

# İzole Kobay Kalplerinde İskemik Arrest Sonrası Levosimendan ve Amrinonun İnotropik Etkilerinin Karşılaştırılması

Öner SÜZER, A. Kürşat BOZKURT, Asuman SÜZER, Zuhul AYKAÇ, Aydın BARLAS

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalları, Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul

Levosimendan kalsiyuma duyarlılığı artırıcı özelliği bulunan fosfodiesteraz inhibitörleri grubundan yeni bir inotropik ajandır. Bu çalışma normal ve post-iskemik koşullarda amrinon ile karşılaştırmalı olarak levosimendanın doza bağımlı kardiyovasküler etkilerini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Kobay kalpleri Langendorff cihazında Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edilmiştir. Kardiyak kontraktile, elektrokardiyogram kaydedilmiş ve koroner akım ölçülmüştür. Kardiyoplejik arrest öncesi ve sonrasında levosimendan veya amrinon ayrı kolonlardan gittikçe artan konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

Hiçbir konsantrasyonda levosimendan veya amrinon koroner akım veya kalp atım hızında değişikliğine yol açmamıştır ( $p>0.05$ ). Her iki grupta reperfüzyon döneminde kontraktile daha kötüdür. Reperfüzyon döneminde daha yüksek  $+dx/dt_{max}$  oranına ulaşan levosimendan ( $p=0.004$ ) daha güçlü inotropik etki göstermiştir. Kontraktile levosimendan grubunda daha iyi olmasına karşın fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0.359$ ). Levosimendan iskemik kalplerde amrinondan daha güçlü bir inotropik ajan olarak bulunmuştur ve bu etkinin fosfodiesteraz inhibe edici özelliğine ek olarak kalsiyuma duyarlılığı artırıcı varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir.

GKD Cer Derg 1996; 1: 4-8

Kalp yetersizliğinde kasılabilme yeteneğini artırabilmek için geçerli olan temel farmakolojik yöntem ortamda aktin-myosin sisteminin kullanabileceği kalsiyumu arttırmaktadır (1). Kardiyak glikozitler,  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonistleri ve fosfodiesteraz III inhibitörleri pozitif inotropik etkilerini sırasıyla, sarkolemmal Na-K adenozin trifosfaz aktiviseninin inhibisyonu, adenilat siklaz-siklik adenozinmonofosfat (cAMP) yolunun uyarılması ve cAMP yıkılımının engellemesi ile gösterirler. Tümünde

## The Comparison of the Inotropic Effects of Levosimendan and Amrinone After Ischemia in Isolated Perfused Guinea Pig Hearts

Levosimendan is a new phosphodiesterase-inhibitor inotropic agent with calcium-sensitizing properties. This study was planned to find its dose dependent cardiovascular effects in normal and postischemic conditions in comparison with amrinone. Guinea pig hearts were perfused with Krebs-Henseleit solution in Langendorff apparatus. Cardiac contractility, ECG were recorded and coronary flow measurements were made. Levosimendan or amrinone were applied from different columns in rising concentrations before and after cardioplegic arrest.

Levosimendan and amrinone did not change coronary flow and heart rate significantly at any concentration ( $p>0.05$ ). Both groups had worse contractility in reperfusion period. Levosimendan was a more potent inotropic agent in the reperfusion period because this group had higher  $+dx/dt_{max}$  ( $p=0.004$ ) values. Contractility was also better in levosimendan but this was not statistically significant ( $p=0.359$ ). In conclusion, levosimendan is a better inotropic drug for ischaemic hearts than amrinone and this may be due to its calcium sensitizing properties in addition to the phosphodiesterase inhibiting activity.

ortak olan özellik membran depolarizasyonu sonrası kontraktile aktivasyon için gerekli olan miyoplazmik kalsiyum düzeyini arttırmalarıdır (1).

Buna karşın yakın zamanda troponin C'nin ortamda varolan kalsiyuma duyarlılığını artırarak etki eden, pimobendan ve sulmazol gibi daha spesifik inotropik ajanlar geliştirilmiştir (2,3). Bu grup ilaçların aynı zamanda fosfodiesteraz III üstüne kısmen engelleyici etkileri vardır ve diyastolde kalsiyum kontraktile cisim-

den ayrılarak izovolemik relaksasyon sağlanır. Bu etkileri ile kalsiyum duyarlılığını arttırıcı ilaçlar iskemik kalp hastalığına bağlı pompa yetersizliğinin akut ve kronik tedavisinde önemli rol oynayabilir (4). Bu grup içinde levosimendan (OR-1259) son olarak geliştirilen ilaçlardan biri olup henüz deneysel ve faz 1 klinik çalışmalar süregelmektedir (5).

Levosimendanın global miyokardiyal iskemi sonrası kardiyovasküler etkileri yeterince incelenmemiştir. Bu deneysel çalışmada kardiyoplejik arrest öncesi ve sonrası levosimendanın doza bağımlı direkt kardiyak etkilerini, aynı konsantrasyonlarda uygulanan amrinonla karşılaştırmalı olarak belirlemeyi amaçladı.

### Materyal ve Metod

Bu çalışmada her iki cinsten 500-800 gr ağırlığında kobay kalpleri kullanıldı. Deneyle ilişkili tüm ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra denekler sert bir çubukla kafaya vurulan darbe ile öldürüldü. Eter, halotan gibi ilaçların kalbe depresif etkileri bulunduğu için kullanılmamasından kaçınıldı. Göbekten boyuna kadar yapılan kesi ile toraks açıldı. Henüz atmakta olan kalp, aortada en az 2 mm'lik bir mesafe kalacak şekilde çıkartıldı. Önceden hazırlanmış olup buz içinde bekleyen +4° C'de, heparinlenmiş Krebs-Henseleit solüsyonuna kondu. Bu sıvı içinde aort etrafındaki dokular temizlenip preparasyon tamamlandı ve ardından kalp Langendorff sisteminde Krebs-Henseleit solüsyonuyla (Na+137, K+ 4.5 Mg++ 1.2, Ca++ 2.5, Cl 134, HCO3-15.5, H2PO4-1.2 ve glikoz 11.5 mmol) perfüze edildi (6).

Çalışan kalpte mevcut enerji kaynakları tükenip hızla doku hasarı gelişeceğinden kalbin eksize edilmesinden Langendorff sisteminde retrograd perfüzyon başlamasına kadar geçen süre 60 saniye altında tutuldu. Hazırlama süresi 60 saniye üstünde ise, bu denekler çalışma dışı bırakıldı. Aortasından Langendorff kanülüne

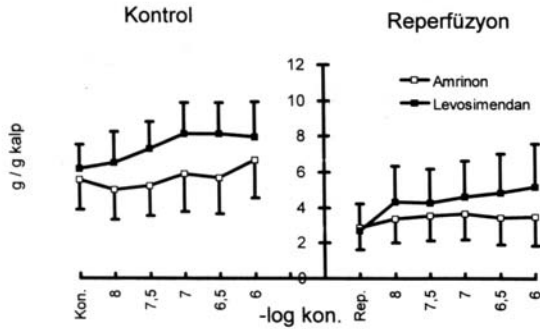
bağlanıp kalp ipekle tespit edildi. Retrograd Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüzyon devam ederken ventrikül kasılmasının yazdırılması için kalbin apeksinden 4/0, 13 mm iğneli atravmatik ipek geçirildi. Sabit ısıda tutulabilmesi için kalp, cidarları 37° C sabit ısıda tutulan bir cam kabın içine konuldu. Apeksdeki ipek FTO3 izometrik transdüserle bağlandı ve kayıtlar bir Grass poligrafla yapıldı. Kalplere bu esnada 5 g gerim verildi.

Apeksin altına konan ölçülü kap ile koroner sıvı toplandı. Bu sıvı deneyin tüm periyodlarında aynı olarak toplanarak koroner akım hesaplandı. Tüm deney süresince kontraksiyon amplitüdüleri ve EKG kaydedildi. Yirmi dakikalık stabilizasyon döneminden sonra levosimendan veya amrinon (her iki grup için n=6) 5'er dakika süreyle artan konsantrasyonlarda  $10^{-8}$ ,  $10^{-7.5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6.5}$ ,  $10^{-6}$  M) uygulandı,

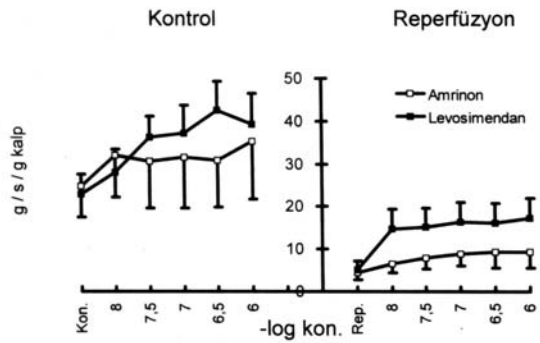
Ölçümler ilaç uygulamasının son dakikasında yapıldı. Deney sonunda kalpler 120°C'de 6 saat süreyle kurutuldu ve parametreler kuru kalp ağırlığına endekslendi. Çalışmada kullanılan tüm solüsyonlar deney sabahı taze olarak hazırlandı. Levosimendan solüsyonlara deneyden hemen önce karıştırıldı. Levosimendan Orion Corporation, Orion – Farnos, Espoo, Finlandiya tarafından hediye edildi. Çalışmada elde edilen verilerin ortalaması ve standart hatası hesaplandı. İstatistiksel incelemede tek yönlü Anova kullanıldı, p<0.05 anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

**Kasılma:** Her iki gruptaki kalplerin kasılma güçleri amrinon veya levosimendan uygulamasıyla arttı. Levosimendan grubunda artışlar daha fazla olsa da gruplar arasında kontrol ve reperfüzyon dönemlerinde istatistiksel farklılık saptanmadı (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol ve reperfüzyon dönemlerinde kalplerin, amrinon ve levosimendanın artan dozlarda uygulanmaları sonucu kasılmalarındaki değişiklikler ( $g$  kasılma,  $g$  kalp ağırlığı<sup>-1</sup>).

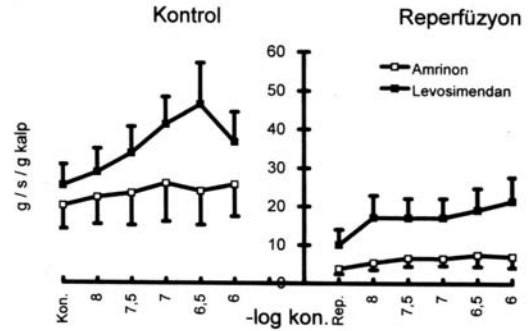


Şekil 2. Kontrol ve reperfüzyon dönemlerinde kalplerin, amrinon ve levosimendanın artan dozlarda uygulanmaları sonucu  $+dx/dt_{max}$  değerlerindeki değişiklikler ( $g$ : kasılma,  $saniye^{-1}$ ,  $g$  kalp ağırlığı<sup>-1</sup>).

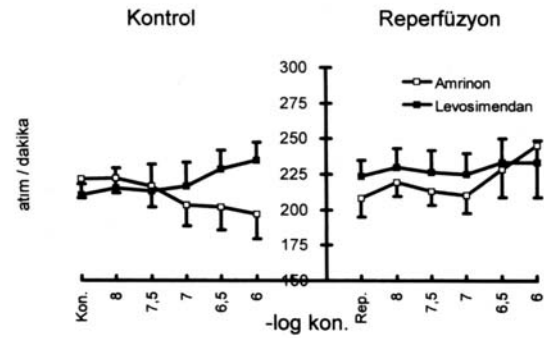
**+dx/d<sub>max</sub>:** Kasılma gücünün zamana göre değişimini gösteren bu kriterde levosimendan grubu amrinona göre daha güçlü değişimler gösterdi, reperfüzyon döneminde bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.004$ ) (Şekil 2).

**-dx/dt<sub>min</sub>:** Gevşemenin zamana göre değişimini gösteren bu kriterde levosimendan grubu amrinona göre daha güçlü değişimler gösterdi, hem kontrol ( $p=0.011$ ) hem de reperfüzyon ( $p<0.001$ ) dönemlerinde bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 3).

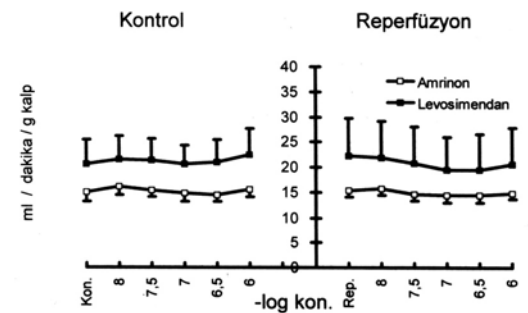
**Kalp hızı:** Deney boyunca kalp hızı artan dozlarda sadece levosimendanda kontrol döneminde artış gösterdi, ancak bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ) (Şekil 4).



Şekil 3. Kontrol ve reperfüzyon dönemlerinde kalplerin, amrinon ve levosimendanın artan dozlarda uygulanmaları sonucu  $+dx/dt_{min}$  değerlerindeki değişiklikler ( $g$ : gevşeme,  $saniye^{-1}$ ,  $g$  kalp ağırlığı<sup>-1</sup>).



Şekil 4. Kontrol ve reperfüzyon dönemlerinde kalplerin, amrinon ve levosimendanın artan dozlarda uygulanmaları sonucu kalp atım hızlarındaki değişiklikler ( $atım$  /  $dakika^{-1}$ ).



Şekil 5. Kontrol ve reperfüzyon dönemlerinde kalplerin, amrinon ve levosimendanın artan dozlarda uygulanmaları sonucu kasılmalarındaki değişiklikler ( $ml$  /  $dakika^{-1}$   $g$  kalp ağırlığı<sup>-1</sup>).

**Koroner akım:** Uygulanan dozlarda kontrol veya reperfüzyon dönemlerinde herhangi bir değişim saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 5).

## Tartışma

Fosfodiesteraz III inhibitörleri pozitif inotropik ve vazodilatör etkileri ile postoperatif düşük kalp debisi sendromunda kullanım alanı bulmuşlardır (7,8). Klinik ve deneysel çalışmalarda diğer inotropik ajanlardan farklı olarak anti-iskemik özelliklerinin olduğu gösterilmiş ve özellikle kalp cerrahisi sonrası düşük kalp debisi sendromunda kullanımı önerilmiştir (8,9). Myofilamanların kalsiyuma duyarlılığını artırarak pozitif inotropik etki sağlanması ise yeni bir farmakolojik yaklaşımdır ve saf fosfodiesteraz inhibitörlerinden farklı olarak miyokard oksijen kullanımını arttırmadıkları bildirilmektedir(10).

Hipoksik veya iskemik miyokardiyumda oluşan intrasellüler asidoz ve troponin I'in cAMP'ye bağlı fosforilasyon artışı nedeniyle ortamda varolan kalsiyum miyofibriller tarafından yeterince kullanılamaz. Çeşitli inotropik ajanlarda bu kalsiyum düzeyinin arttırılması ise kontraktile artışında çok kalsiyum yüklenmesi ve doku hasarına yolaçabilir (11). Bu nedenle teorik olarak miyokardiyal kontraktıl yapının kalsiyuma duyarlılığının arttırılması ideal bir terapötik yaklaşım gibi görünmektedir. Levosimendanın kalsiyum içe akım artışına yol açmadan kontraktıl proteinlerin kalsiyuma duyarlılığını arttırarak etki gösterdiği kanıtlanmıştır (12).

Rump ve ark. saf fosfodiesteraz inhibitörü amrinon ve milrinone ile bu etkiye ek olarak kalsiyuma duyarlılığı arttırıcı özelliği olan levosimendanın fonksiyonel ve antiiskemik özelliklerini izole tavşan kalplerinde araştırmışlardır (13). Bu çalışmada sirkumfleks koroner arterin posterolateral dalı bağlanarak akut miyokardiyal iskemi oluşturulmuş ve epikardiyal NADH-floresan fotoğraf tekniği iskemi ile düzeyi ölçülmüştür. Koroner oklüzyonda 30 dk sonra milrinon veya levosimendan uygulanarak değerler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda miyokardiyal iskemi düzeyi değişmemesine karşın milrinon ve levosimendan epikardiyal NADH-floresans alanını belirgin ölçüde azaltmışlardır. Miyokard

iskemisini azaltmada milrinon ve levosimendan arasından arasında ise fark bulunmamıştır.

Müller ve ark. Domuz yavrularında yaptıkları bir çalışmada 10 gün oral levosimendan uygulaması sonrasında ön inen koroner arteri bağlayarak iskemi oluşturmuşlar ve ardından IV levosimendan vermişlerdir (14). Radyoaktif mikrosferler ile yaptıkları incelemede levosimendanın iskemik ve noniskemik zona kan akımını plaseboya oranla belirgin olarak arttırdığını göstermişlerdir. Siklik GMP benzeri etki ile levosimendanın sol ventrikül kan akımını arttırdığını ve aynı zamanda aritmojenik etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

Levosimendanın global iskemi sonrası etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmada 5 dk St. Thomas Hastanesi Kardiyoplejik solüsyonu ile kalp durdurulmuş ve 30 dk normotermik global miyokard iskemisi oluşturulmuştur. Ardından kalpler, Krebs-Henseleit solüsyonuyla 10 dk süreyle perfüze edildikten sonra levosimendan ve amrinon için doz-cevap eğrileri çıkartılmıştır. Deneysel sol ventrikül fonksiyon parametreleri olarak kontraktile,  $+dx/dt_{max}$ ,  $-dx/dt_{min}$ , kalp atım hızı ve koroner sinüs akımı ölçülmüştür. Ayrıca elektrogram izlenmesi ile ilaçların aritmojenik etkileri araştırılmıştır. Levosimendan ve amrinonun tüm kullanılan konsantrasyonlarda koroner akım, kalp atım hızı ve elektrogramda herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür.

Levosimendan grubunda iskemi öncesi doz cevap eğrisinde yüksek konsantrasyonlarda kalbin atım hızında bir artış görülse de bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Reperfüzyon döneminde her iki grupta da kasılma değerleri preiskemik değerlerden daha kötü bulunmuştur. Ancak levosimendan daha yüksek  $+dx/dt_{max}$  değerlerine ulaşmıştır ve fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0.004$ ). Kasılma değerleri levosimendan grubunda daha yüksek olmasına karşın fark istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır ( $p=0.359$ ). Bu bulgularla levosimendanın amrinondan daha iyi inotropik bir ajan olduğu düşünülmektedir.

Bulgularımız arasında bizce en önemlisi levosimendan grubunda gevşemenin (dx/dt<sub>min</sub>)'de artmış olduğunun bulunmasıdır. Amrinon ve milrinon diyastolde relaksasyonu geciktirirler ve bu yan etki fosfodiesteraz III inhibitörlerinin uzun süreli kullanımını kısıtlar (15). Ancak levosimendanın direkt intrasellüler mekanizmalarla pozitif lusidotropik (relaxation) etkisi gösterilmiştir. Bu etkinin mekanizmaları arasında protein kinaz ile indüklenen troponin C'den Ca<sup>++</sup> ayrılmasının hızlandırılması ve troponin I yoluyla sarkoplazmik retiküler Ca<sup>++</sup>-ATP fonksiyonunun arttırılması öne sürülmüştür (15). Bulgularımız da bu bilgileri destekler niteliktedir.

Gönüllü insanlar (16) ve akut kalp yetersizlikli hastalarda (17) yapılan ön klinik çalışmalarda levosimendanın pozitif inotropik ve vazodilatatör etkileri görülmüş ve tekapötik dozlarda yan etki gözlenmemiştir. Halihazırda ilacın fosfodiesteraz III inhibitörleri ve dobutamin ile karşılaştırmalı klinik ön çalışmaları süregelmektedir. Kanımızca levosimendan kalp cerrahisi sonrasında görülen pompa yetersizliğinde kalsiyum birikimine yol açmadan sağladığı pozitif inotropik ve vazodilatatör etkileri ile geniş kullanım alanı bulacaktır.

## Kaynaklar

1. Katz AM: Changing strategies in the management of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:513-23.
2. Böhm M, Morano I, Pieske B, Rüegg JC, Wankler M, Zimmermann R, et al: Contribution of cAMP-phosphoesterase inhibition and sensitization of the contractile proteins for calcium to the inotropic effect of pimobendan in the failing human myocardium. *Circ Res* 1991; 68:689-701.
3. Van Meel JCA, Zimmermann R, Diederens W, Erdman E, Mrwa U: Increase in calcium sensitivity of cardiac myofibrils contributes to the cardiotoxic action of sulmazole. *Biochem Pharmacol* 1988; 37:213,20.
4. Hajjar RJ, Gwathmey JK: Calcium-sensitizing inotropic agents in the treatment of heart failure: A critical view. *Cardiovasc Drug Ther* 1991; 5:961-66.
5. Haikala H, Nissinen E, Etemadzadeh E, Linden IB,

Podda P: Levosimendan increases calcium sensitivity without enhancing myosin ATPase activity and impairing relaxation. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24 (Suppl V): 97-105.

6. Stover DF, Benjak ZJ, Kampine JP: Comparison of etomidate, ketamine, midazolam, propofol, and thiopental on function and metabolism of isolated hearts. *Anesth Analg* 1992; 4:547-58.
7. Leyen V Der H, Schmitz W, Scholz H, Scholz J: New positive inotropic agents acting by phosphodiesterase inhibition or alpha 1-adrenergic stimulation. *Pharmacol Res* 1989; 21:329-37.
8. Lee KF, Winchler AS: Cardiogenic shock secondary to myocardial infarction. *Base AE; Glenn's thoracic and cardiovascular surgery*. New Jersey, Prentice-Hall International Inc 1996; p.2103-2113.
9. Rump AFE, Blazincic, Klaus W: Effect of amrinone and milrinone on myocardial ischemia extent and infarct size in isolated rabbit hearts. *Drug Res* 1993; 43:1262-66.
10. Herzog JW, Quast U: On the role of Ca binding proteins as possible target for Ca sensitizing agents. *Z Kardiol* 1992; 81:49-55.
11. Rüegg CR, Barth Z, Arret A: Determinants of the calcium sensitivity of the contractile proteins: Basic concepts. In: *Novel approaches in the treatment of the failing heart. Abstract Book, 1995*; p.4-5.
12. Pollesella F, Ovaska M, Kairola J, Tilgman C, Lundström K, Kalkkinen N, et al: Binding of a new Ca sensitizer, levosimendan, to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modeling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study. *J Biol Chem* 1994; 269:28564-90.
13. Rump AFE, Acar D, Klaus W: A quantitative comparison of functional and anti-ischemic effects of phosphodiesterase-inhibitors, amrinone, milrinone and levosimendan in rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol* 1994; 112:757-62.
14. Müller CA, Opie LH, Hofmann D, McCarthy J: Effect of levosimendan in a pig model of ischemia and reperfusion. In: *Novel approaches in the treatment of the failing heart. Abstract Book, 1995*; p.10-11.
15. Pagel PS, Harkin CP, Hettrick MS, Warner DC: Levosimendan (DR-1259), a myofilament calcium sensitizer, enhances myocardial contractility but does not alter isovolumic relaxation in conscious and anesthetized dogs. *Anesthesiology* 1994; 81:974-87.
16. Lilleberg J, Sundberg S, Hayha M, Akkila J, Nieminen MS: Haemodynamic dose-efficacy of levosimendan in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1994; 47:267-74.
17. Luomanmaki K, Jousela I, Lehtonen L, Nieminen MS, Takkanen O, Puhkurinen K: Efficacy of levosimendan in the treatment of acute heart failure. In: *Novel approaches in the treatment of the failing heart. Abstract Book, 1995*; 20-21.