

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

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

**Dr. Simkó József**



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

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

# RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- APA - akciós potenciál amplitúdó
- APD - akciós potenciál időtartam
- APD<sub>90</sub> – a repolarizáció 90 %-ánál mért akciós potenciál időtartam
- APD<sub>50</sub> - a repolarizáció 50 %-ánál mért akciós potenciál időtartam
- CHO – Chinese hamster ovary (kínai hörcsög petefészek sejtvonala)
- EGTA – etilén-glikol-O,O'-bisz(2-aminoetil)-N,N',N'',N'''- tetraecetsav
- ENaC - distalis nephron gyűjtőcsatorna Na<sup>+</sup> csatornája
- FDA - Food and Drug Administration
- GAD - glutamát-dekarboxiláz
- HDC-KO - hisztidin-dekarboxiláz hiányos
- HEPES – 2-(4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil)-etánszulfonsav
- HERG – human Ether-à-go-go-Related Gene
- IC<sub>50</sub> vagy EC<sub>50</sub>– félgátló koncentráció
- I<sub>Ca</sub> - L-típusú kalciumáram
- I<sub>K1</sub> - befelé egyenirányító káliumáram
- I<sub>Kr</sub> - késői káliumáram gyors komponense
- I<sub>Ks</sub> - késői káliumáram lassú komponense
- I<sub>Na</sub> – nátriumáram
- I<sub>t0</sub> - tranziens kifelé irányuló káliumáram
- JMM - Joklik-féle Minimal Essential Medium
- LAD – bal elülső leszálló coronaria arteria
- LDL - alacsony sűrűségű lipoprotein
- MEM - Minimal Essential Medium
- NYHA - New York Heart Association
- PIP3 - foszfátidil-inozitol-trifoszfát
- PPAR $\gamma$  - nuclearis peroxisoma-proliferator-aktivált receptor  $\gamma$
- PTEN - foszfatáz és tensin homológ a X. kromoszómán
- QT<sub>c</sub> - korrigált QT távolság
- SF - standard forma
- sgk1 - serum- és glucocortikoid-indukálható kináz-1

TEACl – tetraetilammónium-klorid

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor-alfa

V<sub>0,5</sub> - félaktivációs feszültség

V<sub>max</sub> - depolarizáció maximális sebessége

W<sub>0</sub> - kimosás

WT - vad típusú

XR - elhúzó hatású (extended release)

# 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 jelenség a chinidin 1920-as évek elején történt bevezetése után már néhány évvel ismertté vált, az úgynevezett chinidin syncope első esetleírásait követően (1). Az 1960-as években pedig a tartós EKG monitorozás elterjedésével kiderült, hogy a chinidin syncope hátterében a később torsades de pointes-nek elnevezett polimorf kamrai tachycardia áll (2). A proarrhythmia előfordulását kezdetben klinikai ritkaságnak és váratlan eseménynek tekintették. Az elmúlt 20 év kutatásai azonban azt igazolták, hogy a proarrhythmia következtében kialakuló ritmuszavarok bizonyos hajlamosító tényezők, rizikófaktorok fennállása esetén gyakrabban fordulnak elő, mint azt régebben feltételezték. Továbbá kiderült az is, hogy nem csak a ritmuszavarok kezelésére használt antiarrhythmias gyógyszerek, hanem a nem antiarrhythmias szerek, ill. ezek kombinációi is hasonló pathomechanizmussal okozhatnak életveszélyes ritmuszavarokat, amelyeket szintén proarrhythmianak fogadott el a tudományos közvélemény.

A proarrhythmia fogalma tehát nem egységes, több jól elkülöníthető klinikai tünetcsoportot sorolhatunk ide, amelyek mind eltérő mechanizmussal alakulnak ki. Roden és Anderson öt proarrhythmia syndromát ismertetnek összefoglaló közleményükben (3):

1. Digitalis okozta ritmuszavarok (sinus bradycardia, exit block, atrioventricularis block, pitvari tachycardia, bidirekcionális kamrai tachycardia); ezek hátterében a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-áz gátlása, intracellularis  $\text{Ca}^{2+}$  akkumuláció, késői utódepolarizációk jelentkezése állhat.
2. Szerzett hosszú QT syndromát okozó gyógyszerek használata során jelentkező ritmuszavarok; ezen szerek az akciós potenciál heterogén megnyújtása révén korai utódepolarizációkhoz, instabil intramuralis reentry-hez, következményes torsades de pointes típusú kamrai tachycardiához vezethetnek.
3.  $\text{Na}^+$ -csatorna blokkolók (egyes antiarrhythmias szerek, triciklikus antidepresszánsok, kokain) okozta sustained monomorf kamrai tachycardia vagy

1:1 átvezetésű pitvari flutter kialakulása; a háttérben lassult vezetés okozta reentry és/vagy a repolarizáció fokozott heterogenitása állhat.

4. Bizonyos gyógyszerek, kábítószeres (5-fluorouracil, triptánok, ephedrin, kokain) alkalmazása mellett hirtelen szívhalál léphet fel, ennek mechanizmusa talán vasospasmus lehet.
5. A mortalitás fokozódása placebo-kontrollált klinikai vizsgálatokban (CAST – flecainid, CAST-II - moricizin, CASH – propafenon, SWORD – d-sotalol) feltehetően torsades de pointes típusú kamrai tachycardiával vagy monomorf kamrai tachycardiával függhet össze, de egyéb mechanizmusok sem zárhatóak ki.

Fentiek 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, pszichotriai 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. Az antimicrobás szerek arrhythmogen hatásait összefoglaló közleményben ismertettük (4), a makrolid antibiotikumok közé tartozó clarithromycin proarrhythmias hatását klinikai vizsgálatunkban *Helicobacter pylori* eradikáció során tanulmányoztuk (5, 6).

Ismert, hogy míg a veleszületett hosszú QT syndroma háttérében több különböző ioncsatorna gén mutációja állhat, a szerzett hosszú QT syndromát többnyire a késői  $K^+$ -áram gyors komponenséért ( $I_{Kr}$ ) felelős ioncsatornákra (HERG) gátló hatást kifejtő szerek okozzák. A gyógyszerek hatására kialakuló akciós potenciál megnyúlás mértéke a myocardium különböző rétegeiben eltérő, a midmyocardialis szöveteken (M sejt) és a Purkinje rostokon kifejezettebb, mint a subendocardialis és subepicardialis szívizom rétegben, ezt a jelenséget a repolarizáció transmuralis dispersiojának nevezi a szakirodalom. A repolarizáció elhúzódása kedvez a befelé irányuló ionáramok reaktiválódásának (L-típusú  $Ca^{2+}$ -áram,  $Na^+/Ca^{2+}$  cseremechanizmus), 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 (7). A torsades de pointes típusú kamrai tachycardia spontán is megszűnhet, azonban ha

elég hosszú ideig tart, syncopét vagy kamrafibrillatíóvá degenerálódva akár hirtelen szívhalált is okozhat.

Jelen ismereteink alapján QT<sub>c</sub> megnyúlásra és torsades de pointes típusú kamrai tachycardia kialakulására hajlamosít a női nem, az organikus szívbetegség (főleg a bal kamra hypertrophia, a szívelégtelenség és a coronariabetegség), a pitvarfibrillatio cardioversioja utáni állapot, a hypokalaemia és hypomagnesaemia, a bradycardia, az alkalmazott gyógyszer túladagolása vagy csökkent eliminatioja (interakció, vese- vagy májbetegség miatt), továbbá másik QT távolságot megnyújtó szer egyidejű szedése és a genetikai predispositio (4). Ez utóbbi esetben valójában a hosszú QT syndroma congenitalis formájáról van szó, de az ioncsatorna mutációt hordozó személy inkomplett penetrancia, variabilis expressio miatt tünetmentes marad mindaddig, amíg nem kap repolarizációt megnyújtó gyógyszert. A mutáció érintheti az I<sub>Kr</sub> ioncsatorna pórusalkotó α-alegységének vagy szabályozó β-alegységének génjét (KCNH2 ill. KCNE2), ilyen esetben ugyanazon ioncsatorna genetikai hibájához gyógyszeres blokádnak társul. Előfordulhat az is, hogy egy másik ioncsatorna gén (leggyakrabban az I<sub>Ks</sub> ioncsatorna pórusalkotó α-alegységének KvLQT1 génje) subclinicus, „forme fruste” mutációja áll fenn, de ezt a hibát az I<sub>Kr</sub> normál működés esetén kompenzálni tudja, így akciós potenciál megnyúlás nem jön létre. A repolarizációnak ezt a biztonsági tartalékát nevezik „repolarizációs rezerv”-nek. Az ilyen betegeknél azonban I<sub>Kr</sub> gátló szer adása manifeszt QT megnyúláshoz és torsades de pointes típusú kamrai tachycardiához vezethet.

A ritkán előforduló, erős hatású mutációk mellett a mérsékelt hatású, de jóval gyakoribb, a teljes populáció legalább 1%-ában megjelenő DNS-szekvencia variációk, a polimorfizmusok jelentőségét is igazolták a gyógyszer okozta akciós potenciál megnyúlás kialakulásában. Például korrelációt mutattak ki az I<sub>Ks</sub> szabályozó β-alegységét kódoló KCNE1 gén D85N polimorfizmusa és a gyógyszer-indukálta QT távolság megnyúlás között (8).

Bár a szerzett hosszú QT syndroma hátterében jelen ismereteink szerint túlnyomórészt direkt I<sub>Kr</sub> blokádnak áll, egyéb mechanizmusokra is fény derült. Pl. a malária kezelésében használatos mefloquine, bár önmagában a QT távolságot kevéssé befolyásolja, nagy mértékben felerősíti az I<sub>Kr</sub> gátló halofantrine proarrhythmias hatását (4). Valószínűsíthető, hogy a mefloquine I<sub>Ks</sub> gátló hatást fejt ki (9), ezzel magyarázható, hogy mefloquine előkezelést követően a halofantrine jelentősebb QT távolság megnyúlást okoz, mint önmagában (10, 11).

Egy másik példában a *Pneumocystis carinii* pneumonia és az álomkór kezelésére használt pentamidin elsősorban intravenás alkalmazás esetén QT távolság megnyúlást és torsades de pointes típusú kamrai ritmuszavart okozhat. A pentamidin azonban nem gátolta az  $I_{Kr}$  ionáramot transfektált HEK 293 sejteken és izolált perfundált nyúlászív modellen sem okozott QT távolság megnyúlást (12). Kuryshev és mtsai kimutatták, hogy bár a pentamidin nem fejt ki direkt gátló hatást a fontosabb ioncsatornákra, hosszabb expositio esetén mégis az  $I_{Kr}$  ionáramok csökkenését váltja ki. Western blot és chemiluminescencia assay segítségével pedig bebizonyították, hogy ennek háttérében a sejt felszínre kerülő érett, teljesen glycosilált ioncsatorna fehérjék számának csökkenése áll (13). Az álomkór és az acut promyelocytás leukaemia kezelésére használt arzén-trioxid hasonló mechanizmussal, az  $I_{Kr}$  csatorna érését gátolva, a sejt felszínre jutó működőképes csatornák számát csökkentve okozhat ritmuszavart (14). Az arzén-trioxidnak egy másik, kevésbé ismert hatása a  $Ca^{2+}$ -áram fokozása, mely feltehetően a PTEN („foszfatáz és tensin homológ a X. kromoszómán”) oxidatív szabadgyökök általi inaktivációja, ezáltal emelkedett foszfatidil-inozitol-trifoszfát (PIP3) koncentráció és az  $I_{Ca}$  aktivációja útján valósul meg (15).

A mai napig nem tisztázott részleteiben a szerzett hosszú QT syndroma és a hirtelen szívhalál összefüggése, mert gyakran lehetetlen a váratlan haláleset és a beteg által szedett gyógyszerek közötti kapcsolatot utólag pontosan igazolni. A populációsintű vizsgálatok azonban bizonyították a valódi rizikót. Az  $I_{Kr}$ -gátló erythromycint és annak biotransformációját gátló cytochrom P450 3A4 inhibitorot egyidejűleg szedő betegek között például a hirtelen szívhalál incidencia jelentősen magasabbnak bizonyult (16). Egy holland adatbázis elemzése szerint pedig a hirtelen szívhalál rizikó háromszoros volt azoknál a személyeknél, akik valamilyen nem kardiológiai indikációjú QT távolságot nyújtó szert szedtek és évente 320 hirtelen szívhalál eset hozható kapcsolatba ilyen gyógyszer szedésével Hollandiában (17).

Közismert, hogy az utóbbi három évtized alatt alapvetően megváltozott a szemléletünk az arrhythmia pathogenesisét, diagnosztikáját és kezelését illetően. A ritmuszavarokban szenvedő betegek nagy száma, az arrhythmia 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**

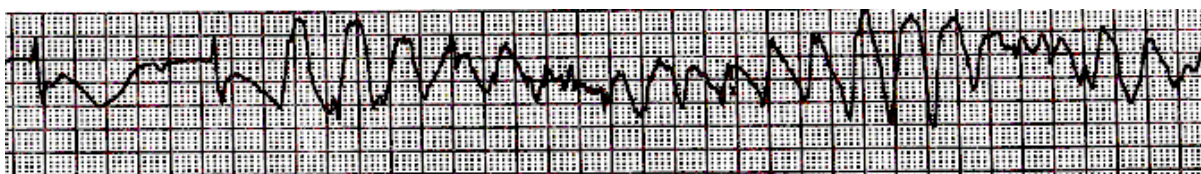
A Parkinson-kór elsősorban idős korban kialakuló, progresszív, degeneratív idegrendszeri betegség. A kórkép alapja a dopamin mennyiségének a csökkenése a nigrostriatalis pályarendszerben a substantia nigra sejtjeinek pusztulása miatt. A betegség az extrapyramidalis rendszer működészavarával jár, motoros 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 (18). A szív vegetatív beidegzése is károsodik, ami a baroreflex sensitivitas csökkenésében (19), a szívfrekvencia variabilitas változásában nyilvánul meg (20).

Bár Parkinson-kóros betegekben a finom EKG eltérések értékelése a nyugalmi tremor miatt esetenként igen nehézkes (21), a  $QT_c$  intervallum (gyógyszerhatástól független) megnyúlása egyértelműen igazolható, amit szintén a cardialis autonóm dysfunctiora vezetnek vissza (22). A  $QT_c$  megnyúlás mértéke a Parkinson-kór súlyosságával arányos (23). A repolarizáció gátlása bármilyen QT távolságot megnyújtó gyógyszeres kezeléssel tovább fokozhatja a betegek ritmuszavar illetve hirtelen szívhalál rizikóját (24).

### **2.2. A ropinirol általános jellemzése**

A ropinirol a Parkinson-kór kezelésére alkalmazott nem ergolinvázas dopamin agonista gyógyszer. A ropinirol szelektíven stimulálja a centrális és perifériás  $D_2$  és  $D_3$  receptorokat anélkül, hogy hatna a szerotonin receptorokra. Ezért - az ergotamin származékokkal szemben – nem okoz szívbillentyű károsodást, mely feltételezések szerint a szívbillentyűkön expresszáldott  $5-HT_{2B}$  receptorok ergolinvázas vegyületek által történt stimulációjával, következményes mitogenesisselel és fibroblast proliferációval állhat kapcsolatban (25, 26). A gyógyszer esetleges proarrhythmiás hatása akkor vetődött fel,

amikor egy ropinirol kezelés alatt álló betegben ismételten torsades de pointes típusú kamrai ritmuszavart észleltünk (**1. ábra**). A 82 éves nőbeteg két hetes ropinirol kezelése során ismételten eszméletvesztéssel járó epizódok léptek fel. A rohammentes időszakban jelentős QT<sub>c</sub> távolság megnyúlást, a rohamok alatt pedig torsades de pointes típusú kamrai tachycardiát dokumentáltunk, a beteg ellátása során ismételten defibrillációval szüntettük meg az életveszélyes állapotot. Végül az esetet vélhetően a ropinirol kezeléssel kapcsolatba hozható szerzett hosszú QT syndromának véleményeztük (27).



**1. ábra.** A torsades de pointes kamrai tachycardia kezdete EKG ritmuscsíkon. Megfigyelhető az utolsó megelőző sinus ütés megnyúlt QT távolsága és a ritmuszavar alatt a QRS komplexusok változó amplitudója és polaritása (27).

### 2.3. A ropinirol cellularis elektrofiziológiai hatásai

A ropinirol szívműködésre 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 (28). 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 (29). A ropinirol szívműködésének 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 (29).

## 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. A betegség hosszú évek alatt, lappangva fejlődik ki a csökkent glukóztolerancián keresztül, a klasszikus tünetek hiányoznak, a betegekben

gyakran macro- és microvascularis szövődmények alakulnak ki. Mértékadó epidemiológiai felmérések alapján 2010-ben világszerte a 20–79 éves korosztályban a cukorbetegek száma 285 millióra tehető, ez a szám várhatóan 439 millióra emelkedik 2030-ra (30). A cukorbetegek 90%-a a 2-es típusba sorolható. A Magyar Diabetes Társaság becslése szerint hazánkban kb. egy-másfél millió ember szenved felismert vagy fel nem ismert cukorbetegségben, a csökkent glukóztoleranciájú egyének száma pedig megközelítőleg még egyszer ugyanennyi (30). 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 Framingham vizsgálatban például diabeteses férfiak körében 2-szer, diabeteses nők között 3-szor nagyobb volt a cardiovascularis betegségek incidenciája, mint az azonos nemű, nem cukorbeteg egyének között (31). Az MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial) tanulmányban a cardiovascularis mortalitás a diabeteses férfiak csoportjában 3-szor nagyobbak bizonyult (32). A Finnish Study adatai szerint a diabeteses, infarctust nem szenvedett betegek cardiovascularis rizikója ugyanakkora, mint az infarctuson átesett, nem diabeteses betegeké (33). A szív-érrendszeri szövődmények közül a macroangiopathiás (coronaria, cerebrovascularis és alsó végtagi arteriás) megbetegedések mellett magas a szív elektromos tulajdonságait (ingerképzés, ingerületvezetés) és pumpafunkcióját egyaránt érintő diabeteses cardiomyopathia incidenciája is (34, 35). A szívizom elektromos működésének a változásaiban a kamrai repolarizációt reprezentáló korrigált QT ( $QT_c$ ) távolság megnyúlása és a  $QT_c$  diszperzió növekedése a legszembetűnőbb. Diabeteses patkányok izolált szívizomsejtjeit vizsgálva az akciós potenciálok szignifikáns megnyúlását és a  $K^+$ -áramok csökkenését észlelték (36, 37). A szívizomsejtek  $K^+$ -áramainak ( $I_{to}$ ,  $I_{Ks}$  és a steady-state kifelé irányuló áram,  $I_{ss}$ ) szabályozása komplex, amplitúdójuk és denzitásuk sejt típus-, életkor- és fajfüggő, emellett a szív kórállapota és neurohumorális faktorok is meghatározzák. Ezen ionáramok csökkenése diabeteses szív modellekben az akciós potenciál profilk megváltozásával jár (37-39).

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

A 2-es típusú diabeteses betegekben fokozott a szívelégtelenség és egyéb cardiovascularis szövődmények kialakulásának kockázata és nagy körültekintést igényel annak megítélése, hogy ez a rizikó a vércukorszintet csökkentő kezelés mellett hogyan változik. A gyógyszer kiválasztásánál tehát a szer alkalmazásának haszon/kockázati

arányát is figyelembe kell venni a cukorbeteg individuális állapota mellett. Az elmúlt évtizedben egy ígéretes gyógyszercsoport, a tiazolidindionok két tagja – a rosiglitazon és a pioglitazon – bekerült a 2-es típusú diabetes kezelési algoritmusába és széles körben el is terjedt (40), ezzel szemben a troglitazont hepatotoxicus hatása miatt viszonylag korán kivonták a forgalomból (41).

A munkacsoportunk által vizsgált rosiglitazon egy tiazolidindion típusú orális vércukorszint csökkentő gyógyszer, mely mind diabeteses állatmodellekben, mind 2-es típusú cukorbetegség kezelésében hatékonyan bizonyult (42, 43). A tiazolidindion típusú, inzulinérzékenységet fokozó szerekkel elérhető a glycaemiás kontroll jelentős és hosszantartó javulása, mely  $\beta$ -sejt megőrző tulajdonságukkal lehet kapcsolatban (44-46). A tiazolidindionok nagy affinitással kötődnek egy magreceptorhoz, a nuclearis peroxisoma-proliferator-aktivált receptor  $\gamma$ -hoz (PPAR $\gamma$ ), mely a szénhidrát- és zsírsavmetabolizmusban szerepet játszó gének expresszióját szabályozza (47, 48). A PPAR $\gamma$  részt vesz számos alapvető élettani folyamat, egyebek között az adipogenesis, a lipid metabolizmus és az inzulin érzékenység szabályozásában, emellett szerepet játszik az obesitas, a cukorbetegség és az atherosclerosis pathogenesisében (49-52). A tiazolidindionok a zsírszövetben és a harántcsíkolt izomszövetben javítják az inzulinérzékenységet, a szívizomban a glukóztranszporterek expresszióját és hatékonyságát fokozzák, a szív glukóz metabolizmusát stimulálva (53-58). A tiazolidindionok vasorelaxáns, vérnyomáscsökkentő és gyulladáscsökkentő hatását is kimutatták (59-63). A rosiglitazon és a pioglitazon a lipidprofil is befolyásolja: a rosiglitazon emeli az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) koncentrációt, növeli az atherogen (apo B100-tartalmú) partikulumok számát és a triglicerid koncentrációt, ezzel szemben a pioglitazon az LDL szintet nem befolyásolja, az apo B100 szintet kissé csökkenti és a triglicerid koncentrációt is csökkenti (64, 65). A tiazolidindionok csökkentik a gyulladásmarkereket (pl. C-reaktív protein, TNF- $\alpha$ ) szintjét, befolyásolják a véralvadási kaskád komponenseinek aktivitását (pl. plazminogén aktivátor inhibitor-1) és emelik az anti-atheroscleroticus tulajdonságú adipokin és adiponektin szintjét (66-70). A macrophagok habos sejté alakulását, a plakk stabilitását, az érfal sérülésre adott válaszreakciót is befolyásolják, javítják az endothel funkciót és csökkentik a microalbuminuria mértékét (71, 72). Állatkísérletekben a myocardialis infarctus és az ischaemiás agykárosodás kimenetelét is javították (73-75). Emberben is kimutatták a carotis intima-media vastagságot csökkentő hatásukat (76, 77). A pioglitazon érlemezés progresszióját csökkentő tulajdonságát intravasculáris ultrahang technikával is sikerült bizonyítani, míg glimepirid kezelés mellett a 18 hónapig tartó

nyomon követés végére a coronaria atherosclerosis progressziója igazolódott (78). A vércukorszint csökkentésén túl mind a rosiglitazon, mind a pioglitazon kezelés során egyéb jótékony, kedvező szív-érrendszeri hatásokat is igazoltak (61, 79).

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 - egyéb komoly mellékhatások mellett (nem osteoporoticus lokalizációjú törések, pioglitazon esetében hólyagrák) - összefüggésben állhat bizonyos cardiovascularis események: pl. súlygyarapodás, oedemaképződés, szívelégtelenség kialakulásával (80-86). 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 dózisemelést javasolt. A súlyosabb, NYHA III-IV. stádiumban a tiazolidindionok használatának teljes mellőzését ajánlották (87). A mellékhatásként kialakuló folyadékretenció háttérben álló mechanizmusok ma még csak részben ismertek, lehetséges, hogy a distalis nephron gyűjtőcsatornájában a  $\text{Na}^+$ -csatorna (ENaC)  $\gamma$ -alegységének és/vagy a serum- és glucocortikoid-indukálható kináz-1-nek (sgk1) a fokozott expressziója áll a háttérben (88-91). Mindkét mechanizmus végeredményben a  $\text{Na}^+$  reabsorptio fokozódásával jár, ez folyadékretenciót és perifériás oedemát okoz, melynek szívelégtelenségben különösen nagy lehet a jelentősége (92).

További elemzések során a rosiglitazon esetében a myocardialis infarctus rizikójának növekedését is megfigyelték (84), 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 (16, 17). Meg kell jegyeznünk, hogy míg a szívelégtelenség fokozott kockázatát randomizált, kontrollált vizsgálatok mindkét szer használatával kapcsolatban bizonyították, az infarctus és a mortalitás rizikójának növekedése csak a rosiglitazont érinti (84, 93), a pioglitazon ettől a kockázattól mentesnek bizonyult (94, 95). Graham és munkatársai retrospektív vizsgálatának eredménye szerint a rosiglitazon a pioglitazonnal szemben megnövelte a cerebrovascularis esemény, a szívelégtelenség, a bármely eredetű halálozás, valamint mindezek akut szívinfarcussal

kiegészített együttesének kockázatát. Az infarctus mint önálló végpont rizikója nem különbözött a két csoportban (96). A rosigitazon használatát annak ellenére korlátozták, hogy a szívinfarctus kockázatának növekedését több vizsgálat nem támasztotta alá (97-99).

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

Lu és munkatársai kimutatták, hogy altatott disznókban a rosigitazon mérsékli az ischaemia és a ATP-szenzitív  $K^+$ -csatorna nyitó levcromakalim akciós potenciál rövidítő hatását (100). Ezen túlmenően a súlyos myocardialis ischaemia okozta kamrafibrillatio rosigitazon adása esetén hamarabb következik be, ezt a hatást a ischaemiás állapotban protektív szerepet játszó cardialis ATP-szenzitív  $K^+$ -csatornák gátlására vezették vissza. Mindezülig azonban nem vizsgálták a szer többi cardialis ionáramra gyakorolt hatását voltage clamp mérésekkel. A rosigitazon számos ioncsatornát gátol az extracardialis szövetekben, köztük a neuronális  $Ca^{2+}$ -csatornákat, epithelialis  $Na^+$ -csatornákat, ATP-szenzitív  $K^+$ -csatornákat, patkány vascularis simaizom sejtekben a késői  $K^+$ -áram lassú komponensét és az L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornákat (101-105).

Bár a rosigitazon szívizomsejtekre gyakorolt elektrofiziológiai hatásairól eddig nem voltak adataink, egy másik tiazolidindion vegyületről, a troglitazonról bebizonyosodott, hogy az L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák hatékony gátlószere tengerimalac (106, 107) és patkány kamrai szívizomsejtekben (108, 109), nyúl kamraizomsejtekben pedig a  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  és  $K^+$ -áramokra is gátló hatást fejt ki (110).

# CÉLKITŰZÉSEK

## 1. A ropinirol cellularis elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata

A ropinirol elterjedt alkalmazása és az ergotamin származékokhoz viszonyítva alacsonyabb cardiotoxicus potenciálja 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 (27). 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 szívimsejteken. Bár a megjelent közlemények a ropinirol terápiás plazmakoncentrációját 25-80 nM közöttinek adják meg (111, 112), a vizsgált koncentrációt 300  $\mu$ M-ig terjesztettük ki, hogy a túladagolás és mérgezés esetén fellépő esetleges mellékhatásokat is megjeleníthessük. Kísérleteinket kutya szívimsejteken végeztük, mert a transzmembrán ionáramok eloszlását és kinetikai tulajdonságait tekintve a humán kamrai myocardium legjobb modellje a kutya szívimsejt (113, 114).

## 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 (101-105), valamint a cardialis ATP-szenzitív  $K^+$ -csatornákon (100) azonban már igazolódott a gyógyszer gátló hatása, sőt ischaemiás állapotban az arrhythmogen hatását is bizonyították állatkísérletekben (100).

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 háttérében a rosiglitazon cardialis elektrofiziológiai hatásai állhatnak, vizsgálataink során elemeztük a rosiglitazon hatásait az akciós potenciál morfológiájára és a háttérben álló ionáramokra izolált kutya kamrai szívimsejteken 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 (összetétel:  $144 \text{ mM NaCl}$ ,  $5,6 \text{ mM KCl}$ ,  $2,5 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $1,2 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $5 \text{ mM HEPES}$ ,  $11 \text{ mM glükóz}$ ,  $\text{pH}=7,4$ ). Az enzimatikusan izolált szívizomsejteket a bal kamrából nyertük anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával (113). Kanuláltuk 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  $50 \text{ }\mu\text{mol CaCl}_2$ -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. Az elektrodákat közvetlenül a

kísérlet megkezdése előtt boroszilikát kapillárisból (Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) készítettük programozható mikroelektróda-húzó (Sutter Instruments Co., USA) segítségével. Az elektródát mechanikus makro- és három irányban mozgatható hidraulikus mikromanipulátorral (Narishige, Japán) pozicionáltuk. A mérés során nyert jeleket Axoclamp-2B erősítő készülékkel (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) erősítettük. A mérés során a sejteket a mérőelektródon keresztül folyamatosan 1 s ciklushossz mellett 1 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 mikroelektródákat 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 (115). 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 ( $\text{APD}_{90}$ ) 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 (116). 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 ( $I_{\text{Kr}}$ ) (117).

## 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.

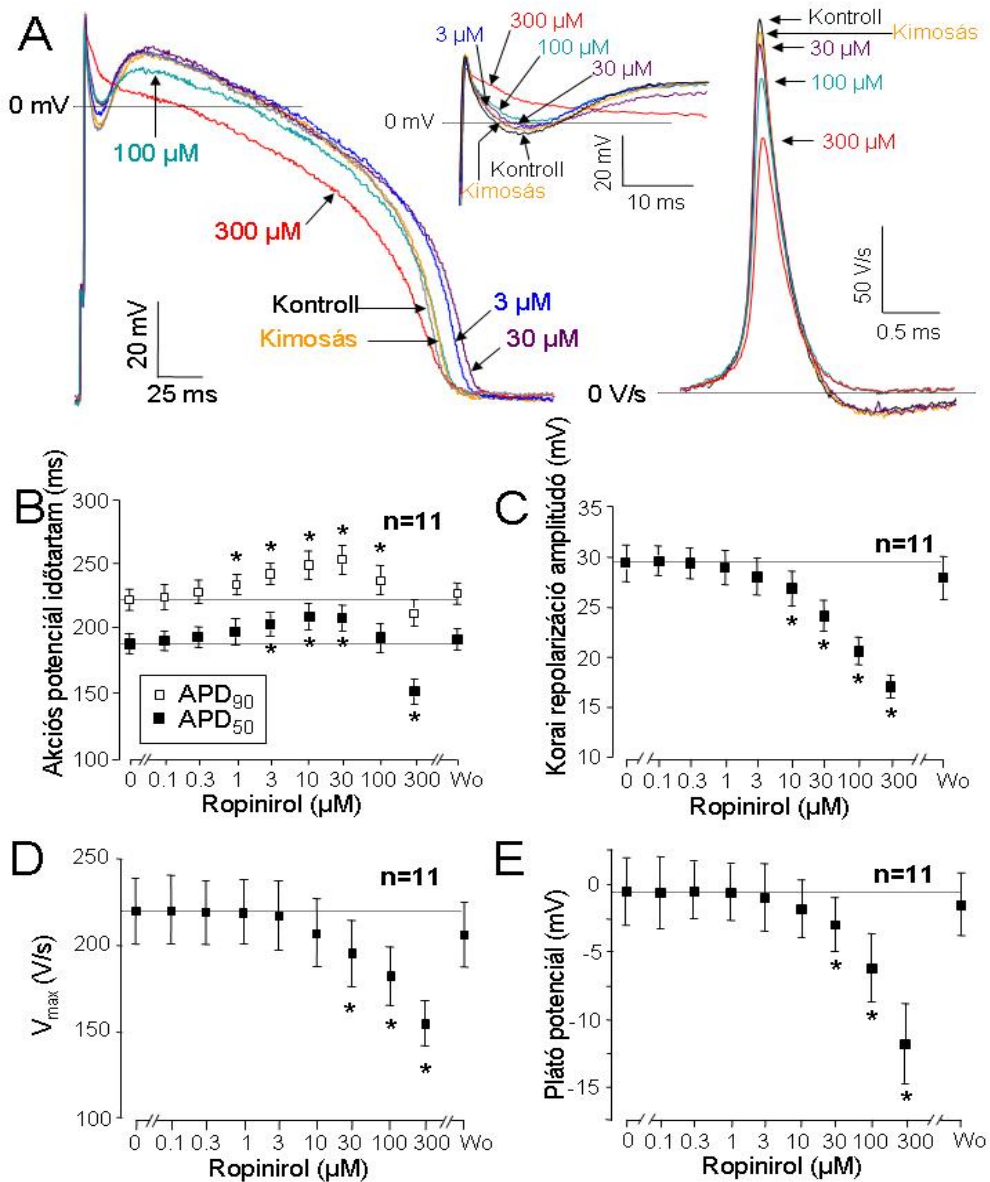
Minden elvégzett vizsgálat összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publication No 85–23, revised 1996) és a Helsink Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyta.

# EREDMÉNYEK

## 1. A ropinirol vizsgálata során nyert eredmények

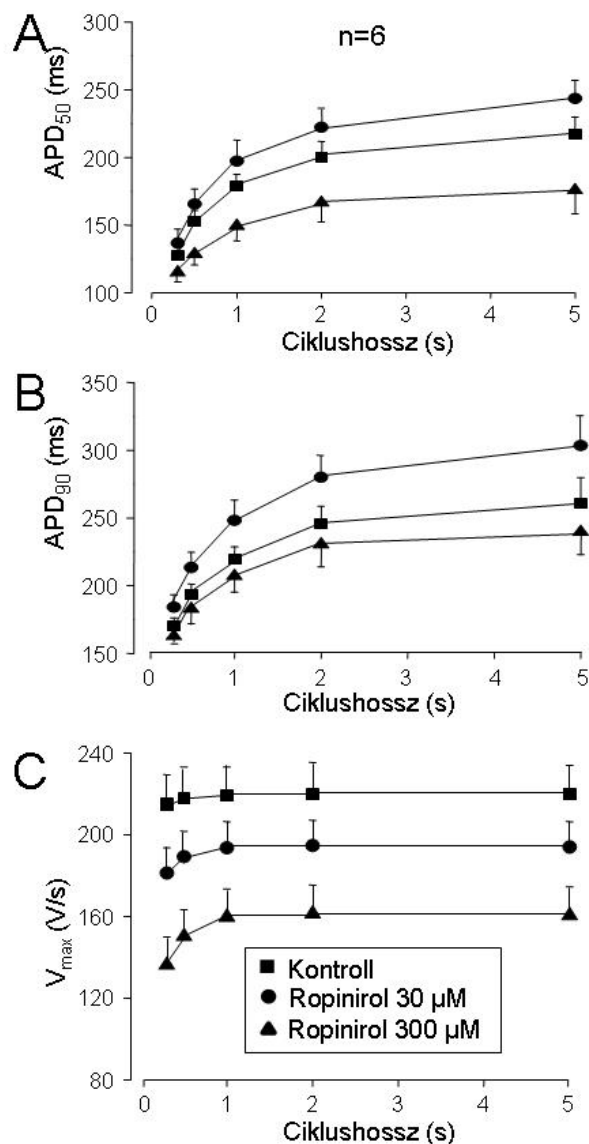
### 1.1. A ropinirol hatása a kutya szívműködésének akciós potenciáljára

A ropinirol komplex, koncentrációfüggő változásokat idézett elő az 1 Hz frekvenciával ingerelt kutya kamrai szívműködésének 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 (**2.A ábra**). 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 (**2.B ábra**). 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 (**2.C-E ábra**).



**2. ábra.** A Ropinirol kumulatív koncentrációfüggő hatásai az akciós potenciál paramétereire 1 Hz ingerlőfrekvencia mellett. Az akciós potenciál korai eseményeit az ábrabetéten felnagyítva, az akciós potenciál felszálló szárának idő szerinti első deriváltját a jobb oldalon ábrázoltuk. **B-E** A ropinirol kumulatív koncentrációfüggő hatásai az akciós potenciál időtartamára (APD<sub>50</sub> és APD<sub>90</sub>), a korai repolarizáció amplitúdójára, a depolarizáció maximális sebességére ( $V_{max}$ ) és a plató potenciál nagyságára. A korai repolarizáció amplitúdóját a túllövési potenciál és az incisura legmélyebb pontja közötti különbségként definiáltuk, a plató potenciált az akciós potenciál időtartamának felénél határoztuk meg. A ropinirol mindegyik koncentrációját 3 percig perfundáltuk, majd 10 perces kimosás (Wo) következett. Az eredmények a 11 szívműködő sejtben végzett mérések átlagát jelentik, csillaggal a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ( $P < 0,05$ ) különbségeket jelöltem.

A ropinirol hatásai 10 perces Tyrode oldattal történő kimosás után visszafordíthatónak bizonyultak. A  $V_{max}$  és az APD ropinirol-indukálta változásai frekvenciafüggőek voltak (**3. A-C ábra**). A  $V_{max}$  csökkenése gyors ingerlésnél, a ciklushossz 1 s alá csökkentésekor volt a legfeltűnőbb. Ezzel szemben az APD megnyúlása (30  $\mu\text{M}$  koncentrációnál) és az APD rövidülése (300  $\mu\text{M}$  koncentrációnál) is hosszabb ciklushosszaknál volt kifejezettebb, tehát fordított frekvenciafüggés volt kimutatható („reverse rate dependent” hatás).

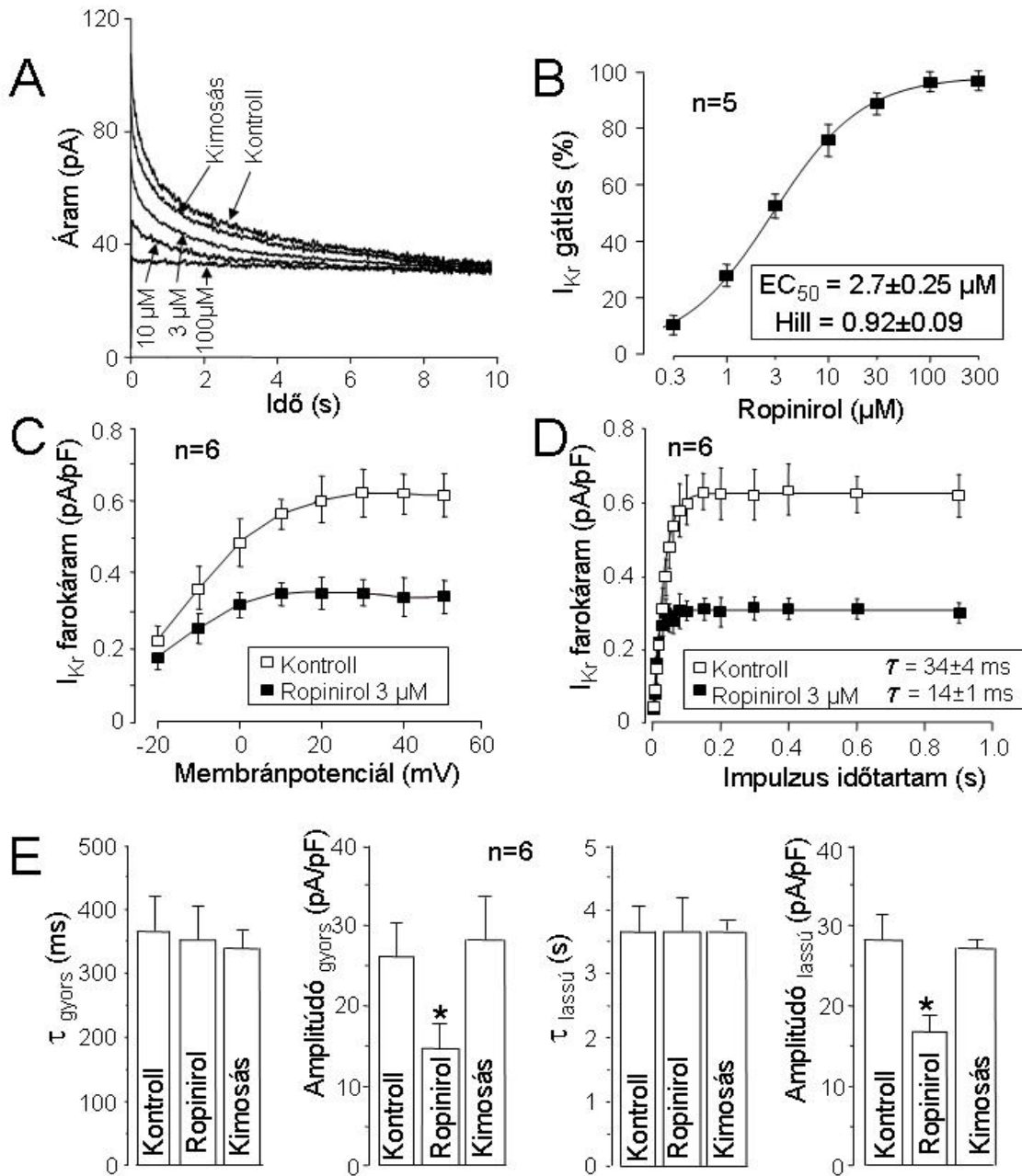


**3. ábra.** 30 és 300  $\mu\text{M}$  ropinirol steady-state frekvencia-függő hatásai az APD<sub>50</sub> (A), APD<sub>90</sub> (B) és  $V_{max}$  (C) értékekre 6 szívizomsejtből nyert adatok alapján. Ezeknél a vizsgálatoknál a ciklushosszat kezdetben 5 s-ra állítottuk be, majd 10 perc elteltével fokozatosan csökkentettük.

## 1.2. A ropinirol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek ionáramaira

A ropinirol ionáramokra gyakorolt hatásait feszültség-clamp körülmények között vizsgáltuk a koncentráció függvényében, a koncentrációt 0,1  $\mu\text{M}$  és 300  $\mu\text{M}$  között fél dekádonként 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  $\mu\text{M}$  nifedipinnel, a késői káliumáram lassú komponensét ( $I_{Ks}$ ) 1  $\mu\text{M}$  HMR-1556 hozzáadásával gátoltuk. Az  $I_{Kr}$  farokáramok amplitúdóját a ropinirol emelkedő koncentrációi egyre nagyobb mértékben csökkentették (**4.A ábra**). Az  $IC_{50}$  érték  $2,7 \pm 0,25 \mu\text{M}$ -nak adódott, a Hill-koefficiens  $0,92 \pm 0,09$  volt 5 szívizomsejt átlagában (**4.B ábra**). Az  $I_{Kr}$  aktivációjának feszültségfüggése a negatívabb potenciálok felé tolódott 3  $\mu\text{M}$  ropinirol jelenlétében: a félaktivációs feszültség ( $V_{0,5}$ )  $-14,4 \pm 1,8 \text{ mV}$ -ról  $-21,3 \pm 1,1 \text{ mV}$ -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 (**4.C ábra**). A ropinirol felgyorsította az  $I_{Kr}$  aktivációját. Az aktivációs időállandó  $34 \pm 4 \text{ ms}$ -ról  $14 \pm 1 \text{ ms}$ -ra csökkent 3  $\mu\text{M}$  ropinirol jelenlétében ( $P < 0,05$ , **4.D ábra**). Eredményeink szerint a ropinirol okozta  $I_{Kr}$  gátlás az aktiváció gyorsulása ellenére alakult ki. A ropinirol 3  $\mu\text{M}$  koncentrációban nem változtatta meg a lassú és gyors deaktivációs időállandókat (**4.E ábra**).

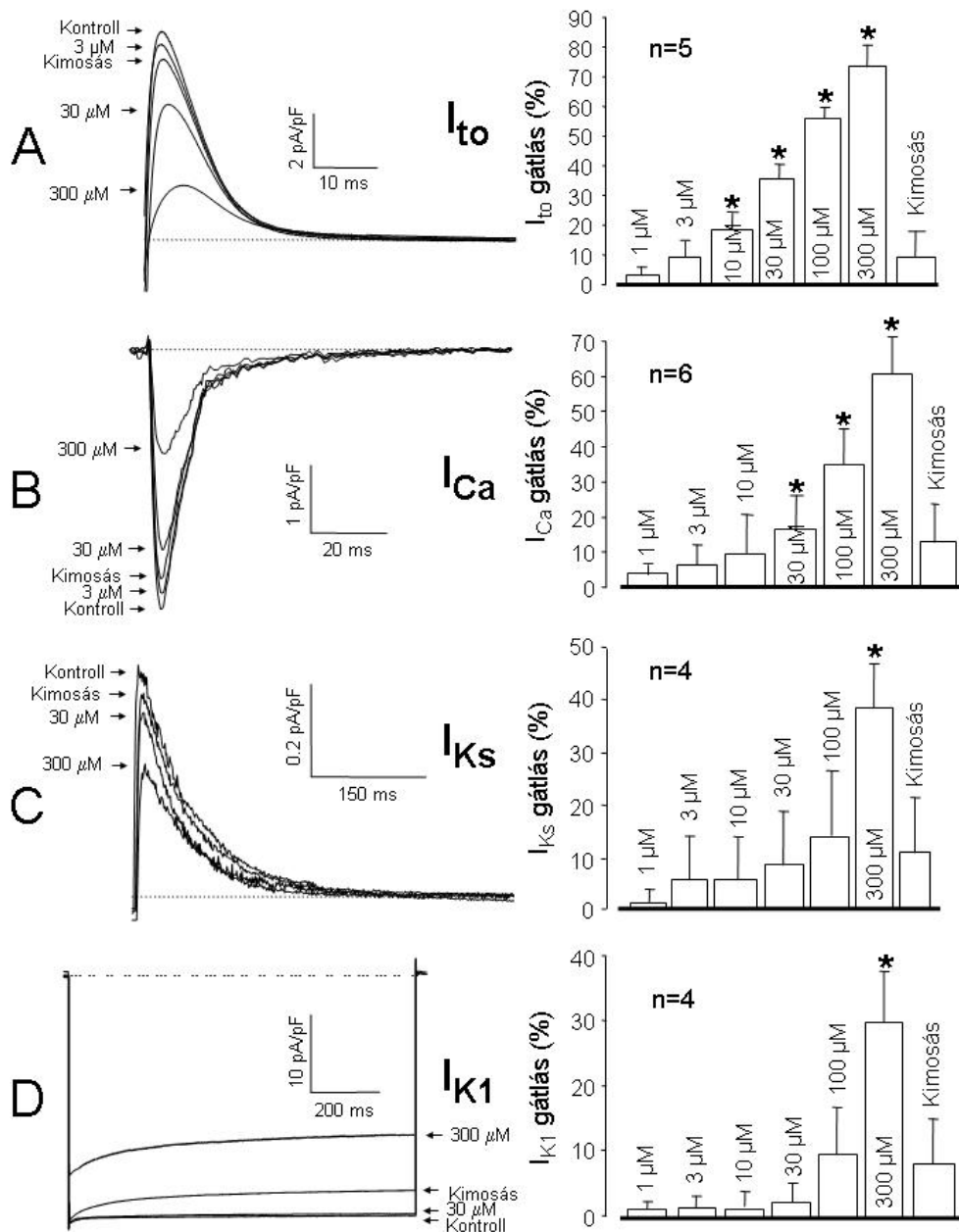


**4. ábra.** **A, B** A ropinirol kumulatív koncentrációfüggő hatásai az  $I_{Kr}$  ionáramra konvencionális feszültség-clamp körülmények között. **A** Reprezentatív egymásra vetített  $I_{Kr}$  farokáram regisztrátumok ropinirol adása előtt és növekvő koncentrációjú ropinirol jelenlétében. **B** Az  $I_{Kr}$  gátlás dózis-hatás görbét 5 szívizomsejten vizsgáltuk, az adatokat a Hill-egyenlethez illesztettük. **C-E** 3  $\mu$ M ropinirol  $I_{Kr}$  gátló hatásának kinetikai tulajdonságai. **C** Az  $I_{Kr}$  aktivációjának feszültségfüggése. Az áram csúcsamplitúdóit az aktiváló feszültségértékek függvényében ábrázoltuk, majd a Boltzmann-függvénnyel illesztettük. **D** Az aktivációs időállandót a „tail-envelope” teszttel nyert adatok monoexponenciális illesztése során nyertük +50 mV-ra történő depolarizáló impulzusokat alkalmazva majd a farokáram amplitúdókat -40 mV-on meghatározva. A depolarizáló impulzusok időtartamát az abszcisszán ábrázoltuk. **E** Az  $I_{Kr}$  deaktivációját két exponenciális tag (egy gyors és egy lassú) komponens összegeként illesztettük meg 6 sejtről nyert adatok alapján ( $\tau_{gyors}$  és  $\tau_{lassú}$  a két komponens időállandóját jelzi).

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 (**5.A ábra**).

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 (**5.B ábra**).

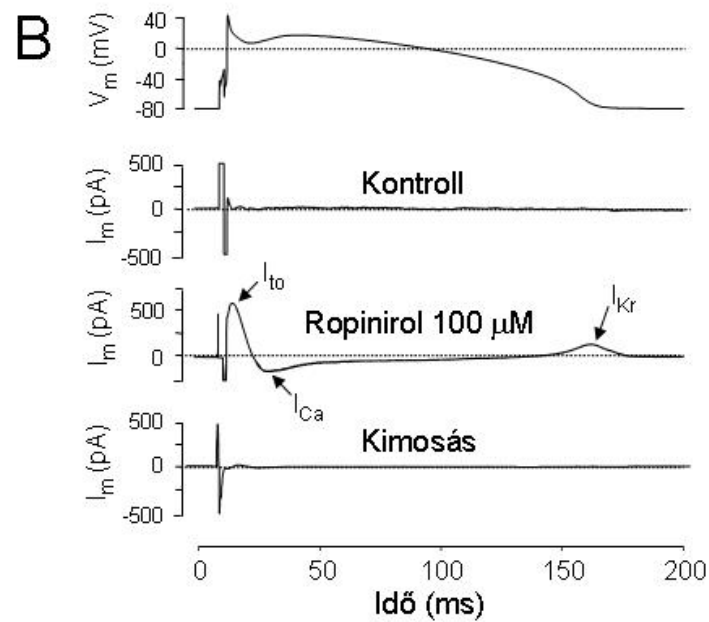
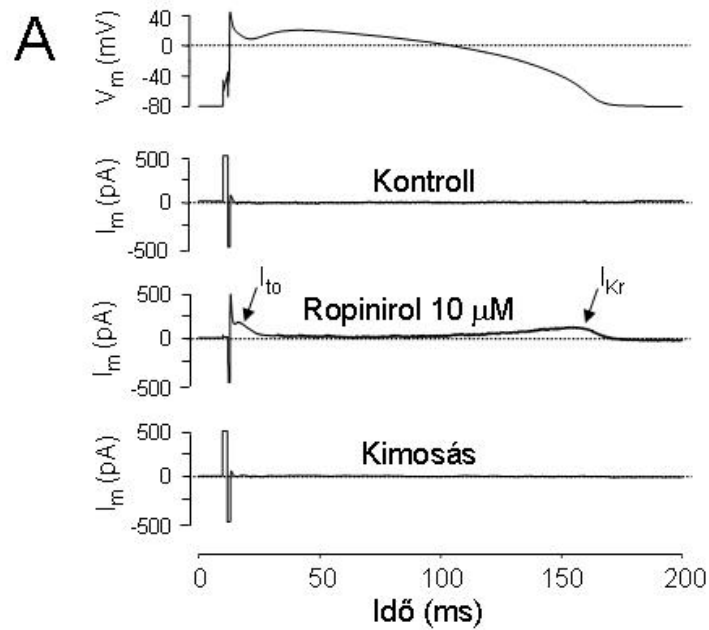
A késői káliumáram lassú komponensét ( $I_{Ks}$ ) -40 mV tartófeszültségről +50 mV-ra történő 3 s hosszú depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Az L-típusú kalciumcsatornát 5  $\mu$ M nifedipinnel, a késői káliumáram gyors komponensét ( $I_{Kr}$ ) 1  $\mu$ M E4031 hozzáadásával gátoltuk. A befelé egyenirányító 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 (**5.C,D ábra**).



**5. ábra.** A ropinirol kumulatív koncentrációfüggő hatásai az  $I_{to}$  (A),  $I_{Ca}$  (B),  $I_{Ks}$  (C) és  $I_{K1}$  (D) ionáramokra konvencionális feszültség-clamp körülmények között. A bal oldali ábrákon a ropinirol adása előtti, a növekvő koncentrációjú ropinirol jelenlétében mért, majd a kimosás után kapott reprezentatív regisztrátumokat mutatjuk be. Az  $I_{Ca}$ -t és  $I_{to}$ -t a testpulszus során kialakuló áramcsúcsként,  $I_{Ks}$ -t a tartófeszültségre történő repolarizáció során nyert farokáramként regisztráltuk. Az  $I_{to}$ ,  $I_{Ca}$  és  $I_{Ks}$  áramok amplitúdóit a csúcsértékek és a steady-state értékek közötti különbségként határoztuk meg.  $I_{K1}$  esetében a teszt impulzus végén mérhető áram értékeket határoztuk meg és ábrázoltuk. Az  $I_{to}$ ,  $I_{Ks}$  és  $I_{K1}$  mérések során az L-típusú kalciumcsatornát 5  $\mu\text{M}$  nifedipinnel, míg a késői káliumáram gyors komponensét ( $I_{Kr}$ ) 1  $\mu\text{M}$  E4031 hozzáadásával gátoltuk. Az  $I_{Ca}$  méréseknél a káliumáramokat 3 mM 4-aminopiridin, 1  $\mu\text{M}$  E4031 és 1  $\mu\text{M}$  HMR-1556 hozzáadásával gátoltuk. A jobb oldali ábrarészekben a ropinirol gátló hatásainak koncentráció-függését mutatjuk be, ahol n a vizsgált szívizomsejtek számát jelzi.

### 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 (6. ábra). A késői kifelé irányuló áramcsúcs, mely a kutya szívműködés akciós potenciáljának terminális repolarizációs fázisával esik egybe, az  $I_{Kr}$  és  $I_{Kl}$  gátlását egyaránt tükrözheti (117). 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. Amint a 6. ábra bemutatja, a ropinirol mind az  $I_{Kr}$ , mind az  $I_{to}$  áramot gátolta 10  $\mu$ M koncentrációban, míg az  $I_{Ca}$  blokádnál volt észlelhető. Az akciós potenciál clamp üzemmódban kapott eredmények tehát egybevágóak a feszültség-clamp körülmények között végzett mérések adataival. A ropinirol hatásai kimosás után teljesen reverzibilisnek bizonyultak.

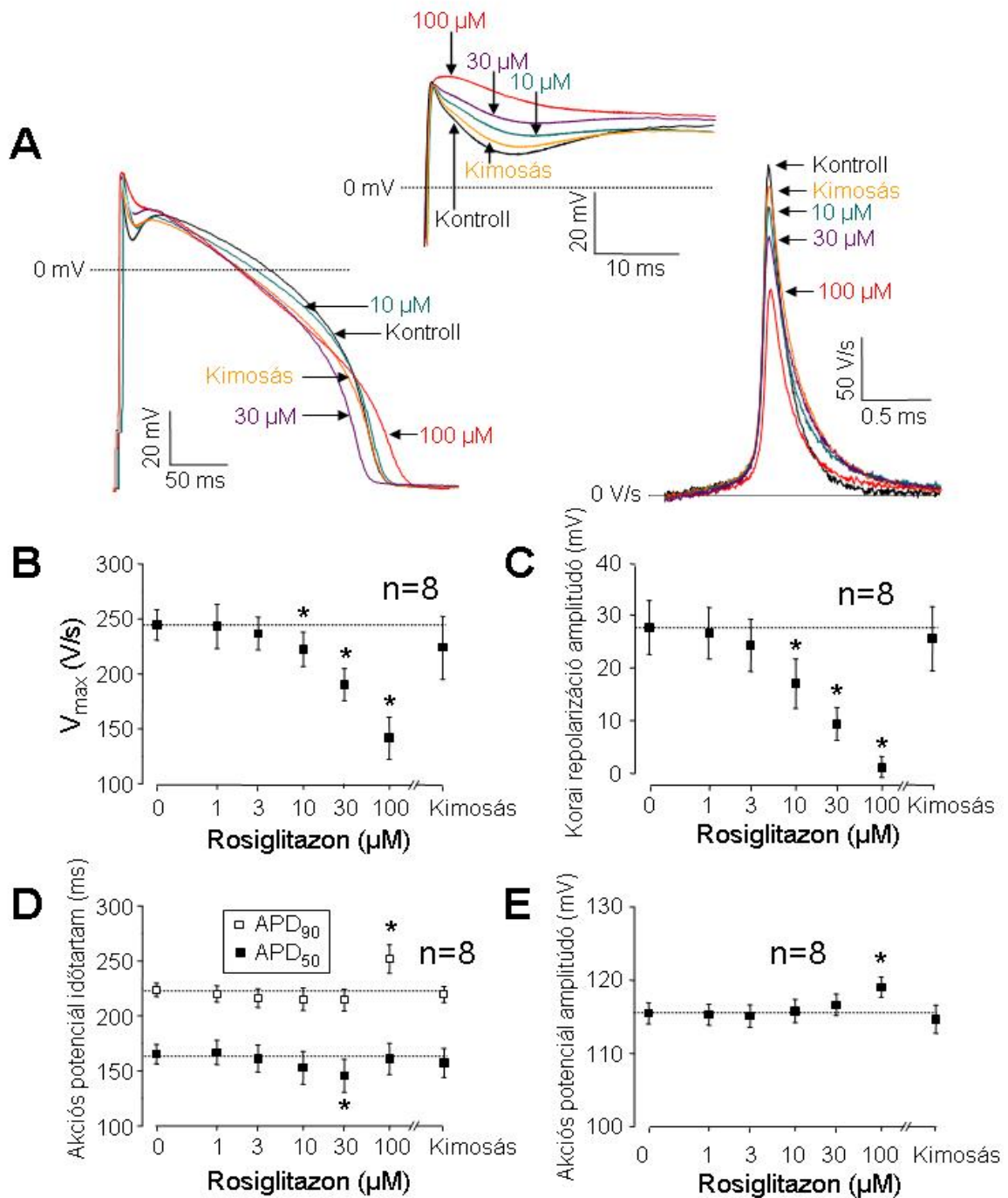


**6. ábra.**  $10 \mu\text{M}$  (A) és  $100 \mu\text{M}$  (B) ropinirol hatásai az ionáramokra akciós potenciál clamp körülmények között. A parancsjelet (felső regisztrátum) és a ropinirol adása előtt, alatt és a kimosás után nyert áramprofilok reprezentatív regisztrátumai. Mivel az ionáramokat ugyanazon a sejten mértük, melyről az akciós potenciál parancsjelet nyertük, a gyógyszer adása előtti áramjel egy nulla szintben futó vízszintes vonal. A szaggatott vonalak a nulla áram szintet jelzik mindegyik regisztrátumon.

## 2. A rosiglitazon vizsgálata során nyert eredmények

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

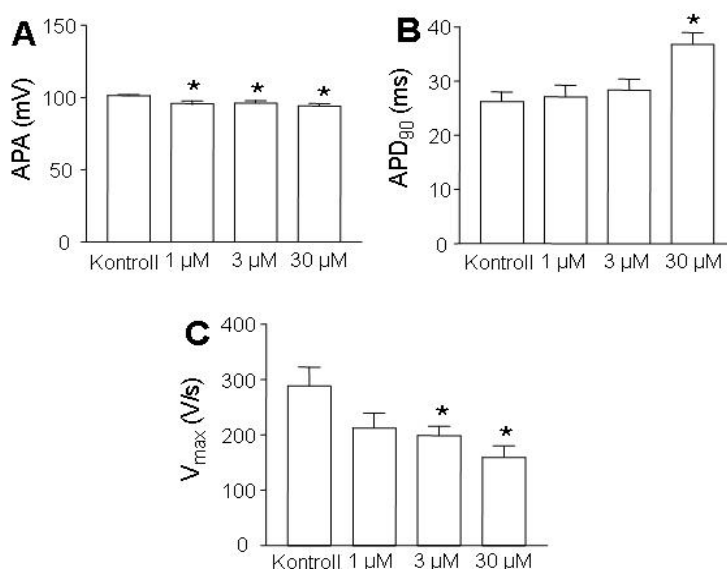
A rosiglitazon komplex, koncentrációfüggő változásokat idézett elő az 1 Hz frekvenciával ingerelt kutya kamrai szívműsejtek (négy kutyából származó nyolc sejt) akciós potenciáljának morfológiájában. A szer csökkentette az akciós potenciál korai repolarizációs fázisának amplitúdóját, a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ) és hatására a plató fázis depressziója is észlelhető volt (**7.A ábra**). A rosiglitazon ezen hatásai 10  $\mu$ M koncentrációtól voltak szignifikánsak (**7.B,C ábra**). Az akciós potenciál időtartama kis mértékben változott, bár 30  $\mu$ M koncentrációnál az APD<sub>50</sub> értékek szignifikáns rövidülését, míg 100  $\mu$ M koncentrációnál az APD<sub>90</sub> megnyúlását tapasztaltuk (**7.D ábra**). A  $V_{max}$  csökkenése ellenére az akciós potenciál amplitúdója (APA) nem csökkent, sőt 100  $\mu$ M rosiglitazon jelenlétében szignifikánsan növekedett (**7.E ábra**). A rosiglitazon hatásai gyorsan, 2-3 perc alatt kialakultak és 10 perces Tyrode oldattal történő kimosás után visszafordíthatónak bizonyultak.



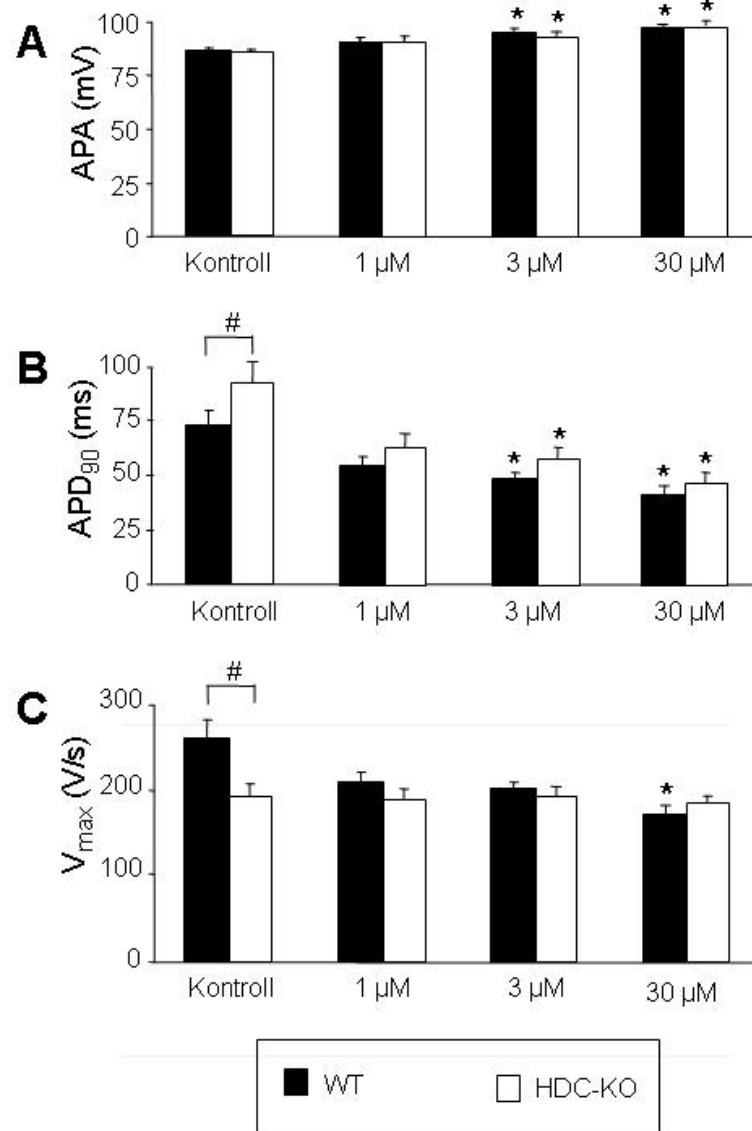
**7. ábra.** A Rosiglitazon kumulatív koncentrációfüggő hatásai az akciós potenciál paramétereire. Az akciós potenciál korai eseményeit az ábrabetétben felnagyítva, az akciós potenciál felszálló szárának idő szerinti első deriváltját a jobb oldalon ábrázoltuk. **B-E** A Rosiglitazon kumulatív koncentrációfüggő hatásai a depolarizáció maximális sebességére ( $V_{max}$ ), a korai repolarizáció nagyságára, az akciós potenciál amplitúdójára (APA), valamint az akciós potenciál időtartamára (APD<sub>50</sub> és APD<sub>90</sub>). A Rosiglitazon mindegyik koncentrációjával 3 percig perfundáltunk, majd 10 perces mosás következett. Az eredményeket a négy kutyából származó nyolc szívizomsejten mért adatok átlagaként adjuk meg. A gyógyszer adása előtti kontroll értéket pontozott vonal, míg a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ( $P < 0,05$ ) különbséget csillag jelzi.

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 szívműködés vizsgálatára is. A rágcsáló mintákon végzett mérések adatait a kutya szívműködés nyert eredményekkel együtt mutatom be. A rosigitazon komplex, nem minden esetben egybevágó elektrofiziológiai hatásokat fejtett ki a kis rágcsálók papilláris szívműködésén és a kutya kamrai izomsejteken.

Patkányokban a rosigitazon az APA koncentrációfüggő csökkenését idézte elő (8.A ábra), ezzel szemben mind a vad típusú, mind a HDC-KO egereknél az APA növekedését tapasztaltuk (9.A ábra). A vad típusú egereknél a rosigitazon koncentrációfüggő módon, szignifikánsan csökkentette a nátriumáram indirekt jelzőjeként értékelhető  $V_{max}$  értéket, ez a változás HDC-KO egereknél nem volt észlelhető (9.C ábra). A rosigitazon patkány papilláris szívműködésén a  $V_{max}$  értékek szignifikáns, koncentrációfüggő csökkenését okozta, ezek az eredmények egybevágóak a Kavak és mtsai által közölt adatokkal (118) (8.C ábra). Az akciós potenciál időtartama, főként a terminális repolarizáció fázisa úgyszintén változott: az  $APD_{90}$  patkányban megnyúlt (8.B ábra), míg egérben koncentrációfüggő módon rövidült (9.B ábra).



**8. ábra.** Patkány jobb kamrai papilláris izmából származó sejtek elektrofiziológiai paraméterei kontroll körülmények között és 1, 3 és 30 μM rosigitazon adását követően. Az APA (A),  $APD_{90}$  (B) és  $V_{max}$  (C) mérések eredményeit 15 preparátum vizsgálata során nyert átlag  $\pm$  SE értékeket megadva mutatjuk be. Csillaggal a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ( $P < 0,05$ ) különbséget jelöltük.

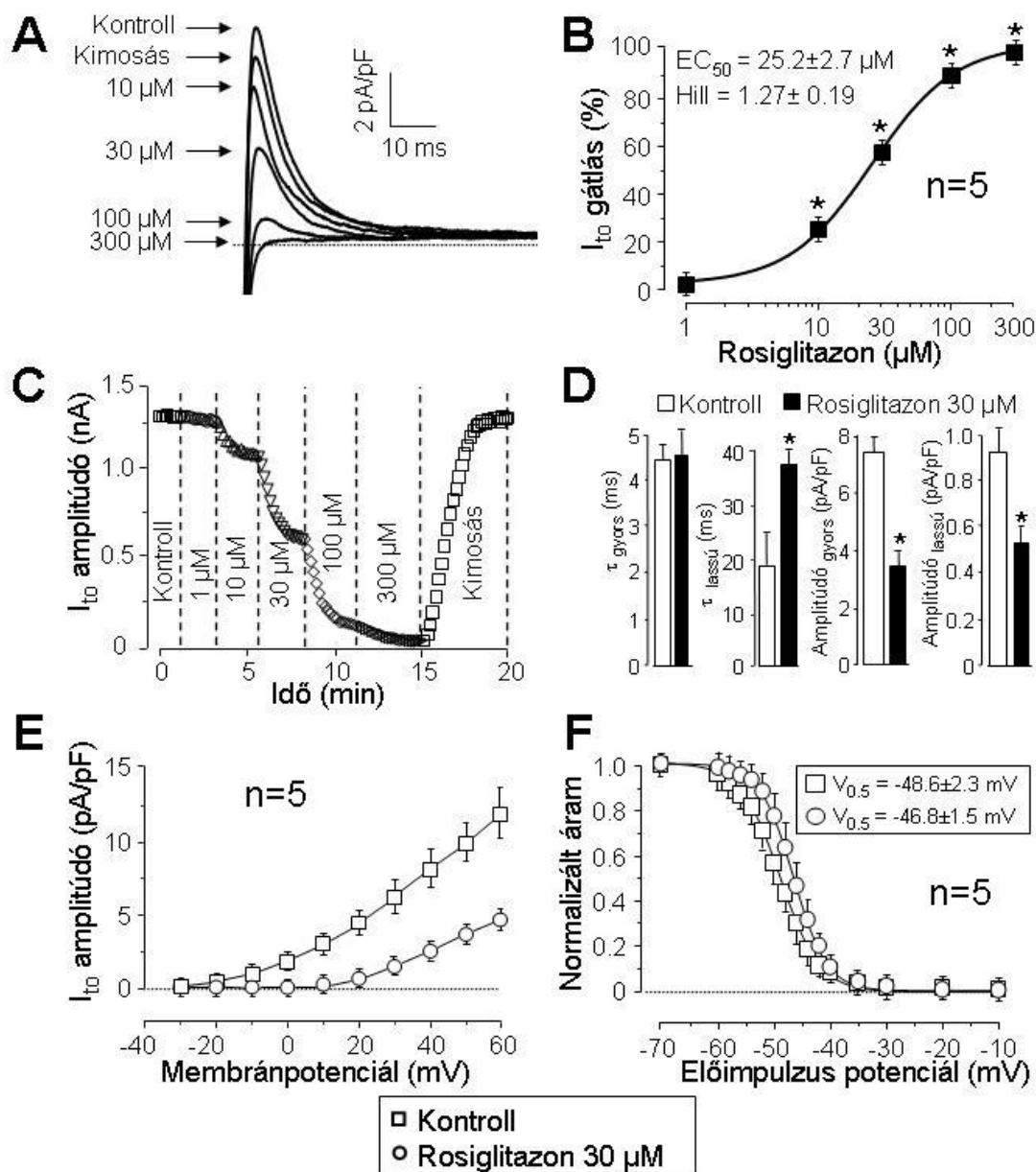


**9. ábra.** Vad típusú (WT) és hisztidin-dekarboxiláz hiányos (HDC-KO) egerek jobb kamrai papilláris izmából származó sejtek elektrofiziológiai paraméterei kontroll körülmények között és 1, 3 és 30  $\mu$ M rosiglitazon adását követően. A (\*) a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbséget, a (#) a WT és a HDC-KO egerek közötti szignifikáns különbséget mutatja ( $n = 15$ ).

## 2.2. A rosiglitazon hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek ionáramaira

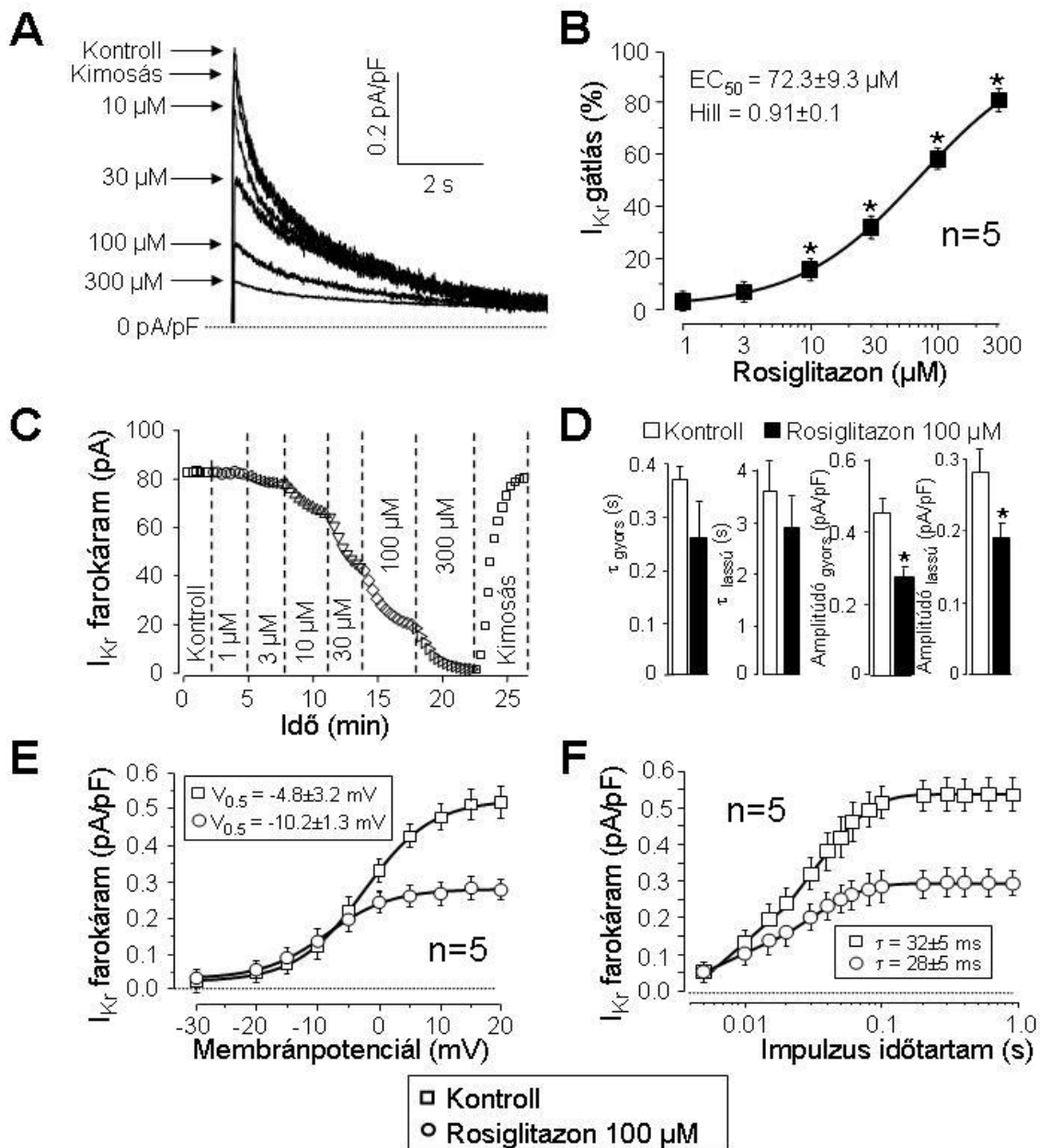
A rosiglitazon ionáramokra gyakorolt hatásait feszültség-clamp körülmények között vizsgáltuk az alkalmazott koncentráció függvényében, amit 1  $\mu\text{M}$ -tól 300  $\mu\text{M}$ -ig féldekádonként növeltünk. Az áramok kinetikai tulajdonságaira gyakorolt hatásokat a félhatásos koncentrációk közelében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

A tranziens kifelé irányuló káliumáramot ( $I_{\text{to}}$ ) 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  $I_{\text{to}}$  amplitúdóját a vizsgált 5 szívizomsejten. A rosiglitazon hatása 10  $\mu\text{M}$  koncentrációtól volt statisztikailag szignifikáns, az  $\text{EC}_{50}$  érték  $25,2 \pm 2,7 \mu\text{M}$ -nak adódott, a Hill-koefficiens  $1,27 \pm 0,19$  volt (**10.A,B ábra**). A rosiglitazon hatása gyorsan, 2-3 perc alatt, kialakult és teljes mértékben kimosható volt (**10.C ábra**). A rosiglitazon megváltoztatta az  $I_{\text{to}}$  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 (**10.D ábra**). Az  $I_{\text{to}}$  aktiválásához rosiglitazon jelenlétében nagyobb depolarizációra volt szükség és az aktivációs küszöb -20 mV-ról +20 mV-ra tolódott (**10.E ábra**), míg az inaktiváció feszültségfüggésében nem volt szignifikáns változás (**10.F ábra**).



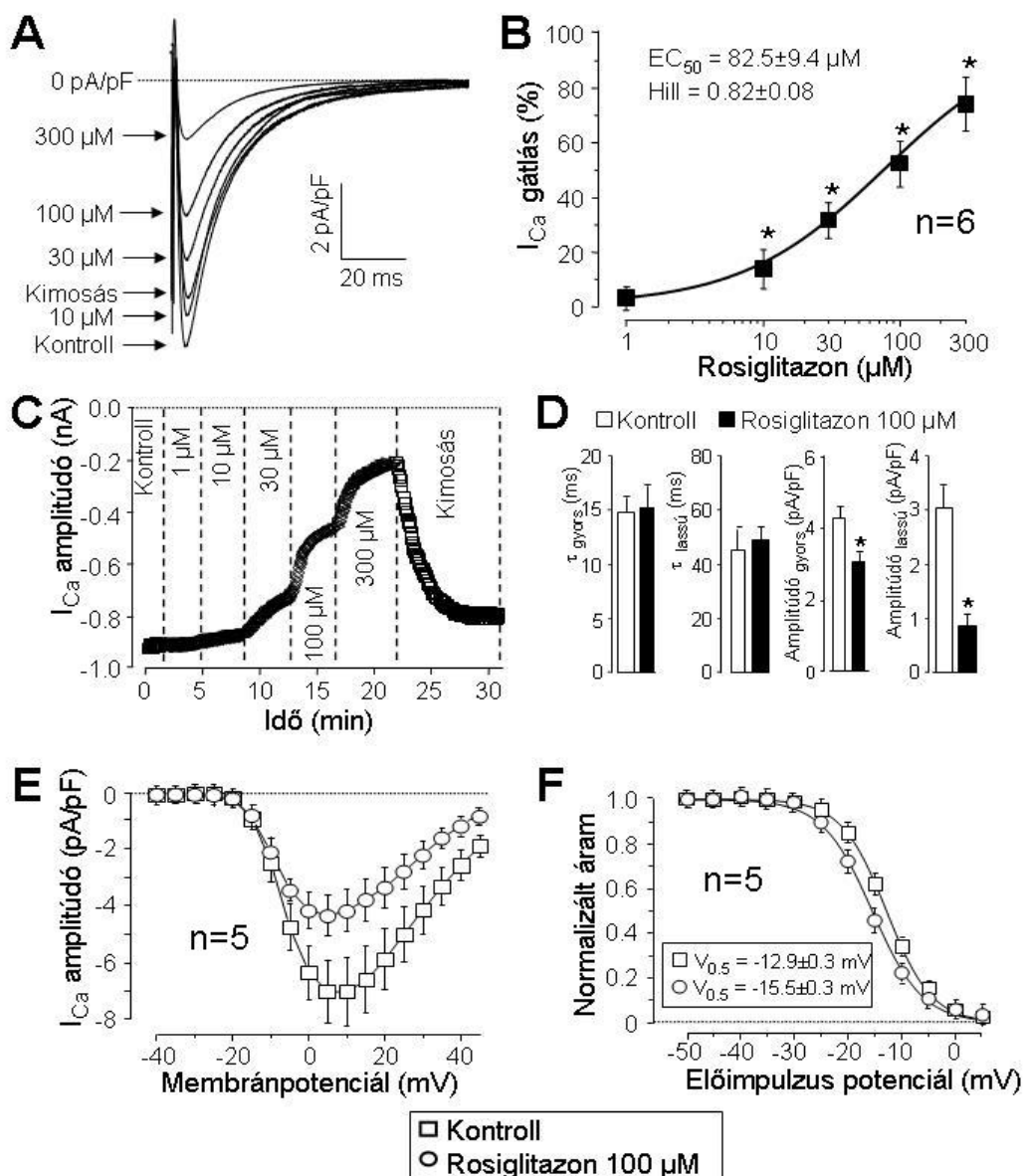
**10. ábra.** A rosiglitazon kumulatív koncentrációfüggő hatásai az  $I_{10}$  ionáramra konvencionális feszültség-clamp körülmények között. **A** Reprezentatív  $I_{10}$  regisztrátumok rosiglitazon adása előtt és növekvő koncentrációjú rosiglitazon jelenlétében. **B** Az  $I_{10}$  gátlás dózis-hatás görbéje 5 szívizomsejt átlagában. Az  $EC_{50}$  értékeket és a Hill-koefficienseket a Hill-egyenlettel történő illesztéssel nyertük. **C** A rosiglitazon  $I_{10}$ -ra kifejtett hatásának időbeli lefolyása és reverzibilitása egy reprezentatív sejten bemutatva. **D-F** 30  $\mu\text{M}$  rosiglitazon hatása az  $I_{10}$  kinetikai tulajdonságaira 5 szívizomsejten vizsgálva. **D** Az  $I_{10}$  inaktivációjának időfüggése. Az áram inaktivációját biexponenciális függvénnyel illesztettük egy gyors és egy lassú komponens összegeként. **E** Az  $I_{10}$  aktivációjának feszültségfüggése. Az áram csúcsamplitúdóit az aktiváló feszültség függvényében ábráztuk. **F** A rosiglitazon hatása az  $I_{10}$  steady-state inaktivációjának feszültségfüggésére. A +50 mV-ra történő depolarizáló impulzust megelőzően -70 és +10 mV közötti előimpulzusokat alkalmaztunk. Az előimpulzusokat követő áramcsúcsokat a -70 mV-os előimpulzushoz tartozó áramcsúcsra normalizáltuk és az előimpulzusok feszültségértékének függvényében ábráztuk, majd a Boltzmann-függvénnyel illesztettük. A csillagok a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ( $P < 0,05$ ) különbségeket mutatják.

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 (**11.A ábra**). 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 (**11.B ábra**). Hasonlóan az  $I_{I_0}$ -nál tapasztalt változásokhoz, a rosiglitazon  $I_{Kr}$ -re irányuló gátló hatása is gyorsan kialakult és teljes mértékben reverzibilis volt (**11.C ábra**). 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 (**11.D ábra**). 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 (**11.E ábra**). Az  $I_{Kr}$  aktivációjának monoexponenciális időállandója nem változott 100  $\mu$ M rosiglitazon jelenlétében (**11.F ábra**).



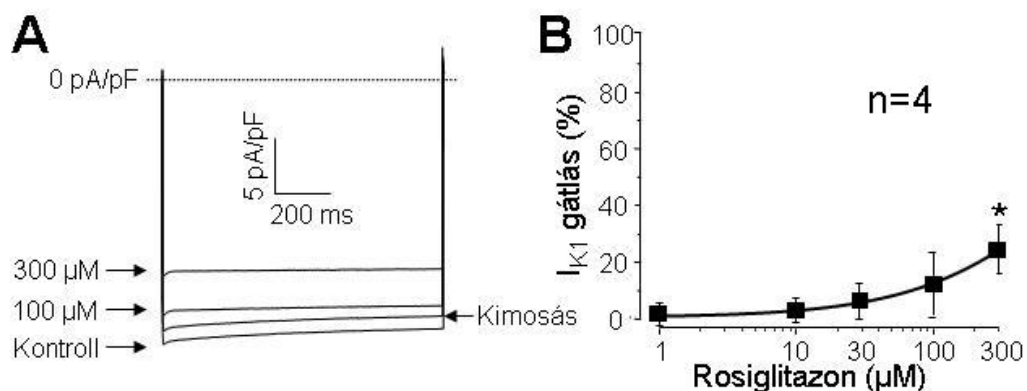
**11. ábra.** A rosiglitazon kumulatív koncentrációfüggő hatásai a késői káliumáram gyors komponensére ( $I_{Kr}$ ) feszültség-clamp körülmények között. **A** Reprezentatív  $I_{Kr}$  farokáram regisztrátumok rosiglitazon adása előtt és növekvő koncentrációjú rosiglitazon jelenlétében. **B** Az  $I_{Kr}$  gátlás dózis-hatás görbéje 5 szívizomsejt adatai alapján, a Hill-egyenlet segítségével meghatározott félhatásos koncentráció és Hill-koefficienssel. **C** A rosiglitazon  $I_{Kr}$ -re kifejtett hatásának időbeli lefolyása és reverzibilitása egy reprezentatív kísérletben bemutatva. **D-F** 100  $\mu\text{M}$  rosiglitazon hatása az  $I_{Kr}$  kinetikai tulajdonságaira 5 szívizomsejten vizsgálva. **D** Az  $I_{Kr}$  deaktivációjának időfüggése. Az áram deaktivációját egy gyors és egy lassú komponens összegeként illesztettük. **E**  $I_{Kr}$  aktivációjának feszültségfüggése. A farokáram amplitúdóit az aktiváló feszültség függvényében ábrázoltuk és a Boltzmann-függvénnyel illesztettük. **F** Az aktivációs időállandót a "tail-envelop" teszttel nyert adatok monoexponenciális illesztésével nyertük. Csillaggal a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ( $P < 0,05$ ) különbségeket jelöltük.

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 (**12.A,B ábra**). Az  $I_{Ca}$  gátlása csak részben volt visszafordítható a  $10$  perces kimosási periódust követően (**12.C ábra**). 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 (**12.D ábra**). A rosiglitazon nem változtatta meg az  $I_{Ca}$  áram-feszültség karakterisztikáját (**12.E ábra**), ezzel szemben  $100$   $\mu$ M rosiglitazon serkentette a steady-state inaktivációt (**12.F ábra**). A félinaktivációs 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,  $P < 0,05$ ,  $n = 5$ ).



**12. ábra.** A rosiglitazon kumulatív koncentrációfüggő hatásai  $I_{Ca}$  áramra feszültség-clamp üzemmódban. **A** Rosiglitazon adása előtt és növekvő koncentrációjú rosiglitazon jelenlétében nyert reprezentatív regisztrátumok. **B** Az  $I_{Ca}$  gátlás dózis-hatás görbéje 6 szívizomsejten vizsgálva, a Hill-egyenlet segítségével meghatározott félhatásos koncentráció és Hill-koefficienssel. **C** A rosiglitazon  $I_{Ca}$ -ra kifejtett hatásának időbeli lefolyása és reverzibilitása egy reprezentatív sejten bemutatva. **D-F** 100  $\mu$ M rosiglitazon hatása az  $I_{Ca}$  kinetikai tulajdonságaira 5 szívizomsejten vizsgálva. **D**  $I_{Ca}$  inaktivációjának időfüggése. Az áram inaktivációját biexponenciális függvénnyel tudtuk megilleszteni egy gyors és egy lassú komponens összegeként. **E** Az  $I_{Ca}$  amplitúdójának feszültségfüggése. Az áram csúcsamplitúdóját az aktiváló feszültség függvényében ábrázoltuk. **F** A rosiglitazon hatása az  $I_{Ca}$  steady-state inaktivációjának feszültségfüggésére. A +5 mV-ra történő depolarizáló impulzust megelőzően -50 és +5 mV közötti előimpulzusokat alkalmaztunk. Az előimpulzusokat követő áramcsúcsokat a -50 mV-os előimpulzushoz tartozó áramcsúcsához normalizáltuk, az előimpulzusok feszültségértékének függvényében ábrázoltuk, majd a Boltzmann-függvénnyel illesztettük. Csillaggal a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ( $P < 0,05$ ) különbséget jelöltük.

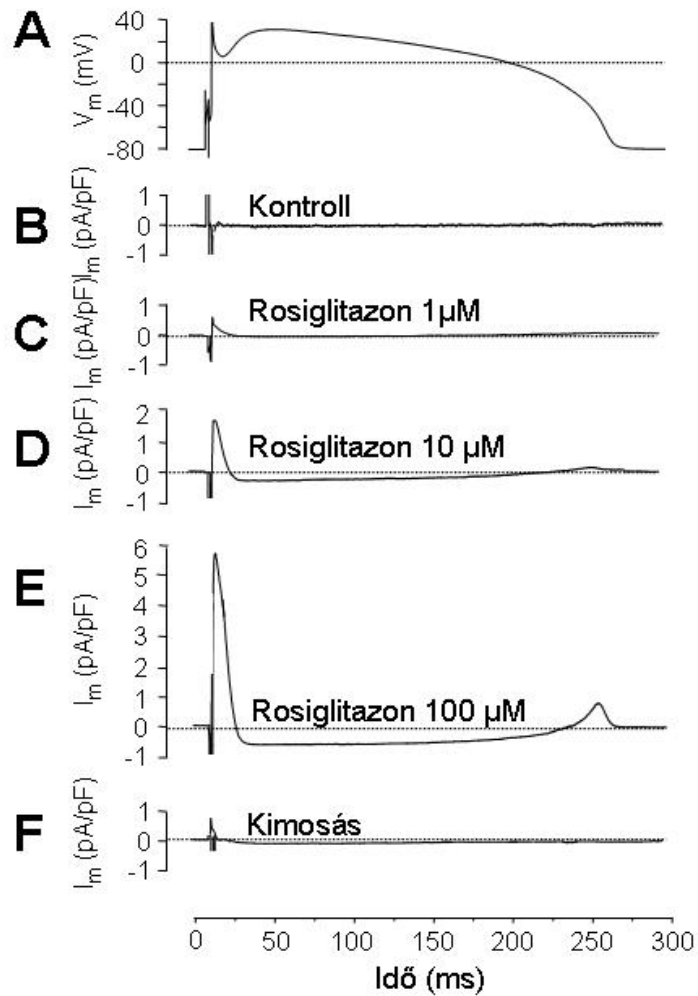
A befelé egyenirányító káliumáramot ( $I_{K1}$ ) -40 mV-ról -135 mV-ra történő hiperpolarizáció alkalmazásával tanulmányoztuk. A steady-state áramot 400 ms-mal az impulzus kezdete után határoztuk meg. A rosiglitazon 100  $\mu\text{M}$  koncentráció mellett az  $I_{K1}$  áramot szignifikánsan nem változtatta meg a tanulmányozott 4 sejtben (**13. ábra**). Magasabb (300  $\mu\text{M}$ ) koncentrációnál  $I_{K1}$  kis mértékű reverzibilis gátlása volt megfigyelhető.



**13. ábra.** A rosiglitazon kumulatív koncentrációfüggő hatása az  $I_{K1}$  áramra konvencionális feszültség-clamp körülmények között. **A** Reprezentatív  $I_{K1}$  ionáramok rosiglitazon adása előtt és növekvő koncentrációjú rosiglitazon jelenlétében. **B** Az  $I_{K1}$  gátlás dózis-hatás görbéje 4 szívizomsejt átlagában.

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

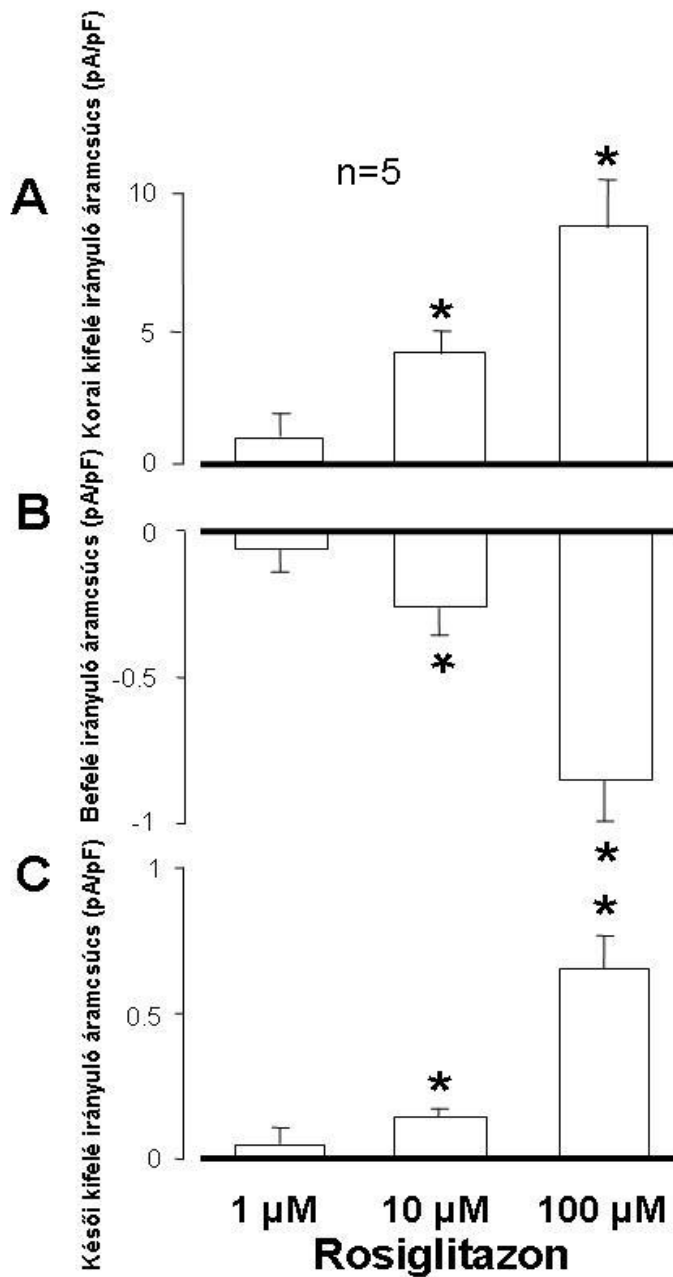
Az ionáramok profilja akciós potenciál clamp üzemmódban vizsgálva jelentősen eltér a konvencionális feszültség-clamp körülmények között észlelt profiltól (119). Az akciós potenciál clamp technika előnye, hogy bármely vizsgált gyógyszer nettó membrán áramra gyakorolt hatása vizsgálható, ezáltal egyszerre 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 (117). Ennek megfelelően a korai kifelé irányuló áramcsúcs az  $I_{t0}$  gátlásakor jelenik meg, míg a befelé irányuló áramtranziens az  $I_{Ca}$  blokádjának a következménye (**14. ábra**).



**14. ábra.**  $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  és  $100 \mu\text{M}$  rosiglitazon hatása az áramokra akciós potenciál clamp körülmények között. A parancsjelet (A) és a rosiglitazon adása előtt (B), alatt (C-E), és a kimosás után (F) nyert áramprofilok reprezentatív regisztrátumai. Mivel az áramokat ugyanazon a sejten mértük, melyről az akciós potenciál parancsjelet nyertük, a gyógyszer adása előtti áramjel egy nulla szintben futó vízszintes vonal. A szaggatott vonalak a nulla áram szintet jelzik mindegyik regisztrátumon (az A panelt kivéve, amelyen a szaggatott vonal a nulla feszültséget jelzi).

A késői kifelé irányuló áramcsúcs, mely a kutya szívizomsejt 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. A három áramcsúcs (korai kifelé irányuló, befelé

irányuló és késői kifelé irányuló áram) nagyságának változásait, melyeket 5 sejten végzett mérések adatainak átlagolásával kaptunk, a **15. ábra** mutatja be.



**15. ábra.** 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  és 100  $\mu\text{M}$  rosigitazon hatása a korai kifelé irányuló áramcsúcsra, mely  $I_{to}$ -nak felel meg (A), a befelé irányuló,  $I_{Ca}$ -nak megfelelő áramcsúcsra (B) és a késői kifelé irányuló áramcsúcsra, mely elsősorban az  $I_{Kr}$ -nek felel meg (C) akciós potenciál clamp körülmények között 5 szívizomsejten vizsgálva. Csillaggal a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ( $P < 0,05$ ) különbségeket jelöltük.

# 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. Ez az érték valamivel magasabb, mint a CHO sejteken expresszált HERG csatornákon mért  $1,2 \mu\text{M}$  félgátló koncentráció (29). 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 (120). 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 (121). A  $V_{max}$  gátlás frekvenciafüggő komponense gyors kinetikával jellemezhető, mivel a ciklushossz  $1 \text{ s}$  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 (122). 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 (111, 112). Egyszeri 12 mg dózis bevitelét követően 33 ng/ml (110 nM) plazma csúcskoncentrációt mértek egészséges önkéntesekben (123). A ropinirol 40%-os fehérjekötődését is figyelembe véve (124) nem valószínű, hogy a gyógyszer egészséges egyének szívműködésének elektrofiziológiai tulajdonságait befolyásolja.

Azokban a klinikai vizsgálatokban, melyekben a ropinirolt placebóval vagy másik dopamin agonista szerrel hasonlították össze, syncope gyakrabban fordult elő a ropinirolt szedő betegeknél, mint a kontroll csoportban. A syncope eseteket többnyire orthostaticus hypotensioval hozták összefüggésbe, mely a  $\text{D}_2$  receptorok ingerlése útján a felálláskor bekövetkező fiziológiás noradrenerg válasz hiányával és a peripheriás vascularis rezisztencia csökkenésével magyarázható (125). A posturalis vérnyomásesés hátterében a  $\text{D}_4$  receptorok aktiválása és ennek következtében a noradrenalin felszabadulásának gátlása is állhat (126).

EKG leírás azonban mindössze egyetlen syncopés esetről áll rendelkezésre: a leírás szerint 1,5 mg teszt dózis bevitelét követően egy betegben prodromalis tüneteket (gyengeség, hányinger, hányás) követően bradycardia és átmeneti eszméletvesztés következett be (127). A  $\text{D}_2$  presynapticus receptorok stimulatioja (128) vagy a  $\text{D}_2/\text{D}_3$  striatalis receptorok ingerlése révén (129) ropinirol hatására az autonóm idegrendszer egyensúlya felborulhat, parasympaticus túlsúly alakulhat ki. Az ily módon kialakult vagustúlsúly tüneteket okozó bradycardiát és pitvarfibrillatiót egyaránt okozhat. Egy másik közlemény szerint egy 51 éves, strukturálisan ép szívű betegben kis dózissal (napi 0,5 mg) ropinirol szedése mellett ismételt eszméletvesztéssel járó sinuscsomó dysfunctio lépett fel (130). Az autonóm egyensúly hirtelen felborulása a gyógyszer dózisának hirtelen emelésekor vagy az elhúzó hatású forma helyett a standard forma bevitelkor is bekövetkezhet. Két ilyen jellegzetes esetről számol be Di Giacopo: az egyik, egyébként

egészséges 52 éves Parkinson-kórban szenvedő betegben a 24 órás, elhúzódó hatású (extended release, XR) ropinirol adagjának emelése során paroxysmalis pitvarfibrillatio, majd tévedésből az XR helyett 2 mg standard forma (SF) ropinirol bevétele után syncopét okozó átmeneti asystole lépett fel. A másik, 65 éves férfiban az XR helyett tévedésből 2 mg SF ropinirol bevétele után jelentkezett pitvarfibrillatio (131).

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 (132). A veleszületett vagy szerzett hosszú QT syndromás betegek számára pedig a ropinirol az előírás szerinti adagban is veszélyes lehet. Érdeemes lenne azonban azt is tisztázni, hogy a ropinirol proarrhythmias hatásának a hátterében - a pentamidinhez és az arzén-trioxidhoz hasonlóan - nem az  $I_{Kr}$  csatorna érésének gátlása, a sejt felszínre jutó működőképes ioncsatornák számának csökkenése áll-e elsősorban. Ez esetben ugyanis az ioncsatornákra gyakorolt csekély közvetlen gátló hatás ellenére is kialakulhatna a szer mellékhatásaként torsades típusú kamrai ritmuszavar. 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 szívizomsejtek vizsgálata során észlelt korai repolarizáció csökkenés az  $I_{to}$  gátlásával magyarázható ( $EC_{50} = 25,2 \pm 2,7 \mu M$ ) (**10.A ábra**). Hasonlóképpen a plató fázis csökkenése rosiglitazon hatására a  $Ca^{2+}$  és  $Na^{+}$ -áramok gátlására vezethető vissza (**7.A ábra**), míg a  $V_{max}$  depresszióját az  $I_{Na}$  gátlás indikátorának tekinthetjük (121). Az  $I_{to}$  gátlására kapott

adatainkat megerősítették Jeong és munkatársainak vizsgálatai (133), eredményeik szerint a rosiglitazone gátolta a rekombináns  $K_v 4.3$  csatornákat  $25 \mu\text{M}$  félgátló koncentrációval.

Annak ellenére, hogy a rosiglitazon számos ioncsatorna működésére hatással van, az akciós potenciál időtartamát jelentős mértékben nem befolyásolta (kivéve egy mérsékelt  $\text{APD}_{50}$  csökkenést  $30 \mu\text{M}$  és egy  $\text{APD}_{90}$  megnyúlást  $100 \mu\text{M}$  koncentrációnál). Ez annak a következménye, hogy a gyógyszer a plátó fázis során szimultán gátolja a befelé irányuló (window  $I_{\text{Na}}$  és  $I_{\text{Ca}}$ ) és kifelé irányuló ( $I_{\text{Kr}}$  és  $I_{\text{to}}$ ) ionáramokat. A  $V_{\text{max}}$  csökkenése rendszerint együtt jár az APA csökkenésével, ezt a jelenséget azonban nem észleltük a kutya szívműködés vizsgálatok során. Ezzel ellentétben,  $100 \mu\text{M}$  rosiglitazon jelenlétében az APA szignifikáns mértékben növekedett. Ez az  $I_{\text{Na}}$  és az  $I_{\text{to}}$  szimultán blokádjának köszönhető, melyek közül az  $I_{\text{Na}}$  blokádnak az APA csökkenése, az  $I_{\text{to}}$  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  $I_{\text{K1}}$  áramra irányuló viszonylagos hatástalanságával ( $100 \mu\text{M}$ -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  $I_{\text{Ca}}$  áramot patkány (108, 109), nyúl (110) és tengerimalac (106) szívműködésben  $10 \mu\text{M}$ -hoz közeli  $\text{IC}_{50}$  koncentrációval gátolta. Ez jelentősen alacsonyabb, mint a kutya szívműködésben végzett vizsgálataink során a rosiglitazon  $92 \mu\text{M}$  félgátló koncentrációja. A troglitazon az  $I_{\text{Na}}$  áramot is jóval erősebben gátolja, mint a rosiglitazon. Vizsgálatainkban  $100 \mu\text{M}$  rosiglitazon a  $V_{\text{max}}$  kevesebb, mint  $50\%$ -os csökkenését idézte elő. Ezzel szemben  $1 \mu\text{M}$  troglitazone  $50\%$ -os  $V_{\text{max}}$  csökkenést,  $10 \mu\text{M}$  troglitazon pedig az akciós potenciálok teljes eltűnését eredményezte nyúl kamrai szívműködésben (110). 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  $\text{APD}_{90}$  és APA értékekre a különböző állatfajoknál jelentősen eltérőek. Ennek a különbségnek az okát az akciós potenciál morfológia, valamint a patkány, egér és kutya szívműködésben  $K^+$  áramainak kinetikai tulajdonságai

közötti eltérésekben kell keresnünk (intenzív  $I_{to}$ , plátó fázis hiánya patkányban és egérben) (134). 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 (135). 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 (136). Ez a változás észlelhető jelen vizsgálatunkban is: a HDC-KO egerekben az  $APD_{90}$  megnyúlása és a  $V_{max}$  depressziója volt tapasztalható a vad típusú egerekből nyert kontroll értékekkel összehasonlítva (**9.B,C ábra**). Bár közvetlen ionáram mérések a patkány és egér szívműködéseken 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 (137).

#### 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 (138, 139). Ezért nem valószínű, hogy a rosiglitazon szokásos dózisa egészséges egyéneknél befolyásolja a cardialis 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 szívműködéseken 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 (ischaemiás

szívbetegség, hypertonia, hyperlipidaemia) is terhelt, ezekben az esetekben a rosiglitazon proarrhythmias effektusa nem zárható ki. A rosiglitazonról állatkísérletekben bebizonyosodott, hogy ischaemiás állapotban csökkenti a kamrafibrillációs küszöböt (61). A gyógyszer csökkent eliminációja vagy túladagolása esetén pedig a plasma koncentráció olyan tartományba emelkedhet, mely már a szívizomsejtek ioncsatornáit gátolva arrhythmiaakra hajlamosít.

A gyógyszer cardiovascularis biztonságossága továbbra is nyitott kérdés, egymásnak ellentmondóak a kockázat/haszon aránnyal kapcsolatos adatok. A bizonytalan és ellentmondásos klinikai eredmények (80, 81, 84, 97, 98) 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 (140-142). 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 (143). 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 (144-146). A balaglitazon parciális agonista a rosiglitazonhoz hasonló vércukorszint csökkentő hatékonysággal, de kevésbé okoz folyadékretentiót (144). A compound 50 és az MK-0533 a preklinikai fejlesztés fázisában levő, kevesebb mellékhatást okozó parciális agonisták (145, 146). 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 (147, 148).

# 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 egybeváltak 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.

## SUMMARY

The cellular cardiac electrophysiological effects of ropinirole and rosiglitazone were investigated in isolated canine cardiomyocytes. The concentration-dependent effects of both drugs on action potential morphology and the underlying ion currents were studied in enzymatically dispersed canine ventricular cardiomyocytes using standard microelectrode, conventional whole-cell patch clamp, and action potential voltage clamp techniques.

Ropinirole, a dopamine receptor agonist increased action potential duration (APD<sub>90</sub>) and suppressed the rapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>Kr</sub>) with an IC<sub>50</sub> value of 2.7±0.25 μM and Hill coefficient of 0.92±0.09 at concentrations ≥1 μM. At higher concentrations, ropinirole decreased the amplitude of early repolarization (at concentrations ≥10 μM), reduced the maximum rate of depolarization and caused depression of the plateau (at concentrations ≥30 μM), and shortened APD<sub>50</sub> (at 300 μM) indicating a concentration-dependent inhibition of I<sub>to</sub>, I<sub>Na</sub>, and I<sub>Ca</sub>. I<sub>Ks</sub> and I<sub>K1</sub> were not influenced significantly by ropinirole at concentrations less than 300 μM. Suppression of I<sub>Kr</sub>, I<sub>to</sub>, and I<sub>Ca</sub> has been confirmed under conventional patch clamp and action potential voltage clamp conditions.

The results indicate that ropinirole treatment may carry proarrhythmic risk for patients with inherited or acquired long QT syndrome due to inhibition of I<sub>Kr</sub> - especially in cases of accidental overdose or intoxication.

Recent large clinical trials found an association between the antidiabetic drug rosiglitazone therapy and increased risk of cardiovascular adverse events. Because there is little information on the cellular cardiac effects of rosiglitazone, we investigated the cardiac electrophysiological properties of rosiglitazone on isolated rat and murine ventricular papillary muscle cells and canine ventricular myocytes using conventional microelectrode, whole cell voltage clamp, and action potential voltage clamp techniques.

At concentrations ≥10 μM rosiglitazone decreased the amplitude of phase-1 repolarization, reduced the maximum velocity of depolarization and caused depression of the plateau potential in canine ventricular myocytes. In histidine-decarboxylase knockout mice as well as in their wild types rosiglitazone (1-30 μM) shortened APD<sub>90</sub> and increased the action potential amplitude in a concentration-dependent manner. In rat ventricular papillary muscle cells rosiglitazone (1-30 μM) caused a significant reduction of action

potential amplitude and maximum velocity of depolarization which was accompanied by lengthening of APD<sub>90</sub>.

Rosiglitazone suppressed several ion currents in a concentration-dependent manner under conventional voltage clamp conditions in canine ventricular myocytes. The EC<sub>50</sub> value for this inhibition was 25.2±2.7 μM for the transient outward K<sup>+</sup> current (I<sub>to</sub>), 72.3±9.3 μM for the rapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>Kr</sub>), and 82.5±9.4 μM for the L-type Ca<sup>2+</sup> current (I<sub>Ca</sub>) with Hill coefficients close to unity. The inward rectifier K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) was not affected by rosiglitazone up to concentrations of 100 μM. Suppression of I<sub>to</sub>, I<sub>Kr</sub>, and I<sub>Ca</sub> has been confirmed under action potential voltage clamp conditions as well.

Alterations in the densities and kinetic properties of ion currents may carry serious proarrhythmic risk in case of overdose with rosiglitazone, especially in patients having multiple cardiovascular risk factors, like elderly diabetic patients.

**Keywords:** ropinirole, dopamine receptor agonists, rosiglitazone, antidiabetic agents, canine ventricular myocytes, action potential, ion currents, proarrhythmic risk

# 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 segítőkézségüket.

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 segítőkézségükért, türelmükért.

# IRODALOMJEGYZÉK

1. **Kerr WJ , Bender, W.L.** Paroxysmal ventricular fibrillation and cardiac recovery in cases of atrial fibrillation with complete heart block while on quinidine treatment. *Heart* 1929;9(269 ).
2. **Selzer A, Wray HW.** Quinidine Syncope. Paroxysmal Ventricular Fibrillation Occurring During Treatment of Chronic Atrial Arrhythmias. *Circulation* 1964;30:17-26.
3. **Roden DM, Anderson ME.** Proarrhythmia. *Handb Exp Pharmacol* 2006(171):73-97.
4. **Simkó J, Csilek A, Karászi J, Lőrincz I.** Proarrhythmic potential of antimicrobial agents. *Infection* 2008;36(3):194-206.
5. **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* 2003;33:B5 .
6. **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: University of Miskolc, Innovation and Technology Transfer Centre 2003; p. 77-80 .
7. **Roden DM.** Cellular basis of drug-induced torsades de pointes. *Br J Pharmacol* 2008;154(7):1502-7.
8. **Noseworthy PA, Newton-Cheh C.** Genetic determinants of sudden cardiac death. *Circulation* 2008;118(18):1854-63.
9. **Kang J, Chen XL, Wang L, Rampe D.** Interactions of the antimalarial drug mefloquine with the human cardiac potassium channels KvLQT1/minK and HERG. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(1):290-6.
10. **Lightbown ID, Lambert JP, Edwards G, Coker SJ.** Potentiation of halofantrine-induced QTc prolongation by mefloquine: correlation with blood concentrations of halofantrine. *Br J Pharmacol* 2001;132(1):197-204.
11. **Nosten F, ter Kuile FO, Luxemburger C, Woodrow C, Kyle DE, Chongsuphajaisiddhi T, et al.** Cardiac effects of antimalarial treatment with halofantrine. *Lancet* 1993;341(8852):1054-6.

12. **Katchman AN, Koerner J, Tosaka T, Woosley RL, Ebert SN.** Comparative evaluation of HERG currents and QT intervals following challenge with suspected torsadogenic and nontorsadogenic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316(3):1098-106.
13. **Kuryshev YA, Ficker E, Wang L, Hawryluk P, Dennis AT, Wible BA, et al.** Pentamidine-induced long QT syndrome and block of hERG trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312(1):316-23.
14. **Ficker E, Kuryshev YA, Dennis AT, Obejero-Paz C, Wang L, Hawryluk P, et al.** Mechanisms of arsenic-induced prolongation of cardiac repolarization. *Mol Pharmacol* 2004;66(1):33-44.
15. **Wan X, Dennis AT, Obejero-Paz C, Overholt JL, Heredia-Moya J, Kirk KL, et al.** Oxidative inactivation of the lipid phosphatase phosphatase and tensin homolog on chromosome ten (PTEN) as a novel mechanism of acquired long QT syndrome. *J Biol Chem* 2011;286(4):2843-52.
16. **Ray WA, Murray KT, Meredith S, Narasimhulu SS, Hall K, Stein CM.** Oral erythromycin and the risk of sudden death from cardiac causes. *N Engl J Med* 2004;351(11):1089-96.
17. **Straus SM, Sturkenboom MC, Bleumink GS, Dieleman JP, van der Lei J, de Graeff PA, et al.** Non-cardiac QTc-prolonging drugs and the risk of sudden cardiac death. *Eur Heart J* 2005;26(19):2007-12.
18. **Dewey RB, Jr.** Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurol Clin* 2004;22(3 Suppl):S127-39.
19. **Szili-Török T, Kálmán J, Paprika D, Dibó G, Rózsa Z, Rudas L.** Depressed baroreflex sensitivity in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2001;22(3):435-8.
20. **Kallio M, Haapaniemi T, Turkka J, Suominen K, Tolonen U, Sotaniemi K, et al.** Heart rate variability in patients with untreated Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2000;7(6):667-72.
21. **Malik M, Andreas JO, Hnatkova K, Hoeckendorff J, Cawello W, Middle M, et al.** Thorough QT/QTc study in patients with advanced Parkinson's disease: cardiac safety of rotigotine. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84(5):595-603.
22. **Deguchi K, Sasaki I, Tsukaguchi M, Kamoda M, Touge T, Takeuchi H, et al.** Abnormalities of rate-corrected QT intervals in Parkinson's disease—a comparison with multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 2002;199(1-2):31-7.

23. **Oka H, Mochio S, Sato H, Katayama K.** Prolongation of QTc interval in patients with Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1997;37(3):186-9.
24. **Mathias CJ.** Cardiovascular autonomic dysfunction in parkinsonian patients. *Clin Neurosci* 1998;5(2):153-66.
25. **Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, Hufeisen SJ, et al.** Evidence for possible involvement of 5-HT(2B) receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* 2000;102(23):2836-41.
26. **Rothman RB, Baumann MH.** Serotonergic drugs and valvular heart disease. *Expert Opin Drug Saf* 2009;8(3):317-29.
27. **Simkó J, Nagy G, Lőrincz I.** Szerzett hosszú QT-szindróma. *Cardiol Hung* 2007;37:C5 .
28. **Humphrey SJ, Turman CN, Curry JT, Wheeler GJ.** Cardiovascular and electrocardiographic effects of the dopamine receptor agonists ropinirole, apomorphine, and PNU-142774E in conscious beagle dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47(3):337-47.
29. **Hurst RS, Higdon NR, Lawson JA, Clark MA, Rutherford-Root KL, McDonald WG, et al.** Dopamine receptor agonists differ in their actions on cardiac ion channels. *Eur J Pharmacol* 2003;482(1-3):31-7.
30. **Jermendy G , Barkai L , Blatniczky L , Halmos T , Hidvégi T , Kaló Z , et al.** A Nemzeti Diabetesprogram 2011 létrehozásának indoka. *Diabet Hung* 2011;19 (3.Suppl.):8-9 .
31. **Kannel WB, McGee DL.** Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation* 1979;59(1):8-13.
32. **Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D.** Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16(2):434-44.
33. **Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M.** Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339(4):229-34.
34. **Gargiulo P, Jacobellis G, Vaccari V, Andreani D .** Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiological and clinical aspects. *Diabetes Nutr. Metab.* 1998;11:336-346.
35. **Adeghate E, Kalász H, Veress G, Teke K.** Medicinal chemistry of drugs used in diabetic cardiomyopathy. *Curr Med Chem* 2010;17(6):517-51.

36. **Shimoni Y, Firek L, Severson D, Giles W.** Short-term diabetes alters K<sup>+</sup> currents in rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1994;74(4):620-8.
37. **Magyar J, Rusznák Z, Szentesi P, Szűcs G, Kovács L.** Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24(8):841-53.
38. **Pacher P, Ungvári Z, Nánási P, Kecskeméti V.** Electrophysiological changes in rat ventricular and atrial myocardium at different stages of experimental diabetes. *Acta Physiol Scand* 1999;66 :7-13 .
39. **Lengyel C, Virág L, Kovács PP, Kristóf A, Pacher P, Kocsis E, et al.** Role of slow delayed rectifier K<sup>+</sup>-current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;192(3):359-68.
40. **Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al.** Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. Update regarding the thiazolidinediones. *Diabetologia* 2008;51(1):8-11.
41. **Gitlin N, Julie NL, Spurr CL, Lim KN, Juarbe HM.** Two cases of severe clinical and histologic hepatotoxicity associated with troglitazone. *Ann Intern Med* 1998;129(1):36-8.
42. **Quinn CE, Hamilton PK, Lockhart CJ, McVeigh GE.** Thiazolidinediones: effects on insulin resistance and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2008;153(4):636-45.
43. **Doshi LS, Brahma MK, Bahirat UA, Dixit AV, Nemmani KV.** Discovery and development of selective PPAR gamma modulators as safe and effective antidiabetic agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19(4):489-512.
44. **Tonelli J, Li W, Kishore P, Pajvani UB, Kwon E, Weaver C, et al.** Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53(6):1621-9.
45. **Waugh J, Keating GM, Plosker GL, Easthope S, Robinson DM.** Pioglitazone: a review of its use in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2006;66(1):85-109.
46. **Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, et al.** Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 2006;355(23):2427-43.
47. **Fujita T, Sugiyama Y, Taketomi S, Sohda T, Kawamatsu Y, Iwatsuka H, et al.** Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-

- methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes* 1983;32(9):804-10.
48. **Day C.** Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med* 1999;16(3):179-92.
49. **Forman BM, Chen J, Evans RM.** The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann N Y Acad Sci* 1996;804:266-75.
50. **Latruffe N, Vamecq J.** Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 1997;79(2-3):81-94.
51. **Blaschke F, Takata Y, Caglayan E, Law RE, Hsueh WA.** Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(1):28-40.
52. **Hofmann C, Lorenz K, Colca JR.** Glucose transport deficiency in diabetic animals is corrected by treatment with the oral antihyperglycemic agent pioglitazone. *Endocrinology* 1991;129(4):1915-25.
53. **Fujiwara T, Yoshioka S, Yoshioka T, Ushiyama I, Horikoshi H.** Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats. *Diabetes* 1988;37(11):1549-58.
54. **Oakes ND, Kennedy CJ, Jenkins AB, Laybutt DR, Chisholm DJ, Kraegen EW.** A new antidiabetic agent, BRL 49653, reduces lipid availability and improves insulin action and glucoregulation in the rat. *Diabetes* 1994;43(10):1203-10.
55. **Fujiwara T, Okuno A, Yoshioka S, Horikoshi H.** Suppression of hepatic gluconeogenesis in long-term Troglitazone treated diabetic KK and C57BL/KsJ-db/db mice. *Metabolism* 1995;44(4):486-90.
56. **Young LH.** Insulin resistance and the effects of thiazolidinediones on cardiac metabolism. *Am J Med* 2003;115 Suppl 8A:75S-80S.
57. **Kecskeméti V, Bagi Z, Pacher P, Posa I, Kocsis E, Koltai MZ.** New trends in the development of oral antidiabetic drugs. *Curr Med Chem* 2002;9(1):53-71.
58. **Yki-Jarvinen H.** Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004;351(11):1106-18.
59. **Sung BH, Izzo JL, Jr., Dandona P, Wilson MF.** Vasodilatory effects of troglitazone improve blood pressure at rest and during mental stress in type 2 diabetes mellitus. *Hypertension* 1999;34(1):83-8.
60. **Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G.** The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes* 1999;48(7):1448-53.

61. **Khandoudi N, Delerive P, Berrebi-Bertrand I, Buckingham RE, Staels B, Bril A.** Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* 2002;51(5):1507-14.
62. **Sundararajan S, Landreth GE.** Antiinflammatory properties of PPARgamma agonists following ischemia. *Drug News Perspect* 2004;17(4):229-36.
63. **Sarafidis PA, Nilsson PM.** The effects of thiazolidinediones on blood pressure levels - a systematic review. *Blood Press* 2006;15(3):135-50.
64. **Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, et al.** A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2005;28(7):1547-54.
65. **Deeg MA, Buse JB, Goldberg RB, Kendall DM, Zagar AJ, Jacober SJ, et al.** Pioglitazone and rosiglitazone have different effects on serum lipoprotein particle concentrations and sizes in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2007;30(10):2458-64.
66. **Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI.** Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106(6):679-84.
67. **Carta AR, Frau L, Pisanu A, Wardas J, Spiga S, Carboni E.** Rosiglitazone decreases peroxisome proliferator receptor-gamma levels in microglia and inhibits TNF-alpha production: new evidences on neuroprotection in a progressive Parkinson's disease model. *Neuroscience* 2011;194:250-61.
68. **Satoh N, Ogawa Y, Usui T, Tagami T, Kono S, Uesugi H, et al.** Antiatherogenic effect of pioglitazone in type 2 diabetic patients irrespective of the responsiveness to its antidiabetic effect. *Diabetes Care* 2003;26(9):2493-9.
69. **Derosa G, Cicero AF, Gaddi A, Ragonesi PD, Piccinni MN, Fogari E, et al.** A comparison of the effects of pioglitazone and rosiglitazone combined with glimepiride on prothrombotic state in type 2 diabetic patients with the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;69(1):5-13.
70. **Matsuzawa Y.** Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl* 2005;6(2):7-14.
71. **Marx N, Walcher D.** Vascular effects of PPARgamma activators - from bench to bedside. *Prog Lipid Res* 2007;46(6):283-96.

72. **Sarafidis PA, Bakris GL.** Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside. *Kidney Int* 2006;70(7):1223-33.
73. **Yue TL, Bao W, Gu JL, Cui J, Tao L, Ma XL, et al.** Rosiglitazone treatment in Zucker diabetic Fatty rats is associated with ameliorated cardiac insulin resistance and protection from ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *Diabetes* 2005;54(2):554-62.
74. **Luo Y, Yin W, Signore AP, Zhang F, Hong Z, Wang S, et al.** Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem* 2006;97(2):435-48.
75. **Ye Y, Lin Y, Atar S, Huang MH, Perez-Polo JR, Uretsky BF, et al.** Myocardial protection by pioglitazone, atorvastatin, and their combination: mechanisms and possible interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(3):H1158-69.
76. **Mazzone T, Meyer PM, Feinstein SB, Davidson MH, Kondos GT, D'Agostino RB, Sr., et al.** Effect of pioglitazone compared with glimepiride on carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: a randomized trial. *JAMA* 2006;296(21):2572-81.
77. **Stocker DJ, Taylor AJ, Langley RW, Jezior MR, Vigersky RA.** A randomized trial of the effects of rosiglitazone and metformin on inflammation and subclinical atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Am Heart J* 2007;153(3):445 e1-6.
78. **Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Nesto R, Kupfer S, Perez A, et al.** Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299(13):1561-73.
79. **Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Patel NS, Di Paola R, et al.** Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Br J Pharmacol* 2003;140(2):366-76.
80. **Krentz A.** Thiazolidinediones: effects on the development and progression of type 2 diabetes and associated vascular complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25(2):112-26.
81. **Kaul S, Diamond GA.** Diabetes: Breaking news! Rosiglitazone and cardiovascular risk. *Nat Rev Cardiol* 2010;7(12):670-2.
82. **Lago RM, Singh PP, Nesto RW.** Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Lancet* 2007;370(9593):1129-36.

83. **Singh S, Loke YK, Furberg CD.** Thiazolidinediones and heart failure: a teleo-analysis. *Diabetes Care* 2007;30(8):2148-53.
84. **Nissen SE, Wolski K.** Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007;356(24):2457-71.
85. **Dagenais GR, Gerstein HC, Holman R, Budaj A, Escalante A, Hedner T, et al.** Effects of ramipril and rosiglitazone on cardiovascular and renal outcomes in people with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: results of the Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication (DREAM) trial. *Diabetes Care* 2008;31(5):1007-14.
86. **McGuire DK, Inzucchi SE.** New drugs for the treatment of diabetes mellitus: part I: Thiazolidinediones and their evolving cardiovascular implications. *Circulation* 2008;117(3):440-9.
87. **Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, et al.** Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2004;27(1):256-63.
88. **Kiryluk K, Isom R.** Thiazolidinediones and fluid retention. *Kidney Int* 2007;72(6):762-8.
89. **Hong G, Lockhart A, Davis B, Rahmoune H, Baker S, Ye L, et al.** PPARgamma activation enhances cell surface ENaCalpha via up-regulation of SGK1 in human collecting duct cells. *Faseb J* 2003;17(13):1966-8.
90. **Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, et al.** Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med* 2005;11(8):861-6.
91. **Zhang H, Zhang A, Kohan DE, Nelson RD, Gonzalez FJ, Yang T.** Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(26):9406-11.
92. **Erdmann E, Wilcox RG.** Weighing up the cardiovascular benefits of thiazolidinedione therapy: the impact of increased risk of heart failure. *Eur Heart J* 2008;29(1):12-20.
93. **Singh S, Loke YK, Furberg CD.** Long-term risk of cardiovascular events with rosiglitazone: a meta-analysis. *JAMA* 2007;298(10):1189-95.

94. **Erdmann E, Spanheimer R, Charbonnel B.** Pioglitazone and the risk of cardiovascular events in patients with Type 2 diabetes receiving concomitant treatment with nitrates, renin-angiotensin system blockers, or insulin: results from the PROactive study (PROactive 20). *J Diabetes* 2010;2(3):212-20.
95. **Erdmann E, Charbonnel B, Wilcox R.** Thiazolidinediones and cardiovascular risk - a question of balance. *Curr Cardiol Rev* 2009;5(3):155-65.
96. **Graham DJ, Ouellet-Hellstrom R, MaCurdy TE, Ali F, Sholley C, Worrall C, et al.** Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. *JAMA* 2010;304(4):411-8.
97. **Rosen CJ.** The rosiglitazone story - lessons from an FDA Advisory Committee meeting. *N Engl J Med* 2007;357(9):844-6.
98. **Mannucci E, Monami M.** Is the evidence from clinical trials for cardiovascular risk or harm for glitazones convincing? *Curr Diab Rep* 2009;9(5):342-7.
99. **Mannucci E, Monami M, Di Bari M, Lamanna C, Gori F, Gensini GF, et al.** Cardiac safety profile of rosiglitazone: a comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials. *Int J Cardiol* 2010;143(2):135-40.
100. **Lu L, Reiter MJ, Xu Y, Chicco A, Greyson CR, Schwartz GG.** Thiazolidinedione drugs block cardiac KATP channels and may increase propensity for ischaemic ventricular fibrillation in pigs. *Diabetologia* 2008;51(4):675-85.
101. **Pancani T, Phelps JT, Searcy JL, Kilgore MW, Chen KC, Porter NM, et al.** Distinct modulation of voltage-gated and ligand-gated Ca<sup>2+</sup> currents by PPAR-gamma agonists in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 2009;109(6):1800-11.
102. **Pavlov TS, Levchenko V, Karpushev AV, Vandewalle A, Staruschenko A.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonists decrease Na<sup>+</sup> transport via the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Mol Pharmacol* 2009;76(6):1333-40.
103. **Mishra SK, Aaronson PI.** Differential block by troglitazone and rosiglitazone of glibenclamide-sensitive K(+) current in rat aorta myocytes. *Eur J Pharmacol* 1999;386(1):121-5.
104. **McKay NG, Kinsella JM, Campbell CM, Ashford ML.** Sensitivity of Kir6.2-SUR1 currents, in the absence and presence of sodium azide, to the K(ATP) channel inhibitors, ciclazindol and englitazone. *Br J Pharmacol* 2000;130(4):857-66.
105. **Knock GA, Mishra SK, Aaronson PI.** Differential effects of insulin-sensitizers troglitazone and rosiglitazone on ion currents in rat vascular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1999;368(1):103-9.

106. **Nakajima T, Iwasawa K, Oonuma H, Imuta H, Hazama H, Asano M, et al.** Troglitazone inhibits voltage-dependent calcium currents in guinea pig cardiac myocytes. *Circulation* 1999;99(22):2942-50.
107. **Katoh Y, Hashimoto S, Kimura J, Watanabe T.** Inhibitory action of troglitazone, an insulin-sensitizing agent, on the calcium current in cardiac ventricular cells of guinea pig. *Jpn J Pharmacol* 2000;82(2):102-9.
108. **Arikawa M, Takahashi N, Kira T, Hara M, Saikawa T, Sakata T.** Enhanced inhibition of L-type calcium currents by troglitazone in streptozotocin-induced diabetic rat cardiac ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 2002;136(6):803-10.
109. **Arikawa M, Takahashi N, Kira T, Hara M, Yoshimatsu H, Saikawa T.** Attenuated inhibition of L-type calcium currents by troglitazone in fructose-fed rat cardiac ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44(1):109-16.
110. **Ikeda S, Watanabe T.** Effects of troglitazone and pioglitazone on the action potentials and membrane currents of rabbit ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1998;357(2-3):243-50.
111. **Tompson DJ, Vearer D.** Steady-state pharmacokinetic properties of a 24-hour prolonged-release formulation of ropinirole: results of two randomized studies in patients with Parkinson's disease. *Clin Ther* 2007;29(12):2654-66.
112. **Dewey RB, 2nd, Reimold SC, O'Suilleabhain PE.** Cardiac valve regurgitation with pergolide compared with nonergot agonists in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2007;64(3):377-80.
113. **Szabó G, Szentandrassy N, Bíró T, Tóth BI, Czifra G, Magyar J, Bányász T, Varró A, Kovács L, Nánási PP.** Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Arch* 2005;450(5):307-16.
114. **Szentandrassy N, Bányász T, Bíró T, Szabó G, Tóth BI, Magyar J, Lázár J, Varró A, Kovács L, Nánási PP.** Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 2005;65(4):851-60.
115. **Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;391(2):85-100.

116. **Fischmeister R, DeFelice LJ, Ayer RK, Jr., Levi R, DeHaan RL.** Channel currents during spontaneous action potentials in embryonic chick heart cells. The action potential patch clamp. *Biophys J* 1984;46(2):267-71.
117. **Bányász T, Magyar J, Szentandrassy N, Horváth B, Birinyi P, Szentmiklósi J, Nánási PP.** Action potential clamp fingerprints of K<sup>+</sup> currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiol (Oxf)* 2007;190(3):189-98.
118. **Kavak S, Emre M, Tetiker T, Kavak T, Kolcu Z, Gunay I.** Effects of rosiglitazone on altered electrical left ventricular papillary muscle activities of diabetic rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008;376(6):415-21.
119. **Bányász T, Fülöp L, Magyar J, Szentandrassy N, Varró A, Nánási PP.** Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. *Cardiovasc Res* 2003;58(1):66-75.
120. **Hondeghem LM, Katzung BG.** Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1977;472(3-4):373-98.
121. **Strichartz G, Cohen I.** V<sub>max</sub> as a measure of G<sub>Na</sub> in nerve and cardiac membranes. *Biophys J* 1978;23(1):153-6.
122. **Schrag AE, Brooks DJ, Brunt E, Fuell D, Korczyn A, Poewe W, et al.** The safety of ropinirole, a selective nonergoline dopamine agonist, in patients with Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 1998;21(3):169-75.
123. **Kaye CM, Nicholls B.** Clinical pharmacokinetics of ropinirole. *Clin Pharmacokinet* 2000;39(4):243-54.
124. **Swagzdis JE, Wittendorf RW, DeMarinis RM, Mico BA.** Pharmacokinetics of dopamine-2 agonists in rats and dogs. *J Pharm Sci* 1986;75(10):925-8.
125. **Uitti RJ, Ahlskog E.** Comparative review of dopamine receptor agonists in Parkinson's disease. *CNS Drugs* 1996 ;5:369-388.
126. **Matheson AJ, Spencer CM.** Ropinirole: a review of its use in the management of Parkinson's disease. *Drugs* 2000;60(1):115-37.
127. **Brooks DJ, Abbott RJ, Lees AJ, Martignoni E, Philcox DV, Rascol O, et al.** A placebo-controlled evaluation of ropinirole, a novel D<sub>2</sub> agonist, as sole dopaminergic therapy in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 1998;21(2):101-7.
128. **Mannelli M, Lazzeri C, Ianni L, La Villa G, Pupilli C, Bellini F, et al.** Dopamine and sympathoadrenal activity in man. *Clin Exp Hypertens* 1997;19(1-2):163-79.

129. **Yeh TL, Yang YK, Chiu NT, Yao WJ, Yeh SJ, Wu JS, et al.** Correlation between striatal dopamine D2/D3 receptor binding and cardiovascular activity in healthy subjects. *Am J Hypertens* 2006;19(9):964-9.
130. **Szymanski C, Boey S, Hermida JS.** Ropinirole-induced symptomatic sinus node dysfunction. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008;31(8):1079-82.
131. **Di Giacopo R, Fasano A, Fenici R, Loria G, Bentivoglio AR.** Rare and serious cardiac side effects during ropinirole titration. *Mov Disord* 2010;25(10):1509-10.
132. **Yang T, Snyders D, Roden DM.** Drug block of I(kr): model systems and relevance to human arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38(5):737-44.
133. **Jeong I, Choi BH, Hahn SJ.** Rosiglitazone inhibits Kv4.3 potassium channels by open-channel block and acceleration of closed-state inactivation. *Br J Pharmacol* 2011;163(3):510-20.
134. **Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, et al.** Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricles. *J Physiol* 2004;559(Pt 1):103-20.
135. **Quintana FJ, Buzás E, Prohászka Z, Biró A, Kocsis J, Füst G, et al.** Knock-out of the histidine decarboxylase gene modifies the repertoire of natural autoantibodies. *J Autoimmun* 2004;22(4):297-305.
136. **Szebeni A, Falus A, Kecskeméti V.** Electrophysiological characteristics of heart ventricular papillary muscles in diabetic histidine decarboxylase knockout and wild-type mice. *J Interv Card Electrophysiol* 2009;26(3):155-8.
137. **Wilson KD, Li Z, Wagner R, Yue P, Tsao P, Nestorova G, et al.** Transcriptome alteration in the diabetic heart by rosiglitazone: implications for cardiovascular mortality. *PLoS One* 2008;3(7):e2609.
138. **Park JY, Kim KA, Shin JG, Lee KY.** Effect of ketoconazole on the pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58(4):397-402.
139. **Wittayalertpanya S, Chompootaweeep S, Thaworn N, Khemsri W, Intanil N.** Pharmacokinetic and bioequivalence study of an oral 8 mg dose of rosiglitazone tablets in Thai healthy volunteers. *J Med Assoc Thai* 2010;93(6):722-8.
140. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Press\\_release/2010/09/WC500096996.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2010/09/WC500096996.pdf)
141. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm226956.htm>

142. **Kaul S, Bolger AF, Herrington D, Giugliano RP, Eckel RH.** Thiazolidinedione drugs and cardiovascular risks: a science advisory from the American Heart Association and American College Of Cardiology Foundation. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(17):1885-94.
143. <http://www.finance.senate.gov/newsroom/chairman/release/?id=bc56b552-efc5-4706-968d-f7032d5cd2e4>
144. **Larsen PJ, Lykkegaard K, Larsen LK, Fleckner J, Sauerberg P, Wassermann K, et al.** Dissociation of antihyperglycaemic and adverse effects of partial peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-gamma) agonist balaglitazone. *Eur J Pharmacol* 2008;596(1-3):173-9.
145. **Acton JJ 3rd, Akiyama TE, Chang CH, Colwell L, Debenham S, Doebber T, et al.** Discovery of (2R)-2-(3-{3-[(4-Methoxyphenyl)carbonyl]-2-methyl-6-(trifluoromethoxy)-1H-indol-1-yl}phenoxy)butanoic acid (MK-0533): a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator for the treatment of type 2 diabetes mellitus with a reduced potential to increase plasma and extracellular fluid volume. *J Med Chem* 2009;52(13):3846-54.
146. **Seto S, Okada K, Kiyota K, Isogai S, Iwago M, Shinozaki T, et al.** Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of novel 2,4,6-trisubstituted-5-pyrimidinecarboxylic acids as peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) partial agonists with comparable antidiabetic efficacy to rosiglitazone. *J Med Chem* 2010;53(13):5012-24.
147. **Tamás G, Kerényi Z.** Búcsú a rosiglitazontól: merre tovább? *LAM* 2010;20(12):805-811 .
148. **Fülöp T, Jenei Cs.** A 2-es típusú cukorbetegség biztonságos kezelése kardiológiai szemszögből. *Cardiol Hung* 2011;41(4):291-296 .

Iktatószám: DEENKÉTK/306/2012.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Simkó József

Neptun kód: CJRYQQ

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

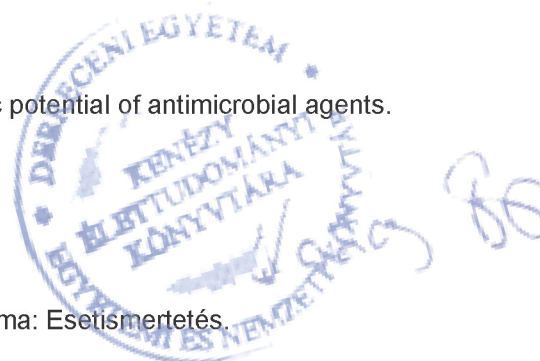
### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

