

Enhanced prediction and prevention of drug-induced torsades de pointes

Citation for published version (APA):

Johnson, D. M. (2013). *Enhanced prediction and prevention of drug-induced torsades de pointes*. BOXPRESS. <https://doi.org/10.26481/dis.20130308dj>

Document status and date:

Published: 01/01/2013

DOI:

[10.26481/dis.20130308dj](https://doi.org/10.26481/dis.20130308dj)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The major function of the heart is to continuously pump blood through the circulatory system of the entire body and hence careful regulation of this activity is essential. Synchronous pump function is driven by electrical signals, called action potentials. Under normal conditions these signals are generated and regulated by pacemaker cells within the sinoatrial (SA) node, which is located within right atrium. These electrical signals then enter the base of the ventricle at the Bundle of His and then follow the left and right bundle branches along the interventricular septum. The bundle branches then divide into an extensive system of Purkinje fibers that conduct the impulses at high velocity throughout the ventricles. This results in rapid depolarization of ventricular myocytes throughout both ventricles. In mammalian ventricular myocytes the action potential consists of a prolonged plateau phase where calcium ions can enter the myocytes of the ventricle, this triggers calcium induced calcium release, a process essential for excitation-contraction coupling. The global electrical signal of the heart is reflected in the electrocardiogram, and various parameters can be extrapolated from this signal, including the QT time which is utilized as a measure of repolarization duration.

The normal cardiac rhythm is very regular, with minimal fluctuation allowing for continual blood flow, however it can be altered to meet the oxygen demand by nervous impulses or by circulatory substances, including the adrenergic agonist adrenaline. Under certain conditions however the rhythm of the heart can become irregular, too fast (tachycardia) or too slow (bradycardia), or the beats of the atria and ventricle become unsynchronized. These arrhythmias can be caused by a multitude of both extrinsic and intrinsic factors, including genetic mutations (for example Long QT1 syndrome, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)), cardiomyopathies and can also be drug-induced.

Over recent years drug-induced arrhythmias have received increased attention, in particular drug-induced Torsades de Pointes (TdP). This arrhythmia is a polymorphic ventricular tachycardia that can deteriorate into ventricular fibrillation and ultimately sudden cardiac death, and is normally seen in the context of a prolonged QT interval on the ECG. Although regulatory guidelines are in place to prevent compounds causing such arrhythmias getting to market, various pharmacological agents have been shown to cause this arrhythmia, and this has led to the withdrawal of a number of compounds. Currently prolongation of the QT interval and inhibition of one of the major ionic currents (I_{Kr}) are used as surrogate markers that a compound may cause TdP, however this strategy can still lead to both false negatives and false positives, a situation that is detrimental to drug development.

The major aim of this thesis was to further understand mechanisms involved in the generation of this deadly arrhythmia, leading to improved **prediction** and **prevention** of this potentially deadly arrhythmia.

Chapter 1 is a general introduction, in which a background to cellular cardiac electrophysiology is given, as is an overview of the problem of drug-induced TdP and the current strategies for dealing with this issue at the preclinical stage of drug development. It is in this chapter where the concepts of beat-to-beat variability of repolarization (BVR) and the electro-mechanical (E-M) window are introduced. Finally in this chapter the aims and goals of the thesis are formulated.

In *Chapter 2* we describe in detail a number of protocols for assessing changes in action potential duration in canine ventricular myocytes utilizing both optical imaging and electrophysiological techniques. We also present a protocol for assessing the occurrence of after-depolarizations and BVR at the level of the single cell. Both of these protocols can be utilized in cardiac safety pharmacology studies to **predict** the proarrhythmic potential of novel chemical entities and we illustrate how these protocols can reliably detect the electrophysiological effects of a number of reference compounds.

In *Chapter 3* we use one of the techniques described in *Chapter 2* to investigate how BVR can manifest itself at the single cell level. In this chapter isolated myocytes were used to investigate the importance of β -adrenergic receptor (β AR) stimulation of I_{Ks} in the rescue of excessive increases in BVR following I_{Kr} blockade and augmented late I_{Na} . We show that both increases in action potential durations either by I_{Kr} blockade or augmentation of late I_{Na} leads to increased BVR, and these increases can be counteracted by β AR stimulation, most likely due to the concomitant increase in I_{Ks} . In addition we illustrate that an increased BVR corresponds with an increased occurrence of afterdepolarizations, further illustrating the usefulness of this parameter in **prediction** of arrhythmia. Interestingly we also show that under conditions of I_{Ks} blockade and β AR stimulation, similar to the LQT1 phenotype, BVR is exacerbated and this is also accompanied by the occurrence of afterdepolarizations. Both the increase in BVR and the afterdepolarizations can be abolished by chelation of intracellular calcium or by inhibition of the Sodium-Calcium exchanger current illustrating the possible utility of this strategy as a **preventative** antiarrhythmic treatment.

In *Chapter 4* we further develop the findings in *Chapter 3* by investigating the specific mechanisms of BVR under conditions of I_{Ks} blockade and β AR stimulation. Using a variety of techniques we show that under these conditions spontaneous calcium releases (SCR) drive the increase in BVR by causing interspersed action potential prolongation. We illustrate that this is due to alterations in the inactivation of the L-type calcium channel after such calcium releases. A number of strategies,

including CAMKII inhibition and treatment with magnesium were able to significantly reduce BVR, and hence we propose a number of **preventative** strategies in this chapter. These findings were extended beyond the single cell by investigating this phenomenon in both a whole animal model of LQT1 and in multicellular computer models. The findings shown in the single cell, also have relevance in both of these models, illustrating the fact that these data have significant translational value.

These data also illustrate the fact that delayed afterdepolarizations caused by SCRs can not only initiate arrhythmogenesis by causing triggered activity, but also contribute by increasing the temporal and spatial dispersion of repolarization.

Data included in *Chapter 5* shows that there are specific regional differences in the response to β AR stimulation in the left versus the right ventricle (RV). We demonstrate that there is an enhanced responsiveness of the RV to β AR stimulation caused by higher cAMP elevation in the cytoplasm due to a decreased degradation by PDE3 and PDE4 in the RV compared to the LV. These data further illustrate interventricular differences which may be utilized to specifically intervene under various arrhythmic conditions. Further studies should concentrate on how this balance is altered under pathogenic conditions, which may aid in development of safer agents for **prevention** of arrhythmia

In *Chapter 6* we move from the single cell to the whole animal. The chronic AV block dog model has been used for a number of years as a proarrhythmic model as in these animals structural and electrophysiological remodeling render these animals highly susceptible for TdP. In this chapter we use the novel multi ion channel blocker AZD1305 to further investigate the utility of BVR as a proarrhythmic marker in vivo. We show that AZD1305 has a lower proarrhythmic potential than the pure I_{Kr} blocker dofetilide in this model, despite both agents causing similar degrees of repolarization prolongation. Interestingly BVR of the left ventricular monophasic action potential was only increased after administration of dofetilide, further indicating the superiority of this proarrhythmic marker in **prediction** of TdP arrhythmia. Although AZD1305 did cause TdP in a subset of animals, these data further illustrate that the approach of inhibition of multiple (inward and outward) currents holds great promise as a safe antiarrhythmic strategy.

Chapter 7 investigates the utility of the E-M window as a **predictive** marker of TdP occurrence in a guinea pig model. The E-M window has recently been proposed as a novel marker for the prediction of TdP in a dog model of LQT1, and takes into account the temporal difference between the end of mechanical and electrical systole. We illustrate that when anaesthetized guinea pigs are challenged with agents that are known torsadogens, the E-M window becomes negative, with the electrical activity lasting longer than the mechanical activity. Interestingly when the electrical activity was 'safely' prolonged the E-M window did not become negative,

illustrating the fact that this surrogate marker is superior and is more robust than looking at repolarization duration alone.

In the final chapter of this thesis, *Chapter 8*, the main findings of this thesis are discussed together with both their possible significance for both drug development (**prediction**) and novel antiarrhythmic strategies (**prevention**) of drug induced TdP.

In conclusion the data provided within this thesis illustrates the importance of factors other than repolarization duration prolongation and the influence of β AR stimulation and calcium handling in the manifestation of drug-induced arrhythmias. Insights are given into possible novel markers to improve the **prediction** of arrhythmia as well as possible antiarrhythmic mechanisms to **prevent** drug induced TdP.

Samenvatting

De functie van het hart is hoofdzakelijk om continue bloed door het vatensysteem van het gehele lichaam te pompen, waarvoor een nauwkeurige regulatie noodzakelijk is. Gelijkmatic rondpompen wordt aangestuurd door elektrische signalen die actiepotentialen heten. Under normale omstandigheden ontstaan deze signalen iedere hartslag in pacemaker cellen in de sinusknop, gelegen aan de bovenkant van de rechterboezem van het hart. Daarvandaan spreidt het elektrische signaal over de rechter- en linkerboezem voor een gesynchroniseerde contractie. Vervolgens komt het signaal via de atrioventrikulare knop en de bundel van His in het interventrikulair septum, waarvandaan het elektrische signaal vervolgens verder geleidt wordt door de linker en rechter bundeltakken. Hierna geleidt een complex netwerk van Purkinjevezels de elektrische impulsen met grote snelheid door de hartkamers voor een snelle en homogene depolarisatie van de hartspiermassa. Er bestaat een sterke hiërarchie voor de pacemakerfuncties in het hart, waarin meerdere delen van het hart de pacemakerfunctie kunnen overnemen als superieure pacemakers niet functioneren. Onder normale omstandigheden domineert de sinoatriale pacemaker het hartritme. Globale elektrische activiteit in het hart wordt weergegeven in het elektrocardiogram of hartfilmpje (ECG), waarin diverse parameters kunnen worden gemeten, zoals de QT tijd, die dient als maat voor de activatie- of repolarisatieduur van de hartkamers. Op het niveau van de hartspiercel wordt het elektrische signaal gedragen door transmembrane actiepotentialen. Deze hebben een verlengde plateaufase gedurende welke calcium ionen de cel binnengaan, die vervolgens weer leidt tot calcium-geïnduceerde calcium vrijgave, een proces dat essentieel is voor excitatie-contractie koppeling.

Het normale cardiale ritme is regelmatig, met slechts weinig fluctuatie, wat ervoor zorgt dat een continue bloedstroom mogelijk is. Indien nodig is het mogelijk het ritme aan te passen door middel van prikkels uit het autonome zenuwstelsel of door neurohumorale factoren zoals catecholamines, om aan een vergrote zuurstofvraag te kunnen voldoen. Onder bepaalde omstandigheden kan het hartritme onregelmatig worden: te snel (tachycardie), te traag (bradycardie), of de ritmes van boezems en kamers worden ontkoppeld. Deze ritmestoornissen kunnen door diverse ex- en intrinsieke factoren ontstaan, waaronder genetische mutaties (bijvoorbeeld het lange QT syndroom en catecholaminerge polymorfe ventriculaire tachycardie) en structurele cardiomyopathiën, maar ook als ongewenste bijwerking van bepaalde medicijnen.

Gedurende een aantal jaren hebben deze laatstgenoemde ritmestoornissen steeds meer aandacht gekregen, met name medicijn-geïnduceerde torsades de pointes (TdP). TdP is een polymorfe tachycardie die kan eindigen in kamerfibrilleren en vervolgens plotse hartdood, die veelal samen gaat met een verlenging van de QT tijd op het ECG. Welke mechanismen leiden tot TdP ritmestoornissen is nog steeds niet

volledig bekend en ondanks dat er regels bestaan die moeten voorkomen dat stoffen op de markt komen die deze ritmestoornissen kunnen veroorzaken, hebben helaas diverse farmacologische stoffen aantoonbaar geleid tot pro-aritmische bijwerkingen waarna een aantal van deze stoffen van de markt gehaald moesten worden. Een onvolledig begrip van deze ritmestoornis maakt dat de huidige indicatoren die TdP moeten voorspellen (QT verlenging en blokkade van een belangrijke ion stroom, I_{Kr}), zoals opgelegd door de regelgevende autoriteiten, verre van ideaal zijn, waaruit blijkt dat de voorspelling van TdP ritmestoornissen een van de grootste uitdagingen is voor de cardiale veiligheids farmacoloog. Daarom is het centrale doel in dit proefschrift dan ook om het mechanistische begrip van TdP uit te breiden, wat moet leiden tot een **verbeterde voorspelling** en het **voorkomen** van deze potentieel dodelijke ritmestoornis.

Hoofdstuk 1 is de algemene introductie waarin een achtergrond wordt gegeven van cardiale cellulaire elektrofysiologie en een overzicht van het probleem van medicijn-geïnduceerde TdP. Ook de huidige strategieën die bestaan bij het preklinische deel van medicijn ontwikkeling worden besproken. In dit hoofdstuk worden verder de concepten van slag-op-slag variabiliteit van repolarisatie (BVR) en het elektro-mechanische (E-M) "window" geïntroduceerd. Ten slotte worden de doelen van dit proefschrift geformuleerd.

In *Hoofdstuk 2* beschrijven we gedetailleerde methoden om veranderingen in actiepotential duur in kamercellen uit hondenhart te bestuderen met elektrofysiologische en optische beeldvorming technieken. We presenteren vervolgens een protocol waarmee het optreden van na-depolarisaties en de mate van BVR op het niveau van de geïsoleerde hartspiercel kan worden bepaald. Beide methoden kunnen bij cardiale veiligheids farmacologie studies gebruikt worden om het pro-aritmische potentiaal van nieuwe chemische stoffen te **voorspellen** op hartspiercel niveau en we tonen aan hoe deze protocollen de electrofysiologische effecten van een aantal referentie stoffen betrouwbaar detecteren.

In de studies voor *Hoofdstuk 3* hebben we onderzocht hoe BVR zich manifesteert in ventriculaire hartspiercellen uit honden, gedurende medicijn-geïnduceerd lange QT type 1, 2 en 3 omstandigheden. Geïsoleerde hartspiercellen werden gebruikt om het belang van β -adrenerge receptor (β AR) stimulatie van I_{Ks} gedurende bij het terugbrengen van overmatige toename van BVR, ontstaan door I_{Kr} blokkade en late I_{Na} toename, aan te tonen. We tonen aan dat een toegenomen BVR overeenkomt met een toegenomen incidentie van vroege na-depolarisaties, wederom wijzend op de bruikbaarheid van deze parameter bij het **voorspellen** van ritmestoornissen. We tonen verder aan dat onder omstandigheden van I_{Ks} blokkade en β AR stimulatie, zoals tijdens het lange QT fenotype, BVR is toegenomen en dat deze toename samen gaat met het optreden van na-depolarisaties. Zowel de toename in BVR als het optreden van na-depolarisaties kan ongedaan gemaakt worden door chelatie van

intracellulair calcium of door remming van de natrium-calcium “exchanger” stroom, duidend op hun potentiaal als **preventieve** antiaritmische strategieën.

In *Hoofdstuk 4* onderzoeken we specifieke mechanismen van BVR gedurende I_{Ks} blokkade en β AR stimulatie verder. Met behulp van verscheidene technieken tonen we aan dat onder deze omstandigheden spontane calcium vrijgave (SCR) zorgen voor de toename in BVR door wisselende actiepotentiaal verlenging. We tonen aan dat dit wordt veroorzaakt door wisselingen in de inaktivering van het L-type calcium kanaal na SCR. Diverse behandelingen, waaronder CaMKII inhibitie en toediening van magnesium, verminderden BVR. Vandaar dat we een aantal **preventieve** strategieën voorstellen gebaseerd op de resultaten uit dit hoofdstuk. We trekken onze resultaten door van de geïsoleerde hartspiercel naar het diermodel van LQT1 en multicellulaire computermodellen. We tonen aan dat late na-depolarisaties, veroorzaakt door SCR, niet alleen aritmieën kunnen veroorzaken via getriggerde activiteit, maar ook door temporele en spatiële dispersie van repolarisatie te vergroten.

Data uit *Hoofdstuk 5* tonen aan dat er regionale verschillen bestaan in de respons op β AR stimulatie in de linker (LV) en rechter (RV) hartkamer. Toegenomen gevoeligheid van de RV op β AR stimulatie wordt veroorzaakt door een hogere cAMP concentratie in de myoplasma vanwege een toegenomen afbraak door PDE3 en PDE4 in de RV vergeleken met de LV. We tonen aan dat PDE3 en PDE4 ervoor zorgen dat cAMP gekompartimentaliseerd wordt waardoor locatie-specifieke verschillen tussen de hartkamers ontstaan bij β AR stimulatie. Aangezien BVR alleen **voorspellend** is voor aritmieën wanneer deze gemeten wordt in de LV, kan deze kompartimentalisatie hier gedeeltelijk mee te maken hebben. Verder onderzoek is essentieel om het begrip over de mogelijke relaties tussen PDE's, cAMP signalen en BVR te vergroten. Verder kunnen toekomstige studies zich richten op hoe de β AR respons in de hartspiercel en de onderliggende verschillen in PDE verdeling veranderd worden onder pathologische cardiale omstandigheden, wat kan bijdragen tot verbeterd begrip van elektrische remodelering en de ontwikkeling van veiligere anti-aritmische medicijnen.

In *Hoofdstuk 6* gaan we van de geïsoleerde cel naar het hele dier. Het hondenmodel met chronisch compleet atrioventriculair blok wordt al tientallen jaren gebruikt als pro-aritmisch model omdat deze dieren vanwege structurele en elektrische remodelering, zeer gevoelig zijn voor TdP. We gebruikten de nieuwe multi-kanaal blokker AZD1305 om de bruikbaarheid van BVR als pro-aritmische marker in vivo te onderzoeken. We tonen aan dat AZD1305 in dit model een lager pro-aritmisch potentiaal heeft dan de pure I_{Kr} blokker dofetilide, ondanks dat beide stoffen een vergelijkbare verlenging van repolarisatie laten zien. Het is interessant te zien dat BVR van de LV monofasische actiepotentiaal alleen verlengt na toediening van dofetilide en dat dit, samen met andere kenmerken, verder wijst op de superioriteit

van deze pro-aritmische marker bij het **voorspellen** van TdP ritmestoornissen. Ondanks dat AZD1305 leidde tot TdP in een subgroep, tonen deze data nog steeds aan dat het blokkeren van meerdere (in- en uitwaartse) ionstromen, veelbelovend is als antiaritmische strategie.

In *Hoofdstuk 7* beschrijven we het gebruik van de E-M window als **voorspellende** marker voor het optreden van TdP in een cavia model. De E-M window werd recentelijk voorgesteld als nieuwe marker voor het voorspellen van TdP in een hondenmodel van LQT1 en het houdt rekening met het temporele verschil tussen het einde van de mechanische en elektrische systole. We tonen aan dat wanneer geanestheerde cavia's worden blootgesteld aan bekende TdP opwekkers, de E-M window negatief wordt, waarbij de elektrische activiteit vaak (veel) langer duurt dan de mechanische activiteit. Opvallend is dat wanneer de elektrische activiteit "veilig" verlengt, de E-M window niet negatief wordt, hetgeen aantoont dat deze alternatieve marker beter en meer robuust is dan alleen repolarisatie duur.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, *Hoofdstuk 8*, worden de voornaamste bevindingen uit dit proefschrift bediscussieerd, samen met hun mogelijke belang voor medicijn-ontwikkeling en veiligheids farmacologie (**voorspelling**) en nieuwe anti-aritmische strategieën (**preventie**) bij medicijn-geïnduceerde TdP.

Concluderend geven de resultaten uit dit proefschrift het belang aan van factoren anders dan verlenging van repolarisatie, de invloed van β AR stimulatie en calcium verwerking in het optreden van medicijn-geïnduceerde ritmestoornissen. Er wordt inzicht gegeven in mogelijke, nieuwe markers die verbeterde **voorspelling** van deze ritmestoornis mogelijk maken, alsmede in mogelijke anti-aritmische mechanismen die medicijn-geïnduceerde TdP kunnen **voorkomen**.

