

## OTKA zárójelentés

**Szerződésszám: T/F 046776**

**Témavezető: Dr. Farkas András**

**A téma címe: Az antiaritmiás gyógyszerek proaritmiás hatását befolyásoló tényezők vizsgálata**

**A 2004-2007-ben elvégzett munka és az elért eredmények rövid ismertetése:**

I. Első in vivo kísérletsorozatunkban intravénás anesztetikumok hatását vizsgáltuk a dofetilid (szelektív delayed rectifier kálium áram - azaz  $I_{Kr}$  - gátló) proaritmiás hatására a leggyakrabban használt in vivo torsades de pointes modellben, a Carlsson-féle altatott nyúl modellben. Bizonyítottuk, hogy az in vivo kísérletekben alkalmazott altatószer befolyásolhatja a kálium csatorna gátlás következtében kialakult ritmuszavarok előfordulását a Carlsson modellben is. A pentobarbitál altatás védett a dofetilid-okozta torsades de pointes aritmia ellen nyulakban, míg az intenzív osztályokon leggyakrabban használt intravénás altatószer, a propofol jelentősen nem befolyásolta a dofetilid-okozta ritmuszavarok gyakoriságát a kloralóz altatáshoz viszonyítva. A pentobarbitál olyan kifejezett mértékben védett a ritmuszavarok ellen, hogy még a dofetilid dózisának duplázása és az érzékenyítő fenilefrin dózisának triplázása sem növelte jelentősen a dofetilid által okozott ritmuszavarok gyakoriságát pentobarbitál-altatott nyulakban. A kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy a dofetilid-okozta ritmuszavarok gyakorisága összefügg-e az altatószerek vegetatív idegrendszerre kifejtett hatásával. Meglepő módon az eredmények azt mutatták, hogy a legtöbb ritmuszavar abban a csoportban jelentkezett (kloralóz), ahol a szimpatikus és a paraszimpatikus idegrendszer aktivitása a legalacsonyabb volt. A legkevesebb torsades de pointes viszont a legmagasabb paraszimpatikus és szimpatikus aktivitású, pentobarbitál-altatott nyulakban alakult ki. Ebben a munkában megvizsgáltuk továbbá, hogy az EKG-n mérhető számos repolarizációs paraméter közül van-e olyan, mely képes előre jelezni a dofetilid okozta torsades de pointes tachycardia megjelenését altatott nyúlban. Meglepő módon nem találtunk olyan paramétert, mely prediktív értékűnek bizonyult volna, pedig néhány, általunk is mért repolarizációs paraméter más experimentális modellben prediktív értékűnek tűnt. A vizsgálat részeredményeit több hazai és nemzetközi kongresszuson ismertettük, számos idézhető előadáskivonat született a munkából. Az eredmények teljes feldolgozása megtörtént, egy angol nyelvű teljes közleményben foglaltuk össze az adatokat. A dolgozat az egyik legnívósabb farmakológiai szaklapban, a *British Journal of Pharmacology*-ban jelent meg: Vincze D, Farkas AS, Rudas L, Makra P, Csík N, Leprán I, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A, Farkas A. Relevance of anaesthesia for dofetilide-induced torsades de pointes in  $\alpha_1$ -adrenoceptor-stimulated rabbits. *Br J Pharmacol.* 2008 Jan;153(1):75-89. Epub 2007 Oct 29.

II. Mivel az altatószeres vizsgálatunkban fordított arányosságot találtunk a különböző altatószerrel altatott állatok vegetatív idegrendszeri aktivitása és a dofetilid-okozta torsades de pointes aritmia gyakorisága között, felmerült, hogy ez a különbség lehet az alapja az egyes állatok  $I_{Kr}$  gátló szerek proaritmiás hatásával szemben mutatott különböző érzékenységének. Ezt vizsgálandó egy újabb in vivo kísérletsorozatban Na-pentobarbitállal altatott nyulak aktuális paraszimpatikus és szimpatikus aktivitását mértük dofetilid adása közben. A vizsgálatban összefüggést próbáltunk keresni a vegetatív idegrendszeri paraméterek és a szer által okozott ritmuszavarok előfordulása között. Eredményeink szerint, az általunk mért

paraszimpatikus aktivitást tükröző paraméterek nem voltak arányosak a dofetilid proaritmiás aktivitásával pentobarbitállal altatott nyúlban. Ezen eredményeinket az International Society for Heart Research (ISHR) 26. európai kongresszusán, Manchesterben prezentáltuk (Farkas A, Farkas AS, Rudas L, Leprán I, Orosz Sz, Csík N, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A. Basal vagal nerve activity does not predict susceptibility to dofetilide-induced torsade de pointes in anaesthetized rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 2006. 40: 984, Abstract No. 174). További adataink alapján, a módszereinkkel mért szimpatikus idegrendszeri paraméterek sem korreláltak a dofetilid proaritmiás aktivitásával pentobarbitállal altatott nyúlban. Ezen eredményeinket a Magyar Kardiológusok Társasága (MKT) 2007. évi kongresszusán (Farkas A, Farkas AS, Makra P, Csík N, Leprán I, Varró A, Rudas L. A vegetatív idegrendszer szerepének vizsgálata a dofetilid proaritmiás aktivitására Na-pentobarbitállal altatott nyulakban. *Cardiologica Hungarica*, 2007. 37: Suppl. A, A15.) valamint az ISHR XIX. (2007. évi) világgongresszusán, Bologna-ban prezentáltuk (Farkas A, Farkas AS, Vincze D, Makra P, Csík N, Leprán I, Varró A, Rudas L. Examination of the role of the sympathetic nervous system in the proarrhythmic activity of dofetilide. *J Mol Cell Cardiol* 2007. 42: S7).

Mivel a vegetatív idegrendszeri paraméterek nem magyarázták az egyes állatok nagyobb érzékenységét a dofetilid proaritmiás hatásával szemben, ezért megvizsgáltuk, hogy esetleg valamilyen repolarizációs eltérés lehet-e az oka az állatok különböző aritmia érzékenységének. A korábbi altatószeres vizsgálatban kifejlesztett módszerekkel az EKG-n számos repolarizációs paramétert mértünk, majd megvizsgáltuk, hogy van-e köztük olyan, mely korrelál a dofetilid proaritmiás aktivitásának mértékével pentobarbitállal altatott nyulakban. Meglepő módon egyetlen repolarizációs paraméter sem volt prediktív értékű ebben a vizsgálatban sem. Ezen eredményeinket az MKT 2007. évi kongresszusán (Orosz Sz, Farkas AS, Makra P, Csík N, Leprán I, Varró A, Farkas A. Az EKG repolarizációt jellemző paraméterei nem jelzik előre a dofetilid proaritmiás aktivitásának mértékét Na-pentobarbitállal altatott nyulakban. *Cardiologica Hungarica*, 2007. 37: Suppl. A, A23.) valamint az ISHR XIX. (2007. évi) világgongresszusán, Bologna-ban prezentáltuk (Orosz S, Farkas AS, Makra P, Csík N, Leprán I, Rudas L, Varró A, Farkas A. Repolarization-related ECG parameters do not predict the proarrhythmic activity of dofetilide. *J Mol Cell Cardiol* 2007. 42: S6). Egy angol nyelvű teljes közlemény megírása folyamatban van a dofetilid proaritmiás hatásának pentobarbitállal altatott nyúlban történt vizsgálatáról.

III. Brit kutató kollégákkal együttműködésben vizsgáltuk a nervus vagus átvágásának hatását egy másik IKr gátló szer, a clofilium által kiváltott torsades de pointes kamrai tachycardia gyakoriságára pentobarbitállal altatott nyulakban. Ebben a munkában részletesen vizsgáltuk a vérnyomás és a szívfrekvencia változás hatását is a clofilium proaritmiás hatására. Érdekes módon a vágusz ideg kétoldali átvágása jelentősen csökkentette a clofilium proaritmiás hatását. A vérnyomás emelése angiotenzin II-vel nem fokozta a szer aritmogén hatását. Legkorábbi eredményeinket az ISHR 2004 évi drezdai kongresszusán adtuk elő (Coker SJ, Farkas A. Influence of bradycardia on the induction of torsade de pointes with clofilium. *J Mol Cell Cardiol* 2004. 36: 722, Abstract No 27.) A munka adatainak teljes feldolgozása megtörtént, egy angol nyelvű teljes közleményt írtunk belőle, melyet közlésre elküldtünk a British Journal of Pharmacology-nak (Farkas A, Dempster J, Coker SJ. Importance of vagally-mediated bradycardia for the induction of torsade de pointes in an in vivo model). A munka elbírálása jelenleg folyamatban van, első lépésben pozitív választ adtak, a szöveg módosítását kérték pár okból kifolyólag. Ez megtörtént, várjuk a végleges döntést a dolgozatról.

A pályázatunk célkitűzései között szereplő kísérletek nagy része in vivo kísérlet lett volna, mivel az. un. Carlsson-féle altatott nyúl modellel voltak már korábban gyakorlati tapasztalataink. Sajnos a pályázat megnyerését és a kutatás elkezdését követően röviddel a Sigma-Aldrich kivonta a forgalomból a relatíve olcsón elérhető (bár nem szelektív) delayed rectifier kálium áram ( $I_{Kr}$ ) gátló clofiliumot, és helyette elkezdett egy szelektív  $I_{Kr}$  blokkolót (E4031) forgalmazni. Ez utóbbi szernek az ára viszont olyan magas, hogy egy in vivo kísérlethez szükséges mennyiségű szer ára több millió forintot is elér. Személyes kapcsolatokon keresztül hozzájutottunk bizonyos mennyiségű dofetilidhez, de ennek a mennyisége a fent említett in vivo kísérleteken túl nem volt elég újabb in vivo munkákra. Emiatt a pályázatunkban tervezett további in vivo kísérleteket nem tudtuk elvégezni. Így a pályázat célkitűzései között szereplő vizsgálatok közül (1) az akut, respiratórikus alkalózis következtében kialakult hipokalémia és (2) a prekondicionálás hatását a gyógyszer indukálta ritmuszavarok kialakulására, valamint (3) az  $I_{Kr}$  gátlók proaritmiás hatásának dózis-függő mértékét nem tudtuk vizsgálni. Az anyagi keretek relatív szűkössége miatt (a vizsgálni kívánt  $I_{Kr}$  gátlók árának drasztikus növekedéséhez viszonyítva) a jóval kisebb mennyiségű szert igénylő in vitro módszerek felé fordultunk, további munkáink nagy részét izolált, Langendorff perfundált szívekkel végeztük.

IV. Célkitűzéseinknek megfelelően kísérleteket végeztünk, hogy megállapítsuk, a kamrai falfeszülés képes-e fokozni a dofetilid proaritmiás hatását izolált nyúl szívben. Eredményeink az elvárásainkkal ellentétben, de a clofiliummal végzett in vivo vizsgálat vérnyomás eredményeivel összhangban azt mutatják, hogy a bal kamra falának folyamatos feszítése nem fokozza az  $I_{Kr}$  gátlók, pl. a dofetilid által okozott ritmuszavarok gyakoriságát.

Ismert, hogy altatott nyúlban adott iv.  $\alpha_1$  adrenoceptor izgató szerek növelik a kálium csatorna blokkolók proaritmiás hatását, az viszont nem volt ismert, hogy az intra- vagy az extracardiális  $\alpha_1$  adrenerg receptorok közvetítik az aritmia fokozó hatást. Ezért a fenti in vitro munkában azt is vizsgáltuk, hogy az intracardiális  $\alpha_1$  adrenoceptor izgatás fokozza-e a kálium csatorna blokkoló dofetilid proaritmiás hatását izolált, Langendorff-perfundált nyúl szívekben. Meglepő módon, a korábbi felvetésekkel ellentétben azt találtuk, hogy az intracardiális  $\alpha_1$  adrenoceptor izgatás nem befolyásolja a dofetilid proaritmiás hatását. Ez arra utal, hogy nyúlban az extracardiális  $\alpha_1$  adrenoceptorok szerepe döntő a gyógyszer okozta ritmuszavarok kialakulásában. A vizsgálat előzetes eredményeit több hazai és nemzetközi kongresszuson ismertettük, számos idézhető előadáskivonat született a munkából. Az adatok teljes feldolgozása után az eredményeket egy angol nyelvű, rangos, nemzetközi szaklapban publikáltuk (Farkas AS, Acsai K, Tóth A, Dézsi L, Orosz S, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A, Farkas A. Importance of extracardiac  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation in assisting dofetilide to induce torsade de pointes in rabbit hearts. *Eur J Pharmacol* 2006. 537: 118-125).

A kutatási időszak megkezdése után röviddel különös szerencsénkre hozzájutottunk egy új, rendkívül szelektív  $Na^{2+}$ - $Ca^{2+}$  exchanger (NCX) gátló szerhez. Az NCX működésének és funkciójának vizsgálata korábban meglehetősen korlátozott volt, mivel nem állt rendelkezésre eléggé szelektív farmakológiai gátló szer. A SEA 0400 kifejlesztése azonban lehetőséget adott az NCX vizsgálatára, mi a szerencse révén az elsők között tanulmányozhattuk az NCX működését.

V. Egy nagy kísérletsorozatban Langendorff perfúziós módszert használva vizsgáltuk az NCX gátlás szívizom kontraktilitásra kifejtett hatását. Bizonyítottuk, hogy a szelektív NCX gátlás nem befolyásolja a szívizom kontraktilitását a hosszú akciós potenciállal és alacsonyabb intracelluláris  $Na^+$  szinttel rendelkező nyúl szívben, míg a rövid akciós potenciállal és magas intracelluláris  $Na^+$  szinttel rendelkező patkány szívben pozitív inotróp

hatású. További intracelluláris kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az NCX gátlás során észlelt fajbéli kontraktilitás különbség oka nem a SEA0400 esetleges fajspecifikus farmakodinámiai hatásának és nem is az NCX esetleges fajspecifikus expressziójának a következménye. A vizsgálat részeredményeit több hazai és nemzetközi kongresszuson ismertettük, számos idézhető előadáskivonat született a munkából. A vizsgálat izolált szíves kontraktilitás eredményeit először egy magyar nyelvű teljes közleményben jelentettük meg az MKT szaklapjában, a *Cardiologica Hungarica*-ban (Farkas AS, Balázs M, Acsai K, Tóth A, Pálincás A, Csanády M, Forster T, Papp JG, Varró A, Farkas A. A  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger gátlás eltérő hatása az izolált patkány- és nyúl szív kontraktilitására. *Cardiologica Hungarica* 2006. 36: 92-96). A teljes munka adatait egy angol nyelvű dolgozatban foglaltuk össze, melyet közlésre elfogadott a *British Journal of Pharmacology* (Farkas AS, Acsai K, Nagy N, Tóth A, Fülöp F, Seprényi G, Birinyi P, Nánási PP, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A, Farkas A.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger inhibition exerts a positive inotropic effect in the rat heart, but fails to influence the contractility of the rabbit heart *Br J Pharmacol, in press*)

VI. Mivel több szerző is felvetette, hogy a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangernek szerepe lehet a gyógyszer okozta torsades de pointes kialakulásában, ezért egy nagy kísérletes munkában azt vizsgáltuk, hogy az NCX gátlás SEA0400-zal csökkenti-e a dofetilid okozta torsades de pointes tachycardia gyakoriságát izolált, AV blokkos nyúl szívben. Meglepő módon az NCX szelektív gátlása SEA0400-zal nem csökkentette a dofetilide által kiváltott ritmuszavarok gyakoriságát, mely arra utal, hogy az NCX működése nem játszik szerepet a dofetilid proaritmiás hatásában. Hogy tisztázzuk, hogy egyáltalán lehetséges-e az AV blokkos izolált nyúl szív modellben a dofetilid okozta torsades de pointes aritmia gyakoriságának csökkentése, egy külön kísérletsorozatban az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna blokkoló verapamil és a  $\text{Na}^+$  csatorna blokkoló lidokain antiaritmiás hatását vizsgáltuk. Mindkét szer védett a dofetilid okozta torsades de pointes ellen izolált, Langendorff-perfundált, AV blokkos nyúl szívben. Ezen eredményeinket az MKT 2007. évi kongresszusán (Farkas AS, Orosz Sz, Forster T, Csanády M, Papp Gy, Varró A, Farkas A. A  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger szerepének vizsgálata a dofetilid okozta torsades de pointes típusú kamrai tachycardia kialakulásában. *Cardiologica Hungarica*, 2007. 37: Suppl. A, A16) valamint az ISHR XIX. (2007. évi) világgongresszusán, Bologna-ban prezentáltuk (Farkas AS, Orosz S, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A, Farkas A. Examination of the role of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in the genesis of the dofetilide-induced torsades de pointes. *J Mol Cell Cardiol* 2007. 42: S4). A vizsgálat adatainak teljes feldolgozása megtörtént, egy angol nyelvű teljes közlemény megírása folyamatban van.

VII. Legutóbbi kísérletes munkánkban egy új, nem AV blokkos izolált nyúl szív torsades de pointes modell beállítását kíséreltük meg. Az utóbbi időben ismerté vált, hogy a delayed rectifier  $\text{K}^+$  áram lassú komponensének, az  $\text{I}_{\text{Ks}}$ -nek a gátlásával a repolarizációs rezerv csökken, mely fokozza az  $\text{I}_{\text{Kr}}$  gátló szerek proaritmiás hatását. Ezt az elvet kihasználva próbáltunk egy új in vitro torsades de pointes modellt beállítani izolált, Langendorff-perfundált nyúl szívben. Eddigi eredményeink feldolgozás alatt állnak, a teljes közleményt ezután írjuk meg.

A projekt II., III., VI., VII. pontjában ismertett kutatásaink eredményeit eddig csak kongresszusokon ismertettük. Ezen munkák adatainak feldolgozása nagy részben megtörtént, mindegyik említett vizsgálatból egy angol nyelvű teljes közleményt kívánunk publikálni nivós nemzetközi szaklapban. Ezek a teljes közlemények elvárásaink szerint a közeljövőben, de legkésőbb 2 éven belül megjelennek. Ezek alapján tisztelettel kérjük, hogy a jelentésben

foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve az ezután megjelent közleményeinket is.

Köszönettel:

Szeged, 2008 február 28.

Dr. Farkas András  
témavezető