

**FAJOK KÖZÖTTI KÜLÖNBSÉGEK A SZÍV KAMRAI
REPOLARIZÁCIÓJÁBAN, ÉS EZEK JELENTŐSÉGE A
HUMÁN SZÍVELEKTROFIZIOLÓGIA
VONATKOZÁSÁBAN**

PhD értekezés tézisei

Dr. Árpádfy-Lovas Tamás

Témavezetők:

Prof. Dr. Varró András

Dr. Virág László



Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem
Szeged, Magyarország

2022

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ

KÖZLEMÉNYEK

- I **Árpádfy-Lovas T**, Baczkó I, Baláti B, Bitay M, Jost N, Lengyel C, Nagy N, Takács J, Varró A, Virág L. *Electrical Restitution and Its Modifications by Antiarrhythmic Drugs in Undiseased Human Ventricular Muscle*. Front Pharmacol. 2020 Apr 30;11:479. doi: 10.3389/fphar.2020.00479. PMID: 32425771
Journal impact factor: 5.811
- II **Árpádfy-Lovas T**, Husti Z, Baczkó I, Varró A, Virág L. *Different effects of amiodarone and dofetilide on the dispersion of repolarization between well-coupled ventricular and Purkinje fibers*. Can J Physiol Pharmacol. 2021 Jan;99(1):48-55. doi: 10.1139/cjpp-2020-0234. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32692935.
Journal impact factor: 2.273
- III **Árpádfy-Lovas T**, Mohammed ASA, Naveed M, Koncz I, Baláti B, Bitay M, Jost N, Nagy N, Baczkó I, Virág L, Varró A. *Species dependent differences in the inhibition of various potassium currents and in their effects on repolarization in cardiac ventricular muscle*, Can J Physiol Pharmacol. *In press*.

**A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények
összesített impakt faktora: 8.084**

TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

Horváth B, Hézső T, Szentandrásy N, Kistamás K, **Árpádfy-Lovas T**, Varga R, Gazdag P, Veress R, Dienes C, Baranyai D, Almássy J, Virág L, Nagy N, Baczkó I, Magyar J, Bányász T, Varró A, Nánási PP. *Late sodium current in human, canine and guinea pig ventricular myocardium*. J Mol Cell Cardiol. 2020 Feb;139:14-23. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.12.015. Epub 2020 Jan 17. PMID: 31958464.

Journal impact factor: 5.000

Pászti B, Prorok J, Magyar T, **Árpádfy-Lovas T**, Györe B, Topál L, Gazdag P, Szlovák J, Naveed M, Jost N, Nagy N, Varró A, Virág L, Koncz I. *Cardiac electrophysiological effects of ibuprofen in dog and rabbit ventricular preparations: possible implication to enhanced proarrhythmic risk*. Can J Physiol Pharmacol. 2021 Jan;99(1):102-109. doi: 10.1139/cjpp-2020-0386. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32937079.

Journal impact factor: 2.273

Orvos P, Kohajda Z, Szlovák J, Gazdag P, **Árpádfy-Lovas T**, Tóth D, Geramipour A, Tálosi L, Jost N, Varró A, Virág L. *Evaluation of Possible Proarrhythmic Potency: Comparison of the Effect of Dofetilide, Cisapride, Sotalol, Terfenadine, and Verapamil on hERG and Native IKr Currents and on Cardiac Action Potential*. Toxicol Sci. 2019 Apr 1;168(2):365-380. doi: 10.1093/toxsci/kfy299. PMID: 30561737.

Journal impact factor: 3.703

Kohajda Z, Virág L, Hornyik T, Husti Z, Sztojkov-Ivanov A, Nagy N, Horváth A, Varga R, Prorok J, Szlovák J, Tóth N, Gazdag P, Topal L, Naveed M, **Árpádfy-Lovas T**, Pászti B, Magyar T, Koncz I, Déri S, Demeter-Haludka V, Aigner Z, Ördög B, Patfalusi M, Tálosi L, Tiszlavicz L, Földesi I, Jost N, Baczkó I, Varró A. *In vivo and cellular antiarrhythmic and cardiac electrophysiological effects of desethylamiodarone in dog cardiac preparations*. Br J Pharmacol. 2022 Feb 1. doi: 10.1111/bph.15812. Epub ahead of print. PMID: 35106755.

Journal impact factor: 8.740

Hézsó T, Naveed M, Dienes C, Kiss D, Prorok J, **Árpádfy-Lovas T**, Varga R, Fujii E, Mercan T, Topal L, Kistamás K, Szentandrassy N, Almássy J, Jost N, Magyar J, Bányász T, Baczkó I, Varró A, Nánási PP, Virág L, Horváth B. *Mexiletine-like cellular electrophysiological effects of GS967 in canine ventricular myocardium*. Sci Rep. 2021 May 5;11(1):9565. doi: 10.1038/s41598-021-88903-3. PMID: 33953276; PMCID: PMC8100105.

Journal impact factor: 4.380

Magyar T, **Árpádfy-Lovas T**, Pászti B, Tóth N, Szlovák J, Gazdag P, Kohajda Z, Gyökeres A, Györe B, Gurabi Z, Jost N, Virág L, Papp JG, Nagy N, Koncz I. *Muscarinic agonists inhibit the ATP-dependent potassium current and suppress the ventricle-Purkinje action potential dispersion*. Can J Physiol Pharmacol. 2021 Feb;99(2):247-253. doi: 10.1139/cjpp-2020-0408. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33242286.

Journal impact factor: 2.273

Koncz I, Verkerk AO, Nicastro M, Wilders R, **Árpádfy-Lovas T**, Magyar T, Tóth N, Nagy N, Madrid M, Lin Z, Efimov IR. *Acetylcholine Reduces IKr and Prolongs Action Potentials in Human Ventricular Cardiomyocytes*. Biomedicines. 2022 Jan 24;10(2):244. doi: 10.3390/biomedicines10020244. PMID: 35203454; PMCID: PMC8869322.

Journal impact factor: 6.081

Romanelli MN, Del Lungo M, Guandalini L, Zobeiri M, Gyökeres A, **Árpádfy-Lovas T**, Koncz I, Sartiani L, Bartolucci G, Dei S, Manetti D, Teodori E, Budde T, Cerbai E. *EC18 as a Tool To Understand the Role of HCN4 Channels in Mediating Hyperpolarization-Activated Current in Tissues*. ACS Med Chem Lett. 2019 Feb 6;10(4):584-589. doi: 10.1021/acsmchemlett.8b00587. PMID: 30996800; PMCID: PMC6466822.

Journal impact factor: 3.975

A további közlemények összesített impakt faktora: 36.425

Minden közlemény összesített impakt faktora: 44.509

Bevezetés

Hirtelen szívhalál, kamrafibrilláció és a repolarizációs rezerv

Európában és Észak-Amerikában a hirtelen szívhalál (sudden cardiac death, SCD) éves incidenciája 50–100 eset 100 000 főre kivetítve, és a szívbetegek körében a halálozás közel feléért az SCD tehető felelőssé. Az SCD leggyakoribb mechanizmusa a kamrafibrilláció (VF), amely egy komplex és nem teljesen tisztázott jelenség a szívben.

A megnövekedett repolarizációs diszperzió következtében kialakuló kamrafibrilláció mechanizmusa

Élettani körülmények között a szívre hosszú és konzisztens effektív refrakter periódus (ERP) és gyors ingerületterjedés jellemző, ami biztosítja a depolarizációs és repolarizációs hullámok homogenitását. Azonban az akciós potenciál hosszának (action potential duration, APD) térbeli különbségei és az ezzel összhangban kialakuló ERP- és refrakteritásváltozások megnövelik a repolarizációs inhomogenitást, ami lehetővé teszi az ingerületterjedést egyébként nem megközelíthető útvonalakon. Mivel az ilyen típusú ingerületterjedés jelentősen megnöveli a reentry-típusú arrythmiák kialakulásának esélyét, ez az állapot a VF *szubsztrátjának* tekinthető.

A szubsztrát kialakulása

A repolarizációs rezerv koncepciója szerint az összes repolarizáló áram együtt hozza létre a szívizom teljes repolarizációs kapacitását. Ha egy áram működése csökken, akkor más áramok működése megemelkedhet, legalább részben pótolva a kiesett áram repolarizáló feladatát.

Az APD lokális különbségei (APD diszperzió) változhatnak különböző hatóanyagok és kórállapotok hatására, melyek a repolarizációt befolyásolják. A transzmurális APD diszperziót az EKG alapján QT/QTc vagy JT diszperzióval lehet közelíteni *in vivo* körülmények között. A kamrai myocardium és a Purkinje-rostok közötti diszperzió azonban csak *ex vivo* körülmények között tanulmányozható. Az emelkedett diszperzió mindkét régióban reentry-típusú arrhythmiaák szubsztrátjaként szolgálhat, azonban a szív ilyen módon érzékenyített állapotba kerülése önmagában nem elegendő az arrhythmiaák létrejöttéhez. A reentry kialakulásához szükség van egy *triggerre* is, amely általában egy extra ütés. Ez az ütés, végigvezetődve az alacsony ERP-jű területek által létrehozott komplex útvonalon, idézi elő a reentry-típusú arrhythmiaákat.

Arrhythmia triggerek és a restitúció

Bármilyen forrásból származó extra ütés triggereseménynek tekinthető, amely VF-hoz vezethet. Ezeknek az extra ütéseknek az időzítése meghatározó jelentőségű az arrhythmia kockázat szempontjából. A cardiomyocyták APD-jét, ERP-jét a diasztolés intervallum (DI), vagyis az előző ütéstől való időbeli távolság határozza meg. A DI-k nyúlásával az APD/ERP idő is megnyúlik a humán szív esetében, ezt a folyamatot nevezzük restitúciónak. A restitúciós hipotézis szerint ahogyan a DI-k nőnek az extra ütés terjedése során, a következő lehetséges extra ütés megnyúlt APD-vel és ERP-vel találkozhat, így helyi vezetési zavar alakulhat ki. Egy meredekebb/gyorsabb restitúciós görbe erősítheti ezt a jelenséget, ezért proarrhythmiasnak tekinthető. Egy kevésbé meredek/lassabb restitúciós görbe ezzel ellentétes hatásúnak tekinthető.

Szívelektrofiziológiai kísérletek

Bizonyos emlősök szíve jobban hasonlít az emberi szívhez, míg másoké jelentősen eltér. Annak ellenére, hogy a rágcsálók könnyen hozzáférhetőek és genetikai módosításukra is lehetőség van, elektrofiziológiai jellemzőik jelentősen eltérnek az emberétől.

Az akciós potenciál által felvehető jelformákat és az APD-k lehetséges időtartamait minden fajnál elsősorban a szív ioncsatornakészlete határozza meg. Ennek következtében az egyes fajok transzlációs értékét és kísérletezésre való alkalmasságát főként a humán szív ioncsatornakészletével való hasonlósága határozza meg. Emellett a megfeleltethető ioncsatornák abundanciája és aktivációs kinetikája is eltérő lehet az egyes fajok között, ami további különbségeket hozhat létre a repolarizációs rezervben.

Ennek a munkának a célja az, hogy szisztematikusan összehasonlítsa a humán kamra repolarizációjának jellemzőit a leggyakrabban alkalmazott modellfajok elektrofiziológiai tulajdonságaival. Ezen felül az egyes fajok APD restitúcióját is összehasonlítottuk, és ioncsatorna gátlószerek a humán restitúcióra kifejtett hatásait is megvizsgáltuk. A dofetilide és az amiodaron hatását elektrotónusosan kapcsolt és egymástól független Purkinje-bal kamra preparátumokon is összehasonlítottuk, lehetővé téve a hatóanyagok lokális repolarizációs diszperzióra kifejtett hatásának vizsgálatát.

Anyag és módszer

Kamrai endocardialis preparátumokból és Purkinje-rostokat tartalmazó preparátumokból vezettünk el akciós potenciálokat a konvencionális mikroelektród technika alkalmazásával, és számos ioncsatorna-gátló hatóanyag APD nyújtó hatását vizsgáltuk. A hatásokat a következő fajokban vizsgáltuk: kutya, nyúl, tengerimalac és patkány. Ezeknek a fajoknak az elektrofiziológiai jellemzőit hasonlítottuk össze humán szívből vett preparátumokkal. A kísérletes munka összhangban volt a Helsinki Nyilatkozat előírásaival. A kísérleti protokollokat a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság jóváhagyta (4991-0/2010-1018EKU [339/PI/010]). Az állatkísérletek kivitelezése a nemzetközi előírásoknak megfelelően történt (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, USA NIH publication NO 85-23, revised 1996; az Európai Parlament 2010/63/EU Direktívája). A kísérleti protokollokat jóváhagyta a Szegedi Tudományegyetem Állatkísérleti Bizottsága (engedélyszám: I-74-24-2017) és a Mezőgazdasági és Vidékfejlesztési Minisztérium (engedély száma: XIII/3331/2017).

A hatóanyagok APD-nyújtó hatását az APD_{90} érték (akciós potenciál időtartam 90%-os repolarizációnál) változásának preparátumok közötti összehasonlításával vizsgáltuk. A fajok

közötti összehasonlítást az APD_{90} megnyúlásának összehasonlításával vizsgáltuk (ANOVA).

A restitúciós görbék adatpontjait a következő monoexponenciális egyenlettel illesztettük az APD_{90} restitúció időállandójának kiszámítására:

$$APD = APD_{ss} - A^{-DI/\tau}$$

ahol az APD_{ss} az APD maximális értéke (APD_{90}), az A az exponenciális függvény amplitúdója, a DI a diasztolés intervallum, és a τ az időállandó.

Eredmények

Szelektív ioncsatorna gátlás 1000 ms ciklushossz mellett

A gyors késői egyenirányító káliumáramot (I_{Kr}) szelektíven gátló dofetilide (50 nM) nem befolyásolta a patkány kamrai repolarizációját, de jelentősen nyújtotta az APD-t humán és nyúl preparátumokban. A lassú késői egyenirányító káliumáram (I_{Ks}) HMR-1556 (500 nM) általi gátlása enyhe megnyúlást idézett elő a tengerimalac, a nyúl és a patkány esetében, de nem befolyásolta azt a humán és a kutya esetében. A tranziens kifelé egyenirányító áramot (I_{to}) chromanol-293B-vel (100 μ M) gátlottuk, melyet a HMR-1556 után alkalmaztunk.

Ez enyhe APD megnyúlást idézett elő a tengerimalac esetében, jelentős megnyúlást a kutya, a nyúl és a patkány esetében, azonban a humán preparátumokban APD rövidülést tapasztaltunk. A BaCl_2 (10 μM), mely a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) gátlója, szignifikánsan nyújtotta a patkány kamrai repolarizációt, de csak mérsékelten nyújtotta azt a kutya és nyúl esetében, és enyhe változásokat idézett elő a humán és a tengerimalac esetében. A XEN-D0101 (1 μM) alkalmazásával az ultrarapid késői egyenirányító káliumáramot (I_{Kur}) gátoltuk. A XEN-D0101 szignifikánsan nyújtotta a patkány repolarizációt, míg a humán, a kutya, a nyúl és a tengerimalac esetében enyhe vagy semmilyen változást nem tapasztaltunk.

Frekvenciafüggő APD változások (változó ciklushosszú ingerlés)

Az APD frekvenciafüggő változásait humán, kutya, nyúl, tengerimalac és patkány preparátumokban 300 ms-tól 5000 ms-ig tartó tartományban vizsgáltuk. A ciklushosszt a protokoll során dinamikusan növeltük. A humán és a kutya esetében az APD konzisztensen nyúlt a ciklushossz növelésével. A nyúl és a tengerimalac preparátumok eltérő mintázatot mutattak: 1000 ms-os ciklushosszig az APD nyúlt, majd az ennél hosszabb ciklushosszaknál rövidülést mutatott. A patkány preparátumok

esetében ennek az ellenkezője történt, ugyanis 1000 ms-ig rövidült az APD, az ennél hosszabb ciklushosszaknál pedig az APD megnyúlását tapasztaltuk.

Ioncsatorna gátló hatóanyagok hatása a humán APD restitúcióra

További kísérletekben antiaritmiás szerek APD restitúcióra kifejtett hatását vizsgáltuk humán kamrai preparátumokon. Az E-4031 és a sotalol, az I_{Kr} -szelektív inhibitorai nyújtották az APD-t és lassították a restitúció kinetikáját ($\tau=82.6$ ms-ról $\tau=160.3$ ms-ra, $n=5$; és $\tau=95.8$ ms-ról to $\tau=152.7$ ms-ra, $n=5$). Az L-735,821, az I_{Ks} áram szelektív gátlószere nem befolyásolta sem az APD-t, sem a restitúció dinamikáját ($\tau=113.1$ ms vs. $\tau=111.9$ ms, $n=7$). A I_{Na} gátló mexiletine és a I_{Ca-L} gátló nisoldipine humán kamrai restitúcióra kifejtett hatásait is vizsgáltuk. Mindkét szer rövidítette az APD-t, azonban csak a mexiletine lassította a restitúciós kinetikát ($\tau=98$ ms-ról $\tau = 133.2$ ms-ra, $n=6$). A nisoldipine hatása a restitúció kinetikájára elhanyagolhatóan bizonyult ($\tau = 111.1$ -ről ms to $\tau = 113.1$ -ra ms, $n=6$).

Az amiodaron és a dofetilide hatásainak összehasonlítása a kamra és a Purkinje rostok közötti repolarizációs diszperzióra

További kísérletekben az amiodaron (kutyák, 4 héten keresztül 50 mg/kg/nap dózis per os) és a dofetilide (50 nM, önkontrollosan a mérés során alkalmazva) APD megnyújtó hatását vizsgáltuk elektrotónusosan kapcsolt és szétkapcsolt kamra és Purkinje preparátumokon. Az elektrotónusosan kapcsolt preparátumok 25–35 mm átmérőjűek voltak, rajtuk a kamrai myocardium kapcsolatban állt a szabadon futó Purkinje-rostokkal. A szétkapcsolt preparátumok hagyományos, különálló papilláris izmok és Purkinje-rost preparátumok voltak, egymással nem álltak kapcsolatban.

Az amiodaron az APD-t hasonló mértékben növelte a kapcsolt és a szétkapcsolt Purkinje-rostokban. Azonban a kapcsolt preparátumok esetében jelentősebb APD nyújtó hatást tapasztaltunk a kamraizomzatban, mint a szétkapcsolt preparátumok esetében.

Ennek következtében a szétkapcsolt preparátumok esetében az amiodaron látszólag a lokális diszperzió változtatása nélkül nyújtotta az APD-t. Ezzel szemben a kapcsolt preparátumok esetében az amiodaron APD-nyújtó hatása a Purkinje-kamra junkció területén jelentősen csökkentette a helyi APD diszperziót.

A dofetilide APD nyújtó hatása a Purkinje-rostokon bizonyult kifejezettebbnek, ennek következtében az APD diszperziót jelentősen megnövelte. A kamrai szöveteken tapasztalt APD₉₀ megnyúlás hasonló mértékű volt a dofetilide hatására az elektrotónusosan kapcsolt és szétkapcsolt preparátumokban is, míg a Purkinje-rostok esetében a szétkapcsolt preparátumokban kifejezettebb volt a megnyúlás. Ennek következtében a dofetilide jelentősen megnövelte a lokális diszperziót a kapcsolt és a szétkapcsolt preparátumokban is, de az utóbbiban a hatás kifejezettebbnek bizonyult.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az elektrotónusos kapcsoltság megléte vagy hiánya befolyásolhatja a gyógyszerek diszperzióra gyakorolt hatásának értelmezését a Purkinje–kamraizomzat-junkcióban,

ugyanis a diszperzió alulbecslése és túlbecslése is előfordulhat, ha azt csak szétkapcsolt preparátumokban vizsgáljuk.

Megbeszélés

A potenciálisan életet veszélyeztető arrhythmia kialakulásához a szív elektrofiziológiailag sérülékeny időpillanatban érő triggereseményre van szükség. Ilyen sérülékeny állapot az APD megnyúlás hatására is létrejöhet, melynek hátterében belső vagy külső eredetű repolarizációs elégtelenség állhat. Ahhoz, hogy humán vonatkozásban releváns információt tudjunk gyűjteni a gyógyszerek és gyógyszerjelöltek APD megnyújtó hatásáról, a humán repolarizációt megfelelően reprezentáló modellszervezeteket kell választanunk. A modellekből gyűjtött adatok értékelésekor pedig az adott modell limitációit is figyelembe kell venni, úgymint az ionáramok eltéréseit a humánhoz képest, és az elektrotónusos kapcsolttság meglétét vagy hiányát is. A kutyát, ioncsatornakészlete szempontjából, a humán szívelektrofiziológia elfogadható modelljének tekintették, és eredményeink is megerősítik ezt az elképzelést. A tengerimalac és a nyúl hozzáférhetőbb modellek a kutyánál, és repolarizációjuk közelebb áll a humánéhoz, mint a patkányé. Ezenfelül az elektrotónusosan szétkapcsolt Purkinje-rost és

kamra preparátumok alkalmazása a Purkinje-rostokban az APD-nyújtó hatások túlbecslését, a kamrában pedig alulbecslését idézheti elő, összehasonlítva ugyanezen szövetek egymással kapcsolt állapotban történő vizsgálatával.

Következtetés

Az új hatóanyagok legalább két különböző modellben történő vizsgálata jelentősen növelheti a szívelektrofiziológiai alapkutatások transzlálhatóságát, és az ebben a munkában bemutatott fajok közötti különbségek figyelembevétele segíthet a gyógyszerek humán APD-re kifejtett várható hatásának pontosabb megjóslásában.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni az elmúlt évek felbecsülhetetlen támogatását és folyamatos szakmai útmutatását témavezetőimnek, Prof. Dr. Varró Andrásnak és Dr. Virág Lászlónak. Hálás vagyok a Farmakológiai Intézet vezetőjének, Dr. Baczkó Istvánnak iránymutatásáért és azért, hogy lehetőséget biztosított, hogy PhD munkámat az Intézetben végezhessem. Köszönöm az Intézet kutatóinak, Prof. Jost Norbertnek, Dr. Nagy Norbertnek, Dr. Husti Zoltánnak, Dr. Koncz Istvánnak, Dr. Orvos Péternek, Dr. Nagy-Kohajda Zsófiának, és Dr. Orosz Andreának támogatásukat és szakmai tanácsaikat. Szeretném továbbá megköszönni Dr. Horváth Baláznak és Dr. Szentandrassy Norbertnek a konferenciák alkalmával tőlük kapott észrevételeket és építő kritikát. Köszönöm a segítséget és a kiváló társaságot PhD hallgatótársaimnak, Dr. Tóth Noéminek, Dr. Topal Leilának, Aiman Mohammednek, Muhammad Naveednek, Dr. Pászti Bencének és Dr. Magyar Tibornak. Hálás vagyok Molnárné Zsuzsa technikai segítségéért és tanácsaiért, amelyekkel nagyban hozzájárult ahhoz, hogy elsajátítsam a konvencionális mikroelektród technika alkalmazását.

Támogatók

Ezt a munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH K-119992 és GINOP-2.3.2-15-2016-00048-STAY ALIVE), az Emberi Erőforrások Minisztériuma (20391-3/2018/FEKUSTRAT, EFOP-3.6.2-16-2017-00006-LIVE LONGER és EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00009), az Új Nemzeti Kiválóság Program (UNKP-19-3-SZTE, UNKP-20-3-SZTE, és UNKP-21-3-SZTE), és a Magyar Tudományos Akadémia támogatta. A GINOP és EFOP projektek az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap közös támogatásával valósultak meg.