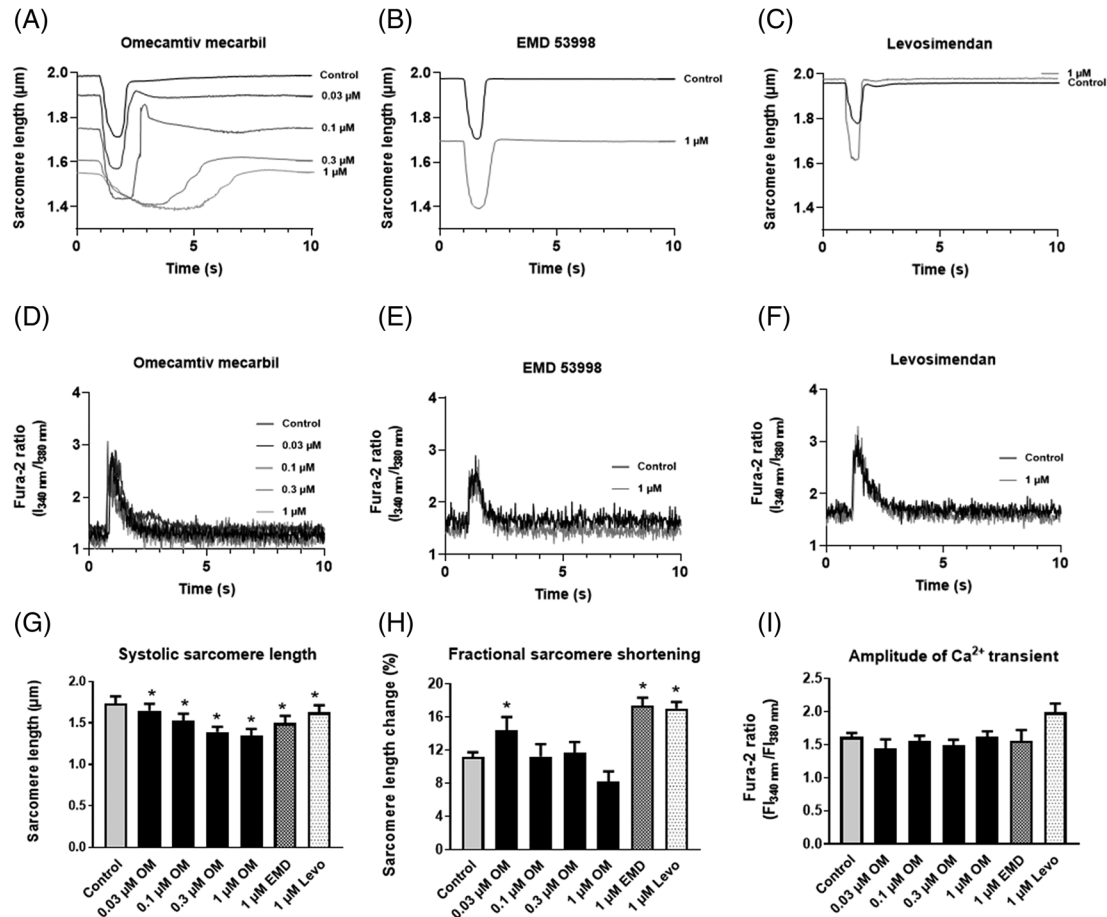
A progressive prolongation of contraction time was observed upon increasing OM concentrations ($1.50 \pm 0.33 \text{ s}$, $2.31 \pm 0.21 \text{ s}$, $3.85 \pm 0.15 \text{ s}$, and $5.89 \pm 0.57 \text{ s}$, at 0.03, 0.1, 0.3, and 1 μM OM concentrations, respectively, vs. $0.95 \pm 0.05 \text{ s}$ in drug-free controls), whereas EMD and Levo did not affect this parameter (Figure 3A). The prolongation of contractile responses could be attributed to slower kinetics of both contractions (from $0.65 \pm 0.05 \mu\text{m/s}$ to 0.51 ± 0.13 , 0.27 ± 0.10 , 0.11 ± 0.02 , and $0.05 \pm 0.01 \mu\text{m/s}$) and relaxations (from $0.95 \pm 0.10 \mu\text{m/s}$ to 1.12 ± 0.30 , 0.29 ± 0.06 , 0.13 ± 0.03 , and $0.05 \pm 0.01 \mu\text{m/s}$), respectively,

with increasing OM concentrations (control, 0.03 μM , 0.1 μM , 0.3 μM , and 1 μM , respectively; Figure 3B,C). In contrast to OM and EMD, Levo increased the kinetics of both contractions (Figure 3B) and relaxations (Figure 3C). The durations of the Ca^{2+} transients (Figure 3D), kinetics of the upstrokes of intracellular Ca^{2+} transients (Figure 3E), and the kinetics of the Ca^{2+} transient decays (illustrated by the rate constant, K) remained unaffected by all drug treatments (Figure 3F).

OM uniquely alters intracellular Ca^{2+} –SL relationship

To characterize further the relationships between intracellular Ca^{2+} transients and contractile responses, sarcomere length was expressed as a function of intracellular Ca^{2+} concentration upon positive inotropic agent administrations (Figure 4). These Ca^{2+} –SL relationships did not largely differ before and after 0.03 μM OM exposures (Figure 4A). However, following 0.1, 0.3, or 1 μM OM administrations, loop diagrams markedly and progressively shifted downwards, suggestive for a Ca^{2+} -sensitizing effect that was present both at systolic and diastolic intracellular Ca^{2+} concentrations (Figure 4B–D). The effect of 1 μM EMD on Ca^{2+} –SL relationship was similar to that observed in the presence of 0.1 μM OM

Figure 2 Effects of OM, EMD, and Levo on sarcomere length and intracellular Ca^{2+} transients during field-stimulation. OM (A) was added to the tissue chamber in different concentrations (0.03, 0.1, 0.3, and 1 μM). Steady-state conditions were reached within 5–8 min, and thereafter, contractile parameters were recorded. EMD (B) and Levo (C) were applied at a single concentration of 1 μM . Intracellular Ca^{2+} transients (D–F) were monitored before and after the treatments (at drug concentrations as indicated). Results of representative examples are shown in the presence of OM (A,D), EMD (B,E), or Levo (C,F). Changes in systolic peak SLs (G), fractional sarcomere shortenings (H), and amplitudes of Ca^{2+} transients (I) are given in bar graphs, where bars represent mean $\pm$ SEM. Significant differences are indicated by asterisks when $P < 0.05$ vs. before treatment. EMD, EMD 53998; FI, fluorescence intensity; Levo, levosimendan; OM, omecamtiv mecarbil.



(Figure 4E). Ca^{2+} –SL relationship in the presence of Levo was enlarged towards shorter systolic SLs, consistent with a Ca^{2+} -sensitizing effect that developed during systoles but not during diastoles (Figure 4F).

Interactions between diastolic and systolic sarcomere dynamics

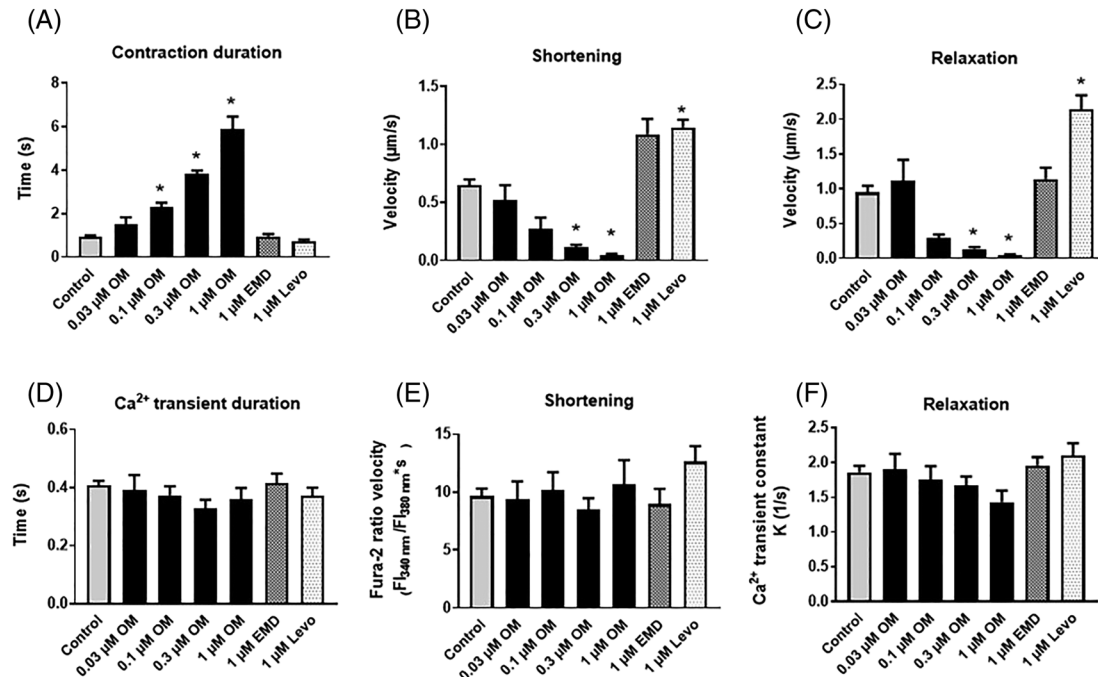
To elucidate further the three different drug–target interactions, parameters of systolic responses upon OM, EMD, or Levo administrations were expressed as functions of their respective diastolic SLs. This approach verified hypothetical similarities between the OM and EMD dependent effects, in particular when interrelations between diastolic SLs and peak systolic SL (Figure 5A) or contraction durations (Figure 5B)

were analysed. Nevertheless, diastolic SL–fractional sarcomere shortening relationships suggested distinctions between OM and EMD (Figure 5C). Furthermore, Levo induced systolic parameters apparently did not require changes in diastolic SL, consistently with a Levo-induced Ca^{2+} -sensitizer mechanism different from those evoked by OM or EMD (Figure 5A–C).

Discussion

In this study, we identified similarities and major differences among the contractile effects of OM, EMD, and Levo on systolic and diastolic indices of cardiomyocyte contractions of enzymatically isolated intact canine LV cardiomyo-

Figure 3 Effects of OM, EMD and Levo on the kinetics of cardiomyocyte contractions and relaxations. The durations of contractions (A) were progressively prolonged by increasing OM concentrations but remained unchanged during EMD or Levo administrations. The kinetics of contractions (B) were slowed down by higher OM concentrations (0.3 and 1 μ M). Relaxation speeds of (E) were also greatly diminished by these high OM concentrations (C). Intracellular Ca^{2+} transient durations (D) were unaffected by all treatments. The kinetics of the upstrokes of intracellular Ca^{2+} transients (E) did not change during the treatments. Intracellular Ca^{2+} concentration transient decays (represented by the rate constant, K) (F) remained also unaltered during drug treatments. Significant differences are indicated by asterisks when $P < 0.05$ vs. before treatment. EMD, EMD-53998; FI, fluorescence intensity; Levo, levosimendan; OM, omecamtiv mecarbil.



cytes. Our data are consistent with an OM-evoked Ca^{2+} -sensitizing effect, whereby its positive inotropic effect develops primarily by prolongation of systolic contractions rather than by major changes in fractional sarcomere shortening or augmentation of the kinetics of cardiac contractions or relaxations.

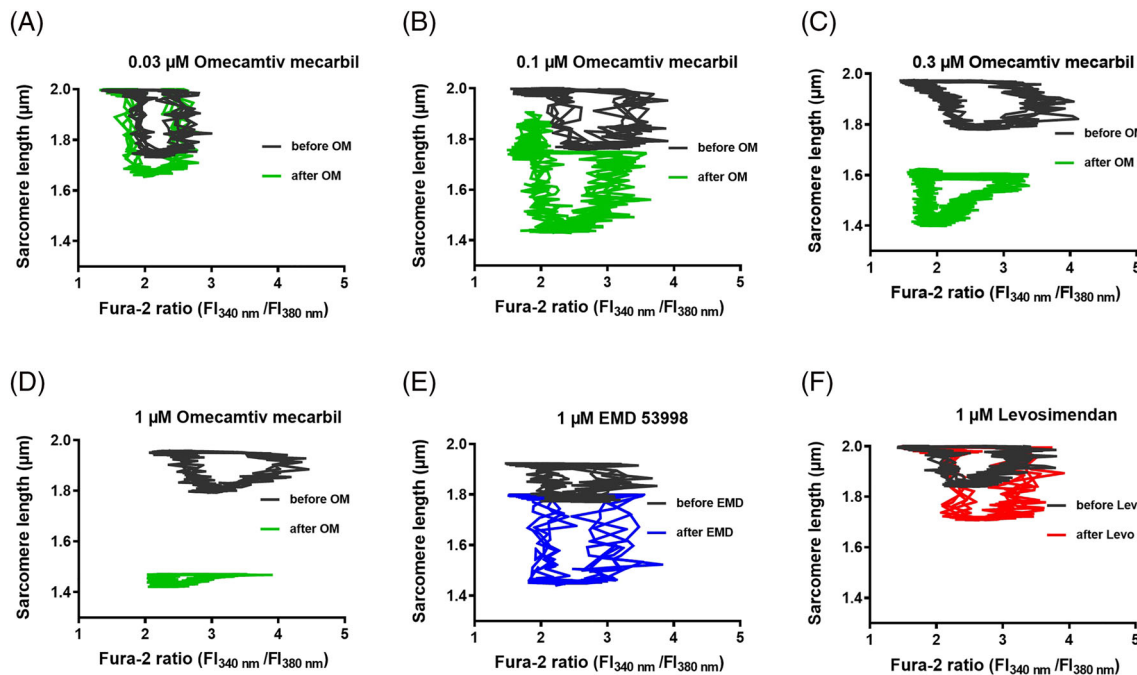
Here, we report that OM, EMD, and Levo evoke robust changes in cardiomyocyte contractions and relaxations in the absence of significant changes in intracellular Ca^{2+} transients, suggestive for Ca^{2+} sensitization for all three agents.² Nevertheless, the characteristics of these Ca^{2+} -sensitizing mechanisms were different for OM, EMD, and Levo and hence resulted in different kinds of contractile responses. Although both Levo and EMD have inhibitory effect on PDE III, the unchanged intracellular Ca^{2+} levels were somewhat surprising in the presence of these agents and can be potentially explained by PDE isoforms (other than PDE III) not inhibited by these agents in canine cardiomyocytes at the employed drug concentrations.^{7,10,15}

OM evoked a reduction in diastolic SL of unstimulated cardiomyocytes of dog hearts at low intracellular Ca^{2+} concentrations. The magnitude of this decrease in SL was comparable with that observed in stimulated cardiomyocytes during diastoles, suggesting that the OM-dependent activation of

the actin–myosin interaction did not require Ca^{2+} . These findings are also in accord with the OM-stimulated increase of basal myosin ATPase activity of rabbit hearts¹ and isometric force production in permeabilized cardiomyocytes of rat hearts at diastolic Ca^{2+} levels.¹⁵ Similarly to OM, EMD but not Levo decreased resting SL, revealing similarities for the two myosin-binding agents and a distinct effect for the thin filament selective Levo in their Ca^{2+} -sensitizing effects. Here, we also show that the reductions in diastolic and systolic SLs and contraction durations are tightly coupled to the applied OM concentrations and thus illuminate different facets of the same drug–target interaction on the myosin molecule. The reduction in diastolic SL was probably also responsible for the unchanged fractional sarcomere shortenings in the presence of high OM concentrations despite the observed reductions in peak systolic SLs. Interestingly, in an independent study, fractional cell shortening did increase by OM in rat cardiomyocytes¹; nevertheless, based on our results, we propose that the increase in fractional cell shortening can be limited by the OM-evoked decrease in resting SL at higher OM concentrations.¹⁶

The range of OM concentrations (i.e. between 0.01 and 1 μ M), where reductions in resting SL were observed overlapped with that reported during its clinical

Figure 4 Intracellular Ca^{2+} –sarcomere length relationships before and after OM, EMD, or Levo administrations. SL values were plotted as the function of the intracellular Ca^{2+} concentration during representative cardiac cycles. Responses of four consecutive cardiac cycles are shown for all panels. Traces before (grey) and after treatments (black) are shown. Upon electrical stimulation, a rapid increase in the intracellular Ca^{2+} concentration was seen, which was followed by contraction (evidenced by decrease in SL). Thereafter, intracellular Ca^{2+} returned to diastolic (low) levels, followed by relaxation (evidenced by increase in SL). Ca^{2+} –SL relationships were progressively shifted downwards with increasing OM concentrations (A–D), suggestive for a Ca^{2+} -sensitizing effect during the entire cardiac cycle. The EMD-evoked Ca^{2+} -sensitization was similar to that induced by 0.1 μM OM (E). Levo did not alter diastolic SL, but augmented SL decreases during systoles (F). EMD, EMD 53998; FI, fluorescence intensity; Levo, levosimendan; OM, omecamtiv mecarbil.



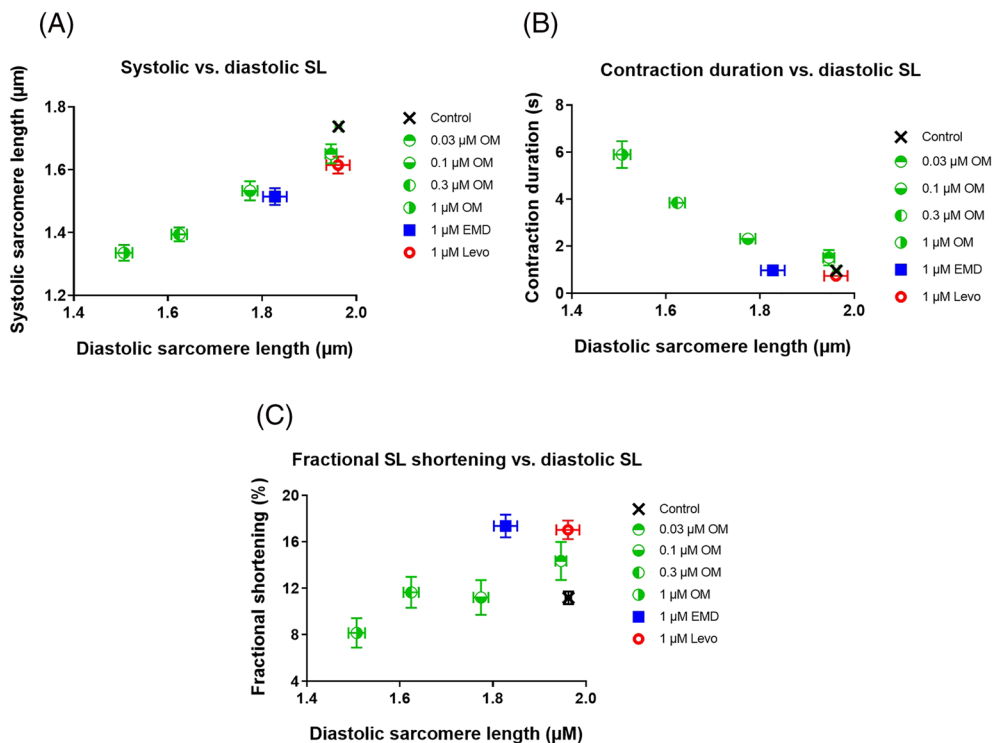
administrations.^{3,4,6} In the most recent clinical trial of OM (GALACTIC-HF), a guided dose titration strategy was applied to achieve plasma concentrations of at least 200 ng/mL (0.5 μM) while avoiding concentrations >1,000 ng/mL (2.5 μM). It is important to note that OM concentrations >1200 ng/mL (3 μM) (three times higher than the maximum concentration used in our *in vitro* experiments) were previously reported to lead to excessive prolongation of the systole, thus limiting coronary blood flow during diastole and possibly leading to myocardial ischemia.^{17,18} In animals and humans, the pharmacodynamic signature of OM is an increase in the systolic ejection time (SET).^{3,4,6,19} This observation is the reflection of the drug's most significant mechanism of action, as contractile activity can be maintained by OM even when cytoplasmic Ca^{2+} concentration falls. Accordingly, in the first-in-man, dose-escalating study, OM augmented left ventricular systolic function and induced a dose-dependent increase in SET, stroke volume (SV), fractional shortening (FS) measured by echocardiography, and left ventricular ejection fraction (LVEF). Despite the slower kinetics of force generation *in vitro*, the maximal rate of LV pressure development ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$) was shown to be unaffected by OM *in vivo*,¹⁹ sug-

gestive for distinct pharmacokinetic properties for OM *in vitro* and *in vivo*.

The durations of cardiomyocyte contractions increased almost six times at high OM concentrations, implicating a prolonged activation for the contractile protein machinery due to a delay of the inactivation of the thin filaments and increased number of strongly attached cross-bridges.^{20,21} The increase in the half-time of activation ($t_{1/2}$ of activation) and the decrease in the rate constant of force redevelopment (k_{tr} illustrating the intrinsic kinetics of the actin–myosin cross-bridges) observed in our previous study¹⁶ in permeabilized rat cardiomyocytes are also in line with our present observations and corroborate the decreased *in vitro* motilities of the myosin filaments.^{22,23} Taken together, OM-evoked Ca^{2+} sensitization may contribute to stronger, slower and prolonged cardiac contractions consistently with previous echocardiographic findings.

Of note, the OM-evoked increase in contraction durations was not observed during EMD administrations, and this might be a consequence of their distinct binding sites on the myosin molecule. The binding site of OM on the myosin S1 domain probably resides in a cleft in the vicinity of its actin-binding

Figure 5 Hypothetical dependences of systolic cardiomyocyte parameters on diastolic sarcomere length. Both peak systolic and diastolic SLs decreased with increasing OM concentrations, and with EMD administration, but not after Levo application (A). Contraction durations increased with increasing OM concentrations, and with EMD administration, but not after Levo application (B). Fractional sarcomere shortening did not increase when diastolic SL decreased following OM administrations; however, it increased by EMD or Levo (C).



interface and of the nucleotide binding pocket. This location is supposedly ideal for allosteric modulation of both the enzymatic and mechanical properties of the cardiac myosin motor.¹ The EMD binding site is not identical with that of OM on the myosin S1 domain; nevertheless, EMD administration can also increase basal myosin ATPase activity.^{9,24–26}

In the present study, relaxation of intact cardiac cells was significantly attenuated, particularly at high (0.3 and 1 μM) OM concentrations, but was less affected upon EMD or Levo treatments. This is compatible with the finding of our previous study in which OM also substantially prolonged the relaxation and increased the passive stiffness of permeabilized rat myocyte-sized preparations with a Ca²⁺-independent mechanism.¹⁶ In heart failure, abnormalities in cardiomyocyte Ca²⁺ cycling are mainly due to altered sarcoplasmic reticulum (SR) functions: reduced and partial cytoplasmic Ca²⁺ reuptake in association with abnormal SR Ca²⁺-ATPase (SERCA) activity.²⁷ Here, we found that cardiomyocyte relaxation was impaired even at low OM concentrations (0.1–0.3 μM), whereas at high OM concentration (1 μM) major limitations in cardiomyocyte relaxation developed. Accordingly, OM-induced diastolic dysfunction can be potentially aggravated by higher diastolic Ca²⁺ levels in the failing heart. An

impaired diastolic performance—reflected by worsened time constant of isovolumic relaxation (τ) and the rate of the LV pressure decrease (dp/dt_{min})—was shown earlier after i.v. OM administration in rats with volume overload HF during OM treatments.²⁸ Nevertheless, OM did not impair diastolic function in healthy volunteers at plasma concentrations similar to those applied in this latter study.^{17,18} The possibility that OM may lead to diastolic dysfunction was addressed based on the data collected in the Chronic Oral Study of Myosin Activation to Increase Contractility in Heart Failure (COSMIC-HF) trial. The post hoc analysis showed an increase in isovolumic relaxation time (IVRT) without changes in E/A ratio or E wave. Unfortunately, diastolic function was not assessed in detail in GALACTIC-HF, which would allow further characterization of LV diastolic dysfunction upon oral administration of OM in patients with HFrEF.

Despite having no effects on the intracellular Ca²⁺ transients, OM, EMD and Levo differently alter Ca²⁺–SL relationships of cardiomyocytes. OM at high concentrations has the most prominent effect on resting SL, leading to diastolic cardiomyocyte shortening and prolonged relaxation. EMD also results in a decrease in the resting SL, but without affecting relaxation kinetics. In contrast to OM and EMD, none of these

adverse effects were seen during Levo administration. We propose that the widely used clinical parameters of systolic function such as fractional shortening or ejection fraction can be misleading in case of myosin activators. Here, we showed a dramatic decrease in resting SL (which could be paralleled by the reduced left ventricular diastolic diameter in clinical studies) upon OM administrations. This factor apparently limited fractional shortening at high OM concentrations and might affect ejection fraction calculations as well. The distinct mechanism of OM action on cardiomyocyte resting SL and relaxation kinetics should raise concerns for the clinical administration of the drug and draw our attention to the importance of regular determination of serum OM levels.

Limitations

The experiments were performed *in vitro* in enzymatically isolated canine cardiomyocytes at room temperature and low pacing rate, and hence, caution is certainly needed when extrapolating experimental data to human hearts. As kinetics of biological processes slow down with decreasing temperatures, we opted for low-frequency stimulation when performing experiments under steady-state conditions. Similarly to our current findings, in one of our previous studies,²⁹ impaired relaxations and decreases in cardiomyocyte cell lengths were also observed at 0.5, 1, and 2 Hz pacing frequencies and 1 or 2 μ M OM concentrations at 37°C. In contrast to structurally intact cardiomyocytes *in vitro*, potentially lower extents of myosin activations can be reached at the applied OM concentrations *in vivo*. It needs also to be noted that all of our experimental data were obtained in healthy animals. Nevertheless, canine cardiomyocytes are considered as relevant models for human cardiac cellular electrophysiology.

Conclusions

OM acts on cardiac muscle at resting Ca^{2+} concentrations, resulting in diastolic cardiomyocyte shortening; besides, it attenuates both contraction and relaxation kinetics. Our data implicate a narrow therapeutic window for OM and a risk for diastolic dysfunction at high OM concentrations.

Conflict of interest

None declared.

Funding

This work was supported by the GINOP-2.3.2-15-2016-00043 project and by the ÚNKP-21-3 new national excellence program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the national research, development, and innovation fund. The project was co-financed by the European Union and the European Regional Development Fund. This work was also supported by project nos. TKP2020-IKA-04 and TKP2020-NKA-04 from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme. Project no. K 132623 (to AT) has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the K_19 funding scheme. Project no. NKFIH-K138090 (to PPN), NKFIH-K142764 (to NSz), and NKFIH-FK128116 (to BH) was financed by the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary. The research group (AT, ZP) is supported by the Hungarian Academy of Sciences.

References

1. Malik FI, Hartman JJ, Elias KA, Morgan BP, Rodriguez H, Brejc K, Anderson RL, Sueoka SH, Lee KH, Finer JT, Sakowicz R, Baliga R, Cox DR, Garard M, Godinez G, Kavas R, Zraynack E, Lenzi D, Lu P, Muci A, Niu C, Qian X, Pierce DW, Pokrovskii M, Suehiro I, Sylvester S, Tochimoto T, Valdez C, Wang W, Katori T, Kass DA, Shen Y, Vatner SF, Morgans DJ. Cardiac myosin activation: a potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science (New York, NY)*. 2011; **331**: 1439–1443.
2. Endoh M. Cardiac Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} sensitizers. *Circ J*. 2008; **72**: 1915–1925.
3. Teerlink JR, Felker GM, McMurray JJV, Ponikowski P, Metra M, Filippatos GS, Ezekowitz JA, Dickstein K, Cleland JGF, Kim JB, Lei L, Knusel B, Wolff AA, Malik FI, Wasserman SM. Acute treatment with omecamtiv mecarbil to increase contractility in acute heart failure: the ATOMIC-AHF study. *J Am Coll Cardiol*. 2016; **67**: 1444–1455.
4. Teerlink JR, Felker GM, McMurray JJV, Solomon SD, Adams KFJ, Cleland JGF, Ezekowitz JA, Goudev A, Macdonald P, Metra M, Mitrovic V, Ponikowski P, Serpytis P, Spinar J, Tomcsányi J, Vandekerckhove HJ, Voors AA, Monsalvo ML, Johnston J, Malik FI, Honarpour N. Chronic oral study of myosin activation to increase contractility in heart failure (COSMIC-HF): a phase 2, pharmacokinetic, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2016; **388**: 2895–2903.
5. Teerlink JR, Diaz R, Felker GM, McMurray JJV, Metra M, Solomon SD, Legg JC, Büchele G, Varin C, Kurtz CE, Malik FI, Honarpour N. Omecamtiv mecarbil in chronic heart failure with reduced ejection fraction: rationale and design of GALACTIC-HF. *JACC Heart Fail*. 2020; **8**: 329–340.
6. Teerlink JR, Diaz R, Felker GM, McMurray JJV, Metra M, Solomon SD, Adams KF, Anand I, Arias-Mendoza A, Biering-Sørensen T, Böhm M, Bonderman D, Cleland JGF, Corbalan R, Crespo-Leiro MG, Dahlström U, Echeverria LE, Fang JC, Filippatos G, Fonseca C, Gonçalvesova E, Goudev AR, Howlett JG, Lanfear DE, Li J, Lund M, Macdonald P, Mareev V, Momomura SI, O'Meara E, Parkhomenko A,

- Ponikowski P, Ramires FJA, Serpytis P, Sliwa K, Spinar J, Suter TM, Tomcsanyi J, Vandekerckhove H, Vinereanu D, Voors AA, Yilmaz MB, Zannad F, Sharpsten L, Legg JC, Varin C, Honarpour N, Abbasi SA, Malik FI, Kurtz CE. Cardiac myosin activation with omecamtiv mecarbil in systolic heart failure. *N Engl J Med*. 2021; **384**: 105–116.
7. Beier N, Harting J, Jonas R, Klockow M, Lues I, Haessler G. The novel cardiotonic agent EMD 53 998 is a potent “calcium sensitizer”. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991; **18**: 17–27.
 8. Dobrunz LE, Backx PH, Yue DT. Steady-state $[Ca^{2+}]_i$ -force relationship in intact twitching cardiac muscle: direct evidence for modulation by isoproterenol and EMD 53998. *Biophys J*. 1995; **69**: 189–201.
 9. Radke MB, Taft MH, Stapel B, Hilfiker-Kleiner D, Preller M, Manstein DJ. Small molecule-mediated refolding and activation of myosin motor function. *Elife*. 2014; **3**: e01603.
 10. Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Edes I, Papp Z. The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur J Pharmacol*. 2004; **486**: 67–74.
 11. Papp Z, Édes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenperä M, Leppikangas H, Mebazaa A, Landoni G, Grossini E, Caimmi P, Morelli A, Guarracino F, Schwinger RHG, Meyer S, Algotsson L, Wikström BG, Jörgensen K, Filippatos G, Parissis JT, González MJG, Parkhomenko A, Yilmaz MB, Kivikko M, Pollesello P, Follath F. Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol*. 2012; **159**: 82–87.
 12. Horváth B, Váczi K, Hegyi B, Gönczi M, Dienes B, Kistamás K, Bányász T, Magyar J, Baczkó I, Varró A, Seprényi G, Csernoch L, Nánási PP, Szentandrassy N. Sarcolemmal Ca^{2+} -entry through L-type Ca^{2+} channels controls the profile of Ca^{2+} -activated Cl^{-} current in canine ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2016; **97**: 125–139.
 13. Hegyi B, Horváth B, Váczi K, Gönczi M, Kistamás K, Ruzsnavszky F, Veress R, Chen-Izu Y, Bányász T, Magyar J, Csernoch L, Nánási PP, Szentandrassy N. Ca^{2+} -activated Cl^{-} current is antiarrhythmic by reducing both spatial and temporal heterogeneity of cardiac repolarization. *J Mol Cell Cardiol*. 2017; **109**: 27–37.
 14. Andrei SR, Ghosh M, Sinharoy P, Dey S, Bratz IN, Damron DS. TRPA1 ion channel stimulation enhances cardiomyocyte contractile function via a Ca^{2+} /Mg²⁺-dependent pathway. *Channels*. 2017; **11**: 587–603.
 15. Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H, Bak I, Tóth A, Borbély A, Edes I, Papp Z. Two inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005; **46**: 369–376.
 16. Nagy L, Kovács Á, Bódi B, Pásztor ET, Fülöp GÁ, Tóth A, Édes I, Papp Z. The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat. *Br J Pharmacol*. 2015; **172**: 4506–4518.
 17. Cleland JGF, Teerlink JR, Senior R, Nifontov EM, Mc Murray JJV, Lang CC, Tsyrlin VA, Greenberg BH, Mayet J, Francis DP, Shaburishvili T, Monaghan M, Saltzberg M, Neyes L, Wasserman SM, Lee JH, Saikali KG, Clarke CP, Goldman JH, Wolff AA, Malik FI. The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *Lancet*. 2011; **378**: 676–683.
 18. Teerlink JR, Clarke CP, Saikali KG, Lee JH, Chen MM, Escandon RD, Elliott L, Bee R, Habibzadeh MR, Goldman JH, Schiller NB, Malik FI, Wolff AA. Dose-dependent augmentation of cardiac systolic function with the selective cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil: a first-in-man study. *Lancet*. 2011; **378**: 667–675.
 19. Shen Y-T, Malik FI, Zhao X, Depre C, Dhar SK, Abarzúa P, Morgans DJ, Vatner SF. Improvement of cardiac function by a cardiac myosin activator in conscious dogs with systolic heart failure. *Circ Heart Fail*. 2010; **3**: 522–527.
 20. Poggesi C, Tesi C, Stehle R. Sarcomeric determinants of striated muscle relaxation kinetics. *Pflugers Archiv: Eur J Appl Physiol*. 2005; **449**: 505–517.
 21. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*. 2000; **80**: 853–924.
 22. Liu Y, White HD, Belknap B, Winkelmann DA, Forgacs E. Omecamtiv Mecarbil modulates the kinetic and motile properties of porcine β -cardiac myosin. *Biochemistry*. 2015; **54**: 1963–1975.
 23. Wang Y, Ajtai K, Burghardt TP. Analytical comparison of natural and pharmaceutical ventricular myosin activators. *Biochemistry*. 2014; **53**: 5298–5306.
 24. Ferroni C, Hano O, Ventura C, Lakatta EG, Klockow M, Spurgeon H, Capogrossi MC. A novel positive inotropic substance enhances contractility without increasing the Ca^{2+} transient in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1991; **23**: 325–331.
 25. Solaro RJ, Gambassi G, Warshaw DM, Keller MR, Spurgeon HA, Beier N, Lakatta EG. Stereoselective actions of thiadiazinones on canine cardiac myocytes and myofilaments. *Circ Res*. 1993; **73**: 981–990.
 26. Gambassi G, Capogrossi MC, Klockow M, Lakatta EG. Enantiomeric dissection of the effects of the inotropic agent, EMD 53998, in single cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1993; **264**: H728–H738.
 27. Denniss AL, Dashwood AM, Molenaar P, Beard NA. Sarcoplasmic reticulum calcium mishandling: central tenet in heart failure? *Biophys Rev*. 2020; **12**: 865–878.
 28. Wilson K, Guggilam A, West TA, Zhang X, Trask AJ, Cismowski MJ, de Tombe P, Sadayappan S, Lucchesi PA. Effects of a myofilament calcium sensitizer on left ventricular systolic and diastolic function in rats with volume overload heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; **307**: H1605–H1617.
 29. Horváth B, Szentandrassy N, Veress R, Almássy J, Magyar J, Bányász T, Tóth A, Papp Z, Nánási PP. Frequency-dependent effects of omecamtiv mecarbil on cell shortening of isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2017; **390**: 1239–1246.



Article

The Novel Cardiac Myosin Activator Danicamtiv Improves Cardiac Systolic Function at the Expense of Diastolic Dysfunction In Vitro and In Vivo: Implications for Clinical Applications

Arnold Péter Ráduly ^{1,2,3,†}, Fruzsina Sárkány ^{1,3,†}, Máté Balázs Kovács ¹, Brigitta Bernát ⁴, Béla Juhász ⁴, Zoltán Szilvássy ⁴, Róbert Porszász ⁴, Balázs Horváth ⁵, Norbert Szentandrassy ^{5,6}, Péter Nánási ^{5,7}, Zoltán Csanádi ², István Édes ², Attila Tóth ^{1,3,8}, Zoltán Papp ^{1,3,8,*}, Dániel Priksz ^{4,†} and Attila Borbély ^{2,3,†}

¹ Division of Clinical Physiology, Department of Cardiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

² Division of Cardiology, Department of Cardiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

³ Kálmán Laki Doctoral School, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

⁴ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

⁵ Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

⁶ Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Dentistry, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

⁷ Department of Dental Physiology and Pharmacology, Faculty of Dentistry, University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

⁸ HAS-UD Vascular Biology and Myocardial Pathophysiology Research Group, Hungarian Academy of Sciences, 4032 Debrecen, Hungary

* Correspondence: pappz@med.unideb.hu; Tel.: +36-52-255-978/54329

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Ráduly, A.P.; Sárkány, F.; Kovács, M.B.; Bernát, B.; Juhász, B.; Szilvássy, Z.; Porszász, R.; Horváth, B.; Szentandrassy, N.; Nánási, P.; et al. The Novel Cardiac Myosin Activator Danicamtiv Improves Cardiac Systolic Function at the Expense of Diastolic Dysfunction In Vitro and In Vivo: Implications for Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 446. <https://doi.org/10.3390/ijms24010446>

Academic Editor: Steve Leu

Received: 7 December 2022

Revised: 21 December 2022

Accepted: 22 December 2022

Published: 27 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Recent cardiotropic drug developments have focused on cardiac myofilaments. Danicamtiv, the second direct myosin activator, has achieved encouraging results in preclinical and clinical studies, thus implicating its potential applicability in the treatment of heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). Here, we analyzed the inotropic effects of danicamtiv in detail. To this end, changes in sarcomere length and intracellular Ca^{2+} levels were monitored in parallel, in enzymatically isolated canine cardiomyocytes, and detailed echocardiographic examinations were performed in anesthetized rats in the absence or presence of danicamtiv. The systolic and diastolic sarcomere lengths decreased; contraction and relaxation kinetics slowed down with increasing danicamtiv concentrations without changes in intracellular Ca^{2+} transients in vitro. Danicamtiv evoked remarkable increases in left ventricular ejection fraction and fractional shortening, also reflected by changes in systolic strain. Nevertheless, the systolic ejection time was significantly prolonged, the ratio of diastolic to systolic duration was reduced, and signs of diastolic dysfunction were also observed upon danicamtiv treatment in vivo. Taken together, danicamtiv improves cardiac systolic function, but it can also limit diastolic performance, especially at high drug concentrations.

Keywords: heart failure with reduced ejection fraction; myosin activators; danicamtiv; positive inotropy; strain; diastolic dysfunction

1. Introduction

Deteriorating left ventricular (LV) systolic performance is thought to be responsible for the high morbidity and mortality of patients suffering from heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) [1,2]. Based on clinical evidence, pharmacological therapies of chronic HFrEF primarily aim to interfere with neuro-humoral signaling via the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), the sympathetic nervous system (SNS), and the natriuretic peptide system (NPS) [3]. However, these medications have no direct effects on

the contractility of LV cardiomyocytes. Conversely, positive inotropic (PI) agents do increase systolic performance either by augmenting the intracellular Ca^{2+} availability (e.g., beta-receptor agonists, PDE III inhibitors, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger modulators) or by fine-tuning the Ca^{2+} responsiveness of the contractile protein machinery (e.g., Ca^{2+} -sensitizers) of cardiomyocytes, though with uncertain effects on the long-term prognosis of HFrEF.

A new class of positive inotropic drugs, the myosin activators, gained considerable interest about a decade ago. These agents modulate the function of the myosin motor protein by acting on the chemo-mechanical actin–myosin crossbridge cycle [4,5]. Importantly, myosin activators augment cardiac contractions without increasing the oxygen demand of the myocardium and arrhythmia incidence [6]. The first representative of these myotropes is omecamtiv mecarbil (OM), which achieved promising results in clinical trials in association with increases in LV ejection fraction (EF), systolic ejection time (SET), and with no major side effects [7]. Moreover, a large-scale phase III clinical trial with OM has recently revealed a lower incidence of a composite endpoint of heart failure (HF) event or death from cardiovascular (CV) causes in patients with chronic HFrEF [8]. Nevertheless, potential increases in the level of circulating troponins stemming from LV diastolic dysfunction, a narrow therapeutic window, and undesired side effects on skeletal muscles raised concerns for the clinical applicability of OM in HFrEF [9–11].

Recent pharmacological efforts led to the development of a new direct myosin activator, danicamtiv, which also binds to the myosin molecule of cardiomyocytes. The danicamtiv binding site on myosin, and consequently its molecular action, is thought to differ from those of OM [5,12]. Moreover, the selectivity of danicamtiv for cardiac myosin over skeletal or smooth muscle myosin isoforms is considered to be higher than for OM [13]. Nevertheless, similarly to OM, danicamtiv also accelerates the ATPase turnover rate of purified human S1 myosin molecules in vitro, and increases SET and LVEF with additional improvements in the left atrial systolic function in an experimental dog model of HFrEF in vivo [13]. These findings prompted a dose-finding trial in humans where, besides signs of improved LV systolic function, transient asymptomatic increases in troponin levels were also detected in 23% of the patients involved [13]. Nevertheless, the results of a phase 1 clinical trial and a pharmacokinetic study also supported a good safety and tolerability profile for danicamtiv in human subjects [14–16]. In comparison to OM administrations, a wider therapeutic window, a greater potential to improve contractile function, and at lower lusitropic costs, were associated with the applications of danicamtiv in a recent preclinical study conducted in human engineered heart tissues [17], although it should be also noted that the preclinical and clinical data on danicamtiv are still scarce and to some degree obscure, and in particular for the diastolic effects of this new myotrope [13,17,18].

In the present study, we aimed to address the contractile effects of danicamtiv at the sarcomere and organ levels. Here, we show the results of a detailed concentration-response analysis in isolated canine cardiomyocytes where danicamtiv effects on sarcomere dynamics are interpreted in view of intracellular Ca^{2+} concentration changes. Complimentary state-of-the-art echocardiographic examinations in rat hearts allowed the analysis of danicamtiv's effects on LV contractile performance. The combination of in vitro and in vivo studies served as a tool to elucidate the relationship between danicamtiv's evoked effects on myocardial systolic and diastolic functions. Our results illustrate danicamtiv as a direct myosin activator having a largely similar pharmacological profile to OM and signify the potential for diastolic dysfunction during direct myosin activation in general.

2. Results

2.1. Danicamtiv Altered LV Dimensions and Cardiomyocyte Mechanics

The characteristics of danicamtiv's evoked changes in myocardial function were monitored by echocardiography in anaesthetized rats (Figure 1A–D) and by cellular physiological methods in enzymatically isolated canine cardiomyocytes (Figure 1E–H). A significant decrease in the LV end-systolic diameter (ESD), but no change in the LV end-diastolic diameter (EDD) were observed upon the intravenous administration of 2 mg/kg dani-

camtiv (representative examples shown in Figure 1A,B, EDD: from 7.56 ± 0.12 to 7.74 ± 0.26 mm, $p = 0.45$, Figure 1C; ESD: from 3.76 ± 0.11 to 2.93 ± 0.17 mm, $p < 0.001$, Figure 1D) in rats. Surprisingly, in isolated cardiomyocytes a concentration-dependent decrease in diastolic sarcomere length (SL) was observed as illustrated in Figure 1E upon danicamtiv administration during steady-state field stimulation at a frequency of 0.5 Hz at room temperature (i.e., from 1.91 ± 0.01 (Control) to 1.90 ± 0.01 , 1.89 ± 0.01 , 1.86 ± 0.01 , 1.83 ± 0.01 , 1.69 ± 0.03 , and 1.57 ± 0.04 μm at 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1 or 2 μM danicamtiv, respectively; significant for SL changes at danicamtiv concentrations 0.5, 1, and 2 μM , $P = 0.002$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, respectively) (Figure 1G). Danicamtiv at concentrations of 1 and 2 μM also evoked significant reductions in systolic SL (from 1.65 ± 0.02 (Control) to 1.51 ± 0.02 and 1.45 ± 0.03 μm , $p = 0.003$ and $p < 0.001$, respectively, Figure 1H). The decreases in diastolic and systolic SL were accompanied by an increase in the durations of cardiomyocyte contractions (Figure 1E). The time courses of the Ca^{2+} transients were not affected by danicamtiv treatments (Figure 1F).

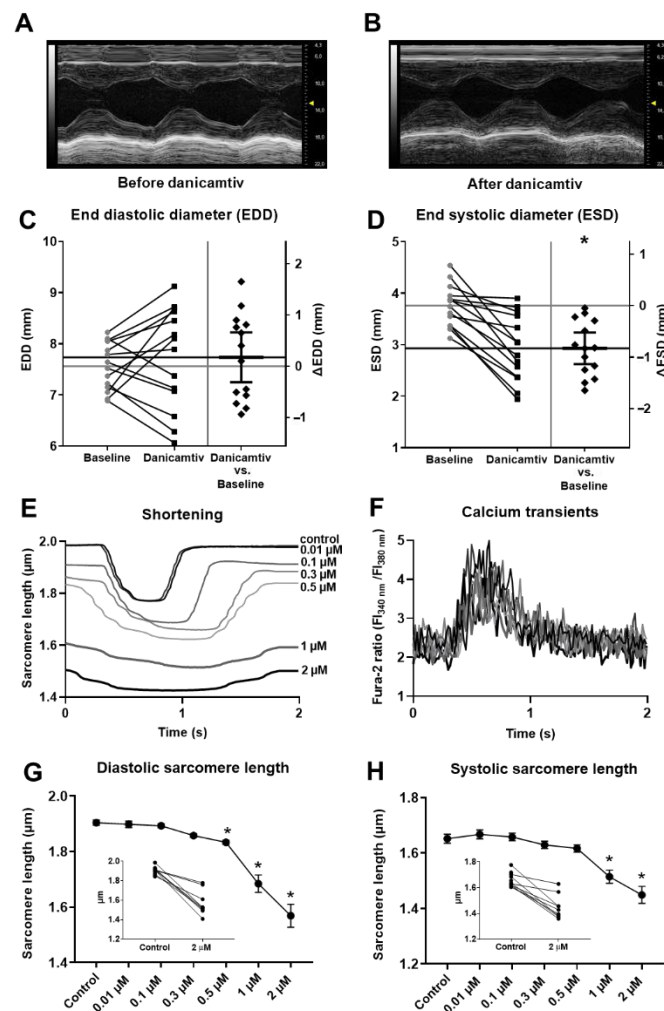


Figure 1. Danicamtiv distinctly affected LV dimensions and cardiomyocyte SL during systoles and diastoles. Representative M-mode echocardiographic images of rat LV before and after iv. danicamtiv treatment (A,B). Danicamtiv did not induce a significant decrease in the mean of EDD changes but it decreased significantly the mean of ESD (C,D). (Danicamtiv-dependent responses are illustrated for all animals on the left sides of panels (C,D). Differences between the values in the absence and presence of danicamtiv are shown on the right sides of panels (C,D) in individual experiments. A horizontal black dash in the middle illustrates the means of differences, and the continuous black lines at the same positions highlight the mean values after danicamtiv treatments. The grey line shows the mean of the baseline values, which coincides with 0 on the right Y axis. The vertical lines

together with the two short black dashes on the right sides of panels (C,D) highlight 95% confidence intervals for the illustration of statistical significance (i.e., when it does not transect 0 level for the differences (Δ EDD or Δ ESD)). Representative traces of SL changes during cardiomyocyte contractions and Ca^{2+} transients upon danicamtiv exposures (E,F). Different shades of gray refer to the applied drug concentrations, as indicated (E,F). Danicamtiv prolonged the duration of cardiomyocyte contractions, but did not affect Ca^{2+} transient durations. Significant reductions both in diastolic (G) and systolic (H) SL were observed in isolated left ventricular canine cardiomyocytes upon danicamtiv administration. Insets show values of SL of individual cardiomyocytes in control and in 2 μM danicamtiv. Symbols represent the means and standard errors of the mean (SEM). Significant differences from the baseline values are indicated by asterisks (* = $p < 0.05$; exact p values are indicated in the text).

2.2. Danicamtiv Improved Left Ventricular Contractile Function In Vivo

The relevant LV systolic contractile parameters, including LVEF (from 79.76 ± 1.24 to $89.36 \pm 0.99\%$, $p < 0.001$), fractional shortening (FS) (from 50.58 ± 1.30 to $63.57 \pm 1.47\%$, $p < 0.001$), and stroke volume (SV) (from 243.89 ± 10.07 to $290.56 \pm 20.26 \mu\text{L}$, $p = 0.012$) increased significantly upon the intravenous administration of 2 mg/kg danicamtiv (Figure 2A–C). In addition, cardiac output (CO) also increased (from 61.40 ± 2.99 to $72.45 \pm 5.04 \text{ mL/min}$, $p = 0.026$) (Figure 2D), supporting the positive inotropic effect of the drug, and the consequent hemodynamic improvement.

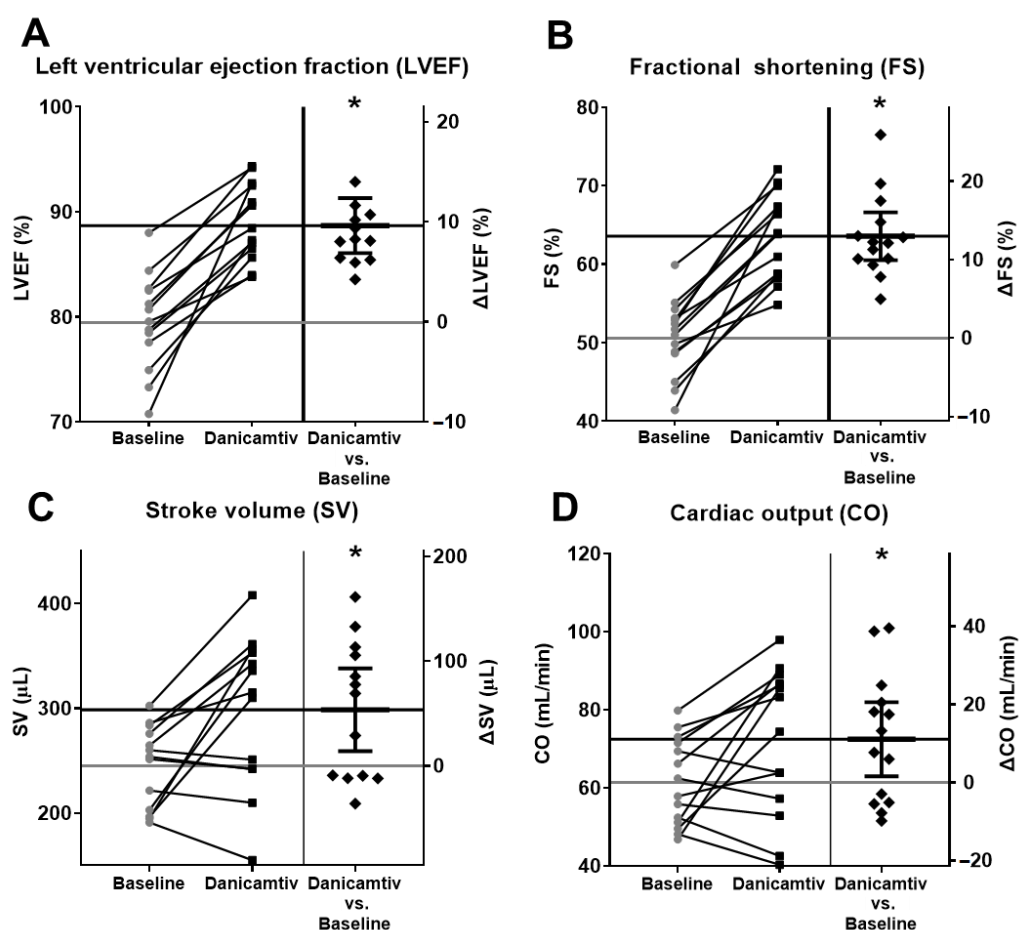


Figure 2. Danicamtiv augmented left ventricular systolic function. Danicamtiv improved LV systolic contractile parameters: LV ejection fraction (EF) (A), fractional shortening (FS) (B), and stroke volume (SV) (C). Cardiac output also increased upon danicamtiv administration (D). (The construction of panels is identical with those in Figure 1C,D). * = $p < 0.05$.

2.3. Danicamtiv Increased Contraction Durations in Rats and Canine Cardiomyocytes

Both systolic durations (from 88.64 ± 1.83 to 106.00 ± 3.30 ms, $p = 0.0001$) and systolic ejection time (SET) were significantly prolonged upon danicamtiv treatments in rats (from 72.28 ± 1.53 to 87.14 ± 3.05 ms, $p < 0.001$) (Figure 3A,B). Similarly, a progressive prolongation in contraction duration (Figure 3C) and in the time to peak interval (Figure 3D) were observed upon increasing danicamtiv concentrations in canine cardiomyocytes (0.64 ± 0.03 , 0.78 ± 0.06 , 0.94 ± 0.06 , 1.02 ± 0.06 , 1.45 ± 0.08 and 2.06 ± 0.22 s, at 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 μM danicamtiv concentrations, vs. 0.66 ± 0.03 s (Control), respectively, $p < 0.001$ for drug concentrations ≥ 0.3 μM for contraction duration; and 0.49 ± 0.02 , 0.69 ± 0.09 , 1.00 ± 0.10 , 1.19 ± 0.08 , 1.04 ± 0.06 , and 1.57 ± 0.21 s, at 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 μM danicamtiv concentrations vs. 0.51 ± 0.02 s (Control), respectively, $p = 0.029$, $p = 0.004$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$ for 0.3, 0.5, 1, and 2 μM drug concentrations for time to peak interval). Echocardiography revealed a significant decrease in the duration of diastole (from 152.20 ± 4.19 to 133.00 ± 4.66 ms, $p = 0.008$) (Figure 3E), which was also evidenced by a marked decrease in the ratio of diastolic to systolic durations (from 1.73 ± 0.06 to 1.28 ± 0.07 , $p < 0.001$, Figure 3F).

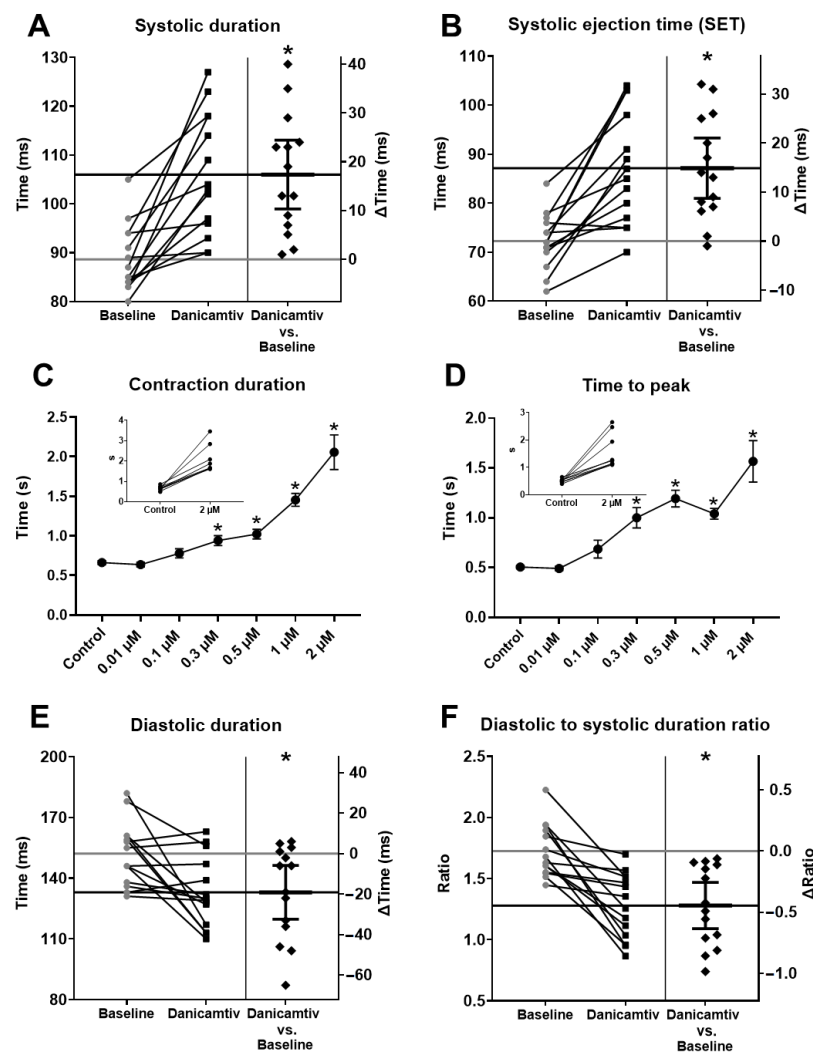


Figure 3. Danicamtiv increased the durations of systoles and decreased the durations of diastoles. Danicamtiv prolonged both systolic durations and systolic ejection time (A,B). When danicamtiv was added to the tissue chamber in different concentrations (0.01 μM to 2 μM), a progressive increase in contraction duration and time to peak interval could be observed (C,D). The results of individual experiments are shown in the insets. The symbols represent the mean and standard error of the mean.

Significant differences from the baseline values upon application of danicamtiv are indicated by asterisks. Danicamtiv decreased diastolic duration (E) with a consequent decline in the ratio of diastolic to systolic durations (F). (The construction of panels is identical with the corresponding ones in Figure 1). * = $p < 0.05$.

2.4. Danicamtiv Decreased Myocardial Contraction Kinetics Both In Vivo and In Vitro

When danicamtiv was applied to rats, a significant decrease in LV peak radial systolic velocity (from 3.50 ± 0.13 to 2.67 ± 0.17 cm/s, $p < 0.001$, $N = 9$, Figure 4A) and contraction velocity (M-mode slope) (from 3.32 ± 0.23 to 2.30 ± 0.11 cm/s, $p = 0.008$, $N = 10$ Figure 4B) were observed. The lengthening of LV contractions could be attributed to the slower kinetics of cardiomyocyte contraction (from 1.16 ± 0.10 to 1.02 ± 0.12 , 0.85 ± 0.09 , 0.76 ± 0.08 , 0.68 ± 0.08 , 0.39 ± 0.07 , and 0.18 ± 0.03 $\mu\text{m/s}$, respectively) with increasing danicamtiv concentrations (control, 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 μM , respectively) significant at danicamtiv concentrations 0.5, 1, and 2 μM , $p = 0.021$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$ (Figure 4C). Upon danicamtiv administration, both global longitudinal strain (from -24.22 ± 1.30 to $-33.27 \pm 1.45\%$, $p < 0.001$, Figure 4D) and global circumferential strain (from -54.58 ± 3.28 to $-59.29 \pm 3.36\%$, $p = 0.015$, Figure 4E) decreased significantly, thus indicating LV systolic function improvement. In addition, a marked increase in the pulmonary vein atrial reversal flow velocity (from 136.70 ± 11.35 to 201.10 ± 24.85 mm/s, $p = 0.008$) and atrial reversal flow duration (from 20.27 ± 0.77 to 28.10 ± 2.24 ms, $p = 0.004$) were observed, which indicate an augmentation of the left atrial systolic function. No significant changes were seen in the aortic or pulmonary artery mean and peak velocities or gradients developed during danicamtiv treatments (Table 1).

Table 1. Echocardiographic and electrocardiographic parameters measured at baseline and following danicamtiv administration in rats.

Parameters	Baseline (n = 14)	Danicamtiv (n = 14)	p Value (Baseline vs. Danicamtiv)
<i>Echocardiography</i>			
LV volume—systole (μL)	61.53 ± 4.23	35.7 ± 4.77	<0.001
LV volume—diastole (μL)	305.4 ± 11.2	326.1 ± 23.9	0.327
LV anterior wall thickness—systole (mm)	3.17 ± 0.09	3.49 ± 0.14	0.034
LV anterior wall thickness—diastole (mm)	1.76 ± 0.22	1.65 ± 0.26	0.171
LV posterior wall thickness—systole (mm)	3.24 ± 0.12	3.69 ± 0.09	0.003
LV posterior wall thickness—diastole (mm)	1.93 ± 0.08	1.92 ± 0.08	0.867
Aorta peak systolic velocity (mm/s)	899.3 ± 35.7	936.7 ± 41.2	0.276
Aorta mean systolic velocity (mm/s)	547.8 ± 29.8	511.1 ± 35.4	0.213
Aorta peak pressure gradient (mmHg)	3.30 ± 0.26	3.59 ± 0.31	0.248
Aorta mean pressure gradient (mmHg)	1.30 ± 0.15	1.11 ± 0.17	0.178
Pulmonic vein atrial reverse flow (mm/s)	136.7 ± 11.4	201.1 ± 24.9	0.008
Pulmonic vein atrial reverse flow duration (ms)	20.27 ± 0.77	28.10 ± 2.24	0.004
Mitral E wave deceleration time (ms)	57.57 ± 2.53	51.09 ± 2.63	0.134
Mitral valve septal e' (mm/s)	40.47 ± 2.44	36.36 ± 2.36	0.051
Mitral valve septal a' (mm/s)	35.21 ± 1.74	42.24 ± 2.27	0.070
Mitral valve septal e'/a'	1.21 ± 0.11	0.874 ± 0.10	0.014
Tei index	0.60 ± 0.04	0.50 ± 0.03	<0.001
E/e' ratio	18.79 ± 1.31	19.53 ± 1.69	0.549
Isovolumic contraction time (ms)	14.50 ± 0.53	14.50 ± 0.91	0.999
Isovolumic relaxation time (ms)	27.79 ± 1.77	28.71 ± 2.22	0.450

Table 1. Cont.

Parameters	Baseline (n = 14)	Danicamtiv (n = 14)	p Value (Baseline vs. Danicamtiv)
<i>Electrocardiography</i>			
Heart rate (bpm)	251 ± 15	249 ± 14	0.715
PQ interval (s)	0.048 ± 0.004	0.051 ± 0.004	0.245
QRS duration (s)	0.017 ± 0.003	0.017 ± 0.002	0.869
QT interval—corrected to heart rate (s)	0.042 ± 0.002	0.042 ± 0.001	0.577
T wave amplitude (mV)	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.477

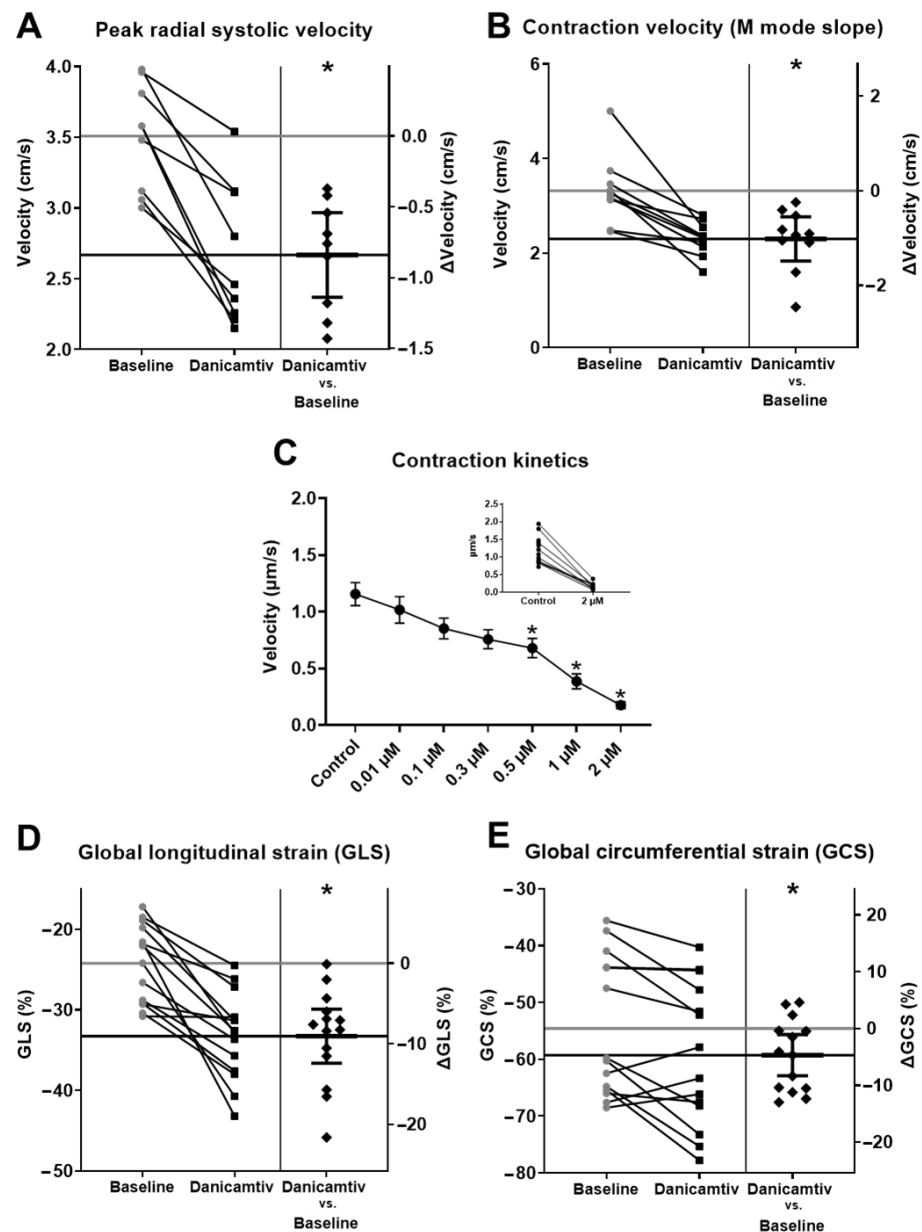


Figure 4. Danicamtiv decreased LV and cardiomyocyte contraction kinetics. The LV peak radial systolic velocity and contraction velocity (M-mode slope) decreased significantly upon danicamtiv administration (**A,B**). Cardiomyocyte contraction kinetics were also slowed down by danicamtiv (**C**). Global longitudinal and circumferential strain were decreased significantly by danicamtiv (**D,E**). (The construction of panels is identical with the corresponding ones in Figure 1). * = $p < 0.05$.

2.5. Danicamtiv Impaired Diastolic Function

Danicamtiv's administration was associated with a significant decrease in the early (E) transmitral filling velocity (from 720.92 ± 11.87 to 645.92 ± 29.17 mm/s, $p = 0.013$) and an increase in the late (A) transmitral filling velocity (from 379.24 ± 19.00 to 506.93 ± 37.81 mm/s, $p = 0.003$, Figure 5A–D). The consequent decrease in the E/A ratio (from 1.97 ± 0.10 to 1.38 ± 0.10 , $p = 0.0003$, Figure 5E) indicated an elevation in left ventricular filling pressures. The tissue doppler imaging (TDI) velocities (i.e., mitral valve septal early (a') and late (e') filling tissue velocities) tended to change similarly to the mitral E and A wave velocities (Table 1). The changes in the TDI e' / a' ratio further support the altered mitral inflow pattern upon danicamtiv administration. Nevertheless, the isovolumic relaxation time (IVRT) was not altered by danicamtiv. Of note, the alterations in the indices of ventricular diastolic function were mirrored by the slower relaxation velocities in isolated cardiomyocytes (i.e., from the drug-free control of 1.63 ± 0.15 μ m/s, to 1.48 ± 0.20 , 1.39 ± 0.13 , 1.13 ± 0.12 , 0.98 ± 0.11 , 0.48 ± 0.10 , and 0.20 ± 0.05 μ m/s, with increasing danicamtiv concentrations; 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 μ M, respectively, $p < 0.001$ at danicamtiv concentrations ≥ 1 μ M Figure 5G).

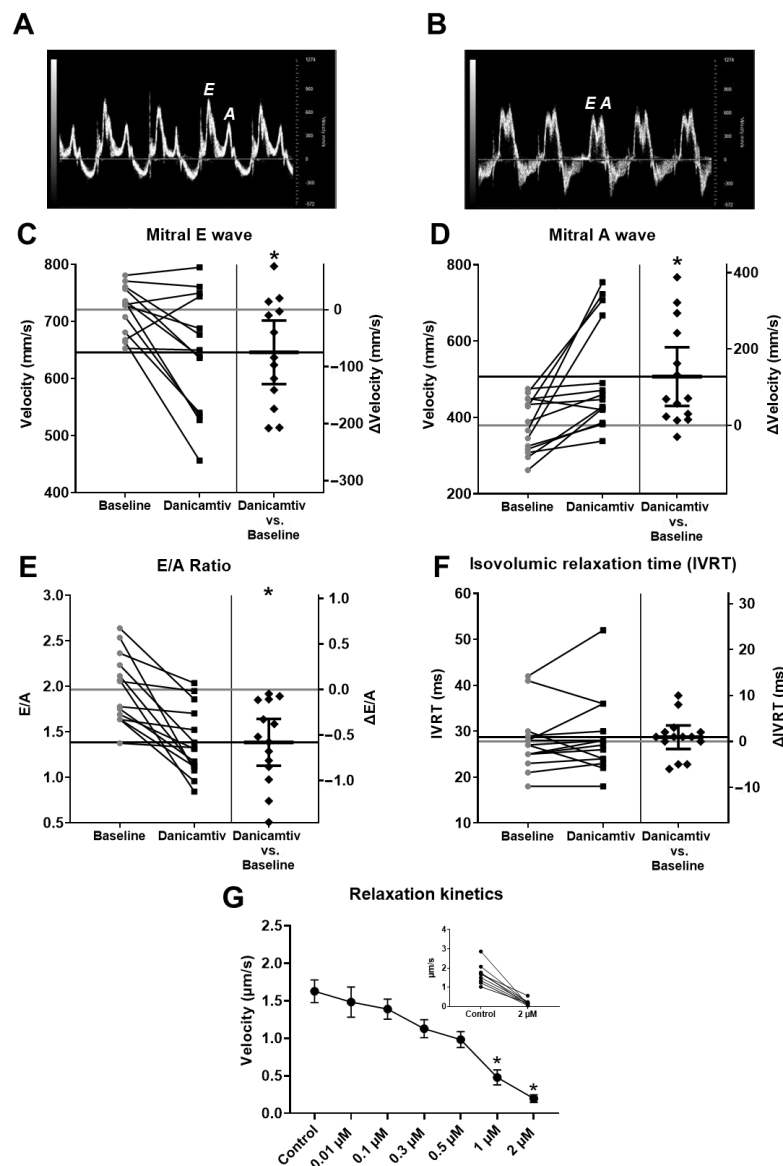


Figure 5. Danicamtiv impaired LV diastolic function and relaxation kinetics. Pulsed-wave Doppler

imaging at the mitral valve was used to determine the early/atrial inflow ratio (E/A) (representative individual recordings in panel (A) for control and presence of danicamtiv in panel (B)). Danicamtiv negatively affected LV diastolic filling in the rat (C–E). Consistent with the echocardiographic measurements, danicamtiv significantly decreased relaxation kinetics in freshly isolated canine LV cardiomyocytes (F,G). The IVRT remained unaltered. Cardiomyocytes were treated with danicamtiv (0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 μ M) during the measurements. (The construction of panels is identical with the corresponding ones in Figure 1). * = $p < 0.05$.

2.6. Danicamtiv Did Not Affect the Time Courses of Ca^{2+} Transients and Had No Proarrhythmic Effects

During the cumulative administration of danicamtiv (0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 μ M) no changes in the amplitudes and durations of Ca^{2+} transients were observed (Figure 6A,B). Moreover, no changes could be detected when the kinetic parameters of Ca^{2+} transients were studied (data not shown). When electrocardiac parameters were analyzed (heart rate, PQ, QRS duration, QT interval, and T wave amplitude), no relevant changes or arrhythmias were observed upon danicamtiv application (Table 1).

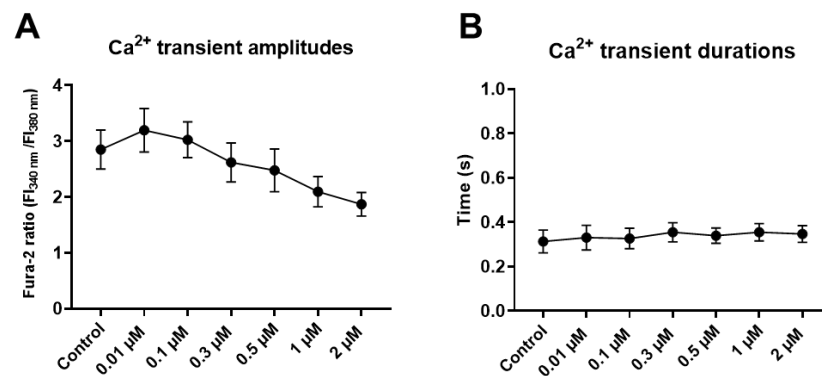


Figure 6. Danicamtiv did not alter intracellular Ca^{2+} transients in canine cardiomyocytes. Ca^{2+} transients were recorded in parallel with contractile parameters. No significant differences were observed in the Ca^{2+} transient amplitudes (A) and durations (B) with danicamtiv.

3. Discussion

The results of our present investigations illustrate danicamtiv, a new direct myosin activator with an apparent coupling between its systolic and diastolic effects. Our data extend previous danicamtiv-related observations and shed new light on its characteristics for a potential future clinical application as a positive inotrope.

Targeted disease-modifying therapies appear as emerging new strategies in current HF guidelines to treat cardiomyopathies [3]. The myosin inhibitor mavacamten by interfering with the hypercontractile state of cardiomyocytes may also temper remodeling in hypertrophic cardiomyopathy [19,20]. However, there is no specific therapy for dilated cardiomyopathy (DCM) to date. This fact and the experience with OM have encouraged the development of the second myosin activator, with danicamtiv reaching the clinical stage [19,21].

The binding site of direct myosin activators is located on the S1 domain of the β -myosin heavy chain in the cardiomyocytes of canine and rodent hearts. Of note, danicamtiv (similarly to OM) had no effect on intracellular Ca^{2+} transients in cardiomyocytes, suggesting that the above drug–target interaction is solely responsible for its cardiotonic effects. It follows that danicamtiv-evoked contractile responses will be largely comparable in dogs and rats, as has been formerly also evidenced for OM in identical canine and rodent cardiac preparations [22]. Here, we decided to conduct our cellular physiological experiments in canine cardiomyocytes considering their electrophysiological similarity to human cardiomyocytes [23], and to complement our investigations at the organ level in rats as current echocardiographic technologies allow high-quality imaging in small mammals [24].

The pathophysiological processes occurring in HFrEF lead to significant declines in contractility with manifest reductions of SV [25]. Positive inotropic agents have been considered for the compensation of this cardiac malfunction both in acute and chronic HFrEF for several decades [4,5,22]. Conventional calcitropes increase intracellular Ca^{2+} levels, oxygen consumption, and also mortality in the long term [26–28]. In contrast, direct myosin activators exert an allosteric effect on the myosin ATPase, thus allowing more actin-myosin contacts to be formed for an unchanged intracellular Ca^{2+} transient, a mechanism that supposedly avoids the above side effects.

Here, we performed comprehensive experiments and showed that danicamtiv has major effects on both the systolic and diastolic functions of enzymatically isolated intact canine LV cardiomyocytes in vitro and in rat hearts in vivo. Danicamtiv evoked a significant decrease both in systolic and diastolic SL in our in vitro experiments, similarly to OM [10,29]. The reduction in diastolic SL could be associated with an increase in cardiomyocyte passive tension, measured at low (diastolic) Ca^{2+} levels, which has been also demonstrated during OM administration [10]. Of note, an increase in passive tension served as an explanation for LV diastolic dysfunction in patients with HF with preserved EF (HFpEF) [30]. The above data on OM and the results of a preclinical investigation on cardiac S1 myosin with omecamtiv and danicamtiv are suggestive of an increase in the myosin ATPase rate even at diastolic Ca^{2+} levels by direct myosin activators [11,20].

Our current assessment on LV contractility revealed significant increases in FS, SV, EF, and CO upon danicamtiv administration, similarly to previous findings obtained with OM [7]. In contrast to OM, which decreased both EDD and ESD in humans [7], here we found that danicamtiv decreased only ESD but not EDD in rat hearts. These findings are in accordance with the preclinical data of an experimental canine model of HF, and to some degree also with the results of a clinical phase 2a trial, where EDD appeared somewhat less sensitive for danicamtiv than ESD [13]. In a recent study, where the effects of danicamtiv and OM were compared in a human engineered myocardium, danicamtiv led also to a greater augmentation of systolic contraction with less negative effects on relaxation [17]. Increased LV filling pressure is known to be compensated by an increase in atrial contractile function. In the case of danicamtiv, this phenomenon was well reflected by a significant increase in the transmitral A wave and a decrease in the E wave; thus, a characteristic alteration in the E/A ratio, a major parameter of diastolic function. Accordingly, these changes might be sufficient to compensate for an adequate LV filling. Taken together, our data and that of others implicate higher gains in SV and CO and more favorable diastolic effects for danicamtiv than for OM. Moreover, we propose that the apparent discrepancy between the danicamtiv-evoked decrease in the diastolic SL of unloaded cardiomyocytes and the unchanged EDDs is the consequence of danicamtiv-aided atrial compensation during LV filling.

The in vivo and in vitro results with danicamtiv showed similarities when comparing the kinetic parameters of the contraction and relaxation of canine cardiomyocytes to those of systolic and diastolic durations in rat LVs: i.e., contraction kinetics was significantly slowed down in vivo, while time to peak and contraction time values were significantly increased in vitro. The increase in systolic ejection time and systolic contraction time appear as hallmarks of myosin activators, as was shown first for OM treatments [11,22]. Of note, an increased systolic time results in a shortened diastolic duration, so that the ratio of diastolic to systolic durations will also be affected by danicamtiv treatment, with potential implications for coronary perfusion and troponin release. In contrast to the effects of OM in humans [7], the isovolumic contraction time (IVCT) and IVRT were not affected by danicamtiv in rat hearts. Nevertheless, SET was significantly increased by danicamtiv, suggestive for an improvement in the myocardial performance index (Tei index) by danicamtiv.

Novel echocardiographic parameters, such as peak radial systolic velocity from strain analysis and the conventional M-mode slope, were also consistent with kinetic parameters measured in canine cardiomyocytes in vitro. Here, we evaluated myocardial strain and

velocity by using speckle tracking (STE, non-Doppler, or 2-dimensional strain) echocardiography. Strain rate imaging is a novel approach for assessing myocardial function and has not been included in routine diagnostic methods yet. It is important to note that strain echocardiography, especially in small animals, has also been less studied, although it provides a very sensitive approach to detect alterations in LV function. Myocardial velocity and strain can be also measured by TDI, though STE 2D-strain is considered to be a superior technique since, in contrast to TDI, the obtained results are angle-independent [31]. In general, data obtained by 2D-strain show a good correlation with sonomicrometry and magnetic resonance imaging (MRI), the gold-standard tool of myocardial deformation and volume analysis [31]. Here, danicamtiv treatment was shown to decrease the contraction velocity of the myocardium, which was also confirmed by a significant decrease in a 2D-strain parameter, the peak radial systolic velocity.

Additionally, 2D-strain echocardiography seems to be a more sensitive tool to assess LV function than measuring EF by classical methods. For example, it has been reported that global longitudinal strain or circumferential strain (GLS or GCS, respectively) can convincingly detect systolic dysfunction even when EF is normal [32]. In our present study, the effects of danicamtiv on LV systolic function were evaluated not only by standard methods (measuring EF, FS, SV, CO, and aortic velocities) but also by 2D-strain echocardiography. We found significantly decreased GLS and GCS values in danicamtiv-treated rat hearts, further confirming the positive effects of the drug on LV contractility as was also reported for danicamtiv in a phase 2a trial in HFrEF patients and in a dog model of HFrEF [13].

It is to be acknowledged that extrapolation of our results to the failing heart could be limited by the fact that our investigations were carried out on the cardiac preparations of healthy animals. Nevertheless, our results are in accord with those performed in a canine model of heart failure and in a phase 2a trial on danicamtiv [13].

Taken together, the cardiac effects of OM and danicamtiv are largely similar: both compounds effectively enhance LV systolic function, although they can also limit LV diastolic function. The data presented here implicate advantages for danicamtiv over OM, since danicamtiv did not affect IVRT or IVCT. Moreover, left atrial contractile function was enhanced at a relatively low danicamtiv concentration. To our knowledge, similar effects have not been reported for OM yet.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

4.1.1. In Vitro Experiments

Cardiomyocytes with intact membranes isolated from adult mongrel dogs (N = 6 weighed 10.00 ± 3.03 kg (6 to 14 kg), aged 15.03 ± 1.02 months (13.9 to 16.9 months)) were anesthetized with intramuscular injections of ketamine hydrochloride (10 mg/kg; Calypsol, Richter Gedeon, Hungary) and xylazine hydrochloride (1 mg/kg; Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV, The Netherlands) according to a protocol approved by the local Animal Care Committee (2/2020/DEMÁB).

4.1.2. In Vivo Experiments

In vivo experiments were performed on 8–12-week-old adult Sprague-Dawley rats (417.90 ± 51.95 g, Charles River Laboratories Inc., Wilmington, Germany) and they were housed in a room with controlled temperature and kept under 12/12 h dark/light cycle. Rats were anaesthetized with ketamine/xylazine combination (75/5 mg/kg, respectively); thereafter, chest hair was shaved, tail vein was cannulated (the cannula was removed at the end of the experiments), and animals were positioned in a dorsal position on a heating pad (39 °C). During echocardiographic examinations, external 3-lead ECG registration was continuously performed. Danicamtiv was administered intravenously at a dose of 2 mg/kg according to a protocol approved by the local Animal Care Committee (4-1/2019/DEMÁB).

4.2. Drugs and Chemicals

Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Danicamtiv was purchased from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA). Stock solutions for in vitro experiments were prepared in DMSO as solvent and stored at 4 °C. Appropriate amounts of concentrated stock solutions were dissolved in the bathing medium to obtain final danicamtiv concentrations of 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 μM for in vitro experiments. These concentrations were reached by cumulative dosing during the experiments. The concentration of DMSO in these solutions was 0.1%. The control (danicamtiv-free) vehicle contained the same amount of DMSO. With regard to in vivo experiments, danicamtiv was administered intravenously (*iv.*), dissolved in its special solvent (10% DMSO/90% (20% SBE- β -CD in saline)) at a dose of 2 mg/kg. Danicamtiv dose was chosen according to a previously published pharmacokinetic study [16]. Control experiments were performed with solutions containing only the vehicle (10% DMSO/90% (20% SBE- β -CD in saline)).

4.3. Isolation of Canine Left Ventricular Cardiomyocytes

Canine cardiomyocytes obtained from adult mongrel dogs were studied, since their physiological properties are very similar to those of humans. Cardiomyocytes were isolated from the midmyocardial region of the LV, as was described previously [33,34]. Briefly, hearts were isolated from anesthetized (ketamine-HCl 10 mg/kg, xylazine-HCl 1 mg/kg) adult mongrel dogs. Thereafter, the hearts were applied to a perfusion system and the left anterior descending coronary artery was cannulated. Single cardiomyocytes were obtained by enzymatic dispersion technique by first using Ca^{2+} free Joklik solution (Minimum Essential Medium Eagle, Joklik Modification; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) for 5 min, followed by 30 min-long perfusions with Joklik solution containing 1 mg/mL collagenase (Type II, Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA) and 0.2% bovine serum albumin (Fraction V, Sigma) added 50 μM Ca^{2+} . Then cells were grounded, and normal Ca^{2+} concentration was restored progressively. Cells were stored at 15 °C until the measurements.

4.4. Recording of Intracellular Ca^{2+} Transients and Cardiomyocyte Shortening

Cardiomyocytes were loaded with 5 μM Fura-2 AM Ca^{2+} -sensitive ratiometric fluorescent dye for 30 min in the presence of Pluronic F-127 (25 mg/mL) to avoid early elimination of the dye from the intracellular space. A total of 25 mg Pluronic F-127 was dissolved in 1 mL DMSO and this solvent was used to make a Fura-2 AM stock solution. Cells were then incubated for 30 min to allow the intracellular esterases to release Fura-2. Cardiomyocytes were placed in a chamber on the stage of an inverted microscope (Nikon TS-100). The final volume of the chamber was filled with 1 mL Tyrode solution (containing 144 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, and 11 mM dextrose, pH = 7.4). After sedimentation, a rod-shaped cardiomyocyte with clear striation, and acceptable contraction upon field-stimulation was selected for further experiments. Field stimulation was performed at 0.5 Hz (Experimenta Setup, MDE, Heidelberg). Alternating excitation wavelengths of 340 nm and 380 nm were used to monitor the fluorescence signals of Ca^{2+} -bound and Ca^{2+} -free Fura-2 dye, respectively. Fluorescent emission was detected above 510 nm in the case of both wavelengths, and traces were digitized at 120 Hz using the FeliX Software (Ratiomaster RM-50 system, Horiba, New Brunswick, NJ, USA) [35].

4.5. Determination of Effects on Diastolic SL, Contractile Parameters, and Ca^{2+} Transients

The experimental protocol was the following: cardiomyocytes were paced at 0.5 Hz for at least 2–3 min to achieve a steady state at the beginning of each experiment. Danicamtiv was added in a cumulative manner (final concentration of 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1 or 2 μM) followed by a 4–7-min incubation period, then contractility was measured upon 0.5 Hz pacing. Multiple parameters of cardiomyocyte contraction and intracellular Ca^{2+} transients were assessed. Cardiomyocyte SL was measured in μm by a high-speed camera. Duration of contraction was defined as the time in seconds from the beginning until the end of

cardiomyocyte contractions and time to peak interval was assessed from the beginning to the peak of shortenings, also in seconds. Rates of contraction and relaxation were determined at the linear phases of contractions and relaxations, respectively, and expressed in $\mu\text{m/s}$. The resting Ca^{2+} level was estimated by Fura-2 ratio (fluorescent intensity ratio at 340 and 380 nm excitation) at baseline (before cardiomyocyte stimulation). The Ca^{2+} transient duration was determined as the time interval measured between the 50% of ascending and descending slope of Ca^{2+} transient. The amplitude of Ca^{2+} transients was defined as the difference between the peak of Ca^{2+} transients and the resting Ca^{2+} levels (340 nm/380 nm ratio). Ca^{2+} transient increase kinetics was determined as the slope of a linear regression line fitted to the ascending Ca^{2+} transient ($340/380 \times s^{-1}$).

4.6. Echocardiography

Echocardiography was carried out using the Vevo 3100 Imaging System including Vevo Imaging Station (VisualSonics, Amsterdam, Netherlands) equipped with high-frequency transducer (MX250, 14–28 MHz). Anesthetized rats (ketamine-HCl 10 mg/kg, xylazine-HCl 1 mg/kg) were shaved and placed onto a heated platform (VisualSonics SR200) equipped with ultra-low noise, high-resolution ECG electronics. The ECG was continuously monitored and recorded (2 min) during echocardiographic examinations. Echocardiographic imaging was started 5 min after dantrolene i.v. injection and lasted maximum 15 min. Data acquisition was performed in B-, 2D-, M-, and Doppler modes, from parasternal long- and short axis (PSLAX, PSAX, respectively), as well as suprasternal and apical 4 chamber views (SST, A4C, respectively). Cardiac function was assessed in accordance with the guidelines of American Society of Echocardiography [36]. The manufacturer's recommendations for focus, 2D gain, picture width, and depth were used to optimize B-Mode imaging quality. Heart rate (HR, bpm) was automatically calculated from the ECG R-R interval data of 5 s. Wall thickness and chamber diameters were measured in M-mode, at mid-level of the papillary muscles, from both PSLAX and PSAX views, left atrial (LA) maximal diameter (mm), aortic root (Ao) diameter (mm) from M-mode recordings. End diastolic diameter (EDD, mm) and end systolic diameter (ESD, mm), as well as anterior and posterior LV wall thickness (mm, LVAWd, LVAWs, and LVPWd, LVPWs, respectively) and interventricular septum thickness (IVS, mm) were measured by manually tracing the endo- and epicardial borders in PSLAX M-mode images. Left ventricle volume in diastole and systole (LVVOLD, LVVOLs, respectively; μL) were calculated by the software as $(7.0/(2.4+EDD))^3 \times EDD^3$, and $(7.0/(2.4+ESD))^3 \times ESD^3$, respectively. The LV ejection fraction (LVEF, %) was measured as $100 \times (LVVOLD - LVVOLs)/LVVOLD$. Stroke volume (SV, μL) was determined as $LVIDd - LVIDs$, and Cardiac Output (CO, mL/min) was estimated as $SV \times HR$. To measure kinetics of endocardial wall contraction, M-mode velocity at the LVPW wall (MVel, mm/s) was determined by manually tracing the wall movement on the M-mode images.

Diastolic function was assessed by pulsed-wave Doppler (PWD) and tissue Doppler imaging (TDI) from apical 4 chamber views at the levels of the mitral valve (MV) and the septal annulus, respectively. Transmitral early (MV E, mm/s) and late atrial (MV A, mm/s) peak flow velocities, MV E/A ratio, and deceleration time (DecT, ms) of the E wave were determined. Isovolumic contraction time (IVCT, ms), systolic ejection time (SET, ms), and isovolumic relaxation time (IVRT, ms) were determined in the left ventricular cavity, where both mitral inflow and left ventricular outflow could be visualized. Myocardial performance index (MPI) was calculated as the Tei-index ($(IVRT + IVCT)/LVET(SET)$). The length of a cardiac cycle (CL; ms) was determined from R-R distance. Duration of systole (SystDur; ms) was considered as $ET + IVCT$, while duration of diastole (DiastDur; ms) was calculated as $CL - SystDur$. The ratio of the DiastDur/SystDur was also calculated. The PW Doppler mode was also used to determine aortic flow (Ao) parameters from a modified suprasternal (aortic arch) view. Aortic velocity time integral (Ao VTI, mm), mean and peak velocity (Ao mean Vel, Ao peak Vel, mm/s), mean and peak pressure gradient (Ao mean Grad, Ao peak Grad, mmHg) were calculated by the software after automatically tracing the borders of the Doppler jet. Similarly, the flow parameters of the pulmonary

artery (PA) were determined as PA velocity time integral (PA VTI, mm), mean and peak velocity (PA mean Vel, PA peak Vel, mm/s), mean and peak pressure gradient (PA mean Grad, PA peak Grad, mmHg; respectively). The pulmonary vein was visualized by using a modified PSLAX view [37]. Pulmonary vein systolic (PV S, mm/s) and diastolic (PV D, mm/s) deflections and PV atrial reversal (AR) peak velocity (PV Ar, mm/s) and duration (PV ARdur, ms) were measured. Tissue Doppler imaging (TDI) was performed at the septal annulus to evaluate peak tissue velocities at systole (s' , mm/s), and in early (e' , mm/s) and late (a' , mm/s) filling. The ratio of E/e' was then determined. Three cardiac cycles were averaged for each parameter.

4.7. Strain Echocardiography

Strain echocardiographic analysis was carried out offline. According to the Lagrangian and Eulerian strain tensors of finite deformation theory, the strain (S) of a soft tissue in each direction is described as the difference between the segment's initial length and its changed length, whereas strain rate (SR) is the rate of deformation change over a given time period. During the conventional echocardiographic imaging, high-frame rate (>200 fps) traces were recorded from both the parasternal long- and short axis views (PLAX and SAX, respectively), by a trained investigator. Images were evaluated in slow motion (1/8) before data storage, to ensure reproducibility. A single observer performed all strain analysis using the VevoLAB[®] software equipped with the VevoStrain[®] extension (ver. 5.6.0; FUJIFILM VisualSonics, Amsterdam, The Netherlands). The software displays acquired videos in configurable slow-motion loops, allowing for suitable analysis even when the HR is high. Grayscale B-mode pictures were used to measure strain and strain rate parameters. Images were carefully selected to provide adequate visualization of myocardial borders; endo- and epicardial borders were traced semi-automatically, with manual adjustment where needed, to achieve proper quality tracking of each loop. Borders were traced from the mid-basal level. Longitudinal and radial strain parameters were generated from PLAX view, while circumferential strain parameters and fractional area change (FAC; %) were assessed from SAX view images, with papillary muscles excluded from tracing. Ventricular borders were defined, and the speckle-tracking system assigned circumjacent areas adjacent to the outlined chamber. The software algorithm estimated velocity (V; cm/s), displacement (D; mm), strain (S; %), and strain rate (SR; s⁻¹) for each site on the designated line by following the defined border region (longitudinal and radial strain values were analyzed at the endocardial border). Speckle-tracking data were visualized in a color-coded map representing diastolic and systolic deformations, and reconstructed in a 3D image to provide a better spatio-temporal perception of wall motion. Time-to-peak analysis (TPk) was also performed to assess local wall motion synchronism, as TPk slope analysis delivers further information about regional motion and deformation development. For this method, the myocardium was divided into six anatomic segments, in agreement with the definition of the American Heart Association. Peak and average radial systolic velocity values (cm/s), global longitudinal strain (GLS; %), global circumferential strain (GCS; %), and fractional area change (FAC; %) after i.v. danicamtiv administration were analyzed and compared to baseline values of each animal [37–41].

4.8. Electrocardiogram

Three lead ECG recording was performed in parallel with the echocardiographic examinations. After anesthesia, animals were placed in a dorsal position and leads were positioned subcutaneously. LabChart Reader v8.1.14 software was used to evaluate ECG recordings. The following parameters were considered for the evaluation: heart rate, PQ interval, QRS duration, QT time, corrected QT interval, T-wave amplitude. For the evaluation, 6 consecutive cardiac cycles were averaged for each parameter, and data are presented as mean $\pm$ SEM.

4.9. Data Analysis and Statistics

Results were evaluated and graphs were created in the GraphPad Prism 9.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As for cellular measurements the number of experiments in each group varied between 9 and 14 from 6 different hearts. Background fluorescence intensity levels were obtained at the end of the measurements on a region without cardiomyocytes and manually subtracted the fluorescence intensities for background correction. Fourteen rats were measured before and after iv. treatment of danicamtiv. For all experiments, values were evaluated for normality (Kolmogorov–Smirnov normality test) and were then evaluated by paired t-tests, ordinary one-way ANOVA, or Kruskal–Wallis test with multiple comparisons as appropriate. Group descriptions are given as mean $\pm$ SEM values. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$; exact p values are indicated in the results section (rounded to three decimal places).

5. Conclusions

Danicamtiv has the potential to augment LV systolic function in the absence of an increase in the amplitude of the intracellular Ca^{2+} transient. Although the administration of danicamtiv inherently affects LV diastolic function, this effect may be less prominent for danicamtiv than for OM. To some degree, this difference may relate to danicamtiv's evoked augmentation in atrial contractility. Moreover, limitations in diastolic function appear as a class-effect during the application of direct myosin activators. Accordingly, considerable attention should be paid to the stratification of LV diastolic function in patients treated with danicamtiv.

Author Contributions: Conceptualization, A.B., A.T., Z.P., D.P., M.B.K., A.P.R. and F.S.; methodology, D.P., A.P.R., F.S., A.B., A.T., Z.S., B.B. and Z.P.; data curation, A.P.R., F.S. and D.P.; writing—original draft preparation, A.P.R., F.S., D.P. and A.B.; writing—review and editing, Z.P., A.T., B.J., R.P., N.S., B.H., Z.S., P.N., I.É. and Z.C.; supervision, A.B. and Z.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the GINOP-2.3.2-15-2016-00043 project and by the ÚNKP-21-3 new national excellence program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development, and Innovation Fund. The project was co-financed by the European Union and the European Regional Development Fund. This work was also supported by project Nos. TKP2020-IKA-04 (to Z.P., A.T., J.B. and D.P.) and TKP2020-NKA-04 (to Z.P., A.T., J.B. and D.P.) from the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary, under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme. Project no. K 132623 (to A.T.) has been implemented with the support provided from the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary, financed under the K_19 funding scheme. Project nos. NKFIH-K138090 (to P.N.), NKFIH-K142764 (to N.SZ.), and NKFIH-FK128116 (to B.H.) were financed by the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary. The research group (A.T., Z.P.) is supported by the Hungarian Academy of Sciences.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Debrecen (2/2020/DEMÁB and 4-1/2019/DEMÁB).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data analyzed and presented in this study are available from the corresponding author on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Shah, K.S.; Xu, H.; Matsouaka, R.A.; Bhatt, D.L.; Heidenreich, P.A.; Hernandez, A.F.; Devore, A.D.; Yancy, C.W.; Fonarow, G.C. Heart Failure with Preserved, Borderline, and Reduced Ejection Fraction: 5-Year Outcomes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 2476–2486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Shah, A.; Gandhi, D.; Srivastava, S.; Shah, K.J.; Mansukhani, R. Heart Failure: A Class Review of Pharmacotherapy. *P T A Peer-Rev. J. Formul. Manag.* **2017**, *42*, 464–472.

3. McDonagh, T.A.; Metra, M.; Adamo, M.; Gardner, R.S.; Baumbach, A.; Böhm, M.; Burri, H.; Butler, J.; Čelutkienė, J.; Chioncel, O.; et al. 2021 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Eur. Heart J.* **2021**, *42*, 3599–3726. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Bernier, T.D.; Buckley, L.F. Cardiac Myosin Activation for the Treatment of Systolic Heart Failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2021**, *77*, 4–10. [\[CrossRef\]](#)
5. Alsulami, K.; Marston, S. Small Molecules Acting on Myofilaments as Treatments for Heart and Skeletal Muscle Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9599. [\[CrossRef\]](#)
6. Shen, Y.-T.; Malik, F.I.; Zhao, X.; Depre, C.; Dhar, S.K.; Abarzúa, P.; Morgans, D.J.; Vatner, S.F. Improvement of Cardiac Function by a Cardiac Myosin Activator in Conscious Dogs with Systolic Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **2010**, *3*, 522–527. [\[CrossRef\]](#)
7. Teerlink, J.R.; Clarke, C.P.; Saikali, K.G.; Lee, J.H.; Chen, M.M.; Escandon, R.D.; Elliott, L.; Bee, R.; Habibzadeh, M.R.; Goldman, J.H.; et al. Dose-Dependent Augmentation of Cardiac Systolic Function with the Selective Cardiac Myosin Activator, Omecamtiv Mecarbil: A First-in-Man Study. *Lancet* **2011**, *378*, 667–675. [\[CrossRef\]](#)
8. Teerlink, J.R.; Diaz, R.; Felker, G.M.; McMurray, J.J.V.; Metra, M.; Solomon, S.D.; Adams, K.F.; Anand, I.; Arias-Mendoza, A.; Biering-Sørensen, T.; et al. Cardiac Myosin Activation with Omecamtiv Mecarbil in Systolic Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 105–116. [\[CrossRef\]](#)
9. Cleland, J.G.F.; Teerlink, J.R.; Senior, R.; Nifontov, E.M.; McMurray, J.J.V.; Lang, C.C.; Tsyrlin, V.A.; Greenberg, B.H.; Mayet, J.; Francis, D.P.; et al. The Effects of the Cardiac Myosin Activator, Omecamtiv Mecarbil, on Cardiac Function in Systolic Heart Failure: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover, Dose-Ranging Phase 2 Trial. *Lancet* **2011**, *378*, 676–683. [\[CrossRef\]](#)
10. Nagy, L.; Kovács, Á.; Bódi, B.; Pásztor, E.T.; Fülöp, G.Á.; Tóth, A.; Édes, I.; Papp, Z. The Novel Cardiac Myosin Activator Omecamtiv Mecarbil Increases the Calcium Sensitivity of Force Production in Isolated Cardiomyocytes and Skeletal Muscle Fibres of the Rat. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 4506–4518. [\[CrossRef\]](#)
11. Fülöp, G.Á.; Oláh, A.; Csipo, T.; Kovács, Á.; Pórszász, R.; Veress, R.; Horváth, B.; Nagy, L.; Bódi, B.; Fagyas, M.; et al. Omecamtiv Mecarbil Evokes Diastolic Dysfunction and Leads to Periodic Electromechanical Alternans. *Basic Res. Cardiol.* **2021**, *116*, 24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Day, S.M.; Tardiff, J.C.; Ostap, E.M. Myosin Modulators: Emerging Approaches for the Treatment of Cardiomyopathies and Heart Failure. *J. Clin. Investig.* **2022**, *132*, e148557. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Voors, A.A.; Tamby, J.-F.; Cleland, J.G.; Koren, M.; Forgosh, L.B.; Gupta, D.; Lund, L.H.; Camacho, A.; Karra, R.; Swart, H.P.; et al. Effects of Danicamtiv, a Novel Cardiac Myosin Activator, in Heart Failure with Reduced Ejection Fraction: Experimental Data and Clinical Results from a Phase 2a Trial. *Eur. J. Heart Fail.* **2020**, *22*, 1649–1658. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Abstracts of the Heart Failure 2019 and the World Congress on Acute Heart Failure, 25–28 May 2019, Megaron Athens International Conference Centre, Greece. *Eur. J. Heart Fail.* **2019**, *21*, 5–592. [\[CrossRef\]](#)
15. Tamby, J.F.; Fang, L.; Lickliter, J.; Hegde, S.; Surks, H.; Reece, S.; Teichman, S.; Yang, C.; Fernandes, S.L. MYK-491, a Novel Cardiac Myosin Activator, Increases Cardiac Contractility in Healthy Volunteers. In Proceedings of the Heart Failure 2019–6th World Congress on Acute Heart Failure, Athens, Greece, 25–28 May 2019. Abstract 60668.
16. Grillo, M.P.; Markova, S.; Evanchik, M.; Trellu, M.; Moliner, P.; Brun, P.; Perreard-Dumaine, A.; Vicat, P.; Driscoll, J.P.; Carlson, T.J. Preclinical In Vitro and In Vivo Pharmacokinetic Properties of Danicamtiv, a New Targeted Myosin Activator for the Treatment of Dilated Cardiomyopathy. *Xenobiotica* **2021**, *51*, 222–238. [\[CrossRef\]](#)
17. Shen, S.; Sewanan, L.R.; Jacoby, D.L.; Campbell, S.G. Danicamtiv Enhances Systolic Function and Frank-Starling Behavior at Minimal Diastolic Cost in Engineered Human Myocardium. *J. Am. Heart Assoc.* **2021**, *10*, e020860. [\[CrossRef\]](#)
18. Fernandes, S.; Oikonomopoulos, A.; Jimenez-MacInnes, S.K.; Aschar-Sobbi, R.; Henze, M.; Sumandea, M.; Gan, Q.F.; Anderson, R.L.; del Rio, C.L. MYK-491, a Novel Small-Molecule Cardiac Myosin Activator Increases Cardiac Systolic Function and Preserves Mechanical Efficiency: Pre-Clinical In Vivo and In Vitro Evidence. *Circulation* **2019**, *140*, A15707.
19. Lehman, S.J.; Crocini, C.; Leinwand, L.A. Targeting the Sarcomere in Inherited Cardiomyopathies. *Nat. Rev. Cardiol.* **2022**, *19*, 353–363. [\[CrossRef\]](#)
20. Olivetto, I.; Oreziak, A.; Barriales-Villa, R.; Abraham, T.P.; Masri, A.; Garcia-Pavia, P.; Saberi, S.; Lakdawala, N.K.; Wheeler, M.T.; Owens, A.; et al. Mavacamten for Treatment of Symptomatic Obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy (EXPLORER-HCM): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet* **2020**, *396*, 759–769. [\[CrossRef\]](#)
21. Teerlink, J.R.; Diaz, R.; Felker, G.M.; McMurray, J.J.V.; Metra, M.; Solomon, S.D.; Legg, J.C.; Büchele, G.; Varin, C.; Kurtz, C.E.; et al. Omecamtiv Mecarbil in Chronic Heart Failure with Reduced Ejection Fraction: Rationale and Design of GALACTIC-HF. *JACC Heart Fail.* **2020**, *8*, 329–340. [\[CrossRef\]](#)
22. Malik, F.I.; Hartman, J.J.; Elias, K.A.; Morgan, B.P.; Rodriguez, H.; Brejc, K.; Anderson, R.L.; Sueoka, S.H.; Lee, K.H.; Finer, J.T.; et al. Cardiac Myosin Activation: A Potential Therapeutic Approach for Systolic Heart Failure. *Science* **2011**, *331*, 1439–1443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Nánási, P.P.; Horváth, B.; Tar, F.; Almássy, J.; Szentandrassy, N.; Jost, N.; Baczkó, I.; Bányász, T.; Varró, A. Canine Myocytes Represent a Good Model for Human Ventricular Cells Regarding Their Electrophysiological Properties. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 748. [\[CrossRef\]](#)
24. Zacchigna, S.; Paldino, A.; Falcão-Pires, I.; Daskalopoulos, E.P.; Dal Ferro, M.; Vodret, S.; Lesizza, P.; Cannatà, A.; Miranda-Silva, D.; Lourenço, A.P.; et al. Towards Standardization of Echocardiography for the Evaluation of Left Ventricular Function in Adult Rodents: A Position Paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovasc. Res.* **2021**, *117*, 43–59. [\[CrossRef\]](#)

25. Francis, G.S.; Tang, W.H.W. Pathophysiology of Congestive Heart Failure. *Rev. Cardiovasc. Med.* **2003**, *4*, S14–S20.
26. Packer, M.; Carver, J.R.; Rodeheffer, R.J.; Ivanhoe, R.J.; DiBianco, R.; Zeldis, S.M.; Hendrix, G.H.; Bommer, W.J.; Elkayam, U.; Kukin, M.L. Effect of Oral Milrinone on Mortality in Severe Chronic Heart Failure. The PROMISE Study Research Group. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 1468–1475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. O'Connor, C.M.; Gattis, W.A.; Uretsky, B.F.; Adams, K.F.J.; McNulty, S.E.; Grossman, S.H.; McKenna, W.J.; Zannad, F.; Swedberg, K.; Gheorghiade, M.; et al. Continuous Intravenous Dobutamine Is Associated with an Increased Risk of Death in Patients with Advanced Heart Failure: Insights from the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am. Heart J.* **1999**, *138*, 78–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ahmad, T.; Miller, P.E.; McCullough, M.; Desai, N.R.; Riello, R.; Psotka, M.; Böhm, M.; Allen, L.A.; Teerlink, J.R.; Rosano, G.M.C.; et al. Why Has Positive Inotropy Failed in Chronic Heart Failure? Lessons from Prior Inotrope Trials. *Eur. J. Heart Fail.* **2019**, *21*, 1064–1078. [[CrossRef](#)]
29. Horváth, B.; Szentandrassy, N.; Veress, R.; Almássy, J.; Magyar, J.; Bányász, T.; Tóth, A.; Papp, Z.; Nánási, P.P. Frequency-Dependent Effects of Omecamtiv Mecarbil on Cell Shortening of Isolated Canine Ventricular Cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2017**, *390*, 1239–1246. [[CrossRef](#)]
30. Borbély, A.; van der Velden, J.; Papp, Z.; Bronzwaer, J.G.F.; Edes, I.; Stienen, G.J.M.; Paulus, W.J. Cardiomyocyte Stiffness in Diastolic Heart Failure. *Circulation* **2005**, *111*, 774–781. [[CrossRef](#)]
31. Perk, G.; Tunick, P.A.; Kronzon, I. Non-Doppler Two-Dimensional Strain Imaging by Echocardiography—From Technical Considerations to Clinical Applications. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2007**, *20*, 234–243. [[CrossRef](#)]
32. Stokke, T.M.; Hasselberg, N.E.; Smedsrud, M.K.; Sarvari, S.I.; Haugaa, K.H.; Smiseth, O.A.; Edvardsen, T.; Remme, E.W. Geometry as a Confounder When Assessing Ventricular Systolic Function: Comparison Between Ejection Fraction and Strain. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 942–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Horváth, B.; Vácz, K.; Hegyi, B.; Gönczi, M.; Dienes, B.; Kistamás, K.; Bányász, T.; Magyar, J.; Baczkó, I.; Varró, A.; et al. Sarcolemmal Ca(2+)-Entry through L-Type Ca(2+) Channels Controls the Profile of Ca(2+)-Activated Cl(−) Current in Canine Ventricular Myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *97*, 125–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hegyi, B.; Horváth, B.; Vácz, K.; Gönczi, M.; Kistamás, K.; Ruzsnavszky, F.; Veress, R.; Izu, L.T.; Chen-Izu, Y.; Bányász, T.; et al. Ca(2+)-Activated Cl(−) Current Is Antiarrhythmic by Reducing Both Spatial and Temporal Heterogeneity of Cardiac Repolarization. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2017**, *109*, 27–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Andrei, S.R.; Ghosh, M.; Sinharoy, P.; Dey, S.; Bratz, I.N.; Damron, D.S. TRPA1 Ion Channel Stimulation Enhances Cardiomyocyte Contractile Function via a CaMKII-Dependent Pathway. *Channels* **2017**, *11*, 587–603. [[CrossRef](#)]
36. Moran, C.; Thomson, A. Preclinical Ultrasound Imaging—A Review of Techniques and Imaging Applications. *Front. Phys.* **2020**, *8*, 124. [[CrossRef](#)]
37. Yuan, L.; Wang, T.; Liu, F.; Cohen, E.D.; Patel, V.V. An Evaluation of Transmitral and Pulmonary Venous Doppler Indices for Assessing Murine Left Ventricular Diastolic Function. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2010**, *23*, 887–897. [[CrossRef](#)]
38. Smiseth, O.A.; Torp, H.; Opdahl, A.; Haugaa, K.H.; Urheim, S. Myocardial Strain Imaging: How Useful Is It in Clinical Decision Making? *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 1196–1207. [[CrossRef](#)]
39. Beyhoffer, N.; Brix, S.; Betz, I.R.; Klopffleisch, R.; Foryst-Ludwig, A.; Krannich, A.; Stawowy, P.; Knebel, F.; Grune, J.; Kintscher, U. Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2017**, *30*, 1239–1250.e2. [[CrossRef](#)]
40. Hein, S.J.; Lehmann, L.H.; Kossack, M.; Juergensen, L.; Fuchs, D.; Katus, H.A.; Hassel, D. Advanced Echocardiography in Adult Zebrafish Reveals Delayed Recovery of Heart Function after Myocardial Cryoinjury. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122665. [[CrossRef](#)]
41. Bauer, M.; Cheng, S.; Jain, M.; Ngoy, S.; Theodoropoulos, C.; Trujillo, A.; Lin, F.-C.; Liao, R. Echocardiographic Speckle-Tracking Based Strain Imaging for Rapid Cardiovascular Phenotyping in Mice. *Circ. Res.* **2011**, *108*, 908–916. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.