

Hatékony-e a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő szelektív gátlása az iszkémia/reperfúzió indukált kamrai aritmiák ellen?

Tóth András^{1,2}, Kormos Anita², Szepesi Judit², Varró András^{1,2}, Nagy Norbert^{1,2}

¹MTA-SZTE Keringéscsökkentőfarmakológiai Kutatócsoport, Szeged

²SZTE-ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Szeged

Levelezési cím:

Dr. Tóth András, SZTE-ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, 6720 Szeged, Dóm tér 12.

E-mail: toth.andras@med.u-szeged.hu

Gyakran feltételezték, hogy a szív aritmogenezisében a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -kicserélő (NCX) fokozott aktivitásának kritikus szerepe van, de a vizsgálati eredmények ellentmondásosak voltak. Ennek logikus oka lehetett a korai NCX-gátlók nem kielégítő szelektivitása. Első, izolált kutya szívműködésén végzett kísérleteinkben a viszonylag szelektív SEA0400 és a jóval szelektívebb ORM-10103 alkalmazásával elemeztük a gátlás hatékonyságát az intracelluláris Ca^{2+} (Ca^{2+i}) háztartásban és az akciós potenciál (AP) morfológiájában kialakuló aritmogén eltolódásokkal szemben. A (Ca^{2+i}) emelkedést önmagában alkalmazott (mérsékelt low flow) vagy strophantidin terheléssel kombinált (súlyos low flow) szimulált iszkémia/reperfúziós (I/R) protokollokkal hoztuk létre. Egy másik, perfundált izolált patkányszíveken végzett kísérletben regionális I/R-protokollal kiváltott extraszisztolés (ES), kamrai tachycardiás (VT) és kamrafibrillációs (VF) periódusok aritmia-diagrammokról meghatározott időtartamának és gyakoriságának összehasonlításával elemeztük az NCX, NHE és kombinált NCX+NHE-gátlás hatékonyságát, reperfúzió-indukált aritmiákkal szemben. Eredményeink szerint a szelektív, részleges NCX-gátlás – vélhetően a revINCX gátlásával – hatékonyan gátolja a Ca^{2+i} háztartás zavarai által indukált aritmogén utódepolarizációkat, illetve triggerelt aktivitást, ugyanakkor nem képes normalizálni az AP morfológiában kialakuló aritmogén eltolódásokat. Perfundált szívekben az NHE-gátlás jóval hatékonyabban gátolta a reperfúzió-indukált szubsztrát-dependens aritmiákat, ugyanakkor a kombinált gátlás nem növelte az önmagában alkalmazott NCX-gátlás antiaritmiás hatékonyságát.

Kulcsszavak: aritmia, iszkémia/reperfúzió, NCX-gátlás, ORM-10103, SEA0400

Is selective $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibition effective against ischemia/reperfusion induced ventricular arrhythmias?

A crucial role for augmented $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) activity in cardiac arrhythmogenesis was often suggested, however, the results of the related studies were controversial. A feasible explanation of this controversy could be the unsatisfactory selectivity of the early NCX inhibitors. In our first study performed on isolated canine cardiomyocytes we evaluated the efficacy of NCX inhibition using the relatively selective SEA0400, or a new, highly selective ORM-10103 against arrhythmogenic shifts in intracellular Ca^{2+} (Ca^{2+i}) handling and action potential (AP) morphology, when (Ca^{2+i}) was augmented via a simulated ischemia/reperfusion (I/R) protocol performed either alone (moderate low-flow protocol) or with simultaneous strophantidine challenge (severe low-flow protocol). In the second study Langendorff perfused rat hearts were exposed to regional I/R protocol and efficacies of NCX, NHE and combined NCX+NHE inhibition against reperfusion induced arrhythmias were compared by analyzing arrhythmia diagrams for incidence and duration of periods of repetitive extrasystoles (ES) and ventricular tachycardia (VT) or fibrillation (VF). Our results confirm that selective, partial NCX inhibition – presumably by blocking fwdINCX – is highly effective against arrhythmogenic after depolarizations and triggered activity caused by the perturbed Ca^{2+i} handling, but it fails to normalize untoward arrhythmogenic changes in AP morphology. In perfused hearts NHE inhibition was markedly more efficient in reducing reperfusion-induced substrate-dependent arrhythmias, however, combined inhibition failed to improve the antiarrhythmic efficacy reached by NCX blockade alone.

Keywords: arrhythmia, ischemia/reperfusion, NCX inhibition, ORM-10103, SEA0400

Bevezetés

Sokszorosan bizonyított, hogy a számos szívbetegség (pl. malignus kamra-hipertrófia, akut miokardiális infarktus, krónikus iszkémiás szívbetegség és szívelégtelenség, nem iszkémiás szívelégtelenség, diabéteszes cardiomyopathia) kialakulásához és/vagy progressziójához vezető Ca^{2+} -háztartás-zavarok kialakulásában kritikus szerepet játszik az AP alatt a sejtekbe áramló trigger Ca^{2+} eltávolításáért, ezáltal a szívizomsejtek Ca^{2+} -tartalmának szabályozásáért felelős NCX fokozott aktivitása és/vagy expressziója, amit triggerelt aritmiákban (EAD, DAD, TdP), AP-konduktancia rendellenességekben, reentry aritmiákban, pitvarfibrillációban és genetikusan eredetű aritmiákban (CPVT) is igazoltak. Ezért logikus feltételezés, hogy szelektív NCX-gátlással az aritmogén változások effektíven mérsékelhetők, progressziójuk lassítható. Bár az NCX régóta szerepel a fontos farmakológiai célpontok listáján, kellően szelektív gátlószerek hiányában nem történhetett meg a kevésbé szelektív gátlókkal (KB-R7983, SEA-0400) kapott kísérleti adatok validálása és mindeddig nem kerülhetett sor a gátlás terápiás hatékonyságának klinikai szintű vizsgálatára sem.

Az alábbi eredmények az első szelektívnek tekinthető NCX-gátlószert (ORM-10103, Orion Pharma, Finnország) alkalmazásával végzett kísérleteinkből származnak. Ezekben a szelektív NCX-gátlás antiaritmiás hatékonyságát vizsgáltuk, izolált szívizomsejteken és perfundált egész szíveken.

Kevésbé specifikus NCX-gátlók alkalmazásával nyert eredmények

Az NCX-blokád antiaritmiás hatásaira vonatkozó korai adatok a gátlószerekkel kapcsolatos nehézségek miatt ellentmondásosak. Tanulságos példa egy akonitin-indukált aritmiákra vonatkozó tanulmány (1), amely altatott tengerimalacon két NCX-gátló (KB-R7943, SEA0400) antiaritmiás hatékonyságát elemezte. Bár a KB-R7943 gátolta a kamrai tachycardiát, a sokkal szelektívebb SEA0400 még maximális dózisban is hatástalan volt. A KB-R7943 ugyanis az NCX-en kívül gátolta a Na^+ és Ca^{2+} -csatornákat is, ezáltal csökkent a Na^+ - és Ca^{2+} -beáramlás; ugyanakkor a SEA0400, kisebb nem-specifikus hatásai miatt, nem gátolta a triggerelt válasz kialakulását, azaz a KB-R7943 protektív hatása nem az NCX-gátlás következménye. Strophantidinnel előkezelt sejteken a KB-R7943 mar-

kánsan csökkentette a diasztolés (Ca^{2+})_i-t és a strophantidin inotróp hatását alig befolyásolva gátolta a spontán Ca^{2+} -oszcillációkat is (2). Patkányokban preiszkémias alkalmazása megszüntette az I/R-indukált kamrafibrillációt (3). Egy másik vizsgálatban az előkezelés nem befolyásolta a koronária-leszorítással indukált reperfüziós aritmiákat (4). Hypoxiás médiumban inkubált papillaris izomban a KB-R7943 reoxigenáció előtt és alatt alkalmazva szignifikánsan csökkentette a kialakuló aritmiák gyakoriságát és időtartamát (5). Globális iszkémiát követő reperfüzió alatt α_1 -adrenerg-receptor stimuláció hatására nő a szív inozitol(1,4,5)-trifoszfát szintézise, ami fibrillációhoz vezethet. KB-R7943 kivédte az Ins(1,4,5)P3 emelkedését és gátolta a fibrilláció kialakulását (6). A KB-R7943 antiaritmiás Langendorff-perfundált nyúlshíveken is vizsgálták hatását I/R-modellben (7), amelyre iszkémia és reperfüzió alatt is jellemző a magas (50%) VT és VF gyakoriság. KB-R7943 előkezelés után mindkét fázisban szignifikánsan csökkent a VT és VF gyakorisága. A KB-R7943 volt az egyetlen hatóanyag, amely ebben a modellben egyaránt gátolta az iszkémia-, illetve reperfüzió-indukált aritmiákat.

Patkány in vivo I/R-modellben az iszkémiát követően alkalmazott SEA0400 csökkentette a fibrilláció kialakulási gyakoriságát és a mortalitást (8), ugyanakkor kutyán a SEA0400 sem iszkémia előtt, sem utána alkalmazva nem gátolta az aritmiák kialakulását (9). Kutyákon az iszkémia előtt alkalmazott KB-R7943 sem volt hatásos (10). Az iszkémia alatt alkalmazott KB-R7943 egyetlen protektív hatása az aritmiás ütések számának kismértékű csökkenése volt. Ebből arra következtettek, hogy mivel kutyában a KB-R7943 nem mutatott antiaritmiás potenciált, nagyobb emlősökben az NCX-gátlás nem lehet hatásos stratégia az I/R-indukált aritmiákkal szemben.

Célkitűzések

Kutya szívizomsejteken, az iszkémia/reperfüziós ciklus alatt kialakuló ionmiliőt jól közelítő szimulált iszkémia modellben analizáltuk az a Ca^{2+} -homeosztázis és az AP paramétereiben fokozott Ca^{2+} -terhelés hatására kialakuló aritmogén eltolódásokat, valamint a szelektív NCX-gátlás hatékonyságát ezek megelőzésére/csökkentésére.

Kérdéseink

Szimulált iszkémia/reperfüzióban kivédhető-e szelektív NCX-gátlás alkalmazásával a Ca^{2+} -háztartás és

Rövidítések jegyzéke

AP: akciós potenciál; Ca^{2+} _i: intracelluláris kalcium; Ca^{2+} _iD: diasztolés kalciumszint; CaT: kalcium-tranziens; NCX: nátrium/kalcium kicserélő; NHE: nátrium/hidrogén kicserélő; revINCX: reverz irányú NCX áram; fwdINCX: forward irányú NCX áram; I_{K1} : a késői egyenirányító kálium áram gyors komponense; SR: szarkoplazmatikus retikulum; SERCA: szarkoplazmatikus retikulum Ca-ATP-áz; EAD: korai utópotenciál; DAD: késői utópotenciál; TdP: torsade de pointes; I/R: iszkémia/reperfüzió; ES: extraszisztolé; VT: kamrai tachycardia VF: kamrafibrilláció; CPVT: catecholaminerg polimorf ventrikuláris tachycardia; CF: koronária áramlás; HR: szívfrekvencia; LVSP: bal kamrai szisztolés nyomás; LVEDP: baltkamrai végdiasztolés nyomás

AP-aritmogén változásai? Ezáltal javíthatók-e a szívizomsejtek túlélési esélyei?

Izolált patkányszíveken regionális I/R-protokollt alkalmaztunk (bal oldali arteria descendens – LAD – leszorítással indukált rövid iszkémia és rövid reperfúzió). A protokoll leggyakoribb aritmiatípusa a kamrafibrilláció (VF), amely a kontrollszívek közel 100%-ában kialakul. A reperfúzió során gyakori az extraszisztolék (ES) és kamrai tachycardia (VT) kialakulása.

Alkalmas-e a szelektív NCX-gátlás a reperfúziós aritmiák kialakulásának megelőzésére? Hogyan viszonyul egymáshoz a NHE- és az NCX-gátlás hatékonysága? Fokozható-e az NCX- vagy NHE-gátlás hatékonysága a gátlószerek kombinált alkalmazásával?

Módszerek

A módszerek részletes leírása megtalálható eredeti közleményeinkben (11, 12, 13).

Izolált sejtmérések

A méréseket kutya bal kamrából enzimatiszós emésztéssel izolált sejteken optikai (Ca^{2+} transziens (CaT) mérése Ca^{2+} -érzékeny festékkel (Fluo 4-AM), sejttúlélési arány meghatározása, sejtrövidülés mérése videó éldetektorral) és konvencionális mKroelektrod (AP morfológia és kinetika) módszerekkel végeztük.

Izolált szívérések

Patkányszíveket állandó nyomáson perfundáltunk. Koronária-áramlást (CF) ultrahangos áramlásméréssel, bal kamrai nyomást (LVP) elasztikus ballonnal, EKG-t térelektrodokkal regisztráltunk. A $\pm dP/dt_{max}$ értékeket és a szívfrekvenciát (HR) off-line, az LVP-görbékből határoztuk meg.

Anyagok

A vegyszereket néhány kivétellel a Sigma-Aldrich (USA) szállította. A SEA0400-at, cariporidot (mindkettőt a SzTE Gyógyszerkémiai Intézetben szintetizálták), ORM-10103-at (Orion Pharma ajándéka) és a Fluo 4-et (Molecular Probes, USA) DMSO-ban oldottuk.

Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A fluoreszcens jeleket nonspecifikus artefaktokra (hátér, bleaching, leakage) korrigáltuk és a szívizomsejtek eltérő mérete (festéktartalma) miatt a kontroll periódusra normáltuk. Az APD₉₀, APD₂₅ és CaT rövidtávú variabilitásait az alábbiak szerint határoztuk meg:

$$BVR_{ADP90/25} = \frac{\sum(APD_{90/25,i+1} - APD_{90/25,i})}{(n_{\text{ütés}} \times \sqrt{2})}$$

$$BVR_{CaT} = \frac{\sum(CaT_{\text{amplitúdó},i+1} - CaT_{\text{amplitúdó},i})}{(n_{\text{ütés}} \times \sqrt{2})} \times \text{átlagosCaTTC}_{\text{amplitúdó}}$$

Az izolált patkányszív-mérésekben a hemodinamikai paramétereket (CF, HR, LVSP, LVEDP, $\pm dP/dt_{max}$) közvetlenül mértük vagy a nyomásgörbékből számoltuk ki. A reperfúzió-indukált aritmiák súlyosságát a három

alapparaméter: az aritmia típusa (halmozott extraszisztolék – ES), kamrai tachycardia (VT), kamrafibrilláció (VF) és az aritmiás periódusok relatív gyakorisága és időtartama alapján döntöttük el.

A statisztikai számítások Statistica 9.0 (Statsoft) programmal történtek. Két csoportra Student páros/páratlan t-tesztet, több csoportra Bonferroni/Tukey post hoc teszttel bővített, egy/több szempontú, a csoportközi varianciák homogenitásától függően parametrikus/nemparametrikus (Kruskal–Wallis) variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk. A csoportokat szignifikánsan különbözőnek $p < 0,05$ esetben tekintettük.

Szimulált iszkémia-reperfúzió (I/R) modell

Izolált kutya szívizomsejtekben, szimulált I/R-protokollokban (mérsékelt/súlyos „low flow” iszkémia) a szelektív NCX-gátlás hatékonyságát vizsgáltuk az aritmogén változásokkal (Ca^{2+} -tútelődés, diasztolés depolarizáció, APD-megnyúlás, rövidtávú APD és CaT variabilitás-fokozódás) szemben, továbbá a sejtek túlélésére.

Protokollok

Ca^{2+} transziens mérések

Fluo 4-AM-mel töltött sejteken 5 kísérleti csoport:

1. időkontroll;
2. I/R-kezeletlen;
3. I/R-ORM: (ORM-10103 előkezelés).
4. és 5. csoportok megegyeztek az előző két csoporttal, de a szívizomsejteket strophantidint tartalmazó oldattal áramoltattuk át.

AP-mérések

3 kísérleti csoport: a protokollok a CaT-mérések 1-3 csoportjával (időkontroll, I/R-kezeletlen, I/R-ORM) megegyeztek, de natív sejteken végeztük.

Sejttúlélés

Az AP-mérésekben alkalmazott protokollok alkalmazásával periódikusan meghatároztuk a túlélő és elpusztult szívizomsejtek arányát.

Eredmények

- Kezeletlen sejteken NCX-gátlás hatására a (Ca^{2+})iD markánsan nő, a CaT amplitúdója csökken, a szisztolés (Ca^{2+})i emelkedik, a CaT felszálló szárának mereksége csökken, az 50%-os relaxáció (RT50) időtartama nő. A reperfúzió alatt a paraméterek helyreállnak.
- Normál pO_2 mellett az ORM-10103 előkezelés nem befolyásolja a CaT-t, de szignifikáns hatást gyakorol I/R-indukált változásaira: a CaT amplitúdója és mereksége fokozatosan csökken. ORM-10103 kezelés gátolja az iszkémia-indukált (Ca^{2+})iD emelkedést és RT50 megnyúlást.

- Strophantidin hatására az iszkémia-indukált (Ca^{2+})iD emelkedés közel megduplázódik és az kezeletlen sejtekkel szemben reperfúzió során tovább emelkedik. ORM-10103-mal ez az emelkedés nagyrészt kivédhető.
- Strophantidinnel nem kezelt sejteken a CaT variabilitása mérsékelt; ORM-10103 sem okoz szignifikáns növekedést. Strophantidin-kezelt sejtekben a CaT variabilitása iszkémia, de főleg reperfúzió alatt markánsan fokozódik. A fokozódás az NCX gátlása esetén elmarad.
- Normál pO_2 -nél az ORM-10103 csak mérsékelt AP-rövidülést hoz létre. Iszkémia alatt a membrán depolarizálódik, a csúcspotenciál eltűnik; reperfúzió során mindkét paraméter normalizálódik.
- I/R hatására az AP amplitúdója és a plató lényegesen csökken, a trianguláció fokozódik, a membránpotenciál markánsan depolarizálódik. ORM-10103 előkezelés az I/R-indukált AP változásokkal szemben hatástalan.
- A részleges, szelektív NCX-gátlás hatékonyan védi a sejteket a I/R-indukált károsodástól.

Megbeszélés

- Az ATP-tartalékok kimerülésével párhuzamosan a SERCA-aktivitás lassul, ami (Ca^{2+})SR-csökkenéshez vezet. A CaT meredeksége/amplitúdója csökken; a nyugalmi membránpotenciál depolarizációja mérsékli a fwdINCX, a magas $[\text{Na}^+]_i$ növeli a revINCX nagyságát. A lelassult SERCA és fwdNCX-aktivitás és megnőtt revINCX (Ca^{2+})SR-csökkenéshez és egyidejűleg a Ca^{2+} beáramlás-fokozódáshoz, a (Ca^{2+})i növekedéséhez, és az eltávolítandó Ca^{2+} növekedéséhez vezet. A CaT relaxációjának a reperfúzió során látott felgyorsulása mögött a (K^+)i gyors helyreállása, ezáltal a membrán teljes repolarizációja állhat, amely növeli a fwdNCX-aktivitás hatékonyságát, serkenti az [ATP]i helyreállítását és normalizálja a SERCA aktivitását.
- A CaT amplitúdójában látott csökkenés alapján jogosnak tűnik az elképzelés, amely szerint a revNCX-mediált, beat-to-beat Ca^{2+} -beáramlás szerepe kritikus a iszkémia-indukált (Ca^{2+})SR-csökkenés következményeinek kompenzálásában. Fontos megfigyelés, hogy reperfúzió alatt ezek tovább csökkentek, ami alátámasztja hipotézisünket, amely szerint I/R során az NCX-blokád legfontosabb hatása a Na^+ i túltelődés-indukált revNCX-aktivitás-fokozódás gátlása.
- A strophantidin előkezeléssel kapott eredmények megerősítik előző következtetésünket. A strophantidin gyorsítja a Na^+ -felhalmozódást, ami megnyújtja a revNCX transzportaktivitás időtartamát. ORM-10103 gátolja a revNCX-aktivitást, így a Na^+ -felhalmozódás is kisebb lesz.
- A strophantidinnel nem előkezelt sejteken kialakuló és NCX-gátlás hatására alig változó alacsony variabilitás igazolja, hogy az SR Ca^{2+} -felszabadulás transzmembr-

rán Ca^{2+} -fluxusokat moduláló feedback szabályozása jól működik. Ezzel szemben előkezelt sejteken, iszkémia és főleg reperfúzió alatt markánsan emelkedő variabilitás direkt bizonyíték arra, hogy a trigger és a feed-back rendszerek közötti finom dinamikus egyensúly felbomlott, ez pedig a beat-to-beat Ca^{2+} -felszabadulás fluktuációihoz, a Ca^{2+} homeosztázis súlyos instabilitásához vezet.

A szelektív NCX-gátlás kardioprotektív, antiaritmiás hatása elsősorban az I/R-indukált (Ca^{2+})i emelkedés csökkentésével magyarázható. Mivel a CaT-variabilitást szokás az aritmiahajlam érzékeny, sejt szintű indikátorának tekinteni, az eredményekből levonható az a következtetés is, hogy az ORM-10103 előkezelés várhatóan szignifikánsan csökkenti a szív I/R-indukált triggerelt aritmiáinak gyakoriságát.

- Az I/R-indukált aritmiák általában két, egymástól viszonylag független mechanizmus egyikével jönnek létre: (Ca^{2+})i túltelődés, vagy membránde polarizáció. A (Ca^{2+})i túltelődés az SR Ca^{2+} -tartalmának fokozott szivárgásához vezet, ezáltal markánsan fokozódik a spontán diasztolés Ca^{2+} -sparkok kialakulási valószínűsége. A létrejövő Ca^{2+} -függő inward áram (I_{ij} , ami $\sim \text{fwdINCX}$) elősegíti a kamrai aritmiák kialakulását.

Iszkémia hatására az APD rövidül. A sejtmembrán megnőtt K^+ -kiáramlás következtében kialakuló depolarizációja gátolja a Na^+ - és Ca^{2+} -csatornák aktivitását és lassítja a Ca^{2+} i eltávolítását. A megemelkedett (Ca^{2+})iD a fwdINCX aktiválásával, serkenti a Ca^{2+} -kiáramlást, az ATP-szint csökkenése által aktivált $I_{K(ATP)}$ pedig további repolarizáló áramot biztosít. A Ca^{2+} és a repolarizáló K^+ -áramfluxusok redisztribúciója jelentősen hozzájárulhat a reperfúzió alatti rövidtávú APD90 (és CaT) variabilitás-fokozódáshoz.

- Az ORM-10103 kezelés hatástalansága az AP aritmogén zavarainak kivédésére összetett okokkal magyarázható. Bár az AP morfológiájának a (Ca^{2+})i változások fontos modulátorai, mégis elsősorban a inward Na^+ és Ca^{2+} -áramok és az outward K^+ -áramok egyensúlyától függ. Az ORM-10103 az I_{Kr} minimális csökkentésén kívül nincs hatással az áramokra. Ez lehet az AP ORM-10103-ra mutatott érzéketlenségének magyarázata. A gátlás egyetlen jótékony hatása az AP-re a fokozott reperfúzió által létrehozott magas APD90 variabilitás csökkentése. Ez viszont elsősorban a Ca^{2+} i-háztartás megnövelt stabilitásának köszönhető, ami a csökkent (Ca^{2+})i túlterhelés és alacsonyabb (Ca^{2+})iD következménye.
- A szelektív NCX-gátlás jótékony, a szívizomsejtek I/R-indukált károsodásaival szemben kifejtett védőhatásának igazolására közvetlen módszer a kezelt és kezeletlen sejtek túlélési arányainak összehasonlítása. A látott effektív védelem magyarázata az lehet, hogy az ORM-10103 a revINCX gátlásával megakadályozza a (Ca^{2+})iD emelkedéshez, kontraktúrához és mitokondrium-funkció károsodáshoz vezető Ca^{2+} i-túlterhelés kialakulását. A gátlás sejt túlélést javító hatá-

sa a CaT és APD stabilizálása az I/R-indukált variabilitás-fokozódás kivédésével.

Az NCX, NHE és a kombinált NCX+NHE-gátlás antiaritmiás hatásainak elemzése regionális I/R-modellben

Kiindulópont

A súlyos kamrai aritmiák kialakulásának hátterében gyakran a Na⁺ és Ca²⁺-homeosztázis súlyos zavarai állnak, amelyek szorosan kapcsolódnak az SL két kulcsfontosságú transzporterének (NHE, NCX) túlműködéséhez. A szelektív NHE-gátlást klinikai tesztekben is kipróbálták, de rutinszerű használatára nem kerülhetett sor, mivel a tesztek ellentmondásos eredményekhez vezettek (14). Logikus feltételezés, hogy az NHE-gátlás együttes alkalmazása másik antiaritmiás beavatkozással jelentősen javíthatja a gátlás hatékonyságát. Az NHE-vel ellentétben az NCX csak az elmúlt időszakban exponálódott, mint lehetséges terápiás célpont. Ennek egyik oka a specifikus NCX-gátlószerek hiánya volt. Egy másik fontos ok az NCX kevésbé tisztázott fiziológiás szabályozása; mindkét irányú aktivitása nélkülözhetetlen a fiziológiás sejtműködéshez, viszont a transzport bármely irányú zavara súlyos szívbetegségek kialakulásához vagy progressziójához vezethet (15, 16).

Protokollok

A bal anterior descendens koronária (LAD) köré hurkot képeztünk. A kamrába vezetett latex ballont 4-8 Hgmm végdiasztolés nyomásig töltöttük. A hatóanyag/hordozó perfúzióját 5 perccel az okklúzió előtt kezdtük és végig fenntartottuk. Randomizált módon 6 csoportot képeztünk: a kontrollcsoportban a szívét hordozót (DMSO) tartalmazó KHB-oldattal perfundáltuk. 3 kísérleti csoportban a KHB egyetlen gátlószert (cariporid, SEA0400, ORM-10103) tartalmazott. 2 kísérleti csoportban gátlószerek-kombinációt (cariporid+SEA0400, cariporid+ORM-10103) alkalmaztunk. Az aritmiákat a LAD 10 perces leszorítását követő 30 perces reperfúzióval váltottuk ki.

Eredmények

- A cariporid markánsan növeli a sinusritmus időtartamát és az ESD kivételével csökkenti az összes aritmiaparaméter értékét. Hatékonysága kiemelkedően magas a reentry típusú VT és VF esetében; alkalmazását követően a két aritmiatípus csaknem teljesen megszűnik.
- A SEA0400 antiaritmiás hatékonysága erősen függ az aritmia típusától: a triggerelt aritmiák (ES) gyakorisága és időtartama jelentősen csökken. A blokádnál kevésbé hatékony az aritmiamentes periódusok hosszá-

nak növelésére, valamint a VF és VT kialakulásának gátlására, időtartamuk csökkentésére.

- Az ORM-10103 mérsékelten, de a SEA0400-nál kissé jobban növeli az aritmiamentes periódusok időtartamát; a SEA0400-tól eltérően kissé csökkenti a VF és VT gyakoriságát és időtartamát. Triggerelt aritmiákkal (ES) szemben mindkettő hatékonysága magas.
- Egy NCX-gátlóval egyidejűleg alkalmazva a cariporid nem képes az NCX-gátlással elért antiaritmiás védelem jelentős javítására, sőt a kombinált NCX+NHE-gátlás hatékonysága legtöbbször kisebb, mint az önmagában alkalmazott cariporid hatékonysága és nem haladja meg az NCX-gátlás hatékonyságát.

Megbeszélés

- A cariporid preisztkémiás alkalmazása in vitro és in vivo modellekben is szignifikánsan csökkentette az I/R-indukált aritmogenezist, viszont posztisztkémiás alkalmazása esetén, bár a VF gyakorisága kissé csökkent, a mortalitás alig változott (17, 18, 19). Preisztkémiás alkalmazásával nyert eredményeink is az előkezelés jelentős antiaritmiás hatékonyságáról tanúskodnak. Irodalmi adatok szerint a reperfúzió korai fázisában a fokozott NHE-aktivitás fokozza az APD rövidülését, ezáltal érzékenyíti a szívet a reentry típusú aritmiákra. Ezért az NHE gátlása csökkenti a szív aritmiaérzékenységet (20), ezenkívül gyorsítja az AP terjedését és a sejtek elektromos szétkapcsolásának késleltetésével csökkenti AP az iszkémia-indukált diszperzió-fokozódását (20). Mivel utóbbi kritikus tényező a VT és VF kialakulásában és fennmaradásában, az AP-terjedés gyorsítása és/vagy a diszperzió csökkentése fontos lehet a gátlószerek anti-VT és anti-VF hatásaiban.
- Az NCX-gátlás aritmiatípus-függő hatékonyságának oka vélhetően komplex; ellentétes irányú mechanizmusok kölcsönhatásának eredője lehet. A triggerelt aritmiákkal szembeni védelem a revINCX gátlásához köthető, amelynek következtében a reperfúzió-indukált Ca²⁺-túlterhelés markánsan csökken. A hasonló, jelentős védő hatás hiánya a másik két aritmiatípus (VF, VT) vonatkozásában arra mutat, hogy ezek hatékony megelőzéséhez, a Ca²⁺-túlterhelés csökkentésén kívül a fokozott reentry-aktivitás elnyomása is kiemelkedő fontosságú.

Kontrollszívekben az aritmia-összidőtartamban a VF részesedése volt a legnagyobb. Eredetét tekintve a VF rendkívül komplex, reentry típusú aritmia; kialakulásában és fennmaradásában a fokozott AP-diszperzió és a nyugalmi potenciál I/R-indukált térbeli és időbeli heterogenitása is kritikus tényező. Mivel az NCX-gátlás kevésbé alkalmas a szív védelmére a szubsztrát-dependens aritmiákkal szemben, mérsékelt anti-VF hatékonysága logikus. Ezenkívül, mivel ebben a modellben az iszkémiás fázis rövid és részleges, a (Ca²⁺)i iszkémia

és reperfúzió alatti emelkedése egyaránt mérsékelt, viszont rendkívül heterogén. Ezért a revINCX aktiválódása szintén mérsékelt, és heterogén; a gátlás hatása a sejtek I/R-indukált (Ca^{2+})i (túl)terhelésére, ellentétben a tartós iszkémiával, igen egyenlőtlen. Az NCX-gátlás szignifikáns antiaritmiás hatása elsősorban olyankor várható, amikor a (Ca^{2+})i emelkedés nagy és/vagy a Ca^{2+} i és/vagy Ca^{2+} SR-túlterhelés tartós.

- A vizsgálat legvárhatóbb eredménye, hogy két gátlószer kombinált alkalmazása nemhogy fokozná, de markánsan csökkenti a cariporid hatékonyságát. A kombinált kezelés hatása az aritmiamentes periódusok időtartamára nem tért el a SEA0400 önmagában elért hatásától, sőt az ORM-10103 hatásához képest még csökkent is. Az eredmények mindkét NCX-gátló és mindhárom aritmiatípus esetén hasonlóak. Míg az egyes gátlószerekkel nyert eredmények logikusak, a kombinációkkal nyert eredmények meglepőnek tűnnek. A megfigyelés, hogy a cariporid önmagában szignifikánsan magasabb hatékonyságot mutat, mint egy NCX-gátlóval együttesen alkalmazva, arra utal, hogy ilyenkor az NCX-gátlás erősen hatáslimitáló tényező. A korlátozó hatás oka nem világos és tisztázása további vizsgálatokat igényel. Mindazonáltal, hipotetikus magyarázata a következő lehet. Az alkalmazott protokoll esetén az NHE-gátlás antiaritmiás hatása az NCX-gátlás szinergikus hatásával jelentősen már nem fokozható, mivel mind az NHE, mind a revNCX gátlása védelmet nyújt a $[Na^+]_i$ -indukált (Ca^{2+})i emelkedéssel szemben. Ezt alátámasztják az NCX-gátlás és NCX+CAR-alkalmazások közel azonos hatásai.

A cariporid lecsökkent hatékonyságának magyarázata valószínűleg az aritmogén szubsztrátra kifejtett védő hatásának inaktivációja; a kombinált csoportokban az NCX-gátlószer egyedi antiaritmiás hatással ellensúlyozza a cariporid AP-diszperzió-fokozódást gátló hatását és helyreállítja a szívizom reentry-aritmiák iránti érzékenységet. Az indirekt proaritmiás hatás nyilvánvalóan nem jelenik meg, ha a cariporidot önmagában alkalmazzuk. A hatás eltűnése („loss of action”) a SEA0400 és ORM-10103 szignifikáns fwdINCX-gátló hatásának direkt következménye lehet. Az eredmények alapján ugyanis feltételezhető, hogy az önmagában alkalmazott cariporid anti-VF hatása a térbeli és/vagy időbeli heterogenitások fibrilláció kiváltásához szükséges kritikus szint alá csökkentésében nyilvánul meg. Ezért a fwdINCX egyidejű gátlása, mivel ilyenkor a sejtek Ca^{2+} ciklusának normalizálásához szükséges Ca^{2+} i eltávolító transzportaktivitás is gátlódik, a heterogenitás növeléséhez vezethet. Ez a hatás azokban a sejtekben, amelyekben az iszkémia szintje alacsony és a (Ca^{2+})i terhelés mérsékelt, kevésbé jelentős, mint azokban a sejtekben, amelyekben a (Ca^{2+})i emelkedés markáns. Másrészt, nem iszkémiás myocardiumban az NHE-gátlás hatása nem jelenik meg, mivel normál pH esetén az NHE nagyrészt inaktív. Ezzel szemben az NCX-gátlás befolyásolja a Ca^{2+} i-háztartást, valamint az

AP kinetikáját, de iszkémiás és nem iszkémiás myocardiumban eltérő mértékben. Ezért a gátlószerek kombinált alkalmazása esetén a másodlagos fwdINCX-gátlás a heterogenitások csökkentése helyett azok fokozódásához vezet, végső soron visszánövelve azt a kritikus szint fölé, s ezáltal semlegesíti az NHE-gátlás hatékony VF-gátló hatását. A hipotézis érvényességének igazolásához további kísérletek szükségesek.

Következtetések

Vizsgálataink célja a Ca^{2+} -függő szívbetegségekben sokszor kritikus szerepet játszó NCX szelektív gátlása, mint kardioprotektív antiaritmiás stratégia, hatékonyságának elemzése volt. Megállapítottuk, hogy a gátlás effektíven csökkenti az iszkémia/reperfúzió során kialakuló, a fokozott revINCX aktivitás által indukált, Ca^{2+} i-túlterhelést és triggerelt aritmiákat, valamint jelentősen javítja a sejtek túlélését. Ugyanakkor kardioprotektív, antiaritmiás hatékonyságát behatárolja, hogy alig gátolja az AP és a nyugalmi membránpotenciál aritmogén perturbációit. További lényeges megfigyelés, hogy a kevésbé szelektív SEA0400 és a jóval szelektívebb ORM-10103 hatásai lényegében megegyeznek. Ez visszamenőleg validálhatja a SEA0400 alkalmazásával kapott megfigyeléseket.

Bár a másik kritikus iontranszporter, az NHE gátlásával kapcsolatos klinikai eredmények nem kielégítőek, az NHE-blokád és egy másik protektív beavatkozás kombinációja eredményes stratégiát jelenthet. Ugyancsak perspektivikus stratégia lehet az NCX-gátlás kombinációja az LTCC, foszfolamban, vagy mitokondriális PTP gátlásával. Akut Ca^{2+} -tútelődés kivédésére ígéretes alternatívát kínál a fwdINCX szelektív gyorsítása, de potenciális veszélyt jelenthet a diasztolés depolarizáció fokozódása és triggerelt aritmiák kialakulása. Végül érdemes lehet a gyógyszerfejlesztők figyelmét felhívni a szelektív revINCX-gátlószerek megjósolható jelentős hatékonyságára a Ca^{2+} i-túlterhelés indukálta károsodások kivédésére.

Irodalom

1. Amran MS, Hashimoto K, Homma N. Effects of sodium-calcium exchange inhibitors, KB-R7943 and SEA0400, on aconitine-induced arrhythmias in guinea pigs in vivo, in vitro, and in computer simulation studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 83–9. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.066951>
2. Satoh H, Ginsburg KS, Qing K, et al. KB-R7943 block of Ca^{2+} influx via Na^+/Ca^{2+} exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca^{2+} overload in rat ventricular myocytes. *Circulation* 2000; 101: 1441–6. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.12.1441>
3. Nakamura A, Harada K, Sugimoto H, et al. [Effects of KB-R7943, a novel Na^+/Ca^{2+} exchange inhibitor, on myocardial ischemia/reperfusion injury]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1998; 111:105–15. <https://doi.org/10.1254/fpj.111.105>
4. Lu HR, Yang P, Remeysen P, et al. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats: a role of Na^+ and Ca^{2+} influx. *Eur J Pharmacol*. 1999; 365: 233–9. <https://doi.org/10.1016/S0014->

2999(98)00878-4

5. Mukai M, Terada H, Sugiyama S, et al. Effects of a selective inhibitor of Na⁺/Ca²⁺ exchange, KB-R7943, on reoxygenation-induced injuries in guinea pig papillary muscles. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 121–8. <https://doi.org/10.1097/00005344-200001000-00016>
6. Woodcock EA, Arthur JF, Harrison SN, et al. Reperfusion-induced Ins(1,4,5)P3 generation and arrhythmogenesis require activation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1861–9. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1450>
7. Elias CL, Lukas A, Shurraw S, et al. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by KB-R7943: transport mode selectivity and antiarrhythmic consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H1334–45.
8. Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, et al. Protective effects of SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, on myocardial ischemia-reperfusion injuries. *Eur J Pharmacol* 2003; 458: 155–62. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02732-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02732-2)
9. Nagasawa Y, Zhu BM, Chen J, et al. Effects of SEA0400, a Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in the in vivo dogs. *Eur J Pharmacol* 2005; 506: 249–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.11.011>
10. Miyamoto S, Zhu BM, Kamiya K, et al. KB-R7943, a Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, does not suppress ischemia/reperfusion arrhythmias nor digitalis arrhythmias in dogs. *Jpn J Pharmacol* 2002; 90: 229–35. <https://doi.org/10.1254/jjp.90.229>
11. Lengyel C, Varró A, Tábori K, et al. Combined pharmacological block of I(Kr) and I(Ks) increases short-term QT interval variability and provokes torsades de pointes. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 941–51. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707297>
12. Szepesi J, Acsai K, Sebok Z, et al. Comparison of the efficiency of Na⁺/Ca²⁺ exchanger or Na⁺/H⁺ exchanger inhibition and their combination in reducing coronary reperfusion-induced arrhythmias. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66: 215–226.
13. Kormos A, Nagy N, Acsai K, et al. Efficacy of selective NCX inhibition by ORM-10103 during simulated ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*. 2014; 740:539–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.033>
14. Mentzer RM, Jr., Lasley RD, et al. Intracellular sodium hydrogen exchange inhibition and clinical myocardial protection. *Ann Thorac Surg*. 2003; 75:S700–8. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(02\)04700-8](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(02)04700-8)
15. Khananshvil D. The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) - structure, function, and regulation in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2013; 34: 220–35. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.003>
16. Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. Abnormalities of Ca²⁺ metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Failure Reviews* 2009; 14: 213–24. <https://doi.org/10.1007/s10741-009-9146-x>
17. Aye NN, Xue YX, Hashimoto K. Antiarrhythmic effects of cariporide, a novel Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on reperfusion ventricular arrhythmias in rat hearts. *Eur J Pharmacol*. 1997; 339: 121–7. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01371-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01371-X)
18. Zhang Y, Chen J, Zhang F, et al. Cariporide attenuates myocardial ischaemia, reperfusion injury and apoptosis in isolated rat hearts. *Acta Cardiologica*. 2006; 61: 637–41. <https://doi.org/10.2143/AC.61.6.2017963>
19. Wirth KJ, Maier T, Busch AE. NHE1-inhibitor cariporide prevents the transient reperfusion-induced shortening of the monophasic action potential after coronary ischemia in pigs. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 192–7. <https://doi.org/10.1007/s003950170070>
20. Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D, Padilla F, et al. Pre-treatment with the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide delays cell-to-cell electrical uncoupling during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 109–17. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00840-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00840-4)