

**A Na⁺/Ca²⁺ ioncserélő szelektív gátlásának inotróp
következményeit befolyásolja az aktuális ion egyensúly**

PhD Tézis

Kinga Oravecz, MSc



Témavezető:

Dr. Norbert Nagy, PhD

Szegedi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Szeged

2018

Közlemények

A disszertáció alapját képező irodalmak

I. Oravecz K, Kormos A, Gruber A, Márton Z, Kohajda Z, Mirzaei L, Jost N, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Papp JG, Nánási PP, Antoons G, Varró A, Acsai K, Nagy N.

Inotropic effect of NCX inhibition depends on the relative activity of the reverse NCX assessed by a novel inhibitor ORM-10962 on canine ventricular myocytes.

Eur J Pharmacol. 2018 Jan 5;818:278-286

II. Geramipour A, Kohajda Z, Corici C, Prorok J, Szakonyi Z, **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.

Can J Physiol Pharmacol. 2016 Oct;94(10):1090-1101

III. Prorok J, **Oravecz K**, Gazdag P, Frey Zs, Vigh D, Nagy N, Acsai K, Tóth A, Jost N, Papp JGy, Varró A

Selective inhibition of the NCX attenuates the hypokalaemia-induced elevated intracellular Ca^{2+} load and decreases the incidence of ventricular arrhythmias

Manuscript in preparation

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

I. Acsai K, Nagy N, Marton Z, **Oravecz K**, Varro A.

Antiarrhythmic potential of drugs targeting the cardiac ryanodine receptor Ca^{2+} release channel: case study of dantrolene.

Curr Pharm Des. 2015;21(8):1062-72. Review.

Rövidítések jegyzéke

AP: akciós potenciál

APD: akciós potenciál időtartama

ATP: adenosine-trifoszfát

AU: önkényes egység

CaM: calmodulin

cAMP: ciklikus adenosine-monofoszfát

CDI: Ca^{2+} függő inaktiváció

CICR: Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulás

cAMP: cyklikus adenosine-monofoszfát

CDI: Ca^{2+} függő inaktiváció

CaT: Ca^{2+} transiens

CS: sejt rövidülés

DAD: kései utódepolarizáció

DD: diastolikus depolarizáció

DIDS: 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfon sav

EAD: korai utódepolarizáció

ECC: excitációs-kontrakciós kapcsolás

$[\text{Ca}^{2+}]_i$: intracellular Ca^{2+}

GYKB-6635: ((4-amino-1-(((1R,2S,3S,5R)-2,3-dihydroxy-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]heptan-2-yl)-methyl)pyrimidin-2(1H)-one)

I_{CaL} : L-típusú Ca^{2+} áram

I_{CaT} : T-típusú Ca^{2+} áram

I_{Na} : Na^+ áram

I_{NaL} : Kései Na^+ áram

I_{NaK} : Na^+/K^+ pumpa áram

NCX: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ioncserélő

NKA : Na^+/K^+ ATPáz

ORM-10103 : NCX gátlószer

ORM-10962: NCX gátlószer

PMCA : sarcolemmai Ca^{2+} ATPáz

RyR: ryanodine receptor

SERCA2a: szívizmszöveti sarcoplasmaticus reticulum Ca^{2+} ATPáz

SR: sarcoplasmaticus reticulum

Bevezetés

A keringési rendszer megbetegedései még napjainkban is magas mortalitási rátával bírnak. Ezen betegségek továbbra is kihívást jelentenek az orvostudomány és az egészségügyi ellátás számára. Noha a szívritmus zavarok és a szívelégtelenség terápiájában sokféle gyógyszer áll a rendelkezésünkre, mégis a súlyos, olykor halálos mellékhatások miatt egyre növekvő az igény új terápiás célpontok és gátlószerek megismerésére. A lehetséges terápiás célpontok közül kitűnik a nátrium-kalcium ioncserélő, melynek kardinális szerepe van a súlyos aritmiák kialakulásában. Noha szelektív nátrium-kalcium ioncserlő gátló még nem áll rendelkezésünkre, ennek ellenére fontos a lehetséges jelöltek megismerése és vizsgálata a jövőbeni gyógyszerkutatások számára.

A szívizomsejtek kalcium homeosztázisa

A calcium homeosztázisszívizom sejtek estén, a calcium ionok, a feszültség-függő ioncsatornák és a sejtek kontrakciójának finom hangolásán alapul, melyet exitációs-kontrakciós kapcsolásnak nevezünk. Az exitáció-kontrakció kapcsolás szabályozása gyorsan és precízen szabályozott a sarcolemma gyors depolarizációja által. Az egész folyamat legvégén sejtösszehúzódnás történik. A folyamat három nagyobb rész folyamatra, a calcium influxra, calcium-releasere és a calcium-influxra osztható.

Calcium influx

A calcium influx során számos folyamat segíti a calcium ionok sejtbe áramlását, mint például a nátrium-calcium ioncserélő reverz működési módja, a nátrium csatornák, de legfőbb szerepe az L és T típusú calcium csatornáknak van. T típusú calcium csatornák a szív nodális szöveteiben, míg Ltípusú calcium csatornák a szív kamrai és pitvari szöveteiben találhatóak. Az L típusú calcium csatornákon beáramló ionokból kevés mennyiség is elegendő a sarkoplazmatikus reticulum ryanodine receptorain keresztül kiváltható nagy mennyiségű calcium release mechanizmusához, ezt nevezzük kalcium által kiváltott kalcium release-nek. A calcium influx során a sejtbe áramló ionok mennyiségét az SR calcium releasenek nagysága és időtartama szabályozza, ez a feedback mechanizmust, calcium függő inaktiváció.

Calcium release

A sarcoplazmatikus reticulum legfontosabb feladata a calcium ionok raktározása, speciális calcium kötő fehérje, a calsequestrin által. Amikor a trigger calcium ion eléri a RyR receptorokat, akkor azokon keresztül nagy mennyiségű calcium ion áramlik ki az intracelluláris

térbe. A kiáramló calcium megfigyelhető és nyomonkövethető fluoreszcens optikai technikák révén.

Calcium eflux és a calcium visszavétel

A calcium ionok visszavétele két fő mechanizmus során történik. A szisztolés calcium ionok nagyrészt az SR calcium pumpája a SERCA vesszi vissza, míg kisebb részét a nátrium-calcium ioncserélő forward működési módja távolítja el a szívműködésből. Az arány 72-27%. Legkisebb részben az ATP-független calcium transzporter a PMCA járul hozzá a calcium eltávolításhoz és calcium homeosztázis fenntartásához.

A nátrium-calcium ioncserélő szerepe és farmakológiája szívműködésben

Szívműködés sarcolemmájában a nátrium-calcium ioncserélő NCX1. isoformája található meg. A tíz transzmembrán dimerből áll, a calcium kötő loop az 5. és 6. transzmembrán domain közt található. Az ioncserélő működése elektrogén, működése során 3 nátrium iont cserél ki egy calcium ionra. Az ioncserélő két működési módját, a forward és a reverz működési módot különböztetjük meg. Forward működési során, amikor calcium távolítódik el a sejtől, inward áram, míg reverz mód során outward áram generálódik. Az ioncserélő működésének irányát befolyásolja az aktuális membrán potenciál, illetve az intra és extra celluláris nátrium és calcium ionok mennyisége is. A forward mód működését a pozitívabb membrán potenciál, míg a reverz működési módnak a negatívabb membrán potenciál értékek kedveznek. A reverz működési mód normal fizioiógias körülmények közt csak az akciós poenciál elején, a calcium influx során figyelhető meg 30-50 ms ig.

Patológias körülmények esetén, mint például szívelgtelenség során az ioncserélő működése eltolódik a reverz irányba, hozzájárulva az intracelluláris calcium többlet kialakulásához, mely az SR calcium vesztésére adott kompenzációs válasz.

A nátrium-calcium ioncserélő szelektív gátlása régóta kihívások elé állítja a szív-elfiziológiával foglalkozó kutatókat, noha az ioncserélő gátlószereként számos anyag ismert, az eredmények interpretálása nehéz, mivel ezen szerek más ioncsatornákat is hatékonyan gátolnak. Amilorid analógok, bepidril és amiodarone is hatékonyan gátolja az NCX-t, de ezen molekulák nem szelektív inhibítorai az ioncserélőnek. Benzyllofenil származékok, mint a KB-R7943 és a SEA400, illetve az SN-6 részben szelektívnek és hatékonyan bizonyultak számos tanulmányban. A KB-R7943 az ioncserélő reverz módját gátolta hatékonyabban, míg a SEA400 még hatékonyabbnak és specifikusabbnak bizonyult., noha mindkét vegyület kismértékben gátolt más ioncsatornákat is, mint például I_{Na} , I_{CaL} , I_{K1} csatornákat. Az SN-6 a inkább az outward NCX áramra volt gátló hatással, számos más

ioncsatorna mellett (I_{Na} , I_{CaL} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}), mely végül az akciós potenciál megrövidüléséhez vezetett a kísérletekben. A két legújabb és legszelektívebb NCX gátlószer napjainkban az ORM-10103 és ORM-10962. Az ORM-10103 sikeresen gátolja az NCX reverz és forward működését is, illetve kísérletes körülmények közt sikersek csökkentette az *in vitro* indukált EAD és DAD gyakoriságát kutya szívpreparátumon. Noha az ORM-10103 20 %-os gátlást fejt ki I_{Kr} áramra, de nem befolyásolja atöbbsi ionáramot. A legújabb NCX inhibitor az ORM-10962, mely alacsonyabb EC_{50} értékkel és ígéretes antiarrithmiás profillal bír.

Az NCX gátlás lehetséges klinikai vonatkozásai

A szív megbetegedései közül, különösképp hypokalémiás kórképek esetében megnövekszik az intracelluláris nátrium szint, mely csökkenti a Na^+/K^+ pumpa aktivitását és működését, ezáltal jelentősen fokozva areverz NCX működési módját, mely intracelluláris calcium overloadhoz, illetve a szív megváltozott automációjához vezet. Ennek ismeretében feltételezhető, hogy az NCX mindkét működési módjának szelektív gátlásával antiarrithmiás hatás váltható ki, a nátrium indukálta calcium overload esetén. Noha az eddigi irodalmi adatok meglehetősen ellentmondásosak, *in vivo* kísérletek során az EAD-ok számát a SEA400 jelentősen csökkentette, de az okonitin által kiváltott arrithmiák esetén ez nem volt megfigyelhető, továbbá szignifikánsan növelte a Langendorff perfúziós kísérletek során az ischemia-reperfúzió okozta arrithmiák incidenciáját és időtartamát. Az intézet munkatársai bizonyították, hogy a SEA400 nem csökkentette a QT szakasz megnyúlását dofetilide adása után, illetve nem volt alkalmas a Torsades de Pointes tachyarrhythmiák (TdPs) megelőzésére Langendorff perfundált nyúlszíveken.

Ellentmondásosak az NCX gátlás inotróp következményeivel foglalkozó eredmények, kísérletes körülmények közt a SEA400 nem tudta növelni a calcium tranziens mértékét nyúl, kutya és tengerimalac szívizomsejteken, míg a fentebb említett két új NCX gátlószer használata során pozitív inotróp következményeket figyeltek meg patkányszívizomsejtek esetén.

Ezen erdmények tükrében az NCX gátlás pozitív inotróp következményei ellentmondásosak, illetve nagyban befolyásolhatja az akciós potenciál alakja, az intracelluláris nátrium és calcium ionok szintje, illetve az ioncserélő működési módjai közti aktuális egyensúly.

Célkitűzések

A tézisben ismertetett munka során két kérdésre kerestük a választ:

- I. Az új és szelektív NCX gátlószer a GYKB-6635 mekkora gátlással bír az NCX áramra?
- II. Megvizsgálni, hogyan befolyásolja az aktuális ionok transzportja az NCX gátlás lehetséges pozitív és negatív inotróp következményeit a legújabb és legszelektívebb NCX gátlószer, az ORM-10962, különféle kísérletes körülmények közt (alacsony Na^+ , magas Ca^{2+} , alacsony K^+)?

Anyag és módszer

Szívizomsejtek preparálása

Thiopenthalal (30 mg/kg i.v./i.p.) altatott kutya és patkány szíveket, a melkast megnyitva gyorsan eltávolítottuk. Langendorff- perfúziós és szegment perfúziós módszerrel, enzimes disszociációval jutottunk a cardiomyocytákhoz.

Az NCX áram mérése

Az áram mérések patch clamp technikával, whole cell konfigurációban történtek. A mérések során többféle feszültség protokollt, alkalmaztunk.

A GYKB-6635 hatásának vizsgálására, a klasszikus "ramp" protokollt, ahol a gátlás mértékének meghatározására NiCl -t használtunk pozitív kontrollként. A kísérletek során az alábbi oldatokat használtuk: K^+ -free oldat, (NaCl 135, CsCl 10, CaCl_2 1, MgCl_2 1, BaCl_2 0.2, NaH_2PO_4 0.33, TEACl 10, HEPES 10, glucose 10, ouabain 20 μM , nisoldipine 1 μM , lidocaine 50 μM , pH 7.4) Pipetta oldat: CsOH 140, aspartic acid 75, TEACl 20, MgATP 5, HEPES 10, NaCl 20, EGTA 20 and CaCl_2 10, pH 7.2. A pipette oldatban lévő $[\text{Ca}^{2+}]$ mennyisége 160 nM volt.

A többi kísérlet sorozatban az NCX áramot intakt calcium homeosztázis jelenlétében mértük. A sejt kontrakciók kiváltása 1 Hz frekvenciás téringerlésseltörtént, míg 0 vagy + 30 mV feszültség pulzosok apipettán keresztül aktiválták az I_{CaL} és az NCX áramokat, a pipetta oldat nem tartalmazott sem EGTA sem Ca^{2+} -t.

Az L-típusú calcium áram mérése

Azon kísérletek során, ahol szükség volt az L-típusú calcium áram mérésére, a kísérletek során HEPES tartalmú Tyrode oldatot és 3mM 4-aminopyridine, alkalmaztunk, mely blokkolja a kálium áramokat.. Az oldat összetétele: KOH 40, KCl 110, TEACl 20, MgATP 5,

BAPTA 10, HEPES 10 és GTP 0.25, pH 7.2). I_{CaL} áram kiváltása 400 ms időtartalmú, 0mV-os depolarizáló feszültség pulzussal történt, a holding potenciál -80 mV volt. Egy rövid – 40 mV-os prepulzussal történt a nátrium áram inaktiválása.

A sejtrövidülés mérése

Az izolált patkány kamrai szívizom sejtek kontraháltatása, 1Hz frekvenciájú téringerléssel történt. A kísérletek során a sejtek perfúziója, normal és alacsony kálium tartalmú Tyrode oldattal, ORM-10962 nélkül és az inhibitor jelenlétében történt. A perfúzió oldatonként 10 percig tartott. A kísérlet időtartalma alatt termosztát segítségével a sejteket és az oldatokat 37 °C-on tartottuk. A sejt rövidülés két percenként került video felvételre, majd a kiértékelésére a MatLab-alapú CellContract 1.0 software-t használtuk

A calcium tranziens mérése

A Fluo4-AM el töltött kutya kamrai cardiomyocytákat (5 μ M), 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A sejt szuszpenzió fölcseppentése után, a sejtek kontrakció kiváltása téringerléssel, 1 Hz-es frekvenciával történt. A calcium tranzienseket 480 nm-es gertjesztő fény jelenlétében detektáltuk, invert mikroszkóp segítségével. Ca^{2+} szignálalok detektálása és digitalizálása foton számláló fotomultiplierrel történt.

Eredmények

I. A GYKB-6635 hatása az NCX áramra

GYKB-6635 hatékonyan gátolta az NCX áramot mikromólos koncentrációban, annélkül, hogy gátolta volna az I_{Ca} vagy a főbb K^+ áramokat (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}). Továbbá hatásosan csökkentette a DAD által kiváltott arrithmiákat, Langendoff perfundált tengerimalac szíveken..

II. Marginális pozitív inotróp hatás normal kísérletes körülmények közt

Previous study from our laboratory demonstrated that application of 1 μ M ORM-10962 has approximately 90% inhibitory effect of NCX, measured by conventional ramp protocol. These results justify the 1 μ M chosen concentration in our experiments. Since the relative contribution of the reverse mode NCX activity is believed to be moderate under baseline conditions, consequences of forward mode inhibition should be more pronounced. Therefore an approximately 90% forward mode NCX blockade should produce a significant Ca^{2+} accumulation in the SR with a following increase in Ca^{2+} release and positive inotropy. Surprisingly, under normal conditions the application of ORM-10962 caused a marginal positive inotropic action. The underlying mechanisms may consist of two main categories: (1)

possibly ORM-10962 causes an asymmetrical blockade on NCX under normal Ca^{2+} handling and (2) reverse and forward mode inhibition may have asymmetrical consequences in the Ca^{2+} handling.

Az NCX gátlás inotróp következménye függ az NCX reverz NCX aktivitás mértékétől

A significant negative inotropic action of NCX blockade was described in our previous study, when reverse mode was facilitated by low NaCl containing Tyrode solution. According to these previous results in this study we report that application of ORM-10962 reduced the SR Ca^{2+} content following an earlier enhancement of the reverse mode of NCX activity. In our earlier work, similar observations were made with a previous NCX inhibitor ORM-10103. Where ORM-10103 completely reversed or prevented the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, when reverse mode was facilitated by veratrine or ATXII. For comparison, our previous and present study demonstrated that the positive inotropic effect of the forward mode blockade (when reverse mode was suppressed) was considerably weaker than was expected during ~ 90 % inhibition of NCX.

Az NCX gátlás lehetséges asszimetriksága

Even though some evidences demonstrating that mode selective NCX inhibition may occur under certain experimental conditions, theoretical considerations do not support the possibility of transport mode dependent inhibition.

Previous papers demonstrated that KB-R7943 and SEA0400 preferentially block the reverse mode NCX. In our previous studies, ORM-10103 or ORM-10962 exerted balanced inhibitory effect between reverse and forward mode, therefore we assume that the possibility of asymmetrical inhibition of the reverse and forward mode as a basis for the limited positive inotropic effects can be ruled out in our experiments.

The forward mode NCX blockade may be alleviated by another potential mechanism and thus the positive inotropic effect is the possible modulatory effect of Ca^{2+} on the NCX inhibition. Such a phenomenon has been implicated in the case of KB-R7943. When SEA0400 was applied to block NCX in a previous study, some evidence was found which supporting our theory.

Az NCX gátlás asszimetriks következményei a calcium-handlingre

Asymmetrical consequence means that the ORM-10962 pharmacologically equally inhibits both mode of function, however the unequal ratio of reverse and forward mode during a cycle may cause asymmetrical effect on Ca^{2+} handling, under experimental conditions favouring the

forward mode NCX activity, the observed positive inotropy highlights the importance of adaptive changes in the balance of the Ca^{2+} influx and efflux. These mechanisms may consist of three major submechanisms in the Ca^{2+} handling:

(1) Adaptive changes in Ca^{2+} influx via I_{Ca} due to the increased submembrane $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (2) The elevated submembrane $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activates an alternative Ca^{2+} removal mechanism (e.g. the sarcolemmal Ca^{2+} ATP-ase). In this case the contribution of reverse mode NCX activity to normal Ca^{2+} handling is strongly underestimated or the importance of forward mode NCX activity in Ca^{2+} removal is overestimated. (3) Preserved inducibility of forward NCX activity by high $[\text{Ca}^{2+}]_i$ following NCX blockade.

III. Az NCX gátlás csökkenti az arrithmiák gyakoriságát a hypokalémia által kiváltott calcium overload okozta sejt kontrakciók esetén

Hypokalémia során megemelkedik az intracelluláris nátrium szint, mely az NCX reverz működési módjának kedvez, az így kialakult emelkedett intracelluláris calcium szint, esetleg calcium overload az ioncserélő forward működési módját is aktiválja. As was hypothesized, in the presence of hypokalaemic solution the Ca^{2+} transient was increased presumably after suppression of the Na^+/K^+ pump and consequential Na^+_i gain which activates Ca^{2+} influx through reverse NCX on rat isolated myocytes. This improved Ca^{2+} level was decreased after NCX inhibition which could be attributable to the outward exchanger inhibition. These results may further support the hypothesis of asymmetrical functional consequences of NCX blockade. As was expected, the adverse effects of elevated intracellular Ca^{2+} such as Ca^{2+} waves or extra beats were also suppressed. It is important to mention here that a substantial species-dependent effect was discovered between rat and dog myocytes regarding NCX inhibition mediated positive inotropy: in our previous studies on rat we found marked increase in Ca^{2+} transient and cell shortening/contraction after NCX inhibition, and we failed to reproduce this effect on dog and rabbit myocytes under normal condition. Positive inotropic effect of selective NCX inhibition was observable only after augmentation of Ca handling (independently from reverse NCX activation) which may suggest some important functional differences of forward NCX function between species. The different degree of forward NCX on Ca^{2+} extrusion between species may contribute to this discrepancy. However such interspecies difference was not observed after reverse NCX stimulation: hypokalaemia increased the intracellular Ca^{2+} load which was suppressed after ORM application, in parallel with our previous results carried out on dog myocytes. These results may implicate uniformity

of reverse NCX blockade among different species, at the same time may indicate different capacity of forward NCX for Ca^{2+} extrusion between rats and dogs.

These experiments may indicate that when the NCX balance is shifted toward facilitated reverse mode function, the NCX inhibition resulted in uniformly a decrease of the Ca^{2+} level, suggesting asymmetrical, reverse NCX-dominant inhibition. However under normal condition, positive inotropic effect was described only in rats and marginal effect was observed in the case of guinea-pig, rabbit, and dogs. These animals have considerable difference in baseline heart rate, in the action potential shape and in the underlying ionic currents which may contribute to this discrepancy. However, regarding the function of the forward NCX it is important to note that “functional capacity” of NCX may be increasing from rat to dog, providing an important reserve for Ca^{2+} extrusion. The underlying mechanism of this phenomenon is not clear, it could be related to the autoregulatory mechanism, and/or the persevered inducibility of the NCX in the presence of high Ca^{2+}_i .

Összefoglalás

1) Kimutattuk, hogy az új NCX gátlószer, a GYKB-6635 sikeresen gátolta az ioncserélő forward és reverz működési módját, továbbá nincs hatással az L-type Ca^{2+} áram kinetikájára és a főbb K^+ -áramokra. Ezért a GYKB-6635 ígéretes NCX gátlószer lehet, az ioncserélő további kísérletes vizsgálatait során.

2) A szelektív NCX gátlás az ORM10962 által, szívműködéseken a kísérletes körülményektől függően kiválthat pozitív és negatív inotróp hatást is. A csökkent intracelluláris calcium szint a reverz módnak, míg a megnövekedett intracelluláris calcium szint a forward módnak kedvez, épp ezért az egyik legfontosabb mechanizmus az SR aktuális calcium tartalma, mely erősen függ az NCX működésétől.

3) Az NCX szelektív gátlása az ORM10692 által visszafordítja a hypokalemia által kiváltott calcium overload által indukált túlzott sejtkontrakciót. Hiszen hypokalemia esetén az alacsony intracelluláris kálium szint növeli az intracelluláris nátrium szintet, a sejtek megváltozott membrán potenciálja az NCX reverz működésének kedvez. Ezen körülmények között a szelektív NCX gátlás a reverz működési módot gátolják, mely végsősoron az intracelluláris calcium szint és a sejt kontrakciók mértékének csökkenéséhez vezet.