

Antiaritmiás és proaritmiás mechanizmusok vizsgálata transzgenikus rendszerekben

PhD értekezés tézisei

Horváth András, Msc

Témavezetők:

Dr. Virág László és Dr. Jost Norbert László

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Multidiszciplináris Doktori Iskola**

Szeged

2018

BEVEZETÉS

A halálozások egyik fő oka a szívritmuszavarok. Ahhoz, hogy ezeket a tragikus eseményeket elkerüljük, a szívre ható antiaritmiás szerek, illetve az öröklött szívbetegségek (hosszú QT-szindróma, LEOPARD-szindróma, Andersem-Tawil szindróma) pontos ismeretére van szükség. Bármilyen változás, amely a szív ciklus alatt az elektromos impulzusok sorrendjében vagy formájában bekövetkezik aritmiának nevezzük. Ezek nagyon fontos problémák, így szükség van megbízható modellekre, amiken az öröklött betegségeket tanulmányozhatjuk, illetve biztonságfarmakológiai teszteléshez megfelelő eszközök lehetnek.

Kihívások a szívritmuszavar kezelésében

Az antiaritmiás szerek osztályozása kétféleképpen történhet: a *Vaughan-Williams*-séma (1. táblázat), illetve a klinikai szempontból relevánsabb *Silican Gambit*-séma alapján. Az antiaritmiás szerek komplex hatásmechanizmusa miatt a *Vaughan Williams* klasszifikáció manapság már elavultnak tekinthető. Az 1991-ben bevezetett *Sicilian Gambit* a hatásmechanizmus, és az aritmogén mechanizmus alapján igyekszik csoportosítani az antiaritmiás szereket.

I. csoport Na ⁺ -csatorna blokkolók	II. csoport Szimpatikus tónust csökkentők	III. csoport Repolarizációt nyújtó szerek	IV. csoport Ca ²⁺ -csatorna blokkolók
IA Fázis 0 gátlása Vezetés gátlása Repolarizáció megnyújtása Disopyramid, Prokainamid, Kinidin	Acebutolol Betaxolol Bisoprolol Bucindolol Carvedilol Esmolol Metoprolol Nadolol Propranolol Timolol	Amiodaron Azimilid Bretylium Dofetilid Ibutilid Sotalol Tedisamil	Diltiazem Verapamil
IB Minimális hatás a Fázis 0-ra normál szövetben Fázis 0 gátlása abnormális szövetben Repolarizáció kismértékben rövidül, vagy nem változik Diphenylhydantoin, Lidocain, Mexiletin, Tocainid			
IC Fázis 0 erőteljes gátlása Vezetés erőteljes gátlása Enyhe hatás a repolarizációra Flecainid, Moricizin, Propafenon			

1. táblázat. Az antiaritmiás szerek Vaughan Williams-féle osztályozása

A szívritumszavarok gyógyszeres kezelése továbbra is problémás, azok nem megfelelő hatékonysága, és esetleges proaritmiás mellékhatásuk miatt. A fiziológiás és patofiziológiás mechanizmusai az aritmiáknak továbbra is ismeretlenek. Emiatt sok esetben antiaritmiás szernek proaritmiás mellékhatása lehet. Ezen problémák miatt szükség van arra, hogy a ritmuszavarok mechanizmusait átfogóbban ismerjük szöveti és sejt szinten. Ugyancsak szükség van új, biztonságos és hatékony szerek kifejlesztésére.

Sok tanulmány készült a jelenleg meglévő antiaritmiás vegyületek esetleges proaritmiás mellékhatásának vizsgálatára, ugyanis sok esetben előfordult nagyobb halálozási ráta, a szerek mellékhatásai miatt. A *Cardiac Arrhythmia Suppression Trial* (CAST) tanulmány célja a meglévő szerek hatásának vizsgálata (I/C osztályos szerek encainid, flecainid, or moricizin), aszimptomiáknak, vagy enyhén szimptomatikus kamrai ritmuszavarokban szenvedő páciensekben, miokardiális infarktus után. A próba azért készült, hogy felfedje azt, hogy az antiaritmiás szerek csökkentik-e az életveszélyes ritmuszavarok előfordulását ezen páciensek esetén. 10 hónap után az eredmények azt mutatták, hogy az életveszélyes ritmuszavarok nagyobb valószínűséggel jelentek meg mint a kontroll csoportban. Végeredményben az encainid és flecainid használatát leállították a tanulmányban, és ezek a szerek nem bizonyulnak többé elég biztonságosnak, hogy a fent említett páciensekben alkalmazzák őket.

A szívizom akciós potenciálja

Az emlős szívben a normális pumpafunkció, a szív megfelelő elektromos funkciójától függ. Az összehúzódás ingere az ingerképző területekről származik, ahol ritmusgeneráló funkciót ellátó sejtek vannak. Ezekből a pészmekekről terjed az inger tovább a kamrákra. Az akciós potenciálok (AP) generálásához szükséges ezen miokardiális elektromos aktivitása az szívizomsejteknek, ami a felületi elektrokardiogrammal is detektálható. Az AP-k az ioncsatornák összerendezett aktivációjával és deaktivációjával jönnek létre, amelyek vagy depolarizáló, befelé irányuló (Na^+ és Ca^{2+}), vagy repolarizáló, kifelé haladó (K^+) ionáramokat vezetnek. Az AP-k alakja és formája a szívizom egyes területein eltérő lehet. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy az említett ioncsatornák eltérő mértékben fejeződnek ki, és ennek köszönhetően az elektromos inger terjedése egyirányú, amely egy normális szívritmust eredményez. A szívizom akciós potenciálja esetén 5 különböző fázist különböztethetünk meg.

A kezdő fázis (0. fázis) a gyors depolarizációja az AP-nek. Ezen fázis alatt a gyors Na^+ -csatornák aktiválódnak. A nátriumáramnak relatíve rövid karakterisztikája van (2-3 ms), és egy nagy mértékű töltés-beáramlást eredményez. Amellett, hogy aktivál más ionáramokat (pl. Ca^{2+} -áram és K^+ -áramok) ez a fázis felelős a gyors impulzus terjedésért. Az repolarizáció 1-es fázisában a meghatározó ionáram a tranziens kifelé haladó káliumáram (I_{to}). Ez az áram hasonlóan a nátriumáramhoz gyorsan aktiválódik és inaktiválódik. Az áram nagysága hozzájárul a szív AP-re jellemző „*spike and dome*” konfigurációjához. Az I_{to} kifejeződése eltérő lehet a kamrai szívizom egyes területein (ezzel együtt az áram nagysága is), így a „*spike and dome*” konfiguráció egy fontos markere lehet annak, hogy a szívizomsejtek mely kamrai területből erednek. A második fázis, más néven „*plató fázis*” amely egy tipikus tulajdonsága a szívizom AP-nak. Ezen fázis alatt a befelé haldó L-típusú kalciumáram ($I_{\text{Ca,L}}$) és kifelé haladó káliumáramok egyenlítik ki egymást. Ezzel egy hosszú izoelektromos fázist hoznak létre, amelynek alapvető szerepe van a sejt-összehúzóásban. Az $I_{\text{Ca,L}}$ nemcsak az AP formájának kialakításában játszik fontos szerepet, hanem az intracelluláris Ca^{2+} -ciklus elindításáért is felelős. Amikor az $I_{\text{Ca,L}}$ lassan inaktiválódik, a kifelé haladó káliumáramok még mindig aktívak és elkezdik a gyors repolarizáló fázist (3. fázis). Ez alatt a fázis alatt a gyors és lassú komponense a késői egyenirányító káliumáramnak (I_{Kr} és I_{Ks}) egy nagy, kifelé haladó káliumáramot generál, ezzel alapvető szerepük van a késői repolarizációban. A befelé egyenirányító káliumáramnak (I_{K1}) elsődleges szerepe a repolarizáció befejezése (4. fázis). A 4. fázis határozza meg a nyugalmi membránpotenciált (RMP) diasztolé alatt. Az RMP-t az I_{K1} -áram és feltehetően a Na^+/K^+ pumpa határozza meg kamrai szívizomsejtekben. Pitvari és purkinje sejtekben az I_{K1} kifejeződése alacsonyabb, az RMP instabil és egy lassabb depolarizáció figyelhető meg, amelynek fontos szerepe van a pészmeke funkcióban.

Modellek a kardiovaszkuláris farmakológiában

Ahhoz, hogy ezeket a fent említett mechanizmusokat részletesen lehessen tanulmányozni, megfelelő kísérletes modellekre van szükség, amelyek hasonlítanak a felnőtt humán szívizomhoz. A humán indukált pluripotens őssejtekből származtatott szívizomsejtek (hiPSC-CM) egyedülálló lehetőségeket rejtenek magukban, mind betegség modellezés mind gyógyszeresztelés szempontjából. Azonban sok tanulmány arról számolt be, hogy ezek a hiPSC-CM-ek éretlenek, és jelentős eltéréseket találtak a szarkomer szerveződés és elektrofiziológiai tulajdonságok terén. A patch clamp tanulmányok során

alacson RMP értékekről számoltak be hiPSC-CM-ben a felnőtt kamrai és pitvari szívizomhoz képest. Ez egy fontos felfedezés, ugyanis a megfelelő RMP elengedhetetlen az ingerléshez és a refraktoritáshoz. Az egyik lehetséges magyarázat a kevésbé negatív RMP-re, hiPSC-CM-ben az I_{K1} -áram hiánya, illetve alacsony amplitúdója, amelyet több tanulmány ki is mutatott. A mesterséges szívizomszövetek (EHT) létrehozása hiPSC-CM-ből lehetővé teszi ezen sejtek összehangolt kontrakcióját, ami a szarkomer szerveződésben kontraktilis erőben is jelentős előrelépést mutatott. EHT-konstrukció lehetővé teszi továbbá azt is, hogy a hegyes mikroelektród technika segítségével AP-t mérjünk. Az, hogy az EHT-konstrukció elősegíti-e a hiPSC-CM-ek érését elektrofiziológiai szempontból, továbbra is ismeretlen.

Transzgenikus állatok létrehozása, amelyekben egy szívbetegség fenotípusa kifejezhető ugyancsak rendkívül hasznos eszköznek bizonyult. Gyakran használt állatmodellek a kis rágcsálók (egér, patkány), melyekben transzgenikus úton lehet egy betegséget (hosszú QT-szindróma, hipertófiás kardiomiopátia) kifejezteni, illetve vizsgálni nem csak *in vitro*, de *in vivo* körülmények között is. Az egyik legfőbb probléma azonban ezekkel a kis rágcsálókkal, hogy az elektrofiziológiai tulajdonságaik jelentős eltéréseket mutatnak az emberi szívhez képest, emiatt szükség van olyan transzgenikus állatok létrehozására, amelyek szíve nagyobb hasonlóságot mutat az emberéhez képest. Az egyik lehetséges állatfaj a nyúl, amely már biztató eredményeket mutatott a betegség modellezések terén. Az elektrofiziológiai tulajdonságai a nyúlnak ugyancsak hasonlóak az emberéhez képest, és egy gyakran használt modell a kardiovaszkuláris farmakológiai kutatásokban.

Fentiek alapján a PhD értekezésemben bemutatott kísérletes munkának a következő volt a célja:

- 1) AZ I_{K1} áram denzitásának összehasonlítása a hiPSC-CM-ben két különböző sejt kultúrás technikában tartva (EHT és klasszikus kétdimenziós), majd az eredmények összehasonlítása felnőtt humán pitvari és kamrai sejtekből mért adatokkal.
- 2) Megvizsgálni hogy a hiPSC-CM-ek pitvari, vagy kamrai fenotípust mutatnak ioncsatorna expresszió ($I_{K,ACH}$ lehetséges expressziója és funkciója) és AP paraméterek alapján (repolarizációs frakció)

- 3) A nyugalmi potenciál vizsgálata EHT-ben két különböző méréstechnikát alkalmazva (patch clamp és hegyes mikroelektrod technika).
- 4) Egy új transzgenikus LQT5-ös nyúlmodell celluláris szívelektrofiziológiai tulajdonságainak karakterizálása.
- 5) Az LQT5-ös nyúlmodell *in vivo* elektrofiziológiai tulajdonságainak vizsgálata és annak reakciója az aritmia provokációra.

MÓDSZEREK

Speciesek és preparátumok

A kísérleteket nyúl és emberi szívekből származó preparátumokon és humán indukált pluripotens őssejtekből származtatott szívizomsejteken végeztük. Felnőtt, kb. 3.5 kg súlyú Új Zélandi házinyulakat használtunk. A kísérleti eljárást a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérletes Bizottsága (MÁB) előzetes támogatása és előterjesztése alapján a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc Bizottsága és Állategészségügyi Igazgatósága a 22.1/433/003/2010 and XIII./1211/2012 számú határozatában engedélyezte.

A humán kísérletekhez szívtranszplantációs műtétek során kivett szíveket, illetve szív műtétek során eltávolított szívizom-darabokat használtunk fel (jobb pitvari fülcse és bal kamra). A kísérleti eljárás megfelel az Orvosok Világszövetsége (WMA) Helsinkai Nyilatkozata előírásainak (Cardiovascular Research 1997; 35:2-4). A szívmintákat hideg (4-6 °C) kardioplégiás oldatban tároltuk egészen az elektrofiziológiai vizsgálatok (preparáció) megkezdéséig

Ionáram mérés patch-clamp technikával

A transzmembrán ionáramok méréséhez a patch clamp technika egészsejtes konfigurációját alkalmaztuk. A mikropipetták ellenállása kb. 2-5 MΩ volt. A kísérletek során az extracelluláris teret modellező Tyrode oldatot alkalmaztunk, az adott ionáram méréséhez igazítva. A méréseket Axopatch-200B típusú erősítővel (Molecular Devices-Axon Instruments, Union-City, USA) végeztük. A sejtek kapacitását 10 mV-os hiperpolarizáló pulzus segítségével, -90 mV *holding potenciálról* (az a potenciálérték, amelyen a sejtet két egymást követő feszültséglépcső után tartjuk) határoztuk meg. A

mérések folyamán a 4-8 M Ω -os ellenállást 50-80%-ig kikompensáltuk. A membránáramokat egy 333 Hz-es szoftvervezérelt (Axon pClamp 8.0, 10.0 és ISO2) analóg-digitális kártya (Digidata 1440, Axon Instruments) segítségével digitálisan mértük, és rögzítettük. Az áramméréseket ugyanazon szoftverek segítségével (Axon, pClamp 8.0,10.0 és ANA3) értékeltük ki. A kísérleteket az ionáramtól függően szobahőmérsékleten vagy fiziológiás hőmérsékleten (37 °C) végeztük. A kísérletek során a különböző ionáramokat farmakológiai (szelektív csatorna blokkolókkal), illetve elektrofiziológiai (speciálisan tervezett feszültségprotokollokkal) módon választottuk szét.

Current clamp mérések

Akciós potenciál méréséhez izolált szívizomsejteken a patch clamp technika *perforated patch* konfigurációját alkalmaztuk Amfotericin B segítségével. Az Axopatch 200B *current clamp* módra lett átkapcsolva, és a mérés során Tyrode oldatot használtunk 37 °C-on, 1 Hz-es ingerléssel.

Hegyes mikroelektród mérések

Akciós potenciál méréséhez szívizomszöveti és EHT preparátumokból, a hegyes mikroelektród technikát alkalmaztuk jobb pitvari, bal kamrai és EHT preparátumokon. A mikroelektródák ellenállása 20-50 M Ω (3 M KCl-lel töltve). Az akciós potenciálokat 1 Hz-es 0.5 ms hosszú stimulációval aktiváltunk 50 %-al a küszöbérték intenzitás felett. A mérés során Tyrode oldatot használtunk, 37 °C-os hőmérsékleten.

Transzkript szintek mérése

A teljes RNS tisztításához a humán szívminiókból és a hiPSC-CM-ből, az RNeasy® Plus Mini Kitet (Qiagen, Venlo, The Netherlands) használtuk. A transzkript szint meghatározásához, cDNS-eket termeltettünk a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével. Kvantitatív-PCR mérés az 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) on ABI PRISM 7900HT Sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) segítségével történt.

EKG mérések és kiértékelés

Amiatt, hogy sok altatószer befolyásolhatja az ionáramokat, a nyulakat thiopenthallal vagy ketamin-S/xylazinenal altattuk a fülvénán keresztül beadva. Az arteria carotison keresztül egy katéter lett behelyezve a vérnyomás mérésére. A a szerek beadása a juguláris vénán keresztül történt. A vérnyomás és az EKG folyamatosan regisztrálva volt. Az RR és a QT intervallum minden 30 ütés után átlagából került meghatározásra. Az artimia provokációs kísérletek során, mind a vad típusú mind a transzgénikus nyulak dofetilidet (Gedeon Richter Ltd., Budapest, Hungary) kaptak $20 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ 10 percig.

Statisztika

Az adatok (átlag \pm SEM) statisztikai elemzése egymintás Student *t*-próbával és egyszempontos ANOVA-teszttel történt. A *p* értéket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha értéke kisebb volt, mint 0.05.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az I_{K1} -áram a nyugalmi potenciál és az akciós potenciál vizsgálata hiPSC-CM-ben

A hiPSC-CM alapvető problémája az alacsony nyugalmi potenciál, amelynek hátterében vélhetően, a korábbi közlemények eredményei alapján, az I_{K1} áram alacsony expressziója, illetve amplitúdója áll. Jelen vizsgálat célja a klasszikus „*monolayer*” (ML) és az EHT kultúrából izolált hiPSC-CM-ben az I_{K1} áram mérése és összehasonlítása izolált humán kamrai (LV) és pitvari (RA) szívműködősejtekkel (CM) a patch clamp technika egészsejtes konfigurációját alkalmazva. Megvizsgáltuk, hogy az acetilkolin-szenzitív káliumáram ($I_{K, ACh}$) kifejeződik-e hiPSC-CM-ben, amely fontos pitvari marker. Az EHT konstrukció lehetővé teszi, az akciós potenciál (AP) mérését, hegyes mikroelektród technika segítségével, így a hiPSC-CM nyugalmi potenciálját és akciós potenciáljának tulajdonságait hasonlítottuk össze két eltérő mérés technika alkalmazása esetén (hegyes mikroelektród technika vs. patch clamp technika).

Az I_{K1} áram mérhető és Ba^{2+} -szenzitív volt hiPSC-CM-ben, és a befelé haladó áram denzitása hasonló volt a humán szívműködősejtekben mértékhez képest. Az áram kifelé haladó komponense szignifikánsan nagyobb volt LV-ben, mint a többi csoportban. Az I_{K1} csatorna formáló fehérje alegységeinek (Kir2.1-2.3) mRNS szintje magasabb volt LV-ben mint az ML, EHT, és RA csoportok esetén míg a Kir2.4 egyik csoportban sem volt

mérhető. A Ba^{2+} minden esetben hatékonyan gátolta az I_{K1} -áramot. A $2 \mu M$ carbachol egyetlen esetben sem aktiválta az $I_{K,ACH}$ -áramot hiPSC-CM-ben és LV-CM-ben. A Kir3.1-es alegység csak RA-ban fejeződött ki. Hegyes mikrolektródával mérés esetén a nyugalmi potenciál értéke hasonló volt EHT-ben, mint RA-ban és LV-ben. Patch clamp technikát alkalmazva az RMP szignifikánsan alacsonyabb volt hiPSC-CM-ben, mint humán bal kamrai illetve jobb pitvari miocitákban. Az akciós potenciál időtartam (APD_{90}) és az RMP értékek is jelentős átfedést mutattak az különböző csoportokban, mindkét technika alkalmazásakor. A repolarizációs frakció magasabb volt RA-ban, mint EHT-ben és LV-ben hegyes mikrolektród technika esetén. Az eredményeink azt mutatják, hogy a hiPSC-CM-ben az I_{K1} -áram mérhető, és denzitása hasonló, mint amit humán szívműködésben mértünk, mind a kifelé haladó, mind a befelé haladó komponens esetén. A Ba^{2+} már alacsony koncentrációban hatékonyan gátolta az áramot, és a Kir2.4-es alegység hiánya arra utal, hogy az I_{K1} neuronális formája nem fejeződik ki hiPSC-CM-ben. Az $I_{K,ACH}$ áram nem volt aktiválható carbachollal, és a Kir3.1 fehérje alegység sem expresszálódott hiPSC-CM-ben, ami részben kamrai fenotípusra utal. Az izolált hiPSC-CM-ben mért alacsony RMP érték oka feltehetően mérés technikai eredetű. Az APD_{90} és RMP értékek minden esetben jelentős átfedést mutattak a különböző csoportokban, így ezen paraméterek megbízhatósága pitvari, illetve kamrai fenotípus eldöntésére hiPSC-CM-ben kérdéses. A repolarizációs frakció szignifikánsan magasabb értéke RA-ban LV-hez és EHT-hez képest arra utal, hogy ezen paraméter megbízhatóan használható pitvari vagy kamrai fenotípus megállapítására hegyes mikrolektród technika használata esetén.

Új, 5-ös típusú hosszú Qt-szindrómás transzgenikus nyúlmodell *in vitro* és *in vivo* szívelektrofiziológiai vizsgálata

A különböző szerek esetleges proaritmiás mellékhatásainak megijóslása továbbra is fontos cél. A jelenlegi biztonsági előírások a KCNH2/HERG ionáram gátlására koncentrálnak szövetekben, illetve állatmodellekeben ép repolarizáció mellett. Új, olyan modellek szükségesek, melyekkel könnyebben megijósolhatóak a proaritmiás mellékhatások, illetve olyanok, amelyek szívműködés remodellingel, és gyengült repolarizációs tartalékkal rendelkező páciensekhez hasonló tulajdonságokkal bírnak. Ezen tanulmányban egy 5-ös típusú hosszú QT-szindrómás (LQT5) nyúlmodell lett kifejlesztve, amely egy szívspecifikus mutációt (G52R) fejez ki a KCNE1 β -alegységen, amely az I_{Ks} áramot generáló ioncsatornát szabályozza. EKG-paraméterek, mint a QT-szakasz rövid

távú variabilitása (STVQT), -amely fontos biomarkere a proaritmiás kockázatnak és az aritmia kialakulásának - kerültek vizsgálatra. Az *in vivo* kísérletek során az aritmia-fogékonyság vizsgálatához intravénásan dofetilidet alkalmaztunk. A káliumáramok méréséhez a patch clamp technika egészsejtes konfigurációját alkalmaztuk izolált kamrai szívizomsejteken 37 °C-on. A patch clamp kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy mind az I_{Kr} és I_{Ks} áram denzitása és aktivációs kinetikája nem változott, ezzel szemben mindkét ionáram deaktivációs kinetikája gyorsabb volt az LQT5-ös, heterozigóta nyulak szívéből izolált kamrai szívizomsejtekben. Az I_{to} áram denzitása nagyobb volt a transzgenikus állatokban, míg az I_{K1} áram denzitása nem változott, sem a befelé, sem a kifelé haladó komponens esetén. Az LQT5-ös heterozigóta állatok kis mértékű, de szignifikánsan hosszabb szívfrekvenciára normalizált QT indexszel (QT_i) és megnövekedett STVQT-vel rendelkeznek. A dofetilide magasabb számban váltott ki Torsades-de-pointes típusú aritmiát az LQT5-ös állatokban az STVQT-val párhuzamosan.

Sikeresen létrehoztunk egy új típusú LQT5-ös transzgenikus nyúlmodellt, amely szignifikánsan fogékonyabb volt a dofetilide-indukálta aritmiákra, így egy fontos modell lehet a proaritmiás mellékhatások, a repolarizációs zavarok okozta aritmiák és hirtelen szívhalálok lehetséges háttereinek vizsgálatára.

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK

1. HiPSC-CM erős I_{K1} -áram denzitással rendelkezhetnek. Az áram denzitása ML kultúrából származó sejtek esetén hasonló volt, mint humán LV-CM ben, EHT kultúrából származó sejtek esetén pedig, mint RA-CM-ben, azonos kísérleti körülmények között.
2. Feltehetően technikai problémák okozhatják a kis méretű sejtekben mért alacsony RMP-t patch clamp technika alkalmazása esetén. HiPSC-CM-ben, mind a pitvari (I_{K1} és RMP), mind a kamrai ($I_{K,ACH}$ hiánya és alacsony repolarizációs frakció) fenotípus megtalálható. Az alacsony I_{K1} és a depolarizált RMP nem feltétlenül öröklött sajátossága a hiPSC-CM-nek.
3. Egy új, transzgenikus LQT5-ös nyúlmodellt sikeresen létrehoztunk, amely a humán KCNE1 gént G52R mutációval overexpresszálja. Az állatok gyengült repolarizációs tartalékkal rendelkeznek, de súlyos repolarizációs zavarok és kamrai aritmiák nem voltak tapasztalhatóak kontroll körülmények között. AZ LQT5-ös transzgenikus nyulak fogékonyabbak az aritmiákra a vad típusúaknál, repolarizációs stressz esetén,

ezáltal egy megfelelő modell lehet a kihívást jelentő „csendes” LQT klinikai esetekhez.

4. Ez a modell további belátást nyújthat az repolarizációs zavarok okozta aritmiák és a hirtelen szívhalál mechanizmusainak megértésében. Ezen kívül egy új modellként szolgálhat az új, fejlesztés alatt álló vegyületek proaritmiás potenciáljainak tesztelésében.

A PhD értekezés téziseihez kapcsolódó publikációk

Közlemények

I. Horváth A, Lemoine MD, Löser A, Mannhardt I, Flenner F, Uzun AU, Neuber C, Breckwoldt K, Hansen A, Girdauskas E, Reichensperner H, Willems S, Jost N, Wettwer E, Eschenhagen T, Christ T, Low Resting Membrane Potential and Low Inward Rectifier Potassium Currents Are Not Inherent Features of hiPSC-Derived Cardiomyocytes.

STEM CELL REPORTS 10:(3) pp. 822-833. (2018)

IF (2017): 7.338 (Q1/D1)

Idézetek száma: 1

II. Major P, Baczkó I, Hiripi L, Odening KE, Juhász V, Kohajda Z, Horváth A, Seprényi G, Kovács M, Virág L, Jost N, Prorok J, Ördög B, Doleschall Z, Nattel S, Varró A, Bősze Z, A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of KCNE1 gene.

BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 173:(12) pp. 2046-2061. (2016)

IF: (2016): 5.491 (Q1/D1)

Idézetek száma: 7

Absztraktok

I. Horváth A, Uzun A, Vollert I, Breckwoldt K, Neuber C, Ansen A, Varró A, Eschenhagen T, Christ T, Mesterséges izomszövetekből izolált pluripotens őssejtekből származtatott szívizomsejtek elektrofiziológiai tulajdonságai (Electrophysiological properties of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes isolated from engineered heart tissues). *CARDIOLOGIA HUNGARICA* 45:(Suppl. D) pp. D31-D32. (2015)

II. Horváth A, Uzun A, Mannhardt I, Breckwoldt K, Neuber C, Löser A, Hansen A, Jost N, Varró A, Eschenhagen T, Christ T, Befelé egyenirányító ionáramok human indukált pluripotens őssejtekből származtatott szívizomsejtekben. (Inward rectifier ion currents in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes). *CARDIOLOGIA HUNGARICA* 46:(Suppl.F) pp. F47-F48. (2016)

III. Horváth A, Gurr K, Ismaili D, Mannhardt I, Ulmer B, Hansen A, Varró A, Eschenhagen T, Christ T, Properties of the sodium-calcium exchanger and the Na⁺/K⁺-ATPase in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *EP EUR.*;19: iii7-iii7. (2017)

IV. Horváth A, Gurr K, Ismaili D, Mannhardt I, Ulmer B, Hansen A, Jost N, Eschenhagen T, Christ T, A nátrium-kalcium cseremechanizmus és a Na⁺/K⁺-ATPáz vizsgálata humán indukált pluripotens őssejtekből származtatott szívizomsejtekben (Investigation of the

sodium-calcium exchanger and the Na⁺/K⁺ -ATPase in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes). *CARDIOLOGIA HUNGARICA* 47:(Suppl.C) p. C48. (2017)

Egyeb a PhD értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

I. Corici C, Kohajda Z, Kristóf A, Horvath A, Virág L, Szél T, Nagy N, Szakonyi Zs, Fülöp F, Muntean DM, Varró A, Jost N, L-364,373 (R-L3) enantiomers have opposite modulating effects on I-Ks in mammalian ventricular myocytes. *CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY* 91:(8) pp. 586-592. (2013)

IF: (2013): 1.546 (Q3)

Idézetek száma: 2

II. Jost N, Nagy N, Corici C, Kohajda Zs, Horváth A, Acsai K, Biliczki P, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Papp JGy, Varró A, Virág L, ORM-10103, a novel specific inhibitor of the sodium/calcium exchanger, decreases early and delayed afterdepolarization in the canine heart.

BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 170:(4) pp. 768-778. (2013)

IF (2013): 4.990 (Q1/D1)

Idézetek száma: 22

III. Uzun AU, Mannhardt I, Breckwoldt K, Horvath A, Johannsen SS, Hansen A, Eschenhagen T, Christ T, Ca(2+)-Currents in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Effects of Two Different Culture Conditions.

FRONTIERS IN PHARMACOLOGY 7: p. 300. (2016)

IF (2016): 4.400 (Q1/D1)

Idézetek száma: 5

IV. Kohajda Z, Farkas-Morvay N, Jost N, Nagy N, Geramipour A, Horváth A, Varga RS, Hornyik T, Corici C, Acsai K, Horváth B, Prorok J, Ördög B, Déri Sz, Tóth D, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Baczkó I, Leprán I, Nánási PP, Papp JGy, Varró A, Virág L. The effect of a novel highly selective inhibitor of the sodium/calcium exchanger (NCX) on cardiac arrhythmias in in vitro and in vivo experiments.

PLOS One 11(11): e0166041. doi: 10.1371/journal.pone.0166041.eCollection (2016)

IF (2015): 3.057 (Q1/D1)

Idézetek száma: 2

V. Lemoine MD, Mannhardt I, Breckwoldt K, Prondzynski M, Flenner F, Ulmer B, Hirt MN, Neuber C, Horvath A, Kloth B, Reichenspurner H, Willems S, Hansen A, Eschenhagen T, Christ T, Human iPSC-derived cardiomyocytes cultured in 3D engineered heart tissue show physiological upstroke velocity and sodium current density.

SCIENTIFIC REPORTS 7:(1) p. 5464. (2017)

IF (2015): 4.259 (Q1/D1)

Idézetek száma: 4

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

Szeretnék köszönetet mondani a PhD dolgozatom elkészítésén során közreműködő és segítséget nyújtó személyeknek. Hálás köszönettel tartozom **Prof. Dr. Papp Gyula**, akadémikus Úrnak a támogatásért tanácsaiért és segítségéért PhD munkásságom során, és **Prof dr. Varró András és Prof. Dr. Thomas Eschenhagen** tanszékvezető egyetemi tanár Uraknak, hogy lehetőséget nyújtottak, hogy a Szegedi Tudományegyetem, Általános

Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében és a Hamburgi Egyetemi Klinikai Központ, Kísérletes Farmakológiai és Toxikológiai Intézetében végezhettem PhD tanulmányaimat.

Különösen köszönöm témavezetőminek **Dr. Virág László, Dr. Jost Norbert és Dr. Torsten Christ** tudományos főmunkatárs Uraknak folyamatos támogatásukat és értékes javaslataikat, melyek alapvető mértékben hozzájárultak a dolgozat, illetve a tudományos közlemények megszületéséhez. Köszönöm támogatásukat melyet az elektrofiziológia alapjainak tanítása során nyújtottak, és amely egész munkám során elkísért.

Külön köszönöm szenior kollégáimnak **Dr. Baczkó Istvánnak, Prof. Dr Arne Hansennek, Prof. Dr Tóth Andrásnak és Prof. Dr. Bősze Zsuzsannának**, posztdok kollégáimnak **Dr. Nagy Norbertnek, Dr. Ördög Baláznak, Dr. Acsai Károlynak, Dr. Ingra Mannhardtnak, Dr. Kaja Breckwoldtnak, Dr. Frederik Flennernek, Dr. Christiane Neubernek** és PhD hallgató kollégáimnak **Dr. Corici Klaudiának, Dr. Amir Geramipournak, Kristóf Attilának, Dr. Juhász Vikornak, Dr. Nagy Zsófiának, Dr. Marc Daniel Lemoinenak, Ahmet Umur Uzunnak** a rengeteg segítséget.

Köszönöm **Molnár Imréné Zsuzsa, Girst Gábor, Dobai Gábor, Klaus Dieter Söhren, Anna Steenpass** kollégáknak a nyújtott segítségükért és a jó hangulatban eltöltött munkanapokért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak **Ujvári Violának, Horváth Györgynek, Ifj. Horváth Györgynek, Szabó Erzsébetnek Ujvári Istvánnak és Dr. Háromszéki Józsefnek** odaadó szeretetüket és folyamatos támogatásukat, ezért jelen tézisemet nekik ajánlom.

A jelen értekezéshez készült tudományos munka az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA K-119992 és OTKA ANN-113273), a Széchenyi 2020 Program (GINOP-2.3.2-15-2016-00006 és EFOP-3.6.2-16-2017-00006 projektek), a HU-RO Határon Átnyúló Program (HURO/1001/086/2.2.1 HURO-TWIN), a Magyar Tudományos Akadémia, a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program (Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program), a Campus Hungary Program (CHP/200-7/2014), az AFib-TrainNet (675351), a Német Kardiovaszkuláris Kutatóközpont (DZHK), a Német Oktatási és Kutatási Minisztérium (BMBF), a Német Kutatási Alap (DFG Es 88/12-1), a Európai Kutatási Tanács (ERC AG IndivuHeart - 340248), Kanadai Szív Alapítvány és a Kanadai Egészségügyi Kutatóintézetek támogatásával jött létre.