

Gyógyszerhatású vegyületek antiaritmiás és proritmiás hatékonysága

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Muhammad Naveed, *Pharm. D., M.Phil.*



Témavezető:

Prof. Dr. Varró András, MTA doktora

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2023

Az értekezéssel kapcsolatos tudományos dolgozatok

- I. **Tamás Hézső***, **Muhammad Naveed***, Csaba Dienes, Dénes Kiss, János Prorok, Tamás Árpádfy-Lovas, Richárd Varga, Erika Fujii, Tanju Mercan, Leila Topal, Kornél Kistamás, Norbert Szentandrassy, János Almássy, Norbert Jost, János Magyar, Tamás Bányász, István Baczkó, András Varró, Péter P. Nánási, László Virág, Balázs Horváth; *Mexiletine-like cellular electrophysiological effects of GS967 in canine ventricular myocardium*. Scientific Reports; doi: 10.1038/s41598-021-88903-3. Published 5 May 2021. (Impact factor 4.9 (D1))
- II. **Leila Topal***, **Muhammad Naveed***, Péter Orvos, Bence Pásztli, János Prorok, Ákos Bajtel, Tivadar Kiss, Boglárka Csupor-Löfer, Dezső Csupor, István Baczkó, András Varró, László Virág, Norbert Jost; *The electrophysiological effects of cannabidiol on action potentials and transmembrane potassium currents in rabbit and dog cardiac ventricular preparations*. Archives of Toxicology; <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03086-0>. Published 24 May 2021. (Impact factor 6.1 (Q1))
- III. Zsófia Kohajda, László Virág, Tibor Hornyik, Zoltán Husti, Anita Sztojkov-Ivanov, Norbert Nagy, András Horváth, Richárd Varga, János Prorok, Jozefina Szlovák, Noémi Tóth, Péter Gazdag, Leila Topal, **Muhammad Naveed**, Tamás Árpádfy-Lovas, Bence Pásztli, Tibor Magyar, István Koncz, Szilvia Déri, Vivien Demeter-Haludka, Zoltán Aigner, Balázs Ördög, Márta Patfalusi, László Tálósi, László Tiszlavicz, Imre Földesi, Norbert Jost, István Baczkó, András Varró. *In vivo and cellular antiarrhythmic and cardiac electrophysiological effects of desethylamiodarone in dog cardiac preparations*. British Journal of Pharmacology. First published: 01 February 2022. <https://doi.org/10.1111/bph.15812>. (Impact factor 9.4 (D1))

* **megosztott első szerzőség**

További közlemények

Teljes dolgozatok:

- I. A. Polyák, L. Topal, J. Prorok, N. Tóth, Zs. Kohajda, Sz. Déri, V. Demeter-Haludka, P. Hegyi, V. Venglovecz, A. Sarusi, G. Ágoston, Z. Husti, N. Zombori-Tóth, P. Gazdag, J. Szlovák, T. Árpádfy-Lovas, **M. Naveed**, N. Jost, L. Virág, N. Nagy, I. Baczkó, A. S. Farkas, A. Varró. *Cardiac electrophysiological remodeling associated with enhanced arrhythmia susceptibility in a canine model of elite exercise*. eLife. 2023 Feb 23;12:e80710. doi: 10.7554/eLife.80710 (Impact factor 8.7 (D1))
- II. Tamás Árpádfy-Lovas, Aiman Saleh A. Mohammed, **Muhammad Naveed**, István Koncz, Beáta Baláti, Miklós Bitay, Norbert Jost, Norbert Nagy, István Baczkó, László Virág, and András Varró. *Species-dependent differences in the inhibition of various potassium currents and in their effects on repolarization in cardiac ventricular muscle*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. Published 20 April 2022. DOI: 10.1139/cjpp-2022-0028. (Impact factor 2.2 (Q2))
- III. Bence József Pásztli, Janos Prorok, Tibor Magyar, Tamás Árpádfy-Lovas, Balázs Györe, Leila Topal, Péter Gazdag, Jozefina Szlovák, **Muhammad Naveed**, Norbert Jost, Norbert Nagy, András Varró, László Virág, Istvan Koncz. *Cardiac electrophysiological effects of ibuprofen in dog and rabbit ventricular preparations: Possible implication to enhanced proarrhythmic risk*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 16 September 2020. Doi.org/10.1139/cjpp-2020-0386. (Published). (Impact factor 2.2 (Q2))
- IV. Aiman Saleh A. Mohammed, **Muhammad Naveed**, Norbert Jost. *Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities)*. Journal of Polymers and the Environment; <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02052-2>. Published 27 January 2021. (Impact factor 4.7 (Q1))

- V. Gábor Katona, Fakhara Sabir, Bence Sipos, **Muhammad Naveed**, Zsuzsanna Schelz, István Zupkó, Ildikó Csóka. *Development of Lomustine and n-Propyl Gallate Co-Encapsulated Liposomes for Targeting Glioblastoma Multiforme via Intranasal Administration*. Published: 12 March 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030631>. (*Impact factor 6.5 (Q1)*).

PhD értekezéshez kapcsolódó dolgozatok kumulatív impakt faktora: 20.4

Az összes publikáció kumulatív impakt faktora: 44.7

Idézhető absztraktok

- I. Muhammad Naveed**, Leila Topal, Janos Prorok, Bence Paszti, Dezso Csupor, Istvan Baczko, Laszlo Virag, Norbert Jost, Andras Varro. *Assessment of proarrhythmogenic risk for cannabidiol using dog and rabbit cardiac preparations: the electrophysiological effects on action potential and transmembrane potassium currents*. Cardiovascular Research, Volume 118, Issue Supplement_1, June 2022, cvac066.021, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac066.021>. (*Published Conference Abstract*)
- II. Muhammad Naveed**, Leila Topal, Janos Prorok, Bence Paszti, Dezso Csupor, Istvan Baczko, Laszlo Virag, Norbert Jost, Andras Varro. *The electrophysiological effects on action potential, hERG, and transmembrane ionic currents using dog and rabbit cardiac preparation*. Gordon Research Conference on Cardiac Arrhythmia Mechanisms 26/02/2023-03/03/2023 at Grand Galvez in Galveston, Texas, USA.
- III. Muhammad Naveed**, Leila Topal, Janos Prorok, Bence Paszti, Dezso Csupor, Istvan Baczko, Laszlo Virag, Norbert Jost, Andras Varro. *Assessment of proarrhythmogenic risk for cannabidiol using dog and rabbit cardiac preparations: the electrophysiological effects on action potential and transmembrane potassium currents*. 46th EWGCCE Meeting Saturday, 04 June 15:25 - Monday, 06 June 2022 13:30 CEST (3 Days), Toledo – Spain.
- IV. Muhammad Naveed**, Leila Topal, Janos Prorok, Bence Paszti, Dezso Csupor, Istvan Baczko, Laszlo Virag, Norbert Jost, Andras Varro. *The Electrophysiological Effects of Cannabidiol on Action Potential and Transmembrane Potassium Currents in Dog and Rabbit Cardiac Preparations*. 14th Conference of New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 25-27 MAY, 2022. Bratislava, Slovak Republic.
- V. Muhammad Naveed**, Leila Topal, János Prorok, Bence Pászti, Dezső Csupor, István Baczkó, László Virág, Norbert Jost, András Varró. *The Electrophysiological Effects of Cannabidiol on Action Potential and Transmembrane Potassium Currents in Dog and Rabbit Cardiac Preparations*. 7th MEETING OF THE EUROPEAN SECTION AND 8th MEETING OF THE NORTH AMERICAN SECTION OF THE INTERNATIONAL ACADEMY OF CARDIOVASCULAR SCIENCES (IACS) Banja Luka, Bosnia, 20-23 September 2021.
- VI. Muhammad Naveed**, Leila Topal, János Prorok, Bence Pászti, Dezső Csupor, Istvan Baczko, László Virág, Norbert Jost, András Varró. *A cannabidiol elektrofiziológiai hatásainak feltérképezése kutya és nyúl akciós potenciálok és transzmembrán ionáramok vizsgálatával*. Conference: A Magyar Kardiológusok Társaságának tudományos folyóirata. October 2021. DOI: 10.13140/RG.2.2.19113.52329. Balatonfüred, Hungary.

1. BEVEZETÉS

A szív a az emberi test egyik létfontosságú szerve, amely mechanikus pumpaként működik, hogy eljuttassa a vért más szervekhez. Az akciós potenciál (bioelektromos jel) által generált szívösszehúzódnások a szív kulcsfontosságú funkciói, és a gerjesztés-összehúzódnás kapcsolódási folyamaton keresztül jönnek létre. Az akciós potenciál (AP) az impulzusvezetésnek nevezett aktív elektrofiziológiai folyamat révén a szinuszcsomó sejtjeiből indul ki, majd továbbterjed az egész szívbe, és az extra- és intracelluláris terek közötti elektromos potenciálkülönbségeként rögzíthető. A szív AP-ja egy elektromos jel, amely meghatározza a szívverés gyakoriságát és ritmusát, szabályozza a szív összehúzódnását, és továbbítja a szív választ a belső és külső körülmények változásaira. Az elektromos impulzus a sinoatriális csomóban (SAN) keletkezik, és az internodalisan keresztül az atrioventrikuláris (AV) csomóba (AVN) jut, ahol késik. Ezután az impulzus a kamrai sövény tetején elhelyezkedő közös kötegen (vagy His-kötegen) és a kamrai sövény mindkét oldalán elhelyezkedő jobb és bal köteg ágon keresztül továbbítódik a Purkinje-rostok hálózatába, amely a kamrai szívizom összehúzódnását idézi elő.

A kamrai repolarizációt a befelé és kifelé irányuló transzmembrán ionáramok finom egyensúlya szabályozza, beleértve az I_{Na} , I_{Ca} , I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} és I_{K1} áramokat. Szokásos körülmények között egyfajta kifelé irányuló K^+ -áram csillapítása vagy gátlása nem idézhet elő jelentős és potenciálisan káros APD-megnyúlást, mivel más K^+ -áramok megfelelő repolarizációs kapacitást biztosítanak, ami „repolarizációs tartaléknak” tekinthető. Azonban olyan körülmények között, amikor egy vagy több típusú K^+ csatorna denzitása csökken, öröklődés vagy más tényező következtében, más K^+ csatornák további gyengülése az APD megnyúlásának váratlan növekedését okozhatja, ami proaritmiás reakciókhoz vezethet.

Az AP keletkezésének zavarai, a repolarizációs rendellenességek és/vagy az impulzusvezetés károsodása a szívritmus szabályszerűségének változását, úgynevezett aritmiát okozhat. Általánosságban elmondható, hogy az aritmia a szívverés bármely szabálytalanságára vonatkozik, vagy kóros szívverésre, vagy mindkettőre. A szívritmuszavar lényegében az elektromos zavarok számos típusát egyesíti, a klinikailag ártalmatlan egyszeri extrasystolés ütésektől a káros, életveszélyes tachyarrhythmiáig, mint például a *Torsades de Pointes* (TdP) és a kamrafibrilláció (VF). A tachyaritmia mechanizmusa jellemzően a provokáló trigger dinamikus kölcsönhatásától, a sérülékeny szöveti szubsztráttól és a moduláló tényezőktől, például az autonóm egyensúlytól, a plazma elektrolitoktól és a farmakológiai kezelésektől függ, amelyek mindkettőre hatással vannak. A szívritmuszavarok nagy száma a fokozott proaritmiás szubsztrátnak köszönhető, amely triggerrel kombinálva van. A re-entry az aritmia gyakori mechanizmusa, és nem tesz szükségessé abnormális sejtelektrofiziológiát. A re-entry az elektromos impulzusok keringése egy zárt pályán (egy visszatérő áramkörön) belül, amely lehetővé teszi, hogy az impulzus állandóan stimulálódjon a keletkezés helyén. Ez a fajta abnormális gerjesztés számos feltételtől függ: a vezetőpályán

belüli egyirányú blokk meglététől, a kritikus időzítéstől és a normál szövet effektív refrakter periódusának (ERP) hosszától.

Az antiaritmiás szerek olyan gyógyszerek, amelyeket a rendellenesen gyors ritmusok (tachycardiák), például AF, kamrai tachycardia (VT) és supraventricularis tachycardia leküzdésére használnak. Az antiaritmiás szerek szűk terápiás indexe azonban klinikailag kihívást jelent. Az aritmiák mechanizmusának jobb megértése csak egy előzetes lépés a megfelelő szer kiválasztásában. A klinikai tényezők, a proaritmiás kockázatok és a mellékhatás-profilok jelentőségteljesebbek, mint a sejtes hatásmechanizmusok a gyógyszer kiválasztásában és monitorozásában. A proaritmia fogalma nem újkeletű, és úgy írható le, mint egy tartós aritmia eszkalációja vagy egy új aritmia progressziója, amelyet egy antiaritmiás gyógyszert eredményez. Nemcsak a betegségek, a remodeling, a szérum elektrolit-zavarok és a genetikai rendellenességek járulhatnak hozzá az aritmogenezishez, hanem a gyógyszerek is, azaz proaritmiás hatást fejthetnek ki. A gyógyszer által kiváltott aritmia vagy túlzott vezetési lassuláshoz köthető (például Ia és/vagy Ic osztályú Na^+ -csatornagátlókkal), vagy a kamrai APD jelentős megnyúlásához (például III. osztályú szerek esetén), vagy mindkettőhöz. Számos gyógyszer gátolja a I_{Na} -t és az impulzusvezetést, beleértve az I. osztályú antiaritmiás szereket, mint a kinidin, flekainid stb. Ezek a gyógyszerek, függetlenül attól, hogy szívritmuszavarok kezelésére használják őket, szintén kamrai tachyarrhythmiát válthatnak ki, nyilvánvalóan azért, hogy a károsodott szövetek területeit egyirányú területekké alakítják impulzusvezetési blokk (a re-entry aritmiák egyik előfeltétele, azaz az aritmogenezis szubsztrátjának fejlesztése). A másik proaritmiás gyógyszerhatás a kamrai repolarizáció megnyúlása. Ez a proaritmiás mechanizmus kifejlesztheti mind az aritmiás triggeret (az EAD-k kiváltásával), mind a szubsztrátot (a repolarizáció diszperziójának fokozásával). Számos gyógyszernek van ilyen hatása, köztük a III-as osztályú antiaritmiás szereknek, mint például a szotalol. Számos gyógyszerről ismert, hogy gátolja az I_{Kr} vagy a hERG áramot; ezért a szívbiztonság szempontjából alapvető fontosságú, hogy a gyógyszerfejlesztés során vizsgáljuk a gyógyszerjelöltek hERG áramblokkoló tulajdonságait. Hangsúlyozni kell, hogy számos gyógyszer okozhat repolarizációs rendellenességgel összefüggő aritmiát, anélkül, hogy nyilvánvaló repolarizációs megnyúlás lenne, de a repolarizációs tartalék gyengítésével. Ezért a gyógyszer más, I_{Ks} , I_{K1} és I_{to} elnevezésű repolarizáló áramokra gyakorolt hatásait is figyelembe kell venni, hogy az új vegyületek kifejlesztése során kiküszöböljük a lehetséges proaritmiás mellékhatásokat.

A gyógyszer-okozta aritmia problémája jelentős ismertségre tett szert a két mérföldkőnek számító nagyszabású klinikai vizsgálat, a CAST és a SWORD jelentései után. Általánosságban kijelenthető, hogy ezek a vizsgálatok azt állapították meg, hogy az aritmia kezelésére szolgáló empirikus stratégia valószínűleg irracionális, mivel az egyik aritmiás mechanizmust kiküszöbölő potenciális ágens ugyanakkor súlyosbíthat más mechanizmusokat is. Például a flekainid csökkentheti az aritmiát azért, hogy csökkenti a méhen kívüli aktivitást, azonban a vezetés lassítása révén elősegíti az aritmiát. A szotalol, bár antiaritmiás hatást fejt ki az elhúzó refraktaritás miatt, elősegítheti az aritmogén EAD-ok képződését. Ezen túlmenően bőséges bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy

számos nem szív- és érrendszeri gyógyszer, mint például a kannabisz, a kannabinoidok, a makrolid antibiotikumok, az antihisztaminok, a gyomor-bélrendszerre vagy a központi idegrendszerre ható gyógyszerek mellékhatásként aritmiát okozhatnak, bár ritkábban.

A vizsgálat céljai

A jelen tanulmány célja egyes farmakológiai szerek antiaritmiás és proaritmiás hatásának vizsgálata volt. Ezért a jelen tanulmányban bizonyos gyógyszereket vizsgáltunk, amelyek befolyásolják a szív elektrofiziológiáját, mint például: i) A GS967 mexiletin-szerű celluláris elektrofiziológiai hatásai; ii) a dezetil-amiodaron sejtszintű antiaritmiás és kardiális elektrofiziológiai hatásai; iii) valamint a kannabidiol, a kinidin és a flekainid elektrofiziológiai hatásai.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérletekhez mindkét nemhez tartozó, 10-15 kg súlyú, 13-27 hónapos felnőtt Beagle kutyát használtunk (Ásotthalom, Magyarország), kísérleti célra tenyésztő (engedélyszám: XXXV/2018) állattenyésztőtől szereztük be. Az Útmutató a laboratóriumi állatok gondozásához és használatához (USA NIH 85-23. sz., felülvizsgált 1996) és az Európai Parlament 2010/63/EU irányelvének megfelelően. A Szegedi Tudományegyetem (Engedélyszámok: I-74-15-2017 és I-74-24-2017) és a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Hatóság Állategészségügyi és Élelmiszer-ellenőrzési Főosztálya (engedélyszámok XIII3330 /2017 és XIII/3331/2017) jegyzőkönyveket jóváhagyta.

AP-k rögzítése többsejtű készítményekből (konvencionális mikroelektród technika)

Az AP méréseket a jobb kamrai izomzatban és a Purkinje-rostban rögzítettük kutya és/vagy nyúl szívéből izolált többsejtű preparátumokból konvencionális mikroelektród technika alkalmazásával, amint azt korábban részletesen tárgyaltuk. A nyugalmi potenciált (RP), az akciós potenciál amplitúdóját (APA), a maximális felfutási sebességet (V_{max}) és a repolarizáció 90%-ánál mért akciós potenciál időtartamát (APD₉₀) határoztuk meg a gyógyszer alkalmazása előtt és után szívpreparátumban. A ciklushossz (CL) függőség és offset vagy onset kinetika vizsgálatára a következő típusú stimulációkat alkalmaztuk a kísérletsorozatban: stimuláció 1000 ms állandó CL-vel; stimuláció különböző, 300 és 5000 ms közötti állandó CL értékekkel. Az 1000 ms-os CL-nél történő kiegyensúlyozást követően a CL-t egymást követően 300 és 5000 ms között változtattuk. Minden egyes CL-nél a 20. AP-t rögzítettük, majd a CL-t megváltoztattuk. Ilyen körülmények között kvázi steady-state állapot azonnal elérhető. A depolarizáció maximális sebességének/maximális felfutási sebességének (V_{+max}) restitúciós kinetikáját tekintjük az eltolási időállandó mutatójának. A V_{+max} restitúciós kinetikájának és az APD₉₀ restitúciós kinetikájának (APD₉₀ restitúció) meghatározásához a preparátumokat 20 alapingerből álló sorozat (S1) segítségével ingereltük, 1000 ms-os BCL-vel. Minden 20. alap S1 ütés után extra akciós potenciált (S2) váltottunk ki egyetlen tesztimpulzusok (S2) használatával egy 1000 ms-os BCL-en hajtott preparátumban. Az S1-S2 csatolási intervallum a refrakter időszak végétől fokozatosan növekedett. Ily módon minden 20. alap AP-t egyetlen extra AP követett, amely fokozatosan növekvő diasztolés intervallumokkal (DI) fordult elő. A DI az ingerléssorozat utolsó alap ütemének APD₉₀-tól az extra AP felfelé futásáig eltelt idő volt. A restitúciós görbéket úgy hoztuk létre, hogy minden extra AP V_{+max} és APD₉₀ értékét a megfelelő DI függvényében ábrázoltuk, és az adatokat egyetlen exponenciális függvényhez illesztettük. A V_{+max} -on a gyógyszerhatás onset kinetikáját úgy határoztuk meg, hogy a készítményt 400 ms-os BCL-sorozatban 1 perces ingerlésmentes periódust követően stimuláltuk, és az első 40 AP-t rögzítettük, az adatokat ábrázoltuk a vonaton belüli elemzett AP-szám függvényében. A lehető legnagyobb gondot fordítottuk arra, hogy az egész kísérlet során és minden egyes kísérlet során ugyanaz a szűrás maradjon fenn. Az elektróda elmozdulása esetén újabb beállítást végeztünk, és a kísérletet folytattuk, ha az újra beállított szűrás AP karakterisztikája nem tért el 5%-nál nagyobb mértékben az előző méréshez képest. A vegyületek hatását a

megadott koncentrációkban, az egyes vegyületek a rendszerhez való hozzáadása után 40-60 perc elteltével, kumulatív módon értékeltük. A vegyületeket minden kísérlethez a Sigma/Merck cégtől vásároltuk.

Transzmembrán ionáramok rögzítése egyetlen kardiomiocitákból

Késői nátriumáram mérése (I_{NaL})

Hagyományos patch-clamp kísérleteket végeztünk téglalap alakú parancsimpulzusok alkalmazásával, hogy tanulmányozzuk a tesztvegyületek I_{NaL} -re gyakorolt hatását stabil tesztpotenciálokon. A külső oldat HEPES-pufferelt Tyrode oldat volt, kiegészítve $1 \mu\text{M}$ nizoldipinnel, $0,5 \mu\text{M}$ HMR-1556-tal és $0,1 \mu\text{M}$ dofetiliddel az $I_{Ca, L}$, I_{Ks} és I_{Kr} áramok blokkolása érdekében. A pipettaoldat összetétele (mM-ban) CsCl 125, TEACl 20, MgATP 5, HEPES 10, EGTA 10 volt (a pH-t aszparaginsavval 7,2-re állítottuk be). Röviden, a nátriumáramot 2 s-os depolarizáló feszültségimpulzusok aktiválták -20 mV -ra a -120 mV -os tartópotenciálról 5 s-os pulzáló CL mellett. 5–7 perc múlva a gyógyszerrel való inkubálás után a külső oldatot $20 \mu\text{M}$ TTX-et tartalmazóra cseréltük. A TTX ebben a koncentrációban teljesen blokkolja az I_{NaL} -t. Az I_{NaL} teljes mennyiségét farmakológiai kivonással határoztuk meg végső superfúzióval, $20 \mu\text{M}$ TTX-vel mint TTX-érzékeny árammal. Az I_{NaL} amplitúdóját az impulzus kezdete után 50 ms-mal értékeltük. Az „áram által hordozott töltés a kezdeti 20 ms kivételével” áramintegrál meghatározásához a kezdeti 20 ms-ot kihagytuk az értékelésből, hogy csökkentjük az I_{NaP} hozzájárulását.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

3.1 ANTIARITMIÁS GYÓGYSZERHATÁSOK

A mexiletin hatása az I_{NaL} -ra whole-cell patch clamp technikával

Kezdetben a mexiletin I_{NaL} -re gyakorolt hatását hagyományos voltage clamp körülmények között, 2 s időtartamú depolarizációval vizsgálták (-120 mV tartópotenciálról -20 mV-ra). A $40 \mu\text{M}$ mexiletin szignifikánsan csökkentette az I_{NaL} sűrűségét, amelyet a pulzus kezdete után 50 ms-mal rögzítettek. Az I_{NaL} sűrűségének csökkenése 12 vizsgált izomcitában $59,1 \pm 1,8\%$ volt ($-0,385 \pm 0,036$ -ról $-0,156 \pm 0,014$ A/F-re). Összehasonlítható eredményeket értek el a jelenlegi integrálokkal. Ugyanezen kísérletek alapján az áramintegrálok szignifikánsan, $63,3 \pm 2,7\%$ -kal csökkentek ($-76,4 \pm 7,6$ -ról $-26,7 \pm 2,6$ mC/F-re).

A mexiletin frekvenciafüggő és helyreállítási kinetikai hatásai az akciós potenciál felfutására (V_{max})

Az I_{NaL} -ra gyakorolt hatás értékelése után a mexiletin hatását a csúcs gyors nátriumáramra (I_{NaP}) vizsgáltuk. Köztudott, hogy a szív I_{NaP} közvetlen mérése 37°C -on kihívást jelent, ezért az I_{NaP} becsült mértékeként az AP felfutó szára alatti maximális depolarizációs sebességet (V_{max}^+) használtuk. Figyelembe véve a többsejtű szívpreparátumok jobb élettani állapotát (például nagyobb stabilitását), a jobb kamrai izmokat használtuk a kísérletekhez hegyes mikroelektrodákkal. A $40 \mu\text{M}$ mexiletin jelentősen és szignifikánsan gátolta a V_{max}^+ -ot 1 másodpercnél rövidebb CL-nél, és csak mérsékelt hatást fejtett ki 1 másodpercnél hosszabb CL-nél. Ezenkívül a $40 \mu\text{M}$ mexiletin jelentősen befolyásolja a V_{max}^+ offset kinetikáját. A V_{max}^+ visszanyerésének időállandója 1 Hz-es stimuláció mellett 289 ms volt a mexiletin esetében.

A mexiletin onset kinetikai hatása a V_{max} -ra

Az offset kinetikát követően a V_{max} -blokk onset kinetikáját kamrai izomszövetekben vizsgáltuk 400 ms állandó stimulációs sebesség mellett, egyperces ingerlésmentes periódust követően, majd rögzítettük az első 40 AP-t. A onset sebességi állandó $2,6$ AP volt $40 \mu\text{M}$ mexiletin esetén.

A mexiletin frekvenciafüggő hatása az akciós potenciál időtartamára (APD)

A mexiletin hatását az APD_{90} -re vizsgáltuk szubendokardiális eredetű kamrai izomkészítményekben, hagyományos éles mikroelektrodos technikával. Az 1 s-nál rövidebb BCL-nél a mexiletin nem változtatta meg szignifikánsan az APD-t, de $40 \mu\text{M}$ mexiletin lerövidítette az APD_{90} -et a $1,5$ másodpercnél hosszabb állandó CL mellett.

A mexiletin kinetikai hatásai az APD-restitúcióra

A mexiletin APD restitúcióra kifejtett hatását a jobb kamrai izmokban a módszerek fejezetben leírtak szerint kettős pulzus protokollal (S1-S2) mértük. A 40 μM mexiletin növelte a refrakteritást, de az APD_{90} állandó 1 Hz-es stimuláció után rögzített restitúciós időállandója a mexiletin alkalmazása után nem volt megfelelően meghatározható az effektív refrakter periódus (ERP) növekedése miatt.

A GS967 hatása az I_{NaL} -re patch clamp technikával

A mexiletinhez hasonlóan a GS967 hatását I_{NaL} -re vizsgáltuk a fent tárgyalt protokoll szerint. 1 μM GS967 viszonylag és szignifikánsan csökkentette az I_{NaL} sűrűségét $-0,313 \pm 0,05$ -ről $-0,062 \pm 0,01$ A/F-re ($80,4 \pm 2,2\%$ -os csökkenés, $n=6$). Hasonlóképpen, az áramintegrálok jelentősen, $79,0 \pm 3,1\%$ -kal csökkentek ($-69,1 \pm 7,9$ -ről $-15,4 \pm 3,9$ mC/F-re).

A GS967 frekvenciafüggő és restitúciós kinetikai hatásai a V^+_{max} -ra

A GS967 hasonló hatását az I_{NaP} -ra a fent említett protokollok segítségével vizsgáltuk. A GS967 V^+_{max} -ra gyakorolt gátló hatása csak a legrövidebb, 0,3 s és 0,4 s CL-eknél volt szignifikáns, amint az ábrán is látható. Ez a frekvenciafüggő hatás jól leírható a GS967 gyorsabb offset és onset kinetikájával. A V^+_{max} felépülési időállandója 1 Hz-es stimulációnál 110 ms volt a GS967 esetében, ez a V^+_{max} felépülésének csaknem háromszor rövidebb időállandója, mint a mexiletin.

A GS967 onset kinetikai hatása a V^+_{max}

Továbbá, a GS967 kinetikára kifejtett hatásának vizsgálatához 1 μM GS967 hatását regisztráltuk a V^+_{max} blokkra 2,5 Hz-es stimulációs sebességnél, hasonlóan a mexiletinéhez. A onset sebességi állandó 5,3 AP volt 1 μM GS967 esetében.

A GS967 frekvenciafüggő hatásai az APD-re

A kamrai izom preparátumokban a GS967 nem változtatta meg szignifikánsan az APD_{90} értéket 2 másodpercnél rövidebb stimuláció esetén. Azonban 1 μM GS967 szignifikánsan lerövidítette az APD_{90} -et 1,5 másodpercnél hosszabb CL stimuláció esetén.

A GS967 restitúciós kinetikai hatásai az APD-re

A GS967 esetében a mexiletinnél alkalmazott módszerekkel vizsgáltuk az APD_{90} restitúciót. 1 μM GS967 lassította a restitúciós kinetikát. Az időállandó az APD_{90} restitúciója 1 Hz állandó stimuláció mellett $12,8 \pm 1,1$ ms-ról $18,3 \pm 2,3$ ms-ra nyúlt GS967 jelenlétében.

A dezetil-amiodaron (DEA) hatása a repolarizáció diszperziójára a kamrában

A DEA megnyújtotta az APD-t a kamrában, de nem a Purkinje-rostokban, ellentétben a III. osztályú antiaritmiás szerek hatásával. Eredményeinkben a repolarizáció diszperzióját (az APD különbsége a Purkinje és a kamrai szövet között) hasonlítottuk össze krónikus DEA 50 μM és akut szotalol (3 és 10 μM) alkalmazása után. A DEA és a szotalol határozottan és szignifikánsan meghosszabbította az APD-t a kamrai izmokban, azonban a repolarizáció diszperziója lényegesen magasabb volt a szotalollal kezelt készítményekben, mint a krónikus DEA alkalmazásakor. Ez arra utal, hogy a szotalolhoz képest a DEA kisebb proaritmiás potenciállal rendelkezik.

A DEA akut alkalmazásának hatása a kutya kamrai AP-kra (APD and V^+_{max})

Számos kísérletben tanulmányozták az akut 10 μM DEA-nak a szív AP-kra gyakorolt hatását is. Kutya jobb kamrai preparátumokban 10 μM akut DEA enyhe, de nem fordított aránytól függő APD₉₀ megnyúlást és jelentős V^+_{max} gátlást fejtett ki rövid ciklushosszaknál (CL<700ms).

A DEA akut beadásának hatása az ouabain által kiváltott késleltetett utódepolarizációra (DAD) kutya Purkinje rostjaiban

Továbbá késleltetett utódepolarizációt (DAD) indukáltak a 0,3 μM ouabainnal előkezelt Purkinje-rostokban. A 10 μM DEA alkalmazása megszüntette a DAD-okat a hat kísérletből mind a hatban. Ezek az eredmények összhangban vannak a laboratóriumunkban korábban közölt eredménnyel, hasonló akut 10 μM AMIO adagolásával (Varro et al., 2001).

A flekainid I. osztályú antiaritmiás hatásai az I_{NaL} -re

3 μM flekainid szignifikánsan csökkentette az I_{NaL} denzitását $-0,311 \pm 0,05$ -ről $-0,114 \pm 0,01$ A/F-re (63,2 \pm 3,0%-os csökkenés, n=4). Hasonlóképpen, az áramintegrálok jelentősen, 56,3 \pm 4,6%-kal csökkentek ($-57,9 \pm 9,7$ -ről $-24,7 \pm 3,9$ mC/F-re).

A flekainid frekvenciafüggő hatásai az APD-re

A flekainid (1, 3, 10 μM) frekvenciafüggő hatásai az APD₉₀-re. A flekainid, bár nem szignifikánsan, 500 ms-os CL-nél rövidebb stimulációs frekvenciáknál megnyújtotta az APD₉₀-et.

A flekainid kinetikai hatásai az APD restitúcióra

Az APD₉₀ restitúciót a flekainid alkalmazása után a kamrai izomzatban mértük a fent leírt eljárásokkal. Az APD₉₀ restitúciójának időállandója a kontrollban, állandó 1 Hz-es stimulációt követően 7,7 \pm 1,2 ms volt, de mivel a flekainid alkalmazása utáni restitúciós görbe nem mutatott monoexponenciális lefutást, nem került meghatározásra. Hangsúlyozni

kell, hogy a korai extraszisztolák APD-je szignifikánsan és jelentősen megnőtt a flekainid alkalmazása után.

A kinidin I. osztályú antiaritmiás hatása az I_{NaL} -ra

10 μ M kinidin szignifikánsan csökkentette az I_{NaL} sűrűségét $-0,416 \pm 0,06$ -ról $-0,212 \pm 0,03$ -ra ($46 \pm 4,3\%$ -os csökkenés, $n=8$). Hasonlóképpen, az áramintegrálok jelentősen, $41,4 \pm 5\%$ -kal csökkentek ($-83,1 \pm 13$ -ról $-47,6 \pm 8,3$ mC/F-re).

A kinidin hatása az APD restitúciós kinetikájára

Az APD₉₀ restitúcióját kinidin alkalmazása után a kamrai izomzatban a fent leírt eljárásokkal mértük. A kinidin minden vizsgált koncentrációnál lelassította a restitúció kinetikáját. A kinidin növelte az APD₉₀-et (és a refrakter időszakot) a teljes helyreállítási görbe során. Az APD₉₀ restitúciójának időállandója állandó 1 Hz-es stimulációt követően $32,3 \pm 2,1$ ms volt 20 μ M kinidin esetén. vs. $5,8 \pm 1,4$ ms a vezérléshez.

3.2 PROARITMIÁS GYÓGYSZERHATÁSOK

A nátriumcsatorna-blokkolók proaritmiás potenciálja

A flekainid frekvenciafüggő hatása a V^+_{max}

A flekainid koncentráció- és frekvenciafüggő módon csökkentette a V^+_{max} -ot, a legnagyobb csökkenés a gyorsabb frekvenciáknál (rövidebb CL-ek) következett be. Hasonlóképpen, a flekainid hatása a V^+_{max} felépülési kinetikájára frekvenciafüggő volt, a V^+_{max} nagyobb csökkenése fordult elő nagyobb ingerlési frekvenciáknál. A V^+_{max} visszanyerésének időállandója, állandó 1 Hz-es stimulációt követően meghatározva, $9,8 \pm 4,0$ s volt a 10 μ M flekainid esetében, míg a kontroll esetében $15,6 \pm 0,9$ ms.

A flekainid hatása a V^+_{max} ra onset kinetikájára

Ennek a használatától függő V^+_{max} blokknak a onset kinetikája flekainid alkalmazása után dózisfüggő volt, magasabb koncentrációban viszonylag gyorsabban, $11,0 \pm 0,8$ ütési állandóval jellemezve 10 μ M flekainid esetén 400 ms-os CL stimulációnál.

A kinidin frekvenciafüggő hatása a V^+_{max} ra

A flekainidhoz hasonlóan a kinidin is a V^+_{max} koncentráció- és sebességfüggő gátlását mutatja. A V^+_{max} csökkenés kifejezetten szignifikáns volt gyorsabb stimulációs ráta mellett, de a CL-ek széles tartományában jelen volt. A V^+_{max} restitúciójának időállandója, állandó 1 Hz-es stimulációt követően meghatározva, $4,0 \pm 0,4$ s volt a 20 μ M kinidin esetében, míg a kontroll esetében $24,0 \pm 2,3$ ms.

A kinidin onset kinetikai hatása a V^+_{max}

Hasonlóan, ennek a koncentrációtól és használatától függő V^+_{max} blokk kinetikája a kinidin alkalmazása után gyorsabb volt magasabb koncentrációnál, amelyet a 20 μ M kinidin $4,1 \pm 0,5$ AP onset sebességi állandója jellemez 400 ms CL stimulációnál.

A kinidin gyakoriságfüggő hatásai az APD-re

A kinidin koncentráció- és sebességfüggő (fordított) hatást mutat az APD-re. A kinidin a teljes frekvenciatartományban meghosszabbította az APD-t, míg lassabb stimulációs frekvenciákon kifejezettebb meghosszabbító hatást mutatott az APD-re.

A kannabinoidok proaritmiás potenciálja

A CBD szív-celluláris elektrofiziológiai hatása az AP-kra nyúl és kutya kamrai készítményekben

A CBD szignifikánsan meghosszabbította az APD₉₀-et 5 μ M koncentrációnál anélkül, hogy bármilyen más AP paramétert jelentősen megváltoztatott volna, mint például az APA, V^+_{max} , RMP. Ez a repolarizációra gyakorolt hatás a nyúl és a kutya kamrai preparációjában leginkább azzal magyarázható, hogy a CBD többszörös hatással van az AP mögött meghúzódó különböző transzmembrán ionáramokra.

KÖVETKEZTETÉSEK

A számos terápiás csoportba tartozó gyógyszerek számos szívritmuszavart válthatnak ki vagy súlyosbíthatnak. Fontos tisztában lenni azokkal a gyógyszerekkel, amelyek szívritmuszavart okozhatnak, és különösen a gyógyszer okozta szívritmuszavarokkal kapcsolatban. A kockázati tényezőkre való odafigyelés egyes gyógyszerek okozta szívritmuszavarok esetén segíthet a megelőzésben és a kockázat csökkentésében. Bár az egyes gyógyszerekhez kapcsolódó aritmiák mögött meghúzódó mechanizmusok nagyrészt ismeretlenek. Ezért további kutatásokat kell végezni ezen a területen annak érdekében, hogy további adatok álljanak rendelkezésre bizonyos gyógyszerek által kiváltott aritmiák általános előfordulásának, a mögöttes mechanizmusoknak, a kockázat csökkentésére és a klinikusok és a betegek tudatosságának növelésére szolgáló standard módszerek megfelelő meghatározásához. Fontos figyelembe venni azt a lehetőséget is, hogy a páciens szívritmuszavarát gyógyszer okozta. Továbbá fontosabbá válik a szív ioncsatornákon ható ágens elektrofiziológiai jellemzése során, hogy a stimulációs frekvenciák széles tartományának felhasználásával teszteljük a kardioaktív hatóanyagok normális és fordított frekvenciafüggő természetét. Ezen túlmenően, annak érdekében, hogy az állatkísérletek eredményeit transzlálni tudjuk klinikailag releváns információkra, figyelembe kell venni a nagyobb emlősöket, például a kutyákat, mivel nagy különbségek vannak az emberi szívfrekvencia és a kisebb laboratóriumi állatok, például egerek, patkányok, gyorsabb spontán frekvenciája között, mint tengerimalacok és nyulak esetében.

Más I-es osztályú szerekkel ellentétben az IA és IC osztályba tartozó szerek lassan disszociálnak a Na^+ csatornáról, és ezáltal jelentősen késleltetik a kamrai vezetést, ezért aritmiás szubsztrát jelenlétében tovább fokozhatják ezt a proaritmiás kockázatot. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a frekvenciafüggés, a restitúciós kinetika és az onset kinetika fontos elektrofiziológiai tényezők, amelyek megkülönböztethetik a proaritmiás és antiaritmiás potenciállal rendelkező Na^+ csatorna blokkolókat. Ezen túlmenően a jelenlegi adatok azt sugallhatják a klinikusok számára, hogy valószínűleg olyan vegyületek, amelyek nem gátolják az impulzusvezetést normál szívfrekvencia mellett, és lerövidítik az APD-t a késői nátriumáram gátlása miatt, valamint gyors felépüléssel rendelkeznek, mint például a mexiletin és a GS967 vegyületek hasznosak lehetnek a jövőben, gyógyszerfejlesztés szempontjából is. Valószínűleg hasznos antiaritmiás tulajdonság lenne a flekainid alkalmazása után megfigyelt, korai extrasystoléra gyakorolt, APD-megnyújtó érdekes, jelentős hatása is. Ezenkívül a kamrai repolarizáció diszperziójának növekedésének hiánya a DEA-val korrelál a proaritmia klinikailag megfigyelt alacsonyabb előfordulásával. Ezenkívül az orvosoknak tisztában kell lenniük az olyan vegyületek fent említett káros hatásaival, amelyek befolyásolják a repolarizációs tartalékot társbetegségben vagy több, gyógyszerrel kezelt betegségben szenvedő betegeknél.

A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK:

Doktori értekezésem legfontosabb új eredményei a következők:

1. Az azonos osztályba tartozó antiaritmiás szerek között lényeges különbségek vannak az antiaritmiás és proaritmiás potenciálok tekintetében.
2. A GS967 I_{NaP} és I_{NaL} gátló tulajdonságokkal is rendelkezik, ami ellentétben áll a korábbi állításokkal, miszerint ez a vegyület az úgynevezett „ I_{NaL} specifikus inhibitorok” új osztályát képviseli.
3. Az I_{Na} -t blokkoló I_{Na} -gátlók (Mexiletine és GS967) jótékony hatásúak, mivel kisebb a proaritmiás potenciáljuk, mint azok, amelyeknél az I_{Na} gátlás lassú fellépése és eltolása kinetikája (flekainid és kinidin).
4. A flekainid specifikus APD-hosszabbító hatást fejt ki a korai extrasystolék APD-jére, amely hatás fel nem ismert sejtes antiaritmiás tulajdonság lehet.
5. Az amiodaron fő metabolitja, a DEA jótékony hatást fejt ki a kamra és a Purkinje rostok közötti repolarizációs diszperzió csökkentésével.
6. A CBD-nek korábban nem ismert enyhe, de észrevehető kamrai APD-t megnyújtó hatása van, ami a klinikai gyakorlatban a proaritmia fokozott kockázatával járhat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás vagyok a Mindenható ALLAH-nak, aki erőt és képességet adott ahhoz, hogy ezt a munkát sikeresen elvégezzem. Számptalan üdvözet szeretett SZENT Profétánkknak, HAZRAT MUHAMMAD-nak (BLV). Másodsor, legnagyobb meglepéddel szeretném kifejezni mélységes és intenzív adósságomat örökké szeretetre méltó témavezetőmnek, Prof. Dr. Varró András, MTA doktorának, Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet professzorának. Hozzáértő tanácsadása, bizalma, értékes javaslatai, határtalan toleranciája, megunthatatlan segítése bármiben, bárhol, bármikor, tökéletes tanácsai, elgondolkodtató útmutatásai és kellő függetlensége ahhoz, hogy eldönthessem a dolgokat a vizsgálat során, hozzásegített ahhoz, hogy mind a kompetenciámban, mind pedig kutatói bizalom. Köszönetemet fejezem ki Dr. Virág László tanár úrnak, aki sokat segített az adatelemzésben és az illusztrációk elkészítésében, valamint a tanítással töltött idejéért. Végtelenül hálás vagyok Prof. Dr. Baczkó István tanszékvezető úrnak a kutatómunka során nyújtott biztatásáért, teljes körű támogatásáért és együttműködéséért. Nagyon hálás vagyok Prof. Dr. Jost Norbert élelítő tanácsaiért, technikai támogatásáért és folyamatos segítségéért is a tanulmányi időszak alatt. Hálás vagyok Dr. Prorok Jánosnak, Dr. Nagy Norbertnek, Dr. Kohajda Zsófiának, Dr. Husti Zoltánnak, Dr. Koncz Istvánnak, valamint az osztályunkon dolgozó valamennyi munkatársnak nyújtott segítségért és biztatásért. Szeretnék köszönetet mondani PhD ösztöndíjas munkatársaimnak, Aiman Mohammednek, Dr. Topal Leilának, Dr. Árpádfy-Lovas Tamásnak minden pozitív támogatásukért és konstruktív társukért a tanulmányom során. Nincsenek szavaim arra, hogy kifejezzem hálámat és mélységes csodálatomat ragaszkodó szüleim és családtagjaim iránt. Egész életemben folyamatos támogatást és szeretetet nyújtottak számomra. Végezetül szeretnék megemlíteni a Tempus Közalapítványt (Magyarország) és a Pakisztáni Felsőoktatási Bizottságot, akik segítettek abbna, hogy elnyerjem ezt a rangos „*Stipendium Hungaricum Ösztöndíjprogram*” ösztöndíjat, amelyen keresztül megvalósítottam álmomat a doktori tanulmányaimról.

Anyagi támogatók

Ezúton is köszönjük az alábbiakban felsorolt támogatóink hozzájárulását: Szegedi Tudományegyetem (IKIKK program, a Nemzeti Kutatásfejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.3.2-15-2016-00012; GINOP-2.3.2-15-2016-00047, GINOP-2.3.2-15-2016-0006; NKFIH K-135464, NKFIH K-142738 és NKFIH K-128851), az Emberi Erőforrások Minisztériuma (20391-3/2018/FEKUSTRAT és EFOP-3.6.2-16-2017-00006), valamint az Eötvös Loránd Kutatói Hálózat.