

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

TIMOL HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SZÍVIZMON ÉS VÁZIZMON

DR. SZENTANDRÁSSY NORBERT



Témavezető:

Dr. Magyar János

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2003**

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	5
<u>I/1. A timol</u>	<u>5</u>
<u>I/2. Timolanalógok</u>	<u>6</u>
I/2.1. A karvakrol.....	6
I/2.2. Az eugenol	7
I/2.3. A guaiakol	8
I/2.3. A vanillin.....	8
I/2.4. A zingeron.....	9
 II. Célkitűzések	 10
 III. Anyagok és módszerek	 11
<u>III/1. Sejtizolálás</u>	<u>11</u>
III/1.1. Szívizomsejtek előállítása kutya bal kamrájából.....	11
III/1.2. Harántcsíkolt izomrostok izolálása patkányból.....	11
<u>III/2. Az akciós potenciál mérése</u>	<u>12</u>
<u>III/3. Ionáramok mérése</u>	<u>13</u>
III/3.1. Kutya szívizomsejtek ionáramainak mérése feszültség-clamp technikával.....	13
III/3.2. Ionáramok mérése patkány harántcsíkolt izomrostokon kettős vazelin gap technikával	15
<u>III/4. Kontrakciós erőmérés.....</u>	<u>15</u>
<u>III/5. Bal kamrai nyomás- és intracelluláris kalciumszint mérése Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven</u>	<u>16</u>
<u>III/6. Single channel mérések mesterséges lipidkettősrétegbe beépített kutya szívizomból származó rianodin receptoron (RyR).....</u>	<u>17</u>
<u>III/7. Kutya szívizomból származó nehéz szarkoplazmatikus retikulum vezikulákból történő kalciumfelszabadulás meghatározása.....</u>	<u>18</u>
<u>III/8. Az ATP-áz aktivitás mérése</u>	<u>18</u>
<u>III/9. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis.....</u>	<u>19</u>
<u>III/10. A vizsgált molekulák oldása</u>	<u>19</u>

IV. Eredmények	20
IV/1. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek akciós potenciáljára.....	20
IV/2. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek L-típusú kalcium áramára	20
IV/3. A timol hatása egészséges humán kamrai szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára	22
IV/4. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek tranziens kifelé irányuló kálium áramára	23
IV/5. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek késői egyenirányító kálium áramának gyors és lassú komponensére	24
IV/6. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek befelé egyenirányító kálium áramára	25
IV/7. A timol analógjainak hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek L-típusú kalcium áramára	25
IV/8. A karvakrol hatása egészséges humán kamrai szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára	28
IV/9. A timol hatása a szívizomkontrakcióra	28
IV/10. A timol hatása a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szívre	29
IV/11. A timol hatása kutya nehéz szarkoplazmatikus retikulum (SR) vezikulák kalciumforgalmára.....	30
IV/12. A timol hatása lipidkettősrétegbe beépített, kutyaszívből izolált RyR-ra.....	30
IV/13. A timol hatása patkány harántcsíkolt izomrostok kalcium áramára	31
IV/14. A timol hatása patkány harántcsíkolt izomrostok kálium áramára	33
V. Megbeszélés	34
V/1. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek ionáramaira és akciós potenciáljára	34
V/2. A timol hatása egészséges humán kamrai szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára	36
V/3. A timol hatása patkány harántcsíkolt izomrostjainak ionáramaira	36
V/4. A timol hatása a szívizomkontrakcióra és a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szívre.....	37
V/5. A timol hatása kutya nehéz SR vezikulák kalciumforgalmára és a lipidkettősrétegbe beépített kutya RyR-ra.....	37

<u>V/6. A timollal végzett kísérleteink eredményeiből levonható következtetések</u>	39
<u>V/7. A timol analógjainak hatása kutya izolált szívműködésének L-típusú kalcium áramára</u>	40
<u>V/8. A karvakrol hatása egészséges humán kamrai szívműködés L-típusú kalcium áramára</u>	41
<u>V/9. A timol analógjainak szerkezete és az L-típusú kalcium áramra kifejtett hatásai közötti összefüggés</u>	42
VI. Összefoglalás	45
VIII. Köszönetnyilvánítás	47
IX. Irodalomjegyzék	48

I. BEVEZETÉS

I/1. A timol

A timol (2-izopropil-5-metil-fenol) a monociklikus monoterpének csoportjába tartozó fenolszármazék (1. ábra). Lipofil tulajdonságú, vízben gyakorlatilag oldhatatlan, alkoholban, kloroformban és éterben jól oldódik. Jellegzetes szagú, fényérzékeny, szobahőmérsékleten fehér kristályos anyag. Erős fertőtlenítő hatása van, fenol koefficiense 20, a fenolnál 20-szor erősebb dezinficiens. A timol a természetben is előfordul, növényi olajok gyakori összetevője. Nagy mennyiségben található a kakukkfű (41%) és az oregánó illóolajában (54%) (Manou és mtsai, 1998.). Irodalmi adatok szerint a timol 1 millimólos koncentrációban specifikusan gátolja egyes patogén baktériumok, például a *Bacillus cereus* ATP termelő enzimrendszerét (Shapiro és Guggenheim, 1995.), míg 3 mM-nál nagyobb koncentrációk esetén károsítja a sejtmembránt és az intracelluláris molekulák gyors kiáramlását okozza. Ezen alapul a molekula baktericid hatása, amely a fungicid és antioxidáns tulajdonsága mellett a timol sokrétű felhasználásának az alapja. Különböző termékek tartósítására alkalmazzák nemcsak az élelmiszeriparban (Aeschbach és mtsai, 1994.), de a növényvédelemben (Lee és mtsai, 1997.; Montes-Belmont és Carvajal, 1998.), valamint kozmetikai termékekben is (Manou és mtsai, 1998.). A vegyiparban szérumminták, oldatok stabilizálására és tárolására is használják (Iarmol'chuk, 1996.). Számos egészségügyi alkalmazása is ismert a molekulának. Antibakteriális hatása miatt a mellkasi folyadékgyülemek megszüntetése céljából végzett pleurodézisek során használják a fertőzések megelőzésére (Jacobi és mtsai, 1998., Turler és mtsai, 1997.). Fogászati kezelések során a fogtömések alá helyezve egyrészt fertőtleníti a területet, másrészt a tömés alól lassan kiáramolva hatékonyan gátolja a szájban a baktériumok szaporodását (Skold és mtsai, 1998.). 1% chlorhexidint és 1% timolt tartalmazó oldat szignifikánsan csökkenti a nyálban és a fogakon található plakkokban a *Streptococcus mutans* baktériumok számát (Twetman és mtsai, 1995.; Ogaard és mtsai, 1997.). Ugyanez az oldat jelentősen csökkenti a fogínyágy váladékában jelenlévő gyulladásos mediátorok (PGE_2 , PGI_2 , LTB_4 , $\text{IL-1}\beta$) mennyiségét, ezért jó hatásúnak bizonyult krónikus ínygyulladás kezelésében (Yucel-Lindberg és mtsai, 1999.). Erős antibakteriális hatása miatt a timol 1%-os oldata több szájvíznek is összetevője. Melanoma B16(F10) sejtvonalon végzett kísérletekkel igazolták, hogy a timol gátolja a tumorsejtek növekedését és osztódását. Egy másik megfigyelés szerint a timol és más terpének *in vitro* javítják az emlőtumorsejtek kezelésében alkalmazott, igen erősen lipofil tulajdonságú tamoxifen bőrön keresztüli felszívódását (Gao és Singh, 1998.). A timolt antioxidáns hatása miatt felhasználják a folyékony halotán stabilizálására is. Régóta ismert,

hogy a halotállal történő altatással végzett műtétek szövődményeként hepatitis alakulhat ki. Ezen úgynevezett halotán hepatitisért egyes szerzők az altatógáz stabilizálására használt timolt teszik felelőssé (Elliot és Sturnin, 1993., Ray és Drummond, 1991.). Puhatastűek (*Helix pomatia*) neuronján azt találták, hogy a timol gátolja a kalcium áramokat és a félgátló koncentráció 200 μ M körüli értéknek adódott (Győri és mtsai, 1991). Ugyanezen preparátumon más szerzők által végzett kísérletekben azt tapasztalták, hogy a timol mikromólos koncentrációban a koffeinhez hasonlóan kalcium-felszabadulást idéz elő a sejtek intracelluláris raktáraiból (Kostyuk és mtsai, 1991, 1992.). Ezen hatását fél millimólos koncentrációban simaizmokon is leírták (Hisayama és Takayanagi, 1986.), de szívizom esetében nincsenek hasonló adatok.

Az izmok excitációs-kontrakciós kapcsolatának működését vizsgáló kísérletekben vagy a neurotranszmitterek, neuromodulátorok felszabadulásának szabályozását tanulmányozó vizsgálatokban szükség lehet az intracelluláris kalciumkoncentráció növelésére, amelyet rutinszerűen koffeinnel idéznek elő (Dutka és Lamb, 2000.; Murchison és Griffith, 1999.; Duke Adrian és Steele Derek, 1998.). Ismert azonban, hogy a koffein ezen hatásának kialakulásához viszonylag nagy, millimólos koncentrációra van szükség. A koffein kémiai szerkezetéből adódóan igen rosszul oldódik mind vízben, mind a laboratóriumi munkák során általában használt egyéb oldószerekben (alkohol, éter, DMSO), ami nagymértékben megnehezíti a szer kísérletes felhasználását. Izmokban a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) koffein hatására bekövetkező kalciumfelszabadulás viszonylag lassan jön létre és a molekula ezen hatását nehezen lehet reprodukálni, ami megnehezíti az eredmények standardizálását. Mindezek alapján a koffein az intracelluláris raktárakból történő kalciumfelszabadítás szempontjából egyáltalán nem nevezhető ideális szernek. A fent említett irodalmi eredmények alapján azt reméljük, hogy a timol alacsony koncentrációban szívizomsejteken is képes lesz az SR-ből kalciumot felszabadítani. A koffeinnél jobb oldékonysága és könnyebb használhatósága miatt a jövőben a kalciumfelszabadítás kiváltásában átveheti a koffein helyét, megkönnyítve ezzel a kutatók dolgát.

I/2. Timolanalógok

I/2.1. A karvakrol

Az általunk vizsgált timolanalógok közül a karvakrol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) mutat legnagyobb hasonlóságot a timol szerkezetével (1. ábra). A két molekula móltömege teljesen megegyezik, a karvakrol mindössze a hidroxilcsoport elhelyezkedésében különbözik a timoltól, ezért számos kémiai tulajdonságuk hasonló. A karvakrol is lipidoldékony és

aszimmetrikus töltéseloszlással rendelkezik. Vízben oldhatatlan, alkoholban és éterben korlátlan mennyiségben oldódik. Szobahőmérsékleten folyékony halmazállapotú, a szaga a timoléhoz hasonló. Különböző növényi olajok gyakori összetevője, nagyobb mennyiségben a kakukkfű, a majoránna, valamint az oregánó tartalmazza. Erős baktericid, fungicid, rovarölő és féregellenes hatása van, mely tulajdonságainak köszönhetően a timolhoz hasonlóan széles körű gyakorlati alkalmazást nyert. Használják fertőtlenítésre (Chang és mtsai, 2001.), növényvédelemre (Lee és mtsai, 1997.), kozmetikai termékek gyártására, valamint élelmiszerek tartósítására és ízesítésére (Manou és mtsai, 1998.; Aeschbach és mtsai, 1994.). A medicina területén elsősorban a fogászati kezelések során, a tömőanyag behelyezése előtt kerülnek alkalmazásra (Shapiro és Guggenheim, 1995.; Yucel-Lindberg és mtsai, 1999.). A karvakrol már mikromólos koncentrációban, a koffeinhez és a timolhoz hasonlóan kalciumfelszabadulást idéz elő a neuron, valamint a simaizomsejtek intracelluláris kalciumraktáraiból (Kostyuk és mtsai, 1991.; Hisayama és Takayanagi, 1986.). Egy millimólos koncentrációban, a timolhoz hasonlóan, a karvakrol specifikusan gátolja egyes patogén baktériumok, például a *Bacillus cereus* ATP termelő enzimrendszereit, míg 3 mM-nál nagyobb koncentrációk esetén irreverzibilisen károsítja a sejtmembránt, és az intracelluláris molekulák gyors kiáramlását okozza. Ez utóbbi tulajdonságán alapszik a szer baktericid hatása (Ultee és mtsai, 1998.).

I/2.2. Az eugenol

Az általunk vizsgált timolanalógok közül az eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil)-fenol) szintén a monociklikus monoterpének csoportjába tartozó fenolszármazék (1. ábra). Az eugenolról is elmondható, hogy lipofil molekula, alkoholban, kloroformban és éterben jól, vízben nagyon kevésbé oldódik. Szobahőmérsékleten színtelen vagy halványsárga, fényérzékeny folyadék. Szintén megtalálható a természetben, növényi olajok gyakori összetevője. A szegfűszeg jellegzetes illatát adja, de megtalálható a kakukkfű és a fahéj illóolájában is. A karvakrolhoz és a timolhoz hasonlóan erős baktericid, fungicid, rovarölő és féregellenes hatása van, mely tulajdonságai alapján az előző két molekulához hasonló a gyakorlati felhasználása. Tartósításra, fertőtlenítésre használják és a fogászatban is alkalmazzák (Chang és mtsai, 2001.; Lee és mtsai, 1997.; Manou és mtsai, 1998.; Aeschbach és mtsai, 1994.; Shapiro és Guggenheim, 1995.; Yucel-Lindberg és mtsai, 1999.). Az eugenol hatásairól az irodalomban számos közlemény jelent már meg. Leírták például, hogy patkányokban mikromólos koncentrációban gátolja a jejunum- és a vesehámszövetek Na/K-ATP-áz aktivitását (Kreydiyyeh és mtsai, 2001.). A Ca^{2+} -érzékenység és a Ca^{2+} -felvétel

módosításával relaxálja a nyúl aorta és a tengerimalac ileum simaizomzatát (Nishijima és mtsai, 1999.; Lima és mtsai, 2001.; Reiter és Brandt, 1985.). Puhatestűek neuronjain az eugenol mind a pre-, mind a posztzinaptikus membránon kifejti hatását. A preszinaptikus membránon gátolja a kalciumcsatornákat, a posztzinaptikus membránon pedig csökkenti a neurotranszmitterek (GABA, ACh, glutamát) által kiváltott excitatorikus posztzinaptikus potenciálok (EPSP) amplitúdóját (Erdélyi, 1999.; Szabadics és mtsai, 2000.; Szabadics és Erdélyi, 2000). Beszámoltak továbbá arról is, hogy 194 μM -os félgátló koncentrációban az eugenol tengerimalac szívmusclesejteken szintén gátolja a kalciumáramot, rövidíti az akciós potenciál időtartamát és negatív inotróp hatású (Sensch és mtsai, 2001.).

I/2.3. A guaiakol

A guaiakol (2-metoxifenol) az általunk vizsgált timol analógok közül a legegyszerűbb szerkezetű molekula (1. ábra). Az eddig ismertett analógoktól eltérően vízzoldékony molekula. Szobahőmérsékleten színtelen, jellegzetes szagú, fényérzékeny folyadék. Hatásairól és előfordulásáról az előző két analóghoz képest lényegesen kevesebb adat áll rendelkezésre. A természetben is előfordul, Amerikában honos örökzöldek törzsében található meg nagyobb mennyiségben. A klinikumban köptetőként alkalmazzák, az Erigon hatóanyaga. Puhatestűek neuronján 1 mM guaiakol depolarizációt vált ki (Szabadics és Erdélyi, 2000.). Az eugenolhoz hasonlóan csökkenti a kiváltott EPSP-k amplitúdóját és 6,8 mM-os félgátló koncentrációban a kalcium áramot is gátolja (Szabadics és Erdélyi, 2000.). A guaiakol 0,1 %-os oldata *Helix pomatia* neuronon az A áram aktivációját és inaktivációját gyorsította, az amplitúdóját pedig csökkentette (Erdélyi, 1999.).

I/2.3. A vanillin

A vanillin (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehid) szerkezete nagyban hasonlít az előbb bemutatott guaiakoléhoz (1. ábra). Szintén hidrofíl molekula, vízben és alkoholban is jól oldódik. Szobahőmérsékleten fehér vagy nagyon halványsárga tűszerű kristályokat formál. Fényérzékeny, mindenki által jól ismert kellemes vanília illata van. A természetben a vaníliában fordul elő. Alkalmazásai közül említhetjük az élelmiszeriparban sütemények, csokoládék ízesítésére történő felhasználását. A szervezetre kifejtett hatásaival kapcsolatban az irodalomban csak néhány közlemény látott napvilágot. Leírták a vegyületről, hogy puhatestűek neuronján spontán akciós potenciálok (AP) megjelenéséhez vezet és az AP időtartamát kismértékben nyújtja (Erdélyi, 1992.). Ugyanezen preparátumon nagy koncentrációban a guaiakolhoz hasonlóan a kalciumáram és az A-típusú káliumáram gátlását

hozta létre. A félgátló koncentráció értéke az utóbbi áram esetén 5 mM-nak adódott. Az A áramnál megfigyelték továbbá, hogy a szer mind az áram aktivációját, mind pedig annak inaktivációját gyorsította (Erdélyi, 1999.). A késői káliumáramokat azonban a vanillin nem befolyásolta.

I/2.4. A zingeron

A zingeron ((4-hidroxi-3-metoxifenil)-etilmetilketon) rendelkezett az általunk vizsgált analógok közül a leghosszabb oldallánccal (1. ábra). Szobahőmérsékleten fehér színű, kristályos anyag, de az olvadáspontja viszonylag alacsony, 40-41 °C. Lipofil karakterű, vízben gyengén, alkoholban szabadon oldódik. A természetben a gyömbér gyökerében található meg, aminek a jellegzetes ízét adja. Élettani hatásai közül ismert, hogy gyökfogó (scavenger) hatása van, de a timolnál gyengébb antioxidáns (Aeschbach és mtsai, 1994.). A vanillinnál és a guaiakolnál kisebb koncentrációban hat *Helix pomatia* A áramára (Erdélyi, 1999.). Millimólos koncentrációban beszámoltak patkány trigeminus ganglion sejteken inward áramot indukáló hatásáról (Liu és Simon, 1996.). Ugyanezen preparátumon a többszöri zingeron adagolás hatására kiváltott áram amplitúdója csökkent (tachifilaxis). Arról is beszámoltak, hogy a vanilloid receptor antagonistá kapszazepin (10 µM) képes volt megakadályozni a zingeron fenti hatását. Egy másik közleményben patkány kamrai szívműködéseken azt találták, hogy 30 µM zingeron 52 %-kal csökkentette a tranziens kifelé irányuló káliumáram és 35 %-kal a késői egyenirányító káliumáram amplitúdóját (Castle, 1992.).

II. CÉLKITŰZÉSEK

Mint a bevezetésben láttuk, a timol széles körben fordul elő a természetben. Emellett a mindennapi életben is rendkívül sok helyen találkozhatunk a molekulával, és számtalan gyógyászati felhasználása is ismert. Mindezek következtében a timol gyakran kerül be az emberi szervezetbe és lipiddékonyságánál fogva a sejtek membránjába beoldódva befolyásolhatja a sejtek működését. Mindezeket figyelembe véve célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a timolnak a szívre és a harántcsíkolt izomra kifejtett hatásait.

Először vizsgálni kívántuk, hogy a timol hogyan befolyásolja a szívműködést és a harántcsíkolt izomrostok elektrofiziológiai tulajdonságait. Megmértük a molekulának a szívműködés akciók potenciáljának alakjára és különböző ionáramainak kinetikai paramétereire kifejtett hatásait. Továbbá kíváncsiak voltunk a timolnak a szívműködés összehúzóására, majd ezzel összefüggésben a szívműködés kalcium homeosztázisára kifejtett hatásaira. Az előbbi esetben a molekula esetleges inotróp hatásait akartuk feltérképezni, míg az utóbbi esetben az intracelluláris kalcium koncentrációra ($[Ca^{2+}]_i$) és a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) történő kalcium felszabadulásra, valamint az SR membránjában elhelyezkedő Ca^{2+} -ATP-áz működésére kifejtett hatásokat kívántuk megvizsgálni. Az SR-ből történő kalciumfelszabadulás vizsgálatánál a timol és a koffein hatásait is össze akartuk hasonlítani.

A timol analógjai közül számos molekula szintén megtalálható a természetben és néhányuk már leírták különböző preparátumok kalcium áramára kifejtett gátló hatását. Emiatt vizsgálni kívántuk ezen analógoknak a szívműködés L-típusú kalcium áramára kifejtett hatását, valamint összefüggéseket kerestünk az egyes analógok szerkezete és a szerek által okozott hatások között.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III/1. Sejtizolálás

III/1.1. Szívizomsejtek előállítása kutya bal kamrájából

Elektrofiziológiai méréseinkhez enzimatikusan izolált, kutyából származó kamrai szívizomsejteket használtunk, amelyeket szegmentperfúziós eljárással nyertünk. Az állatokat 10 mg/tskg ketaminum (SBH-Ketamin, Novartis, Budapest) és 2 mg/tskg xilazin hidroklorid (Primazin, PRIM-A-VET Állatgyógyászati Kft., Budapest) nyakizomba történő injekciójával altattuk el. A szívet hideg, 7,4-es pH-jú normál Tyrode oldattal (összetétel (mM-ban megadva): 150 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 5 HEPES, 10 glükóz) mostuk át, majd leválasztottuk a pitvarokat. Az aorta felől kanuláltuk a bal elülső leszálló koronária artériát (LAD) és a preparátumot szobahőmérsékletű "Joklik Modification for Suspension Culture" (JMM) oldattal (SIGMA Chemical Co., St. Louise, USA) perfundáltuk. A kalciummentes, 6,9-es pH-jú JMM oldattal történő átmosást legalább 5 percig vagy a szívösszehúzódások teljes megszűnéséig és a vér szívből való eltávolításáig alkalmaztuk. Ezután 1 mg/ml CLS-2 típusú kollagenáz enzimet (WORTHINGTON Biochemical Co., Lakewood, USA), 2 mg/ml borjú szérum albumint (SIGMA Chemical Co., St. Louise, USA) és 50 µM CaCl₂-t tartalmazó JMM oldattal kb. 30 percig emésztettük a szívet 37 °C-on. A szövet elfolyósodása után a sejteket fokozatosan emelkedő kalcium koncentrációjú JMM-ben mostuk. Az így nyert izolált bal kamrai sejteket 7,3-as pH-jú 0,5 g/l streptomycin (Egis, Budapest) és 0,5 g/l penicillin (Biogal) tartalmú Minimal Essential Medium (MEM) oldatban (SIGMA Chemical Co., St. Louise, USA) tároltuk 15 °C-on. Ez lehetővé tette, hogy az egy-egy állatból származó sejteket az izolálás után 1-2 napig használjuk. Az izolálások során kapott szuszpenziókban átlagosan 60% volt a szabályos téglalap alakú, ép harántcsíkolatú, éles szélű és tiszta citoplazmával rendelkező sejtek aránya. Ezeket a sejteket használtuk a későbbiekben a mérésekhez. Hasonló eljárást alkalmaztunk a kardioplégias oldatban tárolt humán szívek esetében is.

III/1.2. Harántcsíkolat izomrostok izolálása patkányból

Az izolált vázizomrostokat kevert nemű patkányok extensor digitorum communis izmából enzimátikus emésztéssel nyertük. Az állatokat éterrel altattuk és cervikális diszlokációval öltük meg. Ezt követően eltávolítottuk az állatok izmát és 60-90 percen keresztül 37 °C-on I-es típusú kollagenáz enzimmel (SIGMA Chemical Co., St. Louise, USA) emésztettük. Az emésztést követően a rostokat legalább 20 percig pihentettük és a mérésekhez csak a membránkárosodást nem szenvedett rostokat használtuk. A méréshez

kiválasztott izomrostot a relaxáló oldattal (összetétel (mM-ban megadva): 150 K-glutamát, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 1 EGTA) töltött mérőkádba helyeztük. A rost középső részét vazelinnel szigeteltük el a szélső részekről, mely utóbbiakat 0,01 %-os szaponinnal permeabilizáltuk. A permeabilizált végeken a relaxáló oldatot belső oldatra (összetétel (mM-ban megadva): 120 Cs-glutamát, 5,5 MgCl_2 , 5 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 10 Na-foszfokreatin, 10 glükóz, 5 HEPES, 5 EGTA) cseréltük. A középső részen a külső oldatot (összetétel (mM-ban megadva): 140 TEA- CH_3SO_3 , 2 MgCl_2 , 5 HEPES, 0,0003 tetrodotoxin, 1 3,4-diaminopiridin) alkalmaztuk a mérések során.

A kalciumáram (I_{Ca}) mérésekhez a külső oldathoz 5 mM CaCl_2 -ot adtunk és az ozmolaritás megtartásának céljából a TEA- CH_3SO_3 mennyiségét arányosan csökkentettük. Ezzel egyidőben a belső oldatban az EGTA koncentrációját 20 mM-ra növeltük a Cs-glutamát rovására.

A káliumáram (I_{K}) mérésénél a belső oldat a Cs-glutamát helyett 120 mM K-glutamátot tartalmazott és a külső oldatban a TEA helyett 140 mM N-metil-D-glukamint alkalmaztunk, valamint az abban lévő MgCl_2 koncentrációját 4 mM-ra emeltük.

Méréseink során az oldatokban az ozmolaritást 300 mOsm-ra, a pH-t pedig 7,2-re állítottuk be.

III/2. Az akciós potenciál mérése

A membránpotenciál mérésére a Volders és mtsai által egysejtes rendszerre kidolgozott, nagyellenállású üveg mikroelektrodás eljárást alkalmaztuk. A kísérleteink során a III/1.1. pontban leírtak szerint készített sejtszuspenzióból 2-3 cseppet egy invertáló mikroszkóp (Olympus CK-2, Japán) tárgyasztalára rögzített, kb. 1 ml térfogatú mérőkádba cseppentettünk. A kád és a perfundáló oldatok hőmérsékletét a kísérletek során termosztát és perfúziós rendszer segítségével végig 37 °C-on tartottuk. A szívizomsejtek kiüledése után (2-3 perc) elindított, 2-4 ml/perces sebességgel áramló normál Tyrode oldat perfúziója eltávolította az elhalt sejteket, így csak a kád fenekére kitapadt szabályos alakú, éles szélű, ép harántcsíkolattal rendelkező sejteken dolgoztunk. A sejtek membránpotenciáljának követésére 3 M-os KCl-dal töltött, 25-30 M Ω ellenállású mikroelektrodát használtunk. Az elektrodákat közvetlenül a kísérlet megkezdése előtt boroszilikát kapillárisból (Harvard Apparatus LTD., Kent, UK) készítettük programozható mikroelektroda-húzó (Sutter Instruments Co., USA) segítségével. A mérőrendszert a környezetből származó elektromágneses és mechanikai rezgésektől Faraday-kalitka és antivibrációs asztal (Newport, USA) védte. Az elektrodát mechanikus makro- és három irányba mozgatható hidraulikus mikromanipulátorral

(Narishige, Japán) pozícionáltuk. A mérés során nyert jeleket AXON 2B erősítő (AXON INSTRUMENTS Inc., Foster City, USA) segítségével erősítettük. A sejtek ingerlése a kísérletek teljes időtartama alatt a mérőelektrodon keresztül folyamatosan zajlott 1 s ciklushosszal. Az ingerlő impulzusok időtartama 1 ms volt, amplitúdója, a sejtek érzékenységtől függően 4-8 nA között változott. Az erősítő által felerősített jeleket analóg-digitális átalakítás (Digidata 1200 A/D kártya, AXON INSTRUMENTS Inc., Foster City, USA) után a későbbi elemzéshez számítógépen tároltuk. A mérés során a mintavételezés az AP első 10 ms-a alatt 20 μ s gyakorisággal történt, majd ezt követően 200 μ s-onként rögzítettük az adatokat. Ezáltal az AP felszálló szára és a repolarizáció folyamata egyaránt jól megítélhető volt. A mért AP-ok kísérlet közbeni követésére oszcilloszkópot használtunk. A mérések során pontosan rögzítettünk minden kísérleti körülményt illetve ezek változtatásának idejét és mértékét. Minden mért file-ban 10 AP-t tároltunk, melyek átlagolása és további kiértékelése egy, az Intézetben fejlesztett szoftver segítségével történt (off-line). A program által kiszámított paraméterek közé tartozik a nyugalmi membránpotenciál értéke, a depolarizáció maximális sebessége (V_{max}), az AP amplitúdója, valamint az AP 20, 50 illetve 90%-os repolarizációjához tartozó időtartama (a későbbiekben APD_{20} , APD_{50} és APD_{90} , lásd 2/A. ábra). Az AP-ok kiértékeléséből kapott adatokból az ábrákat az ORIGIN (Microcal, Northampton, USA), valamint a POWERPOINT (Microsoft, Santa Rosa, USA) szoftverek segítségével készítettük.

III/3. Ionáramok mérése

III/3.1. Kutya szívműködése ionáramainak mérése feszültség-clamp technikával

Az ionáramok mérésére az III/1.1. pontban leírt módon izolált szívműködéseket használtunk. A mérésekhez használt patch pipettákat a III/2. pontban leírtakhoz hasonlóan készítettük azzal a különbséggel, hogy ezek ellenállását 2-3 M Ω -nak választottuk. Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában, feszültség-clamp körülmények között mértük (Hamill és mtsai, 1981.). A sejteket itt is 37 °C-on, normál Tyrode oldattal perfundáltuk. A pipetták feltöltésére használt ún. belső oldat összetételét a mérni kívánt ionáramtól függően választottuk meg.

Az L-típusú kalciumáram (I_{Ca-L}) mérésekor a következő belső oldatot használtuk (mM-ban megadva): 110 KCl, 40 KOH, 10 EGTA, 10 HEPES, 20 TEACl, 3 K-ATP, 0,25 GTP, pH=7,4. A kálium áramokat a belső oldatban jelenlevő tetraetilammónium-klorid (TEACl) alkalmazása mellett, a perfundáló oldathoz adott 3 mM 4-aminopiridin (4-AP) hozzáadásával gátoltuk. A sejteket -40 mV-on tartottuk, amely membránpotenciál értéken a gyors,

feszültségfüggő Na^+ csatornák teljes mértékben, a tranziens, kifelé irányuló káliumáram kialakításáért felelős csatornák pedig jelentős mértékben inaktiválódtak, így nem zavarták az $\text{I}_{\text{Ca-L}}$ mérését. A káliumáram vizsgálatára használt impulzus protokollokat tehát -40 mV-os tartópotenciálról indítottuk és a protokollok végén ugyanerre a potenciálra állítottuk be a sejtek membránpotenciálját. Azokban az esetekben, amikor a káliumáram amplitúdójának adott szer hatására bekövetkező változását vizsgáltuk, az áramokat 400 ms hosszú +5 mV-ra történő depolarizációval váltottuk ki.

A káliumáramok mérésekor a belső oldat összetétele a következő volt (mM-ban megadva): 110 K-aszpartát, 45 KCl, 1 MgCl_2 , 10 EGTA, 3 K-ATP, 0,25 GTP, 5 HEPES, pH=7,4. A mérések során a kalcium áramot 5 μM nifedipin perfundáló oldathoz történő adagolásával gátoltuk. A sejtek membránpotenciálját a tranziens kifelé irányuló kálium áram (I_{to}) és a befelé egyenirányító kálium áram (I_{K1}) mérésekor -80 mV-on, míg a késői egyenirányító kálium áram gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponensének mérésekor -40 mV-on tartottuk. Az utóbbi két komponens elkülönítésére eltérő impulzus protokollokat használtunk.

Az áramméréseknél a következő módon jártunk el: először a mikropipettával óvatosan megérintettük egy, a kád aljához kitapadt sejtet, majd a pipettában szájjal történő szívással csökkentettük a nyomást, aminek hatására a sejtek membránjának egy kis darabja betüremkedett a pipettába. Ennek következtében jött létre a “gigaseal”-nek nevezett, nagy ellenállású (minimum 1 $\text{G}\Omega$) kapcsolat a pipetta és a mérni kívánt sejt felszíni membránja között. Ezt követően a sejtet óvatosan jobbra-balra és előre-hátra mozgatva fokozatosan felemeltük a mérőkád fenekéről, majd kompenzáltuk a pipetta kapacitását. A teljes-sejtes konfiguráció eléréséhez a szívóerőt tovább növeltük és ezzel egyidejűleg rövid áramimpulzus alkalmazásával átszakítottuk a pipetta és a sejt közötti membránszakaszt, így hozva létre a kapcsolatot a pipetta belső oldata és az intracelluláris tér között. Minden mérés kezdetén meghatároztuk a sejtek kapacitását, amely 80-200 pF közötti értéknek adódott. A méréseink során a soros ellenállás 3-9 $\text{M}\Omega$ volt, melyet 75 %-ban kompenzáltunk. Azokat a méréseket, ahol a soros ellenállás nagyobb volt, vagy a mérés során megnövekedett, kihagytuk az értékelésből. A kapott áramjeleket Axopatch-200B erősítő (AXON INSTRUMENTS Inc., Foster City, USA) segítségével erősítettük, Digidata 1200 A/D kártyával végzett analóg-digitális átalakítás után pCLAMP 6.04 szoftverrel számítógépen rögzítettük, majd elemeztük. Az árammérések során a mintavételezési frekvencia a mérni kívánt ionáramtól függően 0,5-20 kHz között változott. Az analóg jeleket a Nyquist teóriának megfelelően, az adott mintavételezési frekvencia harmadrészével szűrtük.

III/3.2. Ionáramok mérése patkány harántcsíkolt izomrostokon kettős vazelin gap technikával

Elektrofiziológiai méréseinket az ún. kettős vazelin gap technikával, feszültség-clamp körülmények között végeztük (Csernoch és mtsai, 1999.). A rostok membránpotenciálját -100 mV-on tartottuk és a kísérleteket 16-18 °C-on végeztük.

A kalciumáramok mérésekor a III/1.2. pontban ismertetett oldatokat alkalmaztuk. A nátrium áramot tetrodotoxinnal, a kálium áramokat a külső oldatban 4-aminopiridin és TEACl, a belső oldatban pedig CsCl hozzáadásával gátoltuk. Az áramjelek kiváltására 800 ms hosszú, -50 és +60 mV közötti depolarizáló négyszögimpulzusokat használtunk. A lineáris kapacitív komponenst 20 mV-os hiperpolarizáló pulzus segítségével határoztuk meg és az áramjeleket erre korrigáltuk (Szentesi és mtsai, 2001.).

A káliumáram mérésekor az alkalmazott külső és belső oldat összetételét a III/1.2. pontban már részletesen bemutatottuk. Az áramok vizsgálatára 100 vagy 200 ms hosszú, -80 és +40 mV közötti depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk.

A kalciumáram esetében az áram csúcsertékének feszültségfüggését a következő egyenlettel illesztettük:

$$I=(V_m-V_{Ca})*G(V_m) \quad (1. \text{ egyenlet})$$

ahol V_m a membránpotenciál, V_{Ca} a kalciumra vonatkozó becsült egyensúlyi potenciál és $G(V_m)$ a kalcium csatornák feszültségfüggő vezetőképessége.

$$G(V_m)=G_{max}/(1+\exp(-(V_m-V')/k)) \quad (2. \text{ egyenlet})$$

ahol G_{max} a maximális vezetőképesség, V' az a potenciálérték, ahol a vezetőképesség a G_{max} fele és k a meredekség. Annak érdekében, hogy kiküszöböljük a rostok méretéből adódó különbségeket, minden áramot és a maximális vezetőképességet is az adott rostok kapacitására normalizáltunk.

A káliumáramok aktivációját a szokványos m^4 kinetikával illesztettük:

$$I_K(t)=A*(1-\exp(-(t-t_0)/\tau))^4 \quad (3. \text{ egyenlet})$$

ahol A az áram amplitúdója, τ az aktivációs időállandó és t_0 a késleltetés.

III/4. Kontrakciós erőmérés

A timolnak a szívizom kontraktilis paramétereire kifejtett hatásait kutyaszív jobb kamrájából származó trabekuláris izomnyalábokon vizsgáltuk. Kísérleteinkben mindig vékony trabekulákat használtunk, melyek átmérője egy esetben sem haladta meg az 1 mm-t. A III/1. pontban ismertetett módon elaltatott kutyák szívéből frissen kimetszett trabekulákat

szervkádba helyeztük, majd egyik végüket egy fix helyzetű acél tűhöz rögzítettük, míg a másikat egy mikromanipulátorhoz csatlakoztatott kapacitív mechano-elektronikus jelátalakító karjához. Kísérleteinkben a preparátumokat 95% O₂-t és 5% CO₂-t tartalmazó gázzal ekvilibráltatott Krebs oldattal (összetétel (mM-ban megadva): 120 NaCl, 5,4 KCl, 2,7 CaCl₂, 1,1 MgCl₂, 1,1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 5,5 glükóz) perfundáltuk 10 ml/perces sebességgel. A hőmérsékletet 37 °C-ra, a pH-t pedig 7,4-re állítottuk be. A trabekulák hosszát úgy állítottuk be, hogy a kontrakciós erő maximális legyen. A preparátumokat minden esetben a mérés megkezdése előtt 1 órán keresztül szupramaximális amplitúdójú, 1 ms széles négyszögimpulzusokkal, 1 s-os ciklushosszal ingereltük. Csak ezt követően alkalmaztuk a timolt, amelyet a Krebs oldathoz adva használtunk. Az analóg jeleket erősítés és analóg-digitális átalakítás (Digidata 1200 A/D kártya, AXON INSTRUMENTS Inc., Foster City, USA) után a későbbi kiértékelésig számítógépen rögzítettük.

III/5. Bal kamrai nyomás- és [Ca²⁺]_i-tranziensek mérése Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven

A mérésekhez 300-500 g tömegű hím tengerimalacokat használtunk. Az állatoknak intravénásan Heparint adtunk, majd 150 mg/kg dózisu Na-pentobarbitállal elaltattuk azokat. Az állatok mellkasának megnyitása után a szívet gyorsan eltávolítottuk és a Langendorff perfúziós rendszer kanüljéhez rögzítettük, majd Krebs oldattal perfundáltuk. Perisztaltikus pumpa segítségével a koronária átáramlást 10 ml/perc/g-os értéken tartottuk. A bal kamrai nyomás folyamatos mérésére egy, a bal kamra üregébe helyezett Braun 2021-02 típusú artériás nyomásmérőt alkalmaztunk (Edes és Kranias, 1990). A szív ingerlése 200/perc-es frekvenciával a bal pitvar üregébe vezetett elektróda segítségével történt. A kontroll körülmények között rögzített mérések után 10-10 percen keresztül egyre növekvő koncentrációban (10, 50, 100, 150, 250, és 350 µM) alkalmaztuk a timolt. A disszertáció további részében a kontroll körülmények között mért adatok minden esetben az általunk vizsgált molekula hozzáadását megelőzően rögzített értékeket jelentik.

Az [Ca²⁺]_i-tranziensek mérése során a perfundáló oldathoz 5 mM Fura-2 acetoxi-metilésztert (Fura-2-AM), 0,6 mM probenecidet, 1,25 g/l Synperonic-ot és 50 g/l albumint tartalmazó oldatot adtunk. Az utóbbi két összetevő a Fura-2-AM-rel való feltöltést segítette elő, a probenecid pedig a sejtmembránban található nem specifikus anioncserélő gátlásával megakadályozta a Fura-2 sejtekből történő kipumpálását. Ilyen körülmények között 120 percen keresztül stabil kalcium jeleket tudtunk regisztrálni, ami lehetővé tette a dózis-hatás görbék felvételét. A festéket 340 és 380 nm-es hullámhosszon gerjesztve, az emittált fényt

510 nm-en összegyűjtve Deltascan (Photon Technology International, New Brunswick, NJ, USA.) segítségével regisztráltuk. Az $[Ca^{2+}]_i$ számolásához a háttérre-korrigált fluoreszcencia intenzitások hányadosát ($R=F_{340}/F_{380}$) használtuk (Grynkiewicz és mtsai, 1985.). Brandes és mtsai *in vitro* kalibrációs módszerével az R_{min} értékére 0,89-et, az R_{max} értékére pedig 5,1-et kaptunk. Az analóg fluoreszcencia jeleket és nyomásértékeket 1 kHz-es gyakorisággal mintavételeztük. Mindkét esetben 10 egymást követő kontrakció során mért értékek átlagát képeztük, és az így kapott adatokat a későbbi elemzés céljából számítógépen rögzítettük.

III/6. Single channel mérések mesterséges lipidkettősrétegbe beépített kutya rianodin receptoron (RyR)

Kutyaszív kamrájából nehéz szarkoplazmatikus retikulum (SR) vezikulákat izoláltunk, majd a szolubilizált RyR-t tisztítottuk (Laver és mtsai, 1995.). Foszfátidil-etanolamin, foszfátidil-szerin és L-foszfátidil-kolin 5:4:1 arányú keverékéből sík lipidkettősréteget hoztunk létre, majd ezt n-dekánban oldottuk a végső 20 g/l-es lipidkoncentráció eléréséig (Herrmann-Frank és mtsai, 1996; Csernoch és mtsai, 1999.). Ebbe a lipidkettősrétegbe építettük be a CHAPS puffer segítségével szolubilizált RyR-okat, majd ezt a kettősréteget egy 250 μ m átmérőjű nyílásra feszítettük ki. A kettősréteg mindkét oldalán azonos pufferösszetételű, 7,2-es pH-jú oldatot használtunk (250 mM KCl, 150 μ M $CaCl_2$, 100 μ M EGTA, és 20 mM PIPES). A kettősréteg egyik oldalát cisz oldalnak (citoplazmatikus) a másikat pedig transznak (luminális, az SR lumene felé néző) neveztük el és ez utóbbit elektromosan földeltük. A RyR sikeres beépülésére utalt a lépcsőzetes áramnövekedés. A feszültség-clamp körülmények között kapott áramjeleket 1 kHz-es frekvencián, 8 pólusú Bessel szűrő segítségével szűrtük, majd 3,3 kHz-en Axopatch 200 intracelluláris erősítővel és pClamp 6.02-es szoftverrel analóg-digitális átalakítás után rögzítettük (AXON INSTRUMENTS Inc., Foster City, USA). 250 mM K^+ -ot használva töltéshordozóként, a 400 pS-nél magasabb vezetőképességgel rendelkező csatornákat tekintettük RyR-nak. A nyitvatartási valószínűség értékeit 10-90 s hosszú reprezentatív görbeszakaszokból számoltuk. A timolt a cisz oldalról adagoltuk 150 és 300 μ M-os koncentrációban. Az oldatcserék után legalább 5 percet vártunk a mérések megkezdése előtt, mely időtartam elegendőnek bizonyult a csatorna kapuzásában kialakuló új egyensúlyi állapot létrejöttéhez (Szegedi és mtsai, 1999.). Minden kísérlet végén 2 μ M rianodint adtunk a cisz oldalra a csatornabeépülés irányának megállapítása céljából. Ellentétes beépülés esetében a mért adatokat a későbbiekben nem használtuk fel. A méréseket 23 °C-on végeztük, a szabad Ca^{2+} -koncentráció értékeit mind cisz, mind a transz oldalon a Fabiato által 1998-ban közölt

számítógépes program és stabilitási állandók segítségével határoztuk meg.

III/7. Kutya nehéz SR vezikulákból történő kalciumfelszabadulás meghatározása

A nehéz SR vezikulákból történő kalciumfelszabadulás mérésére az extracelluláris térben bekövetkező Ca^{2+} -koncentráció változásokból következtettünk, melyeket 0,25 mM arzenazo III metallokróm festék segítségével, 37 °C-on követtünk nyomon. A méréseket 1x1 cm nagyságú küvettákban, SPEX Fluoromax single fotonszámláló spektrométerben (Jobin-Yvon, Spex Industries, Edison, NJ, USA) végeztük. A vezikulákat egymást követő CaCl_2 adagolással, majd a kalciumpumpa 100 nM ciklopiazonsavval történő gátlásával töltöttük fel. A vezikulákból történő kalciumfelszabadulás előidézésére a timol hozzáadását alkalmaztuk. A vezikulán kívüli Ca^{2+} -koncentrációt az 1 Hz-en mintavételezett 710 és 790 nm-en történő fényelnyelés különbségéből számoltuk (Pallade, 1987.), majd analóg-digitális átalakítás után a későbbi kiértékelésig számítógépen rögzítettük. A kezdeti kalciumfelszabadulás mértékét a timol hatására bekövetkező fényelnyelési görbe meredekségéből határoztuk meg Lam és mtsai 1995-ben közölt módszerének módosításával. Az inkubációs oldat összetétele a mérések során a következő volt: 92,5 mM KCl, 18,5 mM MOPS, 1 mM ATP és 150 µg/ml fehérje, pH=7.

III/8. Az ATP-áz aktivitás mérése

A kutyaszívából előállított nehéz SR vezikulákban található Ca^{2+} -ATP-áz aktivitásának mérésére úgynevezett „kapcsolt enzim-assay” módszert használtunk. A módszer elve, hogy a Ca^{2+} -ATP-áz működése során ATP-t hasít. Az ekkor keletkezett ADP a piruvát-kináz segítségével reakcióba lép és a foszfoenol-piruváttal piruvátot képez, amelyből laktát-dehidrogenáz hatására laktát keletkezik, miközben NADH-ból NAD^+ szabadul fel. A NADH fogyására a 340 nm-en bekövetkező abszorbancia változás mérésével következtethettünk. Az így kapott görbe meredekségéből számítható volt a Ca^{2+} -ATP-áz aktivitása. A mérések során az SR vezikula frakciót a szubsztrátokat és az enzimet tartalmazó oldatban 5 percig inkubáltuk 37°C-on (100 mM KCl, 20 mM TRIS-HCl, 5 mM MgCl_2 , 0,7 mM CaCl_2 , 5 mM ATP, 0,5 mM EGTA, 0,42 mM foszfoenolpiruvát, 0,2 mM NADH, 1 µM A23187 Ca^{2+} -ionofór, 7,5 IU/ml piruvát-kináz, 18 IU/ml laktát dehidrogenáz és 1-5 µg/ml fehérje, pH=7,5). Az A23187 ionofór az SR-vezikula membránját átjárhatóvá téve megakadályozta, hogy a magas luminális Ca^{2+} -szint csökkentse a pumpa működésének határfokát. A reakciót 10 mM ATP hozzáadásával indítottuk el és folyamatosan mértük az oldat 340 nm-en bekövetkező abszorbancia változását, amelyből a hidrolízis mértékére következtethettünk. Az adatokat a

kalcium hiányában mért alap ATP-áz aktivitásra korrigáltuk és $\mu\text{mol P}_i/\text{mg fehérje/perc}$ egységekben adtuk meg.

III/9. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A mérések során a kapott adatokat átlagoltuk és kiszámítottuk a standard errorrt (SE). Az átlagértékek különbségeinek megítélésakor ANOVA-t és Student féle páros t-próbát használtunk. A kapott eredményeket 5%-os szint felett tekintettük szignifikánsnak ($p < 0,05$). Valamennyi statisztikai analízist IBM kompatibilis személyi számítógépen, SIGMASTAT (Jandel Co., San Raffael, USA) szoftver segítségével végeztünk. Az ábrákon a mért értékek átlagát és a hozzájuk tartozó standard errorrt (SE) tüntettük fel. A szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük.

III/10. A vizsgált molekulák oldása

A timolból és analógjaiból dimetil-szulfoxidban (DMSO, SIGMA Chemical Co., St. Louise, USA) 0,1 mM-os törzsoldatot készítettünk és a vizsgálni kívánt koncentrációkat a törzsoldatokból a kísérletek kezdetén normál Tyrode oldattal hígítottuk ki. Az általunk alkalmazott legmagasabb koncentráció 1 mM volt. Ezt meghaladó koncentrációk esetén már nem lehettünk biztosak abban, hogy a szer teljes mennyisége oldatban marad, vagy esetleg számolnunk kell a molekulák oldatból történő kiválásával. Az 1 mM koncentrációjú oldatok esetében már a DMSO is számottevő koncentrációban volt jelen a mérések során. Annak érdekében, hogy kizárjuk a DMSO hatására bekövetkező változásokat, próbaméréseket végeztünk kizárólag DMSO-t tartalmazó oldatokkal. Ezek eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a DMSO önmagában semmilyen hatással nem volt az általunk vizsgált preparátumokra. A későbbiekben bemutatott eredményekért tehát semmi esetre sem lehet a vizsgált molekulák oldására használt DMSO.

IV. EREDMÉNYEK

IV/1. A timol hatása kutya izolált szívműködősejtjeinek akciós potenciáljára

Az akciós potenciálok mérésénél a III/2. fejezetben leírt módszert alkalmaztuk. A timolt a perfúziós oldathoz adva, egyre növekvő koncentrációban használtuk 10 és 1000 μM közötti tartományban. A timol AP-paraméterekre kifejtett hatásai koncentrációfüggőnek bizonyultak (2. ábra). 10 μM -os koncentrációban a timol csökkentette az AP korai gyors repolarizációs fázisát (2/B. ábra). Nagyobb koncentrációban alkalmazva a szert az AP időtartamának csökkenését és a plató fázis depresszióját figyeltük meg. A molekula AP-t rövidítő hatása nagyobb mértékű volt a repolarizáció 50 %-ánál mért értéknél (APD_{50}), mint a 90 %-os repolarizációhoz tartozó AP időtartamnál (APD_{90}) (2/C. ábra). Magasabb timolkoncentrációk jelenlétében megfigyeltük továbbá a depolarizáció maximális sebességének (V_{max}) csökkenését is. 300 μM timol a kontroll érték 93,4 $\pm$ 4,7 %-ára, 500 μM timol 89,1 $\pm$ 4,4 %-ára, 1000 μM timol pedig 70,3 $\pm$ 8,2 %-ára csökkentette a V_{max} -ot. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a molekula 300 μM -nál magasabb koncentrációkban gátolja a depolarizáció kialakításáért felelős gyors feszültségfüggő Na^+ csatornákat. A sejtek nyugalmi membránpotenciáljában az általunk alkalmazott legmagasabb koncentrációjú timol hatására sem figyeltünk meg változást (-78,4 $\pm$ 2,2 mV kontroll körülmények között és -78,3 $\pm$ 6,2 mV 1000 μM timol jelenlétében).

IV/2. A timol hatása kutya izolált szívműködősejtjeinek L-típusú kalcium áramára

Az $I_{\text{Ca-L}}$ mérésénél a III/3. fejezetben részletezettek szerint jártunk el. Az áram kiváltására 0,2 Hz-es gyakorisággal alkalmazott, 400 ms hosszú, +5 mV-ra történő depolarizáló impulzusokat használtunk. Az $I_{\text{Ca-L}}$ amplitúdóját minden esetben az áram csúcspontja és a nem inaktiválódó komponens 200 ms-nál mért értékének különbségeként határoztuk meg. A kísérletek kezdetén legalább 5 percen keresztül figyeltük az áramot és amennyiben az amplitúdójának csökkenése meghaladta a 10 %-ot, a sejtet nem használtuk fel a további mérésekhez. Ha az áram stabil volt, akkor a timol egyre növekvő koncentrációit 1-1 percen keresztül kimosás nélkül, egymás után alkalmaztuk. A timol $I_{\text{Ca-L}}$ -ra kifejtett gátló hatása gyorsan kialakult (30 s alatt), stabilnak mutatkozott és teljes mértékben kimosható volt (3/C. ábra). A molekula koncentrációfüggő módon csökkentette az $I_{\text{Ca-L}}$ csúcspontját (3/A. ábra). A molekula hatására bekövetkezett gátlás az 50 μM (14,3 $\pm$ 8,65 %-os gátlás) és annál nagyobb szerkoncentrációk esetében adódott statisztikailag szignifikánsnak. A timol

kumulatív dózis-hatás görbéjének Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció (EC_{50}) értékére $158 \pm 7 \mu\text{M}$ -t kaptunk, míg a Hill koefficiens (n) értéke $2,96 \pm 0,43$ -nak adódott (3/B. ábra).

Meghatároztuk az I_{Ca-L} áram-feszültség összefüggését is kontroll körülmények között, valamint 150 és $250 \mu\text{M}$ timol jelenlétében. A mérések során 5 mV -os lépésközökkel -30 és $+40 \text{ mV}$ közötti, 400 ms hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk és az I_{Ca-L} csúcsértékeit az adott impulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk (4/A. ábra). Mint az ábrán jól megfigyelhető, a timol az előzőekben említett gátló hatásán túlmenően nem változtatta meg a kalciumáram feszültségfüggését. Ezek után meghatároztuk a kalcium csatornák vezetőképességét, melyet a csúcsáram értékéből és az ahhoz tartozó hajtóerő hányadosából számoltunk. A hajtóerőt az alkalmazott depolarizáló impulzus feszültsége és az áram $+55 \text{ mV}$ -nak feltételezett reverzálpotenciáljának különbségeként határoztuk meg. 150 és $250 \mu\text{M}$ timol minden vizsgált feszültségen szignifikánsan csökkentette a kalcium csatornák vezetőképességét (4/B. ábra). Ha azonban a mért görbéket az adott görbe $+30 \text{ mV}$ -nál mért vezetőképesség értékére, mint maximumra normalizáltuk, a kapott vezetőképesség-feszültség összefüggések nem különböztek egymástól (4/C. ábra). Ez arra utal, hogy a timol nem befolyásolja az I_{Ca-L} aktivációjának feszültségfüggését.

Ezzel szemben a timol jelentősen módosította az I_{Ca-L} mind feszültség-, mind időfüggő inaktivációs kinetikáját, mely hatások visszafordíthatónak bizonyultak. Az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának vizsgálatánál kettős impulzus protokollt használtunk. Először egy 500 ms hosszú -55 és $+15 \text{ mV}$ közötti 5 mV -os lépésközzel alkalmazott előimpulzust, majd azután egy 400 ms időtartamú $+5 \text{ mV}$ -ra történő tesztimpulzust használtunk. A tesztimpulzussal kiváltott csúcsáramokat a -55 mV -os előimpulzust követő tesztimpulzussal kiváltott csúcsáram értékére normalizáltuk és az alkalmazott előimpulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk. Az ábrázolt pontokat minden egyes mérés esetén kétállapotú Boltzmann függvénnyel illesztettük és meghatároztuk az illesztett görbe meredekségét, valamint azt a feszültségértéket, ahol a csatornák fele volt inaktivált állapotban (félértékfeszültség, $E_{0,5}$). Az egyes mérésekből meghatározott félértékfeszültségeket és meredekségeket átlagoltuk és a kapott értékeket tüntettük fel az 5/B és 5/C. ábrán, valamint ezen paraméterekkel illesztettük az egyes sejteken mért értékek átlagát (5/A. ábra). A timol 50 , 150 és $250 \mu\text{M}$ -os koncentrációban nem okozott változást a görbe meredekségében (5/C. ábra), de azt szignifikáns módon a negatívabb feszültségértékek felé toltta el. A görbe eltolódásának mértéke $50 \mu\text{M}$ timol jelenlétében $5,1 \pm 1 \text{ mV}$ -nak, $150 \mu\text{M}$ timol esetében $10,4 \pm 1,2 \text{ mV}$ -nak, $250 \mu\text{M}$ timol hatására pedig $17,4 \pm 1,6 \text{ mV}$ -nak adódott a $-21,6 \pm 0,7 \text{ mV}$ -os, kontroll

körülmények között mért értékhez képest (5/B. ábra).

Az I_{Ca-L} időfüggő inaktivációja +5 mV-on legpontosabban egy gyorsan és egy lassan inaktiválódó komponens összegével volt illeszthető (biexponenciális). Mint az az 5/D. ábra ábrabetétjén látható analóg áramgörbéken megfigyelhető, a timol gyorsította az áram időfüggő inaktivációját. A timol növekvő koncentrációi hatására csökkent mindkét komponens amplitúdója és a gyorsan inaktiválódó komponens időállandója is (5/D. ábra). A lassan inaktiválódó komponens a gyorsan inaktiválódóhoz képest érzékenyebbnek bizonyult a timollal szemben, mert az előbbi komponens magasabb koncentrációk esetében (150 és 250 μM) a molekula teljesen gátolta, ezáltal az áramjelek monoexponenciális függvénnyel is illeszthetőek voltak.

Ezek után megvizsgáltuk a timolnak az I_{Ca-L} inaktivációból történő visszatérésére kifejtett hatását. A méréseknél két azonos, 400 ms hosszú +5 mV-ra történő depolarizáló impulzust használtunk, ahol a két impulzus közötti időtartamot 50 ms és 3 s között növeltük. A második impulzussal kiváltott áramcsúcsot az első impulzussal kiváltottra normalizáltuk és az így kapott hányadost (I_2/I_1) a két impulzus közötti időtartam függvényében ábrázoltuk (6/A. ábra). Az ábrázolt pontokat minden egyes sejt esetében biexponenciális függvénnyel illesztettük. 150 μM timol hatására mind a gyors, mind pedig a lassú komponens időállandójának szignifikáns növekedését tapasztaltuk (47,2 $\pm$ 2,7 ms-ról 83 $\pm$ 4,8 ms-ra a gyors és 292 $\pm$ 33 ms-ról 569 $\pm$ 41 ms-ra a lassú komponens esetében). A molekula tehát lassította a kalcium csatornák inaktív állapotból történő visszatérését, mely hatása visszafordíthatónak bizonyult (6/B. ábra).

IV/3. A timol hatása egészséges humán kamrai szívízomsejtek L-típusú kalcium áramára

250 μM timol hatására a humán szívízomsejtek I_{Ca-L} -ánál a kutyából származó sejteken mért I_{Ca-L} -nál tapasztalt változásokhoz hasonló eredményeket kaptunk (7/A. ábrabetét). A timol minden általunk vizsgált feszültségértéken csökkentette az áram csúcserősségét (például +5 mV-ra depolarizálva a sejtet -12,1 $\pm$ 1,1 A/F-os értékről -3,8 $\pm$ 1,1 A/F-ra), de nem változtatta meg annak áram-feszültség összefüggését (7/A. ábra). Emellett a timol humán szívízomsejteken sem volt hatással az I_{Ca-L} aktivációjának feszültségfüggésére (7/B. ábra). A humán szívízomsejteken az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését a timol a kutyában látottakhoz hasonlóan, a negatívabb feszültségértékek felé tolt el és nem változtatta meg annak meredekségét (7/C. ábra). A félértékfeszültség kontroll körülmények között -20,3 $\pm$ 0,5 mV-nak, míg 250 μM timol jelenlétében -32,7 $\pm$ 0,2 mV-nak adódott (7/C. ábra). 250 μM timol az I_{Ca-L} mind a gyorsan, mind pedig a lassan inaktiválódó

komponensének amplitúdóját és időállandóit is csökkentette. A kutya szívizomsejtekkel ellentétben ezen timolkoncentráció kisebb mértékben csökkentette a lassú komponens amplitúdóját a humán sejtek esetében, így az áram inaktivációját csak biexponenciális illesztéssel tudtuk elvégezni. A timol hatása 1 perc alatt kialakult és teljesen kimoshatónak bizonyult. Ezzel szemben, amikor hosszabb időn keresztül (5-10 perc) perfundáltuk a sejteket a szerrel (pl. az áram-feszültség összefüggés mérésénél) a gátlás mértéke ugyan nem változott, de a humán sejtek esetében a hatás csak részlegesen volt visszafordítható.

IV/4. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek tranziens kifelé irányuló kálium áramára

A timolnak az AP korai gyors repolarizációjára kifejtett gátló hatása valószínűsítette, hogy a molekula az I_{to} -ra is hatással van. Ennek vizsgálata érdekében az áramot 400 ms hosszú -80 mV-ról kiinduló -10 és +60 mV közötti feszültségtartományba történő depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Minden egyes ingerlő impulzust egy 5 ms hosszú -40 mV-ra történő előimpulzust követően alkalmaztunk, annak érdekében, hogy a gyors, feszültségfüggő Na^+ csatornákat inaktiváljuk. A timol koncentrációfüggő módon csökkentette az I_{to} amplitúdóját (8/A,B. ábra). A szer ezen hatása az I_{Ca-L} -nál látottakkal ellentétben már relatíve kis dózisoknál is kialakult, 1 μM timol az áramot $5,2 \pm 2,4$ %-kal, 10 μM timol pedig $17,4 \pm 2,7$ %-kal gátolta. A kumulatív dózis-hatás görbe Hill egyenlettel történő illesztésével a félgátló koncentráció értékére $60,6 \pm 11,4$ μM -t kaptunk, mely érték szignifikánsan kisebbnek adódott az I_{Ca-L} esetében kapott 158 ± 7 μM -nál. Az illesztett görbe meredekségének 1-hez közeli értéke ($1,03 \pm 0,11$) azt sugallja, hogy a timol I_{to} -ra kifejtett gátló hatása a csatornafehérje egy kötőhelyén valósul meg. A I_{to} amplitúdójának 100 μM timol hatására bekövetkezett csökkenése 30 s-on belül kialakult és már a kimosás első perce alatt teljes mértékben visszafordíthatónak bizonyult (8/C. ábra). Az I_{to} áram-feszültség összefüggése alapján elmondhatjuk, hogy a timolnak az áram csúcsértékére kifejtett gátló hatása nem mutatott feszültségfüggést (9/A. ábra). Ezt követően megvizsgáltuk a timol hatását az I_{to} steady-state inaktivációjának feszültségfüggésére. Ennek érdekében a kalciumáram mérésénél bemutatotthoz hasonló kettős impulzus protokollt alkalmaztunk. Először egy 500 ms hosszú -70 és +10 mV közötti 10 mV-os lépésközzel alkalmazott előimpulzust, majd egy 500 ms időtartamú +50 mV-ra történő teszimpulzust használtunk. A teszimpulzussal kiváltott csúcsáramokat a -70 mV-os előimpulzust követő teszimpulzussal kiváltott csúcsáram értékére normalizáltuk és az alkalmazott előimpulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk. Az ábrázolt pontok illesztése és a kapott paraméterek átlagolása a kalcium áramnál részletesen ismertetett módon történt. A timol nem változtatta meg az I_{to} steady-state

inaktivációjának feszültségfüggését (a kapott félértékfeszültségek: $-38,4 \pm 3,0$ mV kontroll esetben és $-39,3 \pm 3,6$ mV $100 \mu\text{M}$ timol jelenlétében) (9/B. ábra). A I_{to} időfüggő inaktivációjának illesztésekor a legjobb illeszkedést két exponenciális komponens összegével történő illesztéssel nyertük. A $+50$ mV-os depolarizációval kiváltott áram gyorsan inaktíválódó komponensének időállandójára $2,8 \pm 0,6$ ms-ot, a lassan inaktíválódó komponens időállandójára pedig $9,9 \pm 0,2$ ms-ot kaptunk. A gyorsan inaktíválódó komponens időállandójának értékében a timol az általunk használt koncentrációk egyikében sem okozott szignifikáns változást, de a lassan inaktíválódó komponens időállandóját már $10 \mu\text{M}$ timol is szignifikáns módon csökkentette (9/C. ábra). $100 \mu\text{M}$ timol esetében a lassan inaktíválódó komponens időállandójára $5,7 \pm 0,9$ ms-ot kaptunk.

IV/5. A timol hatása kutya izolált szívműködésének késői egyenirányító kálium áramának gyors és lassú komponensére

A késői egyenirányító káliumáram gyors és lassú komponensét különböző impulzus protokollok alkalmazásával különítettük el. A -40 mV-os membránpotenciálon tartott sejteket 150 ms hosszan $+10$ mV-ra depolarizáltuk, majd a membránpotenciál értékét ismét -40 mV-ra állítottuk. Az ekkor kialakuló úgynevezett farokáramot tekintettük I_{Kr} -nek (10/A. ábra). Ezekkel a rövid depolarizáló pulzusokkal az I_{Kr} elegendő mértékű aktivációját tudtuk előidézni, anélkül, hogy az I_{Ks} -t is aktiváltuk volna (Varró és mtsai, 2000). Az I_{Kr} amplitúdóját a timol koncentrációfüggő módon csökkentette (10/A,B. ábra). A kumulatív dózis-hatás görbe Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére $63,4 \pm 6,1 \mu\text{M}$ -t, a Hill koefficiens értékére pedig $1,29 \pm 0,15$ -t kaptunk. Ezek után -30 és $+30$ mV közötti 10 mV-os lépésközökkel alkalmazott, 150 ms hosszú impulzusokkal meghatároztuk a farokáram amplitúdójának feszültségfüggését. $100 \mu\text{M}$ timol nem változtatta meg az áram-feszültség összefüggést, bár a -20 mV feletti impulzusokkal kiváltott farokáramok mindegyikének csökkentette az amplitúdóját (10/C. ábra).

A késői egyenirányító káliumáram lassú komponensének aktiválására 3 s hosszú $+50$ mV-ra történő depolarizáló impulzust használtunk. Ezen impulzus végén mért, teljesen aktiválódott áramot tekintettük az I_{Ks} -nek (11/A. ábra). A timol az I_{Ks} -t is koncentrációfüggő módon gátolta és a hatása visszafordíthatónak bizonyult. Az I_{Ks} esetében még az 1 mM koncentrációjú timol jelenlétében sem kaptunk teljes mértékű gátlást, így a Hill egyenlettel történő illesztéssel kapott $202 \pm 11 \mu\text{M}$ -os félgátló timolkoncentráció és $0,72 \pm 0,14$ -es Hill koefficiens csak becült értékek (11/B. ábra). Hasonlóan a I_{Kr} -nél kapott eredményekhez, a

+10 és +60 mV között timol hatására bekövetkezett I_{Ks} gátlás nem mutatott feszültségfüggést (11/C. ábra).

IV/6. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek befelé egyenirányító kálium áramára

A befelé egyenirányító káliumáram mérése során a sejtek membránpotenciálját – 80 mV-on tartottuk és -125 mV-ra történő, 400 ms hosszú hiperpolarizáló impulzust alkalmaztunk. A 12. ábra A részén az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék láthatók kontroll körülmények között, 100 μ M timol jelenlétében és annak kimosása után. A timol I_{K1} -re kifejtett gátló hatása, hasonlóan az előzőekben bemutatott áramoknál tapasztaltakhoz gyorsan kialakult, a szer alkalmazása során nem változott és teljesen visszafordíthatónak bizonyult (12/C. ábra).

A befelé egyenirányító kálium áram steady-state körülmények között mért áram-feszültség összefüggésének vizsgálata során a sejtek membránpotenciálját -80 mV-on tartottuk és -125 és +65 mV közötti 10 mV-os lépésközökkel, 400 ms hosszú impulzusokat alkalmaztunk. Az impulzusok végén mért áramot az adott impulzus feszültségének függvényében ábráztuk (12/B. ábra). Az áram-feszültség összefüggés -80 mV-nál negatívabb feszültségeken mért meredekségét az I_{K1} sejtmembránban előforduló sűrűsége határozza meg. 100 μ M timol csökkentette ezen rész meredekségét, tehát a timol gátolta az I_{K1} -et (12/B. ábra). A -125 mV-ra történő hiperpolarizáló impulzus hatására kontroll körülmények között kialakuló $-43,3 \pm 1,6$ A/F-os áramsűrűség 100 μ M timol hatására $-34,9 \pm 1,6$ A/F-ra csökkent.

IV/7. A timol analógjainak hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek L-típusú kalcium áramára

A kísérletek során mindenben a timol vizsgálatánál részletezettek szerint jártunk el. A kalciumáram kiváltására itt is 0,2 Hz-es gyakorisággal alkalmazott, 400 ms hosszú, +5 mV-ra történő depolarizáló impulzusokat használtunk. A kísérletek kezdetén kontroll körülmények között rögzítettük az áramjeleket, majd az egyes analógok egyre növekvő koncentrációit 1-1 percen keresztül kimosás nélkül, egymás után alkalmaztuk. A timol analógok közül kutya szívizomsejtek kalcium áramát a vanillin és a guaiakol 300 μ M-os koncentrációban alkalmazva gyakorlatilag nem befolyásolta (13. ábra). Ugyanilyen koncentrációban a zingeron mintegy 17 %-kal, az eugenol és a karvakrol pedig közel azonos mértékben, mintegy 71 %-kal gátolta az I_{Ca-L} -t (13. ábra). Az egyes analógok kimosása után rögzített áramgörbék alapján elmondhatjuk, hogy az eugenol és a karvakrol által okozott gátlás részlegesen kimoshatónak bizonyult. Megállapíthatjuk tehát, hogy az egyes timol analógok egymástól jelentősen különböző mértékben csökkentették az I_{Ca-L} csúcsértékét. A kalciumáram gátlása

az eugenol és a karvakrol esetében már 30 μM , míg a zingeron esetében 300 μM illetve annál nagyobb koncentrációkban adódott statisztikailag szignifikánsnak (14/A. ábra). A kumulatív dózis-hatás görbéket Hill egyenlettel illesztettük, a félgátló koncentrációk és a Hill koefficiensek értékeit pedig a 14. ábra táblázata tartalmazza. A félgátló koncentrációk értékeire a timolnál kapott értékhez képest az eugenol esetében valamelyest magasabb ($187 \pm 15 \mu\text{M}$) a karvakrolnál pedig némileg alacsonyabb ($98 \pm 11 \mu\text{M}$) koncentrációt kaptunk. A görbe meredekségét jellemző Hill koefficiensek értékeinek tekintetében már lényegesen nagyobb különbségeket tapasztaltunk. Ezen paraméter értékére mind az eugenol, mind a karvakrol esetében másfélhez közeli számot kaptunk, szemben a timolnál megfigyelhető 3-as értékhez képest. Mivel az analógok közül (a zingeron nagyon nagy dózisaitól eltekintve) csak az eugenol és a karvakrol fejtett ki számottevő gátlást, a továbbiakban ezen szereknek az $I_{\text{Ca-L}}$ kinetikai paramétereire kifejtett hatásait tanulmányoztuk.

Elsőként a fent említett két analógnak az $I_{\text{Ca-L}}$ áram-feszültség összefüggésére kifejtett hatásait vizsgáltuk. A sejteket 400 ms hosszan 5 mV-os lépésközökkel -30 és +60 mV közötti értékre depolarizáltuk és az $I_{\text{Ca-L}}$ csúcsértékeit az adott impulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk (15/A,B. ábra). Hasonlóan a kontroll körülmények között mértékhez az $I_{\text{Ca-L}}$ a maximumát mindkét analóg esetében +5 mV körül érte el, így megállapíthatjuk, hogy sem az eugenol, sem a karvakrol nem változtatta meg az $I_{\text{Ca-L}}$ áram-feszültség összefüggését. Az eugenol és a karvakrol kalcium csatornák vezetőképességére kifejtett hatásának vizsgálatánál a vezetőképesség értékét az adott membránpotenciálon mért áram és a kalcium ionokra ható hajtóerő hányadosából határoztuk meg. A hajtóerő számításánál az adott membránpotenciál és a +55 mV-nak feltételezett reverzálpotenciál különbségét képeztük. Mind az eugenol, mind pedig a karvakrol koncentrációfüggő módon csökkentette a kalciumcsatornák vezetőképességét (15/C,D. ábra), de ha az egyes membránpotenciálokra kapott értékeket az adott görbe +30 mV-nál mért vezetőképesség értékére, mint maximumra normalizáltuk a kapott vezetőképesség-feszültség összefüggések sem az eugenol, sem a karvakrol esetében nem mutattak eltérést a kontroll körülmények között mért görbétől.

A kontroll körülmények között, valamint 300 μM eugenol illetve karvakrol jelenlétében mért $I_{\text{Ca-L}}$ inaktivációját exponenciális illesztéssel jellemeztük. A legjobb illeszkedést a timollal végzett kísérletekhez hasonlóan két exponenciális tag összegével történő illesztéssel értük el. 300 μM eugenol csökkentette mind a gyorsan (τ_1), mind pedig a lassan inaktíválódó komponens időállandóját (τ_2), de a változás csak a gyors komponens esetében adódott szignifikánsnak. 300 μM karvakrol esetében csak a gyorsan inaktíválódó komponens időállandója esetén kaptunk szignifikáns mértékű csökkenést. A lassú komponens

időállandójában a karvakrol hatására kismértékű növekedést figyelhattunk meg.

	Gyors komponens időállandó (τ_1) (ms)			Lassú komponens időállandó (τ_2) (ms)		
	Kontroll	300 μ M	Kimosás	Kontroll	300 μ M	Kimosás
Eugenol	15,2 $\pm$ 1	12,8 $\pm$ 0,5	14,4 $\pm$ 2,6	68,9 $\pm$ 1,6	63,9 $\pm$ 2,6	63,5 $\pm$ 4,9
Karvakrol	13,6 $\pm$ 0,6	7,9 $\pm$ 0,7	13,4 $\pm$ 1,3	70,6 $\pm$ 2,3	77,1 $\pm$ 7,1	68,5 $\pm$ 5,5

Amikor az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését vizsgáltuk, a IV/2. pontban a timolnál már részletezett kettős impulzus protokollt alkalmaztuk (16. ábra). Itt is az egyes előimpulzusokat követő teszimpulzussal kiváltott csúcsáramokat a -55 mV-os előimpulzust követő teszimpulzussal kiváltott csúcsáram értékére normalizáltuk. Az egyes mérések eredményeit átlagoltuk és az alkalmazott előimpulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk (16/A,B. ábra). Az egyes mérések során kapott pontokat minden esetben kétállapotú Boltzmann függvénnyel illesztettük és meghatároztuk az illesztett görbék meredekségét és félértékfeszültségét. A kapott értékeket átlagoltuk és 16/C. ábrán tüntettük fel. Az általunk vizsgált 100 és 300 μ M-os koncentrációban mind a két analóg esetében szignifikáns mértékű balra tolódást figyelhattunk meg, de a két szer azonos koncentrációi által okozott eltolódás mértékében jelentős különbségeket tapasztaltunk. Hasonlóan az analógok kalcium áramra kifejtett gátlásához, (15/A,B. ábra) a steady-state inaktivációra kifejtett hatásnál is a karvakrol bizonyult a két szer közül hatásosabbnak.

	Félértékfeszültség (mV)			
	Kontroll	100 μ M	300 μ M	Kimosás
Eugenol	-18,3 $\pm$ 0,7	-22,4 $\pm$ 1	-24,1 $\pm$ 2	-20,2 $\pm$ 0,6
Karvakrol	-19,3 $\pm$ 0,7	-26,2 $\pm$ 1,7	-35,1 $\pm$ 1,9	-23,9 $\pm$ 1,1

Megfigyelve az egyes analógok kimosása után mért értékeket, elmondhatjuk, hogy mind az eugenol, mind pedig a karvakrol I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggésére kifejtett hatása részlegesen kimoshatónak bizonyult.

A továbbiakban megvizsgáltuk az eugenol és a karvakrol 300 μ M-os oldatának hatását a kalcium csatornák inaktív állapotból való visszatérésére (17. ábra). A kísérletekben alkalmazott kettős impulzus protokoll és a mérések során kapott adatok ábrázolási módja itt is megegyezett a timolnál már részletesen bemutatottal. A timolhoz hasonlóan a karvakrol szignifikánsan és reverzibilisen lassította a csatornák inaktivációból történő visszatérését,

amit az illesztések időállandóinak értékei is jól mutatnak (17/A. ábra). Hasonlóan a két vegyület eddig bemutatott hatásaihoz, a karvakrol ezen csatornaműködés esetén is hatékonyabbnak bizonyult az eugenolnál, tekintve, hogy ez utóbbi esetében a kapott változások nem voltak statisztikailag szignifikánsak (17/B. ábra).

IV/8. A karvakrol hatása egészséges humán kamrai szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára

A kutya kamrai szívizomsejtek esetén a kalciumáramot gátló timol analógok közül lehetőségünk volt megvizsgálni a karvakrol egészséges humán szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára kifejtett hatását. A karvakrol 100 μM -os koncentrációban mintegy felére csökkentette az $I_{\text{Ca-L}}$ -t (18/B ábrabetét), de nem változtatta meg az L-típusú kalciumáram feszültségfüggését (18/A. ábra). A kutya szívizomsejteken tapasztaltakhoz hasonlóan, a szer egészséges humán kamrai szívizomsejteken sem volt hatással a kalciumáram steady-state aktivációjának feszültségfüggésére (18/B. ábra). Az áram steady-state inaktivációjának vizsgálatára a már korábban ismertetett kettős impulzus protokollt alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy 100 μM karvakrol humán szívizomsejteken az L-típusú kalciumáram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését balra tolta, de a görbe meredekségét nem változtatta meg. A félértékfeszültség értékeire kontroll körülmények között $-21,4 \pm 0,56 \text{ mV}$ -ot, 100 μM karvakrol jelenlétében $-29,5 \pm 0,44 \text{ mV}$ -ot kaptunk. A kimosás utáni érték $-24,3 \pm 0,15 \text{ mV}$ -nak adódott. A kutya szívizomsejteken tapasztaltakhoz hasonlóan, 100 μM karvakrol gyorsította az $I_{\text{Ca-L}}$ időfüggő inaktivációját. A gyorsan inaktiválódó komponens amplitúdója és időállandója, valamint a lassan inaktiválódó komponens amplitúdója egyaránt szignifikáns mértékben csökkent a karvakrol hatására. Humán szívizomsejtek esetében azonban 100 μM karvakrol nem változtatta meg a kalcium csatornák inaktivációból történő visszatérését.

IV/9. A timol hatása a szívizomkontrakcióra

Kísérleteinkben kutyák jobb kamrájából származó trabekuláris izmokon vizsgáltuk a timol kontrakcióra kifejtett hatását. A kontrakció mérését a III/4. fejezetben leírtak szerint végeztük. A mérések során a timol egyre növekvő koncentrációit (30, 100, 300, 600 és 1000 μM) kimosás nélkül, egymás után használtuk a külső perfundáló oldatban. Az egyes koncentrációkat 10 percen keresztül alkalmaztuk. Ezen időtartam alatt a szer hatása minden esetben kialakult és stabil volt. Megfigyeléseink szerint a timol koncentrációfüggő módon csökkentette kutyák jobb kamrájából származó trabekulák kontrakciós erejét (19. ábra). Már 30 μM timol szignifikáns mértékű kontrakciós erő csökkenést okozott, ugyanakkor még az

1000 μM -os koncentrációjú timol sem fejtett ki teljes gátlást. A pontok Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére $297 \pm 12 \mu\text{M}$ -t kaptunk, míg a Hill koefficiens $0,95 \pm 0,04$ -nek adódott (19/B. ábra). Timol hatására a kontrakciós görbék kinetikai paraméterei nem változtak (19/A. ábra). A félrelaxációs idő értékei kontroll esetben $67 \pm 3 \text{ ms}$ -nak, 1000 μM timol jelenlétében pedig $70 \pm 3 \text{ ms}$ -nak adódott, a csúcsfeszülésig eltelt idő kontroll esetben $146 \pm 3 \text{ ms}$, 1000 μM timol jelenlétében pedig $145 \pm 20 \text{ ms}$ volt. Összefoglalva a timol szívizom kontrakciójára kifejtett hatásait kijelenthetjük, hogy a molekula koncentrációfüggő módon csökkentette kutyák bal kamrájából származó trabekulákon a kontrakció erejét, de nem befolyásolta a kontrakció egyéb paramétereit.

IV/10. A timol hatása a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szívre

A timol koncentrációfüggő módon befolyásolta tengerimalac szív kontrakciós paramétereit és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranzienseit is. A 20/A-B. ábra analóg görbéin 150 és 350 μM timol hatásait, míg a 21. ábrán a timol általunk vizsgált koncentrációinál mért értékeket mutatjuk be. A timol 150 μM , vagy annál nagyobb koncentrációban szignifikáns módon csökkentette a szisztolés nyomás értékét (21/A. ábra), ugyanekkor a diasztolés nyomás értéke már az 50 μM koncentrációjú timol jelenlétében is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll körülmények között mért értéknél (21/B. ábra). A timolnak a szisztolés és a diasztolés nyomásra kifejtett hatása összegződve jelentkezett a pulzusnyomás értékeiben, amelyet a molekula 350 μM koncentrációban már közel nullára csökkentett (21/C. ábra).

150 μM vagy annál nagyobb koncentrációban a timol a nyomásváltozásokhoz hasonlóan befolyásolta a citoszolikus kalciumszintet. A szisztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkent, a diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nöött a molekula hatására, míg 350 μM timol jelenlétében a kalciumtranziens amplitúdója közel nullára csökkent (21/D-F. ábra). Alacsonyabb timolkoncentrációknál (50-100 μM) azonban a mért nyomás- és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékek nem mutattak jó egyezést. Ezen koncentrációknál úgy tűnt, hogy a timolnak kalcium-érzékenyítő hatása van, hiszen a szisztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szint csökkenésével párhuzamosan a szisztolés nyomás értékeiben még nem figyelhattunk meg csökkenést. Ehhez hasonlóan a diasztolés nyomás növekedése is a diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szignifikáns növekedése nélkül jött létre. Összefoglalva ezen eredményeket elmondhatjuk, hogy a timol kontraktilitásra kifejtett hatása hasonló volt tengerimalac- és kutyaszív esetében, bár a tengerimalac preparátum érzékenyebbnek bizonyult a szerrel szemben (350 μM timol praktikusán teljesen gátolta a kontrakciós erőt tengerimalac szíven, míg kutyában ezen koncentráció csak közel 50 %-os gátlást okozott).

IV/11. A timol hatása kutya nehéz SR vezikulák kalciumforgalmára

A timol előbbiekben bemutatott negatív inotróp hatásának egyik oka a molekula $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensekre kifejtett koncentrációfüggő gátlása lehet. Ennek bizonyítására külön vizsgáltuk a molekula hatását kutya nehéz SR vezikulák kalciumforgalmának két meghatározó folyamatára, a kalcium vezikulába történő felvételére és az onnan történő kalcium-felszabadulásra. Az utóbbi folyamat tanulmányozása érdekében a vezikulákat egymást követő $CaCl_2$ adagolással, majd a kalciumpumpa gátlásával töltöttük fel. A timol hozzáadása a vezikulákból gyors kalciumfelszabadulást idézett elő (22/A. ábra), mely hatás 100 μM -os vagy annál nagyobb timol koncentrációknál statisztikailag szignifikáns mértékűnek bizonyult és az alkalmazott szerkoncentráció emelésével egyre kifejezettebb volt. A timol hatására bekövetkezett abszorpcióváltozás meredekségéből kiszámoltuk a kalciumfelszabadulás sebességét, mely koncentrációfüggést mutatott (22/B. ábra). A pontok Hill egyenlettel történő illesztésével a kalciumfelszabadulás maximális sebessége (V_{max}) $0,47 \pm 0,04$ nmol/s-nak adódott. A félgátló koncentráció értékére (EC_{50}) 258 ± 21 μM -t kaptunk, míg a Hill koefficiens $3,02 \pm 0,54$ -es értéke a kötőhelyek közötti erős pozitív kooperativitásra utal.

A vezikulákba történő kalciumfelvétel sebessége arányos a preparátum Ca^{2+} -ATP-áz aktivitásával, amely kontroll körülmények között $0,79 \pm 0,07$ $\mu mol P_i/mg$ fehérje/perc értéknek adódott. A timol koncentrációfüggő módon gátolta a kalciumpumpa aktivitását (23/A. ábra). A molekula által kifejtett gátlás már 50 μM -os koncentrációban statisztikailag szignifikánsnak bizonyult. A félgátló koncentráció értékére $253 \pm 4,7$ μM -t kaptunk, míg a Hill koefficiens $1,62 \pm 0,05$ -nek adódott.

IV/12. A timol hatása lipidkettősrétegbe beépített, kutyaszívből izolált RyR-ra

A további méréseket sík lipidkettősrétegbe beépített RyR-on végeztük (23/B-E. ábra). Kontroll körülmények között (timol hozzáadása nélkül) a csatorna specifikus vezetőképessége 512 ± 55 pS-nek adódott, mely érték jó egyezést mutat az irodalomban korábban közölt mérések eredményeivel (Brillantes és mtsai, 1994.; Copello és mtsai, 1997.). A timol RyR-hoz történő kötődése nem változtatta meg a csatorna specifikus vezetőképességét, melynek értékére 150 μM timol jelenlétében 521 ± 55 pS-t, míg 300 μM timol hozzáadásakor 507 ± 59 pS-es értéket kaptunk. A bemutatott reprezentatív áramjelek azt bizonyítják, hogy timol jelenlétében megnőtt a csatorna megnyílásainak száma, valamint hosszú időtartamú

nyitott epizódok jelentek meg (23/C,D.ábra). Az átlagos nyitvatartási valószínűség értékére $0,013 \pm 0,024$ -et, míg az átlagos nyitvatartási időtartam értékére $0,305 \pm 0,087$ ms-ot kaptunk kontroll körülmények között (23/B. ábra). $150 \mu\text{M}$ timol 18-szorosára ($0,233 \pm 0,103$), $300 \mu\text{M}$ timol mintegy 21-szeresére ($0,272 \pm 0,11$) növelte a csatorna nyitvatartási valószínűségét. Bár a kontroll értékhez képest mindkét vizsgált timolkoncentráció hatására a nyitvatartási valószínűség statisztikailag szignifikáns növekedését kaptuk, a két koncentráció jelenlétében mért értékek nem különböztek szignifikánsan egymástól. Ebből arra következtethetünk, hogy a timol jelenlétében bekövetkezett hatás az általunk vizsgált koncentrációknál már a szaturációhoz volt közel. A fent említett hosszú időtartamú nyitott epizódok átlagos nyitvatartási időtartama $150 \mu\text{M}$ timol jelenlétében 287 ± 21 ms-nak, $300 \mu\text{M}$ timol alkalmazása során 381 ± 37 ms-nak adódott, mely értékek szignifikánsan nagyobbak a timol hiányában mért értékektől. Annak érdekében, hogy a timol hatására bekövetkező nyitvatartási valószínűség emelkedésének okai közül kizárjuk a hosszú időtartamú nyitott epizódok előfordulását, a timol jelenlétében mért görbéket a hosszú időtartamú nyitott epizódok kihagyása után újra analizáltuk. Az ekkor kapott új nyitvatartási valószínűség értékek ($0,024 \pm 0,025$ $150 \mu\text{M}$ timol és $0,031 \pm 0,028$ $300 \mu\text{M}$ timol jelenlétében) és átlagos nyitvatartási időtartamok ($0,357 \pm 0,08$ ms $150 \mu\text{M}$ timol és $0,385 \pm 0,103$ ms $300 \mu\text{M}$ timol jelenlétében) már nem különböztek szignifikáns mértékben a kontroll körülmények között mért értékektől. Ebből arra következtettünk, hogy timol jelenlétében a RyR-nak két, jól elkülöníthető kapuzása létezik.

A timol RyR-ra kifejtett, előbbieken ismertetett hatásai nem mutattak feszültségfüggést, a tartópotenciál értékét -80 és $+80$ mV között változtatva a hatásokban nem tapasztaltunk változást. A rianodin a timollal aktivált RyR-hoz is képes volt kapcsolódni. Ezt a kölcsönhatást jól megfigyelhetjük a 23/E. ábrán, ahol a $300 \mu\text{M}$ timol hatására aktivált csatornát a $2 \mu\text{M}$ rianodin hozzáadása a jellegzetes félnyitott állapotban rögzítette, mely arra utal, hogy a csatornafehérje rianodin kötőhelye timol jelenlétében is hozzáférhető.

IV/13. A timol hatása patkány harántcsíkolt izomrostok kalcium áramára

A kalciumáram mérésekor a -100 mV-os membránpotenciálon tartott izomrostokat 800 ms hosszú -50 és $+60$ mV közötti depolarizáló impulzusokkal ingereltük. A timol koncentrációfüggő hatásának vizsgálatakor $+10$ mV-ra depolarizáltuk a sejteket, mert ezen a feszültségértéken volt az áram amplitúdója közel maximális. A timol egyre növekvő koncentrációit kimosás nélkül, egymás után alkalmaztuk. A molekula koncentrációfüggő módon csökkentette az I_{Ca} csúcsértékét (24/A. ábra). A molekula hatására bekövetkezett

gátlás a 100 μM (az áram a kontroll $83\pm 7\%$ -ára csökkent) és annál nagyobb szerkoncentrációk esetében adódott statisztikailag szignifikánsnak. 600 μM timol jelenlétében közel teljes gátlást kaptunk (az áram a kiindulási érték $9\pm 3\%$ -ára csökkent). A timol kumulatív dózis-hatás görbéjének Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére $193\pm 26\ \mu\text{M}$ -t kaptunk, míg a Hill koefficiens értéke $2,52\pm 0,29$ -nak adódott (24/B. ábra).

A 24/A. ábrán bemutatott analóg áramjeleken tisztán látszik, hogy a timol az áram aktivációs és inaktivációs kinetikáját is módosította. Ismerve a vázizom kalcium áramának komplex aktivációs kinetikáját (Feldmeyer és mtsai, 1990.), az aktiváció jellemzésére az áram csúcsértékéig eltelt időt használtuk (24/C. ábra). Az inaktivációs kinetika vizsgálatához az áramjelek inaktiválódó szakaszát monoexponenciális függvénnyel illesztettük (24/D. ábra). A timol hatása mindkét paraméter esetében kétfázisúnak bizonyult, nevezetesen 100-200 μM koncentrációban a timol szignifikáns mértékben csökkentette mind az aktiváció, mind pedig az inaktiváció sebességét. Ezzel szemben 600 μM timol az I_{Ca} aktivációját és inaktivációját egyaránt szignifikáns mértékben gyorsította.

Meghatároztuk az I_{Ca} áram-feszültség összefüggését is kontroll körülmények között és 300 μM timol jelenlétében. A mérések során 10 mV-os lépésközökkel -40 és +60 mV közötti 800 ms hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk és az I_{Ca} csúcsértékeit az adott impulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk (24/E. ábra). A pontokat a módszerekben bemutatott 1. egyenlettel illesztettük. A timol az előzőekben említett gátló hatásán kívül nem okozott az áram-feszültség összefüggésben semmilyen irányú eltolódást. Ezek után meghatároztuk a kalciumcsatornák vezetőképességét, melyet a csúcsáram értéke és az ahhoz tartozó hajtóerő hányadosából számoltunk. A hajtóerőt az alkalmazott depolarizáló impulzus feszültsége és az áram becsült reverzálpotenciáljának különbségeként határoztuk meg. 300 μM timol minden vizsgált feszültségen szignifikánsan csökkentette a kalciumcsatornák vezetőképességét (24/F. ábra). A pontokat a módszerekben leírt 2. egyenlettel illesztettük és meghatároztuk az illesztés meredekségét (k), a kalciumcsatornák maximális vezetőképességét (G_{max}) és a G_{max} félértékéhez tartozó feszültséget (V'). 300 μM timol hatására sem a V' , sem a k értékében nem következett be szignifikáns változás. A V' értékére $-12,2\pm 2,4$ mV-ot kaptunk kontroll körülmények között és $-12,8\pm 1,3$ mV-ot 300 μM timol jelenlétében. Ugyanezen körülmények között a k értékei $6,1\pm 1,2$ mV-nak illetve $4,6\pm 0,7$ mV-nak adódtak. Mint az a 24/F ábrán jól látszik, a G_{max} értékét 300 μM timol szignifikáns mértékben $120\pm 2,7$ S/F-ról $74,3\pm 1,5$ S/F-ra csökkentette.

IV/14. A timol hatása patkány harántcsíkolt izomrostok kálium áramára

A káliumáramot 100 ms hosszú, -100 mV-ról +20 mV-ra történő depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk (25/A. ábra). A timol koncentrációfüggő módon csökkentette az I_K -t. A timol kumulatív dózis-hatás görbéjének Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére $93 \pm 11 \mu\text{M}$ -t kaptunk, míg a Hill koefficiens értéke $1,51 \pm 0,18$ -nak adódott (25/B. ábra).

A káliumáram aktivációjának meghatározására a módszerekben korábban bemutatott 3. egyenletet használtuk. Az áramot 200 ms hosszú, -100 mV-ról kiinduló, -40 és +40 mV között 10 mV-os lépésközökkel alkalmazott depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Az aktivációs időállandót a timol az általunk használt legnagyobb koncentrációban ($300 \mu\text{M}$) sem változtatta meg szignifikáns mértékben. Az áram inaktivációját a timol már $200 \mu\text{M}$ -os koncentrációban szignifikáns mértékben gyorsította.

Az I_K áram-feszültség összefüggése alapján elmondhatjuk, hogy a timolnak az áram csúcserősségére kifejtett gátló hatása nem mutatott feszültségfüggést (25/D. ábra). A timol kimosása után kapott eredményekből látszik, hogy a molekula hatása +20 mV és attól pozitívabb membránpotenciálokön részlegesen reverzibilisnek bizonyult.

V. MEGBESZÉLÉS

V/1. A timol hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek ionáramaira és akciós potenciáljára

Kísérleteink eredményei alapján megállapítottuk, hogy a timol egyaránt hatással volt a szívizomsejtek akciós potenciáljára és az általunk vizsgált valamennyi ionáramra. Koncentrációfüggő módon gátolta a vizsgált ionáramokat és módosította az akciós potenciál paramétereit. Megfigyelhettük azonban azt is, hogy a molekula hatása eltérő mértékű volt a kalcium és az egyes kálium áramok esetében. A dózis-hatás görbékből meghatározott félgátló koncentrációk alapján kijelenthetjük, hogy a timollal szemben az I_{to} és az I_{Kr} bizonyult a legérzékenyebbnek. Az I_{Ks} -t és az I_{Ca-L} -t a timol nagyobb koncentrációban gátolta. A félgátló koncentráció az I_{Ks} esetében adódott a legnagyobb és ezen ionáram volt az egyetlen, amelynél még az általunk alkalmazott legmagasabb timol koncentráció esetében sem kaptunk teljes mértékű gátlást. Kísérleteinkben $158 \pm 7 \mu M$ timol kellett a kalciumáram gátlásához, puhatestűek neuronjain ennél valamivel nagyobb, $200 \mu M$ körüli félgátló koncentrációt kaptak (Győri és mtsai, 1991.). A timol jelenlétében kapott Hill koeficiensek esetében is eltéréseket figyelhettünk meg a kalcium és a kálium áramok között. A kálium áramok 1-hez közeli Hill koeficienseitől nagymértékben eltért a kalciumáram esetében kapott 3-as érték. Az 1-nél kisebb értékek a kötőhelyek közötti negatív, míg az 1-nél nagyobbak pozitív kooperativitásra utalnak. Ezek szerint a káliumáramok esetében a timol egy kötőhelyre hatva hozta létre az áramok gátlását. Ezzel szemben a kalcium áramnál a molekula három, egymással pozitív kooperativitást mutató kötőhelyen gátolta az áramot. Az is elképzelhető, hogy a timol kalcium áramra kifejtett hatásában több mechanizmus játszott szerepet.

A timol azon kívül, hogy az I_{to} időfüggő inaktivációját gyorsította, nem volt hatással az általunk vizsgált káliumáramok egyetlen kinetikai paraméterére sem. Az I_{Ca-L} esetében ezzel szemben számos kinetikai paraméterben jelentős változást hozott létre. Az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését a timol, a konvencionális kalcium csatornagátló verapamilhoz hasonlóan, balra tolta. Ez azt eredményezte, hogy timol jelenlétében a csatornák már negatívabb potenciálokon inaktív állapotban voltak, vagy egy adott potenciálon a kontroll körülményekhez képest a csatornák nagyobb hányadát találtuk inaktív állapotban. A csatornák inaktivációból történő visszatérését a timol lassította, ami különösen a magasabb szívfrekvenciák esetében azt eredményezte, hogy a kalcium csatornák egy része folyamatosan inaktív állapotban volt. A timol ezentúl gyorsította az I_{Ca-L} időfüggő inaktivációját, melynek a háttérben kalciumfüggő és kalciumtól független tényezők állhatnak. A IV/11. pontban leírt eredményeinkhez hasonlóan számos közleményben már relatíve alacsony koncentrációjú

timol hatására a sejten belüli raktárakból történő kalcium felszabadulást figyelték meg (lásd még az V/4. pontban). A timol ezen hatása a csatornák kalciumfüggő inaktivációja révén befolyásolhatja a kalciumáram mérések esetében kapott eredményeinket és létrehozhatta a kalciumáram timol hatására bekövetkezett gyorsult inaktivációját. A méréseink során azonban a pipettaoldat 10 mM EGTA-t tartalmazott, mely képes volt pufferelni a sejten belüli kalciumkoncentrációt, így a timol által bekövetkezett kalciumfelszabadulás nem befolyásolhatta az áramméréseink eredményeit. Ezzel szemben az akciós potenciál méréseknél már nem zárhatjuk ki a timol hatására kialakuló kalciumfelszabadulás AP paramétereit befolyásoló hatását, mert ezen méréseknél a nagyellenállású mikroelektrodokban EGTA-mentes KCl oldatot használtunk.

Mint láttuk, a timol a kalcium csatornák számos kinetikai paraméterét megváltoztatta és az összes általunk vizsgált paraméterben olyan irányú változást okozott, mely kedvezőtlenül befolyásolja a szív működést. Nevezetesen az áram inaktivációja gyorsult, az inaktív állapotból történő visszatérés lassult és a steady-state inaktiváció feszültségfüggése negatívabb feszültségek felé tolódott. Ha feltételezzük, hogy az aktivációt a timol nem befolyásolja, akkor a timol hatására a kinetikai paraméterekben bekövetkező változások együttesen azt eredményezik, hogy a szív működés során kevesebb működőképes kalcium csatorna áll rendelkezésre. Emiatt az akciós potenciál alatt kevesebb kalciumion tud az extracelluláris térből a szívműködésbe bejutni, ami végeredményben magyarázhatja a timol általunk is tapasztalt negatív inotróp hatását (lásd az V/3. pontban).

A timol AP alakjára kifejtett hatásai jól magyarázhatóak az egyes ionáramok esetében kapott eltérő félgátló timolkoncentrációk értékeivel. A timol alacsony koncentrációban (10 μM) csökkentette a korai gyors repolarizáció mértékét anélkül, hogy befolyásolta volna az AP többi paraméterét. 100 μM vagy azt meghaladó koncentrációban a molekula depressziálta az AP plató fázisát és rövidítette az akciós potenciál időtartamát. Az előbbi hatás hátterében az I_{to} timol hatására bekövetkező gátlása állhat, míg az utóbbira a $I_{\text{Ca-L}}$ gátlása adhat magyarázatot. A timol hatására bekövetkező AP rövidülés azt sugallja, hogy a magas szerkoncentrációk esetében a timol $I_{\text{Ca-L}}$ -ra kifejtett gátló hatása dominál a repolarizáló kálium áramokra kifejtett hatással szemben, annak ellenére, hogy a félgátló koncentrációk értékei a kálium áramok esetében az I_{Ks} kivételével alacsonyabbak.

A timol hidrofób karakterű, aszimmetrikus töltéseloszlással rendelkező molekula. Emiatt a csatornafehérjékre kifejtett hatásainak hátterében az is állhat, hogy a membránlipidek felől megközelítve a csatornákat, képes azok mikrokörnyezetét megváltoztatni. Ez a mechanizmus azonban nem magyarázhatja a timol kalcium és kálium csatornákra kifejtett eltérő hatásait,

mert az I_{K1} kivételével az összes csatornafehérje tartalmaz egy nagyon hasonló elrendezésű, hat membránt átívelő domént. Emiatt lehetséges, hogy a timol a fent említett lipidfázis felől kifejtett hatása mellett rendelkezik egy, közvetlenül a csatornafehérjékre kifejtett hatással is.

V/2. A timol hatása egészséges humán kamrai szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára

A timol I_{Ca-L} -ra kifejtett hatásai minőségileg hasonlónak bizonyultak kutyaszívből származó kamrai sejteken és egészséges humán kamrai szívizomsejtek esetében, bár mennyiségi eltérések ennek ellenére adódtak. A timol mindkét sejt esetében csökkentette a kalciumáram csúcserékét és gyorsította az áram inaktivációját. A molekula egyik preparátum esetében sem változtatta meg az I_{Ca-L} amplitúdójának és a steady-state aktivációjának feszültségfüggését. A timol mind kutya, mind humán szívizomsejteken balra tolta az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését. 250 μ M timol például kutyasejtek esetében a kalciumáramot 82,6 %-kal, az inaktiváció gyors komponensének időállandóját 49,6 %-kal csökkentette és 17,4 mV-tal balra tolta el a steady-state inaktiváció feszültségfüggését. Egészséges humán kamrai szívizomsejtek esetén ezen értékek rendre kisebbnek bizonyultak (68,6 %, 38,2 % és 12,4 mV). Elmondhatjuk tehát, hogy a humán szívizomsejtek L-típusú kalcium árama a timolra kevésbé érzékeny. Ezen kismértékű mennyiségi különbségek ellenére megállapíthatjuk, hogy a timol kalcium csatornákra kifejtett hatásmechanizmusa nagyon hasonló lehet a kutya, illetve az egészséges humán szívizomsejtek esetében. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a timol kalcium csatornákra kifejtett hatása szempontjából a kutya kamrai szívizomsejtek a humán sejtek jó modelljének tekinthetők.

V/3. A timol hatása patkány harántcsíkolt izomrostjainak ionáramaira

A szívizomsejteknél bemutatottakhoz hasonlóan, a timol patkány vázizomrostok kalcium és kálium áramát is koncentrációfüggő módon gátolta. A kalcium áramok esetében a Hill koeficiens értékei mindkét preparátumon 3 körüli értéknek adódtak, míg a kálium áramok esetében 1 körüli értékeket kaptunk. Valószínűsíthető tehát, hogy a timol a szívizom és a vázizom kálium csatornáinak egy kötőhelyéhez kapcsolódik. Ugyanakkor a kalcium csatornák esetében a molekula több, egymással pozitív kooperativitást mutató kötőhelyen fejtheti ki hatását, illetve a gátlásban egynél több mechanizmus is részt vehet. Ezen hasonlóságok ellenére számos különbség adódott a két preparátum között: a dózis-hatás görbékből meghatározott félgátló koncentrációk értékei mind a kalcium- (158 és 193 μ M), mind pedig a káliumáram (60 és 93 μ M) esetében szignifikánsan kisebbnek adódtak a szívizomsejteken. Szívizomsejteken a molekula minden általunk vizsgált koncentrációban

gyorsította a kalciumáram inaktivációját, míg a vázizomrostokon bifázisos hatást kaptunk, miszerint 100-300 μM közötti koncentrációban a timol növelte az inaktivációs időállandó értékét, míg magasabb koncentrációban (600 μM) a szer gyorsította az áram inaktivációját.

V/4. A timol hatása a szívizomkontrakcióra és a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szívre

A timol koncentrációfüggő módon gátolta emlős szívizom-preparátumok kontraktilis tulajdonságait. A szer növelte a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíveken a diasztolé alatt mért bal kamrai nyomást és csökkentette a szisztolés nyomás, valamint az intracelluláris kalciumkoncentráció értékeit. A nagyobb timolkoncentrációk jelenlétében megfigyelt pulzusnyomás-csökkenés jól magyarázható a kalciumtranziensek csökkent amplitúdójával. A molekula negatív inotróp hatásai egyaránt megfigyelhetőek voltak kutya jobb kamrájából származó trabekuláris izmán és a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven is, bár a hatásos koncentráció tekintetében jelentős eltéréseket figyeltünk meg a két faj esetében. Amíg kutyában már 30 μM timol csökkentette az összehúzódások erejét, addig tengerimalacszív esetében a molekula ezen hatása csak 150 μM és az annál nagyobb koncentrációk esetében volt megfigyelhető. Ezen túlmenően eltérések adódtak a hatás telíthetőségében is. Míg tengerimalacban 350 μM timol már teljes mértékben gátolta a szívösszehúzódások erejét, addig a kutyából származó trabekulák esetében még 1000 μM timol jelenlétében is csak mintegy 75 %-os kontrakciós erő csökkenést tapasztaltunk. Tekintve, hogy működő kutyaszíven nem végeztünk $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérést, a timol fajok közötti eltérő hatásainak magyarázatát nem ismerjük. 150 μM -nál alacsonyabb koncentrációban a timol nem változtatta meg a tengerimalac szívben mért pulzusnyomás értékét annak ellenére, hogy ugyanezen koncentrációban a kalciumtranziensek amplitúdójában már jelentős csökkenést okozott. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a tengerimalac preparátumokon a timolnak alacsony koncentrációban kalcium érzékenyítő hatása lehet, mely hatását kutyaszíven nem tapasztaltuk. A jelenség pontosabb tisztázásához azonban további, egyidejű $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és kontraktilitás mérésekre lenne szükség.

V/5. A timol hatása kutya nehéz SR vezikulák kalciumforgalmára és a lipiddettősrétegbe beépített kutya RyR-ra

A timol előző pontban említett negatív inotróp hatásaiért a molekula kalciumtranziensekre kifejtett gátló hatása lehet a felelős. A csökkent amplitúdójú tranziensek kialakulásának mechanizmusára adhatnak magyarázatot a timolnak a nehéz SR vezikulák

kalciumforgalmára kifejtett hatásai. Irodalmi adatok vannak arról, hogy patkány, nyúl és béka harántcsíkolt izomban a timol a koffeinhez hasonlóan az SR-ből kalciumot szabadít fel (Szentesi és mtsai, 2001.; Takishima és mtsai, 1980.; Koshita és Oba, 1989.). Leírták a molekula kalcium felszabadító hatását tengerimalac simaizom preparátumon (Hisayama és Takayanagi, 1986.), sőt idegszöveten is (Kostyuk és mtsai, 1991.). Annak ellenére, hogy a timol vezikulákra kifejtett hatásairól ilyen sok adat áll rendelkezésünkre, szívizmon eddig még nem végeztek ilyen méréseket. A kutya szívizomból izolált és lipidkettősrétegbe ültetett RyR-on végzett single channel méréseinkből arra lehet következtetni, hogy a timol a RyR-hoz kötődve képes megváltoztatni annak kapuzását és ezáltal az SR-ből kalciumot felszabadítani. A molekula ezen hatásáért a hosszú időtartamú nyitott epizódok timol jelenlétében történő megjelenése lehet a felelős, tekintve, hogy ezen epizódok átlagos nyitvatartási ideje három nagyságrenddel volt nagyobb a normál, timol hiányában megfigyelhető megnyílásokénál (kb. 0,3 s a 0,3 ms-hoz képest). Fontos azonban megjegyezni, hogy ha az analízisből kihagytuk a hosszú időtartamú nyitott epizódokat, a timol nem változtatta meg a csatorna átlagos nyitvatartási valószínűségét. A RyR-nak timol jelenlétében kétféle kapuzási módja lehet: egy normál kapuzás (mely a kontroll esetben tapasztaltakhoz képest nem mutat eltéréseket) és egy másik, mely a hosszú időtartamú nyitott epizódok megjelenését hozza létre. Egy további lehetőség a hosszú időtartamú nyitott epizódok megjelenésének magyarázatára a timol gyors kötődése a csatornafehérjéhez, illetve az onnan történő lassú leválása. Jelen eredményeink azonban nem teszik lehetővé a felsorolt lehetőségek közötti biztonságos elkülönítést.

Mint megfigyelhettük, a timol nemcsak a kalcium SR-ből történő felszabadítását idézi elő, hanem az SR-ben található Ca^{2+} -ATP-áz működését is koncentrációfüggő módon képes csökkenteni, mely hatásaival az SR kalcium deplécióját hozza létre. Ezen két hatás egymástól függetlenül is felelős lehet a timol negatív inotróp hatásáért és a diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedését valamint az SR kalcium deplécióját eredményezheti. Ezt támasztják alá a timol különböző hatásainál mért, nagyon közeli félgátló koncentrációk értékei is. A negatív inotróp hatás esetében ezen érték $297 \pm 12 \mu\text{M}$ -nak, a kalcium felszabadulás esetében $258 \pm 21 \mu\text{M}$ -nak, a kalciumpumpa gátlásakor pedig $253 \pm 5 \mu\text{M}$ -nak adódott. Az előbb említett esetekben a hasonló félgátló koncentráció értékekkel szemben jelentős eltéréseket figyelhettünk meg a dózis-hatás görbékből meghatározott Hill koefficiensek értékeiben (0,95 a kontraktilitás, 3,0 a kalcium felszabadulás és 1,62 a pumpaaktivitás gátlása esetén).

V/6. A timollal végzett kísérleteink eredményeiből levonható következtetések

A timollal végzett kísérleteink eredményei fontosak lehetnek mind a további

alapkutatások, mind pedig az alkalmazott kutatások szempontjából.

A vázizom és a szívizom excitációs-kontrakciós kapcsolatának tanulmányozása során általában a koffeint alkalmazzák az SR-ből történő kalcium felszabadulás előidézésére. A bevezetőben már ismertetett okok miatt ezen régóta használt molekula egyáltalán nem nevezhető ideálisnak a kalcium felszabadulást előidéző hatása szempontjából. Mint az az eredményeinkből kiderült, a timol várakozásunknak megfelelően képes volt az intracelluláris raktárakból történő kalcium felszabadulást szívizomsejteken is létrehozni, mint azt korábban már számos preparátumon leírták. Ezen hatás tekintetében a koffeinnél hatékonyabbnak bizonyult, hiszen 10 mM koffeinnel kiváltott kalciumfelszabadulás már átlagosan 100 μ M timollal is létrehozható volt. A timol kalcium felszabadító hatása a koffeinéhez képest gyorsabban kialakult és kimoshatónak bizonyult. Azt is megfigyeltük továbbá, hogy a koffeinhez képest a timollal kiváltott kalciumfelszabadulás jobban reprodukálható, amely valószínűleg a timol gyorsabb hatásából és könnyebb kimoshatóságából adódik. Mindezeket figyelembe véve, a timol leválthatja a koffeint mindazon kísérletekben, ahol gyors, reverzibilis és jól reprodukálható módon kell az intracelluláris raktárakból kalciumot felszabadítani. Amennyiben ez bekövetkezik, akkor fontos ismerni a molekula egyéb hatásait, amelyek adott esetben befolyásolhatják a kísérletek eredményeit. Ezen egyéb hatások közül említhetjük a szívizomsejtek és vázizomsejtek elektrofiziológiai működéseire kifejtett hatásokat.

A timolnak a szívizom kalcium háztartására és összehúzóására gyakorolt hatásai következtében szívelégtelenség előfordulásával és szívritmuszavarok megjelenésével is számolni lehet azon esetekben, amikor a szer elegendően nagy mennyiségben kerül be a szervezetbe. Mivel a timolt széles körben alkalmazzák, akár a gyerekek által véletlenül lenyelve, akár a felnőtteknél öngyilkossági szándékból akarattal elfogyasztva a szert, az túladagolás esetén mérgezést okozhat. Számos szájvíz tartalmaz timolt 1 %-os koncentrációban, amelyből 200 ml-t elfogyasztva a szervezet teljes folyadékterében kb. 300 μ M-os koncentrációt érhet el a szer egyenletes eloszlást feltételezve az extra- és intracelluláris térben. Ez a koncentráció pedig, mint az az eredményeinkből is következik, a szív működés zavarait idézheti elő.

Talán több klinikai vonatkozással bír a timol szervezetbe történő bekerülése a halotánnal történő altatásban végzett műtétek esetén. Igaz ugyan, hogy kezdetben a timol koncentrációja az altatógáz keverékben elég alacsony (0,01 %) (Thompson és Carlson, 1989.), de a molekula a vaporizátorban feldúsulhat. Erre leginkább a vaporizátor nem megfelelő használata esetén lehet számítani (nem kellő gyakorisággal történő szellőztetés, a patron ritka cserélése). Egy

gyermekgyógyászati műtétek során előforduló szívmegállásokat feldolgozó tanulmány szerint az esetek két harmada a halotánnal történő altatás során fordult elő (Murray és mtsai, 2000.). A halotán kardiális hatásait ezért széles körben vizsgálják. Ezen kísérletek során megállapították, hogy a halotán gátolja a kalcium és a késői kálium áramot tengerimalac kamrai szívizomsejtjein (Hirota és mtsai, 1989.). A halotán emellett a kalciumáram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését 11 mV-tal negatív irányba tolja el (Baum és mtsai, 1994.). Patkány kamrai szívizomsejtjein a halotán I_{to} -t deprimáló hatásáról is beszámoltak (Davies és mtsai, 2000.). Ezekben a kísérletekben a szerzők a timolt is tartalmazó, folyékony halotánt közvetlenül a perfundáló oldathoz adták. A timollal végzett kísérleteink eredményeivel összevetve ezen adatokat, felmerül annak a lehetősége, hogy a fent említett kísérletekben kapott változásokért nemcsak maga a halotán, hanem annak a stabilizálására használt timol is felelős lehet. A bevezetőben már említett ún. halotán hepatitis kialakulásáért a halotánt teszik felelőssé, de nem zárható ki, hogy az altatógázzal a szervezetbe kerülő timol is szerepet játszik a betegség kialakulásában. Ennek biztonsággal történő megválaszolásához azonban további, a timolnak és a halotánnak a sejtek működésére külön-külön kifejtett hatásait összehasonlító vizsgálatok szükségesek.

V/7. A timol analógiainak hatása kutya izolált szívizomsejtjeinek L-típusú kalcium áramára

Az általunk vizsgált timol analógok közül a guaiakol és a vanillin volt a legkevésbé hatással kutya szívizomsejtek I_{Ca-L} -ára. 300 μ M-os koncentrációban egyik szer sem gátolta az áramot és még az általunk vizsgált legnagyobb koncentrációban (1 mM) is csak mintegy 10 %-os gátlást hoztak létre. A zingeron már nagyobb mértékű, 300 μ M-os koncentrációban mintegy 17 %-os gátlást okozott. Az általunk vizsgált koncentrációtartományban sem a vanillin, sem a guaiakol, sem pedig a zingeron nem volt képes az I_{Ca-L} -ot teljes mértékben gátolni. A fenti három szer közül egyik sem volt hatással a kalciumáram időfüggő inaktivációjára. Ezzel szemben az eugenol és a karvakrol az általunk vizsgált koncentrációkban képes volt a kalciumáram teljes gátlását létrehozni. Eltérőek voltak azonban a kumulatív dózis-hatás görbékből meghatározott félgátló szerkoncentrációk és Hill koefficiensek értékei. Az I_{Ca-L} -ra kifejtett gátlás szempontjából a karvakrol bizonyult a leghatásosabbnak (félgátló koncentráció: $98 \pm 11 \mu$ M), míg a timol és az eugenol félgátló koncentrációi $158 \pm 7 \mu$ M-nak és $187 \pm 15 \mu$ M-nak adódtak. Ennek ismeretében meglepő lehet az egyes szerek Hill koefficienseinek egymástól ellentétes irányban történő eltérése. Nevezetesen mind a timolnál hatékonyabb karvakrol, mind pedig a legkevésbé hatékony eugenol másfél körüli Hill koefficiensei lényegesen alacsonyabbak a timol 3-hoz közeli Hill

koefficienséhez képest. A timolhoz hasonlóan sem az eugenol, sem pedig a karvakrol nem volt hatással az I_{Ca-L} áram-feszültség összefüggésére. Ezzel szemben mindkét szer gyorsította a kalciumáram időfüggő inaktivációját és lassította a csatornák inaktivációból történő visszatérését. Mindezen hatások alapján elmondhatjuk, hogy a karvakrol és az eugenol hatására a kalciumcsatorna nyitott és inaktív állapota közötti átmenet gyorsul, míg az inaktív és a zárt állapot közötti átmenet lassul. Mindkét szer esetében megfigyeltük továbbá, hogy a timolhoz hasonlóan a kalcium csatornák steady-state inaktivációjának feszültségfüggését koncentrációfüggő módon balra tolják el. 300 μM szerkoncentráció esetében a karvakrol esetében az eltolódás mértéke $14,8 \pm 1,26$ mV-nak, míg az eugenolnál $6,05 \pm 1,18$ mV-nak adódott.

V/8. A karvakrol hatása egészséges humán kamrai szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára

Kísérleteink során korlátozott számban és alkalommal állt rendelkezésünkre humán preparátum, ezért célszerűnek tűnt kiválasztani egy analógot és a méréseket azzal elvégezni. Azért esett a választásunk pont a karvakrolra, mert kutya szívizomsejtek kalcium áramán a vizsgált analógok közül a legnagyobb mértékű gátlást ez a molekula hozta létre. Egy másik érv is szólt a karvakrol mellett, nevezetesen a timolhoz hasonlóan előfordul a természetben és széles körű gyakorlati felhasználása miatt az emberi szervezetbe is bekerülhet. Csakúgy mint a timol esetében, a karvakrol is hasonlóan hatott a kutyaszívből származó kamrai sejtek és az egészséges humán kamrai szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára. A molekula egyik preparátum esetében sem változtatta meg az I_{Ca-L} amplitúdójának és a steady-state aktivációjának feszültségfüggését, azonban mindkét esetben csökkentette az áram csúcserékét és gyorsította az áram inaktivációját. A karvakrol mind kutya, mind humán szívizomsejteken balra tolta az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését. A timollal ellentétben, a karvakrollal szembeni érzékenységekben a humán és a kutya szívizomsejtjei között nem volt különbség, mert 100 μM karvakrol hatására az I_{Ca-L} amplitúdója 49 %-kal csökkent kutya és 51 %-kal humán szívizomsejteken. Humán szívizomsejteken a steady-state inaktiváció félértékfeszültségének eltolódása 100 μM karvakrol hatására mintegy $8,1 \pm 0,6$ mV-nak adódott, a kutya sejtjein tapasztalt $7,2 \pm 0,4$ mV-tal szemben. Az inaktiváció időállandója 100 μM karvakrol hatására kutya szívizomsejtjein 30 %-kal, míg humán szívizomsejteken 24 %-kal csökkent. Fontos azonban azt is megjegyezni, hogy az előbb említett érzékenységbeli eltérések egy esetben sem érték el a szignifikancia határát, amely arra enged következtetni, hogy a karvakrol kalcium csatornákra kifejtett hatásmechanizmusa nagyon hasonló lehet a kutya, illetve az egészséges humán

szívizomsejtek esetében. Összehasonlítva a kutya és a humán szívizomsejteken mért eredményeket, a karvakrol esetében a timolhoz képest a következő eltéréseket kaptuk: 1. a humán szívizomsejtek L-típusú kalcium árama a karvakrolra azonos mértékben érzékeny, mint a kutya sejteinek I_{Ca-L} -a. 2. A timollal szemben karvakrol esetében a humán és a kutya szívizomsejteken kapott eredmények közötti különbségek kisebbnek adódtak. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a kalcium csatornákra kifejtett hatás szempontjából a karvakrol esetében a kutya kamrai szívizomsejtek a humán sejtek jobb modelljének tekinthetők.

V/9. A timol analógjainak szerkezete és az L-típusú kalcium áramra kifejtett hatásaik közötti összefüggés

Amikor összefüggéseket keresünk a vizsgált molekulák szerkezete és az általuk kifejtett hatások között, több tényezőt is figyelembe kell venni, amelyek együttesen határozzák meg az adott molekula fiziko-kémiai tulajdonságait. Egyrészt a molekula oldékonysága, másrészt az elektronok eloszlása a molekulán belül, amelyeket a fenolgyűrűhöz kapcsolódó oldalláncok minősége és mennyisége fog meghatározni. Az általunk vizsgált timol analógok közül mindegyikben a fenolos alapszerkezet volt a közös. Eltérő volt azonban a gyűrűhöz kapcsolódó hidrofób oldallánc hosszúsága, amely a molekula oldékonyságát döntően befolyásolja. A guaiakol és a vanillin esetében az oldallánc rövid, mely ezen molekulák vízóldékonyságáért felelős. Ezen két analóg befolyásolta kísérleteinkben a legkevésbé a szívizomsejtek L-típusú kalcium áramát. Ebből arra lehet következtetni, hogy az analógok nem közvetlenül a csatornafélfője extracelluláris részéhez kapcsolódva hozzák létre gátló hatásukat. A zingeron volt a harmadik analóg, mely csak kismértékben befolyásolta a kalcium áramot. Ez arra enged következtetni, hogy a fenti három molekulának a kalcium áramra kifejtett gyenge hatása a timoltól lényegesen eltérő szerkezetük következménye. A guaiakol esetében a molekula nem tartalmaz hosszabb oldalláncot, a zingeron esetében pedig az oldallánc túlságosan hosszú volta akadályozhatja a kalciumcsatornához való kötődést, annak ellenére, hogy ezen utóbbi molekula a másik kettővel ellentétben lipidoldékony. A vanillin szerkezetében van a timolhoz legközelebb az oldalláncok szénatomszáma, de ezek minősége és helyzete annyira eltérő, hogy nagy valószínűséggel a molekula töltéseloszlása jelentős mértékben eltér a timoltól. Ez az eltérés okozhatja azt, hogy a vanillin sem befolyásolja a kalcium áramot. Elmondhatjuk tehát, hogy a fenolgyűrűhöz kapcsolódó funkciós csoportok minősége, mennyisége és elhelyezkedése nagyon fontos a molekula töltéseloszlásának és ezáltal a hatásosságának kialakítása szempontjából.

Az eugenol esetében a funkciós csoportok mennyisége és minősége az eddig ismertetett analógokhoz képest kisebb mértékben különbözik a timoltól, a karvakrolnál pedig csak a csoportok elhelyezkedésében van különbség. Ennek köszönhetően, a timolhoz hasonlóan, ezen két analógnak is számos hatása van kutya szívmuscle L-típusú kalcium áramára. Ezen hatások nagy részében csak kisebb-nagyobb mennyiségi különbség figyelhető meg a három molekula között. Mindenképpen fontos azonban kiemelni a dózis-hatás görbék meredekségét jellemző Hill együtthatók értékeit, melyek tekintetében a három szer lényegesen különbözik. A timol esetében kapott 3 körüli Hill együttható a gátló hatásban több mechanizmusra, vagy a csatornafehérjén több egymással pozitív kooperativitást mutató kötőhely jelenlétére utal. Ezzel szöges ellentétben állnak az eugenol illetve a karvakrol esetében kapott másfélhez közeli értékek, melyek egy kötőhelyen keresztül megvalósuló gátlásra utalnak.

Mint láttuk mind az eugenol, mind pedig a karvakrol számos ponton befolyásolja a kalcium csatornák működését, mely hatásuk több támadásponton keresztül valósulhat meg: 1. az extracelluláris felszín felől kötődhetnek a csatornát alkotó fehérjékhez; 2. lipidoldékonyságuk révén a membránban oldódva megváltoztathatják a csatornát alkotó fehérjék mikrokozmetét, ily módon azok működését; 3. a sejtmembránon ájtutva közvetlenül kötődhetnek a csatorna intracelluláris felszínéhez, vagy beavatkozhatnak egyes intracelluláris enzimrendszerek és jelátviteli folyamatok működésébe. Irodalmi adatokból ismert, hogy a vizsgált fenolszármazékok ájtutnak a neuronok, simaizomsejtek felszíni membránján és az intracelluláris raktárakból kalciumot szabadítanak fel. Az intracelluláris kalciumszint megemelkedése pedig számos enzim működésére lehet hatással. Amennyiben azonban a vizsgált molekulák a membrán lipid fázisa vagy az intracelluláris oldal felől fejtenék ki hatásukat a csatornafehérjékre, ez esetben az eugenol hatásának rövidebb idő alatt kellene jelentkezni, mint a karvakrolénak vagy a timolénak, mert a benzolgyűrűhöz kapcsolódó hosszabb apoláris oldallánc és a metoxi-csoport miatt az eugenol lipidoldékonysága a karvakrolnál és a timolnál nagyobb. Eredményeink szerint a timolnál megfigyeltékhez hasonlóan mind a karvakrol, mind az eugenol hatása 20-30 másodperc alatt kifejlődött. Ez arra utalhat, hogy a fenolszármazékok a csatorna extracelluláris részéhez kötődve fejtik ki gátló hatásukat. Ezt támasztják alá azon tengerimalac szívmuscleken végzett kísérletek is, ahol megállapították, hogy az eugenol kalciumáramra kifejtett gátló hatása nem korrelál a szer oktanol-víz partíciós együtthatójával (Sensch és mtsai, 2001.). Erre utal az is, hogy ha a fenolszármazékok valóban a lipid fázis felől fejtenék ki hatásukat, akkor kis koncentrációban, de hosszabb ideig alkalmazva azokat, ugyanolyan mértékű gátlást kellett volna tapasztalni,

mint nagyobb szerkoncentrációk rövid ideig történő alkalmazása esetén.

Irodalmi adatok vannak arra vonatkozóan, hogy az általunk vizsgált analógok esetén a szer kalcium áramra kifejtett hatásának mértéke a benzolgyűrűhöz kapcsolódó csoportok reakcióképességétől függ (Szabadics és Erdélyi, 2000.). Az eugenol, a karvakrol és a timol molekulák feltehetően a hidroxil-csoport révén kapcsolódnak a csatornafehérjékhez, és fejtik ki nem specifikus hatásukat. Eugenol esetén a benzolgyűrűhöz kapcsolódó metoxi-csoport és a hosszabb hidrofób oldallánc gyengítheti a hidroxil-csoport reakcióképességét. A karvakrol és a timol rövidebb oldallánccal rendelkezik és a metil-csoport kisebb mértékben csökkenti a hidroxil-csoport ionizált állapotát (Szabadics és Erdélyi, 2000.). Ez összhangban van azon eredményeinkkel, hogy az eugenol mind a karvakrolnál, mind pedig a timolnál kisebb mértékben gátolja a kalciumáramot és az áram kinetikai paramétereit is kevésbé befolyásolja, mint a másik két vegyület. A karvakrol és a timol hatásaiban tapasztalható különbségeknek feltételezhetően az az oka, hogy a metil- és a hidroxil-csoportok a benzolgyűrű más szénatomjaihoz kapcsolódnak, így a hidroxil-csoport ionizált állapota eltérő lehet.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A timol és analógjai a természetben széles körben előforduló aromás fenolszármazékok. Közülük többnek baktericid, fungicid és antioxidáns tulajdonságai miatt számtalan ipari és gyógyászati felhasználása van. Emiatt a szerek gyakran kerülnek be az emberi szervezetbe majd lipidoldékonyságuk következtében a sejtmembránba beoldódva és ott feldúsulva befolyásolhatják a különböző sejtműködéseket.

Kísérleteink során célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a timolnak és analógjainak emlős szívizomsejtek akciós potenciáljának morfológiájára és ionáramaira kifejtett hatásait. Továbbá kíváncsiak voltunk arra is, hogy a timol hatása a vázizomrostok ionáramaira hasonló-e a szívizomsejtek ionáramaira kifejtett hatásához. Ezen túlmenően azt vizsgáltuk, hogy a szívizom összehúzódását és a szívizomsejtek kalcium homeosztázisát hogyan befolyásolja a timol.

Vizsgálatainkat kutya bal kamrájából származó, enzimatikusan izolált szívizomsejteken végeztük. A membránpotenciál változásait konvencionális mikroelektrod segítségével mértük, az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában regisztráltuk. A harántcsíkt izomrostokat patkány musculus digitorum communisából nyertük és azok ionáramait kettős vazelin gap technikával feszültség-clamp körülmények között mértük. Kísérleteink másik részét Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven végeztük. A kalciumhomeosztázis vizsgálatához kutya bal kamrájából izolált nehéz SR vezikulákat és tisztított RyR-t használtunk, míg a kontrakciós erőméréseket kutya jobb kamrai trabekuláris izmain végeztük. A kontrakciós erőt kapacitív mechano-elektronikus jelátalakító segítségével határoztuk meg, a RyR-ral végzett mérésekben pedig a single channel technikát használtuk. Az SR kalciumpumpa működését „kapcsolt enzim-assay” segítségével, az SR-ből történő kalcium felszabadulást pedig az extracelluláris térben bekövetkező Ca^{2+} -koncentráció változások kalciumérzékeny festékekkel történő detektálásával követtük nyomon.

A timol kutya bal kamrai szívizomsejtek akciós potenciálját koncentrációfüggő módon rövidítette, deprimálta az AP plató fázisát és csökkentette a korai gyors repolarizáció mértékét. Ezen hatásaival összhangban gátolta ugyanezen sejteken az általunk vizsgált összes ionáramot. A timol egyaránt gátolta a tranziens kifelé irányuló és a befelé egyenirányító kálium áramot, valamint a késői egyenirányító káliumáram gyors és lassú komponensét. A molekula nem befolyásolta az általunk vizsgált káliumáramok kinetikai paramétereit. Ezzel szemben a timol gyorsította az L-típusú kalciumáram inaktivációját, de nem volt hatással annak áram-feszültség összefüggésére és a steady-state aktiváció feszültségfüggésére sem. A

molekula lassította a kalcium csatornák inaktivációból történő visszatérését és balra tolta a steady-state inaktiváció feszültségfüggését. Egészséges humán szívizomsejteken a molekula kalcium áramra kifejtett hatása nagymértékben hasonlónak bizonyult a kutyaiban megfigyeltekhez képest, bár kisebb mennyiségi különbségek adódtak.

Az általunk vizsgált timol analógok közül a vanillin és a guaiakol nem befolyásolta kutya szívizomsejtek L-típusú kalcium áramát, a zingeron pedig csak nagy koncentrációban gátolta az áramot. A karvakrol és az eugenol a timolhoz hasonló hatással volt az I_{Ca-L} -ra, de a molekulák az áram eltérő mértékű gátlását hozták létre. Mind a karvakrol, mind az eugenol koncentrációfüggő módon csökkentette a kalciumáram amplitúdóját, gyorsította annak időfüggő inaktivációját, lassította a kalcium csatornák inaktivációból történő visszatérését és balra tolta a steady-state inaktivációjának feszültségfüggését. A két analóg közül az összes hatás esetében a karvakrol bizonyult hatékonyabbnak. A karvakrol kutya szívizomsejtek kalcium áramára kifejtett hatásai jó egyezést mutattak az egészséges humán szívizomsejtek kalcium áramának mérése során nyert eredményeinkkel. Kísérleteink eredményei alapján kijelenthetjük, hogy mind a timol, mind pedig a karvakrol kalcium áramra kifejtett hatásainak vizsgálatánál a kutya szívizomsejtjei a humán sejtek jó modelljének tekinthetők.

A timol a szívizomsejtekhez hasonlóan patkány harántcsíkolt izomrostjain is koncentrációfüggő módon gátolta a kalcium és a kálium áramokat. A timol kis koncentrációban lassította, nagyobb koncentrációban pedig gyorsította a kalciumáram aktivációját és inaktivációját is. Ezzel szemben a timol nem befolyásolta a kalciumáram csúcsértékének és steady-state aktivációjának feszültségfüggését. Patkány harántcsíkolt izomrostjain a káliumáram csúcsértékének feszültségfüggését és az áram aktivációját a timol nem befolyásolta, de gyorsította az áramok időfüggő inaktivációját. Mérési eredményeink szerint a timol koncentrációfüggő módon csökkentette a kontrakciós erőt kutya trabekuláris izmokon és ezen negatív inotróp hatása a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven is kialakult. Az utóbbi preparátumon a szisztolés nyomás csökkenése mellett a diasztolés nyomás növekedését tapasztaltuk, mely eredményekkel összhangban változott az intracelluláris kalciumkoncentráció is. A timol amellet, hogy gátolta az SR kalcium-pumpát, a RyR aktiválásán keresztül koncentrációfüggő módon kalciumfelszabadulást hozott létre kutya nehéz SR vezikulákból.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Kovács László Professzor Úrnak, az Élettani Intézet igazgatójának, aki lehetővé tette számomra a munka elvégzését.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Magyar Jánosnak áldozatkész segítségét, bátorítását, elméleti és gyakorlati tanácsait, melyek nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom Dr. Bányász Tamásnak, Dr. Fülöp Lászlónak és Dr. Nánási Péternek a bátorításért és hasznos tanácsokért.

Köszönettel tartozom továbbá mindazoknak, akik a disszertációban bemutatott kísérleteket, méréseket végezték vagy azok kivitelezését lehetővé tették, névszerint Dr. Csernoch Lászlónak, Dr. Jóna Istvánnak, Dr. Sárközi Sándornak, Dr. Szegedi Csabának, Dr. Szentesi Péternek és Dr. Szigeti Gyulának.

Külön köszönöm Dr. Varró András professzor úrnak, hogy lehetővé tette a humán szívizomsejteken történő méréseinket.

Az előkészítések során nélkülözhetetlen segítséget nyújtott Kovács Józsefné, Orosz József és Víghné Horváth Katalin.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

Aeschbach R., Loliger J., Scott BC., Murcia A., Butler J., Halliwell B., Aruoma OI. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* 32: 31-36, 1994.

Baum VC., Wetzel GT., Klitzner TS. Effects of halothane and ketamine on activation and inactivation of myocardial calcium current. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23: 799-805, 1994.

Brandes R., Figuerdo VM., Camacho SA., Baker AJ., Weiner MW. Investigation of factors affecting fluorometric quantitation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ in perfused hearts. *Biophys. J.* 65: 1983-93, 1993.

Brillantes A-M., Ondrias K., Scott A., Kobrinsky E., Ondriasová E., Moschella MC., Jayaraman T., Landers M., Ehrlich BE., Marks AR. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77: 513-523, 1994.

Castle NA. Differential inhibition of potassium currents in rat ventricular myocytes by capsaicin. *Cardiovasc. Res.* 26(11): 1137-44, 1992.

Chang HM., Tai TY., Huang CJ. Cytotoxic and nongenotoxic effects of phenolic compounds in human pulp cell cultures. *J. Endod.* 26: 440-443, 2001.

Copello JA., Brag S., Onoue H., Fleischer S. Heterogeneity of Ca^{2+} gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys. J.* 73: 141-156, 1997.

Csernoch L., Szentesi P., Sárközi S., Szegedi Cs., Jóna I., Kovács L. Effects of tetracaine on sarcoplasmic calcium release in mammalian skeletal muscle fibers. *J. Physiol.* 515: 843-857, 1999.

Davies LA., Hopkins PM., Boyett MR., Harrison SM. Effects of halothane on the transient outward K-3 current in rat ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 131: 223-230, 2000.

Duke Adrian M., Steele Derek S. Effects of caffeine and adenine nucleotides on Ca^{2+}

release by the sarcoplasmic reticulum in saponin-permeabilized frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol. Cambridge*. 513(1): 43-53, 1998.

Dutka TL., Lamb GD. Effect of lactate on depolarization-induced Ca^{2+} release in mechanically skinned skeletal muscle fibers. *Am. J. Phys.* 278: 517-525, 2000.

Edes I., Kranias EG. Phospholamban and troponin I are substrates for protein kinase C in vitro but not in intact beating guinea pig hearts. *Circ. Res.* 67: 394-400, 1990.

Elliot RH., Sturnin L. Hepatotoxicity of volatile anaesthetics. *Br. J. Anaesthesia*. 70: 339-348, 1993.

Erdélyi L. Guaiacol and vanilloid compounds modulate the A-type potassium currents in molluscan neurons. *Acta Biol. Hung.* 50: 65-79, 1999.

Erdélyi L. Vanillin modulates the fast outward and calcium currents in *Helix* neurons. *Acta Biol. Hung.* 43(1-4): 15-24, 1992.

Fabiato A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.* 157: 378-147, 1998.

Feldmeyer D., Melzer W., Pohl B., Zollner P. Fast gating kinetics of the slow Ca^{2+} current in cut skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol. (Lond)* 425: 347-367, 1990.

Gao S., Singh J. In vitro percutaneous absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes. *J. Controlled Release*. 51: 193-199, 1998.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with a greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450, 1985.

Győri J., Kiss T., Shcherbatko AD., Belan PV., Tepikin AV., Osipenko ON., Salánki J. Effect of Ag^+ on membrane permeability of perfused *Helix pomatia* neurons. *J. Physiol.* 442: 1-13, 1991.

Hamill OP., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100, 1981.

Herrmann-Frank A., Richter M., Sárközi S., Mohr U., Lehmann-Horn F. 4-chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1289: 31-40, 1996.

Hirota K., Ito Y., Masuda A., Momose Y. Effects of halothane on membrane ionic currents in guinea pig atrial and ventricular myocytes. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 33: 239-244, 1989.

Hisayama T., Takayanagi I. Some properties and mechanisms of thymol-induced release of calcium from the calcium-store in guinea-pig taenia caecum. *Jpn. J. Pharmacol.* 40: 69-82, 1986.

Iarmol'chuk HM. Determination of the content of common protein in biological samples using chemical stabilizers. *Ukr. Biokhim. Zh.* 68: 103-105, 1996.

Jacobi CA., Wenger FA., Schmitz-Rixen T., Muller JM. Talc pleurodesis in recurrent pleural effusions. *Langenbecks. Arch. Surg.* 383: 156-159, 1998.

Koshita M., Oba T. Caffeine treatment inhibits drug-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum and caffeine contracture but not tetanus in frog skeletal muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 890-895, 1989.

Kostyuk PG., Belan PV., Tepikin AV., Korn SJ., Horn R., Nejlson CB., Nickashin A., Little PJ., Tkachuk VA., Bobik A. Free calcium transients and oscillations in nerve cells. *Exp. Brain Res. Molecular Pharmacology Journal of Biological Chemistry* 267: 7295-7302, 1992.

Kostyuk PG., Belan PV., Tepikin AV. Free calcium transients and oscillations in nerve cells. *Exp. Brain Res.* 83: 459-464, 1991.

Kreydiyyeh SI., Usta J., Copti R. Effect of cinnamon, clove and some of their constituents on the Na-K-ATPase activity and alanine absorption in the rat jejunum. *Food Chem. Toxicol.* 38: 755-762, 2001.

Lam E., Martin MM., Timerman AP., Sabers C., Fleischer S., Lukas T., Abraham RT., O'Keefe SJ., O'Neill EA., Wiederrecht GJ. A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 26511-26512, 1995.

Laver DR., Roden LD., Ahern GP., Eager KR., Junankar PR., Dunlunty AF. Cytoplasmic Ca^{2+} inhibits the ryanodine receptor from cardiac muscle. *J. Membr. Biol.* 147: 7-22, 1995.

Lee S., Tsao R., Peterson C., Coats JR. Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 883-892, 1997.

Lima D., Criddle DN., Coelho-de-Souza AN., Monte E., Jaffar J., and Leal-Cardoso JH. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. *Planta Med.* 66: 408-411, 2001.

Liu L., Simon SA. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neurophys.* 76: 1858-1869, 1996.

Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer MJ., Barel AO. Evaluation of the preservative properties of Thymus vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *J. Appl. Microbiol.* 84: 368-376, 1998.

Montes-Belmont R., Carvajal M. Control of Aspergillus flavus in maize with plant essential oils and their components. *J. Food Prot.* 61: 616-619, 1998.

Murray JP., Geiduschek JM., Ramamoorthy C., Haberkern CM., Hackel A., Caplan RA., Domino KB., Posner K., Cheney FW. Anaesthesia-related cardiac arrest in children: initial findings of the Pediatric Perioperative Cardiac Arrest (POCA) Registry.

Anaesthesiology 93: 6-14, 2000.

Murchison D., Griffith WH. Age-related alterations in caffeine-sensitive calcium stores and mitochondrial buffering in rat basal forebrain. *Cell-Calcium*. 25(6): 439-452, 1999.

Nishijima M., Uchida S., Kameyama M., Kawakami S., Ohkubo S., Kitamura C. Mechanism mediating the vasorelaxing action of eugenol, a pungent oil, on rabbit arterial tissue. *Jpn. J. Pharmacol.* 79: 327-334, 1999.

Ogaard B., Larsson E., Glans R., Henriksson T., Birkhed D. Antimicrobial effect of a chlorhexidine-thymol varnish (Cervitec) in orthodontic patients. A prospective, randomized clinical trial. *J. Orofac. Orthop.* 58: 206-213, 1997.

Palade P. Drug induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 262: 6135-6141, 1987.

Ray DC., Drummond GB. Halothane hepatitis. *Br. J. of Anaesthesiology*. 97: 84-99, 1991.

Reiter M., Brandt W. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittelforschung* 35: 408-414, 1985.

Sensch K., Vierling S., Brandt W. and Reiter M. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of beta-caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *Br. J. Pharmacol.* 131: 1089-1096, 2001.

Shapiro S., Guggenheim B. The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 10: 241-246, 1995.

Skold K., Twetman S., Hallgren A., Yucel-Lindberg T., Modeer T. Effect of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid. *Eur. J. Oral Sci.* 106: 571-575, 1998.

Szabadics J., Erdélyi L., Csóti T. Attenuation of excitatory synaptic transmission by guaiacol and eugenol under pre- and postsynaptic mechanisms in the ganglia of the snail

Helix pomatia L. *J. of Physiology* p. 526, 2000.

Szabadics J., Erdélyi L. Pre- and postsynaptic effects of eugenol and related compounds on *Helix pomatia* L. neurons. *Acta Biol. Hung.* 51: 265-273, 2000.

Szegedi Cs., Sárközi S., Herzog A., Jóna I., Varsányi M. Calsequestrin: more than only a luminal Ca^{2+} buffer inside the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J.* 337: 19-22, 1999.

Szentesi P., Collet C., Sárközi S., Szegedi Cs., Jóna I., Jacquemond V., Kovács L., Csernoch L. Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibres. *J. Gen. Physiol.* 118: 355-375, 2001.

Takishima K., Shimizu H., Setaka M., Kwan T. A spin-label study of the effects of drugs on calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biochem. (Tokyo)* 87: 305-312, 1980.

Thompson RD., Carlson M. Determination of thymol in halothane anaesthetic preparations by high-performance liquid chromatography. *J. Pharmac. Biomed. Analysis* 7: 1199-1206, 1989.

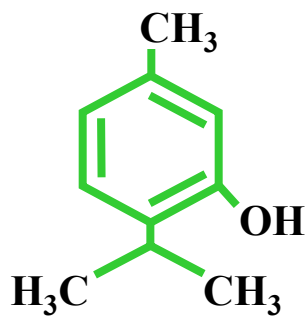
Turler A., Gawenda M., Walter M. Palliative iodized talc pleurodesis with instillation via tube thoracostomy. *Support. Care Cancer* 5: 61-63, 1997.

Twetman S., Hallgren A., Petersson LG. Effect of an antibacterial varnish on mutans streptococci in plaque from enamel adjacent to orthodontic appliances. *Caries. Res.* 29: 188-191, 1995.

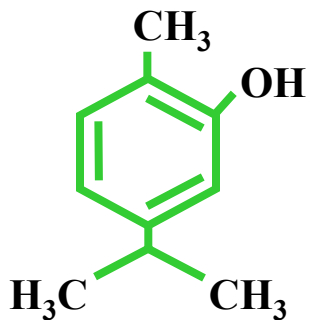
Ultee A., Gorris MT., Schmid EJ. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 211-218, 1998.

Volders PG., Kulcsar A., Vos MA., Sipido KR., Wellens HJ., Lazzara R., Szabo B. Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 34: 348-359, 1997.

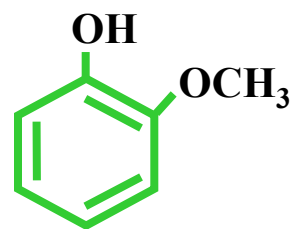
Yucel-Lindberg T., Twetman S., Skold-Larsson K., Modeer T. Effect of an antibacterial dental varnish on the levels of prostanoids, leukotriene B₄, and interleukin-1 beta in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol. Scand.* 57: 23-27, 1999.



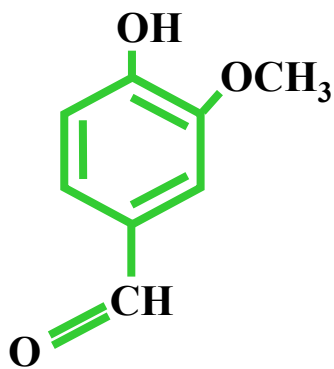
Timol



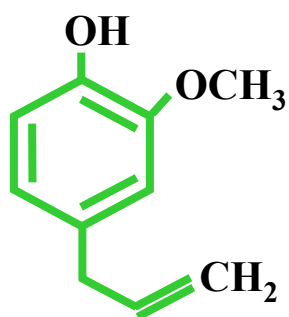
Karvakrol



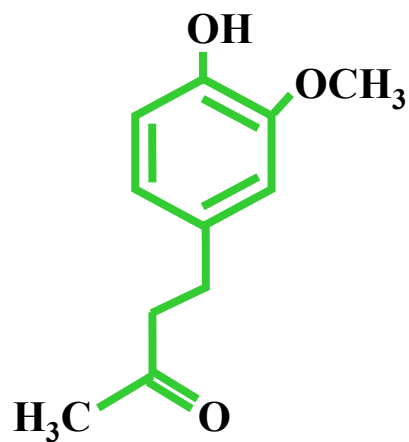
Guaiakol



Vanillin



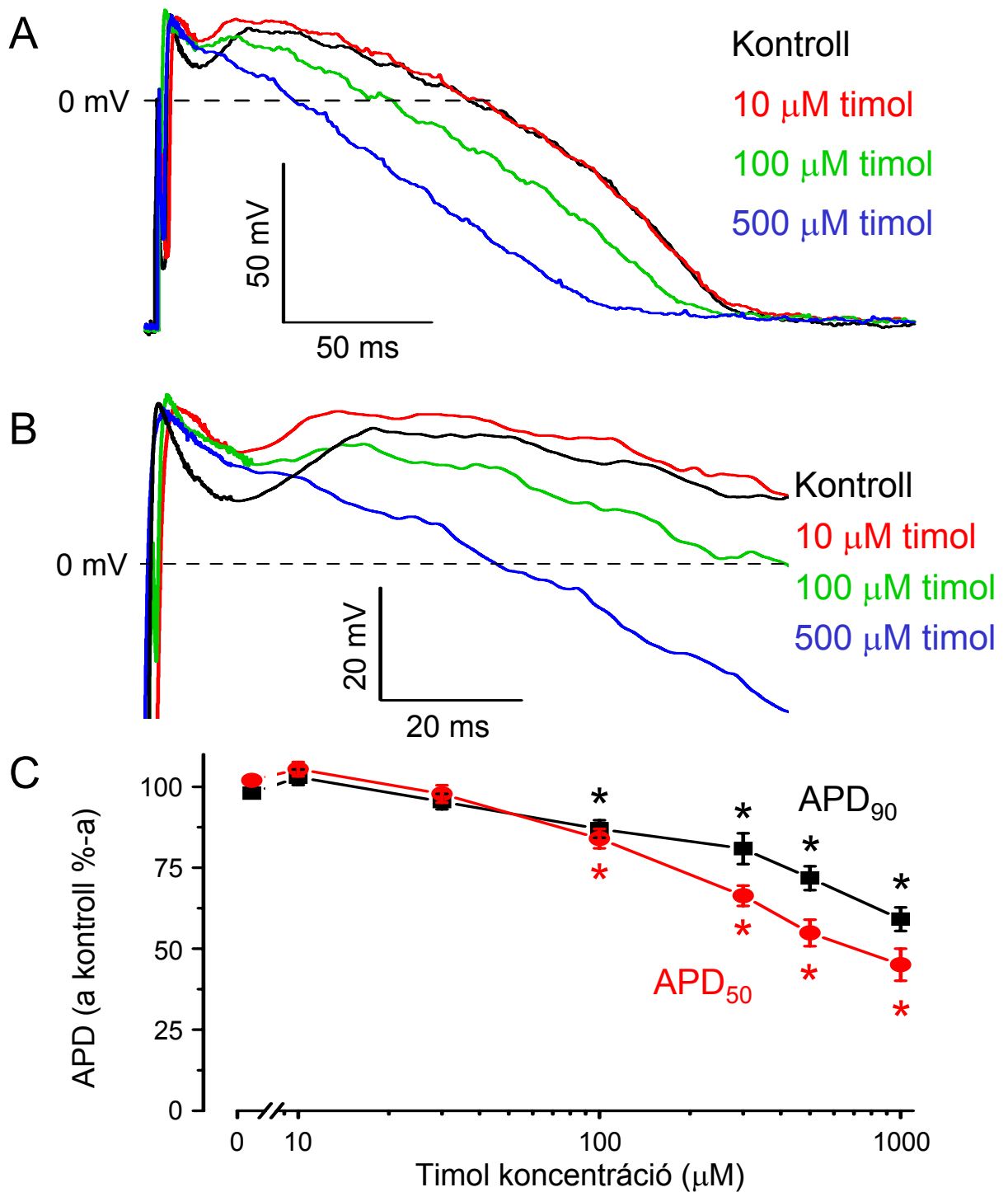
Eugenol



Zingeron

1. ábra

Az általunk vizsgált molekulák szerkezeti képlete



2. ábra

A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek akciós potenciáljára

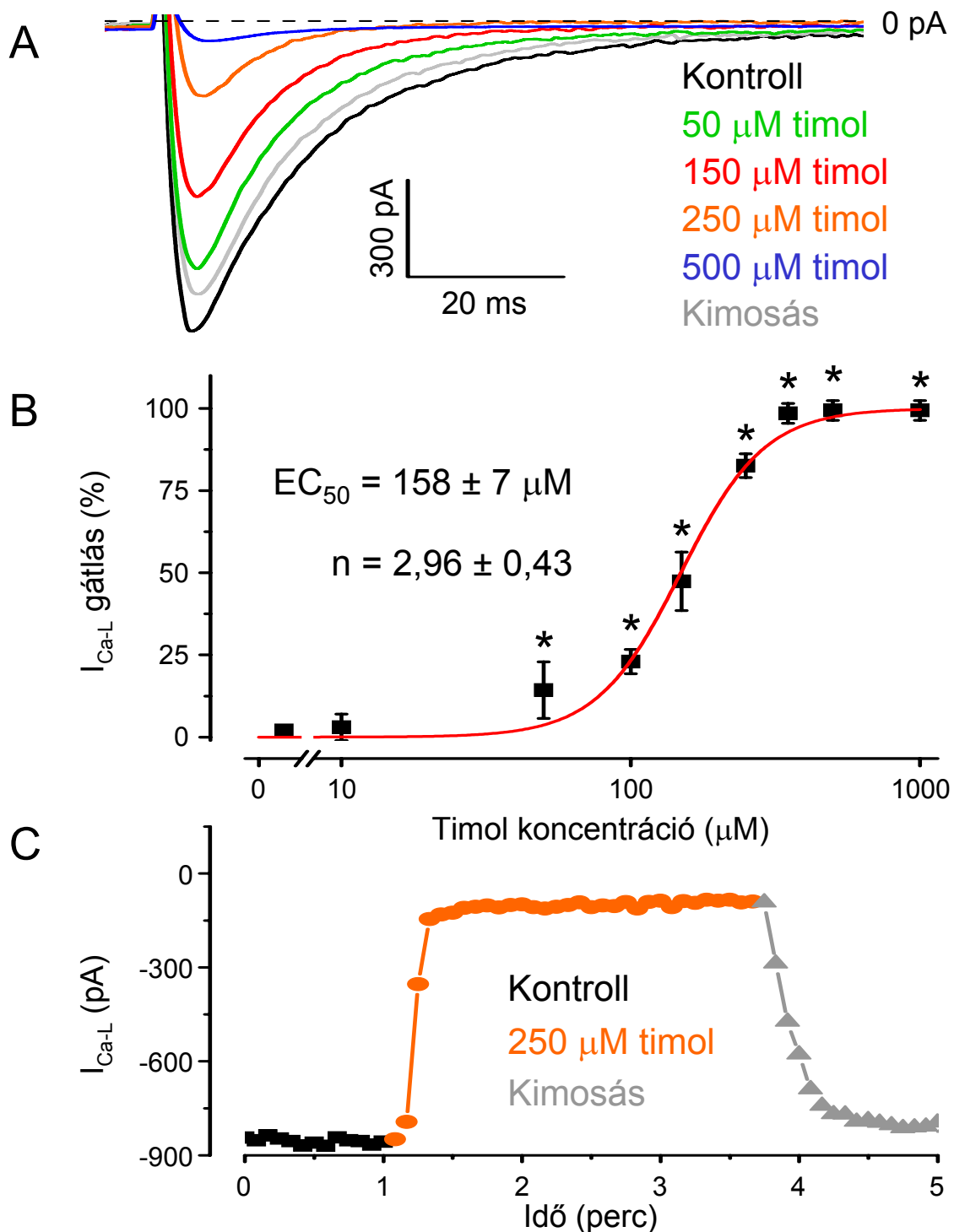
A: Az átlagot jól reprezentáló analóg akciós potenciálok kontroll körülmények között, illetve egymás után alkalmazott 10, 100 és 500 μ M koncentrációjú timol jelenlétében.

B: A korai gyors repolarizáció jobb megítélése érdekében az A részen látható akciós potenciálok első 100 ms-ának kinagyított részlete.

C: A timol hatása az akciós potenciál időtartamára

Az akciós potenciál időtartamát a repolarizáció 50, és 90%-ánál mértük (APD₅₀ és APD₉₀).

A timol egyre növekvő koncentrációit (10, 30, 100, 300, 500 és 1000 μ M) egymást követően, kimosás nélkül alkalmaztuk. n=6.



3. ábra

A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívműködési L-típusú kalcium áramára

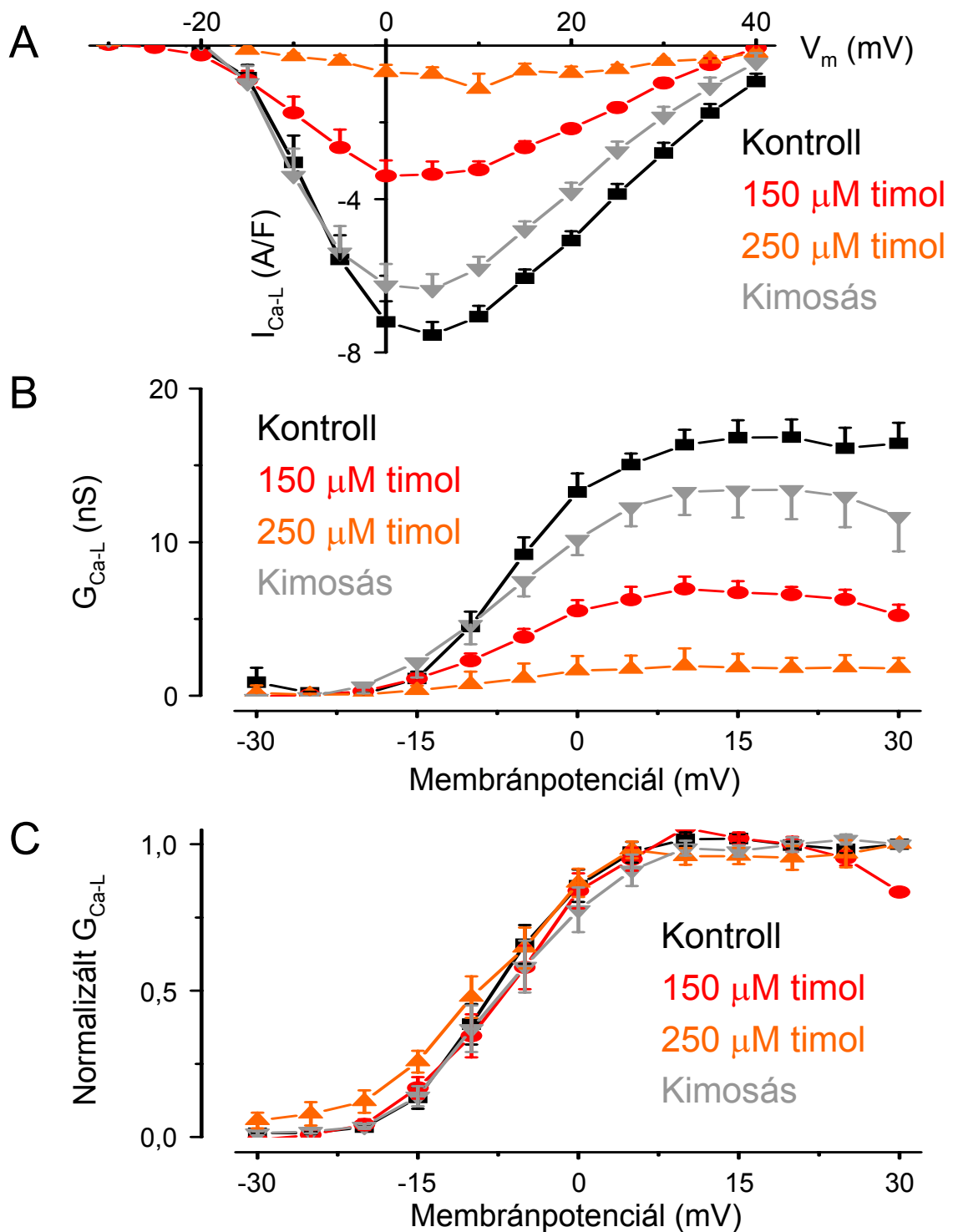
A: Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 50, 150, 250 és 500 μM koncentrációjú timol jelenlétében, majd a timol kimosása után.

B: A timol $I_{\text{Ca-L}}$ -ra vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje

Az egyes timolkoncentrációk által a +5 mV-on mért $I_{\text{Ca-L}}$ csúcsértékére kifejtett gátlást a teljes gátlás százalékában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük (folyamatos piros vonal). $n=4$.

C: A timol $I_{\text{Ca-L}}$ -ra kifejtett hatásának időfüggése

Az ábra a timol hatásának kifejlődését és annak lecsengését mutatja a kísérlet idejének függvényében egy, az átlagot jól reprezentáló sejt esetében.



4. ábra

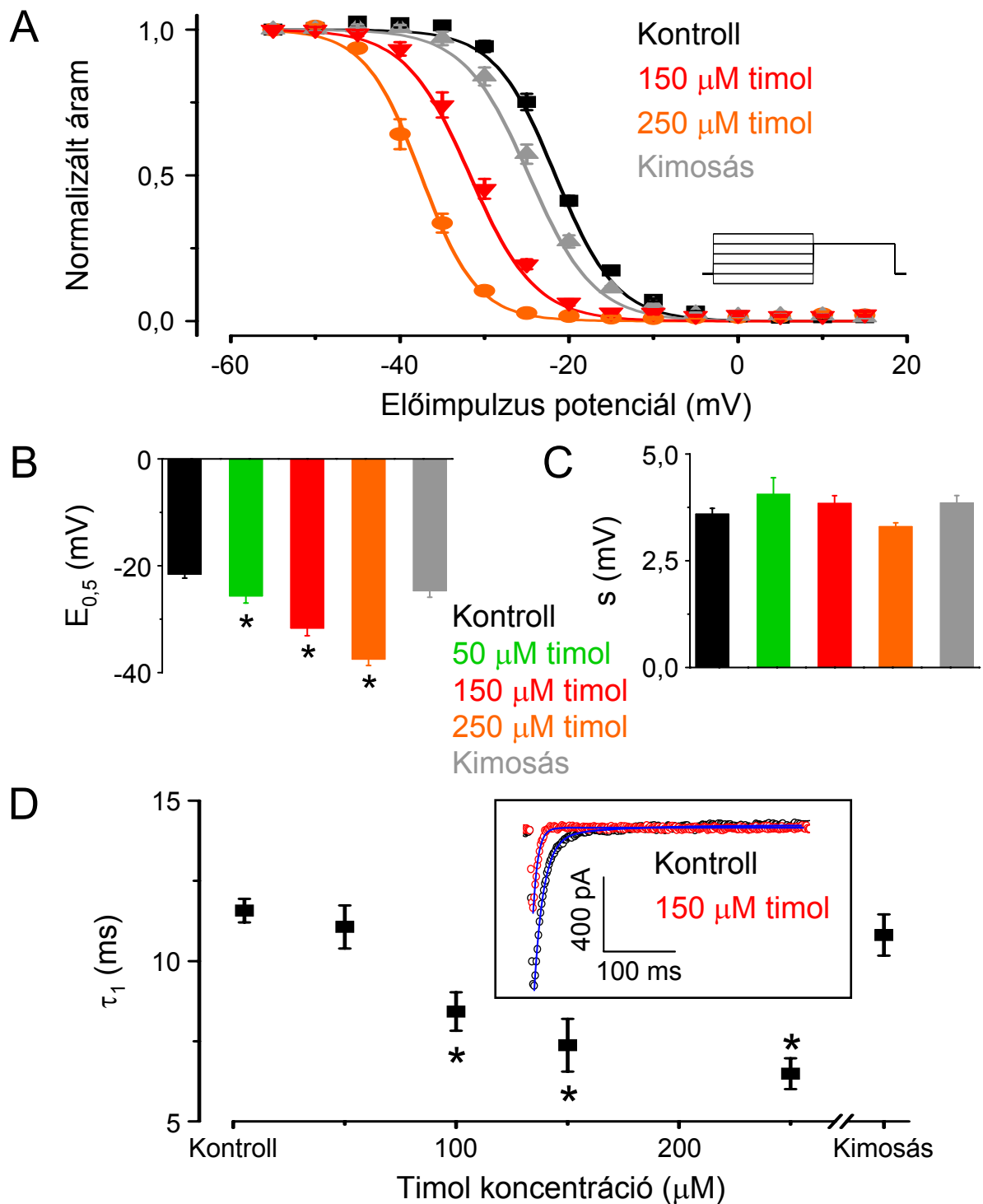
A timol hatása kutya bal kamrából származó szívműködő sejtek L-típusú kalcium áramának feszültségfüggésére

A: Az I_{Ca-L} csúcsértékének feszültségfüggése kontroll körülmények között, illetve egymást követően alkalmazott 150 és 250 μ M koncentrációjú timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. $n=7$.

B: Az I_{Ca-L} steady-state aktivációjának feszültségfüggése kontroll körülmények között, illetve egymást követően alkalmazott 150 és 250 μ M koncentrációjú timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. $n=7$.

C: A timol hatása a kalcium csatorna normalizált konduktanciájának feszültségfüggésére.

A B ábrán bemutatott pontokat az adott körülmények között +30 mV-nál mért értékekre, mint maximumra normalizáltuk és a membránpotenciál függvényében tüntettük fel. $n=7$.



5. ábra

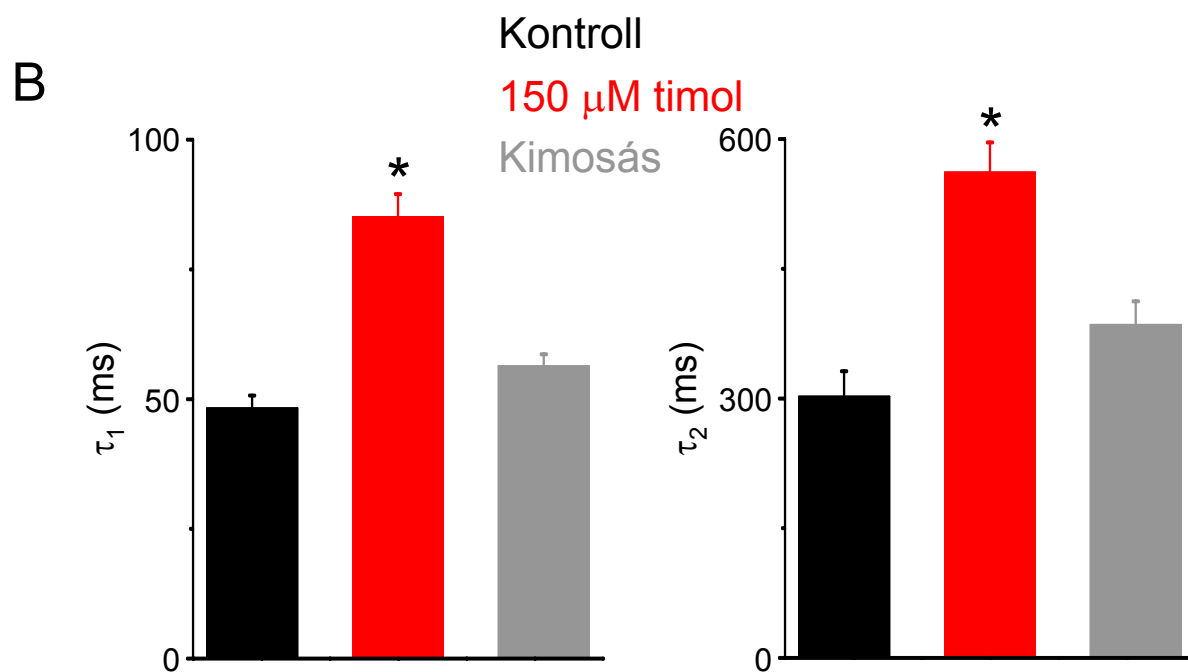
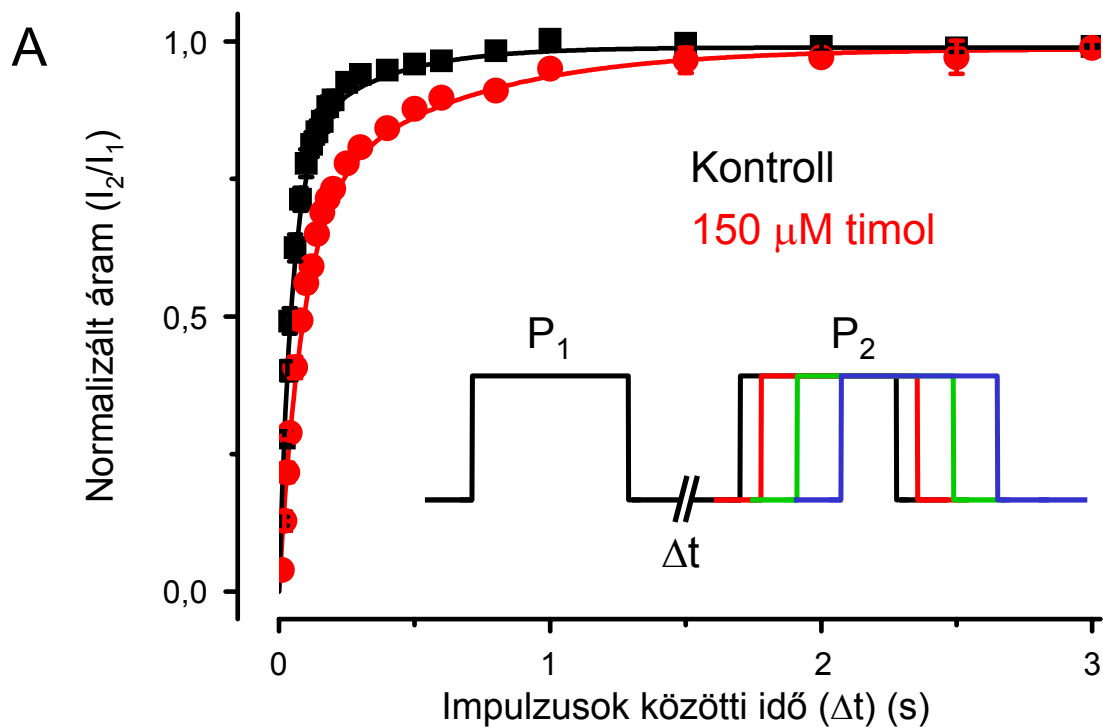
A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívműködő sejtek L-típusú kalcium áramának feszültség- és időfüggő inaktivációjára

A: Az $I_{\text{Ca-L}}$ kettős impulzusprotokollal meghatározott steady-state inaktivációjának feszültségfüggése kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 150 és 250 μM koncentrációjú timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. A kapott pontokat kétállapotú Boltzmann függvényt illesztettük (folyamatos vonal). $n=5$.

B: Az egyes mérések illesztései során kapott félértékfeszültségek átlaga ($E_{0,5}$). $n=5$.

C: Az egyes mérések illesztései során kapott meredekségek átlaga (s). $n=5$.

D: Az $I_{\text{Ca-L}}$ időfüggő inaktivációjának két exponenciális komponens összegével történő illesztése (ábrabetét) és a gyorsan inaktíváló komponens időállandója az alkalmazott timolkoncentráció függvényében. $n=7$.



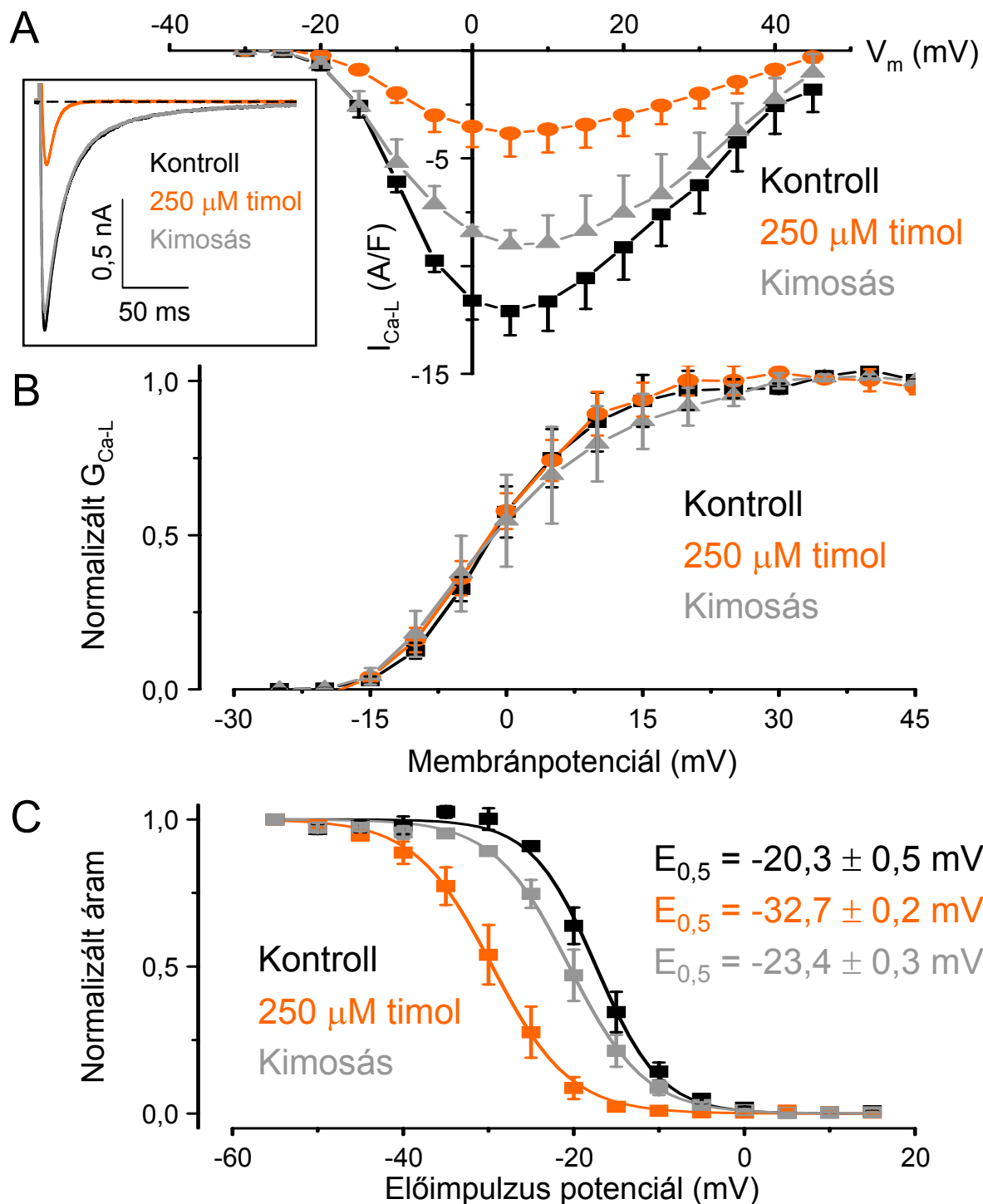
6. ábra

A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívműködési L-típusú kalcium áramának inaktivációból történő visszatérésére

A: Az $I_{\text{Ca-L}}$ kettős impulzusprotokollal meghatározott inaktivációból történő visszatérése kontroll körülmények között illetve 150 μM timol jelenlétében. A kapott pontokat biexponenciális függvénnyel illesztettük (folyamatos vonal). $n=5$.

B: Az egyes mérések illesztései során kapott időállandók átlaga.

Bal oldalon a gyors komponens időállandói (τ_1), jobb oldalon pedig a lassú komponens időállandói (τ_2) láthatóak. $n=5$.



7. ábra

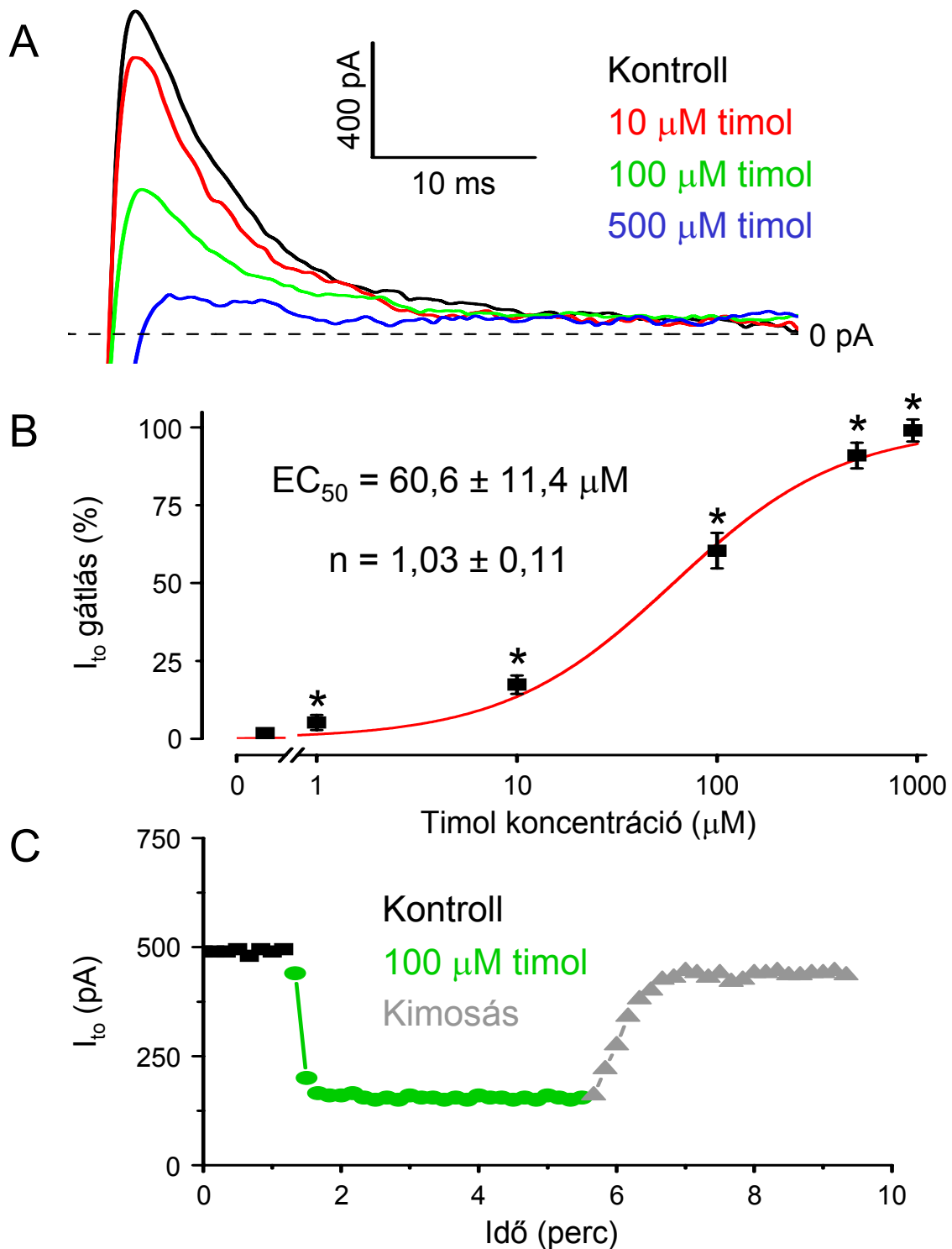
A timol hatása egészséges humán szívműködő sejtek L-típusú kalcium áramára

A: A timol hatása az I_{Ca-L} csúcsértékének feszültségfüggésére. $n=4$.

Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között és 250 μ M timol jelenlétében, majd a timol kimosása után (ábrabetét).

B: A timol hatása a kalciumcsatorna normalizált konduktanciájának feszültségfüggésére. Az A ábra pontjaiból számolt értékeket az adott görbe esetén a +30 mV-nál kapott értékekre, mint maximumra normalizáltuk és a membránpotenciál függvényében tüntettük fel. $n=4$.

C: Az I_{Ca-L} kettős impulzusprotokollal meghatározott steady-state inaktivációjának feszültségfüggése kontroll körülmények között, 250 μ M timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. A kapott pontokat kétállapotú Boltzmann függvénnyel illesztettük. $n=4$.



8. ábra

A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek tranziens kifelé irányuló kálium áramára

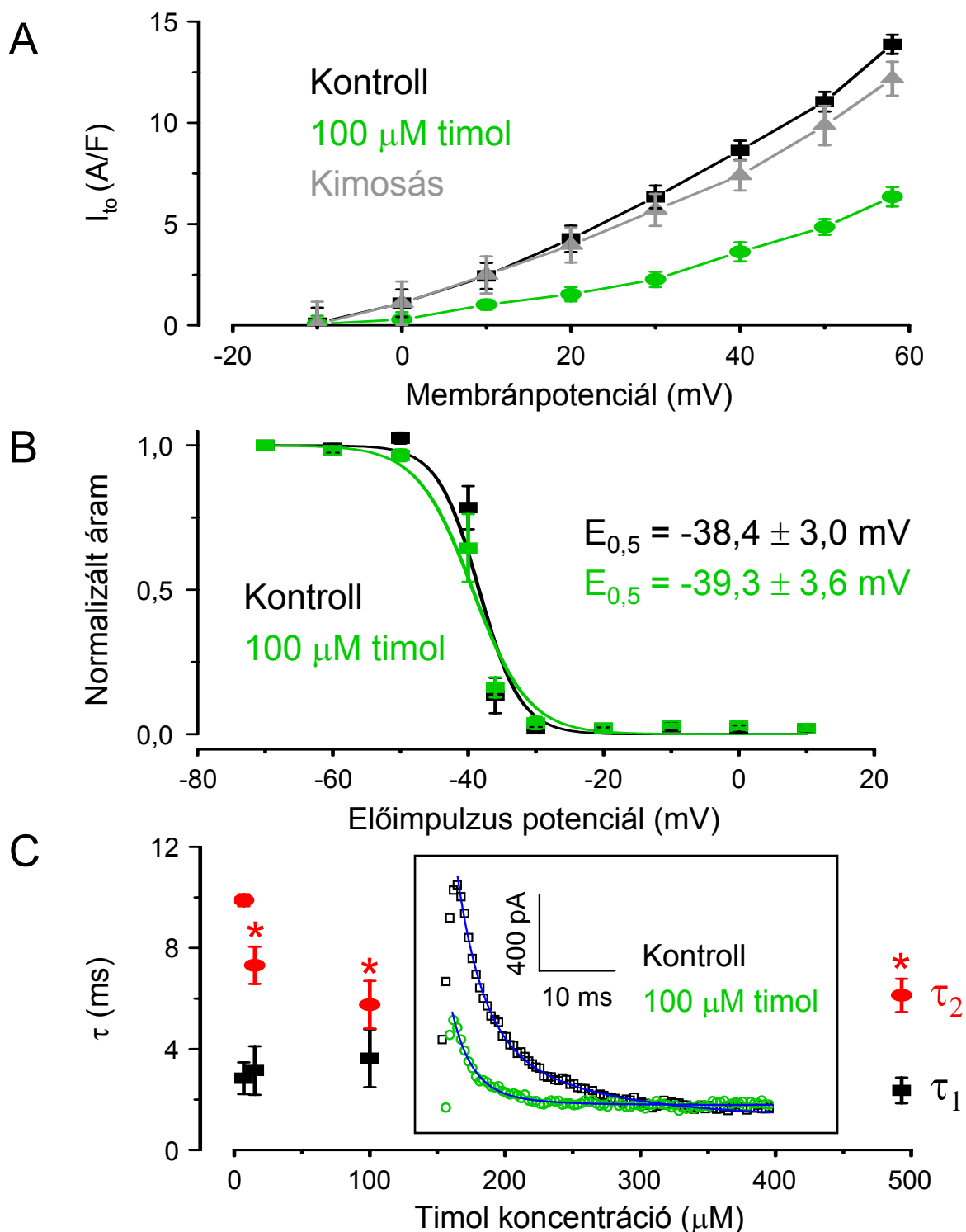
A: Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 10, 100 és 500 μM koncentrációjú timol jelenlétében.

B: A timol I_{to} -ra vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje.

Az egyes timolkoncentrációk által a +50 mV-on mért, I_{to} -ra kifejtett gátlást a teljes gátlás százalékában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. $n=4$.

C: A timol I_{to} -ra kifejtett hatásának időfüggése.

Az ábra a timol által kifejtett gátlásnak és a hatás lecsengésének időfüggését mutatja egy, az átlagot jól reprezentáló sejt esetében.



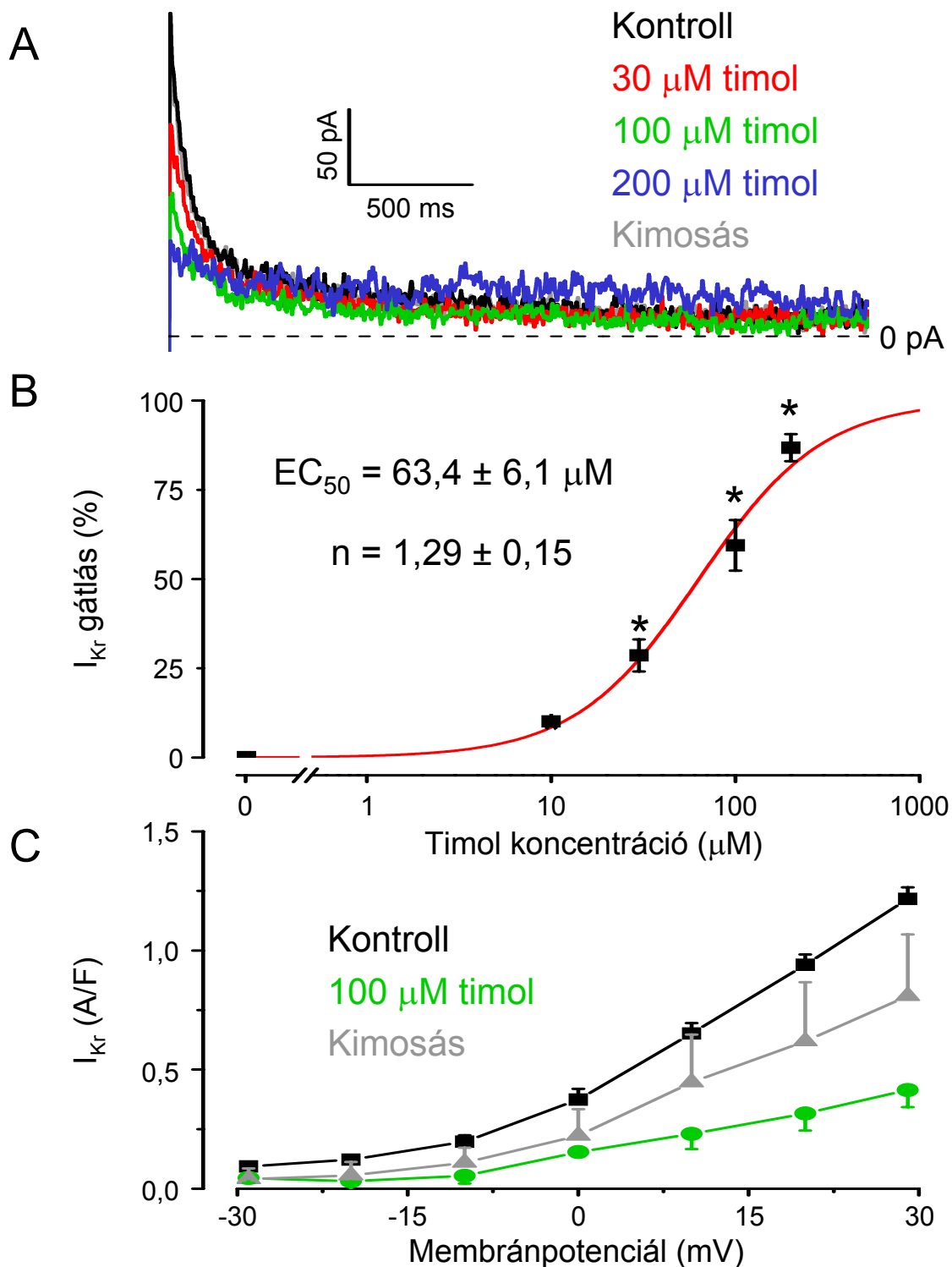
9. ábra

A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívműködő sejtek tranziens kifelé irányuló kálium áramának feszültségfüggésére, valamint feszültség- és időfüggő inaktivációjára

A: Az I_{to} csúcsértékének feszültségfüggése kontroll körülmények között, 100 μM timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. $n=8$.

B: Az I_{to} kettős impulzusprotokollal meghatározott steady-state inaktivációjának feszültségfüggése kontroll körülmények között és 100 μM timol jelenlétében. A kapott pontokat kétállapotú Boltzmann függvényrel illesztettük. $n=6$.

C: Az I_{to} időfüggő inaktivációjának két exponenciális komponens összegével történő illesztése (ábrabetét), az illesztésből meghatározott gyorsan inaktiválódó komponens időállandója (τ_1) és a lassan inaktiválódó komponens időállandója (τ_2) az alkalmazott timolkoncentráció függvényében. $n=8$.



10. ábra

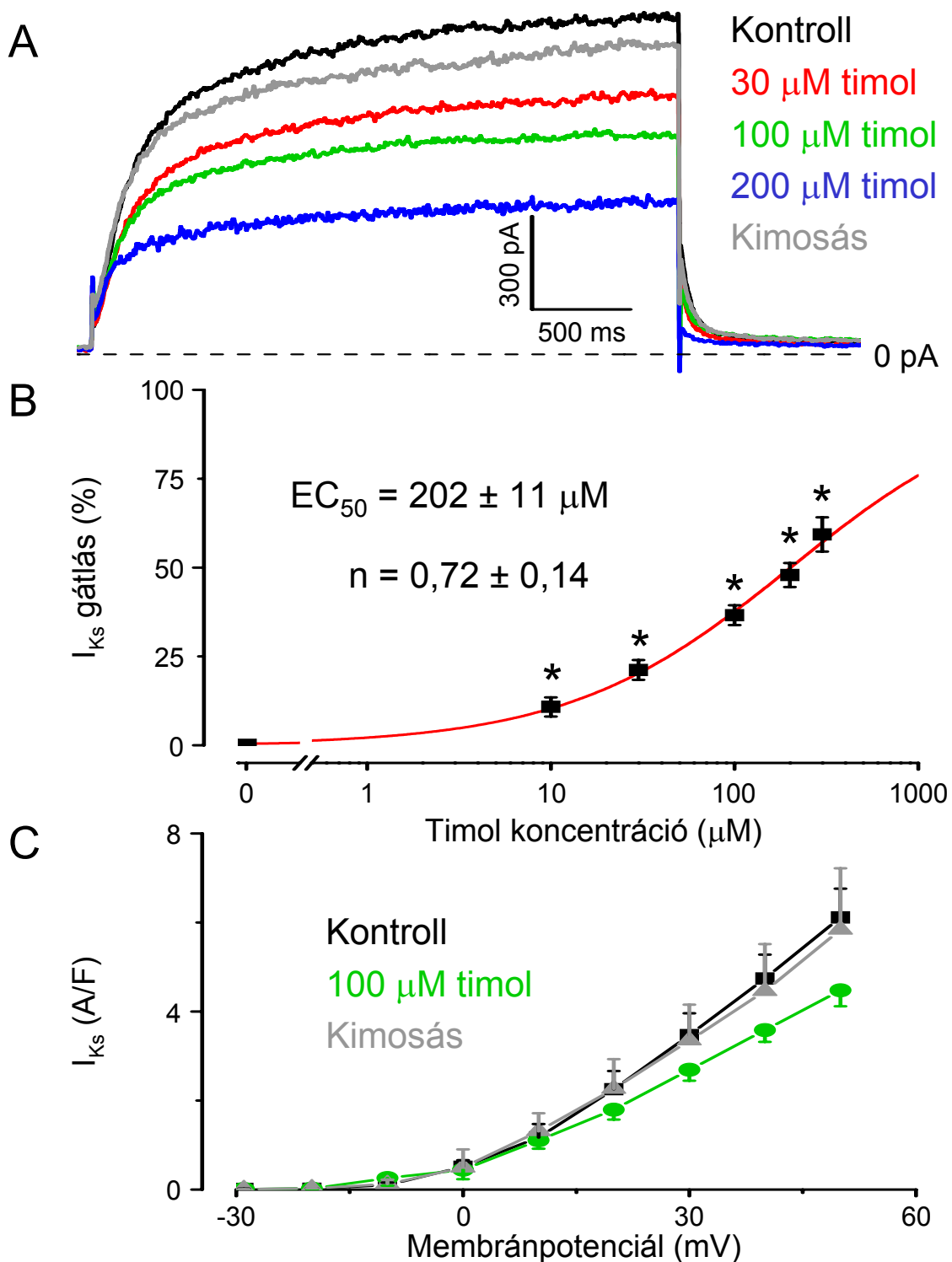
A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek késői egyenirányító kálium áramának gyors komponensére

A: Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 30, 100 és 200 μM koncentrációjú timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. Az I_{K_r} -nek a -40 mV-ról kiinduló 150 ms hosszú $+10$ mV-ra történő depolarizáló impulzus kikapcsolása után kapott ún. farokáramot tekintettük.

B: A timol I_{K_r} -re vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje.

Az egyes timolkoncentrációk által a farokáramokra kifejtett gátlást a teljes gátlás százalékában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. $n=4$.

C: Az farokáramok feszültségfüggése kontroll körülmények között és 100 μM timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. $n=5$.



11. ábra

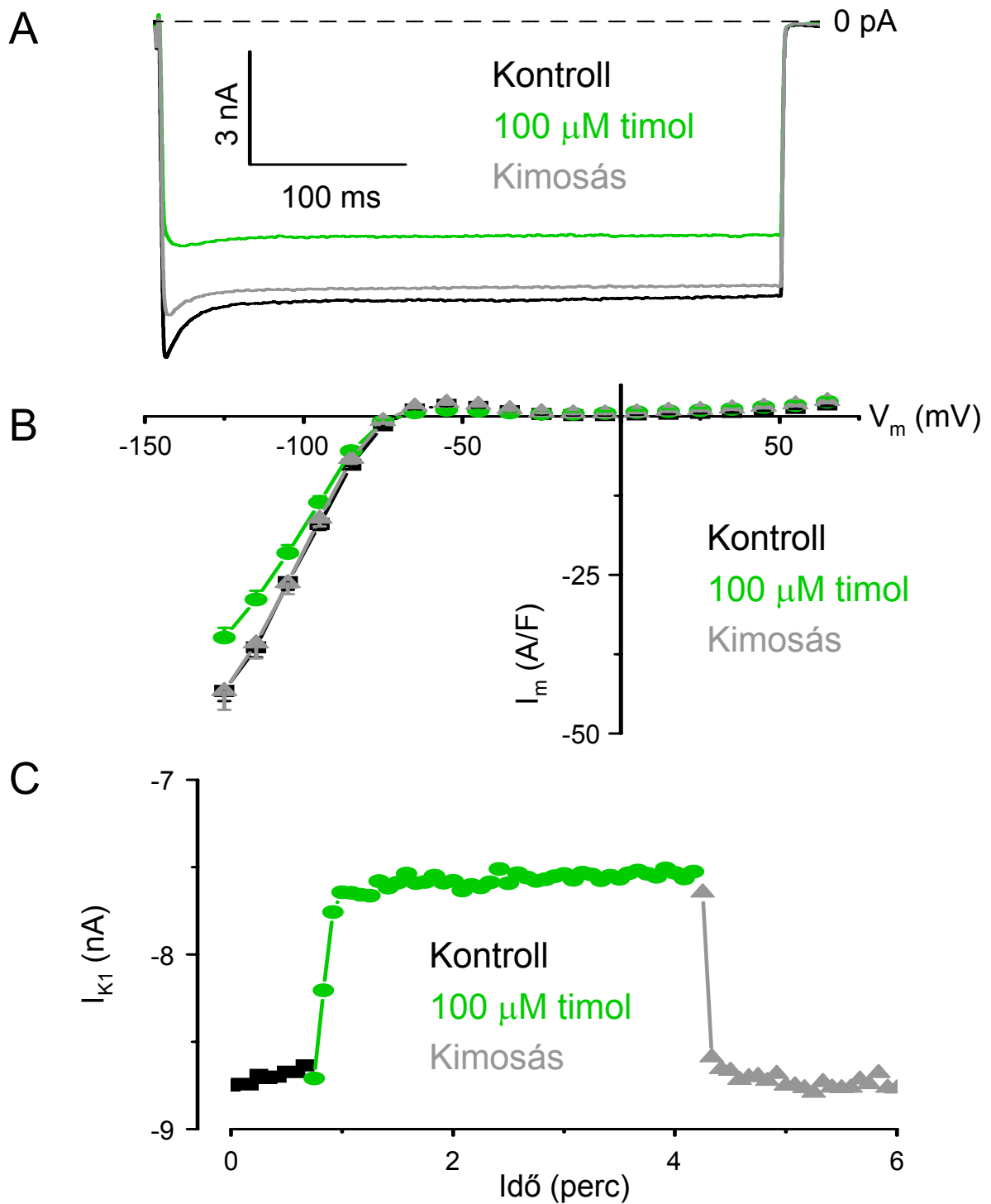
A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek késői egyenirányító kálium áramának lassú komponensére

A: Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 30, 100 és 200 μM koncentrációjú timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. Az áramok aktiválására -40 mV-ról kiinduló 3 s hosszú $+50$ mV-ra történő depolarizáló impulzust használtunk.

B: A timol I_{Ks} -re vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje.

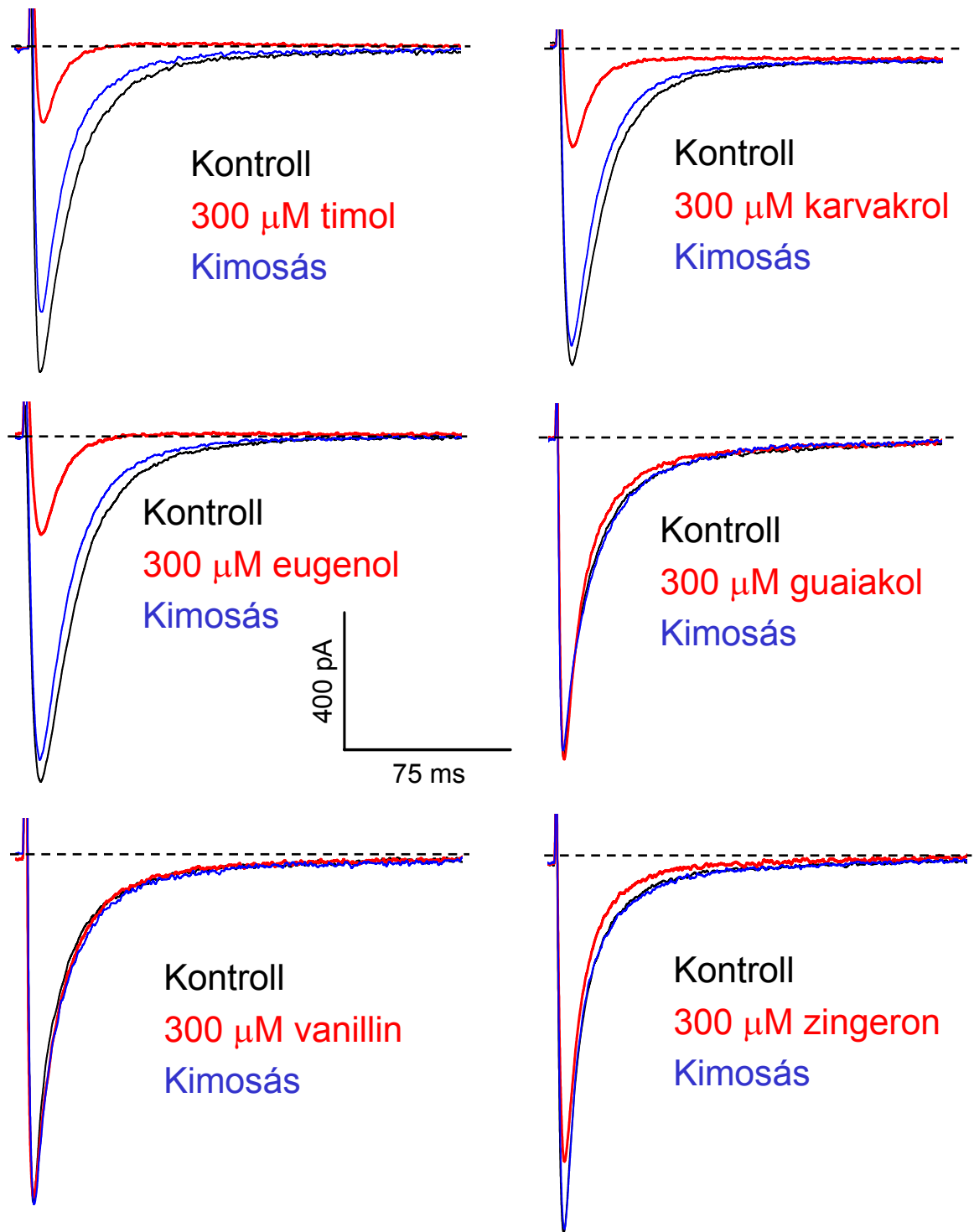
Az egyes timolkoncentrációk által a $+50$ mV-on mért, I_{Ks} -re kifejtett gátlást a teljes gátlás százalékában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. $n=5$.

C: Az I_{Ks} áram-feszültség összefüggése kontroll körülmények között, 100 μM timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. $n=5$.



12. ábra

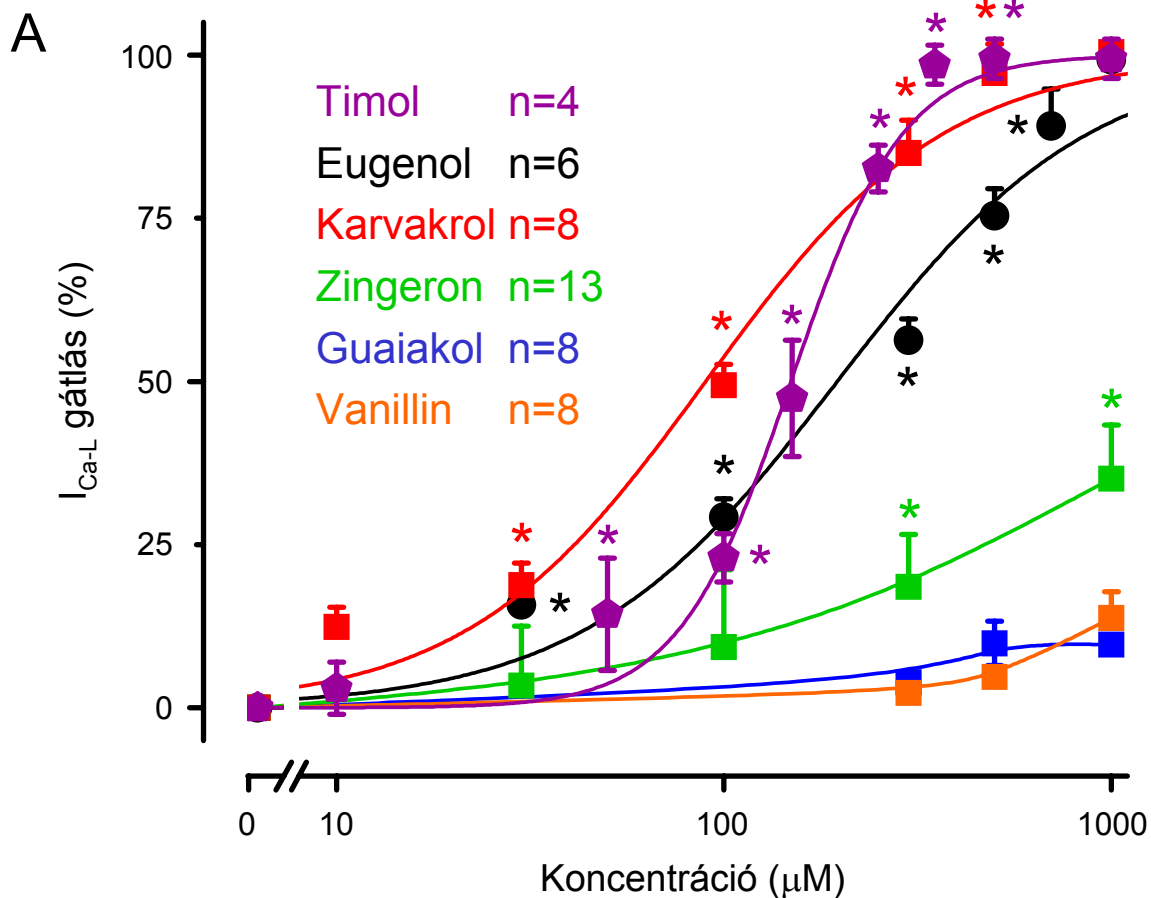
- A timol hatása kutya bal kamrájából származó szívműködési befelé egyenirányító kálium áramára
- A: Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között és 100 μ M timol jelenlétében.
- B: A 400 ms hosszú -125 mV-os hiperpolarizáló impulzusok végén mért áramok feszültségfüggése kontroll körülmények között, 100 μ M timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. $n=8$.
- C: A timol I_{K1} -re kifejtett hatásának időfüggése.
- Az ábra 100 μ M timol hatásának kifejlődését és annak lecsengését mutatja a kísérlet idejének függvényében egy, az átlagot jól reprezentáló sejt esetében. Az ábrázolt pontokat -125 mV-ra történő hiperpolarizáló pulzusok végén mértük.



13. ábra

A timol és analógjainak hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára

Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között, 300 μM timol, illetve az általunk vizsgált egyes timol analógok jelenlétében, majd azok kimosása után. Az áramokat minden esetben -40 mV-ról kiinduló, 400 ms hosszú $+5$ mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk.



B

	Timol	Eugenol	Karvakrol
Félgátló koncentráció (μM)	158 ± 7	187 ± 15	98 ± 11
Hill koefficiens	$2,96 \pm 0,43$	$1,6 \pm 0,1$	$1,42 \pm 0,05$

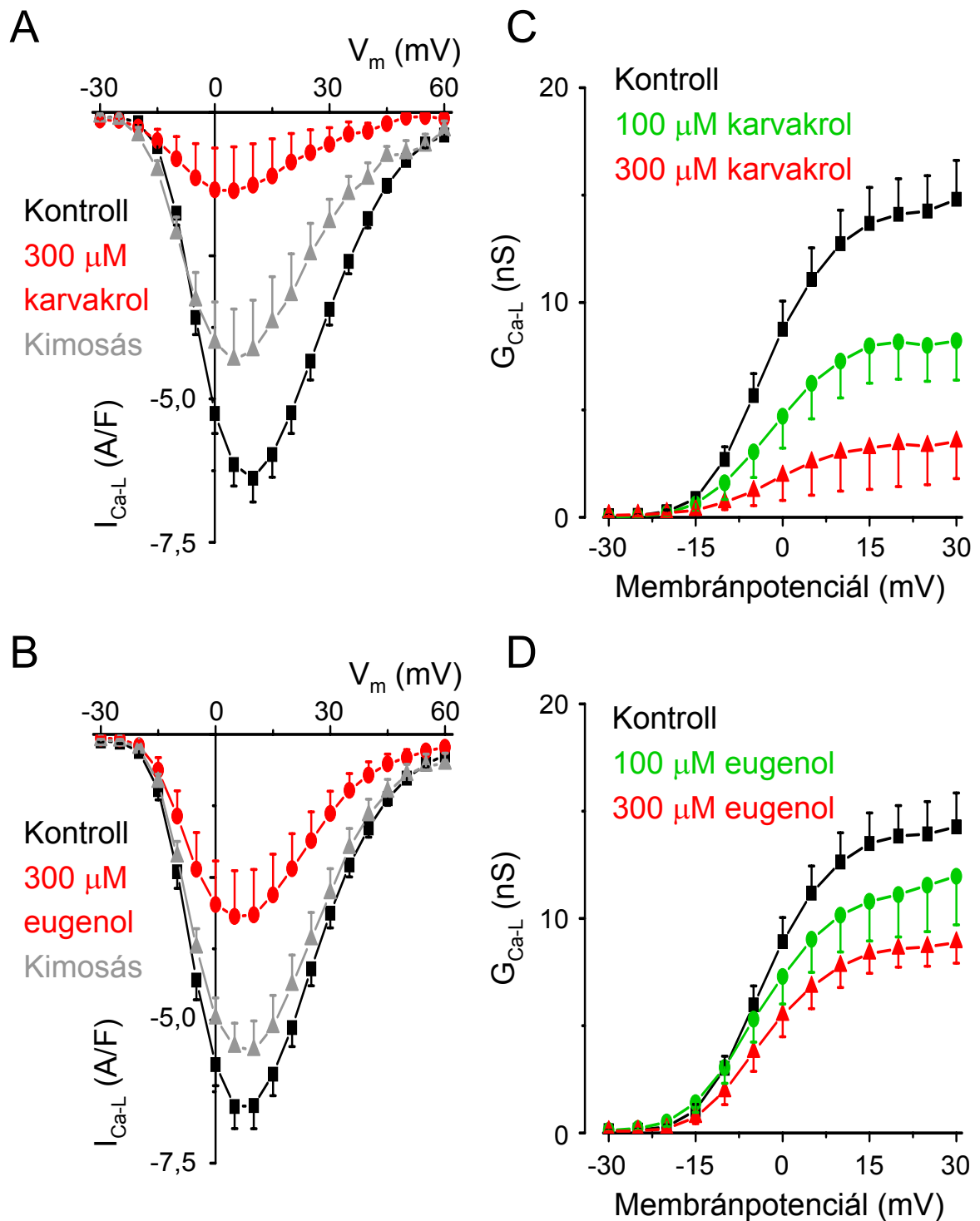
14. ábra

A timol és analógjainak hatása kutya bal kamrájából származó szívműködés L-típusú kalcium áramára

A: A timol és az egyes analógok I_{Ca-L} -ra vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéi.

Az adott analógok egyre növekvő koncentrációit egymást követően, kimosás nélkül alkalmaztuk. Az egyes szerkoncentrációk (timol, eugenol és karvakrol) által a +5 mV-on mért I_{Ca-L} csúcsértékére kifejtett gátlást a teljes gátlás százalékában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük.

B: A timol, az eugenol és a karvakrol kumulatív dózis-hatás görbéiből meghatározott paraméterek.

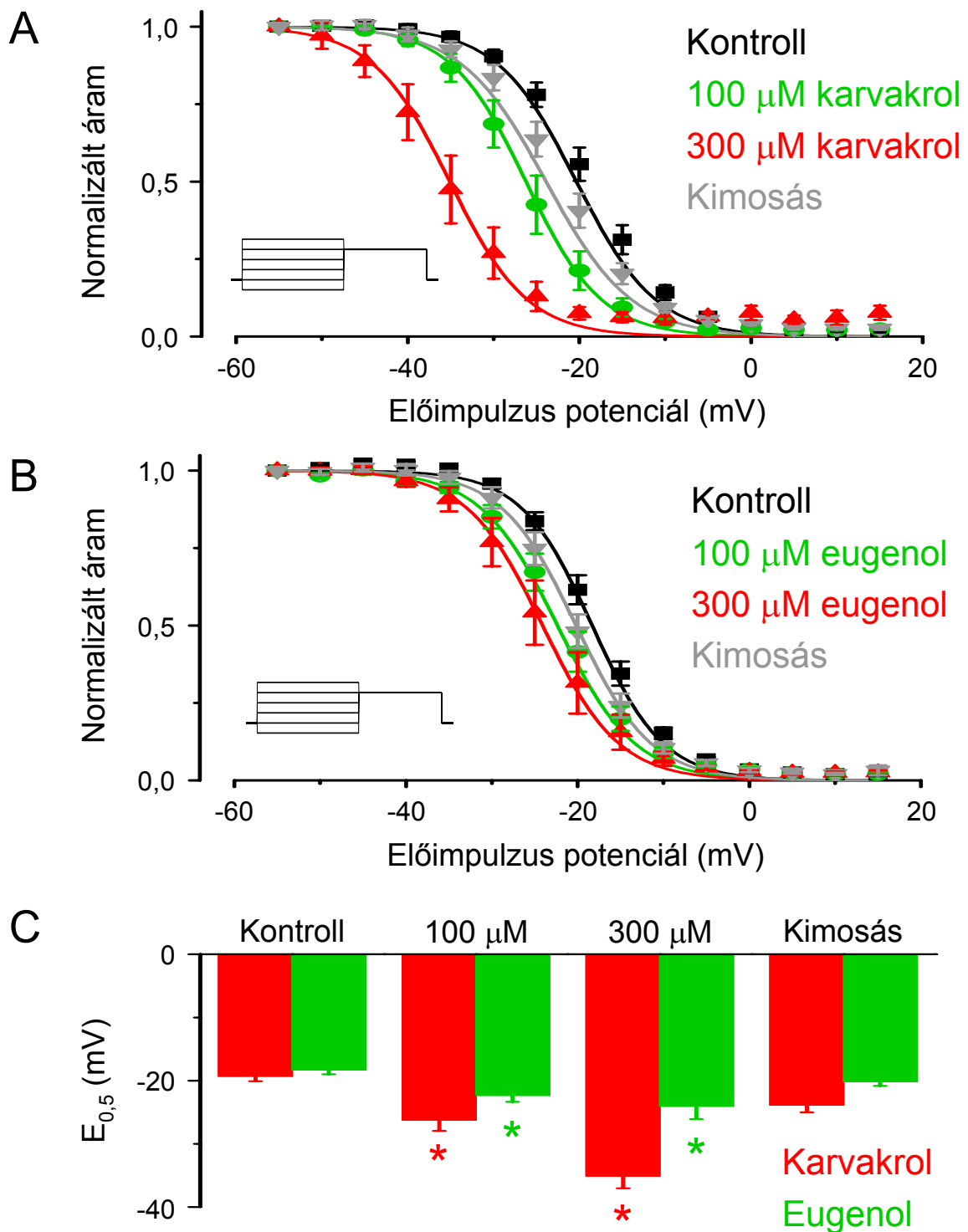


15. ábra

A karvakrol és az eugenol hatása kutya bal kamrájából származó szívműködő sejtek L-típusú kalcium áramának feszültségfüggésére

Az I_{Ca-L} csúcsértékének feszültségfüggése kontroll körülmények között, 300 μ M karvakrol (A) illetve 300 μ M eugenol (B) jelenlétében, majd az analógok kimosása után. $n=7$ a karvakrol és $n=6$ az eugenol esetén.

A timol analógok hatása az I_{Ca-L} steady-state aktivációjának feszültségfüggésére kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 150 és 300 μ M koncentrációjú karvakrol (C) vagy eugenol (D) jelenlétében. $n=7$ a karvakrol és $n=6$ az eugenol esetén.

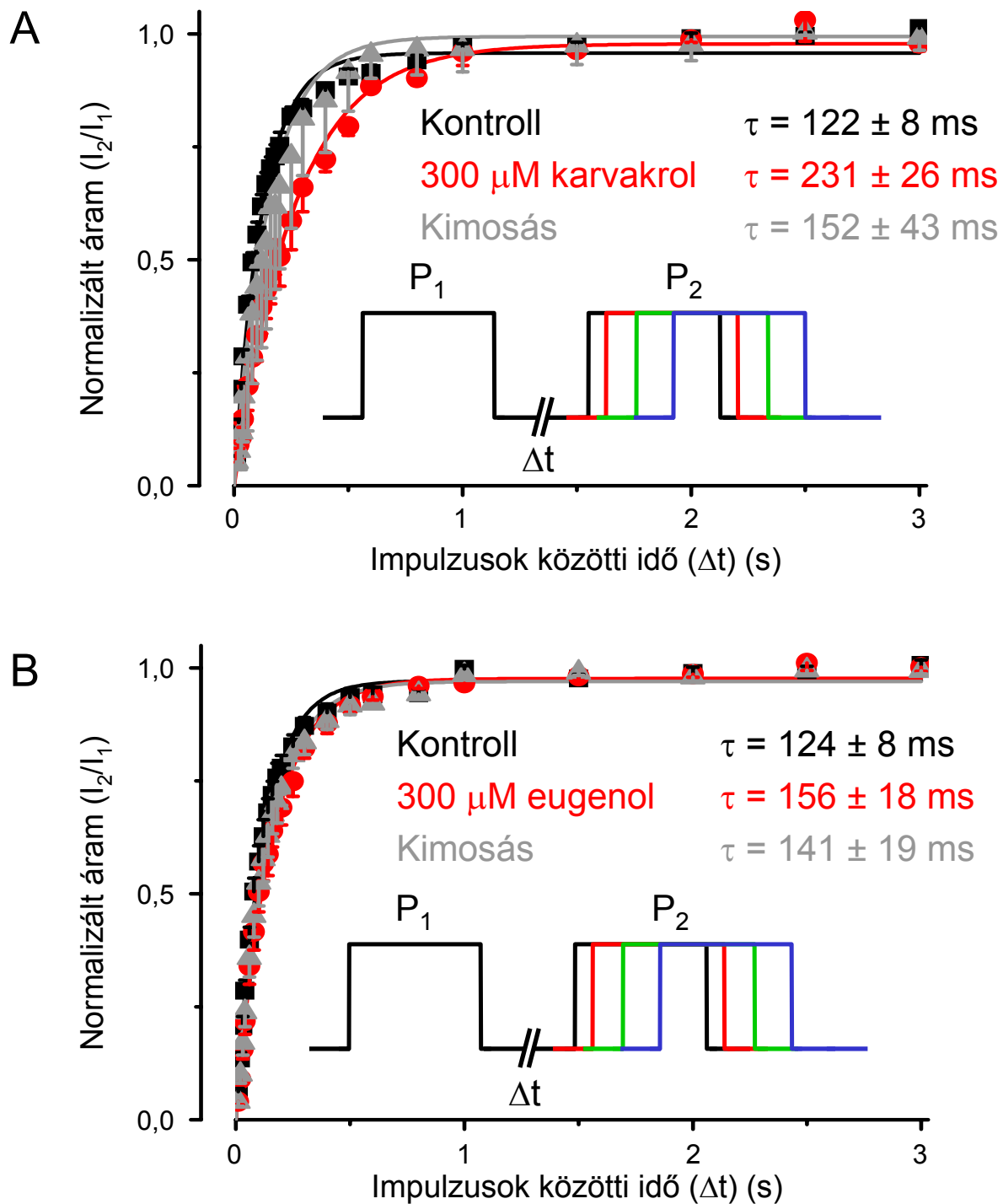


16. ábra

A karvakrol és az eugenol hatása kutya bal kamrájából származó szívműködő sejtek L-típusú kalcium áramának steady-state inaktivációjának feszültségfüggésére

Az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését kettős impulzusprotokollal határoztuk meg kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 100 és 300 μ M koncentrációjú karvakrol (A) vagy eugenol (B) jelenlétében, majd a szerek kimosása után. A kapott pontokat kétállapotú Boltzmann függvénnyel illesztettük. $n=4$ a karvakrol és $n=5$ az eugenol esetén.

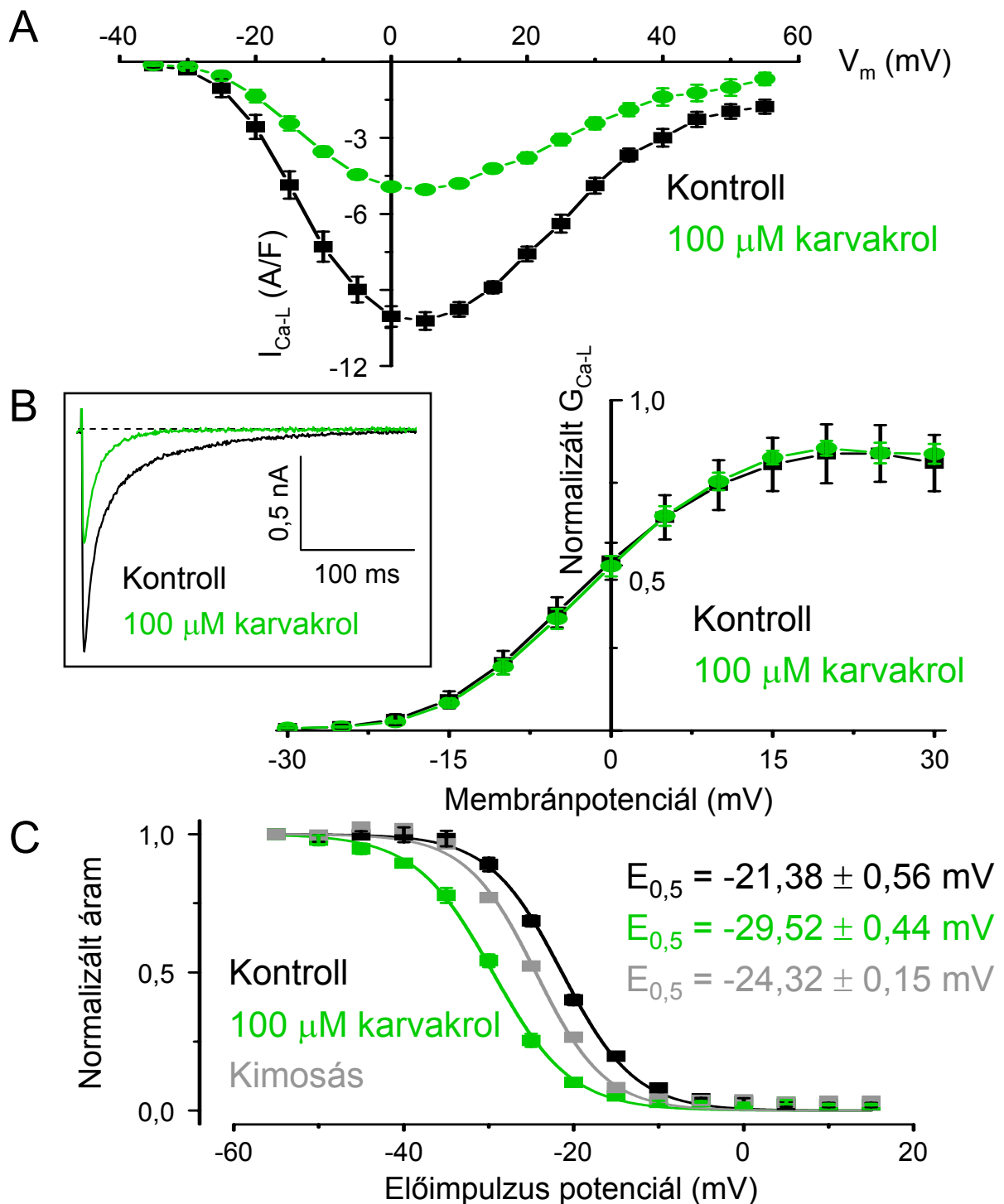
C: Az egyes mérések illesztései során kapott félértékfeszültségek átlaga ($E_{0.5}$). $n=4$ a karvakrol és $n=5$ az eugenol esetén.



17. ábra

A karvakrol és az eugenol hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek L-típusú kalcium áramának inaktivációból történő visszatérésére

Az I_{Ca-L} kettős impulzusprotokollal meghatározott inaktivációból történő visszatérése kontroll körülmények között illetve 300 μ M karvakrol (A) vagy eugenol (B) jelenlétében, majd a szerek kimosása után. A kapott pontokat monoexponenciális függvénnyel illesztettük (folyamatos vonal). $n=6$ a karvakrol és $n=5$ az eugenol esetén.



18. ábra

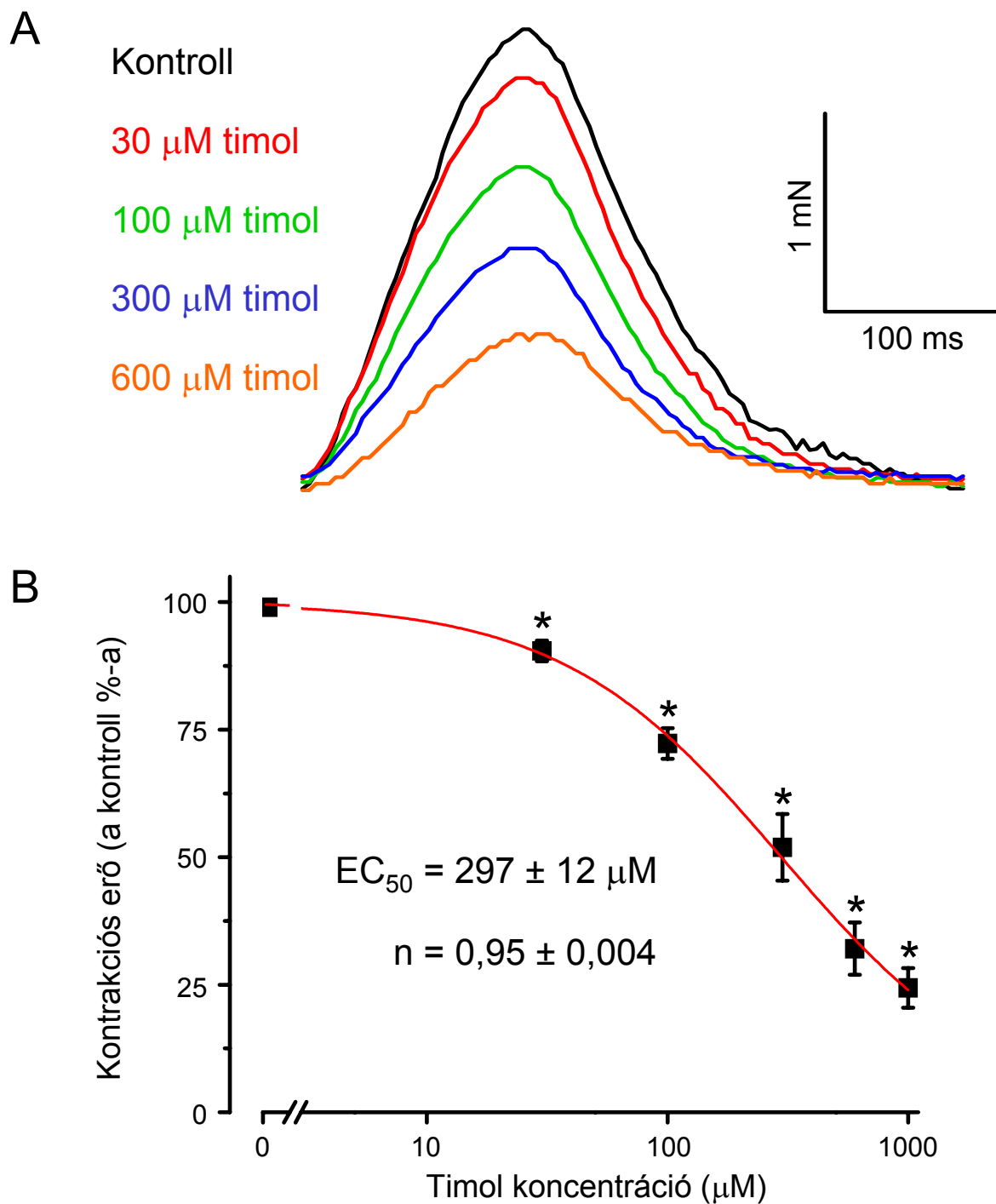
A karvakrol hatása egészséges humán szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára

A: 100 μ M karvakrol hatása az I_{Ca-L} csúcserőértékének feszültségfüggésére. $n=3$.

B: A karvakrol hatása a kalcium csatorna normalizált konduktanciájának feszültségfüggésére. Az A ábra pontjaiból számolt értékeket az adott görbe esetén a +30 mV-nál kapott értékekre, mint maximumra normalizáltuk és a membránpotenciál függvényében tüntettük fel. $n=3$.

Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között és 100 μ M karvakrol jelenlétében (ábrabetét).

C: Az I_{Ca-L} kettős impulzusprotokollal meghatározott steady-state inaktivációjának feszültségfüggése kontroll körülmények között, 100 μ M karvakrol jelenlétében, majd annak kimosása után. A kapott pontokat kétállapotú Boltzmann függvényvel illesztettük. $n=3$.

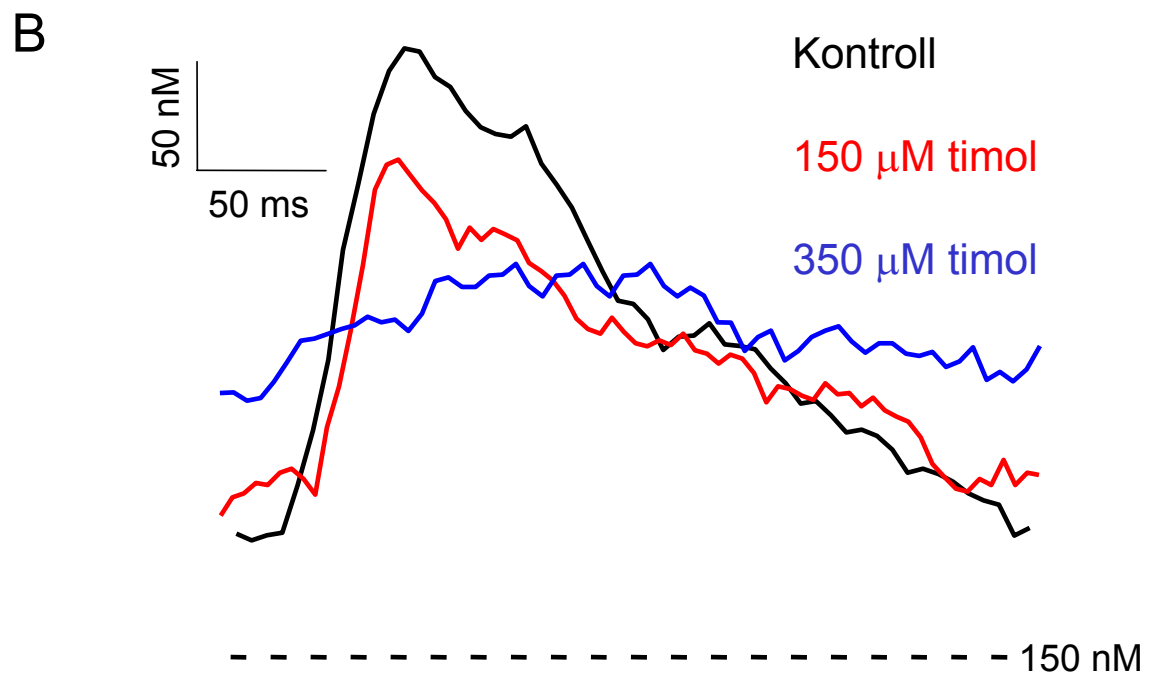
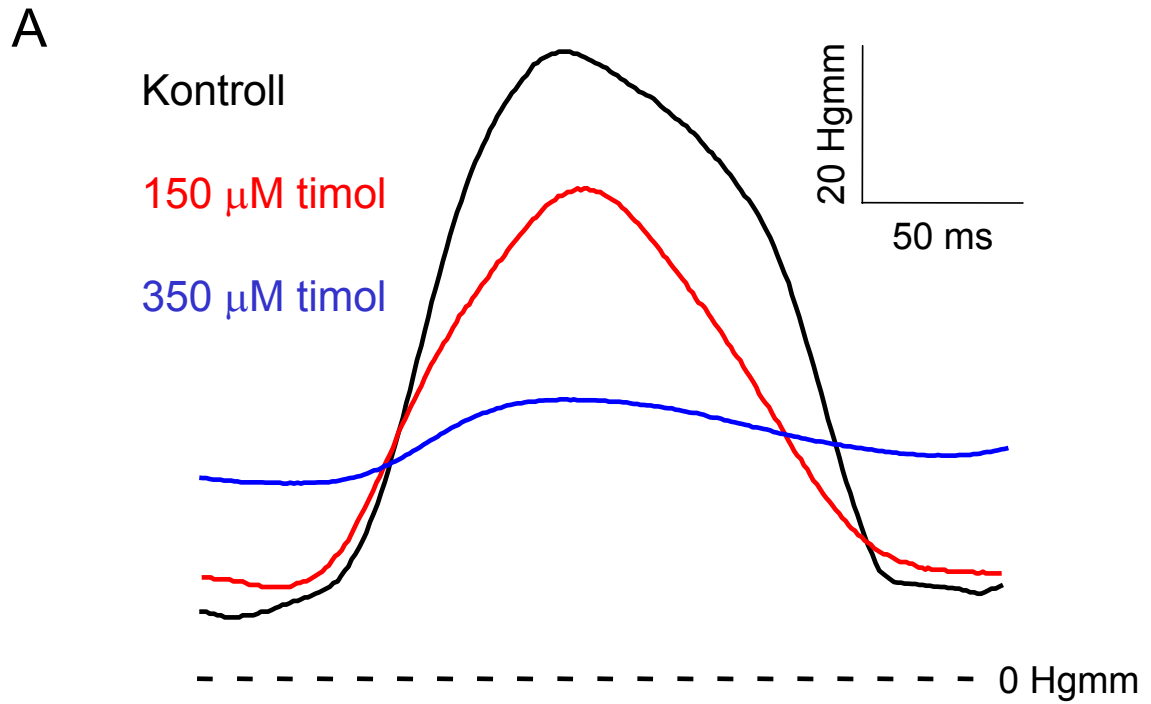


19. ábra

A: Kutyaszív jobb kamrai trabekulákon mért analóg kontrakciós görbék

B: A timol kontrakciós erőre vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje.

A kontroll mérések után a timol egyre növekvő koncentrációit 10-10 percen keresztül alkalmaztuk. Az egyes timolkoncentrációk jelenlétében mért kontrakciós erőt a kontroll körülmények között mért értékekre normalizáltuk és annak százalékában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. n=5.

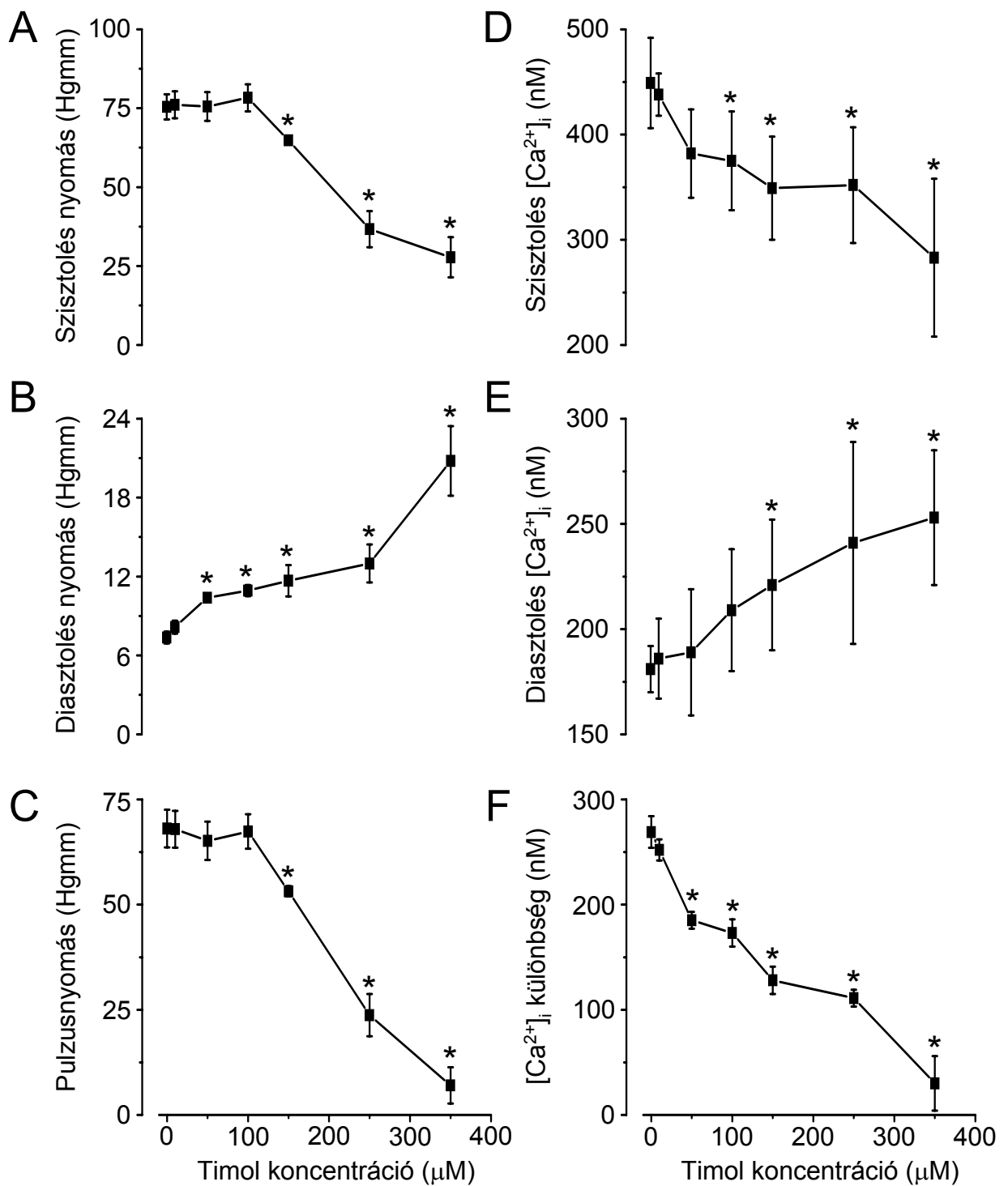


20. ábra

A: Langendorff szerint perfundált tengerimalac szív átlagot jól reprezentáló analóg bal kamrai nyomásgörbéi kontroll körülmények között illetve 150 és 350 μM timol jelenlétében.

B: Ugyanezen preparátum intracelluláris kalciumtranziensei.

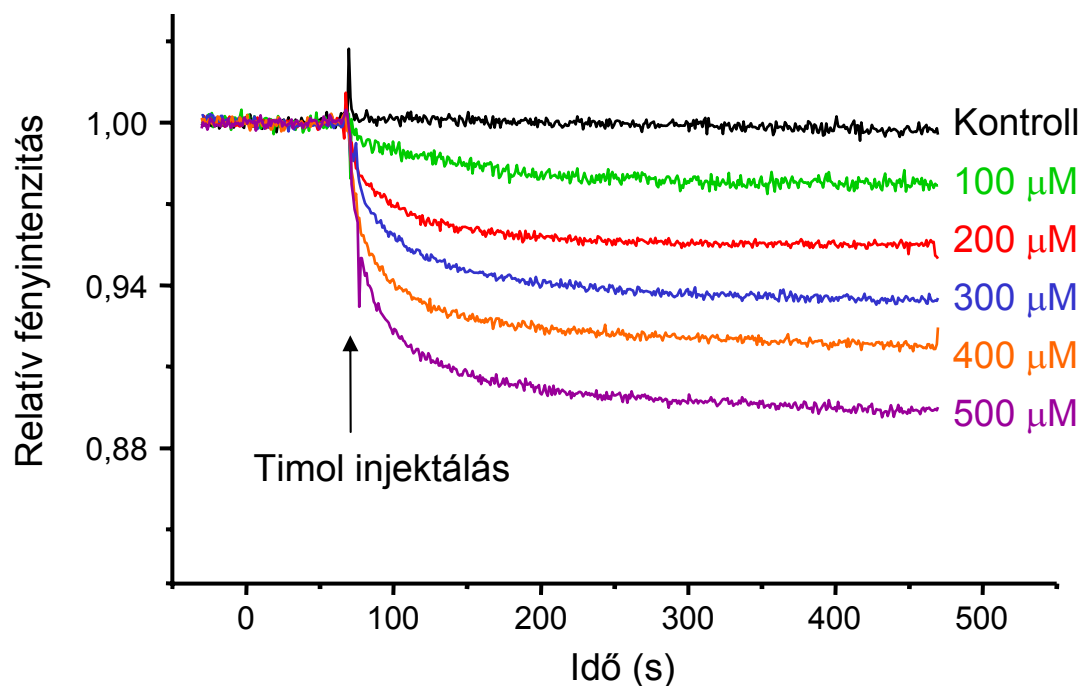
A vízszintes szaggatott vonalak a 0 Hgmm-es nyomást és a 150 nM-os $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t jelzik. A szívek ingerlése 200/perces frekvenciával történt.



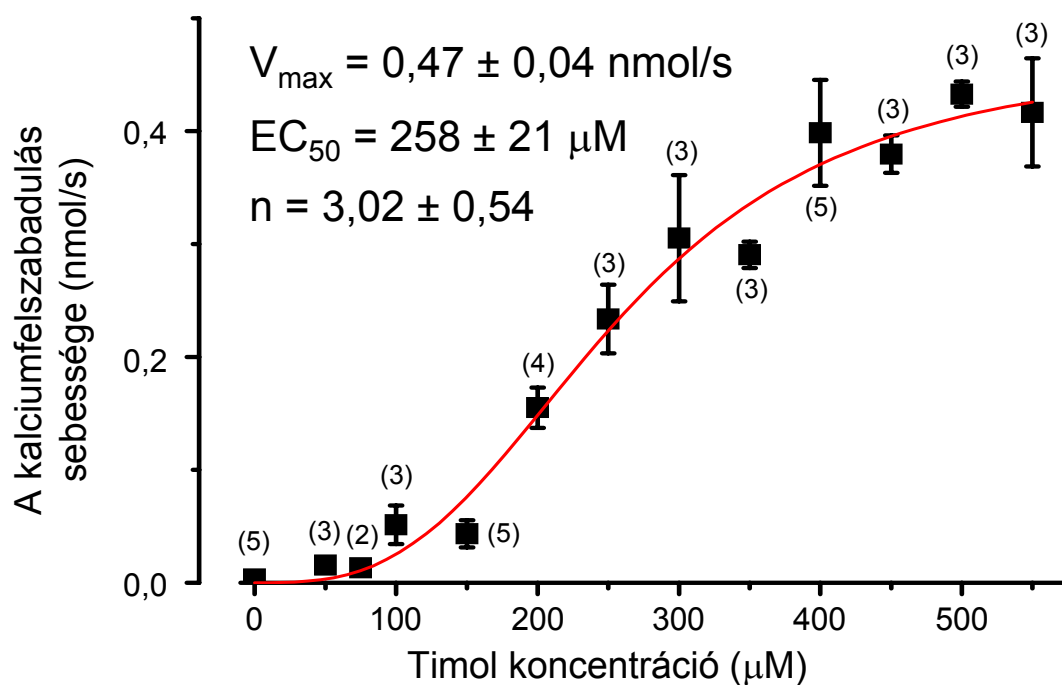
21. ábra

Növekvő koncentrációban alkalmazott timol hatása Langendorff szerint perfundált tengerimalac szív bal kamrai nyomásgörbéire (A-C) és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranzienseire (D-F). A timolt 10 és 350 μM -os koncentrációtartományban, 10-10 percen keresztül alkalmaztuk. A pulzusnyomás értékei (C) a szisztolés és a diasztolés nyomások különbségeinek felelnek meg, az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ különbség (F) pedig szintén a szisztolés és a diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékek különbsége. $n=5$.

A



B



22. ábra

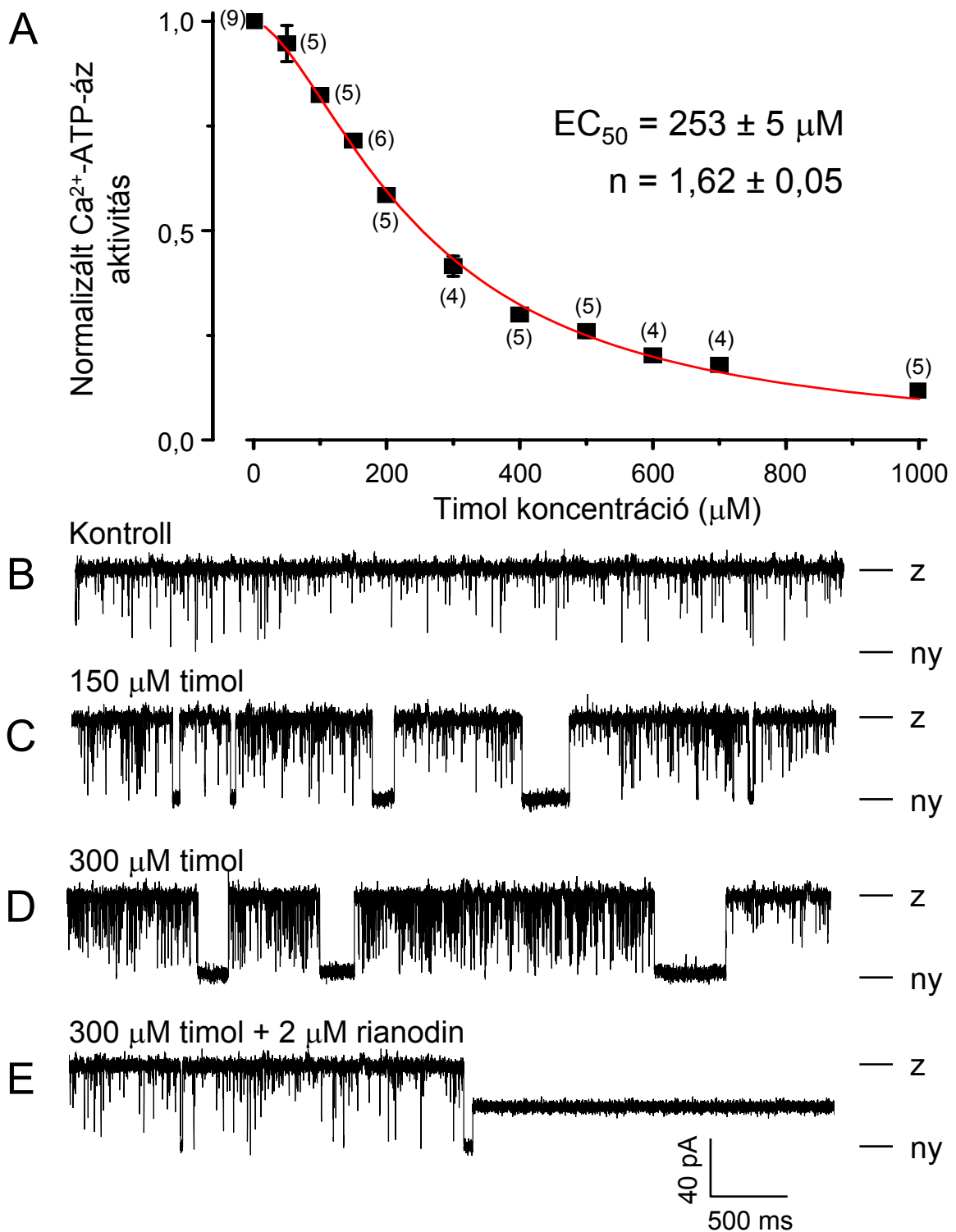
Kutyaszív nehéz SR vezikulákból történő timol indukált kalciumfelszabadulás

A: Timol hatására bekövetkező fényintenzitás változások.

A timol (100-500 μM) hozzáadását nyíl jelöli.

B: A timol hatására létrejövő fényintenzitás-változás meredekségéből számolt kalcium felszabadulási sebesség.

A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. A mért pontok melletti, zárójelbe tett számok az adott koncentráció jelenlétében végzett mérések számát jelölik. A $V_{\max}$ a kalciumfelszabadulás maximális sebessége, melyet az illesztésből határoztunk meg.

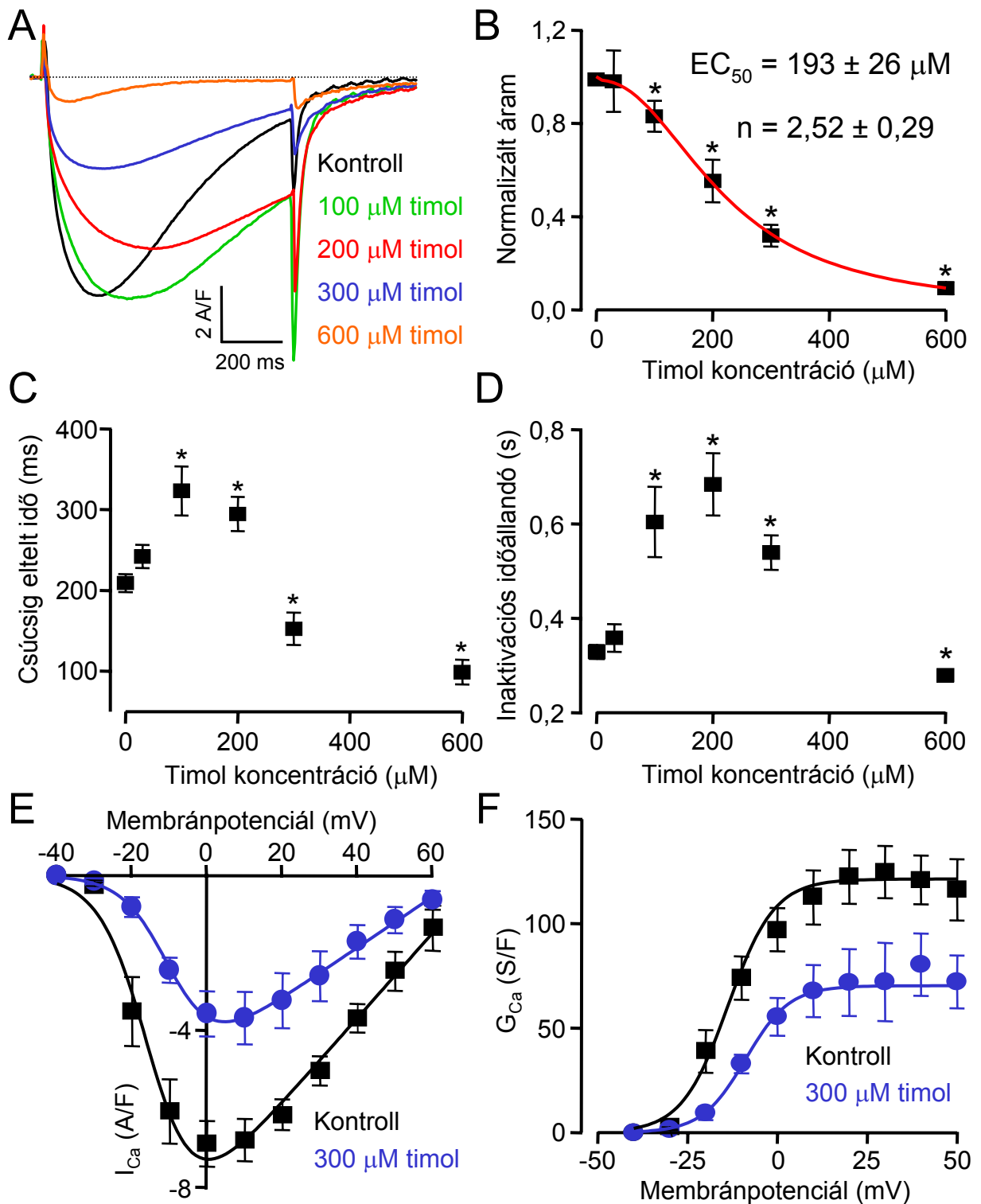


23. ábra

A timol nehéz SR vezikulák Ca^{2+} -ATP-áz aktivitására vonatkozó dózis-hatás görbéje

A: Az ATP hidrolízist mértékét a 340 nm-en mért abszorpció változásából számítottuk ki. A mért adatokat a kalcium nélkül mért alap ATP-áz aktivitásra korrigáltuk és a timol hozzáadása előtt, kontroll körülmények között mért értékre normalizáltuk. A mért pontok melletti zárójelbe tett számok az adott koncentráció jelenlétében végzett mérések számát jelölik. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük.

B-E: Lipidkettősrétegbe beépített kutya izolált RyR csatornákon mért reprezentatív áramgörbék. A csatorna nyitott és zárt állapotát a jobb oldalon leöltük, a nyílások lefelé irányuló kitéréseknek felelnek meg. Az áramokat -80 mV -on, a cisz és a transz oldalon egyaránt $50 \mu\text{M}$ szabad Ca^{2+} tartalmú 250 mM -os KCl oldatban mértük. A timolt a cisz oldal felől 5 percen keresztül alkalmaztuk. A $2 \mu\text{M}$ -os rianodint $300 \mu\text{M}$ timol jelenlétében szintén a cisz oldal felől adagoltuk.



24. ábra

A timol hatása patkány vázizomrostok L-típusú kalcium áramára

A: Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 100, 200, 300 és 600 μM koncentrációjú timol jelenlétében.

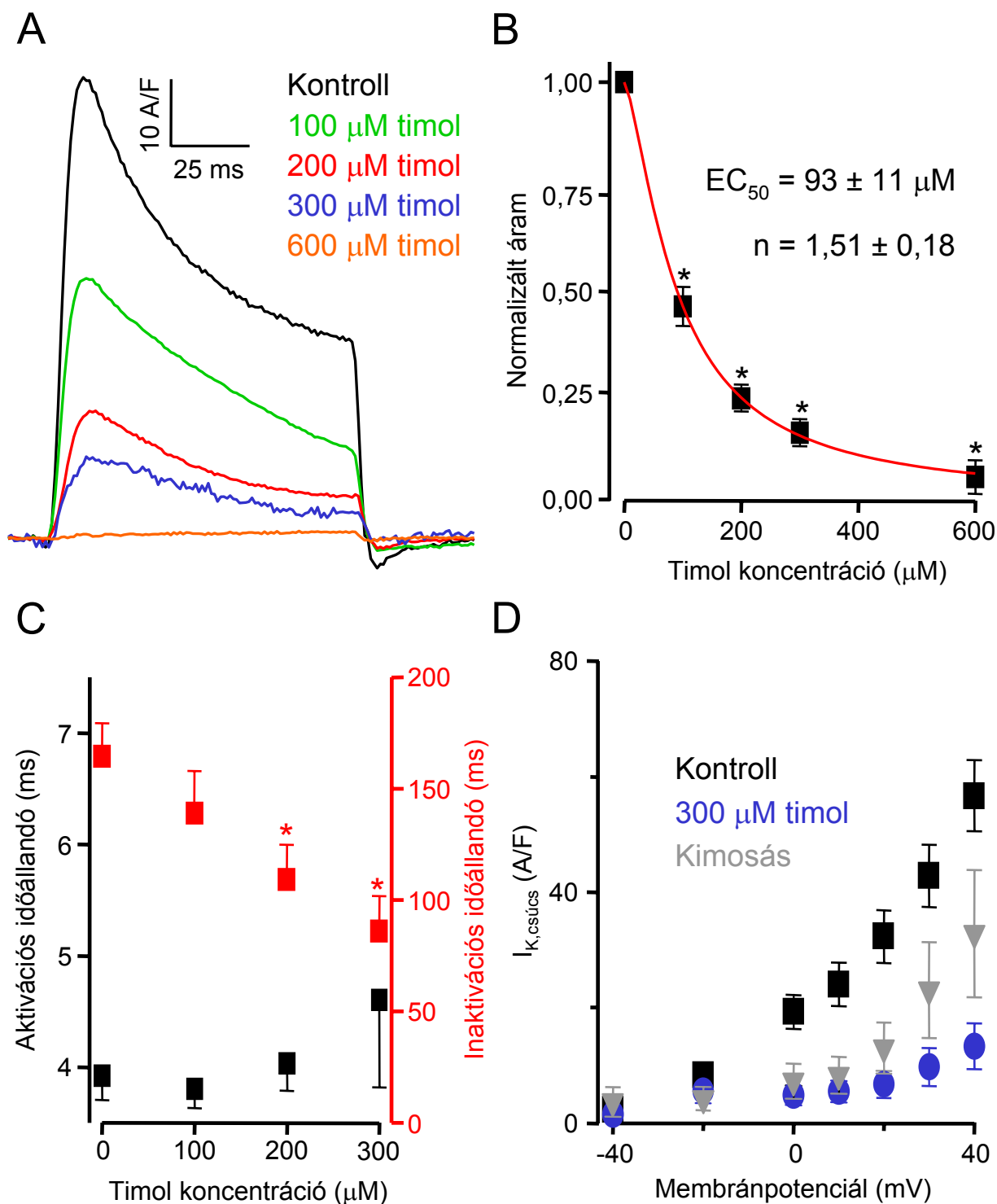
B: A timol I_{Ca} -ra vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje.

Az I_{Ca} kontrollra normalizált csúcsértékeinek átlaga az alkalmazott timolkoncentráció függvényében. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. $n=8$.

C,D: A timol koncentrációfüggő hatása a csúcsig eltelt időre (C) és az inaktivációs időállandóra (D).

E: Az I_{Ca} csúcsértékének feszültségfüggése kontroll körülmények között és 300 μM timol jelenlétében. Az illesztést a módszerekben leírt 1. egyenlettel végeztük. $n=8$.

F: Az I_{Ca} steady-state aktivációjának feszültségfüggése kontroll körülmények között és 300 μM timol jelenlétében. Az illesztést a módszerekben ismertetett 2. egyenlettel végeztük. $n=8$.



25. ábra

A timol hatása patkány vázizomrostok kálium áramára

A: Az átlagot jól reprezentáló analóg áramgörbék kontroll körülmények között illetve egymást követően alkalmazott 100, 200, 300 és 600 μM koncentrációjú timol jelenlétében.

B: A timol kálium áramra vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje.

Az I_K kontrollra normalizált csúcsértékeinek átlaga az alkalmazott timolkoncentráció függvényében. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. n=8.

C: A timol koncentrációfüggő hatása az aktivációs (C) és az inaktivációs időállandóra (D). n=7.

D: A káliumáram csúcsértékeinek feszültségfüggése kontroll körülmények között, 300 μM timol jelenlétében, majd a timol kimosása után. n=8.