

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**A ropinirol és a rosigitazon proarrhythmias hatásának vizsgálata kutya kamrai szívizomsejteken**

**Dr. Simkó József**

**Témavezetők: Dr. Lőrincz István és Dr. Nánási Péter**



**DEBRECENI EGYETEM  
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2013**

**A ropinirol és a rosiglitazon proarrhythmias hatásának vizsgálata kutya kamrai  
szívizomsejteken**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
egészségtudományok tudományágban

Írta: Dr. Simkó József

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája  
(Anyagcsere és endokrin betegségek programja) keretében

Témavezető: Dr. Lőrincz István, Ph.D.  
Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Endre, az MTA doktora  
tagok: Dr. Csanádi Zoltán, Ph.D.  
Dr. Gellér László, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2013. május 31.

Az értekezés bírálói:

Dr. Virág László, Ph.D.  
Dr. Barta Judit, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Endre, az MTA doktora  
tagok: Dr. Csanádi Zoltán, Ph.D.  
Dr. Gellér László, Ph.D.  
Dr. Virág László, Ph.D.  
Dr. Barta Judit, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013. május 31.

# BEVEZETÉS

## 1. Proarrhythmia syndromák

Évtizedek óta ismert, hogy az antiarrhythmias gyógyszeres kezelés súlyosbíthatja a kezelt ritmuszavart vagy újonnan fellépő arrhythmiaikat idézhet elő, amit a szakirodalom proarrhythmianak nevez. A proarrhythmia fogalma nem egységes, több jól elkülöníthető klinikai tünetcsoportot sorolhatunk ide, amelyek mind eltérő mechanizmussal alakulnak ki. A proarrhythmia syndromák közül a szerzett hosszú QT syndroma kiemelt jelentőségét az adja, hogy az I/A, III, ritkábban I/C típusú antiarrhythmias szereken túl számos nem kardiológiai indikációjú gyógyszernek (pl. antibiotikumok, antihisztaminok, pszichiatriai szerek, prokinetikumok stb.) derült fény erre a proarrhythmias hatására, mely néhány szer visszavonásához, számos készítmény fejlesztésének leállításához vezetett. A klinikai gyakorlatban is nap, mint nap szembe kell néznünk az antiarrhythmias és a nem antiarrhythmias gyógyszerek proarrhythmias hatásaival. A szerzett hosszú QT syndromát többnyire a késői  $K^+$ -áram gyors komponenséért ( $I_{Kr}$ ) felelős ioncsatornákra (HERG) gátló hatást kifejtő szerek okozzák. A repolarizáció elhúzóódása kedvez a befelé irányuló ionáramok reaktiválódásának, s ezáltal korai utódepolarizációk jöhetnek létre. Amennyiben ezek elérik a küszöbpotenciált, akkor kamrai extrasystolék, majd a repolarizáció jelentős dispersiója esetén reentry mechanizmussal torsades de pointes típusú kamrai tachycardia kialakulásához vezethetnek. A torsades de pointes típusú kamrai tachycardia spontán is megszűnhet, azonban ha elég hosszú ideig tart, syncopét vagy kamrafibriillatíóvá degenerálódva akár hirtelen szívhalált is okozhat.

Közismert, hogy az utóbbi három évtized alatt alapvetően megváltozott a szemléletünk az arrhythmiaik pathogenesisét, diagnosztikáját és kezelését illetően. A ritmuszavarokban szenvedő betegek nagy száma, az arrhythmiaik komoly tüneteket - és hirtelen szívhalált is - okozó hatása indokolja az intenzív kutatások végzését. A klinikai noninvazív diagnosztika és a legújabb sejtszintű és molekuláris szintű kísérleti kutatások eredményei egyaránt fontosak. Az elméleti és klinikai arrhythmia kutatás és a klinikai gyakorlat közötti összefüggést jelzi az a tény, hogy a kutatási eredmények igen rövid idő alatt a mindennapi klinikai gyakorlat integráns részévé válnak, s így mind a diagnosztikában, mind a terápiában alapvetően meghatározó jelentőségű szerepük van.

## **2. A Parkinson-kór és a ropinirol**

### **2.1. A Parkinson-kór okozta autonóm dysfunctio**

A Parkinson-kór elsősorban idős korban kialakuló, progresszív, degeneratív idegrendszeri betegség. A kórkép alapja a dopamin mennyiségének a csökkenése a nigrostriatalis pályarendszerben a substantia nigra sejtjeinek pusztulása miatt. A betegség az extrapyramidalis rendszer működészavarával jár, motoros alaptünetei közé tartozik a nyugalmi tremor, a hypokinesis, a rigor és a tartási instabilitás. Emellett az autonóm idegrendszer sympaticus és parasympaticus részének a működése is zavart szenved. A szív vegetatív beidegzése is károsodik, ami a baroreflex sensitivitas csökkenésében, a szívfrekvencia variabilitas változásában nyilvánul meg.

Bár Parkinson-kóros betegekben a finom EKG eltérések értékelése a nyugalmi tremor miatt esetenként igen nehézkes, a QT<sub>c</sub> intervallum megnyúlása egyértelműen igazolható, amit szintén a cardialis autonóm dysfunctiora vezetnek vissza. A repolarizáció gátlása bármilyen QT távolságot megnyújtó gyógyszeres kezeléssel tovább fokozhatja a betegek ritmuszavar illetve hirtelen szívhalál rizikóját.

### **2.2. A ropinirol általános jellemzése és cellularis elektrofiziológiai hatásai**

A ropinirol a Parkinson-kór kezelésére alkalmazott nem ergolinvázas dopamin agonista gyógyszer. A ropinirol szelektíven stimulálja a centrális és perifériás D<sub>2</sub> és D<sub>3</sub> receptorokat anélkül, hogy hatna a szerotonin receptorokra. A gyógyszer esetleges proarrhythmiás hatása akkor vetődött fel, amikor egy ropinirol kezelés alatt álló betegben ismételt tordsades de pointes típusú kamrai ritmuszavart észleltünk.

A ropinirol szívizomsejtekre gyakorolt elektrofiziológiai hatásáról eddig kevés adat állt rendelkezésre. A ropinirol alacsony koncentrációban (2,2-3,5 ng/ml, mely megfelel 7-12 nM-nak) megnyújtotta a QT<sub>c</sub> távolságot éber beagle kutyákban. Izolált kutya Purkinje rost preparátumokban azonban a szer magasabb koncentrációira (2,5 ill. 25 μM) volt szükség az akciós potenciál szignifikáns (41 ill. 106 ms) megnyúlásához. A ropinirol szívizomsejtek ionáramaira kifejtett hatásait feszültség-clamp analízissel még nem tanulmányozták. Az eddig közölt egyetlen vizsgálatban, melyhez CHO sejtvonalon expresszált HERG csatornákat használtak, a ropinirol 0,1-10 μM koncentrációban a HERG ionáramot gátolta 1,2 μM IC<sub>50</sub> értékkel.

### **3. A 2-es típusú cukorbetegség és a rosiglitazon**

#### **3.1. A 2-es típusú cukorbetegség**

A 2-es típusú cukorbetegség inzulinrezisztenciával, viszonylagos inzulinhiánnyal jellemezhető anyagcserezavar. Hazánkban kb. egy-másfél millió ember szenved felismert vagy fel nem ismert cukorbetegségben, a csökkent glukóztoleranciájú egyének száma pedig megközelítőleg még egyszer ugyanennyi. A 2-es típusú diabetes szív-érrendszeri betegség kialakulására 2-4-szer nagyobb rizikót jelent, és közel ugyanilyen a kockázat a diabetes kórmegelőző állapotaiban is. A szív-érrendszeri szövődmények közül a macroangiopathiás megbetegedések mellett magas a szív elektromos tulajdonságait és pumpafunkcióját egyaránt érintő diabeteses cardiomyopathia incidenciája is. A szívizom elektromos működésének a változásaiban a kamrai repolarizációt reprezentáló korrigált QT (QT<sub>c</sub>) távolság megnyúlása és a QT<sub>c</sub> diszperzió növekedése a legszembetűnőbb. Diabeteses patkányok izolált szívizomsejtjeit vizsgálva az akciós potenciálok szignifikáns megnyúlását és a K<sup>+</sup>-áramok csökkenését észlelték.

#### **3.2. A tiazolidindionok általános jellemzése**

A rosiglitazon egy tiazolidindion típusú orális vércukorszint csökkentő gyógyszer, mely mind diabeteses állatmodellekben, mind 2-es típusú cukorbeteg kezelésében hatékonyan bizonyult. A tiazolidindion típusú, inzulinérzékenységet fokozó szerekekkel elérhető a glycaemiás kontroll jelentős és hosszantartó javulása, mely  $\beta$ -sejt megőrző tulajdonságukkal lehet kapcsolatban. A tiazolidindionok nagy affinitással kötődnek egy magreceptorhoz, a nuclearis peroxisoma-proliferator-aktivált receptor  $\gamma$ -hoz (PPAR $\gamma$ ), mely a szénhidrát- és zsírszövetben szerepet játszó gének expresszióját szabályozza. A tiazolidindionok a zsírszövetben és a harántcsíkolt izomszövetben javítják az inzulinérzékenységet, a szívizomban a glukóztranszporterek expresszióját és hatékonyságát fokozzák, a szív glukóz metabolizmusát stimulálva. A vércukorszint csökkentésén túl mind a rosiglitazon, mind a pioglitazon kezelés során egyéb jótékony, kedvező szív-érrendszeri hatásokat is igazoltak.

A szénhidrát anyagcserére, lipid profilra, vérnyomásra, biomarkerekre gyakorolt kedvező hatásokat figyelembe véve tiazolidindion kezelés mellett a diabetes micro- és macrovascularis szövődményeinek csökkenésére lehetett számítani. Ezzel szemben több

nagy klinikai vizsgálat eredménye azt igazolta, hogy tiazolidindion kezelés összefüggésben állhat bizonyos cardiovascularis események: pl. súlygyarapodás, oedemaképződés, szívelégtelenség kialakulásával. A fentiek miatt az American Heart Association és az American Diabetes Association közös konszenzus nyilatkozatot adott ki, mely New York Heart Association (NYHA) I-II. stádiumú szívelégtelenség, tünetmentes bal kamra dysfunctio fennállásakor vagy a diabetes mellett legalább még egy szívelégtelenségre hajlamosító rizikófaktor jelenléte esetén alacsony tiazolidindion kezdő dózist és a folyadékretenció jeleinek monitorozása mellett óvatos dóziszemelést javasolt. A súlyosabb, NYHA III-IV. stádiumban a tiazolidindionok használatának teljes mellőzését ajánlották. További elemzések során a rosiglitazon esetében a myocardialis infarctus rizikójának növekedését is megfigyelték, emiatt az US Food and Drug Administration (FDA) 2010-ben jelentősen szigorította a rosiglitazon tartalmú készítmények forgalmazását, az Európai Gyógyszerügynökség pedig felfüggesztette a gyógyszer forgalomba hozatali engedélyét.

### **3.3. A tiazolidindionok cellularis elektrofiziológiai hatásai**

Lu és munkatársai kimutatták, hogy altatott disznókban a rosiglitazon mérsékli az ischaemia és a ATP-szenzitív  $K^+$ -csatorna nyitó levromakalim akciós potenciál rövidítő hatását. Ezen túlmenően a súlyos myocardialis ischaemia okozta kamrafibrillatio rosiglitazon adása esetén hamarabb következik be, ezt a hatást a ischaemiás állapotban protektív szerepet játszó cardialis ATP-szenzitív  $K^+$ -csatornák gátlására vezették vissza. Mindezidáig azonban nem vizsgálták a szer többi cardialis ionáramra gyakorolt hatását voltage clamp mérésekkel. A rosiglitazon számos ioncsatornát gátol az extracardialis szövetekben, de a szívizomsejtekre gyakorolt elektrofiziológiai hatásairól eddig nem voltak adataink. Egy másik tiazolidindion vegyületről, a troglitazonról viszont bebizonyosodott, hogy az L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák hatékony gátlószere tengerimalac és patkány kamrai szívizomsejtekben, nyúl kamraizomsejtekben pedig a  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  és  $K^+$ -áramokra is gátló hatást fejt ki.

# CÉLKITŰZÉSEK

## 1. A ropinirol cellularis elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata

A ropinirol elterjedt alkalmazása ellenére kevés adat áll rendelkezésünkre a gyógyszer sejtszintű elektrofiziológiai hatásairól. Klinikai gyakorlatunkban azonban felmerült annak a lehetősége, hogy intenzív osztályon kezelt betegünkben a ropinirol kezelés kapcsolatban állhatott a potenciálisan életveszélyes torsades de pointes típusú kamrai tachycardia jelentkezésével. Ezért indokoltnak tartottuk a gyógyszer cellularis elektrofiziológiai hatásainak részletes elemzését. Jelen munkánkban a ropinirol akciós potenciál morfológiára és a háttérben álló ionáramokra gyakorolt hatását tanulmányoztuk a koncentráció függvényében izolált kutya kamrai szívizomsejteken. Bár a megjelent közlemények a ropinirol terápiás plazmakoncentrációját 25-80 nM közöttinek adják meg, a vizsgált koncentrációt 300  $\mu$ M-ig terjesztettük ki, hogy a túladagolás és mérgezés esetén fellépő esetleges mellékhatásokat is megjeleníthessük. Kísérleteinket kutya szívizomsejteken végeztük, mert a transzmembrán ionáramok eloszlását és kinetikai tulajdonságait tekintve a humán kamrai myocardium legjobb modellje a kutya szívizomzat.

## 2. A rosiglitazon cellularis elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata

A rosiglitazon szénhidrát és lipid anyagcserére kifejtett hatásait széles körben vizsgálták, a gyógyszer cardialis elektrofiziológiai hatásai viszont kevésbé ismertek. Az extracardialis szövetek ioncsatornáin, valamint a cardialis ATP-szenzitív  $K^+$ -csatornákon azonban már igazolódott a gyógyszer gátló hatása, sőt ischaemiás állapotban az arrhythmogen hatását is bizonyították állatkísérletekben.

Nem tisztázott, hogy mi az oka a két hasonló glycaemiás kontrollt biztosító gyógyszer, a rosiglitazon és a pioglitazon cardiovascularis hatásai közötti különbségnek. Mivel felmerült, hogy ennek hátterében a rosiglitazon cardialis elektrofiziológiai hatásai állhatnak, vizsgálataink során elemeztük a rosiglitazon hatásait az akciós potenciál morfológiájára és a háttérben álló ionáramokra izolált kutya kamrai szívizomsejteken az alkalmazott koncentráció függvényében.

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## 1. Sejtizolálás

Vizsgálatainkhoz ivarérett, kutatási célra tenyésztett kutyák szívét használtuk (16 hím, 48 nőstény). Az állatokat  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ketamin hidroklorid (Calypsol, Richter) és  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  xylazin hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV, Hollandia) intravénás injekciójával altattuk el. A mellkas megnyitása után a szívét gyorsan kiemeltük, majd átmostuk normál Tyrode oldattal. Az enzimatikusan izolált szívizomsejteket a bal kamrából nyertük anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával. Kanüláltuk a bal elülső leszálló coronaria arteriát (LAD) és az ér ellátási területének megfelelően perfundáltuk a bal kamrai szívizomzatot Tyrode oldattal. A szövet teljes vértartalmának eltávolításáig folytattuk a preparátum perfúzióját, majd 5 percig  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes JMM oldatot (Joklik-féle Minimal Essential Medium, Sigma) alkalmaztunk. Ezután a szívét 30 percig  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  kollagenáz enzimet (Worthington CLS-II), 0,2% borjú szérum albumint és  $50 \mu\text{mol}$   $\text{CaCl}_2$ -ot tartalmazó Joklik oldattal emésztettük. A szövet elfolyósodása után a bal kamrának főleg a midmyocardialis régiójából vett mintákat kis darabokra vágtuk, majd a sejteket a szövetdarabokból finom rázással kiszabadítottuk. Végül a mintákat fokozatosan  $2,5 \text{ mM}$ -ig emelkedő  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú JMM oldatban mostuk. Az így nyert izolált bal kamrai sejteket MEM (Minimal Essential Medium, Sigma) tápoldatban tároltuk felhasználásig  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ -on.

## 2. Akciós potenciálok elvezetése izolált szívizomsejtekről

Minden elektrofiziológiai vizsgálatot  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten végeztünk. A szívizomsejt szuszpenzióból 2-3 cseppet invertáló mikroszkóp tárgyasztalára rögzített  $1 \text{ ml}$  térfogatú plexiüveg mérőkádba helyeztünk. A mérőkád aljára kitapadt, pálcika alakú és tiszta harántcsíkolatot mutató sejteket folyamatosan  $37^\circ\text{C}$  hőmérsékletű normál Tyrode oldattal perfundáltuk. A transzmembrán potenciálokat  $3 \text{ M}$  KCl oldattal töltött,  $20\text{-}40 \text{ M}\Omega$  ellenállású boroszilikát mikroelektrodákkal regisztráltuk. A mérés során nyert jeleket Axoclamp-2B erősítő készülékkel (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) erősítettük. A mérés során a sejteket a mérőelektrodon keresztül folyamatosan  $1 \text{ s}$  ciklushossz mellett  $1 \text{ ms}$  időtartamú négyszögimpulzusokkal ingereltük, melyek

amplitúdóját az ingerküszöb 120%-ára állítottuk. A ropinirol kumulatív koncentrációfüggő hatásait a gyógyszer koncentrációját fokozatosan, 0,1  $\mu\text{M}$ -tól 300  $\mu\text{M}$ -ig emelve határoztuk meg. A rosiglitazon hatásait a gyógyszer koncentrációját fokozatosan 1  $\mu\text{M}$ -tól 100  $\mu\text{M}$ -ig emelve vizsgáltuk. A gyógyszerek mindegyik koncentrációjával 3 percig perfundáltuk a sejteket, majd 10 percig tartó kimosási szakasz következett. Az inkubációs és kimosási periódusok alatt steady-state gyógyszerhatás ill. annak teljes megszűnése következett be. Az adatokat analóg-digitális átalakítás után (Digidata 1200 A/D kártya, Axon Instruments Inc.) a későbbi elemzéshez számítógépen tároltuk.

### **3. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával**

A sejteket 37°C-on, normál Tyrode oldattal perfundáltuk. A mérésekhez 2 M $\Omega$  ellenállású, boroszilikát üvegből készült mikroelektrodákat használtunk, a pipetták feltöltésére használt belső oldat összetételét a mérni kívánt ionáramtól függően választottuk meg. A káliumáramok mérésekor az oldat összetétele (mM-ban megadva) a következő volt: 100 K-aszpartát, 45 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 10 EGTA, 3 K-ATP, pH=7,2. A kalciumáramok mérése során 110 KCl, 40 KOH, 10 HEPES, 10 EGTA, 20 TEACl, 3 K-ATP, pH=7,2 összetételű belső oldatot használtunk.

Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében, feszültség-clamp körülmények között mértük. Miután óvatos szívással nagy ellenállású (1-10 G $\Omega$ ) kapcsolatot hoztunk létre a pipetta és a mérni kívánt sejt membránja között, a szívóerőt tovább növelve vagy 1,5 V-os feszültségimpulzusokat alkalmazva a pipetta és a sejt közötti membránszakaszt teljesen átszakítottuk. A mérési elrendezés teljes soros ellenállása 4-8 M $\Omega$ -nak adódott, melyet 50-80%-ban kompenzáltunk. Azokat a méréseket, melyeknél a soros ellenállás ennél nagyobb volt vagy a mérés során jelentősen növekedett, kihagytuk az értékelésből. Az elvezetett áramjeleket Axopatch-2B készülékkel erősítettük, analóg-digitális átalakítás (Digidata 1200 A/D kártya, Axon Instruments Inc.) után pClamp 6.0 (Axon Instruments Inc.) szoftverrel számítógépen rögzítettük, majd elemeztük. A sejtek kapacitását minden kísérlet előtt -10 mV-ról -20 mV-ra történő hiperpolarizáló impulzusok segítségével meghatároztuk, és az ionáramokat az így kapott membránkapacitásra vonatkoztattuk. A ropinirol és a rosiglitazon hatásait a koncentráció függvényében kumulatív módszerrel határoztuk meg a gyógyszerek 1 és 300  $\mu\text{M}$  között növekvő koncentrációit alkalmazva.

#### **4. Akciós potenciál clamp**

A patch clamp technika teljes-sejtes konfigurációját használva, az akciós potenciálokat áram-clamp üzemmódban rögzítettük a normál Tyrode oldattal perfundált sejtekről. A pipetta belső oldatának összetétele megegyezett a káliumáramok méréséhez feszültség-clamp körülmények között használt belső oldat összetételével. A sejteket a mérőelektródon keresztül folyamatosan 1 Hz frekvenciájú 1 ms széles küszöb feletti négyszögjellel ingereltük. Minden sejtről 10 egymást követő akciós potenciált regisztráltunk, majd ezeket on-line analizáltuk. Ezen akciós potenciálok egyikét - amelynél a repolarizáció 90 %-ánál mért akciós potenciál időtartam ( $APD_{90}$ ) érték legkevésbé tért el a 10 akciós potenciál átlagától - használtuk ugyanazon a sejten és azonos ingerlési frekvenciával parancsjelként, immár feszültség-clamp üzemmódban. Az ilyen körülmények között nyert áramjel - a kezdeti nagyon rövid kapacitív tranziens kivételével - a nulla szintben futó vízszintes vonal. A ropinirolt 10 és 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban, a rosiglitazont 1, 10 és 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban alkalmaztuk. A gyógyszer által gátolt ionáramok profilját úgy kaptuk meg, hogy a gyógyszerhatás előtti görbéből kivontuk a gyógyszerhatás utáni görbét. Ez a művelet összetett áramprofilokat eredményezett három jól elkülöníthető áramcsúccsal: egy korai kifelé irányuló áram a tranziens kifelé irányuló káliumáramnak ( $I_{\text{to}}$ ) felelt meg, egy befelé irányuló csúcs az L-típusú kalciumáramnak ( $I_{\text{Ca}}$ ) és egy késői kifelé irányuló áram a késői káliumáram gyors komponensének ( $I_{\text{Kr}}$ ).

#### **5. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis**

Az eredményeket a mérési adatok számtani középértékeit  $\pm$  a középérték körüli standard hibát (SE) megadva közlöm. A különbségek statisztikai értékelésekor egyváltozós varianciaanalízist, majd Student-féle egymintás t-próbát alkalmaztam. Az eltéréseket  $P < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak. Minden elvégzett vizsgálat összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publication No 85–23, revised 1996) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyta.

# EREDMÉNYEK

## 1. A ropinirol vizsgálata során nyert eredmények

### 1.1. A ropinirol hatása a kutya szívműködés akciós potenciáljára

A ropinirol komplex, koncentráció-függő változásokat idézett elő az 1 Hz frekvenciával ingerelt kutya kamrai szívműködés akciós potenciáljának alakjában. A szer koncentrációtól függően nyújtotta vagy rövidítette az akciós potenciál időtartamát (APD), csökkentette az akciós potenciál korai repolarizációs fázisát és a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ), továbbá a plató fázis depresszióját idézte elő. Az akciós potenciál időtartamára a ropinirol bifázisos hatást fejtett ki. Mikromoláris koncentrációk jelenlétében az akciós potenciál megnyúlását észleltük. Az APD<sub>90</sub> megnyúlása 1  $\mu$ M koncentrációtól, míg az APD<sub>50</sub> megnyúlása 3  $\mu$ M koncentrációtól volt szignifikáns. A koncentráció 300  $\mu$ M-ra emelése viszont az APD<sub>50</sub> rövidülésével járt. A korai repolarizáció amplitúdójának csökkenése 10  $\mu$ M koncentrációtól, míg a  $V_{max}$  csökkenése és a plató fázis depressziója 30  $\mu$ M koncentrációtól volt szignifikáns. A ropinirol hatásai 10 perces Tyrode oldattal történő kimosás után visszafordíthatónak bizonyultak. A  $V_{max}$  és az APD ropinirol-indukálta változásai frekvenciafüggőek voltak. A  $V_{max}$  csökkenése gyors ingerlésnél, a ciklushossz 1 s alá csökkentésekor volt a legfelfűzőbb. Ezzel szemben az APD megnyúlása (30  $\mu$ M koncentrációnál) és az APD rövidülése (300  $\mu$ M koncentrációnál) is hosszabb ciklushosszaknál volt kifejezettebb, tehát fordított frekvenciafüggés volt kimutatható („reverse rate dependent” hatás).

### 1.2. A ropinirol hatása kutya izolált szívműködésjének ionáramaira

A ropinirol ionáramokra gyakorolt hatásait feszültség-clamp körülmények között vizsgáltuk a koncentráció függvényében, a koncentrációt 0,1  $\mu$ M és 300  $\mu$ M között fél dekadonként növelve.

A késői káliumáram gyors komponensét ( $I_{Kr}$ ) -40 mV tartófeszültségről +50 mV-ra történő 1 s hosszú depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. A membránpotenciál értéket ezután ismét -40 mV-ra állítottuk, az  $I_{Kr}$  áramot az ekkor kialakuló farokáram amplitúdójával jellemeztük. Az L-típusú kalciumcsatornát 5  $\mu$ M nifedipinnel, a késői

káliumáram lassú komponensét ( $I_{Ks}$ ) 1  $\mu$ M HMR-1556 hozzáadásával gátoltuk. Az  $I_{Kr}$  farokáramok amplitúdóját a ropinirol emelkedő koncentrációi egyre nagyobb mértékben csökkentették. Az  $IC_{50}$  érték  $2,7 \pm 0,25$   $\mu$ M-nak adódott, a Hill-koefficiens  $0,92 \pm 0,09$  volt 5 szívizomsejt átlagában. Az  $I_{Kr}$  aktivációjának feszültségfüggése a negatívabb potenciálok felé tolódott 3  $\mu$ M ropinirol jelenlétében: a félaktivációs feszültség ( $V_{0,5}$ )  $-14,4 \pm 1,8$  mV-ról  $-21,3 \pm 1,1$  mV-ra változott ( $P < 0,05$ ). Az aktiváció eltolódása miatt a gátlás fokozódott a pozitívabb potenciálokra történő depolarizációk során: kis mértékű volt -20 mV membránpotenciál esetén, míg a +10 mV-nál pozitívabb membránpotenciálok mellett a kontroll áram amplitúdó feléhez közeli értéket adott. A ropinirol felgyorsította az  $I_{Kr}$  aktivációját. Az aktivációs időállandó  $34 \pm 4$  ms-ról  $14 \pm 1$  ms-ra csökkent 3  $\mu$ M ropinirol jelenlétében ( $P < 0,05$ ). Eredményeink szerint a ropinirol okozta  $I_{Kr}$  gátlás az aktiváció gyorsulása ellenére alakult ki. A ropinirol 3  $\mu$ M koncentrációban nem változtatta meg a lassú és gyors deaktivációs időállandókat.

A tranziens kifelé irányuló káliumáramot ( $I_{to}$ ) 200 ms hosszú, -80 mV-ról kiinduló +50 mV-ra történő depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Minden egyes ingerlő impulzus előtt egy 5 ms hosszú -40 mV-ra történő előimpulzust alkalmaztunk a feszültségfüggő  $Na^+$ -csatornák inaktiválása céljából. Az L-típusú kalciumcsatornát 5  $\mu$ M nifedipinnel, a késői káliumáram gyors komponensét ( $I_{Kr}$ ) 1  $\mu$ M E4031 hozzáadásával gátoltuk. A ropinirol gátló hatása 10  $\mu$ M koncentrációtól volt statisztikailag szignifikáns.

Az L-típusú kalciumáramot ( $I_{Ca}$ ) -40 mV tartófeszültségről +5 mV-ra történő 400 ms hosszú depolarizációval váltottuk ki. Ezeknél a méréseknél a káliumáramokat a Tyrode oldathoz adott 3 mM 4-aminopyridin, 1  $\mu$ M E4031 és 1  $\mu$ M HMR-1556 hozzáadásával gátoltuk. A ropinirol koncentrációfüggő módon csökkentette az  $I_{Ca}$  amplitúdóját, hatása 30  $\mu$ M koncentrációtól volt statisztikailag szignifikáns.

A késői káliumáram lassú komponensét ( $I_{Ks}$ ) -40 mV tartófeszültségről +50 mV-ra történő 3 s hosszú depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Az L-típusú kalciumcsatornát 5  $\mu$ M nifedipinnel, a késői káliumáram gyors komponensét ( $I_{Kr}$ ) 1  $\mu$ M E4031 hozzáadásával gátoltuk. A befelé egyenirányító káliumáramot ( $I_{K1}$ ) -40 mV-ról -135 mV-ra történő hiperpolarizáció alkalmazásával tanulmányoztuk. A steady-state áramot 400 ms-mal az impulzus kezdete után határoztuk meg. A ropinirol sem az  $I_{Ks}$ , sem az  $I_{K1}$  áramot nem gátolta 300  $\mu$ M-nál kisebb koncentrációban.

### **1.3. A ropinirol hatásai az ionáramokra akciós potenciál clamp körülmények között**

A korai kifelé irányuló áramcsúcs (felfelé irányuló kitérés) az  $I_{to}$  gátlásakor jelenik meg, míg a befelé irányuló áramcsúcs (lefelé irányuló kitérés) az  $I_{Ca}$  blokádjának felel meg. A késői kifelé irányuló áramcsúcs, mely a kutya szívizomsejt akciós potenciáljának terminális repolarizációs fázisával esik egybe, az  $I_{Kr}$  és  $I_{Kl}$  gátlását egyaránt tükrözheti. Esetünkben ez tisztán  $I_{Kr}$  gátlásnak felel meg, mivel - mint azt előzőleg kimutattuk - a ropinirol 100  $\mu$ M koncentrációban sem gátolta az  $I_{Kl}$  áramot. A ropinirol mind az  $I_{Kr}$ , mind az  $I_{to}$  áramot gátolta 10  $\mu$ M koncentrációban, míg az  $I_{Ca}$  blokád 100  $\mu$ M koncentrációnál volt észlelhető. Az akciós potenciál clamp üzemmódban kapott eredmények tehát egybevágtak a feszültség-clamp körülmények között végzett mérések adataival. A ropinirol hatásai kimosás után teljesen reverzibilisnek bizonyultak.

## **2. A rosiglitazon vizsgálata során nyert eredmények**

### **2.1. A rosiglitazon hatása az akciós potenciál alakjára**

A rosiglitazon komplex, koncentrációfüggő változásokat idézett elő az 1 Hz frekvenciával ingerelt kutya kamrai szívizomsejtek (négy kutyából származó nyolc sejt) akciós potenciáljának morfológiájában. A szer csökkentette az akciós potenciál korai repolarizációs fázisának amplitúdóját, a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ) és hatására a plató fázis depressziója is észlelhető volt. A rosiglitazon ezen hatásai 10  $\mu$ M koncentrációtól voltak szignifikánsak. Az akciós potenciál időtartama kis mértékben változott, bár 30  $\mu$ M koncentrációnál az  $APD_{50}$  értékek szignifikáns rövidülését, míg 100  $\mu$ M koncentrációnál az  $APD_{90}$  megnyúlását tapasztaltuk. A  $V_{max}$  csökkenése ellenére az akciós potenciál amplitúdója (APA) nem csökkent, sőt 100  $\mu$ M rosiglitazon jelenlétében szignifikánsan növekedett. A rosiglitazon hatásai gyorsan, 2-3 perc alatt kialakultak és 10 perces Tyrode oldattal történő kimosás után visszafordíthatónak bizonyultak.

A Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetével történő együttműködésünk keretein belül lehetőségünk nyílt patkány, valamint vad típusú és hisztidin-dekarboxiláz hiányos (HDC-KO), csökkent glükóztoleranciájú egér papilláris izomból származó szívizomsejtek vizsgálatára is. A rágcsáló mintákon végzett mérések adatait a kutya szívizomsejteken nyert eredményekkel együtt mutatom be. A rosiglitazon

komplex, nem minden esetben egybevágó elektrofiziológiai hatásokat fejtett ki a kis rágszálók papilláris szívizomsejtjein és a kutya kamrai izomsejteken.

Patkányokban a rosiglitazon az APA koncentrációfüggő csökkenését idézte elő, ezzel szemben mind a vad típusú, mind a HDC-KO egereknél az APA növekedését tapasztaltuk. A vad típusú egereknél a rosiglitazon koncentrációfüggő módon, szignifikánsan csökkentette a nátriumáram indirekt jelzőjeként értékelhető  $V_{max}$  értéket, ez a változás HDC-KO egereknél nem volt észlelhető. A rosiglitazon patkány papillaris szívizomsejteken a  $V_{max}$  értékek szignifikáns, koncentrációfüggő csökkenését okozta, ezek az eredmények egybevágóak a Kavak és mtsai által közölt adatokkal. Az akciós potenciál időtartama, főként a terminális repolarizáció fázisa úgyszintén változott: az  $APD_{90}$  patkányban megnyúlt, míg egérben koncentrációfüggő módon rövidült.

## **2.2. A rosiglitazon hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek ionáramaira**

A rosiglitazon ionáramokra gyakorolt hatásait feszültség-clamp körülmények között vizsgáltuk az alkalmazott koncentráció függvényében, amit 1  $\mu\text{M}$ -tól 300  $\mu\text{M}$ -ig féldekádonként növeltünk. Az áramok kinetikai tulajdonságaira gyakorolt hatásokat a félhatásos koncentrációk közelében teszteltük.

A tranziens kifelé irányuló káliumáramot ( $I_{to}$ ) 200 ms hosszú, -80 mV-ról kiinduló +50 mV-ra történő depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Minden egyes ingerlő impulzus előtt egy 5 ms hosszú -40 mV-ra történő előimpulzust alkalmaztunk a feszültségfüggő  $\text{Na}^+$ -csatornák inaktiválása céljából. Az L-típusú kalciumcsatornát 5  $\mu\text{M}$  nifedipinnel, a késői káliumáram gyors komponensét 1  $\mu\text{M}$  E4031 hozzáadásával gátoltuk. A rosiglitazon koncentrációfüggő módon csökkentette az  $I_{to}$  amplitúdóját a vizsgált 5 szívizomsejten. A rosiglitazon hatása 10  $\mu\text{M}$  koncentrációtól volt statisztikailag szignifikáns, az  $EC_{50}$  érték  $25,2 \pm 2,7$   $\mu\text{M}$ -nak adódott, a Hill-koefficiens  $1,27 \pm 0,19$  volt. A rosiglitazon hatása gyorsan, 2-3 perc alatt, kialakult és teljes mértékben kimosható volt. A rosiglitazon megváltoztatta az  $I_{to}$  kapuzási tulajdonságait. Az áram egy gyorsabb és egy lassabb komponens összegeként inaktiválódott, mindkét komponens amplitúdója szignifikánsan csökkent 30  $\mu\text{M}$  rosiglitazon jelenlétében. A gyors időállandó nem változott, míg a lassú időállandó rosiglitazon hatására megduplázódott. Az  $I_{to}$  aktiválásához rosiglitazon jelenlétében nagyobb depolarizációra volt szükség és az aktivációs küszöb -20 mV-ról +20 mV-ra tolódott, míg az inaktiváció feszültségfüggésében nem volt szignifikáns változás.

A késői káliumáram gyors komponensét ( $I_{Kr}$ ) -40 mV tartófeszültségről +50 mV-ra történő 1 s hosszú depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. A membránpotenciál értéket ezután ismét -40 mV-ra állítottuk, az ekkor kialakuló farokáramot tekintettük  $I_{Kr}$ -nek. Az L-típusú kalciumcsatornát 5  $\mu$ M nifedipinnel, a késői káliumáram lassú komponensét ( $I_{Ks}$ ) 1  $\mu$ M HMR-1556 hozzáadásával gátoltuk. Az  $I_{Kr}$  farokáramok amplitúdóját a rosiglitazon emelkedő koncentrációi egyre nagyobb mértékben csökkentették. Az 5 szívizomsejten végzett mérések átlagából számított  $EC_{50}$  érték  $72,3 \pm 9,3$   $\mu$ M-nak adódott, a Hill-koefficiens  $0,91 \pm 0,1$  volt. Hasonlóan az  $I_{to}$ -nál tapasztalt változásokhoz, a rosiglitazon  $I_{Kr}$ -re irányuló gátló hatása is gyorsan kialakult és teljes mértékben reverzibilis volt. Az  $I_{Kr}$  farokáramok deaktivációja biexponenciális kinetikát követett. Bár mindkét komponens időállandója csökkent, ez a változás nem volt statisztikailag szignifikáns ( $P > 0,05$ ). Ezzel szemben mindkét komponens amplitúdója szignifikánsan csökkent 100  $\mu$ M rosiglitazon hatására. Az  $I_{Kr}$  aktivációjának feszültségfüggése mérsékelten a negatívabb potenciálok felé tolódott 100  $\mu$ M rosiglitazon jelenlétében: a félaktivációs feszültség ( $V_{0,5}$ )  $-4,8 \pm 3,2$  mV-ról  $-10,2 \pm 1,3$  mV-ra változott ( $n = 5$ ,  $P < 0,05$ ). Az aktiváció eltolódása miatt, a gátlás látszólag fokozódott pozitívabb potenciálokra történő depolarizációnál: -5 mV-nál negatívabb membránpotenciál esetén elhanyagolható volt, míg +10 mV-nál pozitívabb membránpotenciál mellett a kontroll áram amplitúdójának feléhez közeli értéket adott. Az  $I_{Kr}$  aktivációjának monoexponenciális időállandója nem változott 100  $\mu$ M rosiglitazon jelenlétében.

Az L-típusú kalciumáramot ( $I_{Ca}$ ) -40 mV tartófeszültségről +5 mV-ra történő 400 ms hosszú depolarizációval váltottuk ki. Ezeknél a méréseknél a káliumáramokat a Tyrode oldathoz adott 3 mM 4-aminopiridin, 1  $\mu$ M E4031 és 1  $\mu$ M HMR-1556 hozzáadásával gátoltuk. A rosiglitazon koncentrációfüggő módon csökkentette az  $I_{Ca}$  amplitúdóját, hatása 10  $\mu$ M koncentrációtól volt statisztikailag szignifikáns. A kumulatív dózis-hatás görbe Hill-egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció  $82,5 \pm 9,4$   $\mu$ M-nak adódott, a Hill-koefficiens  $0,82 \pm 0,08$  volt a 6 szívizomsejten mért eredmények átlagából számítva. Az  $I_{Ca}$  gátlása csak részben volt visszafordítható a 10 perces kimosási periódust követően. A rosiglitazon kissé megváltoztatta az  $I_{Ca}$  kapuzási tulajdonságait is. A kalciumáram két exponenciális komponens összegeként inaktíválódott, az időállandókban szignifikáns változás nem volt tapasztalható. Bár 100  $\mu$ M hatására mind a gyors, mind a lassú komponens amplitúdója csökkent, a lassú komponens csökkenése kifejezettebb volt. A rosiglitazon nem változtatta meg az  $I_{Ca}$  áram-feszültség karakterisztikáját, ezzel szemben 100  $\mu$ M rosiglitazon serkentette a steady-state inaktívációt. A félinaktívációs feszültség

( $V_{0,5}$ ) szignifikáns mértékben a negatívabb potenciálok irányába tolódott el ( $-12,9 \pm 0,3$  mV-ról  $-15,5 \pm 0,3$  mV-ra,  $P < 0,05$ ,  $n = 5$ ).

A befelé egyenirányító káliumáramot ( $I_{K1}$ )  $-40$  mV-ról  $-135$  mV-ra történő hiperpolarizáció alkalmazásával tanulmányoztuk. A steady-state áramot  $400$  ms-mal az impulzus kezdete után határoztuk meg. A rosiglitazon  $100 \mu\text{M}$  koncentráció mellett az  $I_{K1}$  áramot szignifikánsan nem változtatta meg a tanulmányozott  $4$  sejtben. Magasabb ( $300 \mu\text{M}$ ) koncentrációnál  $I_{K1}$  kis mértékű reverzibilis gátlása volt megfigyelhető.

### **2.3. A rosiglitazon hatásai az ionáramokra akciós potenciál clamp körülmények között**

Az ionáramok profilja akciós potenciál clamp üzemmódban vizsgálva jelentősen eltér a konvencionális feszültség-clamp körülmények között észlelt profiltól. Az akciós potenciál clamp technika előnye, hogy bármely vizsgált gyógyszer nettó membrán áramra gyakorolt hatása vizsgálható, ezáltal egyszerre több ionáramra gyakorolt hatás monitorozása lehetséges. Emellett ez a technika lehetővé teszi, hogy a tényleges áram profilokat regisztráljuk egy konkrét akciós potenciál lezajlása során. Ha egy szer több ionáramra is hatással van, mint ahogy az a rosiglitazon esetében ez elmondható, akkor az áramgörbén több csúcs is detektálható, melyek mindegyike egy-egy ionáram ujjlenyomatának felel meg. Ennek megfelelően a korai kifelé irányuló áramcsúcs az  $I_{to}$  gátlásakor jelenik meg, míg a befelé irányuló áramtranzienst az  $I_{Ca}$  blokádjának a következménye.

A késői kifelé irányuló áramcsúcs, mely a kutya szívműködés akciós potenciáljának terminális repolarizációs fázisával esik egybe, az  $I_{Kr}$  és  $I_{K1}$  gátlását egyaránt tükrözi. Esetünkben azonban tisztán  $I_{Kr}$  gátlásnak felel meg, mivel - mint azt előzőleg kimutattuk - az  $I_{K1}$  áramot nem gátolta  $100 \mu\text{M}$  koncentrációjú rosiglitazon. A rosiglitazon koncentrációfüggő és reverzibilis módon gátolta az  $I_{to}$ ,  $I_{Ca}$  és  $I_{Kr}$  áramokat akciós potenciál clamp körülmények között, az eredmények tehát egybevágóak a hagyományos feszültség-clamp mérések során kapott adatokkal.

# MEGBESZÉLÉS

## 1. A ropinirol vizsgálata során nyert eredmények megbeszélése

### 1. 1. A ropinirol akciós potenciál morfológiára gyakorolt hatása a feszültség-clamp adatok tükrében

Vizsgálatunkban elsőként elemeztük a ropinirol hatásait a cardialis ionáramokra. Eredményeink szerint a ropinirol számos ionáramot gátol koncentrációfüggő módon, ez együtt jár az akciós potenciál morfológiájának a változásával. Az akciós potenciál konfigurációváltozásai a különböző ionáramok gátlásából levezethetők. A ropinirol mikromoláris koncentrációi például  $I_{Kr}$  gátló hatást fejtettek ki és ennek következtében megnyúlt az akciós potenciálok időtartama. Az  $APD_{90}$  megnyúlása 1  $\mu\text{M}$  koncentrációjú ropinirol mellett már szignifikáns volt, ez összhangban van az  $I_{Kr}$  blokádra kapott 2,7  $\mu\text{M}$   $IC_{50}$  értékkel. A ropinirol  $I_{Kr}$  gátló hatásának hátterében nem állhat a csatorna kapuzásának változása, hiszen az aktiváció megfigyelt felgyorsulása inkább növelné, nem pedig csökkentené az ionáramot. Az ioncsatorna gátlása feszültségfüggő volt, mivel a depolarizáció fokozódásakor a blokádnak mértéke növekedett. Ez feltehetően a csatorna és a ropinirol közötti "use-dependens" kölcsönhatás eredménye. A Hill-koefficiensek közel egységnyi értéke azt sugallja, hogy a ropinirol okozta gátlás minden esetben egy-egy specifikus kötőhelyhez történő kapcsolódás eredményeként értékelhető. Magasabb koncentrációnál egyéb ionáramok, mint az  $I_{to}$  és  $I_{Ca}$  gátlása is kimutatható volt. A tranziens kifelé irányuló káliumáram gátlása 10  $\mu\text{M}$  koncentrációtól volt szignifikáns, a korai repolarizáció amplitúdójának csökkenését okozva. Az L-típusú kalciumáram gátlása 30  $\mu\text{M}$  koncentrációtól volt szignifikáns, ami a plató potenciál depressziójához vezetett. Az  $APD_{50}$  igen magas koncentrációnál (300  $\mu\text{M}$ ) tapasztalt rövidülése is a kalciumcsatorna blokáddal lehetett összefüggésben. A  $V_{max}$  csökkenése, mely 30  $\mu\text{M}$  koncentrációtól volt észlelhető, az  $I_{Na}$  gátlásra vezethető vissza, mivel a  $V_{max}$  a nátriumáram intenzitásának jó indikátora. A  $V_{max}$  gátlás frekvenciafüggő komponense gyors kinetikával jellemezhető, mivel a ciklushossz 1 s alá csökkentése esetén a gátlás mértéke jelentősen nőtt. Ez azt jelzi, hogy a ropinirolnak a  $\text{Na}^+$ -csatornáról történő leválási időállandója 1 s-nál rövidebb.

## 1.2. Klinikai vonatkozások

A ropinirol cardiovascularis mellékhatások tekintetében viszonylag biztonságos szernek tekinthető. A vizsgálataink során statisztikailag szignifikáns változásokat kiváltó legalacsonyabb koncentráció is jóval magasabb, mint a betegeknél vagy *in vivo* állatkísérletekben mért plazma csúcskoncentrációk. A napi 24 mg ropinirolt szedő betegekben mért plazma csúcskoncentráció 20-24 ng/ml, mely 65-80 nM-nak felel meg. Egyszeri 12 mg dózis bevitelét követően 33 ng/ml (110 nM) plazma csúcskoncentrációt mértek egészséges önkéntesekben. A ropinirol 40%-os fehérjekötődését is figyelembe véve nem valószínű, hogy a gyógyszer egészséges egyének szívműködésének elektrofiziológiai tulajdonságait befolyásolja, bár esetismertetésben már beszámoltak ropinirol kezelés kapcsán kialakult sinus csomó dysfunctióról.

A ropinirol szándékos vagy véletlenszerű túladagolása mellett a plazmakoncentráció elérheti a kritikus mikromoláris tartományt, amely a repolarizáció gátlása révén torsades de pointes típusú kamrai ritmuszavarok fokozott rizikójával járhat. A veleszületett vagy szerzett hosszú QT syndromás betegek számára pedig a ropinirol az előírás szerinti adagban is veszélyes lehet. A klinikai gyakorlatban magunk is ismételt torsades de pointes típusú kamrai tachycardia epizódokat észleltünk egy ropinirol kezelés alatt álló betegben. Összességében megállapíthatjuk, hogy eredményeink szerint a ropinirol elektrofiziológiai szempontból viszonylag biztonságos szernek tekinthető. Ennek ellenére strukturális vagy elektromos szívbetegség fennállása esetén alkalmazása rendszeres EKG ellenőrzés mellett javasolható, repolarizációt gátló gyógyszerekkel történő együttadása pedig lehetőleg kerülendő vagy csak szoros ellenőrzés mellett javasolt.

## 2. A rosiglitazon vizsgálata során nyert eredmények megbeszélése

### 2.1. A rosiglitazon akciós potenciál morfológiára gyakorolt hatása a feszültség-clamp adatok tükrében

Eredményeink szerint a rosiglitazon számos ionáramot koncentrációfüggően gátolt és ez az akciós potenciál alakváltozásaival járt együtt. Például a kutya szívműködésének vizsgálata során észlelt korai repolarizáció csökkenés az  $I_{to}$  gátlásával magyarázható. Hasonlóképpen a plató fázis csökkenése a  $Ca^{2+}$  és  $Na^{+}$ -áramok gátlására vezethető vissza, míg a  $V_{max}$  depresszióját az  $I_{Na}$  gátlás indikátorának tekinthetjük. Annak ellenére, hogy a

rosiglitazon számos ioncsatorna működésére hatással van, az akciós potenciál időtartamát jelentős mértékben nem befolyásolta (kivéve egy mérsékelt APD<sub>50</sub> csökkenést 30 µM és egy APD<sub>90</sub> megnyúlást 100 µM koncentrációnál). Ez annak a következménye, hogy a gyógyszer a plató fázis során szimultán gátolja a befelé irányuló (window I<sub>Na</sub> és I<sub>Ca</sub>) és kifelé irányuló (I<sub>Kr</sub> és I<sub>to</sub>) ionáramokat. A V<sub>max</sub> csökkenése rendszerint együtt jár az APA csökkenésével, ezt a jelenséget azonban nem észleltük a kutya szívműködés vizsgálatakor. Ezzel ellentétben, 100 µM rosiglitazon jelenlétében az APA szignifikáns mértékben növekedett. Ez az I<sub>Na</sub> és az I<sub>to</sub> szimultán blokádjának köszönhető, melyek közül az I<sub>Na</sub> blokádnak az APA csökkentése, az I<sub>to</sub> gátlás pedig az APA növekedése irányában hatott. Végül említést érdemel, hogy a rosiglitazone nem változtatta meg a sejtek nyugalmi potenciálját, ami teljes összhangban van a szer az I<sub>K1</sub> áramra irányuló viszonylagos hatástalanságával (100 µM-nál nem nagyobb koncentrációk esetén).

## **2.2. A rosiglitazon és a troglitazon cellularis elektrofiziológiai hatásainak összehasonlítása**

Eredményeink alapján összehasonlíthatóak a rosiglitazon és a troglitazon cellularis elektrofiziológiai hatásai. A troglitazon az I<sub>Ca</sub> áramot patkány, nyúl és tengerimalac szívműködésében 10 µM-hoz közeli IC<sub>50</sub> koncentrációval gátolta. Ez jelentősen alacsonyabb, mint a kutya szívműködésében végzett vizsgálataink során a rosiglitazon 92 µM félgátló koncentrációja. A troglitazon az I<sub>Na</sub> áramot is jóval erősebben gátolja, mint a rosiglitazon. Vizsgálatainkban 100 µM rosiglitazon a V<sub>max</sub> kevesebb, mint 50 %-os csökkenését idézte elő. Ezzel szemben 1 µM troglitazone 50%-os V<sub>max</sub> csökkenést, 10 µM troglitazon pedig az akciós potenciálok teljes eltűnését eredményezte nyúl kamrai szívműködésében. A rosiglitazon és a troglitazon gátló hatása tehát legalább egy nagyságrenddel különbözik.

## **2.3. A rosiglitazon hatása az akciós potenciál alakjára különböző állatfajokban**

A rosiglitazon hatásai az APD<sub>90</sub> és APA értékekre a különböző állatfajoknál jelentősen eltérőek. Ennek a különbségnek az okát az akciós potenciál morfológia, valamint a patkány, egér és kutya szívműködésében K<sup>+</sup>-áramainak kinetikai tulajdonságai közötti eltérésekben kell keresnünk (intenzív I<sub>to</sub>, plató fázis hiánya patkányban és egérben). A HDC-KO egereknél tapasztalt különbségnek pedig az lehet az oka, hogy ez az egértörzs

fogékonyabb autoimmun diabetes kialakulására. A HDC-KO egerekből hiányzik az endogén hisztamin, ezek az állatok csökkent glükóztoleranciával jellemezhetők. Emellett kimutathatóak bennük a glutamát-dekarboxiláz (GAD), az autoimmun diabetes egyik lehetséges target-antigénje elleni autoantitestek. A Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet kutatócsoportjának előző vizsgálatai eredményei szerint diabetesre jellemző elektrofiziológiai változások, mint a repolarizáció megnyúlása vagy a  $V_{max}$  csökkenése kimutathatóak voltak HDC-KO egerekben előzetes streptozotocinnal történő diabetes indukció nélkül. Ez a változás észlelhető jelen vizsgálatunkban is: a HDC-KO egerekben az APD<sub>90</sub> megnyúlása és a  $V_{max}$  depressziója volt tapasztalható a vad típusú egerekből nyert kontroll értékekkel összehasonlítva. Bár közvetlen ionáram mérések a patkány és egér szívműsejteken nem történtek, a rágcsálókön történt akciós potenciál vizsgálatok alapján is valószínűsíthető a rosiglitazon ioncsatornák aktivitását módosító hatása. Ezt az elgondolást alátámasztják azok a diabeteses egérmodellen történt vizsgálatok, melyek szerint a tartós rosiglitazon kezelés módosíthatja a  $K^+$ -csatornák vagy az azokkal kölcsönhatásban levő fehérjék génjeinek expresszióját.

#### **2.4. Klinikai vonatkozások**

A rosiglitazon legalacsonyabb koncentrációi, melyek vizsgálatainkban statisztikailag szignifikáns változásokat idéztek elő, magasabbak voltak, mint a betegekben mért csúcskoncentrációk. Egyszeri 8 mg rosiglitazon bevitelét követően mérhető plazma csúcskoncentráció 0,8  $\mu\text{g/ml}$ , mely megfelel 2  $\mu\text{M}$ -nak. Ezért nem valószínű, hogy a rosiglitazon szokásos dózisa egészséges egyéneken befolyásolja a cardiacis electrogenesisist, ily módon az arrhythmogenitást. Emellett szól az is, hogy rosiglitazon kezeléssel kapcsolatban hirtelen szívhalál esetekről nem számoltak be. Fontos azonban annak a hangsúlyozása, hogy vizsgálatainkat túlnyomórészt egészséges emlős szívműsejteken végeztük, a rosiglitazon pedig a diabetes kezelésére használatos szer. Figyelembe véve, hogy önmagában a diabetes hatására az ioncsatornák működésének és az akciós potenciálnak a megváltozása következik be, diabeteses állatokban a szer cellularis elektrofiziológiai hatásának további elemzése indokolt. A gyógyszert szedő idős, diabeteses betegek egy része egyéb cardiovascularis rizikófaktorokkal is terhelt, ezekben az esetekben a rosiglitazon proarrhythmias effektusa nem zárható ki. A rosiglitazonról állatkísérletekben bebizonyosodott, hogy ischaemiás állapotban csökkenti a kamrafibrillációs küszöböt. A gyógyszer csökkent eliminációja vagy túladagolása esetén

pedig a plasma koncentráció olyan tartományba emelkedhet, mely már a szívizomsejtek ioncsatornáit gátolva arrhythmikiakra hajlamosít.

A gyógyszer cardiovascularis biztonságossága továbbra is nyitott kérdés, egymásnak ellentmondóak a kockázat/haszon aránnyal kapcsolatos adatok. A bizonytalan és ellentmondásos klinikai eredmények miatt a gyógyszerügyi hatóságok reakciója is eltérő volt, az FDA jelentősen szigorította a rosiglitazon tartalmú készítmények forgalmazását, az Európai Gyógyszerügynökség pedig felfüggesztette a gyógyszer forgalomba hozatali engedélyét. A szer biztonságosságáról véglegesen és egyértelműen újabb multicentrikus tanulmányok után lehetne állást foglalni, de az előzmények ismeretében újabb klinikai vizsgálatok indítása valószínűtlen (etikai és pénzügyi szempontból is). 2010-ben az USA Szenátus Pénzügyi Bizottsága kérdőre vonta az FDA-t, hogy miért engedélyezi a rosiglitazon még folyamatban levő klinikai vizsgálatainak folytatását és mit szándékozik tenni a bevont betegek biztonsága érdekében. A Bizottság jelentése szerint a gyártó GlaxoSmithKline céget komoly felelősség terheli, mivel a cardiovascularis mellékhatásokról tudomására jutott adatokat évekig visszatartotta és így 1999 és 2007 között összesen 83000 infarctus eset volt a rosiglitazon szedésével összefüggésbe hozható.

A parciális PPAR $\gamma$  agonista hatású tiazolidindionok kutatása, fejlesztése révén próbálják a szénhidrátanyagcserére gyakorolt kedvező hatást megőrizni és a mellékhatásokat kiiktatni. A balaglitzon parciális agonista a rosiglitazonhoz hasonló vércukorszint csökkentő hatékonysággal, de kevésbé okoz folyadékretentiót. A compound 50 és az MK-0533 a preklinikai fejlesztés fázisában levő, kevesebb mellékhatást okozó parciális agonisták. Bár a parciális PPAR $\gamma$  agonisták kutatásával igyekeznek biztonságosabb tiazolidindionokat találni, egyre inkább úgy tűnik, hogy e mostoha sorsú gyógyszercsoport háttérbe szorul a diabetes kezelésében. A tiazolidindionok sorsa megpecsételődni látszik az incretin alapú kezelés (incretinhatást fokozó szerek és dipeptidil-peptidáz-4 gátlók) terjedésével. Az eddigi eredmények alapján az incretin alapú terápia cardiovascularis szempontból biztonságosnak tartható, de a hosszú távú kimenetellel kapcsolatos kérdésekre a folyamatban levő klinikai vizsgálatok fognak választ adni.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során két gyógyszer, a Parkinson-kór kezelésére használt dopamin agonista ropinirol és a 2-es típusú diabetes kezelésére használt tiazolidindion szer, a rosiglitazon proarrhythmias hatásait vizsgáltuk kutya kamrai szívműködéseken.

A ropinirollal kapcsolatban a következő lényeges megállapításokat tettük:

1. A ropinirol koncentrációtól függően nyújtotta vagy rövidítette az akciós potenciál időtartamát, csökkentette az akciós potenciál korai repolarizációjának mértékét és a depolarizáció maximális sebességét, továbbá a plató fázis depresszióját idézte elő.
2. Ezen hatásaival összhangban gátolta a tranziens kifelé irányuló káliumáramot, a késői káliumáram gyors komponensét és az L-típusú kalciumáramot. A ropinirol sem a késői káliumáram lassú komponensét, sem a befelé egyenirányító káliumáramot nem gátolta 300  $\mu\text{M}$ -nál kisebb koncentrációban.
3. Az akciós potenciál clamp üzemmódban kapott eredmények egybevágtak a feszültség-clamp körülmények közötti mérések adataival.

A rosiglitazon vizsgálata során a következőket észleltük:

1. A rosiglitazon koncentrációtól függően csökkentette az akciós potenciál korai repolarizációs fázisát, a depolarizáció maximális sebességét és a plató fázis depresszióját okozta, míg az akciós potenciál időtartama csak csekély mértékben változott.
2. A rosiglitazon gátolta a tranziens kifelé irányuló káliumáramot, a késői káliumáram gyors komponensét és az L-típusú kalciumáramot. A befelé egyenirányító káliumáramot a szer nem gátolta 300  $\mu\text{M}$ -nál kisebb koncentrációban.
3. Az akciós potenciál clamp üzemmódban kapott adatok alátámasztották a feszültség-clamp körülmények közötti mérések eredményeit.
4. A rosiglitazon akciós potenciál konfigurációra kifejtett hatásai a különböző állatfajokon jelentősen eltérőek. A rosiglitazon patkányokban az akciós potenciál amplitúdó koncentrációfüggő csökkenését, egerekben pedig növekedését idézte elő. A vad típusú egerekben és a patkányokban a rosiglitazon csökkentette a depolarizáció maximális sebességét. A repolarizáció 90 %-ánál mért akciós potenciál időtartam patkányban megnyúlt, míg egérben koncentrációfüggő módon rövidült. A hisztidin-dekarboxiláz hiányos egerekben a 90 %-os repolarizációhoz tartozó akciós potenciál időtartam megnyúlása és depolarizáció maximális sebességének csökkenése volt tapasztalható a vad típusú egerekből nyert kontroll értékekkel összehasonlítva.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, Dr. Lőrincz István egyetemi docensnek, a Sürgősségi Orvostan Tanszék vezetőjének és Dr. Nánási Péter professzornak, a Fogorvosi Élettani és Gyógyszertani Tanszék vezetőjének, akik kutató munkámat mindvégig irányították.

Köszönöm Dr. Szentandrassy Norbertnek hasznos szakmai tanácsait, Dr. Szabó Gergelynek és Dr. Horváth Balázsnak önzetlen segítőkészségüket.

Köszönetemet nyilvánítom mindazoknak, akik munkájukkal a jelen értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészítéséhez hozzájárultak, név szerint Dr. Harmati Gábornak, Dr. Bárándi Lászlónak, Dr. Magyar Jánosnak, Dr. Bányász Tamásnak, Dr. Kecskeméti Valériának, Dr. Szebeni Andreának és Dr. Pacher Pálnak.

Köszönettel tartozom a Miskolci Semmelweis Kórház és Egyetemi Oktatókórház I. Belgyógyászati Osztály jelenlegi és volt vezetőinek, Dr. Újszászy Lászlónak, Dr. Lukács Miklósnak és Dr. Takács Istvánnak és orvosi karának, elsősorban Dr. Nagy Gabriellának, Dr. Borsányi Gábornak és Dr. Somogyi Erzsébetnek, akik mindvégig támogatták kutató munkámat.

Köszönettel tartozom szüleimnek és feleségemnek, Anikónak segítőkészségükért, türelmükért.

Iktatószám: DEENKÉTK/306/2012.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Simkó József

Neptun kód: CJRYQQ

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szebeni, A., Szentandrassy, N., Pacher, P., **Simkó, J.**, Nánási, P.P., Kecskeméti, V.: Can the electrophysiological action of rosiglitazone explain its cardiac side effects?  
*Curr. Med. Chem.* 18 (24), 3720-3728, 2011.  
IF:4.859
2. Szentandrassy, N., Harmati, G., Bárándi, L., **Simkó, J.**, Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Szebeni, A., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of rosiglitazone on the configuration of action potentials and ion currents in canine ventricular cells.  
*Br. J. Pharmacol.* 163 (3), 499-509, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01215.x>  
IF:4.409
3. **Simkó, J.**, Szentandrassy, N., Harmati, G., Bárándi, L., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Nánási, P.P.: Effects of ropinirole on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes.  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 382 (3), 213-220, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0538-1>  
IF:2.5



### További Közlemények

4. **Simkó, J.**, Nagy, G., Dózsa, A., Lőrincz, I.: Sinus node dysfunction due to psychotropic agents combination.  
*Acta Neuropsychiatr.* 24 (4), 247-250, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5215.2011.00639.x>  
IF:0.577 (2011)
5. Bárándi L., **Simkó J.**, Harmati G., Bányász T., Magyar J., Szentandrassy N., Horváth B., Nánási P.P.: A ropinirol elektrofiziológiai hatásai kutya kamrai szívizomsejteken.  
*Cardiol. Hung.* 40, G34, 2010.
6. Lőrincz I., Szánthó E., **Simkó J.**, Szabó Z., Barta K., Füzi M., Szigeti G.: A fokozott arrhythmiarizikó új markere: A mikrovolt T-hullám-alternáns patomechanizmusa és vizsgálati módszerei.  
*Orv. Hetil.* 151 (30), 1215-1224, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28926>
7. Lőrincz, I., Garai, I., Varga, E., Barta, K., **Simkó, J.**, Szabó, Z., Galuska, L., Varga, J.: Myocardial adrenergic innervation in patients with vasovagal syncope measured with 123I-MIBG uptake.  
*Nucl. Med. Commun.* 30 (2), 134-139, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MNM.0b013e328319bfcc>  
IF:1.315
8. Lőrincz I., Szabó Z., **Simkó J.**, Szánthó E., Barta K., Füzi M., Szigeti G.P.: A pitvarfibrilláció és a vegetatív idegrendszer.  
*Orv. Hetil.* 149 (43), 2019-2028, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28466>
9. **Simkó, J.**, Lőrincz, I.: The Proarrhythmic Potential of Macrolides: The Role of Interactions. A Review. In: EHRLICH II-2nd World Conference on Magic Bullets. Ed.: Sörgel, F., Bodmann, K., Scubert-Zsilavec, M., Wilhelm, M, German Association of Pharmaceutical Scientists, Nürnberg, A-297, 2008.
10. **Simkó, J.**, Csilek, A., Karászi, J., Lőrincz, I.: Proarrhythmic potential of antimicrobial agents.  
*Infection.* 36 (3), 194-206, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-007-7211-8>  
IF:1.831
11. **Simkó J.**, Nagy G., Lőrincz I.: Szerzett hosszú QT szindróma: Esetismertetés.  
*Cardiol. Hung.* 37, C5, 2007.



12. **Simkó J.**, Csilek A., Lőrincz I.: Az antimikróbás szerek proaritmiás hatása.  
*Cardiol. Hung.* 37, C2, 2007.
13. **Simkó J.**, Barta K., Szabó Z., Varga E., Nagy E., Lőrincz I.: A hyperthyreosis cardiovascularis manifesztációi és az amiodaron-kezelés okozta pajzsmirigybetegség.  
*Orv. Hetil.* 145 (48), 2411-2417, 2004.
14. **Simkó J.**, Újszászy L., Nagy G., Horváth G., Grenda A., Horváth T., Lőrincz I.: A clarithromycin aritmogén hatásának vizsgálata a QT távolság és a QT diszperzió mérésének segítségével.  
*Cardiol. Hung.* 33, B5, 2003.
15. **Simkó, J.**, Újszászy, L., Nagy, G., Horváth, G., Grenda, A., Horváth, T., Lőrincz, I.: Evaluation of the Arrhythmogenic Effect of Clarithromycin by Measuring QT Interval and QT Dispersion.  
In: 4th International Conference of PhD Students. Szerk.: Patkó Gyula, University of Miskolc, Innovation and Technology Transfer Centre, Miskolc, 77-80, 2003.

**Összesített impakt faktor: 15.491**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 11.768**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.24

