

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

OTKA ny.szám: F-61224
Témavezető: Dr. Lengyel Csaba Attila
Téma: **A repolarizációs rezerv csökkenésére és a kamrai repolarizáció adaptációs zavaraira visszavezethető proarrhythmias mechanizmusok elemzése klinikai körülmények között és emlős szívizomban**
A kutatás időtartama: 2006-2009
Kutatóhely: Szegedi Tudományegyetem, I. Belgyógyászati Klinika
Támogatás összege: 10394 eFt

A KUTATÁS ELMÉLETI HÁTTERE

A szívizom repolarizációjáért elsősorban a sejtmembrán felszínén található többféle (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to} , I_{K1}) káliumcsatorna együttes összehangolt működése felelős. Normál körülmények között valamely kifelé irányuló repolarizáló kálium áram gátlása nem feltétlenül okoz jelentős megnyúlást a kamrai szívizom akciós potenciáljának időtartamában (APD), mivel a többi kálium csatorna ezt részben kompenzálni képes. A fenti kompenzációs mechanizmust *repolarizációs rezervnek* nevezzük. Amennyiben a repolarizációt egy I_{Kr} -blokkoló hatású gyógyszer, hypokalaemia, genetikai defektus vagy bradycardia jelentősen megnyújtja, az APD nyúlása kedvez az I_{Ks} áram aktivációjának, ami *negatív feedback* mechanizmus révén gátat szabhat a további APD prolongációnak. Enélkül a protektív mechanizmus nélkül az örökletes defektusok vagy a különböző pathofiziológiai állapotokra visszavezethető ioncsatorna remodelling (diabetes mellitus, szívelégtelenség, etc.) megteremtheti az excesszív repolarizáció megnyúlás feltételeit, ami megnöveli a *torsade de pointes* kamrai tachycardia (TdP) fellépésének esélyét. Azokban az esetekben ugyanis, amikor a repolarizációs rezerv meggyengült, valamely más káliumáram még viszonylag gyenge blokkolása is markáns APD prolongációt okozhat, ami fokozott *proarrhythmia* veszéllyel jár. A repolarizációs rezerv gyengülését önmagában azonban nem kíséri feltétlenül sem a testfelszíni EKG regisztrátum QT-szakaszának megnyúlása, sem a QT-szakasz diszperzió megnövekedése, így a fokozott *proarrhythmia*-hajlam hagyományos módszerekkel történő kimutatása nehéz. A kamrai szívizom elektromos instabilitásának egyik korai jele lehet a repolarizáció *időbeli variabilitásának* megnövekedése. A szívizom elektromos instabilitásának egyik újonnan vizsgált klinikai markere a QT szakasz különböző matematikai módszerekkel jellemezhető időbeli, *beat-to-beat variabilitása*.

A cukorbetegségben gyakoribbnak vélt hirtelen szívhalál egyik feltételezett oka repolarizációs rezerv ioncsatorna remodellingre visszavezethető beszűkülése, illetve a betegség tartam előrehaladásával a kamrai repolarizáció manifeszt megnyúlása. A diabetes mellitus közvetlen, celluláris és subcelluláris szívelektrofiziológiai vizsgálatára experimentális körülmények között főként egér és patkány modellekben került sor. Az ionáramok kinetikájában és az expresszált csatornaproteinekben tapasztalható interspecies eltérések miatt azonban az egér és patkány modellekből származó információk a human vonatkozásban korlátozott értékűek. A szívizomzat kamrai repolarizációjának vizsgálata kapcsán a humán viszonyok tekintetében relevánsabb specieseknek számító diabeteses nyúl és kutya modellekből mindezidáig érdemi adat nem állt rendelkezésünkre. Ugyancsak kevés adattal rendelkezünk arról, vajon miképp változik a QT-szakasz repolarizációs rezerv beszűkülését és kamra repolarizáció időbeli instabilitását tükröző rövid időtartamú *beat-to-beat* variabilitása cukorbetegségben, valamint egyéb, ioncsatorna remodellinget okozó krónikus betegségben.

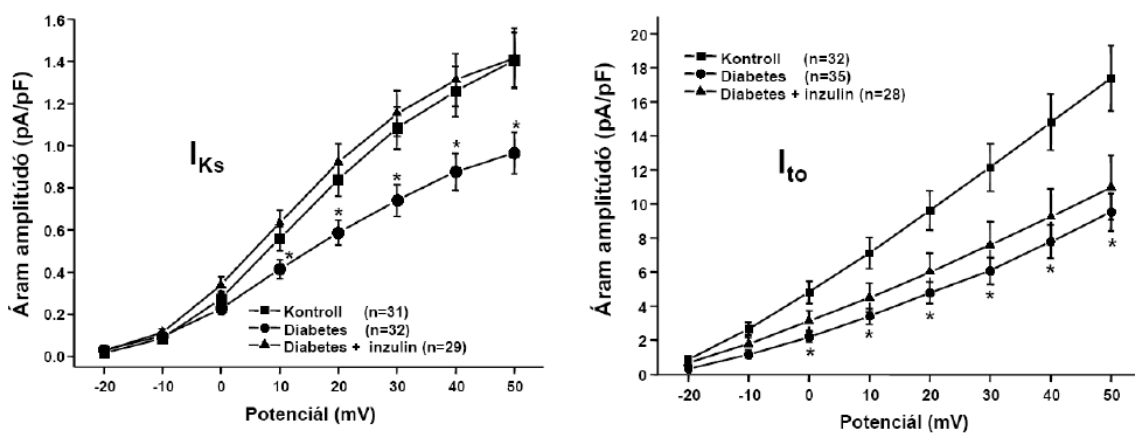
A KUTATÁS CÉLJA

A fentiek alapján vizsgálni kívántuk milyen, a kamrai repolarizációs rezervet csökkentő szívelektrofiziológiai és csatorna-protein szintű változások detektálhatók experimentális diabetes mellitusban, alloxán-diabetikus kutya- és nyúlmodellben. Tanulmányozni kívántuk azt is, miként változik a testfelszíni EKG felvételen a QT-szakasz *beat-to-beat* variabilitása diabetes mellitusban szenvedő betegekben a szénhidrátanyagcsere-egészséges kontrollokhöz képest. Választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy az esetleges eltérés mutat-e összefüggést a cardiovascularis reflexesztekkel jellemezhető autonóm idegrendszeri statusszal. Szívizom-hypertrophiás, valamint szívelégtelen kutya-modellből nyert adatok alapján az I_{Ks} áram farmakológiai blokkolásával olyan *acut torsade-modell*t kívántunk kidolgozni, amely alkalmas a potenciálisan proarrhythmias hatással rendelkező, I_{Kr} -blokkoló mellékhatással is rendelkező gyógyszerek preklinikai tesztelésére. A fenti összefüggések alapján megvizsgáltuk azt is, vajon szívelégtelen betegekben kimutatható-e a QT-variabilitás megváltozása és ez összefüggést mutat-e a kamrai tachycardia előfordulásának kockázatával.

EREDMÉNYEK

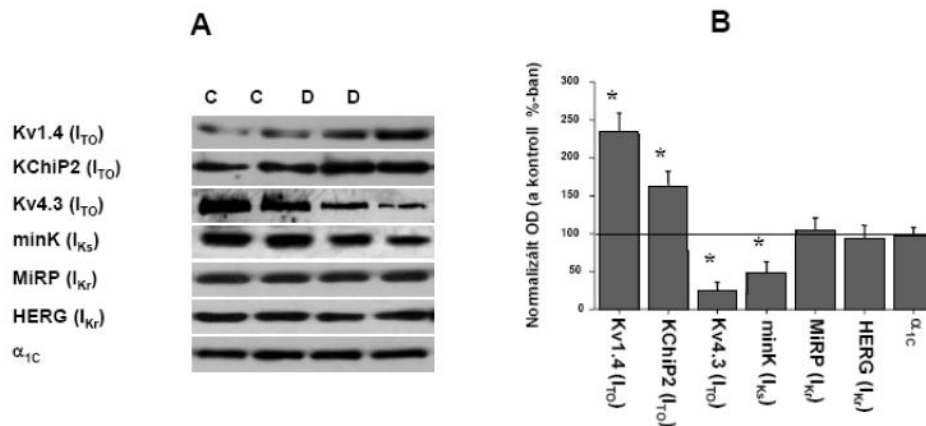
A repolarizációs rezerv vizsgálata alloxán indukálta diabetes mellitusos kutya modellben

Vizsgálataink során kísérletes körülmények között elemeztük, miként változik a kamrai repolarizáció, illetve a repolarizációs rezerv experimentalis diabetes mellitusban és az esetleges változásokat befolyásolhatja-e az inzulinkezelés segítségével elért euglycaemia. A kísérleteket alloxán indukált diabetesben szenvedő kutyákon, *in vivo* és *in vitro* körülmények között végeztük. Klinikai és experimentális vizsgálatok korábban már leírták a szívizom kamrai repolarizációjának cukorbetegségben tapasztalható megnyúlását, az eltérés közvetlen, celluláris és subcelluláris szívelektrofiziológiai analízisére azonban – a humán viszonyok tekintetében relevánsabb speciesnek számító – kutya modellben első alkalommal került sor. A cukorbetegség diagnózisának felállítására az alloxán adagolását követően egy héttel került sor. A diabetes expozíciós ideje 8 hét volt. A cukorbeteg állatok egy részében a vizsgálati periódus alatt subcutan inzulin adagolásával euglycaemiát értünk el. A kísérletek elvégzését a diabeteses állatok – irodalmi adatokból is ismert és ezért részben tervezhető – magasabb elhullási rátája nehezítette. A QT-szakasz mérése céljából a diabetes indukciót megelőzően az altatott kutyákról 12 elvezetéses testfelszíni EKG-t regisztráltunk, majd a felvételt a 8 hetes periódus végén megismételtük. Ezt követően *in vitro* körülmények között, konvencionális microelectrod



technika segítségével jellemeztük az akciós potenciál változását, patch clamp technika alkalmazásával pedig az egyes repolarizáló ionáramokban tapasztalható eltéréseket. Az ionszatorna proteinek expressziójának meghatározására Western blot analízist használtunk. A testfelszíni EKG felvétel alapján számított QT_c-intervallumban és az izolált jobb kamrai papilláris izomban regisztrált akciós potenciál időtartamában a 8 hetes diabetes expozíciót követően csupán mérsékelt fokú megnyúlást tapasztaltunk. A cukorbeteg állatokból izolált szívizomsejtekben azonban az I_{Ks} és az I_{to} ionszatornák amplitúdója a kontrollhoz képest jelentősen csökkent. Az I_{Ca}, I_{K1} és I_{Kr} ionáram amplitúdója nem változott. A Western blot technikával meghatározott Kv4.3 és a MinK ionszatorna protein expressziója, az

Transzmembrán ionszatorna proteinek denzitásának változása diabeteses kutyában



elektrofiziológiai változásoknak megfelelően, szintén csökkenést mutatott, míg az egyéb csatorna proteinek denzitása vagy nem változott (HERG, MiRP1, α_{1c}), vagy nőtt (Kv1.4, KChIP2, KvLQT1). Az inzulin szubsztitúció a diabetes indukálta változásokat az I_{Ks}, KvLQT1 és MinK esetében teljes mértékben kivédte, míg az I_{to}, Kv4.3, and Kv1.4 esetében csak részben mérsékelt. Kísérleteink arra utaltak, hogy a rövid időtartamú alloxán-diabetes a repolarizáció mérsékelt megnyújtása mellett, az I_{Ks} és I_{to} áramok csökkentése révén már jelentősen szűkíti a repolarizációs tartalékot, ami fokozott proarrhythmias kockázattal járhat.

Kísérletes körülmények között megvizsgáltuk intakt éren az alloxan-diabeteses kutyák koszorúereinek vazoreaktivitását is. Azt találtuk, hogy a cukorbeteg állatokban *in vitro* körülmények között a kalcium aktiválta káliumcsatornák kompenzatórikus aktivitás-fokozódása hatásos vasodilatációs rezervet képezhet a diabetes korai szakaszában.

Megjelent közlemény:

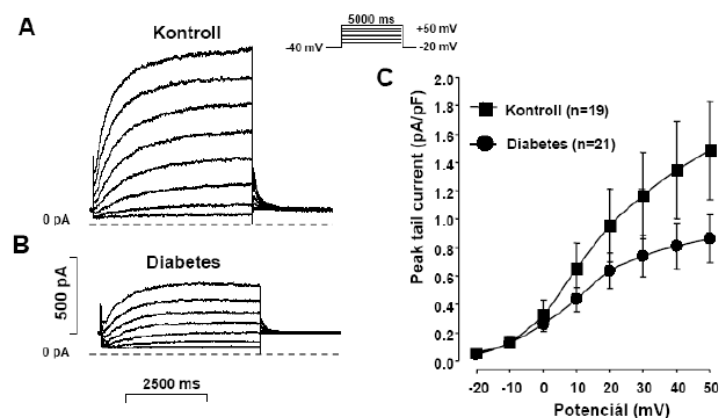
Lengyel Cs, Virág L, Bíró T, Jost N, Pacher P, Magyar J, Biliczki P, Kocsis E, Skoumal R, Kecskeméti V, Nánási PP, Horkay F, Tóth M, Varró A, Papp JGy: Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res*, 73: 512-520, 2007 (IF₂₀₀₇: 6.127)

Pataricza J, Márton Z, **Lengyel Cs**, Tóth M, Papp JGy, Varró A, Kun A: Potassium channels sensitive to combination of charybdotoxin and apamin regulate the tone of diabetic isolated canine coronary arteries. *Acta Physiol*, 194: 35-43, 2008 (IF₂₀₀₇: 1.602)

A repolarizációs rezerv vizsgálata alloxán indukálta diabetes mellitusos nyúl modellben

A vizsgálat fő célja annak további kísérletes elemzése volt, vajon miként változik a kamrai repolarizáció, illetve a repolarizációs rezerv experimentalis diabetes mellitusban, valamint a korábbi kutyakísérletekből nyert adatok reprodukálhatóak-e, más – a humán szívizom repolarizációja szempontjából relevánsnak számító – speciesben. A kísérleteket ezúttal alloxán indukált diabetesben szenvedő nyulakon, *in vivo* és *in vitro* körülmények között végeztük el. A QT-szakasz mérése céljából a diabetes indukciót megelőzően az altatott nyulakról konvencionális testfelszíni EKG-t regisztráltunk, majd a felvételt a diabeteses periódus végén megismételtük. Ezt követően *in vitro* körülmények között patch clamp technika alkalmazásával elemeztük az egyes repolarizáló ionáramokban tapasztalható eltéréseket. A testfelszíni EKG felvétel alapján számított QT_c-intervallumban mérsékelt fokú nyúlást tapasztaltunk. A cukorbeteg állatokból izolált szívizomsejtekben az I_{Ks} ionáram amplitúdója a kontrollhoz képest jelentősen, mintegy 40%-kal csökkent, míg az egyéb kálium áramok tekintetében nem tapasztaltunk változást. A vizsgálatban egyértelműen reprodukálható volt az I_{Ks} ionáram korábbi kutyakísérletekben már tapasztalt amplitúdócsökkenése. Kísérleteink arra utaltak, hogy a repolarizációs rezerv kialakításában fontos szerepet játszó I_{Ks} áram diabetes mellitusban mindkét speciesben jelentősen (~40%) csökken, így a rövid időtartamú alloxán-diabetes a repolarizáció mérsékelt megnyújtása mellett, ezen áram csökkentése révén már jelentősen szűkíti a repolarizációs tartalékot, ami fokozott proarrhythmias kockázattal járhat.

A késői egyenirányító káliumáram lassú komponense (I_{Ks}) kontroll és alloxán-diabeteses nyulakból izolált kamrai szívizomsejtekben



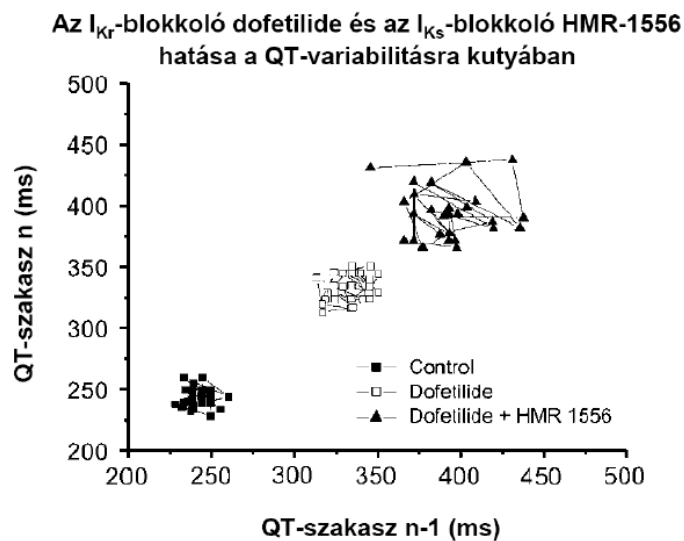
Ugyanakkor - kutyakísérleteinkkel ellentétben - a diabeteses nyulakban nem tapasztaltunk változást az I_{to} áram amplitúdójában, ami az I_{to} csatorna két speciesben tapasztalható eltérő molekulárbiológiai szerkezetével magyarázható.

Megjelent közlemény:

Lengyel Cs, Virág L, Kovács PP, Kristóf A, Pacher P, Kocsis E, Koltay MZs, Nánási PP, Tóth M, Kecskeméti V, Papp JGy, Varró A, Jost N: Role of slow delayed rectifier K⁺-current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart. *Acta Physiol*, 192: 359-368, 2008 (IF₂₀₀₇: 1.602)

A repolarizációs rezerv farmakológiai gyengítésén alapuló *acute torsade-modell* kifejlesztése

Célkitűzéseinknek megfelelően megvizsgáltuk a repolarizációs rezerv és a proarrhythmias kockázat összefüggését a short-term QT variabilitás elemzésének segítségével *in vivo* körülmények között éber kutyákon és altatott nyulakon. A repolarizációs rezerv akut gyengítését ezekben a kísérletekben az I_{Ks} blokkoló HMR1556 intravénás adagolásával értük el. Az I_{Ks} áram gátlásával kiváltott repolarizációs rezerv gyengülés proarrhythmias szerepének elemzése szervesen kapcsolódott azokhoz a kísérletes eredményéhez, amelyben igazoltuk, hogy diabeteses mellitusban az I_{Ks} áram amplitúdója markánsan csökken. Gyengített repolarizációs rezerv mellett az alkalmazott I_{Kr} blokkoló dofetilid jelentősen növelte a QT-variabilitást és a



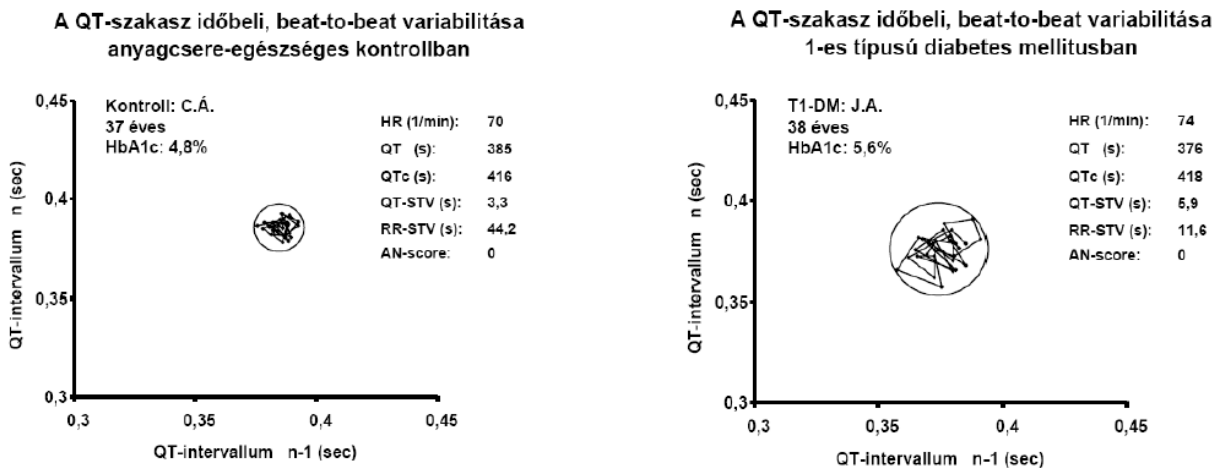
proarrhythmias események (*torsade de pointes* kamrai tachycardia) számát mind éber kutyákban, mind altatott nyulakban. Hasonló hatást értünk el a vizsgált szerek fordított sorrendű alkalmazásával. A QT-szakasz short-term, beat-to-beat variabilitásának elemzésekor azt tapasztaltuk, hogy az I_{Kr} - és I_{Ks} -blokkoló kombinációja esetén a QT-variabilitás megemelkedett. Eredményeink megerősítik azt a feltevést, hogy a repolarizációs rezerv gyengülése fokozza a proarrhythmias kockázatot, aminek kiváló markere a QT-variabilitás fokozódása. Az alkalmazott kísérletes elrendezés egyben alkalmasnak bizonyult egy olyan *acute torsade* modellnek is, amelyben a repolarizációs rezerv prompt farmakológiai gátlását követően tesztelhetővé válhat az I_{Kr} -blokkoló hatással vagy mellékhatással rendelkező gyógyszerek *torsadogen* potenciálja is.

Megjelent közlemény:

Lengyel Cs, Varró A, Tábori K, Papp JGy, Baczkó I: Combined pharmacological block of I_{Kr} and I_{Ks} increases short-term QT interval variability and provokes *torsades de pointes*. *Brit J Pharmacol*, 151: 941-951, 2007 (IF₂₀₀₇: 3.767)

A kamrai repolarizáció időbeli instabilitásának vizsgálata diabetes mellitusban szenvedő cukorbetegekben

A kutatási program korábbi szakaszában elvégzett kísérleteink azt igazolták, hogy a repolarizációs rezerv beszűkítése növeli a proarrhythmias kockázatot, aminek kiváló markere a QT-variabilitás fokozódása. Tekintettel a fentiekre, célkitűzéseinknek megfelelően megvizsgáltuk, miként változik a QT-szakasz rövid távú időbeli variabilitása 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegekben. A QT-variabilitás mérését az Experimetria Kft-vel közösen kifejlesztett EKG jelanalizáló rendszer segítségével végeztük. A cukorbetegek nem különböztek az anyagcsere-egészséges kontroll csoporttól a QT_c-intervallum időtartamában, a rövid időtartamú beat-to-beat QT-variabilitás azonban a diabeteses betegekben magasabbnak



bizonyult a kontroll csoporthoz képest. Az autonóm idegrendszeri funkció szerepét a Ewing-féle öt hagyományos cardiovascularis reflexteszt eredményei alapján elemeztük. A diabeteses betegek átlagos autonóm score értéke 1.7 ± 0.3 volt. A QT-variabilitás és a cardiovascularis reflex-tesztek egyes paraméterei között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Eredményeink arra utaltak, hogy hosszú ideje fennálló 1-es típusú diabetes mellitusban a rövid távú QT-variabilitás akár változatlan átlagos QT_c-időtartam mellett is megemelkedhet, ami már korai időszakban jelezheti a kamrai repolarizáció instabilitásának fokozódását. Az eredményekről az Európai Diabetes Társaság 2008. évi kongresszusán számoltunk be. Az azóta eltelt időszakban az elemszámot megkétszereztük és a vizsgálat *in extenso* közzlése is folyamatban van.

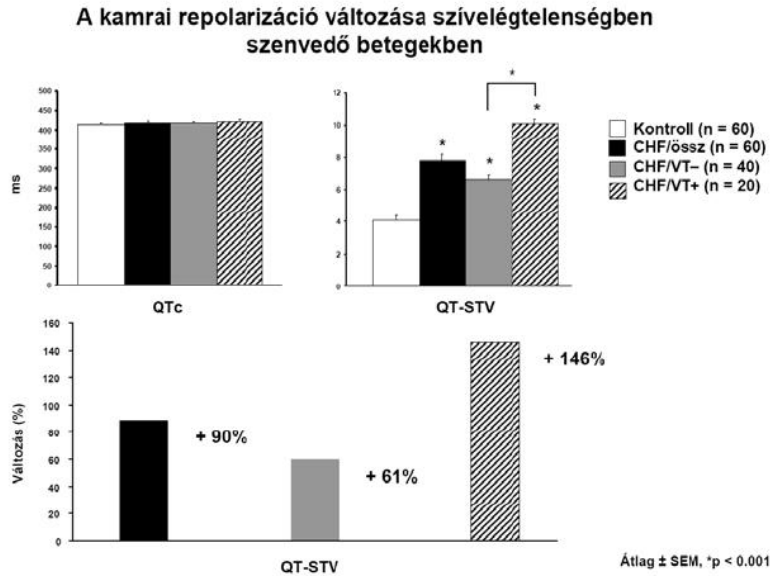
Megjelent közlemény:

Lengyel Cs, Orosz A, Takács R, Várkonyi TT, Baczkó I, Wittmann T, Papp JGy, Varró A:
Short-term QT interval variability in patients with long-standing type-1 diabetes mellitus.
Diabetologia, 51 (Suppl 1): S556, 2008 (abstract)

A QT-variabilitás vizsgálata szívelégtelenségben szenvedő betegekben

A vizsgálati időszakban elemeztük azt is, vajon egyéb, a repolarizációs rezerv csökkenését okozó betegségben is észlelhető-e a QT-variabilitás növekedése. Állatkísérletekből származó szívelektrofiziológiai adatok korábban igazolták, hogy experimentális szívelégtelenségben a repolarizációs rezerv beszűkül. A kooperációs partnereinkkel közösen

folytatott vizsgálatban 60 szívelégtelenségben (NYHA II-III) szenvedő dilatativ cardiomyopathiás betegek adatait elemeztük. 20 beteg secundaer prophylaxis céljából implantabilis cardioverter defibrillator kezelésben részesült. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy szívelégtelenségben a QT-szakasz időbeli variabilitása – a repolarizációs instabilitás jeleként – már változatlan QT_c-időtartam mellett is jelentősen (átlagosan 90%-kal)



megnövekedett. A QT-variabilitás fokozódása ebben a vizsgálatban nemcsak a szívelégtelenség NYHA stádiumával, hanem a dokumentált kamrai tachycardiák fellépésével is összefüggést mutatott. A kamrai tachycardiával szövődő esetekben (CHF/VT+) a variabilitás-növekedés 146% volt, míg az attól mentes esetekben (CHF/VT-) csupán 61%. A humán vizsgálatok arra utaltak, hogy QT-variabilitás elemzése alkalmas lehet a látens repolarizációs zavar és a fokozott kamrai tachycardia-kockázat kimutatására (OR: 1.52, 95% CI: 1.12-2.07, $p < 0.007$).

Tervezett közlemény:

Hinterseer M, Beckmann BM, Thomsen MB, Ulbrich M, **Lengyel Cs**, Schimpf R, Maier S, Pfeufer A, Varró A, Vos MA, Steinbeck G, Käb S: Electrical remodeling and proarrhythmia in human heart failure is associated with increased short-term variability of QT intervals. *J Am Coll Cardiol* (submitted)