

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, Substanzen der antiarrhythmischen Klassen 1a, 1b, 1c, 3 und 4 (VAUGHAN WILLIAMS Klassifizierung) in bezug auf ihre Beeinflussung des Transienten Kaliumauswärtsstroms ( $I_{to}$ ) und des Delayed Rectifier Kaliumstroms ( $I_K$ ) am Herzen zu charakterisieren.

Als Substanzen dieser Klassen wurden Chinidin (1a), Lidocain (1b), Flecainid (1c), Tedisamil (bradykardisierende Substanz mit Klasse-3-Wirkung), E 4031 (3) und Verapamil (4) ausgewählt.

Die Ionenströme wurden an isolierten ventrikulären Myozyten von Ratten ( $I_{to}$ ) und Meerschweinchen ( $I_K$ ) mit Hilfe der Ganzzell-Spannungsklemm-Technik untersucht. Zusammenhänge zwischen den Substanzwirkungen auf Ionenkanalebene einerseits und auf das kardiale Aktionspotential andererseits konnten durch zusätzliches Ableiten des Aktionspotentials über eingestochene Mikroelektroden am multizellulären Präparat analysiert werden.

### Transienter Kaliumauswärtsstrom ( $I_{to}$ ):

- der Transiente Kaliumauswärtsstrom wurde an ventrikulären Myozyten von Ratten gemessen.
- der  $I_{to}$  stellte sich ab Membranpotentialen  $\geq -20$  mV als schnell aktivierender und zeitabhängig inaktivierender positiver Auswärtsstrom dar.
- ab Potentialen  $\geq 10$  mV verhielt sich die Strom-Spannungs-Beziehung linear.

### Substanzwirkungen auf den $I_{to}$ :

- Chinidin, Tedisamil und Flecainid reduzierten in therapeutischen Konzentrationen ( $\leq 10$   $\mu\text{mol/l}$ ) das Strom-Zeit-Integral des  $I_{to}$  auf unter 50 % des Wertes vor Substanzgabe.  
Die Reduktion des Stroms wurde über eine Beschleunigung der Inaktivierung und eine Reduktion des nicht-inaktivierenden Anteils des  $I_{to}$  bewirkt. Die Aktivierung des  $I_{to}$  wurde von den Substanzen weitaus weniger beeinflusst. Dieses Verhalten legt den Schluß nahe, daß die Substanzen an einen geöffneten Zustand der Ionenkanäle binden.
- E 4031 (1-[2-(6-Methyl-2-Pyridyl)ethyl]-4-(4-Methylsulfonylamino-benzoyl)-Piperidin) und Verapamil reduzierten das Strom-Zeit-Integral des  $I_{to}$  mit geringerer Potenz und Effizienz als die oben genannten Substanzen. Die Kinetiken des  $I_{to}$  (Aktivierung/Inaktivierung) wurden dabei nicht signifikant verändert.
- Lidocain hatte bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  keinen signifikanten Einfluß auf einen der untersuchten Parameter des  $I_{to}$ .
- Bei keiner der untersuchten Substanzen war eine deutliche Spannungsabhängigkeit der Wirkung in den Bereichen festzustellen, wo die Strom-Spannungs-Beziehung des  $I_{to}$  voll aktiviert war.

## Delayed Rectifier Kaliumstrom ( $I_K$ ):

- Der  $I_K$  wurde an isolierten ventrikulären Myozyten von Meerschweinchen untersucht.
- Der  $I_K$  aktivierte spannungsabhängig ab Potentialen  $\geq -20$  mV und zeigte keine zeitabhängige Inaktivierungskinetik.
- Im Vergleich zum  $I_{to}$  verlief die Aktivierungskinetik wesentlich langsamer.
- Die Strom-Spannungs-Beziehung des  $I_K$  zeigte im Potentialbereich zwischen 0 und +30 mV deutlich einwärts rektifizierende Eigenschaften. Diese waren um so stärker ausgeprägt, je kürzer die Depolarisationsdauer gewählt wurde. Bei längeren Depolarisationen wurde die I-V-Beziehung zunehmend linear. Aus diesem Verhalten wurde geschlossen, daß der  $I_K$  beim Meerschweinchen mindestens aus einer rektifizierenden und einer linearen Komponente besteht, wobei mit zunehmender Depolarisationsdauer die lineare den Hauptanteil der Gesamtamplitude ausmacht.

## Substanzwirkungen auf den $I_K$

- Alle 6 untersuchten Substanzen reduzierten im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10  $\mu\text{mol/l}$  (Verapamil 0,1 und 1  $\mu\text{mol/l}$ ) sowohl die Amplitude der Aktivierung wie auch die Deaktivierungsströme ("Tail-currents") des  $I_K$  in signifikanter Weise.
- In einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  reduzierten E 4031, Tedisamil, Chinidin und Flecainid die Amplitude der  $I_K$  Aktivierung im Mittel auf unter 60 % des Vorwertes.
- Verapamil (67 %) und Lidocain (74 %) wirkten deutlich schwächer auf die  $I_K$  Aktivierung.
- Von Chinidin und E 4031 wurden die Amplituden der Tail-currents stärker reduziert als die Amplituden der Aktivierung.
- Nach kurzen Depolarisationen wurden die Amplituden der Tail-currents stärker reduziert als nach langen.
- Während die Wirkung von Flecainid, Tedisamil, Verapamil und Lidocain nicht signifikant von der Depolarisationsdauer beeinflusst wurde, wirkten E 4031 und Chinidin deutlich stärker bei kurzen (200 ms) als bei langen (3000 ms) Depolarisationen.  
Bei den letztgenannten Substanzen war ferner auffällig, daß sich die Aktivierung des  $I_K$  zu Beginn der originalen Stromkurve deutlich verlangsamte.
- Die Spannungs-Wirkungs-Beziehung hatte bei Depolarisationen von 200 ms bei E 4031, Chinidin und Flecainid einen glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum bei +20 mV.  
Die Spannungs-Wirkungs-Beziehungen der anderen Substanzen zeigten keine Spannungsabhängigkeit.
- Durch Subtraktion der Strom-Spannungs-Kurven des  $I_K$  vor und nach Substanzgabe wurden I-V-Kurven für die substanzempfindlichen Komponenten errechnet.  
Analog zu den Spannungs-Wirkungs-Beziehungen zeigten die durch Flecainid, E 4031 und Chinidin geblockten Komponenten deutlich rektifizierende

---

Eigenschaften. Die rektifizierenden Eigenschaften waren bei kurzen Depolarisationen deutlicher ausgeprägt als bei langen.

- Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens der Substanzen in bezug auf die  $I_K$  Blockade wurde die Hypothese aufgestellt, daß E 4031 und Chinidin bevorzugt an die geschlossenen Kanäle des  $I_K$  binden, während es sich bei Flecainid und Tedisamil um "offen-Kanal-Blocker" handelt.

Während sich bei E 4031, Chinidin und Flecainid Anzeichen für eine bevorzugte Blockade des kleinen, schnell aktivierenden und rektifizierenden  $I_K$ -Anteils zeigten, schien Tedisamil hauptsächlich den größeren, langsam aktivierenden, linearen Anteil zu blockieren.

#### **Selektivität der Substanzen auf einen der untersuchten Kaliumströme:**

- Während Tedisamil, Flecainid, Chinidin und Verapamil jeweils beide Kaliumströme beeinflussten, zeigte E 4031 eine deutliche Selektivität für den  $I_K$ , während Lidocain in therapeutischen Konzentrationen nur den  $I_K$ , nicht aber den  $I_{to}$  beeinflusst.

#### **Substanzwirkungen auf das kardiale Aktionspotential am isolierten Meerschweinchenpapillarmuskel:**

- Eine Verlängerung des kardialen Aktionspotentials wurde in therapeutischen Konzentrationen durch E 4031, Tedisamil und Chinidin bewirkt (Klasse-3-Effekt), während die Aktionspotentialdauer durch Flecainid und Verapamil nicht beeinflusst und durch Lidocain leicht verkürzt wurde.
- In höheren Konzentrationen zeigten alle der untersuchten Substanzen, außer E 4031 eine Verminderung der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit am Aktionspotential (Klasse-1-Effekt).
- Bei der Untersuchung von E 4031 bei 1- und 3 Hz Reizfrequenz wurde eine negative Frequenzabhängigkeit festgestellt. Gleiches wird aus der Literatur für Chinidin berichtet, wohingegen die Flecainid-Wirkung in bezug auf die Aktionspotentialverlängerung positiv frequenzabhängig sein soll.
- Aus den eigenen Ergebnissen und den aus der Literatur erhältlichen Daten ergeben sich Hinweise darauf, daß Substanzen, die aufgrund der Ganzzell-Spannungsklemm-Versuche als geschlossen-Kanal-Blocker eingestuft wurden (Chinidin und E 4031), eine negative Frequenzabhängigkeit in bezug auf die Aktionspotentialverlängerung zeigen, wohingegen Flecainid, welches als offen-Kanal-blocker eingestuft wurde, nach Angaben aus der Literatur eine positive Frequenzabhängigkeit zeigt.

**Influence of antiarrhythmic agents of different classes on voltage dependent potassium channels and the cardiac action potential in ventricular myocytes.**

**SUMMARY**

The aim of the present study was to characterize the influence of different antiarrhythmic agents belonging to the VAUGHAN WILLIAMS classes 1a, 1b, 1c, 3 and 4 on the Transient Outward Current ( $I_{to}$ ) and the Delayed Rectifier Current ( $I_K$ ) in isolated cardiac myocytes.

Quinidine (1a), Lidocaine (1b), Flecainide (1c), Tedisamil (a bradycardic agent with additional class 3 properties), E 4031 (3) and Verapamil (4) were chosen to be tested.

The investigation of the ionic currents were performed at isolated ventricular myocytes of rats ( $I_{to}$ ) and guinea pigs ( $I_K$ ).

The correlation between the effects of the compounds tested on (i) ionic currents and (ii) on the action potentials were analysed by additional measurements via microelectrodes injected into multicellular probes.

**Transient Outward Current ( $I_{to}$ ):**

- the  $I_{to}$  was measured in cardiac myocytes isolated enzymatically from rat hearts.
- at membrane potentials  $\geq -20$  mV the  $I_{to}$  was identified as a positive outward current with fast activating and time-dependent inactivating properties.
- for membrane potentials  $\geq 10$  mV the  $I_{to}$  showed a linear current-voltage relationship.

**Effects of the compounds on  $I_{to}$  parameters:**

- in therapeutic concentrations ( $\leq 10$   $\mu$ mol/l) Quinidine, Tedisamil and Flecainide reduced the time-current-integral of the  $I_{to}$  to less than 50 % of its predrug-value.  
These reduction was achieved by an acceleration of the inactivation and a decrease of the amplitude of the non-inactivating part of the  $I_{to}$ .  
Thus, it seems likely that these substances bind preferentially to an open state of the  $I_{to}$  channels.
- E 4031 and Verapamil reduced the  $I_{to}$  with both a low potency and efficacy. None of these compounds affected the kinetics of the  $I_{to}$ .

- Lidocaine exhibited no effect on any of the evaluated  $I_{to}$  parameters up to a concentration of 100  $\mu\text{mol/l}$ .
- the evaluated effects of the compounds on the fully activated  $I_{to}$  showed no marked voltage-dependency.

### Delayed Rectifier ( $I_K$ ):

- the delayed rectifier was measured on enzymatically isolated cardiac myocytes of guinea pig hearts.
- the  $I_K$  was activated voltage dependent to potentials more positive than -20 mV and showed no time-dependent inactivation kinetics.
- the kinetics of the  $I_K$  were much slower compared to those of the  $I_{to}$ .
- the current-voltage relationship of the  $I_K$  showed marked inwardly rectifying properties in the potential range between 0 and +30 mV. These rectifying properties were more pronounced at short (200 ms) compared to longer (500/3000 ms) depolarisations since the current-voltage relationship became more linear. It was concluded that the  $I_K$  consists at least of two components: one with rectifying and one with linear properties.  
With longer depolarisations the contribution of the linear component to the total  $I_K$  seems be more important compared to the rectifying component.

### Effects of the compounds on the $I_K$ parameters:

- the six substances produced a significant reduction of the amplitudes of both the activation and the tail-currents of  $I_K$  in the concentration range between 1 and 10  $\mu\text{mol/l}$  (Verapamil 0,1 and 1  $\mu\text{mol/l}$ ).
- E 4031, Tedisamil, Quinidine and Flecainide reduced the amplitude of the  $I_K$ -activation to less than 60 % of its predrug value.
- with a reduction to 67% and 74 % respectively the effects of Verapamil and Lidocain were less pronounced.
- Quinidine and E 4031 reduced the tail-current amplitudes with a greater efficacy than the amplitudes of the activating current.
- the reductions of the tail-current amplitudes by Quinidine, E 4031 and Tedisamil were more pronounced on those tail-currents elicited by short depolarisations (200 ms) compared to those elicited by longer (500/3000 ms) ones.  
Additionally there was an obvious delay of the activation detectable on the original current traces of  $I_K$  under E 4031 and Quinidine.
- for 200 ms depolarisations the voltage-effect relationship for E 4031, Quinidine and Flecainide was bell-shaped with a maximum around +20 mV.  
The effect of the other substances showed no voltage dependence.
- current-voltage relationships for the compound-sensitive component of the  $I_K$  were calculated for each substance by subtraction of the I-V-curves under a compound from the predrug I-V-curve.  
The current-voltage relationships for the Flecainide-, E 4031- and Quinidine-

sensitive component of  $I_K$  showed marked inward rectifying properties which were more pronounced at short compared to longer depolarisations.

- It was concluded that a possible explanation for the different  $I_K$ -blocking properties could be that E 4031 and Quinidine bind preferentially to a closed state of the  $I_K$  channels, whereas Tedisamil and Flecainide more likely act as open channel blockers.
- E 4031, Quinidine and Flecainide affected mainly the small, fast activating and rectifying component of  $I_K$ , whereas Tedisamil more likely block preferentially the bigger, slow-activating and linear part.

### Selectivity of the compounds for one of the potassium channels:

- Tedisamil, Flecainide, Quinidine and Verapamil affected both investigated potassium channels. E 4031 blocked the  $I_K$  with a much higher potency and efficacy than the  $I_{to}$ . Lidocaine did not affect the  $I_{to}$  at all in therapeutic concentration ranges (up to 100  $\mu\text{mol/l}$ ).

### Effects of the compounds on the cardiac action potential:

- E 4031, Quinidine and Tedisamil caused a prolongation of the cardiac action potential in therapeutic concentration ranges, whereas this parameter was not influenced by Flecainide and Verapamil. Lidocaine showed a tendency to shorten the action potential.
- all compounds except E 4031 showed a decrease of the maximum upstroke velocity at higher concentrations (class-1-effect).
- E 4031 showed a "reverse use dependency" concerning the action potential prolongation evaluated at different stimulus frequencies (1 vs. 3 Hz). The same is reported in the literature about Quinidine, whereas Flecainide is supposed to be positive use dependent.
- These results together with data from the literature exhibit clear evidence, that compounds which were classified as possible "closed channel  $I_K$ -blockers" show a reverse-use-dependency in prolonging the cardiac action potential. In contrast to that, Flecainide which was classified as a possible "open channel blocker" is reported to prolong the action potential in a use-dependent manner (detectable only at frequencies  $> 1$  Hz).