

I

**Gyógyszer-indukálta és transzgenikus hosszú QT
szindrómás csökkent repolarizációs rezervú nyúl
modellek alkalmazása proaritmiás gyógyszerhatások
vizsgálatában**

PhD értekezés tézisei

Hornyik Tibor, MD



Szeged

2021

**Gyógyszer-indukálta és transzgenikus hosszú QT
szindrómás csökkent repolarizációs rezervú nyúl
modellek alkalmazása proaritmiás gyógyszerhatások
vizsgálatában**

PhD értekezés tézisei

Hornyik Tibor, *MD*

Témavezető:

Baczkó István, *MD, PhD, habil*

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

SZTE Multidiszciplináris Doktori Iskola

Szeged

2021

A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Hornyik T, Castiglione A, Franke G, Perez-Feliz S, Major P, Hiripi L, Koren G, Bősze Zs, Varró A, Zehender M, Brunner M, Bode C, Odening E. K., Baczkó I. Transgenic LQT2, LQT5, and LQT2-5 rabbit models with decreased repolarisation reserve for prediction of drug-induced ventricular arrhythmias. BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 177 pp. 3744-3759. , 16 p. , **2020**, **IF (2019): 7.73** (D1/Q1)

Varga R, **Hornyik T**, Husti Z, Kohajda Zs, Krajsovszky G, Nagy N, Jost N, Virag L, Talosi L, Mátyus P, Varro A, Baczko I. Antiarrhythmic and cardiac electrophysiological effects of SZV-270, a novel compound with combined Class I/B and Class III effects, in rabbits and dogs. CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY **2021**, 99(1): 89-101, **IF (2019): 1.946** (Q2)

Összesített impakt faktor: 9.676

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Baczko I*; **Hornyik T***, Brunner M, Koren G, Odening K. Transgenic Rabbit Models in Proarrhythmia Research. Frontiers in Pharmacology 11: Paper 853, 18 p. (**2020**), **IF: 4.225** (Q1)

*megosztott első szerzők

Juhász V, **Hornyik T**, Benak A, Nagy N, Husti Z, Pap R, Saghy L, Virag L, Varro A, Baczko I. Comparison of the effects of $I_{K,ACH}$, I_{Kr} and I_{Na} block in conscious dogs with atrial fibrillation and on action potentials in remodeled atrial trabeculae. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 96(1): 18-25. (**2018**), **IF: 1.54** (Q2)

Kohajda Z, Farkas-Morvay N, Jost N, Nagy N, Geramipour A, Horvath A, Varga R, **Hornyik T**, Corici C, Acsai K, Horvath B, Prorok J, Ordog B, Déri Sz, Toth D, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Toth A, Baczko I, Lepran I, Nanasi PP, Papp JG, Varro A, Virag 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) Paper e0166041. 28 p. (2016), IF: 3.11 (Q1)

Husti Z, Tabori K, Juhasz V, **Hornyik T**, Varro A, Baczko I. Combined inhibition of key potassium currents differently affects cardiac repolarization reserve and arrhythmia susceptibility in dogs and rabbits. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 93(7): 535-544. (2015), IF: 1.546 (Q2)

Pueyo E, Husti Z, **Hornyik T**, Baczkó I, Laguna P, Varro A, Rodriguez B. Mechanisms of ventricular rate adaptation as a predictor of arrhythmic risk. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 298(5): H1577-H1587. (2010), IF: 3.881 (Q1)

Idézhető absztraktok száma: 29

A tézis tárgyához kapcsolódó közlemények impakt faktora: 9.676

Egyéb közlemények impakt faktora: 14.302

Összesített impakt faktor: 23.978

RÖVIDÍTÉSEK

APD:	akciós potenciál időtartama
CL:	ciklus hossz
HERG:	az I_{Kr} -áramot vezető kálium csatorna humán 'ether-a-go-go' gén által kódolt α -alegysége
$I_{Ca,L}$:	L-típusú kalcium áram
I_{Kr} :	késői egyenirányító kálium áram gyors komponense
I_{Ks} :	késői egyenirányító kálium áram lassú komponense
I_{K1} :	befelé egyenirányító kálium áram
KCNE1:	az I_{Ks} -áramot vezető kálium áram β -alegységét kódoló gén
LQTS:	hosszú QT szindróma
LQT2:	hosszú QT szindróma 2-es típusa
LQT5:	hosszú QT szindróma 5-ös típusa
LQT2-5:	hosszú QT szindróma kombinált 2-es és 5-ös típusa
MAP:	monofázisos akciós potenciál
QT:	QT intervallum az EKG-n
SCD:	hirtelen szívhalál
STV _{QT} :	a QT intervallum rövid távú variabilitása
TdP:	Torsades de Pointes kaotikus kamrai tachycardia
VEB:	kamrai extra ütés
VER:	kamrai pótritmus
VT:	kamrai tachycardia
VF:	kamrafibrilláció
WT:	vad típus

BEVEZETÉS

A proaritmia – gyógyszeres terápia kapcsán jelentkező 'de novo' aritmia – ritka de potenciálisan életveszélyes gyógyszermellékhatás, mely jelentős biztonsági kockázatot jelent gyógyszerfejlesztés során. Az esetek többségében a proarrhythmia háttérében a szívizom repolarizációjának megnyúlása áll, melyet az EKG-n a QT intervallum meghosszabbodása jelez (szerzett vagy gyógyszer-indukálta hosszú QT szindróma, 'aLQTS'). A szerzett hosszú QT szindróma Torsades-de-Pointes (TdP) kamrai tachikardián keresztül hirtelen szívhalál (SCD) kialakulására hajlamosít. Az utóbbi évtizedekben számos igen elterjedten használt gyógyszercsoport (antipszichotikumok, antidepresszánsok, antihisztaminok és anitibiotikumok) használatával kapcsolatban igazoltak TdP okozta hirtelen szívhalált, és ennek eredményeképpen számos ilyen mellékhatásprofíllal rendelkező szert kellett a forgalomból kivonni, jelentős anyagi veszteséget okozva ezzel a gyógyszeriparnak. A fentiekből következően jelentős igény mutatkozik tehát az új gyógyszerjelölt vegyületek proaritmiás kockázatának minimalizására, ez a cél azonban mindezidáig nem kielégítően megoldott.

Az új gyógyszerjelölt vegyületeknek akár 60%-a, míg a forgalomba került gyógyszereknek nem kevesebb mint 2-3%-a képes a szív ioncsatornáinak befolyásolásával annak elektromos funkcióit megzavarni. A legtöbb vegyület elsősorban a késői egyenirányító kálium áram gyors komponensét (I_{Kr}) gátolja, de más ionáramokkal, mint például a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensével (I_{Ks}) vagy a befelé egyenirányító kálium árammal (I_{K1}) történő gyógyszerinterakció szintén súlyos proaritmiát eredményezhet (több ioncsatornát érintő úgynevezett 'multi-channel-based' jellegzetesség). Mindezek ellenére, a jelenleg használt proaritmia tesztek többnyire csak a szerek I_{Kr} gátló hatásának kimutatására fókuszálnak, míg az I_{Ks} vagy I_{K1} gátló hatások rutinszerű vizsgálata nem történik meg. Ezen kívül a gyógyszer által kiváltott TdP többnyire olyan betegeknél jelentkezik leginkább, akikben kardiovaszkuláris és / vagy anyagcsere-betegség következtében a szív szerkezeti és / vagy elektrofiziológiai átalakulása ('remodelling') miatt az ún. „repolarizációs tartalék” csökkenése alakul ki. A repolarizációs tartalék a szívizomsejtek azon tulajdonságát jelöli, mely szerint azok a repolarizációt nyújtó (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{to} gátló) gyógyszerhatások ellenére is képesek a repolarizáció normál fenntartására a gátlásban nem érintett 'tartalék' K^+ áramok működésének fokozásán keresztül. Ennek ellenére a jelenlegi gyógyszerbiztonsági proaritmia

tesztek továbbra is főként ép repolarizációjú egészséges állatok vagy az azokból származó szövetek / sejtek felhasználásával történnek.

Mindezek alapján a gyógyszer okozta proaritmiás mellékhatások megbízhatóbb szűrésére olyan új állatmodellek - mint például az I_{Kr} vagy I_{Ks} funkciókárosodása miatti csökkent repolarizációs rezervkapacitású modellek - használata javasolt, melyek a proaritmia kialakulására legérzékenyebb rizikócsoportok patofiziológiai jellegzetességeit mutatják. E modellek közül a nyúl kiemelkedő helyet foglal el az aritmia-kutatásban, mivel szívelektrofiziológiai jellemzői sok szempontból sokkal közelebb vannak az emberhez, mint más kisebb állatok, úgy mint az egerek vagy a patkányok: (i) hasonló káliumáramok (főleg I_{Kr} és I_{Ks}) felelősek a szív repolarizációjának kialakításáért nyulakban és emberekben, és ezért (ii) az akciós potenciál alakja is hasonló a két fajban. Ezen kívül a szívizom mechanikai funkciója, és a gyógyszerhatásokra adott válaszaik is nagyon szoros hasonlóságot mutatnak az emberrel.

A fentiek alapján, jelen dolgozatban különböző gyógyszer-indukálta (I_{Ks} gátló HMR-1556) szerzett vagy transzgenikus (LQT2: HERG-G628S, I_{Kr} vesztés; LQT5: KCNE1-G52R, csökkent I_{Ks} és LQT2-5, mindkét mutációval) csökkent repolarizációs tartalékú hosszú QT szindrómás nyúl modellt használtunk azon elektrofiziológiai változások modellezésére melyek a proaritmiára legérzékenyebb betegcsoportokban alakulnak ki. Ezen modellek különböző repolarizációt nyújtó szerekre ('szelektív' K^+ -csatorna gátlók és egy új gyógyszerjelölt az SZV-270) mutatott érzékenységét vizsgáltuk a vad típussal összehasonlítva, hogy megállapíthassuk, e modellek mennyire lehetnek alkalmasak a gyógyszer által kiváltott ritmuszavarok megbízhatóbb előrejelzésében.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Egy új, kombinált III és I/B osztályú antiaritmiás gyógyszerjelölt, az SZV-270 proaritmiás mellékhatásának vizsgálata farmakológiailag (I_{Ks} gátló HMR-1556) gyengített repolarizációs rezervú szerzett hosszú QT szindrómás nyúl modellben.
2. Egy új, dupla-transzgenikus (LQT2-5) nyúl modell létrehozása és karakterizálása károsodott repolarizációs rezerv (hosszú QT szindróma) melletti csökkent I_{Ks} funkciójú betegség modellezése, ill. a csökkent I_{Ks} – elsősorban fokozott szimpatikus

idegrendszeri aktivitás melletti – gyógyszer-indukálta proaritmiában közrejátszott szerepének tisztázása céljából.

3. Különböző mechanizmus miatt csökkent repolarizációs rezervú transzgenikus hosszú QT szindrómás nyúl modellek (LQT2, LQT5 and LQT2-5) alkalmazhatóságának vizsgálata gyógyszer okozta kamrai ritmuszavarok pontosabb előrejelzésében.

MÓDSZEREK

Az állatkísérletek az EU irányelveivel (2010/63/EU) és a német, ill. a magyar állatvédelmi törvényekkel összhangban a helyi állatetikai bizottságok (Regierungspraesidium Freiburg G14/111, ill. a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-Biztonsági és Földművelésügyi Főosztály, XIII/4227/2016) hatósági engedélyvel zajlottak.

Proaritmia vizsgálatok gyógyszer-indukálta hosszú QT szindrómás nyúl modellen

Az SZV-270, egy új antiaritmiás gyógyszerjelölt vegyület proaritmiás mellékhatásának vizsgálata a gyógyszer-indukálta szerzett hosszú QT szindrómás nyúl modell segítségével történt. Az állatokat iv. thiopentánnal (50 mg/kg) altattuk, majd egy traheális csövön keresztül géppel lélegeztettük. A vérnyomás monitorozása és iv. gyógyszeradás céljából a bal oldali carotis artériát és a jobb oldali juguláris vénát kanüláltuk. 15 perc nyugalmi idő ('kontroll') után az 1-es csoport ('dofetilid') I_{Kr} gátló dofetilidet (25 μ g/kg), míg a 2-es ('HMR + dofetilid') és a 3-as csoportok ('HMR + SZV-270') I_{Ks} gátló HMR-1556 (0,1 mg/kg) és dofetilid (25 μ g/kg) vagy SZV-270 (0,3 mg/kg) kombinációját kapták. Az EKG-t (I, II, és III-as elvezetés) szubkután tűelektrodák segítségével monitoroztuk. A QT intervallum szívfrekvencia korrekcióját a $QT_c = QT - (0.704 * (RR-250))$ egyenlet szerint végeztük. A repolarizáció időbeli (ún. 'beat-to-beat') variabilitásának, az ún. rövid távú QT variabilitásnak (STV_{QT} , proaritmiás marker) gyógyszer-indukálta változását, 31 egymást követő QT értékből a következő képlet szerint származtattuk: $STV_{QT} = \sum |D_{n+1} - D_n| (30 \times \sqrt{2})^{-1}$, ahol a 'D' az 'n'-ik ütéshez tartozó QT távolságot jelöli. Az aritmiák jellemzése a Lambeth konvenciók szerint történtek.

Proaritmia vizsgálatok transzgenikus hosszú QT szindrómás nyúl modelleken

A gyógyszer-indukálta aritmiákra legérzékenyebb betegekben létrejövő krónikus szívelektrofiziológiai változások (csökkent repolarizációs rezerv) pontosabb modellezésére különböző transzgenikus hosszú QT szindrómás nyúl modelleket hoztunk létre funkcióvesztéssel járó humán mutációk (KCNH2 (HERG-G628S, I_{Kr} hiány, LQT2) vagy KCNE1 (KCNE1-G52R, csökkent I_{Ks} , LQT5)) kardioszelektív kifejeztetésével. A dupla-transzgenikus LQT2-5 modellt LQT2-es hím és LQT5-ös nőstény egyedek keresztezésével kaptuk. A transzgén(ek) jelenlétét PCR vizsgálattal igazoltuk, a szükséges genomikus DNS-t az állatoktól 40-50 napos korban levett vérmintákból nyertük. A fenotípus igazolása szedált, 3-4 hónapos egyedek 12 evezetési EKG vizsgálatával történt a QT index (QT_i) meghatározásával (QT_i (%) = $(QT_{\text{mért}} / QT_{\text{várható}}) * 100$). Vizsgáltuk a különböző genotípusok (WT, LQT2, LQT5 és LQT2-5 modellek QT_i = 100 ± 5%-al) elektrofiziológiai jellemzőit, I_{Ks} funkcióját illetve K⁺-csatorna gátló szerekkel szembeni érzékenységüket és *ex vivo* aritmia készségüket.

Transzgenikus hosszú QT szindrómás nyulak elektrofiziológiai jellemzőinek vizsgálata

Telemetriás EKG: Éber, mozgásában nem korlátozott WT (n=11), LQT5 (n=11), LQT2 (n=10) és LQT2-5 (n=8) nyulak EKG monitorozása céljából szubkután EKG transzmitterek (három elvezetési EKG D70-EEE; Data Sciences International) beültetését végeztük általános érzéstelenítés mellett (im. 12,5 + 3,75 mg/kg ketamin+xylazin indukció, fenntartó dózis 2,5-5 ml/kg/óra sebességű 20 ml ketamint és 3 ml xylazint tartalmazó keverék oldat iv. adásával, ketamin: 25 mg/ml; xylazin: 20 mg/ml). 2 hét regenerálódási idő után végeztük el a konvencionális EKG paraméterek (PQ, QRS, RR, QT) 24 órás monitorozását kontroll (gyógyszer mentes) körülmények között. Ezen paraméterek 24 órán keresztül 30 percenkénti 5 másodperces mérési szakaszok értékeiből számolt átlagnak felelnek meg. A nyulak egyéni QT / RR összefüggését 48 db QT – RR pár értékeire illesztett egyeneses képleteként (QT (y) = a * RR (x) + b) kaptuk meg. Ennek segítségével egyéni QT frekvenciakorrekciót (QT_{várható} (y) = a * RR (x) + b) és QT indexszámítást (QT_i (%) = 100 * (QT_{mért} / QT_{várható})) végeztünk minden egyednél. A frekvenciakorrigált QT időt (QT_c) a QT_c = QT_{mért} – (a * (RR – 250)) képlet szerint számoltuk, ahol 'a' a QT / RR összefüggés meredekségét jelöli. A QT_c és QT_i 24 órás átlagértékeit tekintettük kontroll értéknek. Genotípus specifikus QT_c számításához az adott

genotípus minden vizsgált egyedének összes QT – RR párjára illesztett egyenes képletét használtuk.

Hagyományos 12 elvezetéses EKG: Ketamin/xylazinnal szedált WT (n=6), LQT5 (n=9), LQT2 (n=8) és LQT2-5 (n=8) állaton végeztünk 12 elvezetéses EKG vizsgálatot a hagyományos EKG paraméterek (PQ, QRS, RR, QT) meghatározása céljából. Proaritmia markerek, mint a 'T_{peak}-T_{end}' (T_{p-e}) és az STV_{QT} is meghatározásra kerültek a repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitásának vizsgálata céljából. A T_{p-e} paramétert V3-ban mértük a T hullám csúcsától annak végéig ms-ban kifejezve. Az STV_{QT}-t a fent leírtak szerint számoltuk.

Monofázisos akciós potenciál (MAP) mérése 'ex vivo': A WT (n=13), LQT5 (n=15), LQT2 (n=12) és LQT2-5 (n=11) nyulakat ketamine/xylazinnal szedáltuk (lásd fent) majd heparinizáltuk (500 NE iv., Braun, Németország). Thiopentállal (40 mg/kg iv., Inresa, Németország) történő terminális altatás után a szíveket eltávolítottuk majd egy vertikális Langendorff set-up-hoz csatlakoztattuk (Model IH5, Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Németország). A szíveket retrográd perfundáltuk 37°C-os pre-oxygenizált (95% O₂ and 5% CO₂) módosított Krebs-Henseleit oldattal 50 ml/perc sebességgel. Az aortanyomást 80-100 Hgmm között tartottuk. Egy latex ballon végű nyomás szenzort helyeztünk a bal kamrába és a végdiasztolés nyomást 6-10 Hgmm értékre állítottuk. Az AV csomó mechanikai ablációját követően a szívet 500 és 250 ms ciklushosszú ingerléssel stimuláltuk. Az EKG-t a kísérlet teljes ideje alatt monitorizáltuk. 20-30 perc regenerációs idő után 4 db epikardiális kontaktelektroda segítségével MAP méréseket végeztünk 500 és 250 ms-os ciklushosszú ingerlés mellett a következő régiókban: MAP1: elülső apikális, MAP2: középső-elülső oldali, MAP3: alsó oldali bazális és MAP4: alsó bazális pozíciókban. A MAP időtartamát (a repolarizáció 75%-nál, APD₇₅) és a 'trianguláció' (APD₉₀ - APD₃₀) mértékét 'off-line' mértük minden egyes MAP elektróda (MAP1-4) esetén, illetve kiszámoltuk ezek átlagait is ('átlag APD₇₅' és 'átlag APD₉₀ - APD₃₀').

Proaritmia markerek változásainak vizsgálata K⁺-csatorna gátló szerek hatására WT, LQT2, LQT5 és LQT2-5-ös nyúl modellekben

Telemetriás EKG: 24 órás kontroll mérést követően dofetilidet (0,02 µg/kg), bárium-kloridot (BaCl₂, 0,3 mg/ttkg), PEG-400-at (0,125 ml/kg), HMR-1556-ot (0,1 µg/kg 0,125 ml/kg PEG400-ban) ill. HMR-1556 és BaCl₂ kombinációt adtunk im., naponta egy injekciót. Az EKG

paraméterek változását minden im. injekció után 24 órán keresztül követtük. A dofetilid és BaCl_2 hatását a 24 órás kontroll periódus alatt mért átlagos QTc/QTi értékekhez viszonyítottuk. A HMR-1556 és a HMR-1556 + BaCl_2 hatását 'vivőanyag kontroll'-ként adot PEG-400 im. adását követő 5 órában mért átlagos QTc/QTi értékekhez viszonyítottuk.

Hagyományos 12 elvezetéses EKG: Gyógyszermentes 'kontroll' regisztrálást követően dofetilidet (0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$), BaCl_2 -t (0,3 mg/kg), HMR-1556-ot (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ill. HMR-1556 és BaCl_2 kombinációját adtuk bólusban iv., majd megmértük a konvencionális EKG paraméterek (PQ, QRS, RR, QT) és proaritmia markerek (STV_{QT} , T_{p-e}) legnagyobb ('csúcs'-hatás) változásait az injekció beadásától számolt 20 percen belüli időszakban.

Monofázisos akciós potenciál (MAP) mérése 'ex vivo': Gyógyszermentes 'kontroll' regisztrálás után (2Hz-es ingerlés mellett) mértük az APD_{75} és az AP 'triangularizáció' változásait 10 perces dofetiliddel (1 nM), HMR-1556-al (100 nM), BaCl_2 -al (10 μM) vagy kombinált BaCl_2 (10 μM) + HMR-1556-al (100 nM) történő perfúziót követően.

Az I_{Ks} funkciójának vizsgálata *in vivo*, WT, LQT2, LQT5 és LQT2-5-ös nyúl modellekben

Konvencionális 12 elvezetéses EKG-t regisztráltunk ketamin/xylazin-nal szedált WT (n=6), LQT5 (n=9), LQT2 (n=8) és LQT2-5 (n=8) állatokon. A szívfrekvencia 20-30%-os emelése céljából 6-12 $\mu\text{g}/\text{óra}$ sebeséggű isoproterenol-t (Isuprel, 0,2 mg/kg, Hospira Inc., USA) adtunk iv. perfurzorral. Az I_{Ks} *in vivo* funkcióját az I_{Ks} aktivátor iv. isoproterenol majd az azt követően iv. adott I_{Ks} gátló HMR-1556 okozta QTi (%) változások alapján ítéltük meg.

WT, LQT2, LQT5 és LQT2-5 modellek aritmia érzékenységének vizsgálata *ex vivo* izolált szíveken

Ex vivo aritmia protokollunkhoz az Echhart és mti. által leírt módszert használtuk, amelyben bradikardia, alacsony K^+ koncentráció ($[\text{K}^+]_o$) és K^+ -csatorna gátló szer adását kombinálták a repolarizáció nyújtása és az aritmiakészség fokozásának céljából. Kísérleteinkben ritmuszavart Langendorff perfundált AV-ablált (n=7 WT, n=8 LQT5, n=6 LQT2 and n=7 LQT2-5) szíveken – melyek stabil, 60-80 ütés per perces frekvenciájú stabil kamrai pótritlussal működtek – a következő oldatok perfúziójával váltottunk ki: 5,4 mM $[\text{K}^+]_o$ Krebs-Henseleit (KH) (kontroll I., 10 perc), 2,0 mM $[\text{K}^+]_o$ KH (5 perc), 5,4 mM $[\text{K}^+]_o$ KH (kontroll II., 10 perc), 5,4 mM $[\text{K}^+]_o$ KH +10 μM BaCl_2 (10 perc) and 2,0 mM $[\text{K}^+]_o$ KH +10 μM BaCl_2 (5 perc). Folyamatos EKG monitorozás mellett az aritmiák (AR) időtartamát (a perfúziós idő %-

ában) számát (AR-k számának átlaga) és előfordulási gyakoriságát (az összes kísérlet %-ában) vizsgáltuk. Az aritmiákat a Lambeth irányelvek szerint kategorizáltuk.

EREDMÉNYEK

1. Cél: Egy új antiaritmiás gyógyszerjelölt vegyület, az SZV-270 proaritmiás potenciáljának vizsgálata

Egy új, kevert III-as (I_{Kr} gátló) és I-es (I_{Na} gátló) osztályú antiaritmiás gyógyszerjelölt, az SZV-270 proaritmiás készségének vizsgálatához első lépésben I_{Ks} gátló HMR-1556 adásával csökkentettük a WT nyulak repolarizációs rezervkapacitását. Ezt követően az SZV-270 adásának proaritmiás hatásait - proaritmia markerek (QT_c és STV_{QT}) változásai és TdP előfordulás – hasonlítottuk össze egy ismert torsadogén szernek, a dofetilidnek a hatásaival. A dofetilid hatását normál, HMR-1556 kezelés nélküli WT nyulakon is vizsgáltuk. A HMR-1556, dofetilid, vagy a HMR-1556 + dofetilid ill. HMR-1556 + SZV-270 kombináció nem változtatta meg a vérnyomást vagy a PQ időt. A szívfrekvenciát a HMR-1556 nem, míg a dofetilid vagy a HMR-1556 + dofetilid ill. HMR-1556 + SZV-270 kombinációk enyhén csökkentették.

A HMR-1556-al kezelt nyulakon az SZV-270 - a többi szerrel ellentétben – szignifikáns módon kiszélesítette a QRS intervallumot. A szívfrekvencia korrigált QT időt (QT_c) a HMR-1556 nem befolyásolta, míg a dofetilid vagy HMR-1556 + dofetilid ill. HMR-1556 + SZV-270 szignifikáns módon és hasonló mértékben nyújtották (QT_c változás, $ms \pm SEM$; dofetilid $12,4 \pm 4,2$ HMR + dofetilid $21,3 \pm 2,6$ HMR + SZV-270 $18,1 \pm 4,7$; $p < 0,05$). Az STV_{QT} - egy új proaritmia marker, mely a QT_c -nél megbízhatóbban képes a TdP előrejelzésére – csak a dofetilid, vagy (még kifejezettebb mértékben) a kombinált HMR-1556 + dofetilid adására mutatott emelkedést (STV_{QT} változás, $\pm SEM$; Dofetilid $1,1 \pm 0,2$ HMR + dofetilid $5,1 \pm 1,9$; $p < 0,05$), míg SZV-270 hatására nem változott. Az STV_{QT} ezen változásai jól korreláltak a TdP előfordulásával: a dofetilid önmagában való vagy (különösen) HMR-1556-al történt kombinált adása jelentősen növelte a TdP kialakulását (TdP incidencia, %; dofetilid 25 HMR+dofetilid 83,3; $p < 0,05$ vs. 'kontroll' (HMR-1556 önmagában)), míg az SZV-270 (HMR-1556 adás után) egyáltalán nem provokált TdP-t. Ezek alapján fontos kiemelni, hogy a HMR-1556-al csökkentett repolarizációs rezerv mellett adott SZV-270 és dofetilid egyaránt hasonló

mértékben nyújtották a QTc-t, de ez a repolarizáció megnyúlás az SZV-270 esetében - a dofetiliddel ellentétben – nem növelte meg a QT idő 'beat-to-beat' variabilitását (STV_{QT} -t) és legfőképpen nem vezetett TdP kialakulásához.

2. Cél: Az új, dupla transzgenikus LQT2-5 ill. WT, LQT2 és LQT5 nyúl modellek nyugalmi elektrofiziológiai jellegzetességeinek vizsgálata

Éber, mozgásukban nem korlátozott illetve altatott nyulak EKG jellegzetességei *in vivo*

A WT és különböző transzgenikus hosszú QT-s nyulak nyugalmi (gyógyszer mentes) elektrofiziológiai tulajdonságainak összehasonlítása céljából 24 órás telemetriás EKG felvételt készítettünk éber, mozgásukban nem korlátozott nyulakról. Az RR, PR és QRS értékei minden genotípusban hasonlóak voltak, a repolarizáció tekintetében azonban jelentős genotípus-specifikus eltéréseket mértünk: az LQT2 és LQT2-5-ös modellek szívfrekvencia korrigált QT idejei (QTc) kifejezetten hosszabbnak mutatkoztak, mint WT vagy LQT5-ben (QTc, $ms \pm SEM$; LQT2 $165,4 \pm 2,9$ és LQT2-5 $165,7 \pm 4,2$ vs. WT $136,8 \pm 1,6$ vagy LQT5 $131,6 \pm 1,7$; $p < 0,05$). Kiemelendő, hogy a QT/RR hányados emelkedettebb volt LQT2 és LQT2-5-ben mint WT vagy LQT5-ben (QT/RR hányados, $\pm SEM$; LQT2 $0,65 \pm 0,01$ és LQT2-5 $0,48 \pm 0,02$ vs. WT $0,23 \pm 0,01$ és LQT5 $0,2 \pm 0,01$; $p < 0,05$), mely jelentősen nagy mértékű QT nyúlásra utal LQT2 és LQT2-5-ben alacsony szívfrekvencia esetén.

Az éber állatokhoz hasonlóan az altatott nyulakon mért RR, PQ vagy QRS-ben sem volt genotípusfüggő eltérés. A QTc és egyéb proaritmia markerek (STV_{QT} és ' $T_{peak}-T_{end}$ ' (T_{p-e})) azonban szignifikáns emelkedést mutattak LQT2 és LQT2-5-ben a WT ill. LQT5-höz képest (STV_{QT} és T_{p-e} (ms) $\pm SEM$; LQT2 $2,8 \pm 0,1$ és $40,9 \pm 1,4$; LQT2-5 $2,5 \pm 0,1$ és $39,2 \pm 1,2$ vs. WT $1,9 \pm 0,1$ és $29,8 \pm 0,8$ vagy LQT5 $1,9 \pm 0,1$ és $30,6 \pm 0,6$; $p < 0,05$).

A monofázisos akciós potenciálok (MAP) globális és regionális jellegzetességei (*ex vivo*)

A QTc-hez hasonlóan az *ex vivo* Langendorff perfundált szíveken mért MAP-ok időtartamai (APD_{75}) szintén szignifikánsan hosszabbak voltak LQT2 és LQT2-5-ös nyulakban mint WT vagy LQT5-ben (APD_{75} 500ms-os ciklushosszú ingerléskor, $ms \pm SEM$; LQT2 $152,6 \pm 6,3$ és LQT2-5 $152,5 \pm 5,2$ vs. WT $121,2 \pm 3,7$ vagy LQT5 $112,5 \pm 3,7$; $p < 0,05$). Az APD_{75} -nek ez a genotípusfüggő különbsége hosszabb ciklushosszú ('CL') ingerléskor jelentősen nagyobb mértékű volt, ami az APD / CL hányados kifejezettebb emelkedésében is megmutatkozott

LQT2 és LQT2-5-ben a WT vagy LQT5-höz képest (APD/CL hányados, \pm SEM; LQT2 $0,2\pm 0,03$ és LQT2-5 $0,22\pm 0,03$ vs. WT $0,14\pm 0,02$ vagy LQT5 $0,13\pm 0,02$; $p<0,05$). Az akciós potenciál formájának háromszögessége ('triangulációja', APD_{90-30}) - egy fontos, a repolarizáció 3. fázisát jellemző proaritmiás paraméter – nagyobb mértékű volt LQT2-ben mint WT vagy LQT5-ben (APD_{90-30} 500ms CL ingerléskor, $ms\pm SEM$; LQT2 $94,9\pm 4,1$ vs. WT $78,4\pm 2,7$ vagy LQT5 $73,0\pm 2,0$; $p<0,05$). A repolarizáció genotípusfüggő, globális (átlagolt APD és APD_{90-30}) különbségein túl azok regionális heterogenitásában is megfigyeltünk eltéréseket az egyes csoportok között: a WT-vel ellentétben szignifikáns 'apikobazális' APD heterogenitás (a bázishoz (MAP3/4) képest rövidebb csúcsi ('apikális', MAP1) APD_{75}) volt megfigyelhető valamennyi transzgenikus állatban. A kamra apikális részében az AP-triangulációja (APD_{90-30}) továbbá csak az LQT5 és LQT2-5-ben volt kifejezett a bázishoz képest.

3. Cél: K^+ -csatorna gátlók provokálta genotípusfüggő különbségek vizsgálata proaritmia markerek és *ex vivo* aritmia gyakoriság monitorozásával

A különböző LQTS modellek repolarizációt nyújtó gyógyszerek iránti érzékenységének vizsgálatához többféle „szelektív” K^+ -csatorna gátló szert adtunk *in vivo* és *ex vivo*.

K^+ -csatorna gátló szerek hatása *in vivo* proaritmia markerekre

Éber nyulaknak adott alacsony dózisú im. dofetilid (enyhe I_{Kr} gátlás) csak az LQT5-ben nyújtotta meg a QTc-t (QTc változás, $ms\pm SEM$; $+7,7\pm 1,9$; $p<0,05$), míg az egészséges WT vagy az I_{Kr} hiányos LQT2 és LQT2-5-ben nem. Az I_{K1} gátló $BaCl_2$ minden csoportban nyújtotta a QTc-t, legkifejezettebben az LQT2-ben (QTc változás, $ms\pm SEM$; LQT2 $+15,4\pm 2,0$ vs. WT $+7,5\pm 1,2$ LQT5 $+9,6\pm 1,7$ és LQT2-5 $+9,6\pm 2,2$; $p<0,05$). Az I_{Ks} -gátlása önmagában (HMR-1556) egyik genotípusban sem okozott QTc változást. Az I_{K1} ($BaCl_2$) és I_{Ks} (HMR-1556) együttes gátlása minden csoportban nyújtotta a QTc-t.

Altatott állatokban az előbbiekhöz hasonló QTc változásokat figyeltük meg. Az I_{K1} gátló $BaCl_2$ minden genotípusban szignifikánsan nyújtotta a QTc-t, de ez a hatás LQT2 és LQT2-5-ben a WT és LQT5-höz képest kifejezettebb volt. A HMR-1556 és HMR-1556 + $BaCl_2$ hatásai az éber állatokéhoz volt hasonló. A dofetilid meglepő módon nem csak az LQT5-ben, hanem az LQT2-5-ben is nyújtotta a QTc-t (QTc változás, $ms\pm SEM$; LQT5 $+4,3\pm 0,8$ ill. LQT2-5 $+10,9\pm 2,0$; $p<0,05$). A K^+ -csatorna gátlók hatása a proaritmiát jelző paraméterekre (STV_{QT} és

$T_{peak}-T_{end}$) kifejezettebb volt a csökkent repolarizációs rezervú LQTS állatokban: a dofetilid és HMR-1556 csak az LQT5 és LQT2-5-ös nyulakban emelte az STV_{QT} és $T_{peak}-T_{end}$ értékeit (Dofetilid okozta STV_{QT} változás, $\pm SEM$; LQT5 $+0,6\pm 0,1$ LQT2-5 $+1,3\pm 0,3$; $p < 0,05$). Az STV_{QT} és $T_{peak}-T_{end}$ emelkedése $BaCl_2$ ill. HMR + $BaCl_2$ hatására minden LQTS állatban nagyobb mértékű volt, a WT-hez képest ($BaCl_2$ okozta STV_{QT} változás, $ms\pm SEM$; LQT5 $+0,7\pm 0,1$ LQT2 $+1,0\pm 0,2$ LQT2-5 $+1,1\pm 0,2$ vs. WT $+0,3\pm 0,1$; $p < 0,05$). Fontos megjegyezni, hogy egy-egy LQT2 ill. LQT2-5-ös állatban VEB és 'non-sustained' VT epizódok alakultak ki iv. adott $BaCl_2$ hatására, igazolva ezáltal a K^+ -csatorna gátló szerekkel szembeni fokozott aritmiakésztséget ezen genotípusokban *in vivo* körülmények között is.

Az I_{Ks} funkciójának *in vivo* vizsgálata különböző hosszú QT szindrómás modellben

Az I_{Ks} aktiválása céljából a szimpatomimetikus hatású isoproterenolt alkalmaztuk, hogy a szimpatikus aktivitás szívizom repolarizációra gyakorolt esetleges különbségeit vizsgáljuk az egyes LQTS típusokban. Normál esetben – a fiziológias adaptáció következtében – QT rövidülés észlelhető, mely folyamat a repolarizáló (QT rövidülést eredményező) I_{Ks} és a depolarizáló (QT nyújtó) I_{Ca} együttes aktiválódásának egyensúlyán alapul. LQT5 és LQT2-5-ben a mutáns KCNE1 (KCNE1-G52R) által kódolt I_{Ks} -t kialakító csatornafehérje béta-alegységének abnormalitása miatt csökkent az I_{Ks} funkciója, így az nem volt képes az aktiválódó $I_{Ca,L}$ repolarizáció nyújtó hatását ellensúlyozni, ami szignifikánsan nagyobb mértékű QT megnyúláshoz vezetett LQT5 és LQT2-5-ben mint WT vagy LQT2-ben ahol az I_{Ks} normálisan funkcionált (QTi változás, $\%\pm SEM$; LQT5 $+16,5\pm 1,2$ LQT2-5 $+13,4\pm 2,4$ vs. WT $+8,0\pm 1,4$ vagy LQT2 $+5,1\pm 2,0$; $p < 0,05$). Másrésztől, az I_{Ks} gátló HMR-1556 okozta QT nyúlás nagyobb mértékű volt WT és LQT2-ben mint LQT5 és LQT2-5-ben, mivel előbbieken esetén az isoproterenol a jól funkcionáló I_{Ks} -t normál mértékben tudta aktiválni, míg LQT5 és LQT2-5 esetében nem. A fenti eredmények az I_{Ks} funkciójának károsodására utalnak az LQT5 és LQT2-5-ös modellekben.

K^+ -csatorna gátlók hatása a monofázisos akciós potenciálra (MAP) *ex vivo*

Az I_{Kr} gátló dofetilid nagyon alacsony koncentrációjának (1nM) adása az APD_{75} csekély, a klinikai relevanciát jelentő 10ms-os határt meg nem haladó megnyúlását okozta minden csoportban. Az I_{Ks} gátló HMR-1556 (100nM) APD_{75} -öt nyújtó hatása LQT2 és LQT2-5-ben sokkal kifejezettebb volt, mint WT vagy LQT5-ös szíveken (APD_{75} változása, $ms\pm SEM$; LQT2

+13,2±2,2 LQT2-5 +13,0±2,8 vs. WT +7,0±1,1 vagy LQT5 +6,2±1,2; $p < 0,05$). Hasonlóképpen, az I_{K1} -gátló $BaCl_2$ (10 μM) vagy a kombinált I_{K1}/I_{Ks} -gátlás ($BaCl_2$ (10 μM) + HMR-1556 (100 nM)) az LQT2 és LQT2-5-ben szignifikánsan jobban nyújtotta az APD_{75} -öt mint WT vagy LQT5-ben ($BaCl_2$ okozta APD_{75} nyúlás, $ms \pm SEM$; LQT2 +29,4±2,9 LQT2-5 +32,3±4,2 vs. WT +16,1±2,3 vagy LQT5 +18,1±1,8; $p < 0,05$). Az APD megnyúlás kifejezettebb mértéke alacsony szívfrekvencia esetén az APD/CL meredekségének emelkedését eredményezte I_{K1} , I_{Ks} vagy kombinált I_{K1}/I_{Ks} gátlás esetén LQT2 és LQT2-5-ben. Kiemelendő, hogy az AP triangularizációja (APD_{90-30}) kifejezettebb mértékű volt LQT2 és LQT2-5 esetén a WT-hez képest I_{K1} vagy I_{K1}/I_{Ks} -gátlást követően (APD_{75} változás I_{K1} -gátlást követően, $ms \pm SEM$; LQT2 +25,8±3,9 ill. LQT2-5 +23,8±3,7 vs. WT +14,6±2,3; $p < 0,05$).

Ex vivo aritmia gyakoriság genotípus függő különbségei alacsony K^+ -szint és K^+ -csatorna gátló szer hatására

Annak vizsgálatára, hogy az LQTS modellek alkalmasabbak-e gyógyszer-indukálta proaritmiás hatások megbízhatóbb szűrésére mint a WT állatok, AV-ablált szíveket perfundáltunk alacsony $[K^+]_o$ és/vagy I_{K1} gátló $BaCl_2$ -al. Kontroll esetben (5,4 mM $[K^+]_o$) az AV ablált szívek stabil - átlagosan 69,1±3,5 ütés/perc frekvenciájú - kamrai pótritlussal ('VER') működtek. Súlyosabb aritmia nem volt észlelhető. 5 perc 2,0 mM $[K^+]_o$ KH-el történő perfúzió hosszabb bigeminiát és VT-t generált a csökkent repolarizációs rezervű transzgenikus állatokban mint a normál WT-ben (időtartam a perfúziós idő %-ában; bigeminia: LQT2 38,8±11,7 ill. LQT2-5 37,9±7,0 vs. WT 11,1±6,8; VT: LQT2 25,0±11,1 ill. LQT2-5 30,2±10,5 vs. WT 1,7±1,1; $p < 0,05$). A hatás reverzibilis volt, 10 perc normál (5,4 mM $[K^+]_o$) KH-el történő perfúzió hatására visszakaptuk az alap kamrai pótritmust (kontroll II.). Az ezt követő I_{K1} gátló $BaCl_2$ hosszabb időtartamú és magasabb incidenciájú ritmuszavart okozott LQT2 és LQT2-5-ben mint WT-ben. A $BaCl_2$ és 2mM $[K^+]_o$ kombinált perfúziója az előbbieknél is jóval súlyosabb mértékű (hosszabb időtartamú és magasabb incidenciájú) aritmia kialakulását provokálta a transzgenikus állatokban a WT-hez képest (összaritmia időtartama a perfúziós idő %-ában: LQT5 53,7±11,3 LQT2 86,3±5,3 LQT2-5 83,0±5,1 vs. WT 16,2±5,9; az összaritmiák átlagos száma: LQT2 52,0±16,1 ill. LQT2-5 46,9±13,2 vs. WT 3,6±1,6; $p < 0,05$). Összességében, súlyosabb aritmia típusok (VT és VF) alakultak ki LQT2 és LQT2-5-ben mint LQT5 vagy WT-ben (AR előfordulási gyakorisága: $BaCl_2$: LQT2 (VT: 100%) és LQT2-5 (VT: 86%, VF: 57%) vs.

WT (VT: 0%, VF: 0%); BaCl₂ + 2mM [K⁺]_o: LQT2 (VT: 100%, VF: 60%) és LQT2-5 (VT: 83%, VF: 57%) vs. WT (VT: 0%, VF: 0%); p<0,05).

DISZKUSSZIÓ

A gyógyszer okozta proaritmia főleg kardiovaszkuláris és metabolikus betegségek okozta strukturális és/vagy elektrofiziológiai szívizom átépülés miatt csökkent repolarizációs rezervú betegekben fordul elő. Olyan állatmodellek, mint a krónikus volumen túlterhelt AV-ablált ('CAVB') kutya vagy a metoxamin (α 1-adrenoceptor agonista) érzékenyített altatott nyúl modellek, igazolták azon koncepciót, mely szerint (szív)betegség miatt csökkent repolarizációs rezervú állatok kifejezetten érzékenyek HERG/I_{Kr} gátlók okozta TdP kimutatására és így alkalmasak proaritmiás gyógyszerbiztonsági szűrővizsgálatokra. Ezen modelleknek azonban egyikét sem alkalmazzák gyógyszer okozta ritmuszavarok rutinszerű vizsgálatára. Tézismunkámban ezért a gyógyszeresen (gyógyszer okozta LQTS) vagy genetikai módon (transzgenikus LQTS) csökkentett repolarizációs rezervú nyulak alkalmazhatóságát vizsgáltam meg gyógyszer okozta kamrai aritmiák jobb kimutatásában.

Farmakológiailag csökkentett repolarizációs rezervú gyógyszer-indukálta szerzett hosszú QT szindrómás nyúl modell

Az I_{Ks} jelentősége a repolarizációs rezervben ill. kóros működésének szerepe a gyógyszer-indukálta proaritmiák kialakulásában - különösen fokozott szimpatikus tónus esetén – régóta ismert. Az I_{Ks} csökkenését (vagy hiányát) számos humán megbetegedés – úgy mint krónikus szívbetegség és cukorbetegség (vagy LQT1) – kapcsán összefüggésbe hozták ezen betegségek magas proaritmiás kockázatával. Ezen (pato)fiziológiai megfigyelések alaján számos csökkent I_{Ks} funkciójú proaritmia modellt hoztak létre. A 'CAVB' kutya, vagy az I_{Ks}-gátló HMR-1556 indukált altatott (szerzett LQTS) nyúl modellek használatát - azok HERG/I_{Kr} gátló szerek iránti nagyfokú érzékenységük miatt – gyógyszerjelölt vegyületek torsadogén mellékhatásprofiljának kimutatására javasolták. A HMR-1556-indukált szerzett LQTS nyúl modellen az SZV-270 új gyógyszerjelölt vegyület proaritmiás hatásának vizsgálatával kapcsolatos eredményeink megerősítik e korábbi elgondolást: az I_{Kr} gátló dofetilid egészséges (kontroll) állatoknak történő adása csak csekély mértékű TdP-t provokált, míg ugyanezen szer az előzetesen I_{Ks}-gátolt (HMR-1556 kezelt) állatoknak csaknem 90%-ában

váltott ki TdP-t. A kevert I_{Kr} - (III-as osztályú) és I_{Na} gátló (I/B osztályú) SZV-270 ugyanakkor egyáltalán nem provokált TdP-t a HMR-1556 érzékenyített nyulakon. Az SZV-270 ezen előnyös - proaritmia nélküli repolarizáció nyújtó - elektrofiziológiai hatása feltehetően annak I/B osztályú hatásából következik, amely - az $I_{Na,late}$ gátló hatáson keresztül – ellensúlyozni képes az I_{Kr} gátló sajátosság miatt létrejövő repolarizáció túlnyúlást alacsony szívfrekvenciákon.

Genetikailag csökkentett repolarizációs rezervú transzgenikus LQTS nyúl modellek

A transzgenikus LQTS nyúl modellek nyugalmi elektrofiziológiai sajátosságai

Az LQT5 nyulak nyugalmi (globális) repolarizáció (QT intervallum) megnyúlást nem mutattak, azonban az APD és AP-triangularizáció apikobazális megnövekedése a WT-hez képest enyhe fokú regionális repolarizációs zavart jelzett. Ez jó összhangban van a modellnek Major és mtsi. által elsőként leírt jellemzőivel. Ezek alapján az LQT5-ös nyulak az LQTS 'rejtett', nyugalmi körülmények között közel normális fenotípusát mutató formáját modellezik. Ezzel szemben az LQT2 és LQT2-5-ös nyulak a repolarizáció kifejezett, időben és térben (regionálisan) heterogén mértékű megnyúlását mutatták már nyugalmban is: az LQTS begekhez hasonlóan megnyúlt QTc/APD, emelkedett QT/RR meredekség, növekedett időbeli QT variabilitás (STV_{QT}) ill. a repolarizáció és AP-triangularizáció fokozott transzmurális ($T_{peak-end}$) és apikobazális heterogenitása mutatkozott. Ezen modellekben a fentiek mint aritmia 'szubsztrát' a re-enty mechanizmusú proaritmia kialakulását segítették elő különösen bradikardia esetén. Az LQT2 és LQT2-5 fenotípusa nyugalomban érdekes módon nem különbözött. Az I_{Ks} funkciójának kifejezettebb károsodása LQT2-5-ben azonban csökkent QT-rövidülési adaptációs képességben mutatkozott meg magas szívfrekvenciánál.

A transzgenikus LQTS nyúl modellek alkalmazhatósága K^+ -csatorna gátlók proaritmiás hatásának vizsgálatában proaritmiás markerek segítségével

Az LQTS betegekhez hasonlóan, az annak jellemzőit modellező különböző LQTS nyúl modellek is fokozott érzékenységet mutattak a repolarizációt nyújtó (K^+ -csatorna gátló) szerhatásokra. Az I_{Ks} enyhe csökkenését mutató LQT5-ös állatok, - a korábbi eredményeknek megfelelően – érzékenyebbek voltak az I_{Kr} gátló dofetilid adására mint a WT állatok, így kifejezettebb QTc, $T_{peak-end}$ és STV_{QT} emelkedést mutattak. Az I_{Kr} hiányos és károsodott I_{Ks} funkciójú LQT2 és LQT2-5-ös nyulak ellenben az I_{K1} gátló $BaCl_2$ hatására voltak – a korábbi

eredményekkel megegyezően - a WT-nél érzékenyebbek: a midazolam, a jól ismert, I_{K1} gátló hatással is bíró szedatohipnotikum csak az érzékenyebb LQT2 nyulakban nyújtotta meg a QT-t és provokált kamrai extraszisztolákat, míg a WT-ben nem. Ezek alapján az LQT2 és LQT2-5-ös nyulak az I_{K1} gátló (proaritmias) mellékhatásokat megbízhatóbban jelző új állatmodelleknek tekinthetők, melyek lehetővé teszik ennek az ismert, de egyébként nem vizsgált torzadogén (I_{K1} gátló) gyógyszer mellékhatásprofilnak a szűrését.

Kísérleteinkben a szimpatomimetikus (I_{Ks} és $I_{Ca,L}$ aktiváló) hatású isoproterenol adása kisebb mértékű I_{Ks} aktiváció miatt kifejezettebb QT_i nyúlást eredményezett LQT5 és LQT2-5-ben a WT vagy LQT2-höz képest, mely arra enged következtetni, hogy az LQT5 és LQT2-5-ös állatok kifejezetten fogékonyak lehetnek adrenerg hatás okozta repolarizáció túlnyúlásra és aritmia kialakulásra. Az LQT2-5 emellett modellezhet olyan betegségeket, – mint pl. szívelégtelenség vagy cukorbetegség – melyekben a manifesztálódott LQTS mellett az I_{Ks} károsodása is szerepet játszik a kórállapotok fokozott aritmogenitásban, és amely modelben - az LQT1-el ellentétben - az I_{Ks} farmakológiai gátlásának vagy serkentésének pro/antiaritmias hatásai vizsgálhatókká válnak.

Az LQTS nyúl modellek alkalmazhatósága gyógyszer-indukálta aritmiák kimutatásában

A proaritmias markerek változásainak mérése helyett az LQTS modellek gyógyszer-indukálta direkt aritmiát előrejelző képességének vizsgálatához az I_{K1} gátló $BaCl_2$ -ot használtuk *ex vivo* kísérleteinkben, mivel: (i) az I_{K1} -nek fontos szerepe van a repolarizációs rezervkapacitásban, és (ii) egyedül ez a szer nyújtotta meg valamennyi genotípusban a repolarizáció hosszát. A $BaCl_2$ növelte a komplex kamrai pótütések és a súlyosabb formájú aritmiák, mint a VT és a VF gyakoriságát és időtartamát az LQT2 és LQT2-5-ben, míg az LQT5-ben csupán bigeminiát provokált, ill WT-ben semmilyen súlyosabb ritmuszavar nem volt észlelhető. Az LQTS szívekben, a nyugalomban is megnyúlt repolarizáció idő- és térbeli (regionális) heterogenitása a provokáló tényezők hatására fokozódott, mely tovább növelte a modellek re-entry-re való fogénységát. Ez összhangban áll azon korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint az AV-ablált Langendorff perfundált WT szívekben aritmia sem nyugalomban sem hipokalémia alatt nem mutatkozott, és súlyosabb VT csak a repolarizációt nyújtó szer további hatására alakult ki. Hasonlóképpen, fokozott aritmia készség volt észlelhető a különböző LQTS modellekben *in vivo* is: spontán VT és SCD LQT2-ben és dofetilid provokálta

TdP a gyógyszer (HMR-1556) indukálta szerzett LQTS nyúl vagy kutya modellekben és az LQT5-ös nyúlban.

KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ EREDMÉNYEK

1. A farmakológiailag (I_{Ks} gátló HMR-1556) csökkentett repolarizációs rezervú szerzett LQTS nyúl proaritmia modell alkalmas I_{Kr} gátló sajátosságú gyógyszerjelölt vegyületek torzadogén hatásának előrejelzésére. Jelen munkánkban ez a modell nem mutatott ki proaritmiás hatást a vizsgált gyógyszerjelölt vegyület, az SZV-270 kapcsán.
2. A transzgenikus LQTS nyulak a humán LQTS klinikailag 'rejtett' - normál QT idő (LQT5) - vagy manifeszt - megnyúlt QT idő (LQT2 és LQT2-5) – formáját modellezik a szív repolarizációs rezervkapacitásának különböző patomechanizmusú károsodásai miatt (csökkent I_{Ks} LQT5 és LQT2-5-ben illetve az I_{Kr} kiesése LQT2 és LQT2-5-ben).
3. Az új LQT2-5 modell fenotípusa az LQT2-höz áll közel, azonban az I_{Ks} csökkent funkciója miatt attól eltérő sajátosságokat is mutat (csökkent QT-rövidülési készség gyors szívfrekvencián). Az I_{Kr} kiesése és az I_{Ks} csökkenése miatt az új LQT2-5-ös modell pontosabb betekintést nyújthat a csökkent repolarizációs rezerv talaján fokozott szimpatikus aktivitás okozta ritmuszavarok kialakulásába. Ebből a szempontból az LQT2-5 fontos modellje lehet i) olyan betegségeknek – mint pl. szívelégtelenség vagy cukorbetegség - melyekben a fokozott aritmia készség a szívizomátépülés miatt károsodott I_{Ks} -nek tulajdonítható és ii) olyan vizsgálatoknak, melyek az I_{Ks} farmakológiai csökkentésének vagy fokozásának hatásait kívánják feltárni klinikailag manifeszt LQTS-ben.
4. Az LQTS nyulak a WT-hez képest jóval érzékenyebben képesek kimutatni I_{Kr} - (LQT5) vagy I_{K1}/I_{Ks} - (LQT2 és LQT2-5) gátló szerhatásokat: a proaritmia markerek emelkedése illetve az *ex vivo* aritmiák előfordulási gyakoriságának és időtartamának növekedése és súlyossága kifejezettebb volt LQTS-ben. Ezek alapján az LQTS modellek alkalmasak lehetnek az új gyógyszerjelölt vegyületek 'multi-channel'-mechanizmusú proaritmiás hatásainak megbízhatóbb előrejelzésére.
5. Fontos megjegyezni, hogy az LQTS modellek szenzitivitásának és specificitásának részletes vizsgálatára mindenképpen szükség van azok proaritmia szűrésben való rutin felhasználása előtt.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni **Professzor Dr. Varró Andrásnak**, az SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet előző vezetőjének és **Professzor Dr. Peter Kohlnak**, a freiburgi 'Institute for Experimental Cardiovascular Medicine' vezetőjének, hogy lehetővé tették számomra az intézetükben végzett kutatómunkát, valamint köszönöm a felmerülő kérdéseket megválaszoló világos tanácsaikat.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Baczkó Istvánnak** az éveken át tartó kiváló szakmai irányítását, a tudományterület alapjainak és új információinak rendszerező és naprakész átadását és azt, hogy lehetővé tette számomra kutatási eredményeink különböző fontos hazai és nemzetközi konferenciákon történő prezentálását. Külön szeretném köszönetemet kifejezni számára azért a támogatásért, amit PhD tanulmányaim nehezebb időszakában nyújtott számomra. Szeretném hálás köszönetemet kifejezni **Professzor Dr. Katja Odening-nek**, a freiburgi 'Institute for Experimental Cardiovascular Medicine' transzlációs medicina csoport vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra az általa vezetett csoportban való kutatómunkát valamint köszönöm neki az éveken át tartó szakmai vezetését, segítségét.

Köszönöm **Professzor Dr. Papp Gyula** akadémikus úrnak, intézetünk korábbi vezetőjének, a mai napig tartó tudományos és emberi példamutatását.

Köszönöm **Győrfiné Kosztka Máriának** és **Stefanie Perez-Feliz-nek** a kiváló asszisztenciát. Köszönettel tartozom **Dr. Orosz Andreának**, **Dr. Husti Zoltánnak**, **Dr. Juhász Viktornak**, **Dr. Márton Zoltánnak**, **Varga Richárdnak**, **Dr. Bódi Ilonának** és **Dr. Gerlind Franke-nak**, akik nélkül elképzelhetetlenek lettek volna a dolgozós hétköznapok. Köszönöm **Dobai Gábor** és **Motzwickler Róbert** állatgondozóknak a kísérleti állatok gondozásában és kísérletekhez való előkészítésében vállalt professzionális segítségüket.

Fiamnak, Szüleimnek, Húgomnak és Barátaimnak.

Anyagi támogatás: Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munka anyagi forrását az Emberi Erőforrások Minisztériuma (EFOP-3.6.2-16-2017-00006) által Dr. Baczkó Istvánnak, és a 'German Heart Foundation' (F/02/14) által Professzor Dr. Katja Odening-nek ítélt támogatások képezték.