

Tóth András – MTA doktori értekezés

„Intracelluláris Ca²⁺ homeosztázis-változások hatásainak elemzése izolált szívpreparátumokon”

Válasz Szokodi István MTA doktor opponensi véleményére

Először is szeretnék köszönetet mondani Dr. Szokodi Istvánnak, az MTA doktorának, hogy értekezésem bírálatát elvállalta és azzal behatóan foglalkozott. Köszönöm kritikus de segítő megjegyzéseit és hálás vagyok értékes észrevételeiért, elgondolkodtató kérdéseiért és elismerő szavaiért a témaválasztás fontosságát, illetve a dolgozat stílusát illetően. Köszönöm, hogy témaválasztásomat fontosnak és időszerűnek, az elvégzett vizsgálatokat gondosan megtervezettnek és koherensnek, az alkalmazott módszereket korszerűnek értékelte.

A kérdésekre és megjegyzésekre adott válaszaim:

1. Bal és jobb kamra közötti elektrofiziológiai eltérések?

Az alkalmazott kísérletes technikák nem teszik szükségessé, hogy a sejtek izolálása a bal kamrából, a multicelluláris minták izolálása a jobb kamrából történjék; a megosztásnak alapvetően praktikus okai vannak – ílymódon ugyanis egyetlen szívből mindkét típusú preparátum kinyerhető, s ezáltal jelentős költségcsökkentés érhető el. Természetesen az eredmények összehasonlításának alapvető feltétele, hogy a vizsgált ionáramok nagysága és eloszlása, illetve a Ca²⁺ homeosztázis fontosabb paraméterei vonatkozásában ne legyen a két szívfél sejtjei között lényeges kvantitatív eltérés. Ezt a kérdést kísérletesen nem vizsgáltuk, de az irodalmi adatok szerint (melyek nem kis része a debreceni kutatócsoportéhoz köthető) ez a fontos feltétel igen jó közelítéssel teljesül. A Ca²⁺-háztartás vonatkozásában a jobb és bal szívfél lényegesen nem különbözik egymástól, az AP a jobb szívfélben valamivel rövidebb, amit a depolarizáló K⁺ áramok csatornáinak kissé magasabb denzitása magyaráz.

Elektrofiziológiai szempontból jóval nagyobb, sok esetben szignifikáns különbségek igazolhatók a szívizom rétegeit alkotó endo-, epi- és midmiokardiális sejtípusok, illetve kisebb mértékben a bazális és apikális izomterületek sejtjei között. Az izolálási technikák sajátosságai miatt a sejt mérések szinte minden esetben midmiokardiális sejteken történnek. Végezetül meg kell említeni, hogy a jobb szívfélből izolált multicelluláris minták valamivel vékonyabbak, ezért a core-hypoxia kialakulási valószínűsége alacsonyabb, továbbá a ható- és jelzőanyagok penetrációja is egyenletesebb.

2. Milyen modellek bevezetésétől várható áttörés?

Számos vizsgálat igazolja, hogy elektrofiziológiai szempontból a kutyaszív tűnik legalkalmasabbnak a humán szív modellezésére. A kisebb rágcsálók szívében – az igen magas szívfrekvencia és az ebből következően jelentősen lerövidült AP következtében – a legtöbb ioncsatorna expressziója, száma és eloszlása markánsan eltér(het) a nagyobb állatok és az ember szívének ioncsatorna-összetételétől. Természetesen ez nem jelenti azt, hogy a kutya szívének ioncsatorna-összetétele és denzitása, illetve Ca²⁺ homeosztázisának legfontosabb paraméterei egy-az-egyben megegyeznek a humán szív analóg paramétereivel; pl. az I_{K1} vonatkozásában mi is szignifikáns eltérést mutattunk ki (Jost és mts., 2013). Általánosságban elmondható, hogy *adott kérdéshez* mindig található közel optimális állatmodell, ami

legtöbbször valóban a kutyaszív, de bizonyos aritmogenezissel kapcsolatos vizsgálatokat célszerűbb lehet kecskéken végezni, a pitvarfibrilláció kialakulásával/terápiájával kapcsolatos vizsgálatok céljára pedig esetenként lovakat is használnak.

Mindezek alapján fontos hangsúlyozni, hogy még a legjobbnak tartott állatmodellekből nyert kísérleti eredmények is markánsan eltérhetnek a humán szíven végzett analóg mérések eredményeitől, ezért minden esetben indokolt és szükséges az állatkísérletek eredményeit humán szíveken, szívmintákon validálni. Csakis az érthető okból nehezen elérhető, sokszor limitált számú humán mintán végzett mérések pozitív eredményei szolgáltatathatják a végső engedélyt a klinikai tesztek elindításához. Szemléletes (sajnos negatív) példa erre az NHE-gátlókkal kapcsolatos experimentális és klinikai eredmények markáns eltérése, melynek okai mindmáig nem tisztázottak.

Végezetül meg kell említeni, hogy egyes elektrofiziológiai paraméterek nagymérvű eltérése ellenére esetenként mégis megengedhetőnek véljük kis rágcsálók szívének felhasználását. Ennek részben technikai/financiális okai lehetnek – nagyszámú állatra van szükség (sok kísérleti csoport), vagy egyes hatóanyagok, fluoreszcens tracerek kiemelkedően nagy fajlagos költsége. Másrészt nemegyszer jól kidolgozott, sokszorosán validált kísérleti modellek állnak rendelkezésre, mint pl. a patkányszíven alkalmazott regionális iszkémia/reperfúziós modell. Természetesen ezekben az esetekben még sokkal inkább kiemelkedő jelentősége van az eredmények humán szíven történő validálásának.

Ami a lehetséges gyors áttörést illeti, a Jelölt ebben a kérdésben kissé bizonytalan. A szívbetegségek jelenleginél hatékonyabb kísérletes modellezését – különösen a szívizom markáns remodelingjével járó krónikus betegségek (egyes kamrai aritmiák, pitvarfibrilláció, szívelégtelenség) vonatkozásában – erősen behatárolja a patomechanizmusokat strukturális szempontból is megfelelően tükröző (pl. aritmogén szubsztrát) állatmodellek hiánya és az elérhető modellek kulcsparamétereinek szignifikáns eltérése a beteg humán szívektől, másrészt – és főleg – rendkívüli mértékben megnehezíti a klinikai beavatkozást igénylő humán szívek állapot-paramétereinek rendkívül nagyfokú heterogenitása. Ezért véleményem szerint a várható fejlődés a nagy ugrás helyett a sok kis lépés irányába mutat; a komplex klinikai állapotot (pl. krónikus szívelégtelenség) sokkal jobban megközelítő állatmodelleken, a humán szív működés elektrofiziológiai vonatkozásainak mélyebb feltárásán (még kevésbé ismert ioncsatornák karakterizálása, stb.), a használt hatóanyagok szelektivitásának és/vagy kinetikájának optimalizálásán (pl. gyors kinetikával kötődő/leváló NCX-gátlószerek, szelektív NCX aktivátorok kifejlesztése), végül, de nem utolsósorban a jelenleginél jobban validált és optimalizált számítógépes (in silico) modellek használatán keresztül.

3. A CaMKII esetleges "beat-to-beat" kinetikája? In vitro eredmények in vivo érvényessége?

Az I_{K1} -et generáló $K_{ir2.x}$ csatornák szabályozása rendkívül komplex; az elkülönült modulációs jelutak (PKA, PKC, CaMKII, $[Ca^{2+}]_i$) egyidejűleg hatnak a csatornára, ezáltal jöhet létre az I_{K1} nagyságának és kinetikájának az APD megfelelő adaptációját elősegítő finomhangolása. Ennek következtében a CaMKII pillanatnyi aktivitását, a $K_{ir2.x}$ csatornára kifejtett hatását közvetlen módon tanulmányozni csak speciális, nem feltétlenül fiziológiás körülmények között lehet. Az általunk is használt kísérleti felállásban két másik, fiziológiás körülmények között folyamatosan aktív jelút (PKA, PKC) nagy valószínűséggel nem, vagy csak minimálisan aktiválódott, így az I_{K1} pillanatnyi értéke szinte kizárólag a CaMKII aktivitásától függött, ami ez esetben lényegében (bár komplex módon) a $[Ca^{2+}]_i$ függvénye.

Régóta ismert, hogy $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplex bekötődése hiányában a legtöbb (de nem összes) CaMKII molekula – a katalitikus domének autoinhibíciója következtében – inaktív állapotban van. Az enzim autofoszforilációja $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ affinitását közel 1000-szeresére fokozza (CaM trapping), egyidejűleg jelentősen megnyújtva a CaMKII aktív állapotának időtartamát. Az így kialakuló „autonóm” aktivitás tovább növeli az aktív állapot élettartamát – ez a CaM komplex disszociációját követően is megmarad – ezáltal a CaMKII aktivált állapotának időtartama jóval hosszabb lehet a CaT időtartamánál és az eredeti aktiváló stimulus megszűnését követően (diasztolé alatt) is fennállhat – azaz a CaMKII „ Ca^{2+} -dependens memóriával” rendelkezik. Ugyanakkor a nem aktivált (azaz nem autofoszforilált) enzim markánsan eltérő deaktivációs kinetikát mutat; a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nyugalmi szintre csökkenésével párhuzamosan a Ca^{2+} -CaM komplex leválik az enzimről, és az rövid időállandóval inaktiválódik. Mindezekből következően nehéz megbecsülni a CaMKII aktivitásának időskáláját. Amennyiben az adott intracelluláris mikrodoménben az enzimmolekulák nagy része foszforilálatlan, az I_{K1} követhet beat-to-beat kinetikát; ezzel szemben a CaMKII aktiválódása esetén CaM trapping tulajdonsága és autonóm aktivitási hajlama valószínűtlenné teszi, hogy aktivitás-kinetikája képes lenne követni a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fiziológiás, beat-to-beat változásait.

A CaMKII aktivitás-változására vonatkozó felvetés jogos, mivel az ismertett kísérletekben valóban nem mértük közvetlenül az enzim aktivitásának időfüggését. Idézett állításunkat egyrészt néhány ($n = 3$) kiegészítő kísérlet eredményeire alapoztuk, melyekben az I_{K1} kinetikájának beat-to-beat változásait kíséreltük meg folyamatosan követni és megbecsülni (hangsúlyozottan csak megbecsülni). Másrészt állításunkat indirekt módon alátámaszthatják a 21/B ábra alsó részén látható egyedi I_{K1} görbék; bár a csúcsáram-amplitúdókban jelentős különbség mutatkozik, a fel- és lefutási kinetikák közötti $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pip}}$ -függő eltérések kisebbek, minthogy az I_{K1} változásai ne követhessék a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beat-to-beat változásait.

Működési sajátosságai alapján a CaMKII intracelluláris stimulusjel integráló szerepet játszik; eszerint aktiválódásának mértékét és kinetikáját az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megelőző időszakra jellemző paraméterei határozzák meg. Az alkalmazott protokoll során más, fiziológiás körülmények között fontos jelutak (PKA, PKC) nem, vagy alig aktiválódtak, így a CaMKII ezen körülmények között mutatott aktivitására vonatkozó megfigyelések *in vivo* viszonyokra közvetlenül nem vihetők át. Figyelembe véve, hogy az enzim aktiválódásának mértéke *in vivo* is elsősorban a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ függvénye, a mértéktartó indirekt következtetések vélhetően mégis helytállóak.

4. A CaMKII-nek és tartós (kóros) aktivációjának hatása a repolarizációs rezerv K^+ áramaira.

A CaMKII a szarkolemma Na_v csatornáin és több, a Ca^{2+} -háztartásban résztvevő proteinen (pl. LTCC pórusformáló és β alegységei, foszfolemmán (PLM), RyR, SERCA2) kívül több feszültségfüggő K^+ (K_v) csatornát is foszforilálhat. Közvetlen, jól ismert és jól dokumentált modulátor hatása van az AP korai repolarizációjáért felelős tranziens outward K^+ áram (I_{to}) 4-aminopiridin érzékeny komponensét (I_{to1}) humán szívben túlnyomórészt generáló Kv4.3 (KCND3) és Kv4.2 (KCND2), illetve a nyúlban domináns Kv1.4 (KCNA4) csatornákra. Érdekes módon a Kv4.x csatornatípusokra kifejtett hatásai között kvantitatív különbségek vannak: a Kv4.3 csatornákat már alacsony (diasztolés) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett is, a Kv4.2 csatornákat viszont csak viszonylag magas (szisztolés) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett képes foszforilálni. A Kv4.3 CaMKII-mediált foszforilációja lassítja a csatorna inaktivációját és gyorsítja helyreállítását az inaktivációból; így az I_{to1} kinetikájának CaMKII-indukált változásai befolyásolják az AP időtartamát. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy *in vivo*, akár fiziológiás, akár patológiás körülmények között, a CaMKII csak egyike a szívizomsejtekben aktív, nem szelektív, a Kv4. csatornákat foszforilálni

képes intracelluláris kinázoknak. A kérdés komplexitását jól mutatja, hogy egy számítógépes nyúl modellben (Grandi és mts., 2007) az epikardiális szívimsejtekre jellemző magas I_{to} expresszió esetén a CaMKII fokozott expressziója (az I_{to} markáns növekedése következtében) APD rövidüléshez, ezzel szemben az endokardiális szívimsejtekre jellemző mérsékelt I_{to} expresszió esetén – mivel az I_{NaL} és I_{CaL} aktiváció APD nyújtó hatása túlkompenzálta az I_{to} aktiváció APD rövidítő hatását – végső soron APD megnyúláshoz vezetett. Érdekes azt is megjegyezni, hogy a Kv4.3 csatornák, mivel a CaMKII CaM-kötő helyéhez kompetitív módon kapcsolódhatnak, CaMKII rezervoár funkciót töltenek be, ezáltal modulálják annak aktivitását. A Kv4.3-kötött enzim az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedését követően sem aktiválódik.

A CaMKII és a repolarizációs rezervben kiemelkedő szerepet játszó késői K^+ áramok (I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}) közvetlen kapcsolatára jóval kevesebb irodalmi adat áll rendelkezésre. A pitvarban előforduló, az I_{Kur} áramért felelős Kv1.5 (KCN A5) csatornák aktivitásának CaMKII-dependens modulációját több szerző leírta, bár a bizonyítékok túlnyomó része indirekt. Az I_{Kr} (hERG, KCNH2) és I_{Ks} (Kv7.1, KCNQ1) áramokat generáló csatornák működését jelen ismereteink szerint a CaMKII nem befolyásolja.

A humán krónikus szívelégtelenség kialakulásával/progressziójával kapcsolatban számos, egymással komplex kölcsönhatásban álló ioncsatorna kóros működését igazolták, ezért még mindig meglehetősen nagy a bizonytalanság abban a kérdésben, melyek a szív malignus hipertrófiáért, a szívelégtelenséghez vezető strukturális és elektrofiziológiai változások iniciálásáért és progressziójáért felelős *elsődleges* patomechanizmusok, illetve melyek a kompenzatorikus jellegűek ioncsatorna változások. Az irodalmi adatok szerint krónikus szívelégtelenségben – több más endogén kinázzal együtt – a CaMKII is fokozottan expresszálódik (Hoch és mts., 1999; Kirchhefer és mts., 1999; Ai és mts., 2005) és számos ioncsatorna, többek között a CaMKII-dependens kálium csatornák aktivitása is jelentősen változik. Bár az állatmodellekből származó adatok/következtetések csak megfelelő limitációkkal alkalmazhatók a humán szívelégtelenségre, egyes kísérleti eredmények fontos implikációkkal rendelkezhetnek.

Tachycardia-indukált kutya szívelégtelenség modellben a kamrai Kv4.3 protein expressziója és az I_{to} denzitása szignifikánsan csökken (Zicha et al., 2004). Ezt humán szívelégtelenségben is igazolták (Kaab és mts., 1998; Zicha és mts., 2004). A csökkent I_{to} denzitás következtében az APD és QT intervallum megnyúlik (Barry és mts., 1998). Hasonló változásokat láttak tachycardia-indukált nyúlshíven (Rose, 2005), bár érdekes módon a csökkent Kv1.4, Kv4.2 és KChIP2 mRNS szintek mellett a Kv4.3 mRNS szint nem változott. A Kv4.2 és KChIP2 proteinek expressziója csökkent, viszont a Kv4.3 és Kv1.4 csatornáké nem változott.

A változások háttérmechanizmusainak megértését nehezíti, hogy az eredmények ellentmondásosak. Nyúl szívimsejtekben a CaMKII δ enzim rövidtávú túlexpressziója az I_{to} denzitás fokozódásához vezet (Wagner és mts., 2009). Hasonló következtetéseket vontak le *in silico* modellekből is (Grandi és mts., 2007). Egy másik vizsgálatban a megemelkedett I_{to} háttérét képező Kv4.2/4.3 csatornák pórusformáló alegységeinek expressziójában nem találtak eltérést, csak a KChIP2 alegység downregulációját sikerült kimutatni (Li és mts., 2006). Egyes adatok alátámasztani látszanak a feltételezést, hogy a CaMKII-nek tulajdonított változásokért részben a SAP97, egy MAGUK (azaz membrane-associated guanylate kinase) protein felelős. A rendkívül komplex kölcsönhatások részleteinek tisztázásához számos további vizsgálat szükséges. Érdekes megemlíteni, hogy egy friss közlemény (Mizukami és mts., 2015) szerint spontán hipertenzív patkányokban a CaMKII foszforilációját követően a Ca^{2+} -aktivált SK2 csatornák árama is megnő.

5. Mi lehet krónikus szívelégtelenségben az előnyösebb stratégia, a CaMKII globális, vagy egyes célpontjainak szelektív modulációja?

A CaMKII-nek, mint lehetséges terápiás célpontnak, kiemelkedő jelentőséget biztosít az intracelluláris jelutakban betöltött centrális szerepe. Az enzim az egyik legfontosabb Ca^{2+} szignál transducer, melyre számos, hipertrófiához, aritmogenezishez és szívelégtelenséghez vezető szignálút konvergál. Krónikus szívelégtelenségben a szív fokozott aritmiás hajlamának kialakulásában a megnőtt CaMKII expresszió/aktivitás következtében kialakuló intracelluláris ionhomeosztázis-perturbációk kritikus szerepet játszanak. Az intracelluláris Na^+ és Ca^{2+} háztartásban Na_v , Ca_v , RyR, PLM és NCX kóros működése következtében kialakuló zavarok mellett nagyon lényeges komponens az APD megnyúlása, melynek hátterében az I_{to} és I_{K1} denzitások CaMKII-indukált csökkenése található. A megnyúlt APD és/vagy túl magas szívfrekvencia következtében az enzim túlaktiválódik, ami további APD megnyúláshoz vezet. CaMKII δ -transzgen egerekben kialakuló szívelégtelenségre jellemző az I_{K1} és I_{to} denzitás csökkenése, az APD megnyúlása, a fokozott aritmiás hajlam és a Ca^{2+}_i homeosztázis zavarai ((Kaab és mts., 1998, Maier, 2003; Wagner és mts., 2011). Ezzel szemben krónikus miokardiális infarktus vagy emelkedett utóterhelés esetén a transzgenikus CaMKII gátlás vagy KO megelőzi/normalizálja a szívelégtelenséghez és aritmiákhoz vezető strukturális remodelinget (Zhang és mts., 2005; Backs és mts., 2009; Ling és mts., 2009). Bár az aritmia hajlam fokozódásához vezető patomechanizmusok részletei kevésbé tisztázottak, a CaMKII túlműködés gátlása farmakológiai és/vagy génterápiás eszközökkel az ionhomeosztázis perturbációinak csökkentésén keresztül jelentős antiaritmiás potenciállal rendelkezik.

Különböző szívbetegség állatmodellekben a CaMKII gátlók sikeresen kivédtek a strukturális szívizom remodeling kialakulását és az aritmogenezist. A vizsgálatok továbbfejlesztését és a klinikai tesztek elindítását azonban nagymértékben hátráltatja a megfelelő membrán-permeabilis CaMKII gátlószerek hiánya. A leggyakrabban alkalmazott gátlószer, a KN-93, nélkülözhetetlen információkat nyújtott a CaMKII vélt fiziológiás/patológias szerepéről a szívben, de nem igazán szelektív: a CaMKII-n kívül gátolja néhány feszültségfüggő K^+ csatorna áramát is, ezért az AP-re gyakorolt hatásait nem lehet a szelektív CaMKII gátlás következményének tulajdonítani. Az érintett ioncsatornák és az AP CaMKII-dependens regulációjára irányuló vizsgálatok folytatásához szelektívebb gátlószerek szükségesek.

A catecholaminerg és/vagy a renin-angiotenzin szignálok kóros túlaktiválása, melyet jelentős részben a CaMKII fokozott működése közvetít, a szív pumpafunkciójának károsodásához és fokozott aritmia-hajlamhoz vezethet. A klinikumban rutinszerűen alkalmazott β -blokkolók és ACE gátlók lassítják a szívelégtelenség és a proaritmiás szöveti remodeling kialakulását. Az érzékelhető fejlődés ellenére a krónikus szívelégtelenség klinikai terápiája ma még nem tekinthető sem kiforrottnak, sem kellően hatékonynak, amit az a tény is igazol, hogy a CaMKII aktivitás upstream célpontjainak szelektív gátlására alapozott terápiás stratégiák mellett még mindig kiemelkedően magas a szívelégtelenségben, ezen belül a végletes aritmiák következtében eltávozottak száma. Ezért véleményem szerint az optimális kardioprotektív stratégia a CaMKII-re konvergáló jelutak – a szívelégtelenség típusától/progressziójától függő – szelektív modulációjával *egyidejűleg* a CaMKII aktivitás és expresszió globális gátlása lehet. Ez esetben ugyanis lehetségesnek tűnik a remodeling progressziójának leállítása, ideális esetben a malignus folyamatok visszafordítása. Bár ezt a hipotézist számos irodalmi adat támogatja, a globális CaMKII-gátlás, mint hatékony terápiás stratégia bevezetéséhez lényeges elvi/gyakorlati nehézségek elhárítására van szükség.

6. Elképzelhető-e a NKA-gátlók aritmogén hatásának megelőzése pozitív inotrop effektusuk megőrzése mellett?

A digitalisz származékok jól ismert pozitív inotrop hatásának hátterében a Na^+/K^+ ATP-áz mérsékelt gátlása következtében kialakuló Ca^{2+}_i szintemelkedés áll. Míg azonban ez az emelkedés egyik oldalon jótékony hatású, mivel fokozza a szív kontraktilis erejét, a másik oldalon rendkívül veszélyes, mert jelentős proaritmiás hatással rendelkezik, amiért a megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ következtében ugyancsak megemelkedő $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ felelős; a RyR-ok normál körülmények közt alacsony diasztolés szivárgása a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ emelkedés következtében szignifikánsan megnő, és ennek következtében ugrásszerűen nő a sztohasztikus módon felszabaduló Ca^{2+} -sparkok száma, illetve Ca^{2+} tartalma. Az ORM-10103 általunk kimutatott antiaritmiás hatásának hátterében a strofantidin-indukált Ca^{2+}_i szintemelkedés gátlása állhat. Sajnos ennek következtében a pozitív inotrop hatás is csökkenhet. Fontos hangsúlyozni, hogy a 33. ábrán összegzett vizsgálataink alapján az NCX gátló SEA0400 (és bár nem vizsgáltuk, de vélhetően az ORM-10103) közvetlenül nem befolyásolja az SR működését, így az antiaritmiás hatás oka a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkenés okozta $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ csökkenés lehet. Az ORM-10103 $\text{Ca}^{2+}_{\text{SR}}$ túltelődést csökkentő hatását az elmúlt időszakban sikerült közvetlenül is igazolnunk.

Bár a digitális-származékok pozitív inotrop hatásának fenntartása mellett az NCX1 gátlás nem tűnik a legalkalmasabb eszköznek az indukált aritmiák kivédésére, az ECC több pontja is jelenthet megfelelő célpontot. Az egyik lehetőség a Ca^{2+} -troponin-C csatolás hatásfokának javítása – ez esetben ugyanis alacsonyabb, kevésbé aritmogén diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés is létrehozhatná a várt pozitív inotrop hatást. Ez irányban az elmúlt időszakban már történtek sikeresnek mondható klinikai próbálkozások (levosimendan). Egy másik logikus célpontot képezhetnek a RyR-ok, amennyiben azok aritmogén, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ emelkedés-indukált szivárgását sikerül markánsan csökkenteni. Ennek egyik eszköze lehet nyitott állapotuk időtartamának csökkentése. Pozitív kísérleti eredmények már ismertek (pl. ciklikus adenozin 5'-difoszforibóz (cADPR) származékok, JTV519) de tudomásunk szerint klinikai körülmények között tesztelhető RyR szivárgás gátló szer még nem áll rendelkezésre.

7. Milyen klinikai kórállapotokban jelenthetnek a NHE-, illetve az NCX-gátlók előrelépést?

A mindennapi klinikai gyakorlatban használatos antiaritmiás szerek hatékonysága egyáltalán nem tekinthető kielégítőnek, ezt a mortalitási adatok – a szívelégtelenségben és iszkémiás szívbetegségben szenvedő betegek fele kamrai aritmia (szívmegállás, kamrafiibrilláció) következtében hal meg – egyértelműen igazolják. Az elégtelen hatékonyság egyik következménye a drága, ezért széleskörűen kevésbé használható ICD eszközök gyors terjedése. A valódi áttöréshez, az aritmias megbetegedések kielégítő terápiájához, szignifikáns fejlődésre van szükség, ami magában foglalja új terápiás célpontok azonosítását, az antiaritmiás hatóanyagok körének számottevő bővítését, továbbá ezekre alapozva a mainál hatékonyabb megelőzési/gyógyítási protokollok kifejlesztését.

Irodalmi adatok és saját eredményeink szerint egyes kísérleti állatmodellekben mind az NHE, mind az NCX gátlása antiaritmiás hatást fejt ki. Bár az irodalmi adatok nem elhanyagolható része – elsősorban a nem-szelektív gátlószerekkel kapcsolatos nehézségek következtében – ellentmondásos, az elérhető információk kissé szubjektív összegzése alapján viszonylagos biztonsággal állítható, hogy mindkét kicserélő gátlása értékelhető antiaritmiás potenciállal rendelkezik.

A szelektív NCX gátlás akut fiziológiai/patológiai következményeinek megbízható analizésére csak a közelmúltban, az ORM anyagok bevezetésével kerülhetett sor. A gátlás jótékony hatása elsősorban a különböző patomechanizmusokon keresztül kialakuló Ca^{2+} túltelődés szignifikáns csökkentésében, a triggerelt aritmiák kialakulásának gátlásában nyilvánul meg; ezek alapján az NCX gátlás perspektívikus stratégiának tűnik akut iszkémia/reperfúzió indukálta aritmogenezis, illetve a szívelégtelenség korai fázisában, a RyR-ok instabilitása és fokozott diasztolés szívárgása (fokozott spark aktivitás) következtében kialakuló DAD-indukált aritmiák ellen. Ugyanakkor – legalábbis a jelenleg elérhető hatóanyagok használata esetén - az NCX gátlás nem tűnik eredményesnek a sokkal veszélyesebb (pl. diszperzió-növekedés következtében kialakuló) aritmogén szubsztrát bázisú aritmiákkal (pl. PVTC, kamrafibrilláció) szemben.

Fentiekkel kapcsolatban hangsúlyozni kell, hogy mivel az NCX transzport iránya egyetlen AP alatt is változik és a Ca^{2+} túlterhelés minél gyorsabb megszüntetéséhez a $revI_{NCX}$ gátlásával párhuzamosan a $fwdI_{NCX}$ aktiválása is célszerű lenne, mindkét transzportirány egyidejű, közel azonos mértékű gátlása vélhetően messze nem optimális megoldás. A jelenleg elérhető NCX modulátorok lassú kötési/leválási kinetikája viszont nem teszi lehetővé a kicserélő tranzienst, szelektív gátlását, vagy aktiválását. Ennek alapján az NCX gátlás tényleges antiaritmiás hatékonyságának karakterizálásához engedhetetlenül szükséges új típusú, gyors kinetikájú és irány szelektív gátlószerek kifejlesztése. További nehézséget jelent, hogy a krónikus NCX gátlás következményeire vonatkozóan nem érhető el irodalmi adatok.

A szelektív NHE gátlás akut fiziológiai/patológiai következményei jobban tisztázottak, klinikai adatok is rendelkezésre állnak. Mivel az NHE mérhető aktivitást csak igen alacsony pH esetén mutat, a gátlás a hipoxiás, iszkémiás szívben kialakuló aritmiák kialakulásával szemben lehet hatásos. Ugyanakkor, szemben az NCX gátlással, az NHE gátlás hatásosan gátolja az aritmogén szubsztrát miatt kialakuló reentry-típusú aritmiák (VT, VF) kialakulását is.

Az NHE gátlás klinikai, rutin felhasználásával kapcsolatban alapvető problémát jelent, hogy kísérleti körülmények között és klinikai tesztek során mutatott hatékonysága között markáns eltérést találtak, melynek oka még nem tisztázott. Az egyik logikus magyarázat szerint a problémát a klinikai dózisok helytelen beállítása okozhatta (túl alacsony humán dózisok).

Végül még egy megjegyzés. Habár krónikus szívelégtelenségben és iszkémia/reperfúzió során is a kialakuló utódepolarizációk triggerelik a halálos kamrai aritmiák túlnyomó részét, a klinikai vizsgálatok során az aritmia triggererek (pl. PVC-k) gátlása önmagában nem bizonyult kellően eredményes stratégiának. Nagyon valószínűnek (és logikusnak) tűnik, hogy a reentry mechanizmusokat *fenntartó* paraméterek (pl. a restitúció meredeksége és/vagy fokozott AP diszperzió) egyidejű gátlása jelentheti a valóban hatékony megoldást.

8. Mi lehet szívelégtelenségben a legígéretesebb terápiás lehetőség a Ca^{2+} -homeosztázis normalizálása céljából?

A szívelégtelenség kialakulásának, a szívizom elektro-mechanikai átalakulásának több kritikus lépése is a szívizomsejtek Ca^{2+}_i homeosztázisának zavaraihoz köthető. A repolarizáló K^+ áramokat (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) generáló ioncsatornák (legalábbis részben CaMKII-mediált) csökkent expressziója/aktivitása miatt APD megnyúlás jön létre, ennek következtében nő a szisztolés I_{CaL} és az I_{NaL} . A megnőtt $[Na^+]_i$ és megnyúlt APD az NCX transzportaktivitását reverz irányba tolja, ezáltal Ca^{2+} eltávolító funkciója sérül, ami az $[Ca^{2+}]_i$ további emelkedéséhez vezet. Az SR Ca^{2+} felvétele a SERCA2 csökkent aktivitása miatt szintén csökken, markánsan megemelkedik a diasztolés $[Ca^{2+}]_i$, ami csökkent relaxációhoz, diasztolés diszfunkcióhoz vezet. Az AP plató

fázisa alatt a membrán-ellenállás nagy – ezért a depolarizáló (Na^+ és Ca^{2+}) áramok növekedése membrán depolarizációt (korai utópotenciálokat) hoz létre. Az RyR-ok fokozott spontán diasztolés szivárgása (spark aktivitása) következtében csökken a CaT amplitúdója és késleltetett utópotenciál alakulhat ki. A magas Ca^{2+}_i szint Ca^{2+} -függő jelutak túlaktiválásával pozitív visszacsatolást hoz létre, ami a szívelégtelenség progressziójához vezet.

A krónikus szívelégtelenségre jellemző Ca^{2+} -homeosztázis zavarok sokszínűsége, illetve a nagyszámú, egymással szoros kölcsönhatásban lévő résztvevő, rendkívül megnehezíti a megbomlott homeosztázis normalizálását. Ígéretes terápiás lehetőség lehet a $\text{Ca}^{2+}_i/\text{Na}^+_i$ túlterhelés gátlása, az APD megnyúlás megakadályozása, továbbá az SR diszfunkció megszüntetése. Mindazonáltal valószínűnek tűnik, hogy a Ca^{2+} -háztartás hatékony normalizálása önmagában legfeljebb lassíthatja a betegség progresszióját, a kóros szívizom-remodeling visszafordításához jóval összetettebb terápiás erőfeszítésekre van szükség.

Az egymáshoz szorosan csatolt, különböző okokból kialakuló intracelluláris Ca^{2+} és Na^+ túlterhelés kivédésére vonatkozóan már elérhetőek biztató eredmények. A Ca^{2+} túlterhelés kialakulásának egyik elsődleges faktora a revI_{NCX} kompenzatorikus fokozódása, ami NCX gátlószerekkel megakadályozható. Bár az előzőekben részletezett okokból (a fwdI_{NCX} egyidejű gátlása) az elérhető NCX gátlószerek nem tekinthetők optimálisnak, a jövőben kifejlesztésre kerülhetnek jobb paraméterekkel rendelkező hatóanyagok is. Amennyiben a Ca^{2+} túlterhelés kialakulását sikerül meggátolni, a revI_{NCX} -indukált $[\text{Na}^+]_i$ emelkedés mértéke is számottevően csökken, így az NKA fokozott működésén (esetleges stimulálásán) kívül egyéb beavatkozásra vélhetően nem lesz szükség.

Az egyik legsúlyosabb következményekkel járó perturbáció a RyR-ok stabilitásának markáns csökkenése melynek hátterében túlzott foszforilációjuk áll. A fokozott foszforilációért nem kis részben a CaMKII δ (oxidatív stressz, fokozott szimpatikus aktivitás, stb. okozta) túlzott aktivitása és expressziója felelős. Az irodalmi adatok szerint a RyR-calstabin kapcsolódás stabilitásának erősítésével (ennek következtében a RyR nyitvatartási valószínűsége (P_0) csökken) a RyR-ok destabilizálódása nagyrészt kivédhető. A RyR-calstabin kötés stabilitását fokozza a JTV519 és az elsődlegesen Na_v csatorna gátló tetracain is; ezek hatására a Ca^{2+} túltelődés-indukált fokozott spontán Ca^{2+} felszabadulás (spark aktivitás) markánsan, közel normál szintre csökken, ami egyúttal a CaT amplitúdó növekedését is okozza. Az aritmogén spontán Ca^{2+} felszabadulás gátlása és a CaT amplitúdójának növelése – azaz a szív aritmia hajlamának csökkentése és egyidejűleg kontrakciós erejének növelése – ideális stratégiának tűnik a szívelégtelenségben szenvedő paciensek pumpafunkciójának stabilizálására, valamint sikeres túlélésének biztosítására.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Dr. Szokodi Istvánnak, az MTA doktorának részletes, igényes és alapos bírálatát. Köszönöm, hogy az értekezést értékesnek, bemutatott eredményeinket elgondolkodtatónak, megfigyeléseinket újszerűnek, következtetéseinket mértéktartónak ítélte, továbbá, hogy az értekezést és téziseit elfogadásra méltónak találta. Nagyon köszönöm, hogy az értekezés nyilvános vitára bocsátását, sikeres védelem esetén pedig a doktori cím odaítélését támogatja, és kérem előzőekben ismertetett válaszaim elfogadását.

Budapest, 2016. november 5.

Dr. Tóth András