

**Különböző transzmembrán ionáramok elektrofiziológiai tulajdonságai és farmakológiai modulálása emlősszívokban**

**PhD értekezés tézisei**

**Geramipour Amir Mohammad**

**Témavezető:  
Dr. Jost Norbert**



**Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar**

**Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

**SZTE Multidiszciplináris Doktori Iskola**

**Szeged**

**2017**

## 1. A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk listája

### Tudományos dolgozatok

- I. Szűts V, Ménesi Z, Varga-Orvos Z, Zvara A, Houshmand N, Bitay M, Bogáts G, Virág L, Baczkó I, Szalontai B, **Geramipour A**, Cotella D, Wettwer E, Ravens U, Deák F, Puskás LG, Papp, JG, Kiss I, Varró A, Jost N. Altered expression of genes for Kir ion channels in dilated cardiomyopathy.  
*Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(8), 648-656, 2013.  
Impact faktor (2013): 1.546 Független idézetek száma: 10
- II. **Geramipour A**, Kohajda Zs, Corici C, Prorok J, Szakonyi Zs, Oravecz K, Márton Z, Nagy N, Tóth A, Acsai K, Virág L, Varró A, Jost N. The investigation of the cellular electrophysiological and antiarrhythmic effects of a novel selective sodium-calcium exchanger inhibitor GYKB-6635 in canine and guinea pig hearts.  
*Canadian Journal Physiology and Pharmacology*, 94(10), 1090-1101, 2016.  
Impakt factor (2015): 1.704

### Megjelent előadáskivonatok

- III. **Geramipour A**, Kohajda Z, Oravecz K, Márton Z, Nagy N, Acsai K, Gruber A, Szepesi J, Kormos A, Tóth A, Prorok J, Virág L, Kiss L, Fülöp F, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Varró A, Jost N. Comparison of the effect of several, newly synthesized sodium-calcium exchanger (NCX) blockers in mammalian hearts.  
*(“Absztrakt könyv és végleges program”- 2<sup>nd</sup> European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences, 8-10 October, 2015, Belgrade, Serbia; eds. D. Djuric and V. Jakovlevic, Kragujevac Family Press, ISBN: 978-86-904799-9-6)*

- IV. **Geramipour A**, Kohajda Z, , Prorok J, Szakonyi Zs, Oravec K, Márton Z, Nagy N, Tóth A Acsai K, Virág L, Varró A, Jost N. Comparison of the effect of several, newly synthesized The comparison of the effect of several carbocyclic nucleoside analogues as novel selective NCX inhibitors in mammalian hearts.

*(“Absztrakt könyv és végleges program” - Pharmacology 2017, Annual Meeting of the British Pharmacological Society Meeting, 13-15 December, 2016, London, UK)*

#### **Egyéb az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények**

Kohajda Zs. Farkas-Morvay N, Jost N, Nagy N, **Geramipour A**, Horváth A, Varga RS, Hornyik T, Corici C, Acsai K, Horváth B, Prorok J, Ördög B, Déri Sz, Tóth D, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Baczkó I, Leprán I, Nánási PP, Papp JGy, Varró A, Virág L. The effect of a novel highly selective inhibitor of the sodium/calcium exchanger (NCX) on cardiac arrhythmias in *in vitro* and *in vivo* experiments.

PLoS One, 11(11): e0166041. doi: 10.1371/journal.pone.0166041, 2016.

Impakt factor (2015): 3.057

## 2. Absztrakt

A kardiovaszkuláris megbetegedések és azon belül is az olyan szívritmuszavarok, mint a kamrafibrilláció vezető halálokok közé tartoznak a fejlett országokban. A gyógyszeres kezelés hagyományosan egy jellemző kezelési forma mint a kamrai mint a pitvari szívritmuszavarokban. Annak ellenére, hogy jelentős fejlődésen estek át kardiológiai ismereteink tárháza, a szívritmuszavarok kezelésére használt gyógyszereink hatásmechanizmusának tökéletlen ismeretének hiánya miatt a szívritmuszavarok farmakológiai terápiája még ma is inkább csak empirikus. Mindez azt jelenti, hogy az új proaritmia-mentes antiaritmias gyógyszerek fejlesztése nem lehetséges anélkül, hogy megértsük a ritmuszavarok szervi-, szöveti- celluláris sőt szubcelluláris szintű mechanizmusát. Ennek megfelelően a jelen PhD értekezés célja a különböző repolarizáló kálium és a nátrium-kalcium cseremechanizmus áramoknak a ritmuszavarokban játszott kóréletani és farmakológiai jellegű vizsgálata

A főbb célok a következők voltak:

- a) A Kir2.x csatornák különböző kiegészítő fehérjéinek vizsgálata és szerepe dilatatív kardiomiopátiában (DCM).
- b) Számos új fejlesztésű NCX gátló vizsgálata emlőszívekben. Továbbfejlesztésre javasolt "lead" vegyület kiválasztása.
- c) Az új fejlesztésű szelektív NCX gátló GYKB-6635 antiaritmias hatású vegyület celluláris elektrofiziológiai vizsgálata a különböző -áramokra és a triggerelt aritmiákra.

Eredményeink alapján a következő következtetéseket vontuk le:

- 1) Az endogén Kir2.x csatornák a SAP97 kiegészítő csatornával társulva alakítja ki a befelé haladó egyenirányító káliumcsatornát. Dilatatív kardiomiopátiában a különböző alegységek eltérő módon változnak meg. Ez a változások felelnek a betegségben észlelt eltérő molekuláris szerkezetekért. A SAP97 és a Kir2.x új gyógyszer-támadás-pontok lehetnek DCM-ben.
- 2) Számos olyan új fejlesztésű karbociklusos nukleozid analógok (CNA) molekuláról igazoltuk, hogy az NCX szelektív gátlói, amelyeknek szerkezete eltérő az eddig ismert blokkoló vegyületektől.

3) A GYKB-6635 az első olyan vegyület, amely hatékonyan gátolja a *reverz* és *forward* NCX áramot szubmikromoláris koncentráció tartományban. Igazoltuk, hogy a vegyület gátlóhatása szelektív, ugyanis nem befolyásolta sem a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisért felelős egyéb áramokat és mechanizmusokat, sem a repolarizációért felelős egyéb káliumáramokat. A GYKB-6635 Langendorff perfundált tengerimalac kísérletekben hatékonyan kivédte az ouabain indukálta DAD típusú triggerelt aritmiákat. A vegyület alkalmas olyan kísérletek elvégzésre, amely segítségével vizsgálhatjuk az NCX áramnak a ritmuszavarokban játszott szerepének tisztázását.

### 3. Bevezetés

A szívritmuszavar népegészségügyi probléma. A kardiális morbiditás és mortalitás szempontjából a szívritmuszavar leggyakoribb formái a pitvarfibrilláció és a kamrai tachykardia/kamrafibrilláció. A szívritmuszavar a normál szív működés során az elektromos impulzusban bekövetkező változások összességére vonatkozik. Munkám során a szívritmuszavart kiváltó ioncsatorna aktivációt és gátlást, valamint az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintet vizsgáltuk.

A hirtelen szívhalál (SCD) sokszor sajnos első észlelt szimptóma egy szívritmuszavar típusú szívbetegség esetében. Ezért a szívritmuszavarok vizsgálata rendkívül fontos kutatási terület. A farmakológiai kutatások kiemelt célja olyan biztonságos és hatékony antiaritmiás szerek kifejlesztése, amelyek egyaránt biztonságosan alkalmazhatók akut és posztinfarktusos betegekben is.

A dilatatív kardiomiopátia (DCM) egy olyan súlyos betegség amely balkamrai megvastagodással és szisztolés diszfunkcióval jár. DCM jellegzetesen progresszív szívelégtelenséggel és korai halállal járhat. DCM esetében az akciós potenciál időtartam megnyúlik, és számos elektrofiziológiai paraméter (például a nyugalmi potenciál) megváltozik. A befelé egyenirányító káliumáram ( $I_{K1}$ ) egy jelentős repolarizáló káliumáram, amely elsősorban a nyugalmi potenciál biztosításért felelős. Mivel utóbbi DCM-ben jelentősen megváltozik, feltétlenül javasolt az  $I_{K1}$  áramért felelős csatorna összetevők vizsgálata, annak érdekében, hogy megismerjük melyik összetevő remodellingje felelős a DCM-ben tapasztalt változásokért. Ennek megismerése fontos terápiás szempontból is, ugyanis ennek segítségével új farmakológiai gyógyszerátadási-pontok megismerése lehetséges.

Szívizomsejtekben a Na/Ca csereáram – NCX, a  $\text{Ca}^{2+}$ - homeosztázis egyik fő szabályzó transzportere. *Forward* és *reverz* módban is képes működni a mindenkori Ca, Na koncentrációk ill. membránpotenciál függvényében. *Reverz* módban a Na-t, *forward* módban a  $\text{Ca}^{2+}$  iont távolítja el a sejtől. A transzporter működése elektrogén, mivel 1  $\text{Ca}^{2+}$  szállítása mellett 3  $\text{Na}^{+}$  szállít ellentétes térbe, így *forward* módban a  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítása útján a sejtbe bekerülő, Na *inward* áramot hoz létre, így depolarizálja a szívizomsejteket, ez korai és késői utodepolarizációt (EAD és EAD) hozhat létre. Így felmerült, hogy esetleges NCX gátlók antiaritmiás hatásúak lehetnek. Az eddig ismert NCX gátlók, SEA0400 és KB-R7943 bizonyos esetekben antiaritmiás hatásúaknak bizonyultak, azonban az NCX gátlás mellett,

hasonló koncentrációban a  $\text{Ca}^{2+}$ - csatornát is gátolják – így lényegében még nem ismert olyan szelektív NCX gátló, amellyel vizsgálható lenne, hogy az NCX gátlás önmagában antiaritmiás hatású-e. Ennek megfelelően célunk egy olyan eltérő szerkezetű NCX gátló molekula kifejlesztése és vizsgálata volt, amely szelektíven és hatékonyan gátolja az NCX áramot. Ennek megfelelően célul tűztük ki egy karbociklusos nukleozid vegyület szintézisét, és vizsgálatát emlősszíveken.

#### 4. Vizsgálataink célja

Fentiek alapján a PhD értekezésemben bemutatott kísérletes munkának a következő volt a célja: *i)* megvizsgálni miképpen változtatja meg (remodelling) egy ismert szívbetegség, a dilatatív kardiomiopátia a kamrai repolarizációt; *ii)* a szívritmuszavarok farmakológia módosítása új gyógyszertámadás-pontok beazonosítása révén. Ennek megfelelően a specifikus célok a következők voltak:

- a) A Kir2.x csatornák különböző kiegészítő fehérjéinek vizsgálata és szerepe dilatatív kardiomiopátiában (DCM).
- b) Számos új fejlesztésű NCX gátló vizsgálata emlősszívekben. Továbbfejlesztésre javasolt “lead” vegyület kiválasztása.
- c) Az új fejlesztésű szelektív NCX gátló GYKB-6635 antiaritmiás hatású vegyület celluláris elektrofiziológiai vizsgálata a különböző -áramokra és a triggerelt aritmiákra.

#### 5. Módszerek

A kísérleteket kutya, nyúl, tengerimalac és egészséges emberi donor szívekből származó kamrai preparátumokon (papilláris izomnyesedék, ill. szívizomsejt) végeztük. Kezeletlen felnőtt 8-20 kg súlyú keverék kutyákat, 1.5-2 kg súlyú Új Zélandi házinyulakat, illetve 300-500 g súlyú tengerimalacokat használtunk. A kísérleti eljárást a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérletes Bizottsága (MÁB) előzetes engedélye alapján a Csongrád Megyei Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte (XIII./1211/2012). A kísérlethez szükséges humán szívizom preparátumokat aortabillentyű beültetéshez használt egészséges emberi donorszívek nyesedékéből szereztük. A szív kivétele előtt a szervdonor furoszemid, dobutamin és plazma kivételével nem részesült

más gyógyszerkezelésben. A kísérleti eljárás megfelel az Orvosi Világszövetség Helsinki Nyilatkozatának előírásaival, és rendelkezik a Szegedi Tudományegyetem és az Egészségügyi Tudományos Tanács Orvostikai Bizottságának engedélyével (51-57/1997 OEj; ill. 4991-0/2010-1018EKU (339/PI/010.)).

Az *in vitro* elektrofiziológiai kísérleteket (standard mikroelektróda és patch-clamp kísérletek kutya és emberi izolált szívizomsejteken készültek. A Langendorff szerint perfundált aritmia vizsgálatok pedig tengerimalac szíveken készültek. Humán Kir2.x fehérje, mRNS és immunfluorescens vizsgálatok molekuláris kardiológiai (Western-blot és qPCR technikák, illetve konfokális mikroszkópia).

## 6. Eredmények összefoglalása és jelentősége

Kísérletes munkánk alapján a következő következtetéseket vontuk le, amelyeket új eredményként emelünk ki:

- 1) Az endogén Kir2.x csatornák a SAP97 kiegészítő csatornával társulva alakítja ki a befelé haladó egyenirányító káliumcsatornát. Dilatatív kardiomiopátiában a különböző alegységek eltérő módon változnak meg. Ez a változások felelnek a betegségben észlelt eltérő molekuláris szerkezetekért. A SAP97 és a Kir2.x új gyógyszertámadás-pontok lehetnek DCM-ben.
- 2) Számos olyan új fejlesztésű karbociklusos nukleozid analógok (CNA) molekuláról igazoltuk, hogy az NCX szelektív gátlói, amelyeknek szerkezete eltérő az eddig ismert blokkoló vegyületektől.
- 3) A GYKB-6635 az első olyan vegyület, amely hatékonyan gátolja a reverz és forward NCX áramot szubmikromoláris koncentráció tartományban. Igazoltuk, hogy a vegyület gátlóhatása szelektív, ugyanis nem befolyásolta sem a  $Ca^{2+}$ -homeosztázisért felelős egyéb áramokat és mechanizmusokat, sem a repolarizációért felelős egyéb káliumáramokat. A GYKB-6635 Langendorff perfundált tengerimalac kísérletekben hatékonyan kivédte az ouabain indukálta DAD típusú triggerelt aritmiákat.
- 4) Mindez úgy foglалható össze, hogy a GYK-6635, egy olyan új fejlesztésű karbociklusos nukleozid vegyület, amely alkalmas olyan kísérletek elvégzésre, amely segítségével *in vitro* és *in vivo* is vizsgálhatjuk az NCX áramnak a ritmuszavarokban játszott szerepének tisztázását.



## 6. Köszönetnyilvánítás

Nagy köszönettel tartozom **Prof. Dr. Papp Gyula** akadémikus Úrnak, aki hasznos tanácsaival, motivációjával folyamatosan támogatta a kutatómunkámat és dolgozatom elkészítésében is segítséget nyújtott. Köszönöm **Prof. Dr. Varró András** intézetvetőnknek, hogy lehetővé tette a PhD munkám elkészítését a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben és, hogy támogatásával sok hazai és külföldi konferencián részt vehettem.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Jost Norbertnek**, mind a tudományos és az életben szükséges hasznos tanácsiért, folyamatos támogatásáért, valamint, hogy felkeltette az érdeklődésemet a szívelektrofiziológia iránt.

Köszönetemet fejezem ki **Prof Fülöp Ferenc** tanszékvezető egyetemi tanár úrná és kollegáinak (SZTE GYTK Gyógyszerkémiai Intézet) a GYKB vegyületek szintézisében nyújtott segítségért:

Külön köszönet illeti **Dr. Corici Claudia** és **Kohajda Zsófia** kollegáimat, nélkülözhetetlen tanácsaiért és segítőkészségéért és a jó hangulatban eltöltött munkanapokért.

Szeretném megköszönni senior kollegáim (**Dr. Virág László** és **Dr. Tóth András** tudományos főmunkatárs urak) illetve fiatalabb kollegáim (**Dr. Acsai Károly Horváth András**, **Dr. Nagy Norbert**, **Oravecz Kinga** and **Dr. Prorok János** PhD hallgatók *ill.* posztdoktorális kutatók) folyamatos támogatását, ahogy csodálatos laboratóriumi környezetet biztosítottak. Köszönöm Molnárné Zsuzsa és Girst Gábor technikai segítségét.

Szeretném megköszönni **családomnak, szüleimnek** a támogatását, akiknek ajánlom a jelen PhD értekezést.

Jelen értekezéshez készült tudományos munka, az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA NK-104331, NN-109904 and ANN-113273), a Nemzeti Kutatási és Innovációs Hivatal (K-119992, GINOP-2.3.2-15-2016-00006 and GINOP-2.3.2-15-2016-00012), Nemzeti Kutatás Technológiai Hivatal Baross és Jedlik Ányos Programja (REG-DA-09-2-2009-0115-NCXINHIB és NKFP\_07\_01-RYT07\_AF), a HU-RO Határon Átnyúló Együtműködési Programok (HURO/1001/086/2.2.1\_HURO-TWIN) és a Magyar Tudományos Akadémia támogatásával készült.