

Molekulová patobiochemie

srdečního selhání (1. část)

1. Úvod

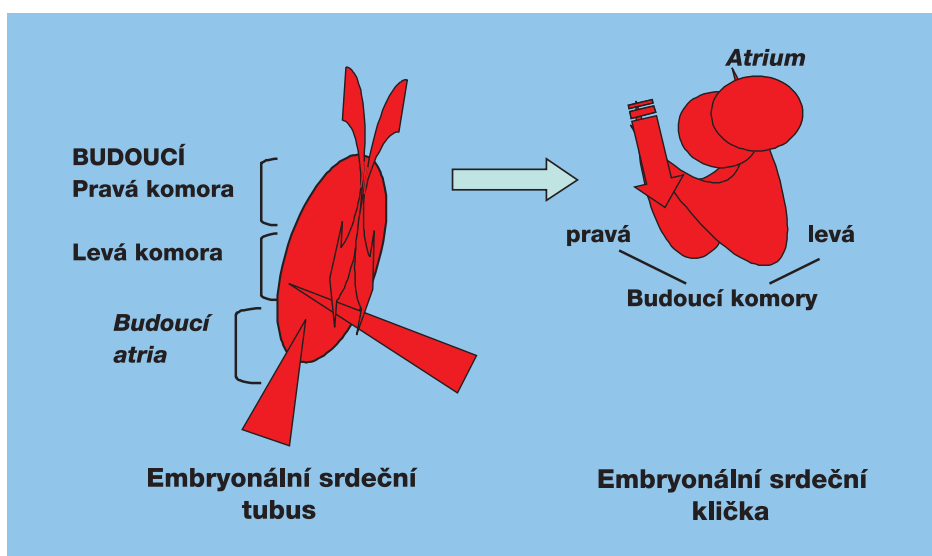
Od geniálního objevu o činnosti srdce jako svalového orgánu rozděleného na pravou a levou předsíň a komoru, který pohání krevní oběh v těle, uveřejněném Williamem Harveyem v díle *De motu cordis* (1628), uplynulo takřka 400 let než jsme se dostali k začátkům poznávání, jak je práce srdce realizována biochemickými pochody na molekulové a subcelulární úrovni.

Srdce je první orgán, který se formuje a funguje v rozvíjejícím se embryu a jeho činnost, umožňující trvalou dodávku kyslíku a živin tělesným orgánům a tkáním, je naprosto nezbytná až do konce života.

Srdce je orgánem, který se ve fylogenezi objevuje v primitivní formě už u hmyzu. Jak probíhá jeho morfogeneze na molekulové úrovni, se začalo objasňovat teprve v 90. letech dvacátého století. Prvním krokem byl objev „homeobox genu“, nazvaného „*tinman*“ (*tin*), který je nutný pro formaci primitivního srdce u mušky *Drosophila melanogaster*. Jeho obdobou u savců je gen označovaný jako *Nkx 2-5* neboli *Csx*.

2. Morfogeneze

Gen *Csx* je exprimován na samém počátku morfogeneze savčího srdce a jeho aktivita přetrvává i v dospělosti; není však jediným, který se uplatňuje při diferenciaci kardiomyocytů. Je nutný pro iniciaci diferenciaci a také pro další vývoj levé srdeční komory. Na rozdíl od morfogeneze buněk kosterního svalstva, kde jediný transkripční faktor - *MyoD* - aktivuje celý program svalové diferenciaci, u kardiomyocytu se podílí na tomto mechanismu několik transkripčních faktorů jako je **MADS-**



Obr. 1: Embryonální vývoj srdce

box factor MEF-2 (= Myocyte Enhancer Factor 2), který s dalšími faktory aktivuje přímo expresi genů kódujících myofibrilární proteiny; podobně faktor **SRF** (= Serum Responsive Factor) sdružený s **Nkx 2-5** **GATA-4** a **myokardinem** řídí expresi genů kódujících proteiny kontraktálního aparátu (aktin, myosin, troponin). (Obr. 1)

Homeodoménový protein **Irx4** také aktivuje ventrikulární geny a potlačuje geny atrilární umístěné v srdečních komorách. Vyšetření DNA sekvencí regulačních genů pro transkripci srdečních genů ukazuje na ohromnou složitost, kterou se řídí morfogeneze srdce. Předpokládá se existence dvou progenitorových populací. Kardiomyocyty se nejprve organizují jako *lineární srdeční tubus*, který podstupuje *pravotočivé stáčení (kličku)* jako odpověď na axiální signální systém, který navozuje levopravou asymetrii. Následuje *výduťová (baloon-like)* formace počáteční tubusové kličky doprovázená tvorbou přepá-

žek (*septa*) za vzniku *vícekomorového útvaru* (levá a pravá komora [ventriculium] a levá a pravá předsíň [atrium], oddělené interatriálními a interventrikulárními přepážkami). Ztlustění endokardiální vrstvy na určitých místech vede ke vzniku *srdečních chlopní*. Tím je umožněno nasávání okysličené krve z plicního oběhu do ostatních částí těla. Objev dvou transkripčních faktorů **HAND 1** a **HAND 2**, které jsou exprimovány jeden v levé druhé v pravé komoře, dokládá příčinu jednostranného nevyvíjení komory při eventuální kongenitální alteraci jednoho z nich.

Růst a zrání kardiomyocytů ve vyvíjejících se srdečních komorách odvisí od komplexu signálů přicházejících ze sousední tkáň. Signalizace zprostředkovaná **neuregulinem** z endokardu k **ErbB receptoru** v myokardu je nutná pro vývoj komorových vrstev (tloušťky). Mutace ovlivňující tuto signalizaci vedou ke vzniku příliš tenké komory v průběhu embryogeneze, což je příčinou úmrtí plodu. (Také lé-

čebné podávání protilátek proti ErbB receptoru, jako možného léku u karcinomu prsu, může vést k těžké poruše kontraktility srdečního svalu). Rovněž buňky epikardu jsou zdrojem chemických signálů ovlivňujících vývoj myokardu.

Tvorba srdečních chlopní vyžaduje signalizaci zprostředkovanou členy rodiny **TGF- β** z kardiomyocytů; dochází tak k proliferaci povrchové vrstvy endokardu, k jejímu ztluštění a k formování chlopní. Porucha této signalizace (chybění **BMP-receptorů**) je pravděpodobně příčinou *chlopnových abnormalit a defektů komorového septa*.

Rytmické stahy myokardu jsou ovládnány zvláštním seskupením buněk v *sinoatriálním uzlu* pravého atria, odkud se šíří elektrické impulsy *srdečním převodním systémem* ke kardiomyocytům. **Buňky převodního systému**, tzv. *Purkyňovy buňky*, vznikly v embryonální době jako zvláštní subpopulace komorových kardiomyocytů v odpovědi na signalizaci prostřednictvím **endothelinu-1** a **neuregulinu**.

Poznávání molekulové podstaty srdeční morfogeneze umožňuje včasné rozpoznání kongenitálních defektů, především u rizikových rodin, stejně jako může snad v blízké budoucnosti poskytnout předpoklady k biologickému terapeutickému zásahu.

3. Molekulová patologie myokardu

Na rozdíl od vývoje srdce v době fetální, kdy růst myokardu se děje hyperplazií kardiomyocytů (zmmožováním počtu buněk), nárůst srdeční svalové hmoty po narození spočívá v hypertrofii srdečních svalových buněk (zvětšení stávajících buněk); to je *fyziologická hypertrofie*. Děje se tak z důvodů adaptace myokardu na zvýšené energetické požadavky (zvýšená potřeba zásobení kyslíkem a energetickými zdroji), kupř. při zvýšené svalové námaze. Naproti tomu *patologická hypertrofie* je důsledkem poškození myokardu a odpovědí na stresové signály. *Patologická hypertrofie navozuje metabolickou změnu ve využívání energie v kardiomyocytech z aerobní (oxidační fosforylace) na anaerobní (glykolytickou) formu, charakteristickou pro fetální období*. Je to provázeno aktivací srdečních genů pro fetální program rozvoje myokardu, včetně genů, jejichž

produkty regulují svalovou kontrakci a přesuny Ca^{2+} . Recentní studie naznačují, že farmakologická nebo genetická blokáda patologických (stresových) srdečních signálů ve smyslu antihypertrofie myokardu, je možnou cestou k léčení patologické srdeční hypertrofie.

Některé stresové signály vedoucí k *srdeční hypertrofii*, provázené *dilatační komory* s následky srdečního selhání, jsou způsobeny tím, že myokard není schopen zvýšit srdeční výdej tak, aby bylo vyhověno metabolickým požadavkům; jiné stresové signály vedou také k *dilataci komor ale bez mezistádia srdeční hypertrofie*. Hlavním faktorem, který je příčinou přechodu patologické hypertrofie na dilataci komor, je *nevyváženost mezi signály pro- a antiapoptózy*. Zdá se, že pro přežívání kardiomyocytů je potřebná signalizace zprostředkovaná cytokinovým **receptorem gp130**. Jeho nedostatek vede k masivní apoptóze buněk myokardu. Proto terapeutické strategie vedoucí k potlačení apoptózy a k posílení přežívání představují velmi slibnou možnost pro léčení srdečního selhání, kardiomyopatii a poinfarktové remodelace myokardu. (Obr. 2)

4. Signální dráhy a srdeční hypertrofie

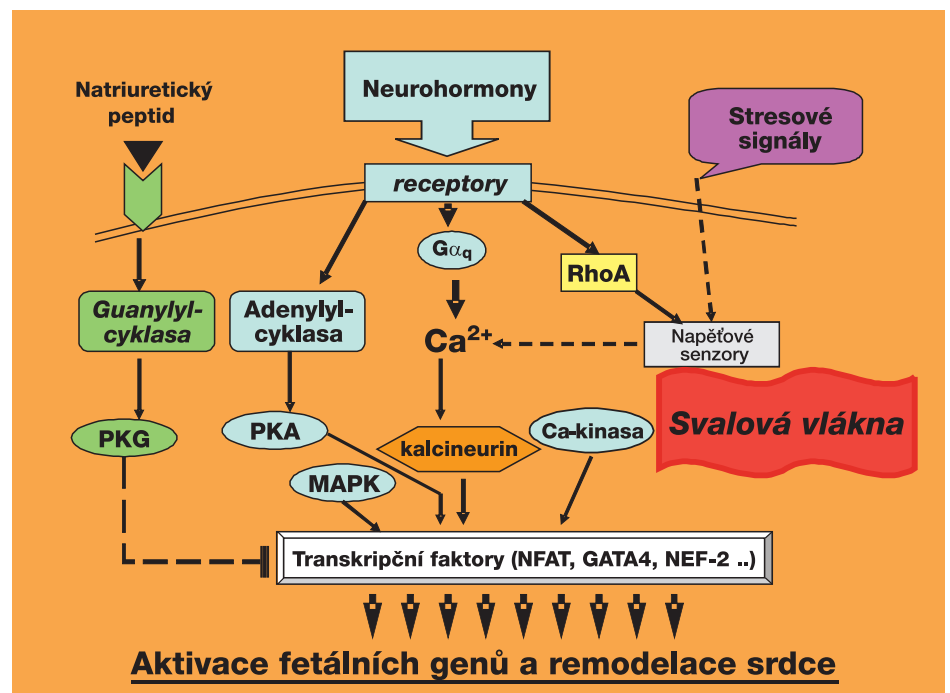
Řada neurohormonálních signálních molekul působících prostřednictvím **G-proteini-**

nu $G\alpha_q$ podporuje za patologické situace vznik kardiohypertrofie. Jsou to především *signální dráhy kalcium-dependentní*, zvláště pak *kalcineurinová dráha* a dále *β -adrenergní signalizace*.

Cyklické nukleotidy jako je **cAMP** (cyklický adenosinmonofosfát) a **cGMP** (cyklický guanosinmonofosfát) slouží jako „sekundární poslové“ při této signalizaci (kupř. účinek katecholaminů nebo natriuretických peptidů).

4.1. Kalciová signalizace

Přesuny Ca -iontů hrají centrální úlohu v regulaci růstu srdce a v jeho kontraktilní funkci. Proto abnormality v nitrobuňčném pohybu Ca^{2+} se podílejí na různých formách onemocnění srdce. Během každého srdečního stahu vstupují ionty Ca^{2+} do kardiomyocytu prostřednictvím **L-typu kalciových kanálů**. Zvýšení nitrobuňčného kalcia navodí dále uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula prostřednictvím **ryanodinových receptorů (RyR)**, což způsobí *desateronásobné zvýšení intracelulárního Ca^{2+}* . Vazba Ca^{2+} na troponin C v kontraktilním aparátu iniciuje svalovou kontrakci (systola). Návrat (reuptake) Ca^{2+} do sarkoplasmatického retikula za účasti specifické **Ca^{2+} -ATPasy (SERCA)** umožňuje opětovnou relaxaci srdečního svalu (diastola). Schopnost SERCA pumpovat zpět Ca^{2+} do sarkoplasmatického retikula je ovládána interakcí s **fosfolambanem**, což je malý modulační protein na



Obr. 2: Schéma hypertrofické signalizace srdce

membráně sarkoplasmatického retikula. V nefosforylovaném stavu fosfolamban inhibuje návrat Ca^{2+} do retikula působením SERCA. Fosforylace fosfolambanu se děje prostřednictvím **proteinkinasy PKA**, což snižuje jeho inhibiční aktivitu a vede to v konečném důsledku k podpoře relaxace myokardu.

Ryanodinový receptor (RyR) je tetramerní kanál, který může vázat řadu signálních molekul jako je **PKA**, **proteinfosfatasa-1 a -2a** nebo **FK-506 vazebný protein FKBP12.6**. Interakce RyR s těmito molekulami udržuje tento kalciový kanál v otevřeném stavu; také mutace genu pro RyR má za následek snížení jeho afinity k vazebnému proteinu FKBP12.6, a tedy k tendenci zůstat otevřený. Tyto stavy pak udržují zvýšené množství Ca^{2+} v sarkoplasmě a mohou přispívat ke vzniku srdečních arytmií navozených tělesným cvičením. Také hyperfosforylace RyR působením PKA se může podílet na srdečním selhání. *Trvale zvýšená koncentrace sarkoplasmatického Ca^{2+} aktivuje kalcineurin-fosfatasa, která pak udržuje kalcineurin v defosforylovaném stavu. Kalcineurinová signalizace je sprážená s dalšími signálními drahami kontrolovanými MAP-kinasami odpovídajícími na stresové podněty nebo proteinkinásou C nebo kalcium a kalmodulin-dependentními kinasami či cyklin-dependentními kinasami. Kalcineurin-fosfatasa defosforyluje také transkripční faktor NFAT. To vše může vést k patologické hypertrofii buněk srdečního svalu. Ukázalo se též, že ovlivnění výše uvedených signálních drah může vyústit v buněčném jádře k fosforylaci histon-deacetylasy podtřídy II (HDAC II), která působí jako signál-responzivní regulátor fetálního genetického programu a vývoje (růstu) srdce. Podobně další transkripční faktory jako MEF2, GATA4 SRF jsou konečným článkem pro signalizaci srdeční hypertrofie a pro reaktivaci fetálních genů.*

4.2. β -adrenergní signalizace

Adrenergní agonisté stimulují srdeční činnost. Vazba **katecholaminů** na „sedminásobně zvlněné“ membránové receptory sdružené prostřednictvím G-proteinu s **adenylátcyklasou** zvyšuje nitrobuňkovou koncentraci cAMP a tím aktivuje **proteinkinasu A (PKA)**.

Vícetupňová β -adrenergní signalizace je narušena v selhávajícím srdci.

Chronická aktivace sympatiku, což je obvyklá odpověď na kardiální selhávání, způsobuje trvalý vzestup katecholaminů v cirkulaci, na který reaguje kardiomyocyt sníženou citlivostí a sníženou „downregulací“ **srdečních β -adrenergních receptorů**. U pacientů se srdečním selháním a levostranou ventrikulární dysfunkcí je kromě noradrenalinu zvýšena hladina reninu, aldosteronu, arginivasopresinu a natriuretických peptidů. Expres **kinasy β -adrenergních receptorů (β ARK)** je rovněž zvýšena, což situaci dále zhoršuje. Z toho vyplývá, že porucha **β -adrenergní signalizace je jedním z hlavních patogenetických mechanismů srdečního selhání**. Paradoxně však podávání β -blokátorů, které adrenergní signalizaci snižují, vykazuje **zlepšení (!)** srdečních funkcí a podporuje prevenci patologické remodelace u pacientů se srdečním selháním. Molekulový mechanismus tohoto příznivého účinku podávaných beta-blokátorů není dosud uspokojivě vyjasněn; musíme však rozeznávat mezi fyziologickou aktivací sympatiku a mezi jeho trvalým drážděním, kterým se fyziologické regulační mechanismy naruší a kdy neadekvátní aktivace β -adrenergních receptorů se stává škodlivou. (Obr. 3)

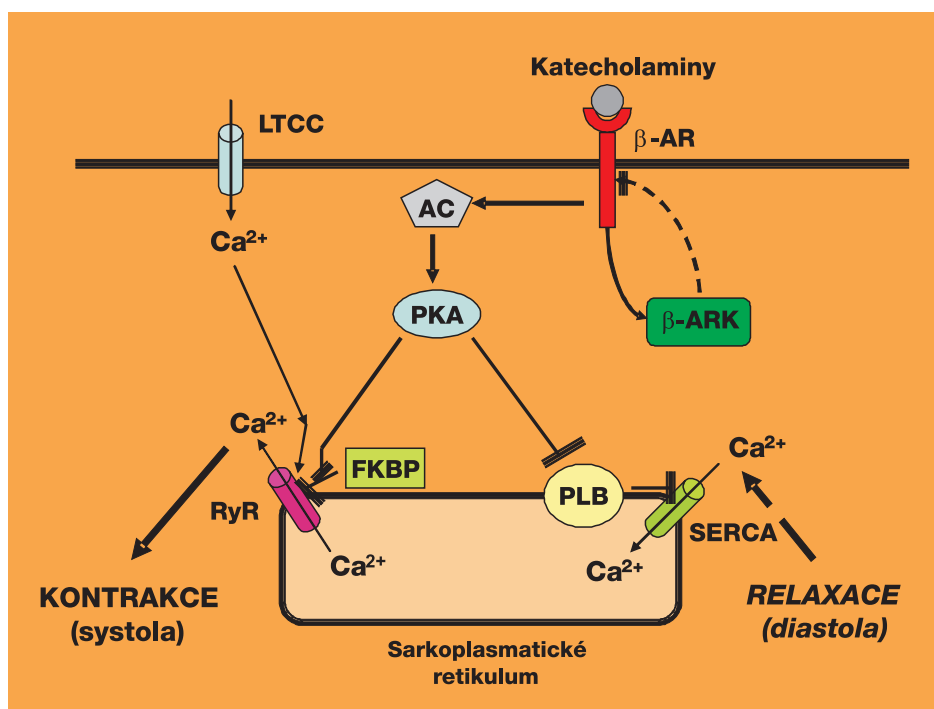
4.3. Natriuretické peptidy

Objev natriuretických peptidů a objasňo-

vání jejich biologických účinků přineslo další významné poznatky v neurohormonálních mechanismech účastnících se ve fyziologii a patologii srdeční činnosti, které se mohou uplatnit jak v terapii tak v diagnostice. Až dosud byly identifikovány 4 členové této rodiny: ANP (atriový natriuretický peptid), produkovaný především v srdečních atriích, BNP (mozkový natriuretický peptid), izolovaný původně z vepřových mozků (B=brain), ale produkovaný především v srdečních komorách, CNP a DNP, o jejichž biologických funkcích zatím mnoho nevíme. Vlastní hormony jsou syntetizovány ve formě pre-prohormonů; po oddělení signální sekvence („pre-fragment“) se prohormon (proBNP) štěpí neutrální endopeptidasou (furin) na vlastní hormon (BNP) a N-terminální peptid (NT-proBNP). (Obr. 4)

Tabulka (Tab. 1) shrnuje některé charakteristiky ANP a BNP.

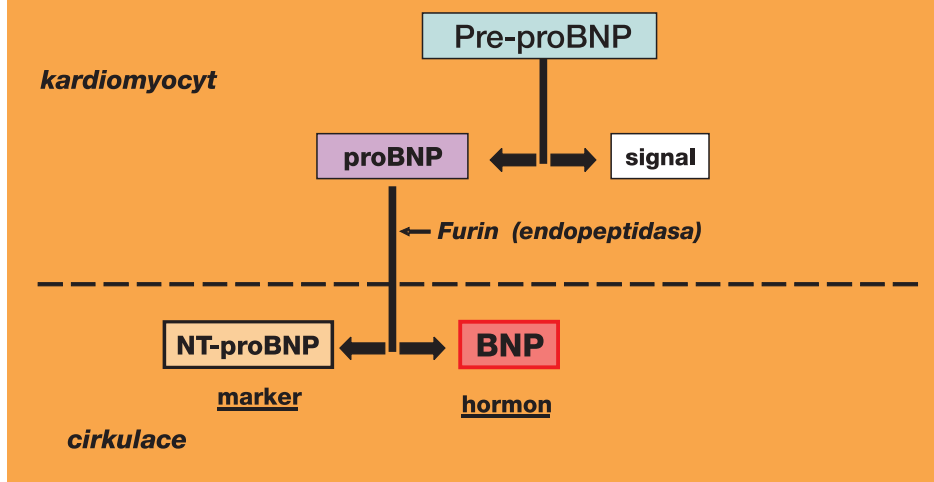
Za normálních okolností jsou hlavním zdrojem ANP i BNP srdeční předsíně (atria). Ale při chronickém napětí kardiomyocytů, jaké nastává kupř. u chronického srdečního selhání, dochází ke zvýšené tvorbě v srdečních komorách. Relativně je to více u BNP-příbuzných peptidů než u ANP. Proto je často (s určitým zjednodušením) BNP označován jako **ventrikulární hormon**. Také u akutního srdečního infarktu je „upregulace“ BNP větší než



Obr. 3: Beta-adrenergní signalizace

Natriuretický peptid BNP

(syntéza)



Obr. 4: Schéma tvorby natriuretického peptidu B (BNP)

Charakteristika	ANP	BNP
Lokalizace v srdci	Atrium	Atrium a komory
Pohotovostní zásoba v atriích	velká	malá
Bazální sekrece v srdci	++	(+)
Genetická transkripční odpověď na natažení	pomalá	rychlá
Relativní zvýšení u srdečního selhání	+	+++

Tab. 1: Charakteristiky ANP a BNP

ANP, pravděpodobně v důsledku lokálního napětí kardiomyocytů v blízkém okolí infarzovaného ložiska.

Vychytávání (odstraňování) natriuretických peptidů ANP, BNP a CNP z krevní cirkulace se děje jednak vazbou na specifické receptory (NPR-A, B, C), jednak enzymovou degradací neutrálními endopeptidasami. V renálních tubulech je ANP a BNP vychytáván receptorem NPR-C a po endocytóze a lyzozomální degradaci je vylučován jako inaktivní fragment(y) močí.

Hlavním stimulem pro sekreci BNP z atrií a komor je napětí kardiomyocytů. Zvýšený tlak na srdeční stěnu působí přímo nebo cestou lokálních parakrinních faktorů jako je endothelin-1, radikál oxidu dusnatého (NO*) nebo angiotensin II. Kromě napětí kardiomyocytů podnětem k sekreci BNP mohou být i další faktory jako je tachykardie a glukokortikoidy, které se podílejí na indukci mRNA pro srdeční BNP při rozvoji srdečního selhání. Uvolňování BNP je modulováno jak tlakovým tak objemovým přetížením, ANP sekrece je primárně navozena zvýšením intramurálního tlaku v srdečních předsíních.

Biologický účinek rodiny natriuretických peptidů ovlivňuje významně fyziologii a patologii kardiovaskulárního aparátu. V ledvinách ANP a BNP stimulují natriurezu a diurezu; děje se tak působením jak na úrovni glomerulů (dilatace „vas afferens“ a současně rozšíření „vas efferens“, což

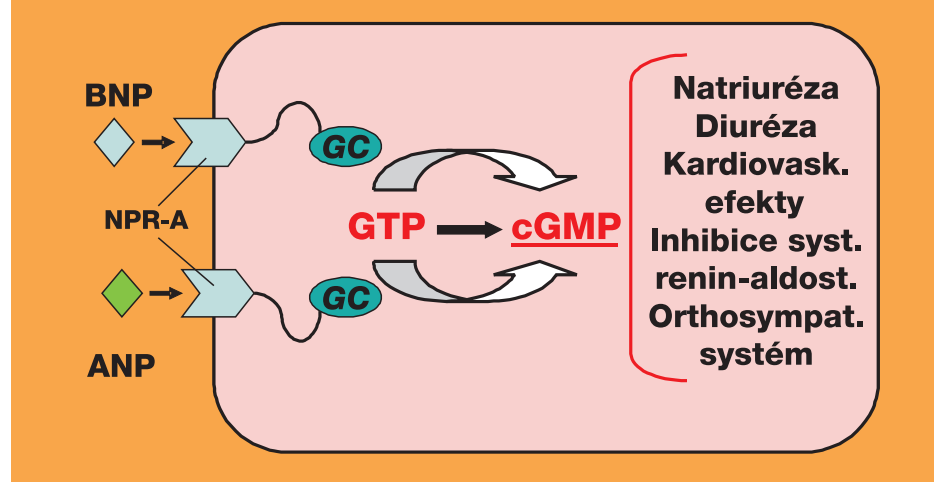
navodí zvýšení filtračního tlaku) tak na úrovni sběrného kanálku (snížení reabsorpce Na^+ → zvýšená natriureza). ANP i BNP také inhibují sekreci reninu a tím tvorbu angiotensinu II a aldosteronu. BNP působí zřejmě též jako kardiomyocytový antifibrotický faktor a podílí se tak na regulaci remodelace kardiomyocytů. ANP i BNP mají významný centrální i periferní inhibiční účinek na sympatický nervový systém. (Obr. 5)

Patologické zvýšení BNP-peptidů u chronického srdečního selhání tento příznivý účinek (podpora natriurezy) nemá. Naopak u městnavé srdeční vady je v klinickém obraze retence Na^+ a tvorba edémů. Tento „paradox“ se vysvětluje tak, že prohormon syntetizovaný v komorách jako odpověď na jejich stresové přepětí nedozrává do plně aktivního hormonu, jako tomu je za fyziologických stavů, kdy hlavní tvorba natriuretických peptidů se děje v srdečních atriích. Na zvýšení plasmatické koncentrace peptidů se také může podílet snížená glomerulární filtrace z hemodynamických příčin, která srdeční selhání provází.

5. Hypertrofická a dilatační kardiomyopatie - mutace genů pro kontraktlní a strukturální proteiny

Kromě patologické signalizace navozené extracelulárními stimuly bývají příčinou

SCHÉMA SIGNALIZACE BNP a ANP a BIOLOGICKÝ ÚČINEK



Obr. 5: Signalizace BNP a ANP a biologický účinek

kardiomyopatií mutace genů ovlivňujících kontraktilní a strukturální proteiny myokardu. **Kontraktilní aparát** sestává z paralelních *aktinových filament* zakotvených v opakujících se strukturách nazývaných *Z-disky*. Ukázalo se, že hrají též úlohu „*napětových senzorů*“ a integrátorů signálních drah, zvláště při přenosu biomechanické zátěže. Účinná svalová kontrakce srdce je umožněna mechanickým spřažením sarkomer při Z-svazcích s interkalárními disky a extracelulární matrix. Kupř. mutace genů kódujících aktin a tropomyosin, které jsou zakotveny k Z-svazkům a interkalárním diskům, způsobují dilatační kardiomyopatii.

Také mutace genu pro *metavinkulin* je příčinou některých forem dilatační kardiomyopatie.

Mutace ovlivňující **těžké řetězce myosinu, protein vázající myosin** nebo další složky kontraktilního aparátu jsou příčinou **hypertrofické kardiomyopatie**. Naproti tomu **dilatační kardiomyopatie**, charakterizovaná roztažením srdečních komor, ztenčením jejich stěny a častými poruchami vodivosti elektrických impulsů, je

přičítána **abnormitám silového přenosu během srdeční kontrakce**. Tak byly u dilatační kardiomyopatie prokázány mutace, způsobující alteraci **dystrofinu, aktinu**, nebo změny v dalších složkách sarkomer a cytoskeletonu (jako je **desmin, lamin A a C**).

6. Genové alterace a srdeční arytmie

Elektrické impulsy navozující systolu a diastolu jsou přenášeny přímo interakcí buňky s buňkou a prostřednictvím srdečního vodivého systému sestávajícího z atrioventrikulárního uzlu, z větví Hisova svazku a z Purkyňových vláken. Nepravidelnosti srdečního rytmu - **arytmie** - často provázejí **patologické stavy srdce** jako je **kardiomyopatie** nebo **srdeční infarkt**; mohou se však objevit i u **jinak zdravých jedinců**, kteří mají **vrozené mutace genů kódujících proteiny iontových kanálů**, způsobující poruchy v přenosu iontů přes membrány kardiomyocytů.

Jedním z prvních objevených genů, které jsou odpovědné za **letální srdeční**

arytmie, je mutovaný gen pro **sodíkový kanál SCN5A**; Mutace způsobuje tzv. "**syndrom dlouhého QT-úseku**", při němž je akční potenciál v kardiomyocytu abnormálně prodloužen. Je to způsobeno neschopností Na⁺-kanálu udržet správnou rovnováhu mezi proudy uvnitř a vně membrány. U syndromu dlouhého QT-úseku byla také nalezena mutace způsobující ztrátu funkce **napětového K⁺-kanálu**. Snížené množství (down-regulace) K⁺-kanálu také provází srdeční selhání a je považováno za příčinu vzniku letální arytmie u těchto nemocných.

Arytmie navozené léky jsou také způsobeny poruchami funkce K⁺-kanálů; jde pravděpodobně o jedince mající polymorfismus genů pro iontové kanály, které se staly citlivějšími na léky blokující K⁺-kanály.

Mutace ovlivňující proteiny „**gap-spójů**“ **konexin 40** a **konexin 43** způsobují srdeční arytmie pro poruchu přenosu signálu mezi sousedními buňkami. Arytmogenní defekty mohou pravděpodobně způsobovat též **mutace genů pro vývojovou větev buněk srdečního převodního systému**.

ROCHE - mezinárodní události a komentáře

■ 12/01/2005, (Basilej): **AmpliChip CYP450 Test Roche, první diagnostický test k detekci klinicky významného genového polymorfizmu, získal souhlas FDA (Food and Drug Administration) k distribuci v USA.**

Nový test kombinuje přednosti amplifikační PCR technologie Roche s mikročipovou technologií spolupracující americké společnosti Affymetrix Inc. Na sklonku minulého roku byl uveden na trh v Evropě, nyní byl oficiálně schválen FDA i pro trh v USA.

Znalost polymorfizmu genů CYP2D6 a CYP2C19, které kódují syntézu enzymů podílejících se na metabolismu většiny léků v játrech, poprvé umožňuje identifikovat u nemocných geneticky podmíněné rozdíly v rychlosti metabolizace léků resp. na nich závislý toxický nebo naopak nedostatečný účinek léku.

■ 14/01/2005, (Basilej): **Avastin Roche, nový lék v terapii nádorů, získal souhlas EC k distribuci v EU.**

V posledních pěti letech získala společnost Roche - ve spolupráci se společnostmi Genentech (USA) a Chugai (Japonsko) - vedoucí postavení ve vývoji a produkci nových protinádorových léků (*Xeloda, Herceptin* v léčbě karcinomu prsu, *MabThera* u ne Hodgkinsonských lymfomů, *Tarceva* u malobuněčného karcinomu plic a u karcinomu pankreatu resp. *Avastin* v léčbě kolorektálního karcinomu).

Avastin přitom představuje lék nového typu: inhibuje vaskulární endothelový růstový faktor (*vascular endothelial growth factor, VEGF*), který je klíčovým mediátorem neoangiogenezy u rostoucích resp. metastatických nádorů; účinkem *Avastinu* dochází k redukci krevní-

ho zásobení nádoru a ke zpomalení jeho růstu.

Rozhodnutí EC přihlíželo k výsledkům klinických studií *Avastinu* (*NEJM*, červen 2004), které prokázaly významně delší přežívání nemocných s metastatickým kolorektálním karcinomem ve srovnání s dosud standardní chemoterapií. Je třeba zdůraznit, že v r. 2000 byl - v celosvětovém měřítku - kolorektální karcinom třetím nejčastějším zhoubným nádorem a v témže roce i druhou nejčastější příčinou mortality na zhoubná nádorová onemocnění v Evropě.

pokračování na str. 11