

**Az intracelluláris kalcium túltelítődés kivédése
az NCX gátlásával**

PhD Értekezés

Szepesi Judit, Msc

**Farmakológiai és Farmakoterápiail Intézet,
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem
Szeged**



Szeged

2015

A TÉZIS RELEVÁNS KÖZLEMÉNYEI

I. Szepesi J, Acsai K, Sebok Z, Prorok J, Pollesello P, Levijoki J, Papp JG, Varro A, Toth A
Comparison of the efficiency of Na⁺/Ca²⁺ exchanger or Na⁺/H⁺ exchanger inhibition and their combination in reducing coronary reperfusion-induced arrhythmias
JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 66:(2) pp. 215226. (2015)
IF: 2.720

II. Nagy N, Kormos A, Kohajda Z, Szebeni A, Szepesi J, Pollesello P, Levijoki J, Acsai K, Virag L, Nanasi PP, Papp JGy, Varro A, Toth A
Selective Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition prevents Ca²⁺ overload induced triggered arrhythmias.
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 171:pp.5665-5681(2014)
IF.: 4,99

Konferencia előadások

Szepesi J, Sebők Zs, Tóth A
Effect of NCX and NHE inhibition on the development and duration of postischemic arrhythmias (NCX és NHEgátlás hatása posztisztkémias aritmiák kialakulására és időtartamára)
CARDIOLOGIA HUNGARICA 42:(Suppl.A) p. A37. (2012)

Szepesi J
The effect of combined NCX1 and NHE1 blockade in acute ischemia/reperfusion injury in rat
SEMINAR FOR YOUNG RESEARCHERS The physiology, pathophysiology and pharmacology of the cardiovascular system (2012)

Absztraktok

Szepesi J
The effect of NCX and NHE inhibition on the development and duration of post-ischemic arrhythmias

- *Sudden Cardiac Death & Cardioprotection conference and advanced workshop* (2012)
- *EHRA EUROPACE 2013 –The meeting of the european heart rhythm association* (2013)

BEVEZETÉS

A szív- és érrendszeri betegségek világszerte a halálozási listák élén állnak. A szívelégtelenség és az aritmiák a legsúlyosabb okok, amelyek halálhoz vezethetnek. A szívelégtelenség okai többek között az iszkémiás érelzáródás, miokardiális infarktus, krónikus hipertenzió és a szívbillentyűhibák. A reperfúziós terápiák széles körben alkalmazott beavatkozások az akut miokardiális infarktus (AMI) kezelésére. Habár, a vér áramlás visszaállítása az iszkémiás szívizomban úgynevezett iszkémia/reperfúziós (IR)-sérülést eredményez. Jelenleg egyre több a bizonyíték arra, hogy az IR sérülésben fontos szerepe van a hipekontraktúra- indukálta calcium túltelítődésnek vagy az alacsony ATP szintnek. Iszkémia utáni reperfúzióban a szívben letális aritmiák alakulhatnak ki. Emberben a leggyakoribb reperfúziós aritmia egy gyorsuló idioventrikuláris ritmus. Habár, a hirtelen szívhalál legfontosabb oka a kamrai tachycardia és a kamrafibrilláció.

Az intracelluláris ion háztartásban (beleértve a $[Na^+]_i$, $[K^+]_i$, $[H^+]_i$, $[Ca^{2+}]_i$ változásait) bekövetkező zavaroknak döntő szerepe van a halálhoz vezető aritmiák kialakulásában és előrehaladásában. Ezeket a változásokat számos tanulmányban bizonyították. Ezen aritmiák prognózisa nagyon csekély és magas a halálozási aránya. Mind az iszkémia-indukálta szöveti sérülések, mind a posztisztkémiás aritmiák kialakulásában a megnövekedett NCX aktivitásnak nagy szerepe van, így az NCX gátlás jótékony hatással lehet ezen kórélettani állapotok javításában.

Intracelluláris kalcium homeosztázis és az elektro-kontrakciós kapcsolás

A kalcium egyike a legfontosabb és legsokoldalúbb molekuláknak a sejtbiológiai folyamatokban. A kalciumion (Ca^{2+}) a jelátviteli folyamatok egyik leggyakoribb másodlagos hírvivője. Több hasonló ion vesz részt a szív bonyolult működésének szabályozásában, amelyek közül a kalciumot tartják talán a legfontosabbnak. A Ca^{2+} elengedhetetlen ahhoz a folyamathoz, hogy a szív üregei kontrahálni és relaxálni tudjanak, ezt nevezzük elektro-kontrakciós kapcsolásnak. Ezt a szabályozást fontos megérteni, hogy tudjuk, hogyan mozog a kalcium a szívizomsejtek sejtalkotóiban. A szívbetegségekben ez a csatolás valamilyen módon megváltozik, miáltal egy kóros állapot alakul ki, mint például az aritmia és a szívelégtelenség, ami akár hirtelen szívhalálhoz is vezethet.

Az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) ciklikus változásának kulcsszerepe van a szív működésben. A szívizomsejtekben a kalcium szabályozás az alapja, mind a kontrakció-relaxáció, mind a depolarizáció és repolarizáció folyamatainak. A membrán-depolarizáció hatására megnyílnak a szarkolemma T-tubulusain nagy sűrűségben jelenlévő L-típusú Ca^{2+} -csatornák, és egy befelé irányuló (inward) Ca^{2+} áramot (I_{Ca}) hoznak létre. A befelé áramló Ca^{2+} aktiválja a szarkoplazmás retikulum (SR) T-tubulus közeli részein (junkcionális SR) elhelyezkedő rianodin receptorait (RyR), melyeken keresztül az SR-raktárakból nagy mennyiségben jut Ca^{2+} a szarkoplazmába. Ezt nevezzük Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulásnak – angol nevén alapuló általános rövidítése: CICR (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release).

Ezzel egy időben a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus (NCX) egy rövid ideig szintén kalciumot juttat a sejtbe. Az NCX-nek ezt a működését nevezzük reverz módnak (Ca^{2+} -influx, Na^+ -efflux). A citoplazmába kerülő Ca^{2+} jelentős része a miofilamentumok troponin C Ca^{2+} -kötő helyeihez kapcsolódik, és aktiválja a miozin kötéseket, létrehozva a kontrakciót. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint emelkedésével aktiválódnak a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok. A szarkoplazmás retikulum Ca^{2+} -ATP-áza (SERCA) az SR lumenébe juttatja vissza a Ca^{2+} -t, ezen kívül az NCX forward módban (Ca^{2+} -efflux, Na^+ -influx) 3 Ca^{2+} -t juttat az extracelluláris térbe 1 Na^+ ellenében, ezáltal kulcsfontosságú a szívizom relaxációjában. A kalcium eltávolításhoz kis mértékben a sejtmembrán Ca -ATP pumpája és a mitokondriális kalcium csatorna is hozzájárul. Eközben a Ca^{2+} lediffundál a troponinról, és az aktin-miozin komplex újra inaktivált állapotba kerül, ezáltal létrejön a relaxáció.

Az NCX felépítése és funkciója

A szívben található NCX1 970 aminosavból épül fel 110 kDa molekulatömeeggel. A legújabb ismereteink szerint a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 9 transzmembrán hélixből áll, 5 az NH_2 terminális részen, 4 pedig a COOH terminális részen helyezkedik el. Az N-terminális rész extracellulárisan helyezkedik el, míg a hidrofób C terminális rész a citoplazmában van. Az 5. és 6. transzmembrán hélix között található egy hosszú hidrofób hurok a citoplazmában (f-loop), amely 550 aminosavat tartalmaz. Ez a rész a felelős az NCX aktivitás szabályozásáért, transzportmechanizmusokon és másodlagos messengereken keresztül, amely lehet: Ca^{2+} , Na^+ , PIP_2 , PKA, PKC, NO, ATP, CaMKII és phospho-arginine, és ebben a régióban található a Ca^{2+} -kötő hely is.

Szívizomsejtekben a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger legfontosabb szerepe a Ca^{2+} homeosztázis szabályozása, és jelentős mértékben hozzájárul a Ca^{2+} szint szabályozásához az excitációs-kontrakciós mechanizmus alatt. Az NCX fő funkciója a szívben a Ca^{2+} felszabadítása a citoplazmából a diasztolé és relaxáció alatt. A felszabaduló Ca^{2+} váltja ki a Ca^{2+} ciklust az L-type Ca^{2+} csatornán keresztül, amely áram az akciós potenciál kezdetekor jellemzi a sejtet. Az akciós potenciál ezen fázisában az NCX hozzájárul a Ca^{2+} sejtbe való, mivel a membrán potenciál pozitív és az intracelluláris Ca^{2+} szint alacsony. Azonban amikor az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedik a Ca^{2+} -indukálta Ca^{2+} felszabadulás hatására a szarkoplazmatikus retikulumból, az NCX forward módra vált át. Ezáltal hozzájárul a Ca^{2+} eltávolításához a sejtből.

Intracelluláris pH szabályozás a szívizomsejtekben

A szívizomsejtek összetett rendszerrel rendelkeznek a pH_i szabályozására, amely bármilyen ingadozásra percekben belül reagál. A pH_i helyreállítása a szarkolemmális ion transzporterek szabályozása alatt áll, amelyek H^+ , OH^- vagy HCO_3^- ionokat szállítanak a membránon keresztül. Legalább 5 funkcionális H^+ ion transzportert azonosítottak emlős szívizomsejtekben. A Na^+/H^+ exchanger (NHE) és a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotranszporter (NBC) közvetíti a sav kipumpálását, míg a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (CBE) és a Cl^-/OH^- exchange (CHE) közvetíti a sav beáramlását. A laktát- H^+

cotranszporter (monocarboxylate transporter, MCT) efflux vagy influx módban is képes működni, az adott körülményektől függően. Normál fiziológiás pH mellett mind a 4 transzporter aktivitása alacsony. Amikor az intracelluláris pH megnő, a CBE és CHE aktiválódik és ez által visszaállítják az pH_i - t a megfelelő értékre. Amikor az intracelluláris pH csökken, az NHE és NBC aktiválódik.

Intracelluláris calcium és nátrium szerepe az iszkémia/reperfúziós károsodásban

Miokardiális iszkémia akkor jelentkezik, amikor a szív szöveteinek energia igénye nem elegendő. Az iszkémiás sejtkárosodások elsődleges oka az oxigén és a tápanyag ellátás megszakadása miatt kialakuló intracelluláris acidózishoz vezető anaerob shift, illetve a jelentősen csökkent ATP szintézis következtében kialakuló ATP depléció. A felszaporodó anyagcseretermékek, pl. H^+ ionok, laktát ionok felhalmozódása, és az ion transzport súlyos zavarai következtében funkciózavar, szöveti elhalás, illetve aritmiák alakulhatnak ki.

Normoxiás körülmények között a depolarizáció alatt a szívizomsejtekbe belépő viszonylag kevés Na^+ iont elsősorban a Na^+/K^+ ATP-áz távolítja el. Iszkémiában a kialakuló acidózis során folyamatosan emelkedő H^+ koncentráció következtében az egyébként gyakorlatilag inaktív Na^+/H^+ kicserélő aktivitása jelentősen megnő és mivel a csökkent ATP ellátás miatt ezt a Na^+ -ot a Na^+/K^+ ATPáz nem tudja eltávolítani, az intracelluláris Na^+ szint is folyamatosan emelkedik. A magas intracelluláris $[Na^+]$ következtében aktiválódik a Na^+/Ca^{2+} kicserélő reverz transzportmódja, és a belső Na^+ egy részét eltávolítva jelentősen megemeli az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -t.

A reperfúzió korai fázisában mindezek a folyamatok tovább fokozódnak. A NHE aktivitása tovább fokozódik és a kialakuló intracelluláris Na^+ túltelítődés következtében ugyancsak tovább gyorsuló reverz NCX aktivitás az intracelluláris Ca^{2+} szint további jelentős növekedéséhez, azaz Ca^{2+} túltelítődéshez vezet, amely az egyik legkritikusabb tényező a hirtelen szívhalálhoz vezető posztiszkémiás aritmiák kialakulásában.

NCX farmakológiája

A hatékony és szelektív NCX gátlók rendkívül hasznosak lehetnek az NCX pontos működésének megértésében. Egészen a közelmúltig, ez a lehetőség korlátozott volt a hatékony és specifikus inhibitorok hiányában.

Az NCX mindkét irányban szállít ionokat, ezért erre specifikus NCX gátlók komoly terápiás lehetőséget nyújtanának. Például, ha a reverz NCX gátlásával blokkolnánk a Ca^{2+} beáramlást, csökkenteni tudnánk a Ca^{2+} túltelítődést és ez által az iszkémia/reperfúziós károsodást a szívben és egyéb szövetekben.

Az NCX aktivitást gátló, pl. kétértékű és háromértékű kationok (La^{3+} , Ni^{2+} , and Cd^{2+}) és különböző komponensek- amiloride származékok (pl. dichlorobenzamil) vagy a szubsztituált pyrolidine ethanamine (pl. bepridil) - régóta ismertek. Ezek a kationok és szerves vegyületek más ion csatornákra és/vagy transzporterekre is kifejtik hatásukat, ami limitálja a specifikus blokkolóként való

használatukat. Manapság, a két legszelektívebb és széles körben használt NCX inhibitor az irodalomban, a SEA0400 és a KB-R7943. Meglepő módon a KB-R7943 preferenciálisan az NCX reverz módjára fejt ki hatását.

A SEA0400 kísérleti eredmények szerint 100-szor hatékonyabb a KB-R7943-nál. Néhány szintetikus peptid is hatékony NCX inhibitornak bizonyult. A XIP peptid, amely az NCX1 primer szekvenciájából származtatott, csökkenti az NCX aktivitását. A XIP peptidnek kis hatása van a Na^+/K^+ -ATPázra, SR Ca^{2+} -ATPázra, vagy az L-type Ca^{2+} áramokra is.

Iwamoto és mtsai. egy új karakterisztikájú NCX inhibitorról számoltak be. Az SN-6, a KB-R7943 származéka és úgy tűnik a SEA0400-hoz hasonlóan a Na^+ függő inaktivációt gyorsítja fel, ezáltal az NCX reverz módját gátolja.

Összefoglalva, habár számos farmakológiai ágens fellelhető az NCX gátlására, az eredmények megfelelő értelmezése mégis bonyolult a más transzport rendszerekre vagy ion csatornákra gyakorolt hatásaik miatt.

Az NCX and NHE gátlás kardioprotektív hatása

Az iszkémia/reperfúzió-indukálta $[\text{Na}^+]_i$ felhalmozódás és az ennek következtében kialakuló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ túltelítődés limitálása egy vagy mindkét cseremechanizmus gátlásával egy ésszerű védekezési stratégia lehet. Preklinikai vizsgálatok szerint az NHE gátlása rendkívül hatékony, különösen ha iszkémia előtt alkalmazzák. Ezen tanulmányok ígéretes eredményeire alapozva az NHE blokkolása egy ésszerű terápiás kezelés lehetne az iszkémia/reperfúzió-indukálta sérülések kivédésére.

Számos preklinikai vizsgálat bizonyítja, főleg mérsékelt iszkémia alatt, hogy az NCX reverz módjának gátlása csökkenti a $[\text{Na}^+]_i$ és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ túltelítődését, a hiperkontraktúrát, az enzim felszabadulást és a sejtkárosodást. Következésképpen, az NCX gátlása potenciális terápiás lehet az iszkémia/reperfúzió-indukálta aritmiák és sérülések kivédésére. Az NCX inhibitorokat soha nem tesztelték még klinikai kutatásokban, mivel nem áll rendelkezésre elég szelektív és hatásos NCX gátló.

Összefoglalva, meggyőző bizonyíték van arra, hogy az NHE gátlás klinikai gyakorlatban nem használható. Másrészt, az NCX reverz módjának gátlása ígéretes kardioprotektív hatással bír állatkísérletekben.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink elsődleges célja az NCX és/vagy NHE blokkád kardioprotektív hatásának analízise volt $[\text{Na}^+]_i$ szint emelkedés-indukálta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ túltelítődés kezelésére és az akciós potenciál morfológiai változásaira iszkémia/reperfúziós sérülés esetén.

A fő kérdések a következők voltak:

- SEA0400 vagy ORM-10103 védő hatással van-e az ATX-II indukálta AP morfológiai változásaira vagy az APD megnyúlására?
- Egyedüli vagy kombinált NHE és/vagy NCX gátlás protektív hatást fejt-e ki aritmiák ellen reperfúziós iszkémia után, vagy legalábbis a reperfúzió-indukálta $[Ca^{2+}]_i$ -tútelítődés ellen Langendorff – perfundált patkny szívből?
- Illetve az NCX és/vagy NHE gátlás kivédi-e a Ca^{2+} -tútelítődés indukálta kontraktúrát globális iszkémia alatt és után?

Erre a célra egy jól ismert, jól karakterizált NHE inhibitor a cariporide-t és 2 NCX gátlót, a részlegesen szelektív SEA0400-at és az új, sokkal szelektívebb ORM-10103-at használtuk.

EREDMÉNYEK

SEA0400 és ORM-10103 hatása az ATX-II által kiváltott APD megnyúlásra

Amikor a SEA0400 és az ORM-10103 az ATX-II kezelés után lett alkalmazva, pl. miután az ATX-II szignifikánsan megnyújtotta az APD-t, egyik NCX gátlószer sem gyakorolt semmilyen változást az ATX-II-indukálta APD megnyúlásra. Ehhez hasonlóan, amikor az NCX inhibitorok az ATX-II kezelés előtt lettek alkalmazva, szintén nem védtek ki az ATX-II-indukálta APD megnyúlást. Összefoglalva, 1 μ M SEA0400-nak nem volt hatása az APD-re, sem az ATX-II kezelés előtt, sem utána. A SEA0400-hoz hasonlóan a szelektívebb ORM-10103 is hatástalannak bizonyult az APD megnyúlással szemben.

Az iszkémia-indukálta kontraktúra paramétereinek összehasonlítása

A kontraktúrának, azaz a szívizom tartós és merev összehúzódásának számos oka lehet. Iszkémiás szívizomban a kontraktúra egy rigor-típusú mechanizmus.

Az iszkémiára jellemző maximális kontraktúrákat hasonlítottuk össze az egyes csoportokban. A maximális kontraktúra szignifikánsan megnövekedett az alkalmazott gátlószer hatására, függetlenül attól, hogy önállóan vagy kombinációban adagoltuk.

A kontraktúra amplitúdója szignifikánsan csökkent mindegyik komponens hatására az iszkémia 25. percére.

A kialakult kontraktúra mértékét is vizsgáltuk, amely a reperfúzió-indukálta miokardiális sérülés egyik mutatója. A SEA0400 és a cariporide szignifikánsan csökkentett a kontraktúra mértékét a kontroll csoporthoz képest. Érdekes viszont, hogy a várttal szemben a kombinált gátlás nem mutatott védő hatást sem az iszkémiára, sem a reperfúzió-indukálta kontraktúra kialakulására nézve.

A funkcionális károsodás mérése

A végdiasztolés nyomás egy fő indikátora a szív relaxációs képességének. Kiváló paraméter arra vonatkozóan, hogy a miokardiumot alkotó sejtek milyen arányban károsodtak olyan mértékben, hogy

a Ca^{2+} -túltelítődés miatt a kontraktúra állapotába kerültek, és relaxációs képességüket elvesztették. Ez a paraméter különösen a reperfúzió kezdetén nagyon érzékeny mutatója a szívműködés károsodásának. Az iszkémia/reperfúziós sérüléshez köthető funkcionális károsodás mértékét a bal kamrai nyomás (LVDP) és a végdiasztolés nyomás (LVEDP) összehasonlításával vizsgáltuk. A kontroll csoportban a reperfúzió 10. percéig a szívek 25 %-ában tért vissza a mechanikai aktivitás (kamrai nyomás > 8 Hgmm), míg a SEA0400, cariporide illetve a kombinációs csoportokban ez az arány rendre 55.5, 87.5, illetve 68.7 % volt. A reperfúzió további károsodást okozott a kamrai funkcióban, melyet az emelkedett végdiasztolés nyomás és a csökkent pulzusnyomás jelez. A gátlószerek ezen paraméterek tekintetében is jelentős védő hatást mutattak, de a kombinált kezelés nem biztosított nagyobb mértékű protekciót. A gátlószerek közül csak a cariporide fejtett ki szignifikáns védőhatást az LVDP-re.

Aritmia diagrammok

Egy viszonylag rövid (10 perces) regionális iszkémiát követően, az általában előforduló reperfúzió-indukálta aritmiák közül kontroll (CON) patkány szívből (csak a vivőanyaggal, DMSO-val lettek kezelve) a kamrafibrilláció volt a leggyakoribb.

A szelektív NHE gátló cariporide antiaritmiás hatása, legalábbis ebben a felállásban, kiváló volt. A kontroll csoporthoz képest, ahol a VF előfordulása nagyon magas, a cariporide drasztikusan csökkentette mind a reperfúzió-indukálta aritmiák gyakoriságát, mind az időtartamát. A két NCX inhibitor, a SEA0400 és az ORM-10103, antiaritmiás hatását szimplán ránézésre nehéz megállapítani. Mindazonáltal teljesen egyértelmű, hogy sem önállóan, sem kombináltan alkalmazva nem olyan hatásosak, mint a cariporide-al való kezelés. A különböző kezelések közötti viszonylag mérsékelt, de esetlegesen fontos különbségek jobb megértése érdekében (főleg a kevésbé súlyos aritmiákra nézve) további sokkal részletesebb kvantitatív analíziseket végeztünk.

A szinus ritmus (SR) és a három fontosabb aritmia típus (ES, VT, VF) kvantitatív analízise reperfúzió alatt

Cariporide, egyedül alkalmazva, szignifikánsan növelte a normál szinus ritmus teljes előfordulását (25.8 ± 2.4 perc). Az összes többi farmakológiai kezelés is kétségtelenül jótékony hatással bír, de egyik sem bizonyult szignifikánsnak. Amíg négyből három NCX gátlóval kezelt csoport (10.26 ± 3.89 ; 10.57 ± 3.61 és 11.25 ± 4.16 perc SEA, SEA+CAR és ORM+CAR csoportokban) közel hasonló eredményt produkált, addig az önállóan alkalmazott ORM kezelés (14.86 ± 4.24 perc) a cariporide után a második legnagyobb hatást eredményezte.

A kontroll csoportban, mind az átlagos időtartam (VF_D) (19.39 ± 3.01 perc), mind az átlagos előfordulási gyakoriság (VF_I) ($1.35 \pm 0.24 \text{ perc}^{-1}$) magasnak bizonyult.

A kontroll csoporthoz viszonyítva, a cariporide önállóan alkalmazva szignifikánsan csökkentette az előfordulási gyakoriságot ($0.55 \pm 0.24 \text{ perc}^{-1}$) és különösen a fibrillációs periódusok időtartamát ($0.25 \pm 0.21 \text{ perc}$). Ebben a csoportban a kísérlet végén a 9-ből egy szív sem fibrillált. Habár az NCX inhibitorok, szemben a cariporide-al csak mérsékelt jótékony hatást fejtettek ki, nyilvánvalóan nem tudták szignifikánsan csökkenteni a VF- periódusok időtartamát vagy gyakoriságát. Sem a SEA0400 (I: $1.08 \pm 0.37 \text{ perc}^{-1}$; D: $17.86 \pm 4.07 \text{ perc}$), sem az ORM-10103 (I: $0.80 \pm 0.13 \text{ perc}^{-1}$; D: $11.57 \pm 4.29 \text{ perc}$) nem csökkentette markánsan csökkenteni az előfordulási gyakoriságot vagy az időtartamot. Ebből az aspektusból nézve az ORM-10103 antifibrillációs hatékonysága valamivel ígéretesebb. Míg a tartósan fibrilláló szívek számában nem figyelhető meg nyilvánvaló különbség (6/12 (ORM-10103) - 7/13 (SEA0400)), addig a VF átlag időtartama mérsékeltén alacsonyabb volt az ORM-10103-al kezelt csoportban összehasonlítva a SEA0400-al.

Kontroll szívekben, mind az extraszisztolék előfordulási gyakorisága (ES_I) ($0.11 \pm 0.02 \text{ perc}^{-1}$), mind az időtartama (ES_D) ($0.14 \pm 0.04 \text{ perc}$) magas volt. Cariporide önállóan alkalmazva szignifikánsan csökkentette az ES előfordulását ($0.03 \pm 0.007 \text{ perc}^{-1}$) és jelentősen csökkentette az átlag időtartamot ($0.066 \pm 0.05 \text{ perc}$). Mindkét NCX inhibitor szignifikánsan csökkentette az ES előfordulási gyakoriságát és főleg az időtartamát (ES_I : SEA: $0.05 \pm 0.02 \text{ perc}^{-1}$; ORM: $0.05 \pm 0.02 \text{ perc}^{-1}$; ES_D : SEA: $0.02 \pm 0.01 \text{ perc}$; ORM: $0.02 \pm 0.007 \text{ perc}^{-1}$). Ezel szemben, amikor a cariporide-al kombináltuk az NCX gátlókat nemcsak, hogy nem javítja, hanem gyakorlatilag megszünteti az NCX gátlás jótékony hatását az extraszisztolék időtartamára és előfordulási gyakoriságára nézve (SEA+CAR: $0.11 \pm 0.05 \text{ perc}$ és $0.09 \pm 0.03 \text{ perc}^{-1}$; ORM+CAR: $0.17 \pm 0.09 \text{ perc}$ és $0.09 \pm 0.02 \text{ perc}^{-1}$).

Mint a többi aritmia típusnál, a kamrai tachycardia (VT) előfordulási gyakorisága ($0.17 \pm 0.04 \text{ perc}^{-1}$) és átlag időtartama ($0.14 \pm 0.05 \text{ perc}$) is magas volt kontroll szívekben. A cariporide-al való kezelés fejtette ki a leghatékonyabb antitachycardiás hatást, azáltal hogy drámain csökkentette mind az a posztisztkémiás VT periódusok előfordulását és időtartamát (VT_I : $0.01 \pm 0.002 \text{ perc}^{-1}$; VT_D : $0.005 \pm 0.001 \text{ perc}$). Szemben az ES -s epizódokkal, ahol mindkét NCX inhibitor kifejtett egy mérsékelt jótékony hatást, a VT előfordulását és időtartamát nem tudta szignifikánsan csökkenteni (SEA: $0.16 \pm 0.04 \text{ perc}^{-1}$ és $0.13 \pm 0.05 \text{ perc}$; ORM: $0.10 \pm 0.03 \text{ perc}^{-1}$ és $0.09 \pm 0.07 \text{ perc}$). Ezen túlmenően, a cariporide és az NCX inhibitorok együttes alkalmazása majdnem teljesen megszüntette a cariporide védő hatását (SEA+CAR: $0.13 \pm 0.06 \text{ perc}^{-1}$ és $0.05 \pm 0.05 \text{ perc}$; ORM+CAR: $0.09 \pm 0.07 \text{ perc}^{-1}$ és $0.10 \pm 0.05 \text{ perc}$).

MEGBESZÉLÉS

AZ NCX gátlás kudarca a kamrai AP módosítására

A szelektív NCX gátlás nem módosította APD-t – sem előkezeléskor, sem az ATX-II alkalmazása után. Az NCX gátlás indukálta szétkapcsolás a I_{NaL} és a $[Ca^{2+}]_i$ kezelés között talán hatásos lehetne ebben a felállásban, habár úgy tűnik csak csekély hatást gyakorol az APD-re. Figyelembe véve ezen

inhibitorok hatástalanságát az APD-re, arra a következtetésre jutottunk, hogy az ORM-10103 elhanyagolható hatással bír az APD diszperzióra nézve. Ez a megállapítás ellentétben áll Milberg és mtsai. eredményeivel, de megegyezik Farkas és mtsai. megállapításaival. Az eredményeink és Milberg eredményei közötti eltérés oka nem ismert. A lehetséges okok talán a különböző kísérleti körülmények, a vizsgálatokhoz használt módszerek, fajok közötti különbségek.

Az APD-re gyakorolt hatás hiányának oka valószínűleg sokkal összetettebb. Elméletileg, az APD megnyúlásának (I_{NaL} fokozása után) két forrása lehet: (1) egy *direkt*, pl. a megnövekedett I_{NaL} áram hatása az APD-re, és (2) egy *indirekt*, pl. az I_{NCX} áram szerepe az aktuális APD meghatározásában. Feltételezhetjük, hogy az NCX gátlásának nincs közvetlen hatása az I_{NaL} áramra, így részben megmagyarázható miért nem ellensúlyozza az APD megnyúlást. Másrészt az ATX-II kezelés utáni AP becsült kinetikája bonyolult.

Az NCX habár csökkentette $[Ca^{2+}]_i$ szintet, de nem volt hatással az APD-re. Lehetséges, hogy CaT elsődleges csökkenése a negatív-feedbacken keresztül nyújtja a I_{Ca} áramot és ezt követően nyújtja az APD-t. Ezért, ha az NCX gátlásnak bármilyen hatása van az APD-re (azaz I_{NCX} mediálta rövidülésre), akkor lényegesen csökkenthető az indirekt mechanizmus által (azaz a I_{CaL} áram mediálta megnyúlással). NCX gátlásnak, the I_{NaL} indukált az $[Ca^{2+}]_i$ szint növekedés után, 2 párhuzamos, de egymásnak ellentmondó hatása lehet az APD-re: *közvetlenül*, rövidítheti az APD-t az NCX gátláson keresztül, de közvetetten – az $[Ca^{2+}]_i$ szint csökkentő hatásának és az ezt követő I_{Ca} áram kinetikájának módosítása következtében – szintén nyújthatja az APD-t.

Globális iszkémia

Fontos megemlíteni, hogy a kontroll csoporthoz képest a SEA0400-al kezelt és a kombinált kezelést kapott csoportokban a kontraktilitás szignifikánsan megnövekedett. Ennek magyarázata valószínűleg az, hogy a SEA0400 NCX gátló hatása miatt a Ca^{2+} eltávolítása a citoszolból csökkent, ami megnövekedett Ca^{2+} -tranzienst és ennek következtében nagyobb kontraktilitást eredményez. Ezen eredményünk összhangban van a munkacsoport korábbi eredményeivel, amely szerint patkány-szívizomsejteken és izolált szívben kontroll körülmények között a SEA0400 növeli a Ca^{2+} -tranzienst. Ez azért lehetséges, mert a SEA0400 ugyan az NCX mindkét irányú működését gátolja, de normál körülmények között a Ca^{2+} -eltávolítás (forward mód) dominál az NCX működésében, ezért ennek gátlása a Ca^{2+} -tranzienst és a kontraktilitás növekedését eredményezi.

NHE gátlás blokkolja az intracelluláris Na^+ szint növekedését és így közvetetten kivédi a Ca^{2+} túltelítődést a reverz NCX-en keresztül, mivel ha a SEA0400-al kombinálva alkalmaztuk közvetlenül a reverz NCX is gátolva van. Ebben a felállásban egy együttes védő hatást vártunk a kombinált NHE-NCX gátlás révén a Ca túltelítődés kivédésére. Eredményeink nem erősítették meg ezt a hipotézist, a pontos oka viszont nem ismert. Mivel a SEA0400 egyidejűleg gátolja a reverz és forward NCX-et, azt feltételezzük, hogy a forward NCX gátlása miatt gyengült Ca eltávolítás ellensúlyozza a kombinált NHE- reverz NCX gátlás jótékony hatását.

Regionális iszkémia

A két NCX gátló, a viszonylag szelektív SEA0400 és az új szelektívebb ORM-10103 reperfúzió-indukálta aritmiák elleni védőhatását vizsgáltuk részletesen. Kísérleti eredmények szerint a SEA0400 antiaritmiás hatást tekintve nagyon csekély és ellentmondásos, habár többnyire pozitív, míg hasonló adatok az ORM-10103-al kapcsolatban csak nemrégiben váltak elérhetővé. SEA0400 mérsékelten gátolja az L-típusú Ca^{2+} csatornát, míg az ORM-10103 kis mértékben befolyásolja az I_{Kr} -t. Ezek e pleiotrópiás hatások egyike sem módosítja jelentősen a vizsgált NCX inhibitorok antiaritmiás hatékonyságát. Mindegyik gátlószer önállóan vagy a jól ismert NHE gátló, cariporide-al volt alkalmazva. A cariporide nagymértékben szelektív és nem befolyásolja egyik fontos ioncsatornát sem.

NHE gátlás (cariporide)

A Eredményeink összhangban állnak azon tanulmányokkal, ahol a cariporide pre-iszkémiás alkalmazása magas antiaritmiás hatékonyságot mutatott. Cariporide szignifikánsan növelte a normál szinus ritmus – az ES_D kivételével – és az *összes aritmiával kapcsolatos paramétert*. A kiváló antiaritmiás hatásnak köszönhetően, főleg a VT és VF esetén, majdnem teljesen megszüntette az aritmiák előfordulását.

A megfigyelt hatékonyság kamrai fibrilláció és tachycardia esetén nem teljesen tisztázott. Korábbi tanulmányok eredményei azt jelzik, hogy a reperfúzió korai szakaszában megnövekedett NHE aktivitás az APD átmeneti rövidülését idézi elő, amelynek következtében a szív fogékonyá válik a *reentry-típusú aritmiák* kialakulására. Így tehát az NHE gátlás szignifikánsan csökkentheti a szív VF-ra és VT-ra való hajlamát. Ezen kívül bizonyított, hogy a NHE gátlás javítja az akciós potenciál terjedését és csökkenti az iszkémia-indukálta AP diszperziót, valószínűleg azért, hogy jelentősen késlelteti a sejt-sejt közötti szétkapcsolást. Mióta köztudott, hogy a megnövekedett AP diszperzió fontos tényező a VT és VF kialakulásában és fenntartásában; az AP vezetésének fokozása és a későbbiekben csökkent diszperzió egy fontos komponens lehet a cariporide anti-VT és anti-VF hatását tekintve.

NCX gátlás (SEA0400 or ORM-10103)

A SEA0400-hoz képest, az új ORM-10103 felépítése jelentősen különbözik és a fokozottabb a szelektivitása. Tekintettel az antiaritmiás hatására, amikor az ORM-10103 önállóan lett alkalmazva összehasonlítva a SEA0400-al – összeségében némileg hatékonyabb az extraszisztolék kivédésében. Habár a SEA0400 mérsékelten növelte az aritmia mentes periódusok számát, de ezzel szemben nem csökkentette a VF és VT gyakoriságát és időtartamát. Az NCX gátlás aritmia-típustól való függőségének oka minden bizonnyal összetett és hűen tükrözi, hogy az egyes tényezők közötti szorosak a kölcsönhatások, de mégis ellentétes következményeket produkálhatnak. A triggerelt aritmiák (ES) elleni kiváló védőhatás talán a reverz NCX aktivitás gátlásának tulajdonítható, amely a

reperfúzió-indukálta Ca^{2+} tútelítődést szignifikánsan csökkentette. Viszont a VF és VT leküzdéséhez szükséges hasonló jótékony hatással nem rendelkeik a SEA0400, ami pedig elengedhetetlen lenne a Ca^{2+} tútelítődés csökkentéséhez.

Ebben a kísérleti modellben a kamrai fibrilláció volt a legjellemzőbb aritmia típus. Eredetét illetően, a VF egy re-entry és nem triggerelt típusú aritmia. A legfontosabb tényező az indukciójában és fenntartásában az AP diszperzió és az iszkémia/reperfúzió-indukálta térbeli és/vagy időbeli heterogenitása. Következésképpen, mivel az NCX gátlás kevésbé alkalmas a szubsztrát-indukálta aritmiák kivédésére, nem meglepő, hogy jelen modellünkben nem hatásos a VF kivédésére. Ennek ellenére mindkét NCX gátló jelentősen csökkentett a Ca^{2+} -függő (triggerelt) aritmiák előfordulását, amelyek valószínűleg a sérülés helyéről származtak. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi tanulmányok eredményeivel, amelyben leírták az NCX gátlók EAD- ra és DAD –ra gyakorolt jótékony hatását. Valójában tehát az NCX gátlás szignifikánsan hatékonyabb, ahol $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint lényegesen magasabb és a Ca^{2+} tútelítődés sokkal kifejezettebb (pl. kiterjedtebb, öszetettebb és hosszabb iszkémia esetén).

Kombinált NHE + NCX gátlás

Míg az NCX inhibitorok önálló alkalmazása során kapott eredmények logikusak és átfogóak, addig a kombinált gátlás során kapott eredmények első ránézésre meglepőek. Valójában azt várnánk, hogy az együttes alkalmazás antiaritmiás hatékonysága felülmúlja vagy legalábbis megközelíti az előző eredményeket. Az a tény, hogy a cariporide önmagában szignifikánsan nagyobb hatékonysággal védte ki az aritmiákat, azt sugallja, hogy az NCX gátlásnak nagyon fontos limitáló szerepe van ezekben a csoportokban. Ennek az egyértelműen korlátozó tényezőnek az oka nem egyértelmű és további kísérletek szükségesek.

Egy logikus, de nagyrészt elméleti magyarázat a következő. Ezekben a kísérletekben a cariporide antiaritmiás hatását az NCX gátlás nem tudja tovább erősíteni, mivel mind az NHE, mind a reverz NCX kivédte a $[\text{Na}^+]_i$ -indukálta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint emelkedést. Sőt ezt a feltételezést támasztja alá az NCX és kombinált NCX+NHE gátlás majdnem megegyező hatása.

A SEA0400 és az ORM-10103 jelentősen gátolja az NCX forward módját, amely a cariporide hatékonyság csökkenésének hátterében állhat. Aheterogenitás növelésével a kombinált gátlás ellentétes hatást válthat ki azáltal, hogy a sejt normal Ca^{2+} ciklusához szükséges Ca^{2+} eltávolítást gátolja. Ez a hatás valószínűleg kevésbé fontos a csak csekély mértékben iszkémiás szívizomsejtekben összehasonlítva azokkal, amelyekben szignifikánsan megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint. Másrészt az NHE gátlás rejtve maradhat egészséges, nem-iszkémiás szívizomban, mivel az NHE normál pH_i esetén inaktív.

KÖVETKEZTETÉS

Eredményeink alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a szelektív, részleges NCX gátlás antiaritmiás hatással bír, azáltal, hogy a Na^+ -indukálta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint emelkedését megakadályozza. Ez a védő hatás elsősorban a revI_{NCX} áram mediálja. Következésképpen, az NCX gátlás egy ígéretes terápiás lehetőségnek tekinthető a Ca^{2+} túltelítődés-indukálta, revI_{NCX} -mediálta aritmiák kivédésében.

Elvileg mind az NCX, mind az NHE és különösen a kettőjük kombinált gátlásának hatékonynak kellene lennie a reperfúzió-indukálta aritmiák kivédésében, mivel mindegyik ugyanazt az útvonalat gátolja. Ezért arra a következtetésre jutottunk az NCX gátlás önmagában vagy NHE blokkolóval kombinálva egy kevésbé optimális terápiás lehetőség a reperfúzió-indukálta aritmiák teljes körű kivédésére. A korlátozott hatékonyság egyik lehetséges oka, hogy a jelenleg elérhető NCX inhibitorok hasonló hatékonysággal bírnak és az NCX mindkét irányú működését gátolják. Másrészt, ezek az NCX gátlók rendkívül hatékonyak az EAD- és DAD- indukálta aritmiák kivédésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Varró Andrásnak, hogy támogatta és biztosította számomra a munkát a Farmakológia és Farmakoterápiai Intézetben.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Papp Gyulának kritikáiért és személyes útmutatásainak, amellyekkel mindig támogatott munkám során.

Különösen szeretném megköszönni Dr. Tóth Andrásnak a folyamatos támogatást, személyes útmutatást és segítséget a technikák megtanulásához. Az ő személyes segítsége nagyban hozzá járult ahhoz, hogy ez amunka létrejöhessen. Szeretném *ml am especially thankful to my supervisors* András

Köszönettel tratozom Dr. Acsai Károlynak, a szakmai segítségért és támogatásért, amelyre munkám során mindig számíthattam.

Hálás vagyok kollégáimnak, Dr. Nagy Norbertnek, Dr. Prorok Jánosnak, Dr. Kormos Anitának, Gruber Andreának a segítségükért. És nem utolsó sorban köszönöm a technikai segítségért Sebők Zsuzsannának és Molnár Imrénének.

Külön elismeréssel tartozom a szüleimnek, a testvéreimnek és minden barátomnak, aki támogatott és biztatott ezekben az években. Végül legmélyebb elismerésem a páromat illeti, aki folyamatosan támogatott és ösztönzött

Ez a munka a **Richter Gedeon Centenárium Alapítványa** nélkül nem jöhetett volna létre.