

# Proaritmiás gyógyszer mellékhatások vizsgálata transzgenikus hosszú QT-szindrómás nyúlmodellek segítségével

Hornyik Tibor, Husti Zoltán, Baczkó István

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Szeged

Levelezési cím:

Dr. Baczkó István, 6720 Szeged, Dóm tér 12. E-mail: baczko.istvan@med.u-szeged.hu



A társszerző  
video-összefoglalója



CH Live kerekasztal

A gyógyszer okozta ritmuszavar a különböző vegyületek súlyos és potenciálisan halálos mellékhatása. A proaritmiás mellékhatást gyakran az adott gyógyszernek a szívizom-repolarizáló ionáramait gátló hatásaival hozzák összefüggésbe, ami az EKG-n a QT-intervallum meghosszabbodásához vezet. A gyógyszerfejlesztésben alkalmazott kifinomult szűrési módszerek ellenére a proaritmia megbízható előrejelzése továbbra is jelentős kihívást jelent. Bár a gyógyszerek által kiváltott QT-idő megnyúlással összefüggő proaritmiás hatás iránt fokozottan érzékenyítenek a betegek repolarizációs tartalékát csökkentő kórfolyamatok, a legtöbb gyógyszerbiztonsági szűrésre használt modellrendszer normális, egészséges sejteket, szöveteket és állatokat használ fel. A közelmúltban több, csökkent repolarizációs tartálékkal rendelkező transzgenikus hosszú QT-szindrómás (LQTS) nyúlmodellt hoztak létre. Összefoglaló közleményünkben e modellek lehetséges felhasználását tárgyaljuk a gyógyszerindukált aritmiák előrejelzésére, összefüggésben a különböző modellekben tapasztalt repolarizáló szívizom ionáram-károsodással. Emellett áttekintjük a rendelkezésre álló transzgenikus LQTS-nyúlmodellek elektrofiziológiai jellemzőit, a modelleken végzett farmakológiai elvi bizonyító vizsgálatokat, kiemelve a transzgenikus nyúl LQTS-modellek előnyeit és hátrányait a gyógyszerindukálta ritmuszavar kutatásában.

**Kulcsszavak:** gyógyszerindukálta ritmuszavar, biztonsági szűrés, hosszú QT-szindróma, transzgenikus nyúl, szív repolarizációs tartalék

## Evaluation of proarrhythmic drug adverse effects using transgenic rabbit models of long QT syndrome

Drug-induced proarrhythmia poses as a severe and potentially fatal adverse effect of various compounds. Proarrhythmic adverse effects are often attributed to the drug's capacity to inhibit repolarizing cardiac ion currents leading to a prolongation of the QT interval on the ECG. In spite of the sophisticated screening methods in drug development, the reliable prediction of proarrhythmia remains challenging. Although drug-induced long-QT-related proarrhythmia is often facilitated by pathological settings that reduce the patient's repolarization reserve, most model systems used for drug safety screening focus on normal, healthy cells, tissues and animals. Recently, several transgenic long QT syndrome (LQTS) rabbit models with impaired repolarization reserve have been generated. In this review, we discuss the potential use of these models for drug-induced arrhythmia prediction, in relation to the different repolarizing cardiac ionic current impairment in the different models. In addition, we overview the electrophysiological characteristics of the available transgenic LQTS rabbit models, and the pharmacological proof-of-principle studies that have been carried out with these models, highlighting the advantages and disadvantages of transgenic rabbit LQTS models for proarrhythmia research.

**Keywords:** drug-induced arrhythmia, safety screening, long QT syndrome, transgenic rabbit, cardiac repolarization reserve

A kézirat 2023. 08. 22-én érkezett a szerkesztőségbe, 2023. 10. 02-án került elfogadásra.

Évtizedek óta ismert, hogy a proaritmiát, a gyógyszeres kezeléssel összefüggésbe hozható szívritmuszavarokat leggyakrabban az „antiaritmiás” szívgyógyszerek okozzák (1, 2). Az antiaritmiás gyógyszerek – látszólag paradox módon – amellet, hogy hatékonyan megszüntethetnek bizonyos szívritmuszavarokat, maguk is malignus aritmiákat indukálhatnak. A gyógyszeres terápia ezen ritka, de potenciálisan halálos mellékhatása azonban nem korlátozódik csupán az antiaritmiás szerekre, hanem számos más, nem kardiológiai indikációval alkalmazott gyógyszer adagolását követően is előfordul (3, 4), ezzel komoly gondot okozva a betegek, az orvosok és a gyógyszeripar számára. Becslések szerint az új kémiai entitások körülbelül 20-60%-a képes modulálni a szív ioncsatornáinak működését, és ezáltal megzavarni a szív élettani elektromos működését (5). Az ioncsatornák működésére gyakorolt gyógyszerhatások természetétől függően a proaritmia hátterében legtöbbször a QT-intervallum megnyúlása vagy lerövidülése áll (hosszú QT-szindróma – LQTS – vagy rövid QT-szindróma – SQTS), valamint vezetési zavarok is hozzájárulhatnak e veszélyes mellékhatás kialakulásához.

A legtöbb gyógyszer esetében a proaritmia a szív káliumáramainak (többnyire  $I_{Kr}$ -áram(ok)/HERG-csatornák) gátlása következtében a szív repolarizációjának megnyúlásán alapul (6). A gyógyszerindukálta LQTS Torsades-de-Pointes (TdP) polimorf kamrai tachycardiára hajlamosít, amely kamrafibrillációhoz és hirtelen szívhalálhoz (SCD) is vezethet (7). Bár az összes forgalomba hozott gyógyszer nem kevesebb, mint 2-3%-a képes szerzett LQTS-t kiváltani (8), a dokumentált, potenciálisan halálos gyógyszerindukálta TdP előfordulási gyakorisága jellemzően nagyon alacsony (1:10 000 a nem szív- és érrendszeri gyógyszerek esetében) (9), ezért azt nagyon nehéz megbízható módon előre jelezni (10). Az elmúlt évtizedekben a TdP-indukálta SCD-eseteket számos gyakran használt gyógyszerrel (antipszichotikumok, antidepresszánsok, antihisztaminok és antibiotikumok) hozták összefüggésbe (7), és ezért sokat közülük (például ciszaprid, asztemizol, terfenadin, grepafloxacin) kivontak a forgalomból (11). A gyógyszer okozta LQTS-en kívül egyéb gyógyszerindukálta ioncsatorna-hatások – mint például a  $Na^+$  vagy  $Ca^{2+}$ -áramok gátlásán alapuló vezetési zavarok, illetve re-entry mechanizmusok – is szerepet játszhatnak ritmuszavarok kiváltásában (1), azonban a nem antiaritmiás hatású szerek esetében ezek előfordulása és így gyakorlati jelentősége kisebb.

A gyógyszer okozta proaritmia szűrésére jelenleg sajnos nem létezik ideális, aranystandard szűrési módszer, ezért a biztonsági vizsgálatok a gyógyszeriparban az „*in vitro*” preklinikai HERG-funkció, akciós potenciál (AP) „*in vivo*” EKG (QT), „*in silico*” (számítógépes modelleken alapuló) számítási módszerrel történő kockázat-előrejelzés (12) (integrált kockázatértékelési [IRA] megközelítés) és klinikai EKG-vizsgálatok (13, 14) kombinált alkalmazásán alapulnak. Általában különböző

proaritmia-markereket és pontszámrendszereket (lásd: 2.1 alfejezet) alkalmaznak a vizsgálatok prediktív értékének növelésére (15) mérsékelt vagy korlátozott sikerrel (16). A jelenleg alkalmazott szűrési stratégia főbb limitációi, hogy

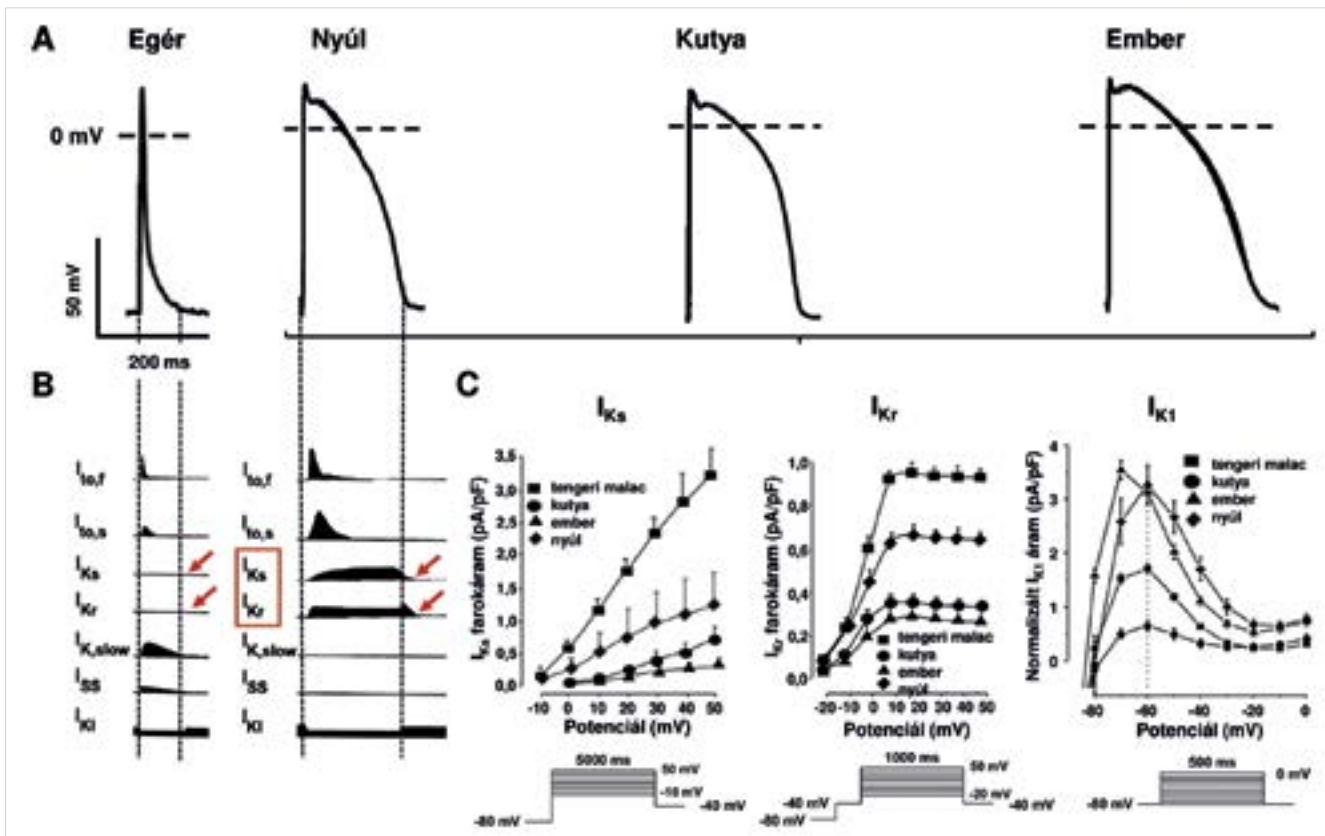
- a gyógyszerjelölt vegyületek vizsgálatokor többnyire elsősorban csak az ún. HERG/ $I_{Kr}$  – az egyik fő repolarizáló  $K^+$ -áram – gátló hatásának kimutatására fókuszálnak, és ezzel figyelmen kívül hagynak egyéb, a proaritmia kialakulása szempontjából szintén lényeges, más áramokat gátló mellékhatásokat, másrészt,
- a tesztek többségéhez egészséges állatmodelleket használnak, amelyek egyáltalán nem képviselik a gyógyszer okozta proaritmiára legfogékonyabb, károsodott repolarizációval és strukturális szívbetegséggel rendelkező különféle betegpopulációkat.

A fentiek alapján kézenfekvő, hogy fokozottabban érzékeny módszerekre, illetve olyan új állatmodellekre van szükség, amelyekkel már a gyógyszerfejlesztés preklinikai fázisában megbízhatóbban kiszűrhetőek a valóban proaritmiás mellékhatással rendelkező gyógyszerjelölt vegyületek, megelőzve a malignus ritmuszavarok okozta elkerülhető haláleseteket, valamint a proaritmiás hatóanyag további, felesleges fejlesztése során felmerülő hatalmas költségeket.

A következő fejezetekben áttekintjük, hogy jelenleg milyen modellrendszerek, illetve állatmodellek használata terjedt el a proaritmiaszűrésben, milyen limitációi vannak e módszereknek, és hogy a különböző új, károsodott repolarizációjú, transzgenikus LQTS-nyúlmodellek milyen előnyökkel rendelkeznek a többi stratégiával szemben. Végezetül ezen új modellek proaritmiaszűrésben való „elhelyezésével” és a modellek limitációival, valamint jövőbeli újabb megoldásokkal ismerkedhet meg az olvasó.

## A transzgenikus hosszú QT-szindrómás nyúlmodellek

A kongenitális hosszú QT-szindróma olyan örökletes betegségcsoport, amely a szívizom-repolarizáció zavaraihoz vezet és a hirtelen szívhalál fokozott kockázatát hordozza (17). Eddig 17 génben található mutációkat azonosítottak a veleszületett LQTS okaként, a betegséget túlnyomórészt a repolarizáló káliumcsatornákat (90%, KCNQ1: LQT1, KCNH2: LQT2) kódoló gének funkcióvesztő mutációi (90%, KCNQ1: LQT1, KCNH2: LQT2) és a depolarizáló nátriumcsatornák (5%, SCN5A: LQT3) funkciónyereses mutációi okozzák (17). A szívizom-repolarizáció redundáns (repolarizációs tartalék), a repolarizáló áramok egyikének csökkenése esetén a többi áram a kiesett funkciót képes részben pótolni (18), így az LQTS-betegek jó részében a repolarizációs tartalék a funkcióvesztő mutációk miatt csök-



**1. ÁBRA.** Az akciós potenciálok és a repolarizáló K<sup>+</sup>-áramok fajspecifikus különbségei. A repolarizáció fajspecifikus különbségeinek bemutatása. (A) Reprezentatív egér, nyúl, kutya és humán akciós potenciálok (AP) (111, 112) (után) és (B) az azt kialakító főbb repolarizáló káliumáramok sematikus ábrázolása. A (C) panel a tengeri malac, nyúl, kutya és humán I<sub>Ks</sub>, I<sub>Kr</sub> és I<sub>K1</sub> farokáramok áram-feszültség karakterisztikáinak fajspecifikus különbségeit mutatja be. Rövidítések: I<sub>to,f</sub> és I<sub>to,s</sub>: a tranzienstől kifelé irányuló K<sup>+</sup>-áram gyors és lassú komponensei, I<sub>Ks</sub> és I<sub>Kr</sub>: a késői egyenirányító K<sup>+</sup>-áramok lassú és gyors komponensei, I<sub>Kslow</sub>: lassú, késői egyenirányító K<sup>+</sup>-áram, ISS: lassan aktiválódó és nem inaktíváló steady-state K<sup>+</sup>-áram, I<sub>K1</sub>: befelé egyenirányító K<sup>+</sup>-áram

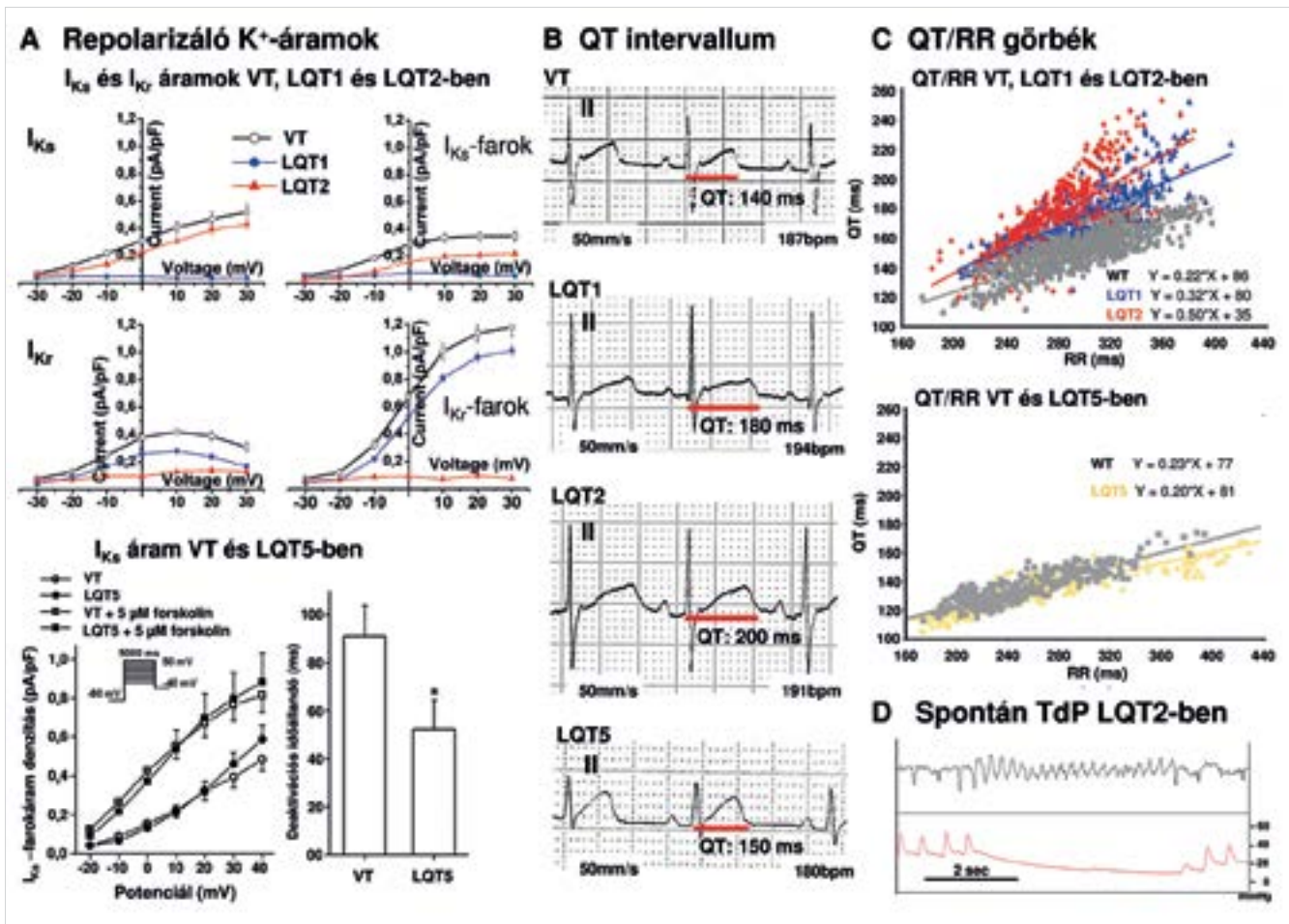
ken. Így ezen betegek a gyógyszerindukálta ritmuszavarok és hirtelen szívhalál szempontjából fokozott kockázatú betegcsoportot képviselnek. Állatmodelleken a kongenitális LQTS létrehozása a fokozott aritmia-érzékenységű betegcsoportokat jobban reprezentáló, csökkent repolarizációs tartalékkal rendelkező vizsgálati platformot jelent.

A humán szervek, szövetek és sejtek ideális forrásai lehetnének az emberi szívbetegségek patofiziológiájával foglalkozó tanulmányoknak. A szív működés mélyreható vizsgálatai etikai okokból azonban csak nagyon korlátozott mértékben végezhetők el embereken, illetve emberi szívszöveteken. Az állatmodellek használata ezért régóta bevett gyakorlat a kardiovaszkuláris kutatásokban (19). Bár kezdetben leginkább gyógyszerek, sebészeti beavatkozások vagy más környezeti változások által létrehozott szívbetegségek állatmodelljeit alkalmazták (19), az elmúlt években egyre több genetikailag módosított állatmodellt hoztak létre (20). Ezeket a modelleket az érdeklődés középpontjában álló gén kiütésével (knock-out), vagy bevitelével (knock-in) vagy a betegség-specifikus gén pontmutációjával hozzák létre. Ez különösen fontos monogén öröklődő szívbetegségek, például az örökletes cardiomyopathiák és

ioncsatorna-betegségek területén végzett kutatások szempontjából. Az LQTS vizsgálata esetében is genetikailag módosított állatmodelleket (például knock-out, knock-in és különösen transzgenikus, humán patogén mutációkat kifejező modelleket) hoztak létre, hogy modellezzék az emberi betegség geno- és fenotípusát.

Ezek az állatmodellek lehetővé teszik a kóreléttani folyamatok több szintű (celluláris, szöveti, szervi, *in vivo*) azonosítását a társbetegségek megzavarása nélkül, valamint lehetővé teszik nemcsak megfigyelésüket, hanem meghatározott kvantitatív terápiás beavatkozások elvégzését is. A különböző fajok között meglévő elektrofiziológiai és elektromechanikai eltérések azonban az állatmodellekből nyert adatok felhasználhatóságának korlátait eredményezik a klinikai transzláció és humán extrapolálás tekintetében (21). Emiatt a továbbiakban részletezni szeretnénk a modellként gyakran alkalmazott állatfajok szív-elektrofiziológiai különbségeit.

A fajok között különösen szembetűnő különbségek tapasztalhatók a szív repolarizációja tekintetében, amelyet a különböző befelé és kifelé irányuló ionáramok szigorúan szabályozott, összehangolt folyamatai irányítanak (22) (1. ábra). A kisméretű rágcsálókat (például az egereket és patkányokat) általánosan használják



**2. ÁBRA.** A transzgenikus LQTS-nyúlmodellek elektrofiziológiai jellegzetességei. Az LQTS-nyúlmodellek elektrofiziológiai jellegzetességei kontroll körülmények között. (A) Felső panel: VT-, LQT1- és LQT2-állatok izolált cardiomyocytáiból származó  $I_{Ks}$  és  $I_{Kr}$  „steady” (bal), illetve „farok” (jobb) áram-feszültség karakterisztikák, amely LQT1-ben az  $I_{Ks}$ , illetve LQT2-ben az  $I_{Kr}$  teljes kiesését jelzik (38) (után). Alsó panel:  $I_{Ks}$ -áram-feszültség karakterisztikák 5  $\mu$ M forskolin jelenlétében és anélkül VT, illetve LQT5-nyúl kamrai myocytákban. Az oszlopdiagram az LQT5-modellben a deaktivációs időállandó szignifikáns csökkenését mutatja (39) (után). (B) VT-, LQT1-, LQT2-, és LQT5-nyúlmodellek QT-intervallumainak különbségeit szemléltető reprezentatív EKG-felvételek II-es elvezetési (38) (után). (C) éber, szabadon mozgó telemetriás EKG-val mért QT/RR-görbék: VT-, LQT1-, és LQT2-állatokban (felső panel) (38) (után), illetve VT- és LQT5-nyulakban (alsó panel) (44) (után). (D) LQT2-állatból származó EKG és vérnyomásgörbe, amely spontán Torsade-de-pointes (TdP) típusú kamrai tachikardia előfordulását szemlélteti (38). \* $p < 0,05$  vs. VT

szívizom-iszkémia indukálta aritmiák tanulmányozására (amelyek általában az ingerületvezetési-zavarokhoz köthetőek), mivel ezen állatok ingerületvezetési tulajdonságait a nátriumáramok, a kalciumáramok és a konnexinfunkció szabályozzák, és ezek a kis rágcsálókban nagyon hasonlóak az emberben leírtakhoz (23). További előnyük, hogy tartásuk alacsony költséggel jár, rövid életciklussal rendelkeznek, és genetikai manipulációjuk sokkal egyszerűbb, mint a nagyobb állatoké. Jelentős hátrányuk azonban, hogy korlátozott értékkel bírnak a repolarizációval összefüggő aritmogenezis tanulmányozásában: egerekben és patkányokban a gyors és lassú tranzienst kifelé irányuló ( $I_{to}$ ) és a késői egyenirányító ( $I_{K1}$ , lassú1 és  $I_{K1}$ , lassú2) (24) feszültségfüggő káliumáramok játszanak fő szerepet a repolarizációban – míg kutyában, nyulakban és ember esetében a késői egyenirányító káliumáram gyors és lassú komponen-

sei ( $I_{Kr}$  és  $I_{Ks}$ ) a fő meghatározói a szívizom repolarizációjának (25, 26). Az  $I_{Kr}$  és az  $I_{Ks}$  pontos szerepe kis rágcsálókban még mindig nem jól ismert és ellentmondásos (27). Ennek eredményeként az AP alakja eltér a nagyobb állatokétól és az emberektől (háromszög alakú és nem „téglalap” alakú AP hosszú plató fázissal, mint emberben (1. ábra) (27), és így a proaritmiás káliumcsatorna-blokkoló gyógyszerekre adott farmakológiai válaszaik is jelentős különbségeket mutatnak. Az akut  $I_{Kr}$ -blokkoló beadása például meghosszabbítja a repolarizációt kutyákban, nyulakban és emberekben, de nem okoz repolarizáció-megnyúlást egerekben vagy patkányokban (28, 29). Az  $I_{Kr}$ -blokkoló dofetilid krónikus adagolása, amely meghosszabbítja a repolarizációt nagyobb állatokban és emberekben azáltal, hogy blokkolja a HERG-csatornákat, egerekben – legalábbis részben – az  $I_{Na,L}$  aktivációjával okoz repola-

rizáció-megnyúlást (a foszfoinozid 3-kináz útvonalon keresztül) (30). A fentiek alapján az egerek és a patkányok komoly korlátokkal rendelkeznek a gyógyszerindukálta proaritmia-kutatásban, tehát csekély transzlációs potenciállal bírnak. Ezzel szemben a szív különböző káliumcsatornáinak funkciója és kapuzási kinetikája nagyon hasonló kutyákban, nyulakban és emberben, ahol az  $I_{Kr}$  és az  $I_{Ks}$  fő repolarizáló áram mindhárom fajban (25–28) (1. ábra). Közöttük csekély különbség tapasztalható: emberben és kutyában – csakúgy, mint a legtöbb emlősnél – az  $I_{to}$  két különálló komponensből áll, amelyek neve  $I_{to,fast}$  és  $I_{to,slow}$  – az inaktivációból történő gyors és lassú visszatéréssel, amelyeket a Kv3.4, illetve a Kv1.4 határoz meg (31). Ezzel szemben nyulakban, ahol az  $I_{to,slow}$  az elsődleges tranzienst káliumáram a bal kamrában (32), míg a jobb kamrában az  $I_{to,gyors}$  a meghatározó, és amelynek a kongenitális LQT1-szindrómához kapcsolódó aritmogenezisben betöltött szerepe nemrégiben megerősítést nyert (33). A nyulak és kutyák repolarizációs képessége robusztusabb, mint az embereké a magasabb  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$  és  $I_{Ks}$  áramdenzitás miatt (28, 34) (1. ábra).

Összefoglalva, a nyúlnak kiemelkedő szerepe van az aritmia kutatásában, mivel:

- az AP alakja (26) és a háttérben álló ioncsatornák/áramok működése és kapuzási kinetikája (25),
- a szívizom mechanikai tulajdonságai (35),
- a relatív effektív szív méret a szív tömeg és a kamrafibrilláció gyakoriságának összefüggésében (36), és
- a farmakológiai beavatkozásokra adott válaszok tekintetében (37) nagymértékű hasonlóságot mutatnak az emberi szív-elektrofiziológiával.

A különböző áramok fent leírt faji különbségei alapján a nyúl előnyt élvezhet a kutyamodellekkel szemben az  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  vagy  $I_{K1}$ -blokkoló tulajdonságokkal rendelkező gyógyszerek proaritmiás potenciáljának tesztelésekor, mivel ezen áramok karakterisztikája nagyfokú hasonlóságot mutat az emberben tapasztaltakhoz, ugyanakkor olcsóbbak, könnyebben kezelhetők és tenyésztethetők, mint a kutyák, és genetikailag egyszerűbben módosíthatók. Ezzel szemben a kutyák vagy tengerimalacok alkalmasabbak lehetnek az olyan ritmuszavarok tanulmányozására, amelyekben az  $I_{to}$ -gátlás kulcsfontosságú szerepet játszik.

Az összes elérhető transzgenikus LQTS-nyúlmodellet a feszültségfüggő káliumcsatornákat, mint a KCNQ1/KvLQT1 (KvLQT1-Y315S, LQT1), a KCNH2/HERG (HERG-628S, LQT2) vagy a KCNE1/minK (KCNE1-G52R) kódoló domináns negatív mutáns humán gének kardioszelektív túlexpressziójával, béta-miozin nehézlánc-promoterek felhasználásával tervezték (38, 39) (1. táblázat).

Az LQT1 vagy LQT2 nyulakból izolált szívizomsejtekben az  $I_{Ks}$  (LQT1), illetve az  $I_{Kr}$ -áram (LQT2) funkcióvesztéses mutáció révén teljesen megszűnt, ami az akciós potenciál időtartamának (APD) megnyúlását

eredményezte, valamint *in vivo* a kamrai refrakteritás és a QT-intervallum megnyúlásához vezetett (38, 40). Mind az LQT1, mind az LQT2 fenotípusa tovább súlyosbodott a megmaradt reciprok káliumáramok, LQT1-ben az  $I_{Kr}$ , LQT2-ben pedig az  $I_{Ks}$  csökkenése miatt, ezen elváltozások a mutáns humán KvLQT1-Y315S és a natív nyúl HERG, illetve a mutáns HERG-G628S és a nyúl KvLQT1-proteinek közötti kölcsönhatások következményei (41). A repolarizáció megnyúlása, csakúgy, mint a humán LQTS-betegeknél, kifejezettebb volt lassú szívfrekvencia esetén, ami a QT-RR arány megnövekedett meredekségéhez vezetett a vad típusú egészséges állatokhoz képest, különösen az LQT2-modellben (38). Az LQT2-nyúl szívvezetékben az akciós potenciál időtartamának megnövekedett térbeli diszperzióját mérték (38, 42), ami fokozott VT/VF indukálhatósághoz, sőt spontán polimorf kamrai tachycardiához és hirtelen szívhalálhoz is vezetett (38, 42). A fentiek alapján ezek voltak az első transzgenikus állatmodellek, amelyek az LQT2 teljes elektrofiziológiai fenotípusát reprodukálták (1. táblázat). A transzgenikus LQT1-nyulak ezzel szemben homogénebben kiszélesedett akciós potenciált mutattak a repolarizáció diszperziójának megnövekedése nélkül, és nem alakult ki spontán VT vagy hirtelen szívhalál (38). Transzgenikus LQT5-nyulakban (39) a KCNE1 mutációja az  $I_{Ks}$ -áram biofizikai tulajdonságainak megváltozását okozta, ugyanis felgyorsult az áram deaktivációja. Ezek a nyulak csak csekély mértékben megnyúlt QT-intervallumot mutattak, azonban emellett a rövid távú QT-variabilitás (short-term beat-to-beat variability of the QT (STVQT)), amely egy újonnan javasolt aritmia előrejelző helyettesítő biomarker, megnövekedett (39, 43). Az LQT5 transzgenikus nyulak fiziológiás körülmények között nem mutattak spontán aritmiákat. Csökkent repolarizációs tartalékuk miatt azonban a fenotípust súlyosbítani lehetett az  $I_{Kr}$ -blokkoló dofetilid alkalmazásával, amely a rövid távú QT-variabilitás további növekedését eredményezte és elősegítette a gyógyszer által kiváltott kamrai tachycardiák kialakulását (39). A fentiek alapján az LQT5 ideális modellt jelenthet a „rejtett” emberi LQT-szindrómák modellezésére, közel normális kiindulási fenotípussal, de fokozott érzékenységgel az  $I_{Kr}$ -blokkoló tulajdonságokkal rendelkező gyógyszerekkel szemben (1. táblázat). A közelmúltban kettős transzgenikus LQT2–5-nyulakat hoztunk létre LQT2-hímek és LQT5-nőstények keresztezéséből. Fenotípusosan ez az LQT2–5-modell nagyon hasonlít az LQT2-re az  $I_{Kr}$  hiánya miatt, ugyanakkor kifejezett  $I_{Ks}$ -funkció-csökkenést mutat a szimpatikus idegrendszer aktivációját követően (44). A fentiek alapján az LQT2–5 transzgenikus nyúlmodell a következő előnyöket mutatja az LQT2-vel szemben:

- betekintést nyújthat a szimpatikus idegrendszer szerepébe az LQTS-hez kapcsolódó aritmogenezisben,
- a csökkent  $I_{Ks}$  miatt olyan magas aritmia-ritmizációval rendelkező betegségek repolarizációs zavarait

1. táblázat. Transzgenikus hosszú QT-szindrómás nyúlmodellek egyes altípusai, azok létrehozása, elektrofiziológiai jellegzetességei és a modellek segítségével feltárt főbb translációs eredmények

LQTS típus	Modell létrehozása	Fenotípus	Kulcsfontosságú translációs eredmények	Referencia
LQT1	Mutáns humán <i>KCNQ1/KvLQT1-Y315S</i> kardioszelektív túlexpresszá-lása (a késői egyenirányító K <sup>+</sup> -áram lassú komponensét vezető csatorna $\alpha$ -alegységének (KvLQT1) domináns negatív mutációja) $\geq$ az $I_{Ks}$ funkciójának kiesése	A humán LQT1 alábbi jellegzetességeinek modellezése: – megnyúlt QT/APD – de: nincs emelkedett aritmiarizikó vagy SCD	– Elektrofiziológiai tulajdonságok: • APD diszperzió nem emelkedett, • VT/VF indukálható gyors szívingerléssel létrehozott cardiomyopathiában, • jobb kamrai fokális ingerületek által iniciált aritmiák, • EAD kialakulása folyamatos adrenerg stimuláció hatására. – Mechanikai funkciók: normális. – Pro/antiaritmiás potenciálja a következő szereknek vizsgálva: anesztetikumok, $I_{KACH}$ - (NicoRandil) és $I_{Kr}$ -aktivátorok (NS1643). – főleg $I_{Kr}$ -gátlók proaritmiás hatásának tesztelésére használhatók.	Brunner et al. 2008; Ziupa et al., 2014, 2019; Odening et al. 2008; Liu et al. 2012; Lau et al., 2015; Kim et al., 2015; Biermann et al. 2011; Bentzen et al. 2011
LQT2	Mutáns humán <i>KCNH2/HERG-G628S</i> kardioszelektív túlexpresszá-lása (a késői egyenirányító K <sup>+</sup> -áram gyors komponensét vezető csatorna $\alpha$ -alegységének (HERG) domináns negatív mutációja $\geq$ az $I_{Kr}$ funkciójának kiesése	A humán LQT2 alábbi jellegzetességeinek modellezése: – megnyúlt QT/APD és meredekebb QT/RR görbe – emelkedett aritmiarizikó és spontán SCD	– Elektrofiziológiai tulajdonságok: • emelkedett APD-diszperzió, amely egyirányú funkcionális blokkot okozva kedvez a reentry VT és VF kialakulásának, • „alternáló diszkordáns”, amely megelőzi a VT/VF-et, • EAD kialakulását a hirtelen adrenerg stimuláció váltja ki. – Mechanikai funkciók: • károsodott regionális diasztolés funkció, megnyúlt kontrakciós idő, • emelkedett regionális mechanikai diszperzió, • a regionális diasztolés diszfunkció súlyosságának és az aritmiarizikónak a pozitív korrelációja. – Nemi hormonok, anesztetikumok, egyéb szerek (antibiotikum, antidepresszáns, antipszichotikum) pro/antiaritmiás potenciáljának vizsgálata. – Proaritmiá-szűrésre való esetleges használat ( $I_{Ks}$ és $I_{Kr}$ -gátlókra való fokozott érzékenység).	Brunner et al., 2008; Odening et al., 2008, 2010, 2012, 2013; Ziv et al., 2009; Liu et al., 2012; Lang et al., 2016a, b
LQT5	Mutáns humán <i>KCNE1-G52R</i> kardioszelektív túlexpresszá-lása (a késői egyenirányító K <sup>+</sup> -áram lassú komponensét vezető csatorna $\beta$ -alegységének (MinK) domináns negatív mutációja $\geq$ csökkent $I_{Ks}$ )	„Csendes” LQTS fenotípus: – normális QT/APD, – emelkedett STV <sub>QT</sub> , – fokozódott apikobazális APD heterogenitás, – Emelkedett proaritmiá-érzékenység.	– A „csendes” LQTS modellje – proaritmiá-szűrésre való esetleges használat: $I_{Kr}$ -gátlókra való fokozott érzékenység (dofetilid indukálta fokozott TdP-hajlam, emelkedett STV <sub>QT</sub> )	Major et al., 2016; Hornyik et al., 2020
LQT2-5	Mutáns humán <i>KCNH2/HERG-G628S</i> és <i>KCNE1-G52R</i> kardioszelektív túlexpresszá-lása $\geq$ kieső $I_{Kr}$ , csökkent $I_{Ks}$	A humán LQT2 alábbi jellegzetességeit tükrözi: – megnyúlt QT/APD és meredek QT/RR görbe, – fokozott <i>ex vivo</i> aritmiahajlam.	– emelkedett regionális APD-diszperzió – proaritmiá-szűrésre való esetleges használat ( $I_{Ks}$ és $I_{Kr}$ -gátlókra való fokozott érzékenység)	Hornyik et al., 2020

modellezheti, mint a szívelégtelenség és a diabetes mellitus, és

- az  $I_{Ks}$  farmakológiai gátlásának vagy aktiválásának proaritmiás/antiaritmiás hatásai vizsgálhatók (44) (1. táblázat).

### A hosszú QT-szindrómához kapcsolódó ritmuszavarok patomechanizmusainak tanulmányozása LQTS-nyúlmodellek segítségével

Klinikai adatok alapján régóta ismert a szimpatikus tónusfokozódás genotípus-specifikus kulcsszerepe a hosszú QT-szindrómás betegek aritmogenezisében. A fokozott adrenerg tónus – például folyamatos magas in-

tenzitású fizikai megterhelés (különösen úszás közben) – az LQT1 esetén, míg a nyugalmi állapotban jelentkező hirtelen fellépő szimpatikus tónusfokozódás – például érzelmi stressz vagy auditív inger – az LQT2-betegekben képes ritmuszavart generálni (45). Ezen kívül a szérumion-koncentrációk változásai (46), vagy a hormonszintekben bekövetkező változások is fokozhatják az aritmogenezist. Az LQT1 és LQT2-ben szenvedő felnőtt nőknél magasabb a ritmuszavarok kialakulásának kockázata a férfiakhoz képest, női LQT2-es betegekben pedig különösen nagy az aritmiarizikó a szülés utáni időszakban (47). Ezen proaritmiás „trigger” tényezők jelenlétén túlmenően a humán LQTS-sel összefüggő ritmuszavarok kialakulásának/fennmaradásának má-

sik elengedhetetlen feltétele az ún. aritmogén szubsztrát, mint például a repolarizáció térbeli és időbeli diszperzió fokozódásának a jelenléte (48). A transzgenikus LQTS-nyúlmodellek genotípus-függő – aritmogenezise nagymértékben hasonló az emberben tapasztaltakhoz. Az LQTS-nyúlmodellben például a kamrai ritmuszavar és a hirtelen szívhalál gyakran stresszhelyzetekben, például párázaskor vagy altatás után jelentkezik (39, 49). Az aritmiarizikót az emberhez hasonlóan befolyásolják a nemi hormonok szintje is, így például a ritmuszavarok kialakulása különösen gyakori a szülés utáni fázisban és krónikus ösztadiol-kezelés esetén (38, 49). Ezek alapján az LQTS-nyúlmodellek tehát különösen alkalmasak lehetnek az LQTS-sel összefüggő, genotípus-specifikus aritmogén trigger mechanizmusok és aritmiaszubsztrát, illetve az új antiaritmiás kezelési lehetőségek vizsgálatára. Az alábbiakban az LQTS-hez társuló ritmuszavarok azon főbb mechanizmusait tárgyaljuk, amelyek vizsgálatában segítséget nyújthatnak a transzgenikus LQTS-nyúlmodellek.

*Aritmia szubsztrát: a repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitásának a szerepe*

Klinikai jellegzetességek: Az LQTS karakterisztikus jellemzője az EKG-n észlelhető megnyúlt QT-intervallum, amely celluláris szinten a szívizomsejtek repolarizációjának megnyúlására vezethető vissza. LQTS-betegekben a szív fiziológiásan is észlelhető repolarizációs inhomogenitásának, tehát a különböző régiók közötti – apiko-bazális, transzmurális és interventrikuláris – kismértékű repolarizációs időeltérések jelentős mértékű növekedését figyelték meg, ezt kvantitatív módon az emelkedett QT-diszperzió (a standard 12 elvezetéses EKG különböző elvezetésein mérhető QT-idők szórása) vagy a megnyúlt  $T_{peak-end}$  intervallum (prekordiális elvezetésekben a T-hullám csúcsa és vége közötti idő, amely a transzmurális heterogenitás mérője) jellemzi (50). Új, nem invazív képző technikák (elektrokardiográfiás képző, EKGi) a repolarizáció kamrák közötti különbségének az emelkedését is feltárták LQTS-betegeknél (51). Ezenkívül a repolarizáció időbeli, ütéstől ütésre („beat-to-beat”) történő változékonyságát jellemző aritmogénitást leíró – ún. „proaritmiás” – paraméternek, a rövid távú QT-variabilitásnak (STVQT, „short-term variability of QT interval”) az emelkedését is megfigyelték LQTS-ben szenvedőkben (52). Szintén leírták az ún. alternáló T-hullámot („T-wave alternans”), amely gyakran megelőzi a kamrai tachyaritmiát LQTS-betegekben (53).

A transzgenikus LQT1- és LQT2-nyulakon végzett vizsgálatok rávilágítanak a repolarizációs diszperzió fokozódásának kiemelkedő jelentőségére az LQTS-sel összefüggő ritmuszavarok kialakulásában: LQT2-nyúl-szívekben például a jobb és bal kamrák közötti kifejezett repolarizációs heterogenitásfokozódást mutattak ki (38, 40, 42), amely kedvez az egyirányú funkcionális blokkok és re-entry körök kialakulásának (38). A repolarizáció

térbeli és időbeli diszperziójának fokozódása létrejöhet dinamikus módon is, például kifejezett „beat-to-beat” QT-variabilitás vagy ún. „alternáló diszkordáns” – a szomszédos régiók közötti temporális regionális repolarizációs heterogenitások – formájában is. Megfigyelések igazolták, hogy transzgenikus LQT2-állatokban ezeknek az alternáló diszkordánsoknak a megjelenése gyakran előrejelzi a VT/VF kialakulását (54). Az LQT2-vel ellentétben az LQT1-nyúlmodellben nem volt szignifikáns mértékű a repolarizáció regionális vagy időbeli diszperziójának emelkedése (38, 40, 42), így ebben a genotípusban nem volt jellemző a spontán vagy provokált VT/VF kialakulása, ami arra utal, hogy LQT1-ben az akciós potenciál időtartamának regionálisan homogénebb megnyúlása nem jár közvetlenül a ritmuszavarhajlam emelkedésével. Amikor az LQT1-szíveket azonban további provokáló hatásnak tették ki, például folyamatos gyors szívingerléssel cardiomyopathiát indukáltak, akkor az akciós potenciál (AP) időtartamok regionális heterogenitásnövekedése, alternáló diszkordáns vagy VT/VF-indukálhatóság – az LQT2-höz hasonlóan – egyaránt megfigyelhető volt (55). Kiemelendő, hogy az akciós potenciálok alternáló diszkordanciája különösen kifejezett volt jelentős kalcium alternáns megléte esetén; és mind a kalcium, mind az AP-alternánsok megszüntethetőek voltak rianodinnal, ami a kalciumháztartás fontosságát hangsúlyozza az LQTS-sel összefüggő ritmuszavarok kialakulása szempontjából (55).

Ezek az adatok tehát arra utalnak, hogy a fenti „aritmogén szubsztrát” – a repolarizáció térbeli és/vagy időbeli diszperziójának a fokozódása – fontos szerepet játszik az LQTS-hez kapcsolódó aritmogenezisben.

*Aritmia triggererek: a korai utódepolarizáció mechanizmusa és szerepe*

Klinikai megfigyelések támasztják alá a genotípus-specifikus aritmia provokáló tényezők – „triggererek” – szerepét az LQTS-sel összefüggő ritmuszavarok kiváltásában: a folyamatosan emelkedett szimpatikus tónus – például tartós magas intenzitású fizikai megterhelés (különösen úszás közben) – az LQT1 esetén, míg a nyugalmi állapotban jelentkező hirtelen fellépő szimpatikus tónusfokozódás – például érzelmi stressz vagy auditív inger hatására – az LQT2-betegekben képes ritmuszavart generálni (45, 56).

LQT1 és LQT2 nyulakban, az előbbi humán megfigyelésekkel összhangban genotípus-specifikus különbségeket találtak a korai utódepolarizáció („early afterdepolarization”, EAD) és az aritmiák kialakulásának a mechanizmusában. LQT2 cardiomyocytákban korai utódepolarizáció hirtelen kialakuló szimpatikus stimulussal váltható ki, míg az izoproterenollal való folyamatos perfúzió inkább megakadályozza az EAD létrejöttét. LQT1-szívekből izolált szívizomsejtekben ezzel szemben a folyamatos adrenerg stimuláció elősegíti az EAD kialakulását (57). A fenti jelenség oka az, hogy a különböző szimpatikus ingerek időben eltérő módon

befolyásolják a szív ionáramait: a hirtelen bekövetkező szimpatikus ingerlés hatására LQT2-ben a befelé irányuló depolarizáló  $I_{Ca,L}$  aktivációja gyorsabb mint a repolarizáló hatású lassú, kifelé irányuló  $I_{Ks}$  aktiválódása, így az  $I_{Ks}$  nem tudja ellensúlyozni a megnövekedett kalciumáram EAD-ot provokáló, aritmogén hatását. LQT2-ben a folyamatos adrenerg stimuláció – pl. sporttevékenység – hatására mind a befelé irányuló  $I_{Ca,L}$  mind az intakt kifelé irányuló  $I_{Ks}$  aktiválódik, így nem alakul ki ritmuszavar. Ezzel szemben LQT1-ben az  $I_{Ks}$  csökkent működésének következtében a folyamatos szimpatikus tónus által aktivált kalciumáramot az  $I_{Ks}$  nem tudja ellensúlyozni, ami EAD és ezáltal aritmia kialakulásához vezethet (57). Ezen túlmenően genotípus-specifikus különbségeket találtak a ritmuszavarok kialakulásának és fenntartásának mechanizmusait illetően is: míg az LQT2-ben a re-entry kialakulásának van kulcsszerepe (38), addig az LQT1-szívekben az aritmogenezis egy új koncepcióját azonosították, amely szerint LQT1-ben az aritmiát fokális (különösen a jobb kamrából kiinduló) stimulusok indítják el, és azt többfókuszú alternáló kisülések tartják fenn (58). A transzgenikus LQT5-nyulakban leírták az  $I_{Ks}$  gyorsabb deaktivációját, valamint egy  $I_{to}$ -mediált alternans kialakulását mint az LQTS-sel összefüggő aritmogenezisnek egy LQT5-re jellemző formáját (59).

#### *Bradycardia és pitvar-kamrai vezetési elváltozások*

A klinikai megfigyelések azt mutatják, hogy bradycardia és pauza-dependens ún. „short-long-short” (rövid-hosszú-rövid) ütési szekvenciák előzik meg a kamrai tachiaritmiák létrejöttét elsősorban az LQT2-betegekben (60). A jelentősen megnyúlt kamrai refrakteritás miatt funkcionális AV-vezetési blokkot – ún. „pseudo-AV-blokkot” –, illetve valódi infranodális AV-blokkot írtak le LQTS-ben (61). Az AV-vezetési blokk előfordulása ritka, de emelkedett aritmiakockázattal jár (62). LQT2-nyulakban bradycardiát, rövid-hosszú-rövid szekvenciát, bigeminiát és „R a T”-n jelenségeket regisztráltak VT előtt (38), hasonlóan a humán LQTS-betegekhez. Ezenkívül epizodikus AV-vezetési blokkokat figyeltek meg a VT/VF előtt LQT2-ben, míg ugyanezt LQT1-es nyulakban nem igazolták (38, 63). Az *in vivo* elektrofiziológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az LQT2-nyulaknál infra-His-blokk és csökkenő His-vezetés alakult ki izoflurán anesztézia alatt, míg az LQT1-nyulaknál lassult His-vezetés és intra-His-blokk akkor alakult ki, amikor az állatokat  $I_{Kr}$ -gátló dofetiliddel kezelték (40). Mindezek genotípus-specifikus különbségekre utalnak a His–Purkinje-rendszert illetően.

#### **Különböző faktorok és farmakonok repolarizációra gyakorolt hatásának vizsgálata LQTS-nyúlmodellekben**

A „repolarizációs tartalék” kifejezés a szívizomsejtek azon élettani képességét írja le, amely szerint valamely repolarizációt nyújtó,  $K^+$ -csatorna-gátló hatással szem-

ben – bizonyos korlátok között – azok képesek fenntartani a normális repolarizációt, más, a blokk által nem érintett „tartalék”  $K^+$ -áramok denzitásának kompenzatorikus fokozásán keresztül (18). A  $K^+$ -áramokon túl a repolarizáció normál időtartamának fenntartásában fontos szerepe van egyéb áramoknak, mint például a platófázis alatt aktív depolarizáló jellegű ún. „window”  $Na^+$ , illetve a  $Ca^{2+}$ -áramok normál működésének is. Krónikus szívelégtelen betegekben leírták például, a „window”  $Na^+$ -áram túlműködését, amely hozzájárul a platófázis megnyúlásához és az újra aktiválódó  $Ca^{2+}$  és fokozott NCX-áramokkal együtt felelőssé tehető a korai utodepolarizáció létrejöttéért, így a ritmuszavarok triggereléséért (64). Tekintettel arra, hogy a re-entry mechanizmusú tachiaritmiák jelentős része olyan betegségek – mint pl. diabetes mellitus, krónikus szívelégtelenség, hipertrófiás cardiomyopathia – meglétekor alakul ki, amely állapotokban ez a repolarizációs rezervkapacitás csökken, így a különböző endogén és exogén faktorok, illetve farmakonok repolarizációra gyakorolt, illetve pro/antiaritmiás hatásának vizsgálatára logikus olyan állatmodelleket használni, amelyek a fenti állapotokat jól modellezik. A transzgenikus LQTS-nyúlmodellek a genetikai eredetű repolarizáló ionáramok csökkenése – tehát redukált repolarizációs rezerv – miatt különösen alkalmasak lehetnek ilyen vizsgálatokra, továbbá segítségükkel az ioncsatornákat aktiváló kísérletes hatóanyagok genotípus-specifikus antiaritmiás hatékonyságának tanulmányozására is jobb lehetőség nyílik. Az alábbiakban a különböző LQTS-nyúlmodellek segítségével felderített, különböző faktorok és farmakonok repolarizációra gyakorolt hatásaival kapcsolatos vizsgálatok eredményei kerülnek rövid ismertetésre.

#### *Nemi hormonok pro- és antiaritmiás hatásainak vizsgálata*

Klinikai adatok egyértelműen bizonyítják a nemek közötti kifejezett különbséget LQTS-betegek aritmiakockázatában: a szívritmuszavarok kialakulásának kockázata magasabb a nőknél a pubertás után, illetve különösen magas a szülést követő időszakban (47), ami arra utal, hogy a nemi hormonok szintjének változásai befolyásolhatják az LQTS-hez kapcsolódó ritmuszavarok kialakulását. Ezen megfigyelések alapján a nemi hormonok proaritmiás és antiaritmiás hatásainak, és ezek háttérben álló molekuláris biológiai mechanizmusoknak a tanulmányozása az LQTS-kutatás kiemelt területévé vált (65).

Az embereken megfigyeltekhez hasonlóan a transzgenikus LQT2-nyulakban is megfigyelték a kamrai aritmiák és a hirtelen szívhalál gyakoribb előfordulását a szülés után (38, 49), ami arra utal, hogy mindkét speciesben hasonlóak lehetnek az aritmiát kiváltó mechanizmusok. Ez alapján az LQT2-modellt a nemi hormonok repolarizációra, illetve aritmogenezisre (trigger és szubsztrát) kifejlesztett hatásainak részletes vizsgálatára használták fel (49): kimutatták, hogy az AP diszper-



ziójának fokozása, és a szimpatikus ingerlés által kiváltott EAD-ok számának emelése miatt az ösztradiol proaritmiás hatású, míg a progeszteron antiaritmiás, protektív hatást fejt ki a szív refraktivitásának lerövidítése, a korai utódepolarizációk kialakulásának csökkenése, valamint a kalcium-homeosztázist stabilizáló hatásai miatt (49). További vizsgálatok kimutatták, hogy a progeszteron növeli továbbá a SERCA aktivitását is azáltal, hogy lassítja annak lebomlását, ezáltal lerövidítve a kalciumtranziensek időtartamát (66). Ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy a progeszteron-alapú terápiák megfontolandók lehetnek mint új, antiaritmiás megközelítések a női LQTS-betegeknél. Az LQT2-nyúlmodellek segítségével derítették fel a közelmúltban két, szülés után magasabb mennyiségben termelődő hormonnak, az oxitocinnak és a prolaktinnak akut  $I_{Ks}$ -gátló hatását (67). E hatásnak feltételezhetően szerepe lehet a postpartum aritmiák kialakulásában, különösen LQT2 esetén (47). Az előbbiekkal szemben a tesztoszteron antiaritmiás hatásának tekinthető LQTS-betegekben, mivel számos, a repolarizációban fontos szerepet játszó  $K^+$ -áram ( $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{K1}$ ) denzitásának emelkedését, a SERCA upregulációját és a kalciumáram csökkenését figyelték meg hatására (68, 69).

#### *Új antiaritmiás szerek hatékonyságának vizsgálata LQTS-nyúlmodellekben*

Miután igazolódott, hogy a repolarizáció térbeli heterogenitásának növekedése kulcsfontosságú az LQTS-hoz kapcsolódó aritmiák kialakulásában, így ezen heterogenitás farmakológiai csökkentésétől erőteljes – genotípus-specifikus – antiaritmiás hatások voltak várhatók az LQTS-nyúlmodellekben. A csatornaaktiváló nicorandil (egy antianginás gyógyszer, amely aktiválja az ATP-függő  $K^+$ -csatornákat), illetve az NS1643 (HERG/ $I_{Kr}$ -aktivátor) lehetséges ilyen antiaritmiás hatásait vizsgálták transzgenikus LQT1-nyulakban (70, 71). Bár mindkét aktivátor rövidítette a szív repolarizációjának időtartamát (így az EKG QT-intervallumát is), az NS1643 proaritmiás hatást mutatott LQT1-ben, rámutatva, hogy az LQTS fenotípusát nehéz korigálni a repolarizáló  $K^+$ -ionáramok aktiválásán keresztül. A proaritmiás hatás hátterében lehetséges, hogy az aktivált repolarizáló  $K^+$ -áram diszperziót fokozó hatása áll, csakúgy, mint maga az LQTS-betegséget okozó mutáció hatása. Az  $I_{Na,late}$ -áram szintén egy lehetséges terápia célpont LQT1 és LQT2 esetén: a  $Na^+$ -áramot gátló tetrodotoxin (blokkolja az  $I_{Na,late}$  és az  $I_{Na,peak}$ -et) vagy ranolazin (blokkolja az  $I_{Na,late}$ -et) megakadályozta a korai utódepolarizáció (EAD) kialakulását és a polimorf kamrai tachycardiát monomorf tachycardiává alakította át LQT1-nyulakban gyors kamrai szívingerléssel kiváltott cardiomyopathia-modellben (55). Hasonlóképpen, a specifikusabb  $I_{Na,late}$ -gátlóról, a GS-458967-ről nemrégiben kimutatták, hogy hatékonyan gátolja a polimorf VT és kamrafibrilláció kialakulását LQT2 izolált nyúl-szívekben azáltal, hogy felgyorsítja a  $Na^+/Ca^{2+}$ -cse-

remechanizmus (NCX) általi kalciumkiáramlást a szív-izomsejtből, rövidíti a kalcium tranziens időtartamát, így csökkenti a kalcium mediálta korai utódepolarizáció kialakulását (72).

#### *Elektromechanikai kölcsönhatások és diszfunkció vizsgálata LQT1- és LQT2-nyúlmodellekben*

Az utóbbi évek klinikai vizsgálatai bizonyították, hogy a tisztán elektrofiziológiai betegségnek tartott LQTS-betegekben szubklinikusan megjelennek mechanikai eltérések is a kóros elektro-mechanikai interakciók miatt. Az új technikai eszközöknek – mint például a fáziskontraszt MRI-nek vagy a strain-echokardiográfnak – a segítségével, amelyek alkalmasak a regionális szöveti mozgás irány és sebesség, illetve a kamrafal deformációjának (strain) a mérésére, kimutatták a diasztolés relaxáció károsodását, a kontrakció elnyúlását és a negatív elektro-mechanikai ablakot az LQTS-betegekben (73–76). Mivel a kontrakció időtartama hosszabb volt a szimptomatikus mint az aszimptomatikus betegekben, és genotípusfüggő eltéréseket is mutatott (kifejezettebb volt LQT2-ben mint LQT1-ben), így megalapozottnak tűnik ezen mechanikai paraméterek használata az LQTS-betegek rizikójának megbízhatóbb becslésében (77). Transzgenikus LQT2-es nyulakban a fáziskontraszt MRI-vizsgálatok igazolták a mechanikus funkciók regionálisan eltérő elváltozásait, a különböző szívterületeken eltérő mértékű diasztolés funkció és kontrakció időtartam-csökkenését. Így a regionális mechanikai funkció heterogenitásának fokozódását tapasztalták LQT2-ben (42). Fontos, hogy regionálisan az elektromos diszfunkció (az APD nyúlás) mértéke és a diasztolés funkció károsodása (42, 78), illetve a mechanikai rendellenességek kiterjedtsége és az aritmiás kockázat nagysága között szoros összefüggés volt kimutatható (79). Ezen túlmenően az LQT2-nyulakon végzett vizsgálatok bizonyították nemcsak az elektromos, hanem a mechanikai funkció nemi eltéréseit is: a kontrakció időtartamának megnyúlását a nőstény és az ösztradiollal kezelt állatokban. Kiemelendő, hogy a humán LQTS-betegekhez hasonlóan, az LQTS-nyúlmodellekben is megfigyelhető, hogy a mechanikai/diasztolés relaxációs károsodás kisebb mértékű LQT1-ben, mint LQT2 fennállása esetén (78). Egy újabb kísérletes megfigyelés szerint a szív előterhelésének („preload”) kísérletes megemelése gyógyszerindukálta, szerzett LQT2-nyúlmodellben nagyobb mértékű, és regionálisan heterogén repolarizáció nyúlást eredményez, mint a kontrollnyulakban (80). Tekintve, hogy a repolarizáció heterogén megnyúlása kedvez a ritmuszavarok kialakulásának, ez felveti annak a lehetőségét, hogy az LQTS-állatok elektrofiziológia szempontból instabilabbak, a szívizom mechanikai viszonyok megváltozására érzékenyebb ezen állatokban, és ennek a mechanizmusnak esetleg szerepe lehet az LQTS-sel összefüggő aritmiák kialakulásában (80). Az LQTS-nyúlmodellek tehát nemcsak elektrofiziológiai, hanem elektromecha-

nikai szempontból is jól modellezik a humán LQTS-betegek patofiziológiáját, így ezen modellek felhasználhatók annak vizsgálatára is, hogy pontosan milyen mechanizmusok játszanak szerepet az LQTS-betegekben tapasztalható mechanikai károsodások létrejöttében, és hogy ezeknek milyen szerepe van az LQTS-sel összefüggő aritmiakészség fokozódásában.

### A transzgenikus LQTS-nyúlmodellek lehetséges alkalmazása gyógyszer indukálta ritmuszavarok szűrésében

A proaritmiás gyógyszer mellékhatások döntő többsége a repolarizáció megnyúlásának talaján következik be, amely az esetek túlnyomó részében a gyógyszer valamely repolarizáló kálium (többnyire, de nem kizárólag a  $HERG\ I_{Kr}$ ) áramra kifejtett gátló hatásának a következtében alakul ki. Mivel a gyógyszer indukálta ritmuszavar nem mindig dóziszfüggő módon következik be, és jelentős individuális különbségeket mutat, ezért megbízható előrejelzése meglehetősen nehéz. Tekintettel a gyógyszer okozta ritmuszavarok potenciálisan halálos kimenetelére, a gyógyszerjelölt vegyületek ilyen vonatkozású megbízható szűrése igen fontos mind a megbízhatóság, mind a gyógyszer visszahívások okozta jelentős anyagi veszteségek minimalizálása érdekében. A proaritmiá-rizikó minimalizálása érdekében született az ún. ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) guidelines (ICH-S7B és ICH-E14) (13, 14) konszenzus, amely a gyógyszerjelölt vegyületek következő gyógyszerbiztonsági vizsgálatának szisztematikus elvégzését ajánlja a fejlesztés különböző fázisaiban: a szer hatásának vizsgálata a

- HERG ( $I_{Kr}$ ) áramra a HERG-csatornát stabilan expresszáló heterológ sejtszereken, mint pl. *Xenopus oocytes*, HEK293 vagy CHO-sejteken,
- akciós potenciálra izolált szívizomsejteken vagy szöveteken (papillaris izmon vagy Purkinje-roston) kutya, nyúl vagy tengerimalac-preparátumokon, *in vitro*
- monofázisos akós potenciálra (MAP) Langendorff-perfundált vad típusú nyúl szívén *ex vivo*,
- EKG-ra (QT-intervallum) altatott kutya modellen *in vivo*,
- *in silico* modelleken történő rizikóbecslés, majd végül a klinikai fázisban humán EKG (elsősorban QT-intervallum) hatások vizsgálata.

Általánosságban jellemző, hogy a gyógyszerfejlesztés kezdeti szakaszában („frontloading”) a nagy kapacitású *in vitro* és *in silico* módszereket, míg a későbbi fázisokban a kiválasztott célmolekulák vizsgálatára a kisebb áteresztő képességű, de komplexebb modellek alkalmazását részesítik előnyben. Az alábbiakban egy rövid összefoglalás olvasható a jelenleg alkalmazott szűrő-módszerek előnyeiről és hátrányairól.

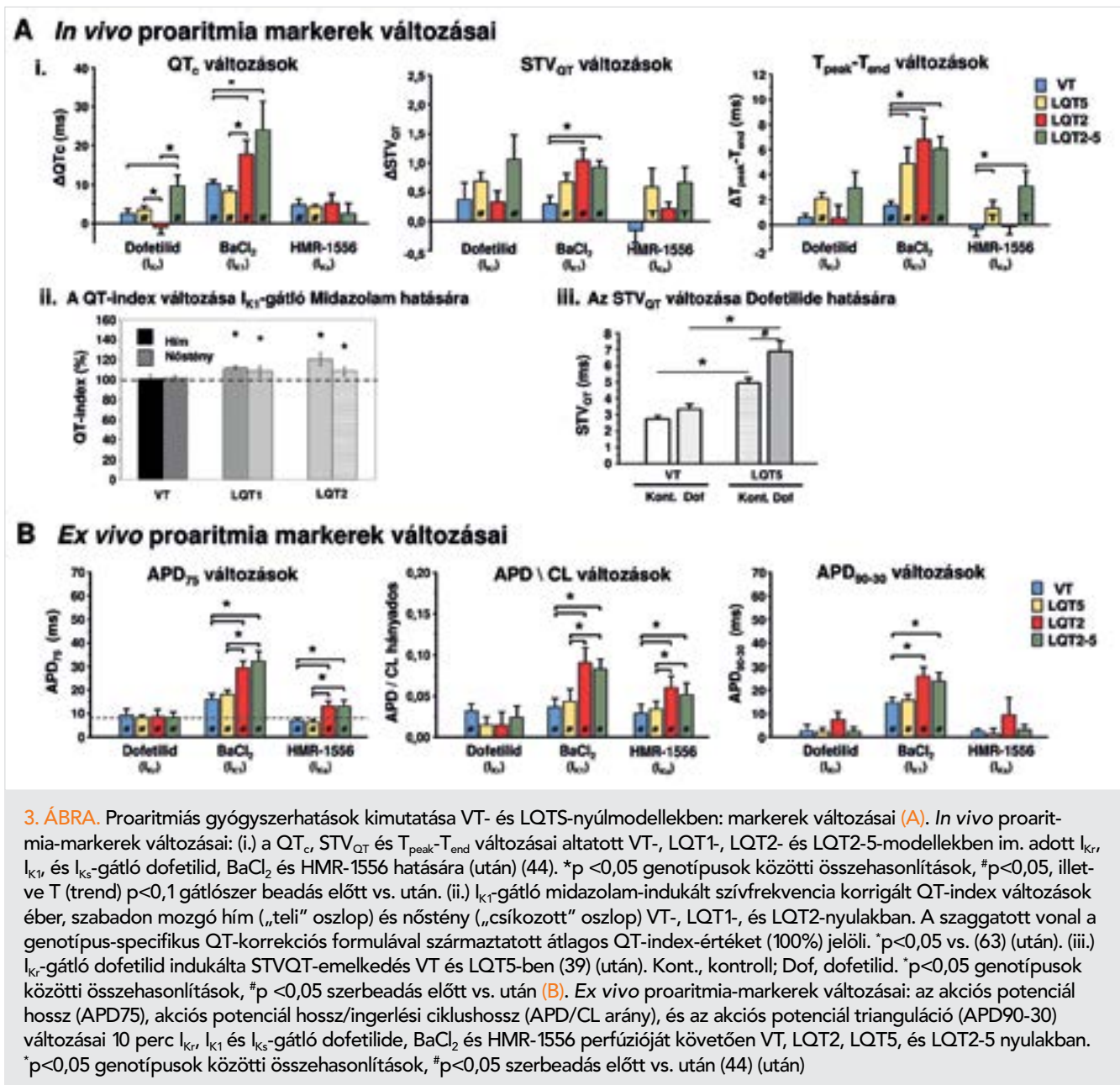
### A proaritmiás gyógyszer mellékhatások szűrésére alkalmazott biomarkerek, modellek és azok limitációi

Tekintettel arra, hogy a proaritmiá ritka – bár potenciálisan halálos – jelenség, a gyógyszer által okozott ritmuszavar kialakulását kemény végpontként meghatározni igen nehéz. Emiatt a gyakorlatban a modelleken a ritmuszavar rizikó fokozódását jelző különféle biomarkerek a vizsgált szer által kiváltott változásait mérjük, és ezek alapján igyekszünk minél megbízhatóbban meghatározni a szer proaritmiás kockázatát (16, 81, 82).

#### Proaritmiá-biomarkerek

Mivel a gyógyszer indukálta ritmuszavarok gyakran a QT megnyúlásának talaján alakulnak ki a klinikai megfigyelések alapján (7), így a preklinikai vizsgálatok is a QT-, illetve APD-megnyúlást tekintették a legfontosabb mérendő biomarkereknek a proaritmiá rizikófelmérese során. Az utóbbi időben azonban számos klinikai és állatkísérletes bizonyíték egyértelműen rámutatott arra, hogy bizonyos repolarizációt nyújtó –  $I_{Kr}$ /HERG-gátló – szerekre a QT-nyújtó hatás ellenére sem jellemző a torsadogén hatás, míg más szerekek kevésbé kifejezett QT-nyújtó hatás ellenére is jelentős proaritmiá-rizikóval bírnak (83, 84). A fentiek alapján számos új proaritmiá-marker került a figyelem előterébe, amelyek nem csupán a repolarizációnyúlást, hanem a repolarizáció térbeli és időbeli változásait is képesek jellemezni. A repolarizáció térbeli (apiko-bazális, transzmurális és interventrikuláris) heterogenitása régóta ismert fiziológiai jellegzetesség, azonban nyilvánvalóvá vált, hogy ennek fokozódása – mint aritmiá-subsztrát – kulcsszerepet játszik a re-entry aritmiák kialakulásában (48). A térbeli heterogenitás jellemzésére a következő markerek használata terjedt el:

- az EKG-n mérhető  $T_{peak-end}$  (a T-hullám csúcsa és vége közötti szakasz precordiális elvezetésekén), amely a transzmurális heterogenitást jellemzi, vagy az ún.
- QT-diszperzió (a 12 elvezetéses EKG QT-intervallumainak „szórása”), amely az apiko-bazális heterogenitással korrelál. A repolarizáció időbeli instabilitásának növekedése szintén kedvez az aritmiák kialakulásának. Ennek egyik formája az ún. restitúció, amely az APD, illetve QT-frekvencia adaptációját jellemző paraméter; gyorsabb restitúció nagyobb aritmiá-érzékenységet jelez (85). Ezen túl számos állatkísérletes (86, 87) és klinikai (88, 89) vizsgálat igazolta, hogy az APD, illetve QT rövid távú – ütésről ütésre történő – variabilitása, az ún. STVQT („short term variability of QT interval”) egy olyan, a repolarizáció időbeli instabilitását jelző paraméter, amelynek növekedése megbízhatóbban használható gyógyszer indukálta ritmuszavarok előrejelzéséhez mint a QT-idő nyúlása. Egyéb paraméterek, mint példá-

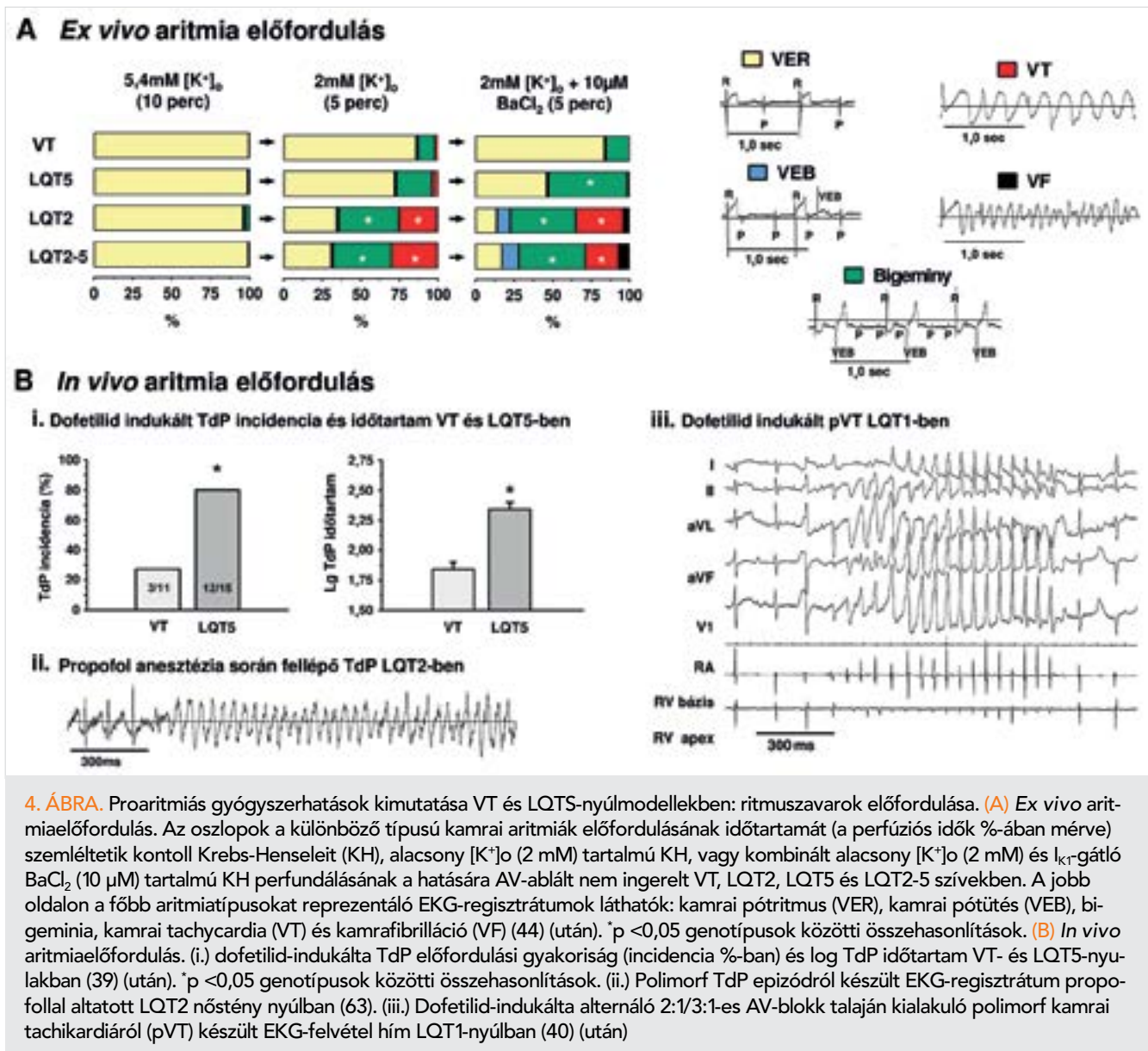


ul a repolarizáció 3. fázisának – egy vulnerabilis periódusnak – a megnyúlását jelző ún. AP „triangulációnak” (háromszögesedésnek, számszerűen az „APD<sub>90</sub>-APD<sub>30</sub>” növekedésének), vagy az APD és QT fordított frekvenciafüggő nyúlásának a kifejezettebbé válásának szintén jelentős prediktív értéke van a gyógyszerek proaritmiás kockázatának becslésében (81).

*Proaritmiia szűrésére használt modellek*

Egy gyógyszerjelölt molekula szív ioncsatornáira gyakorolt hatását izolált natív cardiomyocytákon vagy a vizsgálandó humán ioncsatornát a sejtmembránjukon kifejező, ún. expressziós sejtszisztemeken végzett patch-clamp mérésekkel lehet a legegyszerűbben megvizsgálni (90). Mivel a HERG (I<sub>Kr</sub>)-gátlás kiemel-

kedő fontosságú a gyógyszerindukált ritmuszavarok patogenezisében, így a patch-clamp technikával – annak manuális, illetve automata változtatásával egyaránt – rutinszerűvé vált a gyógyszerjelöltek HERG-gátló hatásának szűrése. Manapság gyakran alkalmaznak nagy áteresztő képességű, antitest-alapú kemilumineszcencia útján működő („HERG-Lite”) (91), illetve rubidium (92) vagy thallium (93) alapú HERG-szűrőmódszereket is. A humán indukált pluripotens őssejt-eredetű cardiomyocyták (iPSC-CM) alkalmazása akár még a beteg-/betegség-specifikus gyógyszerhatások ioncsatorna-szintű kimutatására is alkalmasak lehetnek, és az utóbbi időben egyre ígéretesebb megközelítéssé váltak (94, 95). Bár a fenti technikák kétségkívül fontos információkat szolgáltatnak a gyógyszer HERG-re vagy más ioncsatornákra gyakorolt



hatásairól, az olyan fontos aritmogén tényezők, mint a repolarizáció térbeli heterogenitása, az AP trianguláció vagy a fordított frekvenciafüggő hatás és az időbeli instabilitás nem vizsgálhatóak ezekben a modellekben. A gyógyszer hatását az AP hosszára és alakjára, illetve triangulációjára, valamint annak fordított frekvenciafüggő hatását kiválóan lehet vizsgálni kutya, nyúl vagy tengerimalacból származó papilláris izmon vagy Purkinje-roston mikroelektrod-technikával végzett intracelluláris AP-méréssel (96). Mindezek mellett a szernek a repolarizáció térbeli (regionális) és időbeli diszperziójára való hatásáról az arteriálisan perfundált bal kamrai szelet („wedge”) típusú preparátumok segítségével lehet információt kapni (15). Mivel a két utóbbi módszer az áram-méréseknél jóval komplexebbek, és kevésbé nagy áteresztő kapacitásúak, ezért leginkább a komplex, több ioncsatornát is

befolyásoló, a fejlesztés későbbi preklinikai fázisában lévő célmolekulák proaritmiás potenciáljának megítélésére alkalmasak (96). Egy másik nagyon gyakran használt rendszer a proaritmiás rizikó becslésére a Langendorff-perfundált (patkány, tengerimalac vagy nyúl) szívpreparátum vagy annak automatizált változatának, a SCREENIT-rendszernek a használata (81). Az utóbbi módszert már több száz gyógyszerjelölt aritmogén potenciáljának tesztelésére használták sikeresen. Ebben a modellben a szívet a kanulált aortán keresztül retrográd módon perfundálják, és epikardiális, illetve endokardiális elektródákat használnak a monofázisos akciós potenciálok (MAP) elvezetésére, illetve a szív köré a szövetfürdőben elhelyezett elektródákkal EKG is regisztrálható. Ez a jól bevált rendszer lehetővé teszi az aritmiák (EAD, VES, R-on-T, TdP és VF), valamint

a repolarizáció időbeli instabilitásának és térbeli (apikobazális, transzmurális, interventrikuláris) heterogenitásának becslését, illetve a szer fordított frekvenciafüggő hatásának és az AP triangularizációjának a közvetlen mérését.

Altatott vagy szabadon mozgó (telemetrikus) állatok *in vivo* használhatók a különböző EKG-paraméterek (QT, QT-diszperzió,  $T_{peak-end}$ ,  $STV_{QT}$  stb.) változásainak mérésére. Mivel a proaritmia kialakulása viszonylag ritka esemény normális, egészséges alanyoknál, ezeket a modelleket érzékenyíteni kell a ritmuszavarok iránt – például a szív repolarizációs tartalékának gyengítésével – ahhoz, hogy képesek legyenek közvetlenül kimutatni a gyógyszer okozta aritmogén eseményeket. Ilyen szenzitizált modellek például a repolarizációs tartalékot közvetve csökkentő szívbetegségben szenvedő állatok. A volumen túlterheléses, krónikus atrioventrikuláris blokk (CAVB) kutyán az egyik legjobban jellemzett ilyen szívbetegmodell (97), amelyben az AV-blokk a szív elektromos (csökkent  $I_{Ks}$  és részben csökkent  $I_{Kr}$ -funkció) és strukturális átalakulásához vezet (98). Emiatt a CAVB-modell nagyon érzékeny a HERG/ $I_{Kr}$ -gátló gyógyszer mellékhatásokra, amely ezekben az állatokban könnyen TdP kialakulásához vezet (98, 99). Egy másik jól bevált proaritmia-modell a metoxaminnal ( $\alpha_1$ -adrenerg receptoragonista) szenzitizált, altatott nyúl, amely különösen hajlamos gyógyszer által kiváltott kamrai tachycardia kialakulására, amennyiben a vizsgálandó szer rendelkezik HERG/ $I_{Kr}$ -blokkoló hatással is (100). Végül a repolarizációs tartalék a kifelé irányuló káliumáram(ok) farmakológiai gátlásával is gyengíthető. Leggyakrabban E4031-et (101) vagy dofetilidet (102, 103), illetve HMR-1556-ot (84) használnak a HERG/ $I_{Kr}$ , illetve  $I_{Ks}$ -áramok gátlására *in vivo* Langendorff-perfundált nyúlshívekben vagy *in vivo* nyulakban és kutyákban, és ezáltal szerzett LQT2 vagy LQT1-szerű állatmodellek alakíthatók ki. Ezeknek az érzékenyített állatmodelleknek azonban jelentős korlátai vannak a következők miatt:

- magas költségek, speciális szakértelem és jelentős idő szükséges e modellek létrehozásához (CAVB kutyá),
- az alkalmazott altatószer lehetséges interferenciája a repolarizáló ionáramokkal, valamint potenciális keresztreakció a vizsgált gyógyszer és az  $\alpha_1$ -adrenerg receptorok között a metoxamin-szenzitizált nyúlmodell esetében,
- folyamatos gyógyszeradagolás szükséges a kívánt csatornagátlás fenntartásához hosszú távon, amely a krónikus kísérleteket nagyon költségessé vagy épp kivitelezhetetlenné teszi a farmakológiailag indukált szerzett LQTS-állatmodellekben. Ezért célszerű egy stabilan károsodott repolarizációs tartalékkal rendelkező krónikus állatmodell használata olyan fajban, amely szorosan tükrözi az emberi szív elektro(pato)fiziológiai jellemzőket.

#### A jelenleg használt proaritmia-modellek limitációi

Bár az ICH-irányelvek (13, 14) bevezetése óta nem jelentettek (dokumentált) gyógyszerindukált SCD-esetet újonnan forgalomba hozott gyógyszerek használatával kapcsolatban, mégis, ezen irányelvek korántsem tekinthetők ideálisnak vagy teljes mértékben korszerűnek. Az elmúlt két évtizedben az ICH-szabályozás szigorú követése nagy valószínűséggel sok olyan ígéretes gyógyszerjelölt vegyület kifejlesztésének szükségtelen leállításához vezetett, amelyek – legalábbis speciális korlátozásokkal ellátva – piacra kerülhettek volna. Másrészt a szabályozás nem veszi teljes mértékben figyelembe a proaritmia kialakulásával kapcsolatos számos fontos, újonnan megismert patofiziológiai jellemzőt, mint például:

- annak komplex, több ionáramot is érintő jellegét és
- az új, károsodott repolarizációs tartalékkal rendelkező állatmodellek alkalmazásának jelentőségét és szükségességét.

Azon jelenlegi ismereteink ellenére, miszerint a proaritmia egy többféle ionáram megváltozásával járó komplex gyógyszer mellékhatás következményeként alakul ki, az esetek legnagyobb részében a rutin proaritmia-szűrővizsgálatok továbbra is csupán a tesztvegyületek HERG-blokkoló potenciáljának kimutatására törekednek, mivel ezt tartják a legfontosabb tényezőnek a repolarizáció megnyúlásával összefüggő aritmogenezisben („HERG-centrikus” paradigma). Ennek eredményeként ez a megközelítés a potenciálisan ígéretes gyógyszerjelöltek kizárásához vezet a fejlesztés során, pusztán a vegyület HERG-csatorna-gátló tulajdonsága alapján (104). E problémakör megoldására hozták létre a „Comprehensive *in vitro* Proaritmia Assay” (CiPA) kezdeményezést, amely többek között a gyógyszerjelölt vegyületek többféle humán szívizom ionáramra ( $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Na,peak}$ ,  $I_{Na,late}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Ca,L}$ ) kifejtett hatásának szisztematikus mérését tűzte ki célul heterológ expressziós rendszerekben (105). A CiPA-kezdeményezés kétségtelenül ígéretes megközelítés; ennek gyakorlati értéke azonban jelenleg még nem kellően tisztázott.

A jelenlegi proaritmia-szűrés másik nagy korlátja, hogy annak ellenére, hogy a gyógyszer indukálta TdP leggyakrabban csökkent repolarizációs tartalékkal rendelkező, valamint strukturális szívbetegségeknél fordul elő, a jelenlegi biztonsági értékelések – elvileg – továbbra is elsősorban normális, ép repolarizációjú állatokon illetve a belőlük származó szöveteken/sejteken végzett vizsgálatokon alapulnak (13, 14). Megbízható, olcsó, könnyen használható és stabil, károsodott repolarizációval rendelkező állatmodellek hiánya lehet annak a magyarázata, hogy a gyógyszerindukálta aritmogenezis ezen fontos aspektusa miért tükröződik oly kevésbé a jelenleg is alkalmazott szűrési módszerekben. A fentiek alapján olyan új, aritmogén mellékhatásokra érzékenyebb állatmodellek alkalmazására van szükség a proaritmia-szűrések megbízhatóságának növelése érdekében.

## A transzgenikus LQTS-nyúlmodellek előnyei a proaritmia-kockázat megbízhatóbb előrejelzésében

A számos rutinszerűen alkalmazott állatmodell közül a nyúl kiemelkedő szerepet játszik az aritmiakutatásban, mivel szívelektrofiziológiai jellemzői sok szempontból sokkal közelebb állnak az emberhez, mint más gyakran használt kisállatoké (egér vagy patkány) (25, 26, 28), így például:

- hasonló káliumáramok (főként  $I_{Kr}$  és  $I_{Ks}$ ) felelősek a szív repolarizációjáért nyulakban mint az emberben (22), ezért
- az akciós potenciál alakja is hasonló az emberhez (22, 26), továbbá a szívizom mechanikai funkciója (35) és a farmakológiai beavatkozásokra adott válaszai (37) is jó humán relevanciát mutatnak.

A nyúlmodellek további előnye, hogy viszonylag olcsók, kezelésük és tenyésztésük egyszerűen megoldható, valamint genetikailag is módosíthatók. A fentiek alapján a nyúlmodellek, különösen a csökkent repolarizációs rezervú, gyógyszerindukálta aritmiákra fogékonyabb LQTS-állatok ígéretes modellek lehetnek a proaritmia-szűrésekhez. A repolarizációs rezerv csökkentése létrehozható farmakológiai módon  $K^+$ -csatorna-gátló szerek alkalmazásával (szerzett LQTS) vagy genetikai manipulációval (öröklött LQTS). Régóta ismert, hogy a „krónikus atrioventrikuláris blokk” kutyamodellben a késői egyenirányító  $K^+$ -áram lassú komponensének ( $I_{Ks}$ ) a gyengülése („downregulációja”) miatt a modell kifejezetten alkalmas a HERG/ $I_{Kr}$ -gátló szerek proaritmiás – ebben a modellben torsadogén – hatásának kimutatására. Ezen eredmények alapján derült fény az  $I_{Ks}$  repolarizációban – és a proaritmia kialakulásában – betöltött kulcsszerepére, amely alapján végezték el *Lengyel és munkatársai* nyúlmodellben az  $I_{Kr}$  és az  $I_{Ks}$  repolarizációban betöltött relatív szerepének vizsgálatát: eredményeik szerint az  $I_{Ks}$  vagy  $I_{Kr}$  enyhe gátlása önmagában nem, vagy csak nagyon kismértékben befolyásolja a QT-intervallumot vagy a rövid távú QT-variabilitást (STVQT) és az aritmiahajlamot, azonban a két áram kombinált gátlása jelentős repolarizáció nyúláshoz és TdP ritmuszavar kialakulásához vezet (84). A szerzők javaslata alapján például *Baczkó és munkatársai* is sikerrel alkalmazták az  $I_{Ks}$ -gátló HMR-1556-tal gyengített repolarizációs rezervú nyúlmodellt HERG/ $I_{Kr}$ -gátló hatással rendelkező szerek proaritmiás mellékhatásának vizsgálatára (34, 106).

Bár a farmakológiai módon létrehozott szerzett LQTS-nyúl proaritmia-modell bizonyítékot szolgáltatott a csökkent repolarizációs tartalékkal rendelkező modellek értékéről a gyógyszer okozta ritmuszavarok megbízhatóbb előrejelzésében, a repolarizáló áramok farmakológiai beavatkozásokkal történő csökkentésének számos hátránya van:

- az alkalmazott  $K^+$ -csatorna gátló szerek nem teljesen szelektívek,
- nem alkalmasak hosszú távú proaritmia-vizsgálatokra, és

- nem képesek leképezni a genetikai vagy szív-betegmodellben esetlegesen kialakuló krónikus elektrofiziológiai remodelling folyamatokat, amelyek a hosszú távú repolarizációs problémákkal rendelkező betegeknél előfordulnak. A szerzett LQTS-modellek fenti hátrányainak a kiküszöbölésére és a humán LQTS-betegek patofiziológiájának jobb modellezése érdekében hozták létre a bevezetőben részletesen leírt módon az LQT1 ( $I_{Ks}$  elvesztése), LQT2 ( $I_{Kr}$  elvesztése), LQT5 (csökkent  $I_{Ks}$ ) és a dupla transzgenikus LQT2-5-ös nyúlmodelleket. Az  $I_{Ks}$  működésének teljes kiesése LQT1-ben, vagy funkciójának csökkenése LQT5-ben kifejezetten fogékonyá tette ezeket a modelleket az HERG/ $I_{Kr}$ -gátló hatású gyógyszer mellékhatások kimutatására. A vizsgálatok igazolták, hogy a legkülönbözőbb hatástani csoportokba tartozó, de  $I_{Kr}$ -gátló mellékhatással is rendelkező szerek, úgymint az eritromicin (antibiotikum) (107), fluoxetin (antidepresszáns) (108) vagy a risperidon (antipszichotikum) (108) proaritmiás hatásának kimutatására az LQT1-nyúlmodellek sokkal érzékenyebbek, mint a vad típusú egyedek. Az LQT1-modellben e szerek nyújtották az akciós potenciál hosszát/QT-intervallumot, valamint fokozták az AP regionális diszperzióját és a rövid távú QT-variabilitást (STVQT), illetve kedveztek a különféle aritmiák kialakulásának. Az  $I_{Kr}$  teljes hiányát mutató LQT2-es modell ezzel szemben alkalmasabb volt egyes  $I_{Ks}$  és/vagy  $I_{K1}$ -gátló hatással (is) rendelkező széles körben használt anesztetikumnak, mint például az izoflurán, propofol, tiopental vagy midazolam proaritmiás kockázatának a kimutatására (63). Az eredmények alapján a ketamin/xylazinnal történő altatás bizonyult elektrofiziológiai szempontból a „legsemlegesebbnek”, így különösen súlyos LQTS-ben, vagy elektrofiziológiai célú állatkísérletekhez ez a legbiztonságosabban választható altatószer kombináció (63). Az LQT5-modell a „csendes” LQTS-t tükrözi, amelyben a patch-clamp vizsgálatokkal igazolt gyorsult  $I_{Ks}$  és  $I_{Kr}$  deaktivációs kinetika miatt kismértékben csökkent repolarizációs tartalék csupán az *in vivo* emelkedettebb STVQT és az *ex vivo* észlelhető enyhe regionális repolarizációs heterogenitás növekedésében – emelkedett apikobazális APD-heterogenitás és AP-trianguláció – jelenik meg csupán, amely kontroll körülmények között nem vezet manifeszt QT-nyúláshoz (39, 44). Provokáció, mint például valamely  $K^+$ -csatorna blokkoló szer – különösen  $I_{Kr}$  vagy  $I_{K1}$ -gátló – adására azonban ez a modell is sokkal érzékenyebbnek mutatkozott gyógyszer indukálta TdP kialakulására (39, 44). A dupla transzgenikus LQT2-5-ös modellben az  $I_{Kr}$  csaknem teljes kiesése (az LQT2-vel ellentétben itt indirekt módon kimutatható volt  $I_{Kr}$ ) és az  $I_{Ks}$  funkciójának károsodása LQT2-szerű fenotípust ered-

ményez, amely – az LQT2-től eltérően – azonban alkalmas hosszú QT-vel járó állapotokhoz társuló  $I_{Ks}$ -gátló gyógyszer mellékhatások vizsgálatára (44). Egy későbbi munka, amely az LQTS-nyúlmodellek különböző szelektív  $K^+$ -csatorna-gátló szerekkel szembeni érzékenységét hasonlította össze, megerősítette a fenti eredményeket: az LQT1/LQT5-ös modellek az  $I_{Kr}$ -gátló dofetilidre, míg az LQT2/LQT2-5-ös modellek az  $I_{Ks}$  gátló HMR-1556, illetve  $I_{K1}$ -gátló bárium-klorid hatásaira voltak érzékenyebbek a proaritmia-markerek (AP/QT időtartam, illetve diszperzió és STVQT) változásai és az *ex vivo* aritmiavizsgálatok eredményei (kamrai extra systole, bigeminia, VT- és VF-incidencia és időtartam) alapján (44). A különböző típusú LQTS-nyúlmodellek (LQT1, LQT2, LQT5 és LQT2-5) tehát eltérő érzékenységüknel fogva más-más klinikai szituáció modellezésére és különböző csatornagátló gyógyszer mellékhatások érzékenyebb kimutatására lehetnek alkalmasak.

További előnye a transzgenikus LQT-nyúlmodelleknek, hogy a kongenitális LQTS új kezelési stratégiáinak tesztelésére is alkalmas platformot jelenthetnek, ahogyan azt egy közelmúltban publikált munkánkban mutattuk be, amelyben egy többszörösen telítetlen zsírsavnak, a DHA-nak a repolarizációt normalizáló hatását demonstráltuk LQT2 transzgenikus nyúlmodellel végzett vizsgálataink során (109).

## Következtetések, limitációk

A gyógyszerfejlesztés során a gyógyszerjelölt vegyületek okozta ritmuszavarok megbízható szűrése a mai napig nem teljesen kielégítő. Ennek oka abban keresendő, hogy

- bár a gyógyszer okozta proaritmia sok esetben a szer HERG/ $I_{Kr}$ -gátló hatásával áll összefüggésben, azonban egyéb ioncsatorna-hatások is lényegesen befolyásolják a ritmuszavarok kialakulását (anti- vagy proaritmiás irányba), amelyet a jelenlegi rutin szűrővizsgálatok nem vesznek figyelembe, illetve
- ezeket a biztonsági vizsgálatokat egészséges egyedekben –, illetve szerveken, szöveteken – végzik, és ezek nem a gyógyszer indukálta ritmuszavarokra fokozottabban érzékeny, károsodott repolarizációs rezervkapacitású betegeket reprezentáló állatmodellek.

Irodalmi adatok alapján a nyúl szív-elektrofiziológiai szempontból közeli hasonlóságot mutat az emberrel, és az utóbbi évtizedben/években létrehozott transzgenikus LQTS-nyulak képviselik azon károsodott repolarizációs tartalékkal rendelkező állatmodelleket, amelyek a humán LQTS valamennyi klinikailag fontos jellegzetességét mutatják: megnyúlt QT/APD-t, a repolarizáció térbeli és időbeli diszperziójának fokozódását, emel-

kedett gyógyszerindukálta proaritmia-hajlalmot, spontán ritmuszavarokat (komplex kamrai tachiaritmiák és kamrafibrilláció) és nem utolsósorban, spontán hirtelen szívhalált.

A fentiek alapján tehát az ideális proaritmia szűrési stratégia magában foglalná

- a gyógyszerjelölt vegyületek különböző ionáramokra – a HERG/ $I_{Kr}$  mellett az  $I_{K1}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{ca,L}$ ,  $I_{Na,peak}$  és  $I_{Na,late}$  – való hatásának részletes elektrofiziológiai vizsgálatát natív cardiomyocytákban vagy heterológ expressziós rendszerekben (CiPA-kezdeményezés), kombinálva,
- *in vivo*, illetve *ex vivo* Langendorff-szíven végzett vizsgálatokkal a különböző károsodott repolarizációjú transzgenikus LQTS és egészséges, vad típusú nyúlmodelleken.

A gyakorlatban egy adott tesztelendő gyógyszerjelölt vegyület esetén a legmegfelelőbb LQTS-modell kiválasztásában a szer sejtszinten mutatózó ioncsatorna-hatásai nyújthatnának racionális támpontot:

- $I_{Kr}$ -blokkoló hatással rendelkező szerek esetén LQT1 vagy LQT5,
- $I_{K1}$ -blokkoló szerek esetén LQT2,
- $I_{Ks}$ -áramot gátló szerek esetén pedig LQT2-5-modelleket lehetne választani, mint ideális proaritmia szűrési platformot a vad típusú állatok mellett.

Az *in vivo* vizsgálatok esetén a 12 elvezetéses EKG-n mért különböző proaritmia-markerek ( $Q_{Tc}$ ,  $Q_T$ -diszperzió, STVQT,  $T_{peak-end}$  stb.) vizsgálata elegendő lenne a proaritmia-rizikó becsléséhez; tekintve, hogy a (várható) direkt ritmuszavarok előfordulási aránya meglehetősen alacsony, így ennek közvetlen vizsgálatára irányuló kísérletek EKG-monitorozása túl időigényes és túl költséges lenne. Az *ex vivo* MAP-mérések fontos információt szolgáltatathatnának a proaritmia-markerek, elsősorban a repolarizáció regionális heterogenitásának a változásáról a vad típusú, illetve a fokozott rizikójú betegpopulációt modellező LQTS-állatokban. Az *ex vivo* Langendorff perfundált rendszer használatának további nagy előnye, hogy segítségükkel a szer okozta direkt aritmiaprovokáló hatás is közvetlenül meghatározható (44).

Az LQTS-modellek természetesen számos limitációval bírnak. A modellek az ún. „domináns-negatív” stratégiával, a funkcióvesztéssel járó humán mutáció kardio-szelektív túl-expressziójával lettek létrehozva a „nyúl génkiütés (knock-out), humán génbevitel (knock-in)” technika helyett. Emiatt a túlexpresszált mutáns transzgen kódolta, funkciójukban károsodott humán csatornafehérjék jelenléte mellett ezekben az LQTS-állatokban normál „nyúl” csatornaegységeket is találunk, amely egyes (humán és nyúl) csatornaproteinek interakciói a humán LQTS-től való enyhe – és jelenleg kevésbé ismert – eltéréseket okozhatnak. Az újabb, ún. CRISPR-technika (110) segítségével a jövőben lehetőség lesz a humán LQTS-sel genetikailag jobban megegyező új modelleket létrehozni. Egy másik limitációja

a modelleknek, hogy a mutáció miatt létrejövő krónikus, kompenzatorikus elektrofiziológiai változások (remodelling) tekintetében viszonylag kevésbé ismertek a fajok közötti különbségek. Egérben például megfigyelték a mutáció által nem érintett intakt repolarizáló  $K^+$ -áramok kompenzatorikus növekedését, (így a proaritmia-készség csökkenését) (38), míg az LQT1, illetve LQT2-es nyulakban inkább a repolarizációs tartalék további gyengülését (a proaritmia-készség fokozódását) írták le a mutáns és normál csatornafehérjék interferenciája miatt, amely a csatornaproteinek sejtmembránba való kihelyeződésének („trafficking”) a gátlása miatt jött létre (38). Így a nyulak az emberben leírt szív-elektrofiziológiai sajátosságokhoz való nagyfokú hasonlóságai ellenére mindig körültekintően kell eljárni a fenti modelleken végzett proaritmia-vizsgálatok eredményeinek humán extrapolálásakor.

## Nyilatkozat

*A szerzők kijelentik, hogy az összefoglaló közlemény megírásával kapcsolatban nem áll fenn velük szemben pénzügyi vagy egyéb lényeges összeütközés, összeférhetetlenségi ok, amely befolyásolja a közleményben bemutatott eredményeket, az abból levont következtéseket vagy azok értelmezését.*

## Irodalom

- Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, et al. Mortality and morbidity in patients receiving encaïnide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med* 1991; 324(12): 781–8. <https://doi.org/10.1056/nejm199103213241201>
- Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, et al. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. *Survival With Oral d-Sotalol*. *Lancet* 1996; 348(9019): 7–12. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)02149-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)02149-6)
- Woosley RL, Chen Y, Freiman JP, Gillis RA. Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* 1993; 269(12): 1532–6. <https://doi.org/10.1001/jama.1993.03500120070028>
- Wysocki DK, Bacsaný J. Cisapride and fatal arrhythmia. *N Engl J Med* 1996; 335(4): 290–1. <https://doi.org/10.1056/nejm199607253350416>
- Danker T, Moller C. Early identification of hERG liability in drug discovery programs by automated patch clamp. *Front Pharmacol* 2014; 5: 203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00203>
- Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, et al. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsades de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003; 58(1): 32–45. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00846-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00846-5)
- Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, et al. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2000; 47(2): 219–33. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00119-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00119-x)
- Stansfeld PJ, Sutcliffe MJ, Mitcheson JS. Molecular mechanisms for drug interactions with hERG that cause long QT syndrome. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006; 2(1): 81–94. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.1.81>
- Yap YG, Camm AJ. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart* 2003; 89(11): 1363–72. <https://doi.org/10.1136/heart.89.11.1363>
- Fenichel RR, Malik M, Antzelevitch C, et al. Drug-induced torsades de pointes and implications for drug development. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15(4): 475–95. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2004.03534.x>
- Farkas AS, Nattel S. Minimizing repolarization-related proarrhythmic risk in drug development and clinical practice. *Drugs* 2010; 70(5): 573–603. <https://doi.org/10.2165/11535230-000000000-00000>
- Li Z, Mirams GR, Yoshinaga T, et al. General Principles for the Validation of Proarrhythmia Risk Prediction Models: An Extension of the CiPA In Silico Strategy. *Clin Pharmacol Ther* 2020; 107(1): 102–11. <https://doi.org/10.1002/cpt.1647>
- Food, Drug Administration HHS. International Conference on Harmonisation; guidance on E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs; availability. *Notice*. *Fed Regist* 2005; 70(202): 61134–5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16237860/>
- Food, Drug Administration HHS. International Conference on Harmonisation; guidance on S7B Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals; availability. *Notice*. *Fed Regist* 2005; 70(202): 61133–4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16237859/>
- Lawrence CL, Pollard CE, Hammond TG, Valentin JP. Nonclinical proarrhythmia models: predicting Torsades de Pointes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 52(1): 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2005.04.011>
- Park E, Gintant GA, Bi D, Kozeli D, Pettit SD, Pierson JB, et al. Can non-clinical repolarization assays predict the results of clinical thorough QT studies? Results from a research consortium. *Br J Pharmacol* 2018; 175(4): 606–17. <https://doi.org/10.1111/bph.14101>
- Moss AJ. Long QT Syndrome. *JAMA* 2003; 289(16): 2041–4. <https://doi.org/10.1001/jama.289.16.2041>

- Varro A, Baczko I. Cardiac ventricular repolarization reserve: a principle for understanding drug-related proarrhythmic risk. *Br J Pharmacol*. 2011; 164(1): 14–36. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01367.x>
- Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular research* 1998; 39(1): 60–76. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00110-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00110-2)
- Cesarovic N, Lipiski M, Falk V, Emmert MY. Animals in cardiovascular research: Clinical relevance and translational limitations of animal models in cardiovascular medicine. *European Heart Journal*. 2020; 41(2): 200–3. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz933>
- Baczko I, Jost N, Virag L, Bosze Z, Varro A. Rabbit models as tools for preclinical cardiac electrophysiological safety testing: Importance of repolarization reserve. *Prog Biophys Mol Biol* 2016; 121(2): 157–68. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.002>
- Varro A, Tomek J, Nagy N, et al. Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior. *Physiol Rev* 2021; 101(3): 1083–176. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2019>
- Kaese S, Verheule S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol*. 2012; 3: 345. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00345>
- Brunner M, Guo W, Mitchell GF, et al. Characterization of mice with a combined suppression of I(to) and I(K,slow). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(3): H1201–9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.3.h1201>
- Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated  $K^+$  channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000; 525 Pt 2: 285–98. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.101-1-00285.x>
- Varro A, Lathrop DA, Hester SB, et al. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* 1993; 88(2): 93–102. <https://doi.org/10.1007/bf00798257>
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005; 85(4): 1205–53. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>
- Jost N, Virag L, Comtois P, et al. Ionic mechanisms limiting cardiac repolarization reserve in humans compared to dogs. *J Physiol* 2013; 591(17): 4189–206. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261198>
- Varro A, Balati B, Jost N, et al. The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol* 2000; 523 Pt 1(Pt 1): 67–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00067.x>
- Yang D, Xu J, Zhu T, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. *J Mol Cell Biol* 2014; 6(1): 97–9. <https://doi.org/10.1093%2Fjmc%2Fmj047>
- Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 2005; 569(Pt 1): 7–39. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086223>
- Fedida D, Giles WR. Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *J Physiol* 1991; 442: 191–209. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018789>
- Choi BR, Li W, Terentyev D, Kabakov AY, Zhong M, Rees CM, et al. Transient Outward  $K^+$  Current (I(to)) Underlies the Right Ventricular Initiation of Polymorphic Ventricular Tachycardia in a Transgenic Rabbit Model of Long-QT Syndrome Type 1. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2018; 11(6): e005414. <https://doi.org/10.1161/circep.117.005414>
- Husti Z, Tabori K, Juhasz V, et al. Combined inhibition of key potassium currents has different effects on cardiac repolarization reserve and arrhythmia susceptibility in dogs and rabbits. *Can J Physiol Pharmacol* 2015; 93(7): 535–44. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0514>
- Jung B, Odening KE, Dall'Armellina E, et al. A quantitative comparison of regional myocardial motion in mice, rabbits and humans using in-vivo phase contrast CMR. *J Cardiovasc Magn Reson* 2012; 14(1): 87. <https://doi.org/10.1186/1532-429x-14-87>
- Panfilov AV. Is heart size a factor in ventricular fibrillation? Or how close are rabbit and human hearts? *Heart rhythm* 2006; 3(7): 862–4. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2005.12.022>
- Harken AH, Simson MB, Haselgrove J, Wetstein L, Harden WR, 3rd, Barlow CH. Early ischemia after complete coronary ligation in the rabbit, dog, pig, and monkey. *Am J Physiol* 1981; 241(2): H202–10. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1981.241.2.H202>
- Brunner M, Peng X, Liu GX, et al. Mechanisms of cardiac arrhythmias and sudden death in transgenic rabbits with long QT syndrome. *J Clin Invest* 2008; 118(6): 2246–59. <https://doi.org/10.1172/jci33578>
- Major P, Baczko I, Hiripi L, et al. A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of the KCNE1 gene. *Br J Pharmacol* 2016; 173(12): 2046–61. <https://doi.org/10.1111/bph.13500>
- Odening KE, Kirk M, Brunner M, et al. Electrophysiological studies of transgenic long QT type 1 and type 2 rabbits reveal genotype-specific differences in ventricular refractoriness and His conduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(3): H643–55. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00074.2010>
- Ren XQ, Liu GX, Organ-Darling LE, Zheng R, Roder K, Jindal HK, et al. Pore mutants of hERG and KvLQT1 downregulate the reciprocal currents in stable cell lines. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(5): H1525–34. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00479.2009>
- Odening KE, Jung BA, Lang CN, et al. Spatial correlation of action potential duration and diastolic dysfunction in transgenic and drug-induced LQT2 rabbits. *Heart rhythm*. 2013; 10(10): 1533–41. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.07.038>
- Varkevisser R, Wijers SC, van der Heyden MA, et al. Beat-to-beat variability of repolarization as a new biomarker for proarrhythmia in vivo. *Heart rhythm* 2012; 9(10): 1718–26. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2012.05.016>
- Hornyik T, Castiglione A, Franke G, et al. Transgenic LQT2, LQT5 and LQT2-5 rabbit models with decreased repolarisation reserve for prediction of drug-induced ventricular arrhythmias. *Br J Pharmacol* 2020. <https://doi.org/10.1111/bph.15098>
- Morita H, Wu J, Zipes DP. The QT syndromes: long and short. *Lancet* 2008; 372(9640): 750–63. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)61307-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)61307-0)
- Pezhouman A, Singh N, Song Z, Nivala M, et al. Molecular Basis of Hypokalemia-Induced Ventricular Fibrillation. *Circulation* 2015; 132(16): 1528–37. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.115.016217>
- Sauer AJ, Moss AJ, McNitt S, et al. Long QT syndrome in adults. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(3): 329–37. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.08.057>
- Antzelevitch C. Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(4): H2024–38. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00355.2007>
- Odening KE, Choi BR, Liu GX, et al. Estradiol promotes sudden cardiac death in transgenic long QT type 2 rabbits while progesterone is protective. *Heart rhythm* 2012; 9(5): 823–32. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2012.01.009>
- Priori SG, Napolitano C, Diehl L, Schwartz PJ. Dispersion of the QT interval. A marker of therapeutic efficacy in the idiopathic long QT syndrome. *Circulation* 1994; 89(4): 1681–9. <https://doi.org/10.1161/01.cir.89.4.1681>



51. Vijayakumar R, Silva JNA, Desouza KA, et al. Electrophysiologic substrate in congenital Long QT syndrome: noninvasive mapping with electrocardiographic imaging (ECGI). *Circulation*. 2014; 130(22): 1936–43. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011359>
52. Hinterseer M, Beckmann BM, Thomsen MB, et al. Relation of increased short-term variability of QT interval to congenital long-QT syndrome. *Am J Cardiol* 2009; 103(9): 1244–8. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.01.011>
53. Wilson LD, Rosenbaum DS. Mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans. *Europace*. 2007; 9 Suppl 6: vi77–82. <https://doi.org/10.1093/europace/eum210>
54. Ziv O, Morales E, Song YK, et al. Origin of complex behaviour of spatially discordant alternans in a transgenic rabbit model of type 2 long QT syndrome. *J Physiol* 2009; 587(Pt 19): 4661–80. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.175018>
55. Lau E, Kossidas K, Kim TY, et al. Spatially Discordant Alternans and Arrhythmias in Tachypacing-Induced Cardiac Myopathy in Transgenic LQT1 Rabbits: The Importance of  $I_{Ca}$  and  $Ca^{2+}$  Cycling. *PLoS one* 2015; 10(5): e0122754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122754>
56. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; 103(1): 89–95. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.1.89>
57. Liu GX, Choi BR, Ziv O, et al. Differential conditions for early after-depolarizations and triggered activity in cardiomyocytes derived from transgenic LQT1 and LQT2 rabbits. *J Physiol* 2012; 590(5): 1171–80. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.218164>
58. Kim TY, Kunitomo Y, Pfeiffer Z, et al. Complex excitation dynamics underlie polymorphic ventricular tachycardia in a transgenic rabbit model of long QT syndrome type 1. *Heart rhythm*. 2015; 12(1): 220–8. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.10.003>
59. Kim TY, Kabakov A, Terentyeva R, Terentyev D, Lu Y, Odening KE, et al. Mutations in KCNE1 Promote Cardiac Alternans in Long QT Syndrome Type 5 Rabbits. *Biophysical Journal* 2020; 118(3).
60. Tan HL, Bardai A, Shimizu W, et al. Genotype-specific onset of arrhythmias in congenital long-QT syndrome: possible therapy implications. *Circulation* 2006; 114(20): 2096–103. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.642694>
61. Ben Caref E, Boutjdir M, Himel HD, El-Sherif N. Role of subendocardial Purkinje network in triggering torsades de pointes arrhythmia in experimental long QT syndrome. *Europace* 2008; 10(10): 1218–23. <https://doi.org/10.1093/europace/eun248>
62. Gorgels AP, Al Fadel F, Zaman L, et al. The long QT syndrome with impaired atrioventricular conduction: a malignant variant in infants. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998; 9(11): 1225–32. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1998.tb00096.x>
63. Odening KE, Hyder O, Chaves L, et al. Pharmacogenomics of anesthetic drugs in transgenic LQT1 and LQT2 rabbits reveal genotype-specific differential effects on cardiac repolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(6): H2264–72. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00680.2008>
64. Farkas AS, Makra P, Csik N, et al. The role of the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger,  $I(Na)$  and  $I(CaL)$  in the genesis of dofetilide-induced torsades de pointes in isolated, AV-blocked rabbit hearts. *Br J Pharmacol* 2009; 156(6): 920–32. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00096.x>
65. Odening KE, Koren G. How do sex hormones modify arrhythmogenesis in long QT syndrome? Sex hormone effects on arrhythmogenic substrate and triggered activity. *Heart rhythm* 2014; 11(11): 2107–15. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.06.023>
66. Moshal KS, Zhang Z, Roder K, et al. Progesterone modulates SERCA2a expression and function in rabbit cardiomyocytes. *American journal of physiology Cell physiology* 2014; 307(11): C1050–7. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00127.2014>
67. Bodi I, Sorge J, Castiglione A, et al. Postpartum hormones oxytocin and prolactin cause pro-arrhythmic prolongation of cardiac repolarization in long QT syndrome type 2. *Europace* 2019; 21(7): 1126–38. <https://doi.org/10.1093/europace/euz037>
68. Liu XK, Katchman A, Whitfield BH, et al. In vivo androgen treatment shortens the QT interval and increases the densities of inward and delayed rectifier potassium currents in orchietomized male rabbits. *Cardiovasc Res* 2003; 57(1): 28–36. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00673-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00673-9)
69. Furukawa T, Kurokawa J. Non-genomic regulation of cardiac ion channels by sex hormones. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008; 8(4): 245–51. <https://doi.org/10.2174/187152908786786160>
70. Bentzen BH, Bahrke S, Wu K, et al. Pharmacological activation of Kv11.1 in transgenic long QT-1 rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 57(2): 223–30. <https://doi.org/10.1097/fjc.0b013e318203a44d>
71. Biermann J, Wu K, Odening KE, Asbach S, Koren G, Peng X, et al. Nicorandil normalizes prolonged repolarisation in the first transgenic rabbit model with Long-QT syndrome 1 both in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 2011; 650(1): 309–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.016>
72. Hwang J, Kim TY, Terentyev D, et al. Late  $I(Na)$  Blocker GS967 Suppresses Polymorphic Ventricular Tachycardia in a Transgenic Rabbit Model of Long QT Type 2. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2020; 13(8): e006875. <https://doi.org/10.1161/circep.118.006875>
73. Brado J, Dechant MJ, Menza M, et al. Phase-contrast magnet resonance imaging reveals regional, transmural, and base-to-apex dispersion of mechanical dysfunction in patients with long QT syndrome. *Heart rhythm* 2017; 14(9): 1388–97. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.04.045>
74. Haugaa KH, Amliè JP, Berge KE, et al. Transmural differences in myocardial contraction in long-QT syndrome: mechanical consequences of ion channel dysfunction. *Circulation* 2010; 122(14): 1355–63. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.960377>
75. Nador F, Beria G, De Ferrari GM, et al. Unsuspected echocardiographic abnormality in the long QT syndrome. Diagnostic, prognostic, and pathogenetic implications. *Circulation* 1991; 84(4): 1530–42. <https://doi.org/10.1161/01.cir.84.4.1530>
76. ter Bekke RM, Haugaa KH, van den Wijngaard A, et al. Electromechanical window negativity in genotyped long-QT syndrome patients: relation to arrhythmia risk. *Eur Heart J* 2015; 36(3): 179–86. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu370>
77. Haugaa KH, Edvardsen T, Leren TP, et al. Left ventricular mechanical dispersion by tissue Doppler imaging: a novel approach for identifying high-risk individuals with long QT syndrome. *Eur Heart J* 2009; 30(3): 330–7. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn466>
78. Ziupa D, Menza M, Koppermann S, et al. Electro-mechanical (dys-)function in long QT syndrome type 1. *Int J Cardiol* 2019; 274: 144–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.07.050>
79. Lang CN, Koren G, Odening KE. Transgenic rabbit models to investigate the cardiac ion channel disease long QT syndrome. *Prog Biophys Mol Biol* 2016; 121(2): 142–56. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.004>
80. Lewelat RD, Nimani S, Alerni N, et al. Mechano-electrical interactions and heterogeneities in wild-type and drug-induced long QT syndrome rabbits. *J Physiol* 2023. <https://doi.org/10.1113/jp284604>
81. Hondeghem LM, Carlsson L, Duker G. Instability and triangulation of the action potential predict serious proarrhythmia, but action potential duration prolongation is antiarrhythmic. *Circulation* 2001; 103(15): 2004–13. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.15.2004>
82. Hondeghem LM, Hoffmann P. Blinded test in isolated female rabbit heart reliably identifies action potential duration prolongation and proarrhythmic drugs: importance of triangulation, reverse use dependence, and instability. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2003; 41(1): 14–24. <https://doi.org/10.1097/00005344-200301000-00003>
83. Shah RR, Hondeghem LM. Refining detection of drug-induced proarrhythmia: QT interval and TRLAD. *Heart rhythm*. 2005; 2(7): 758–72. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2005.03.023>
84. Lengyel C, Varro A, Tabori K, et al. Combined pharmacological block of  $I(Kr)$  and  $I(Ks)$  increases short-term QT interval variability and provokes torsades de pointes. *Br J Pharmacol* 2007; 151(7): 941–51. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707297>
85. Taggart P, Lab M. Cardiac mechano-electric feedback and electrical restitution in humans. *Prog Biophys Mol Biol* 2008; 97(2–3): 452–60. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.02.021>
86. Thomsen MB, Verduyn SC, Stengl M, et al. Increased short-term variability of repolarization predicts d-sotalol-induced torsades de pointes in dogs. *Circulation* 2004; 110(16): 2453–9. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000145162.64183.c8>
87. Jacobson I, Carlsson L, Duker G. Beat-by-beat QT interval variability, but not QT prolongation per se, predicts drug-induced torsades de pointes in the anaesthetised methoxamine-sensitized rabbit. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2011; 63(1): 40–6. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.04.010>
88. Hinterseer M, Beckmann BM, Thomsen MB, et al. Usefulness of short-term variability of QT intervals as a predictor for electrical remodeling and proarrhythmia in patients with nonischemic heart failure. *Am J Cardiol* 2010; 106(2): 216–20. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.02.033>
89. Hinterseer M, Thomsen MB, Beckmann BM, et al. Beat-to-beat variability of QT intervals is increased in patients with drug-induced long-QT syndrome: a case control pilot study. *Eur Heart J* 2008; 29(2): 185–90. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm586>
90. Nattel S, Duker G, Carlsson L. Model systems for the discovery and development of antiarrhythmic drugs. *Prog Biophys Mol Biol* 2008; 98(2–3): 328–39. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.009>
91. Wible BA, Hawrylyuk P, Ficker E, et al. HERG-Lite: a novel comprehensive high-throughput screen for drug-induced hERG risk. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; 52(1): 136–45. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2005.03.008>
92. Chaudhary KW, O'Neal JM, Mo ZL, et al. Evaluation of the rubidium efflux assay for preclinical identification of HERG blockade. *Assay Drug Dev Technol* 2006; 4(1): 73–82. <https://doi.org/10.1089/adt.2006.4.73>
93. Titus SA, Beacham D, Shahane SA, et al. A new homogeneous high-throughput screening assay for profiling compound activity on the human ether-a-go-go-related gene channel. *Anal Biochem* 2009; 394(1): 30–8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.07.003>
94. Colatsky T, Ferrini B, Gintant G, et al. The Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative – Update on progress. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016; 81: 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.06.002>
95. Mehta A, Chung Y, Sequiera GL, et al. Pharmacoelectrophysiology of viral-free induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes. *Toxicol Sci* 2013; 131(2): 458–69. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs309>
96. Lindgren S, Bass AS, Briscoe R, et al. Benchmarking safety pharmacology regulatory packages and best practice. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2008; 58(2): 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.07.001>
97. Vos MA, de Groot SH, Verduyn SC, et al. Enhanced susceptibility for acquired torsade de pointes arrhythmias in the dog with chronic, complete AV block is related to cardiac hypertrophy and electrical remodeling. *Circulation* 1998; 98(11): 1125–35. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.11.1125>
98. Volders PG, Sipido KR, Vos MA, et al. Downregulation of delayed rectifier  $K^{+}$  currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation* 1999; 100(24): 2455–61. <https://doi.org/10.1161/01.cir.100.24.2455>
99. Volders PG, Sipido KR, Vos MA, et al. Cellular basis of biventricular hypertrophy and arrhythmogenesis in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsade de pointes. *Circulation* 1998; 98(11): 1136–47. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.11.1136>
100. Carlsson L. The anaesthetised methoxamine-sensitized rabbit model of torsades de pointes. *Pharmacol Ther* 2008; 119(2): 160–7. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.04.004>
101. Maruyama M, Lin SF, Xie Y, et al. Genesis of phase 3 early afterdepolarizations and triggered activity in acquired long-QT syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011; 4(1): 103–11. <https://doi.org/10.1161/circep.110.959064>
102. Farkas AS, Acsai K, Tolth A, et al. Importance of extracardiac  $\alpha$ -1-adrenoceptor stimulation in assisting dofetilide to induce torsade de pointes in rabbit hearts. *Eur J Pharmacol* 2006; 537(1–3): 118–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.014>
103. Orosz S, Sarusi A, Csik N, et al. Assessment of efficacy of proarrhythmia biomarkers in isolated rabbit hearts with attenuated repolarization reserve. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014; 64(3): 266–76. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000116>
104. Pugsley MK, Authier S, Curtis MJ. Principles of safety pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2008; 154(7): 1382–99. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.280>
105. Cavero I, Holzgrefe H. Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay, a novel in vitro/in silico paradigm to detect ventricular proarrhythmic liability: a visionary 21st century initiative. *Expert Opin Drug Saf* 2014; 13(6): 745–58. <https://doi.org/10.1517/14740338.2014.915311>
106. Kristof A, Husti Z, Koncz I, et al. Diclofenac prolongs repolarization in ventricular muscle with impaired repolarization reserve. *PLoS one*. 2012; 7(12): e53255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053255>
107. Ziupa D, Beck J, Franke G, et al. Pronounced effects of HERG-blockers E-4031 and erythromycin on APD, spatial APD dispersion and triangulation in transgenic long-QT type 1 rabbits. *PLoS one*. 2014; 9(9): e107210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107210>
108. Kreifels P, Bodi I, Hornyik T, et al. Oxytocin exerts harmful cardiac repolarization prolonging effects in drug-induced LQTS. *Int J Cardiol Heart Vasc* 2022; 40: 101001. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2022.101001>
109. Castiglione A, Hornyik T, Wulferms EM, et al. Docosahexaenoic acid normalizes QT interval in long QT type 2 transgenic rabbit models in a genotype-specific fashion. *Europace* 2022; 24(3): 511–22. <https://doi.org/10.1093/europace/euab228>
110. Bosze Z, Major P, Bacsko I, et al. The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Prog Biophys Mol Biol* 2016; 121(2): 123–30. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.05.007>
111. Rudy Y, Ackerman MJ, Bers DM, et al. Systems approach to understanding electromechanical activity in the human heart: a national heart, lung, and blood institute workshop summary. *Circulation* 2008; 118(11): 1202–11. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.108.727215>
112. Blenck CL, Harvey PA, Reckelhoff JF, Levinovs LA. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res* 2016; 118(8): 1294–312. <https://doi.org/10.1161/circresaha.116.307509>