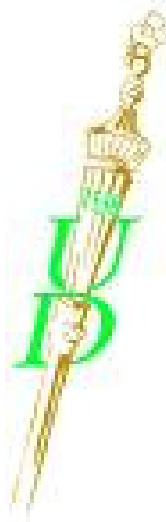


EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Helyi érzéstelenítőszeres szívelektrofiziológiai
hatásai**

Dr. Szabó Adrienne



Témavezetők: Dr. Nánási Péter és Dr. Márton Ildikó

DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2010

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések	4
I. Bevezetés	5
1.1 A lokálanesztetikumok fiziko-kémiai tulajdonságai és az érzéstelenítő hatás kapcsolata.....	6
1.2. A helyi érzéstelenítők hatása az idegrostok működésére.....	8
1.3. A feszültségfüggő nátriumcsatorna működése.....	9
1.4. A helyi érzéstelenítők hatása a nátriumcsatornákra	13
1.5. A helyi érzéstelenítők farmakokinetikai tulajdonságai.....	17
1.6. A helyi érzéstelenítők szisztémás toxicitása	18
1.7. A szívműködés akciók potenciálja és az azt kialakító ionáramok.....	19
1.8. A klinikumban használt új helyi érzéstelenítőszer.....	25
1.8.1. Ropivacain	25
1.8.2. Articain	29
2. Célkitűzések	32
3. Anyagok és módszerek	33
3.1. Kamrai szívműködés izolálása kutyából.....	33
3.2. Akciók potenciál elvezetése intracelluláris mikroelektróda technikával..	33
3.3. Ionáramok mérése konvencionális voltage clamp technikával	34
3.4. Ionáramok mérése akciók potenciál clamp technikával.....	34
3.5. A kontraktilis erő mérése	35
3.6. Az intracelluláris Ca^{2+} transziensek elvezetése.....	36
3.7. A nehéz SR vezikulák preparálása.....	36
3.8. Az ATP-áz aktivitás meghatározása.....	37
3.9. A kalciumfelvétel és -felszabadulás mérése nehéz SR vezikulákon.....	37
3.10. Statisztikai elemzés	38
3.11. Vegyszerek.....	38
4. Eredmények	39
4.1. Az articain hatása az akciók potenciál paramétereire.....	39
4.2. Frekvenciafüggő sajátosságok	41
4.3. Az articain hatása a szívműködés ionáramaira konvencionális voltage clamp körülmények között.....	43

4.4. Az articaïn ionáramokra gyakorolt hatása akciós potenciál clamp körülmények között	46
4.5 A ropivacain hatása az akciós potenciál paramétereire.....	48
4.6. Frekvenciafüggő sajátosságok	50
4.7. A ropivacain hatása a szív ionáramaira konvencionális voltage clamp körülmények között	52
4.8. A ropivacain ionáramokra gyakorolt hatása akciós potenciál clamp körülmények között	54
4.9. Az articaïn és a ropivacain hatása a kontraktilitásra	56
4.10. Az articaïn és a ropivacain hatása az intracellularis kalcium tranziensekre	58
4.11. Az articaïn és a ropivacain hatása a nehéz SR vezikulák kalcium felvételére és kalcium leadására.	58
5. Megbeszélés	61
5.1. Az articaïn akciós potenciál paramétereire gyakorolt hatásai összhangban vannak a voltage clamp technikával nyert adatokkal.....	62
5.2. Az articaïn szívhatásainak összevetése más érzéstelenítők hatásaival	63
5.3. A ropivacain szívhatásainak jellemzői	64
5.4. Az articaïn és a ropivacain negatív inotróp hatásának mechanizmusa.....	67
5.5. A helyi érzéstelenítők hatása a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} homeosztázisára.....	68
6. Összefoglalás	69
7. Új eredmények	71
8. Köszönetnyilvánítás	72
9 Irodalomjegyzék	73
9.1 Az értekezésben hivatkozott irodalom	73
9.2 Az értekezés alapjául szolgáló in extenso publikációk	91
10. Függelék.....	92
10.1 Summary	92
10.2 Az értekezésben felhasznált közlemények.....	93

RÖVIDÍTÉSEK

AP	akciós potenciál (action potential)
APD	akciós potenciál időtartam (action potential duration)
APD _x	az AP kezdetétől mért azon időtartam, mely az AP amplitúdójához képest mért x%-os repolarizációig telt el
ATP	adenozin-trifoszfát
ATP-áz	adenozin trifoszfataz
[Ca ²⁺] _i	intracellularis Ca ²⁺ koncentráció
EC ₅₀	félhatásos dózis (effective concentration in 50 %)
EGTA	etilén-glikol-bisz (2-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
HEPES	4-(2—hidroxietil) piperazun-1-etánszulfonsav
I _{Ca}	az L- típusú Ca ²⁺ csatornákon folyó áram
I _{Na}	a gyors feszültségfüggő Na ⁺ -csatornákon folyó áram
I _{K1}	befelé irányító K ⁺ csatornákon folyó áram (inward rectifier current)
I _K	késői K ⁺ áram (delayed rectifier K ⁺ current)
I _{Kr}	késői K ⁺ áram gyorsan aktiválódó komponense (rapid component of delayed rectifier K ⁺ current)
I _{Ks}	késői K ⁺ áram lassan aktiválódó komponense (slow component of delayed rectifier K ⁺ current)
I _{to}	transziens kifelé irányuló áram (transient outward current)
PIPES	piperazin-N,N'-bisz[etánszulfonsav]
RyR2	szívizom típusú rianodin receptor
SERCA	szarko-endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-áz (sarco-endoplasmatic reticulum calcium ATPase)
SE(M)	az átlag szórása (standard error (of the mean))
SR	szarkoplazmatikus retikulum
V _{max}	a depolarizáció legnagyobb sebessége

1. BEVEZETÉS

A helyi érzéstelenítők egyes diagnosztikus beavatkozások alkalmával, műtétek során, valamint a posztoperatív, a szülészeti és krónikus fájdalom csillapításában bírnak kiemelt jelentőséggel. Nélkülözhetetlen gyógyszerek a fogorvosi gyakorlatban is, hiszen a fogászati és a szájsebészeti ambuláns műtétek kevés kivételtől eltekintve kizárólag helyi érzéstelenítésben történnek. E beavatkozások során a megfelelő érzéstelenítőszer helyes megválasztása különösen nagy jelentőséggel bír, hiszen a fog eredetű betegségek igen intenzív fájdalmat okoznak, amit a szükségessé váló kezelés fájdalmaitól való félelem még tovább fokoz. Fizikokémiai tulajdonságaik alapján különböző hatástartamú és hatáserősségű, kiváló szerek állnak rendelkezésre, melyek minden beteg számára testreszabott anesztéziát tesznek lehetővé. A fogászati érzéstelenítés során a lidocain, a regionális anesztéziában a lidocain és a leggyakrabban alkalmazott hosszú hatású érzéstelenítőszer, a bupivacain a legelterjedtebb. A jelenleg a klinikumban használt és általában biztonságosnak tartott helyi érzéstelenítők mellékhatásai közé tartozik a beadás helyén ritkán jelentkező szöveti toxicitás, a vegyületekkel szemben jelentkező túlérzékenység, valamint legsúlyosabb és életveszélyes szövődményük, a szisztémás toxicitás, mely utóbbi miatt használatuk nagy körültekintést igényel. Klinikai alkalmazásuk alapja az idegsejtek feszültségfüggő nátriumcsatornáira gyakorolt gátló hatásuk révén az ingerületvezetés felfüggesztése. Mivel a feszültségfüggő nátriumcsatornák egyéb ingerlékeny sejteken - többek között a központi idegrendszerben és a szívműködésben - is jelenlévő transzmembrán struktúrák, a helyi érzéstelenítők a szisztémás keringésbe jutva - leggyakrabban véletlen intravénás beadás okozta - relatív vagy abszolút túladagolás következtében, legsúlyosabb mellékhatásként életveszélyes központi idegrendszeri mérgezést valamint kardiotoxicitást okozhatnak.

Az elsősorban a hosszú hatású érzéstelenítőszer használatára során észlelt kardiális szövődmények elkerülésére és korai felismerésükre kidolgozott eljárásokat (pl. teszt dózis, lassú, frakcionált adagolás) alkalmazva e mellékhatások gyakorisága csökkent, ám sporadikus esetek továbbra is előfordultak, ami újabb, kevésbé toxikus, az idegi nátrium csatornákra nézve nagyobb szelektivitással bíró

helyi érzéstelenítők előállítására ösztönözte a kutatókat. A regionális érzéstelenítésben a ropivacain, a fogászati anesztéziában az articain viszonylag rövid ideje alkalmazott szerek.. Klinikai megfigyelések alapján általánosan elfogadott, hogy szisztémás toxicitásuk alacsonyabb, mint a bupivacainé - illetve az articain esetében a lidocainé. A ropivacain önkénteseken és különböző kísérleti állatokon részletesen vizsgált szer, ezek alapján valóban megbízhatóbbnak tűnik, mint a bupivacain. Széles körű alkalmazása ellenére kevés adat áll rendelkezésre a molekula szívre gyakorolt sejt szintű hatásaira vonatkozóan. Az articain klinikai alkalmazásával kapcsolatban eddig nem közöltek túladagolással vagy szisztémás toxicitással járó esetet, de nagyon kevés tanulmány foglalkozik azzal, hogyan befolyásolja az articain a szívizomsejtek elektrofiziológiai folyamatait.

Az utóbbi években a helyi érzéstelenítők alkalmazási köre egyre tágult. Idős korban az általános érzéstelenítés nagyobb kockázata miatt – ha nincs ellenjavallata - a regionális anesztézia alkalmazása előnyt élvez. Az elmúlt évtizedekben a gyermekkori regionális anesztézia is egyre elterjedtebbé vált. Csecsemőknél és kisgyermekkorban elsősorban az életkorra jellemző élettani sajátosságok, idősebbeknél inkább az egyre gyakoribbá váló társbetegségek, az életkorral romló biológiai állapot és a növekvő mértékű gyógyszeresedés fokozhatják a helyi érzéstelenítők alkalmazásával járó kockázatot.

1.1. A lokálanesztetikumok fiziko-kémiai tulajdonságai és az érzéstelenítő hatás kapcsolata

A lokálanesztetikumok a szövetek közé juttatva reverzibilis módon felfüggesztik az akciós potenciálok kialakulását és tovaterjedését az idegrostokon. A klinikumban jelenleg használt helyi érzéstelenítők tercier aminból, és ehhez alifás intermedier láncon keresztül észter- vagy amidkötéssel kapcsolódó, szubsztituált aromás gyűrűből állnak. Mindhárom alkotóelem lényeges szerepet játszik a helyi érzéstelenítők fizikokémiai sajátosságaival összefüggésben lévő, alapvető farmakológiai és klinikai tulajdonságainak meghatározásában. Ilyenek a relatív anesztetikus potenciál, a hatás beállásáig eltelt idő, a hatástartam, valamint a kialakuló szenzoros és motoros gátlás [1]. Az intermedier lánc és a terminális amingyök közötti kötés típusa alapján a helyi érzéstelenítőket két, egymástól jelentősen eltérő farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságokkal

rendelkező csoportba (aminoamid illetve aminoészter) soroljuk. A kötés típusa meghatározza a vegyület metabolizmusát is, mivel az észtereket a szöveti és a plazmában lévő észterázok bontják le, míg az amid típusú helyi érzéstelenítők a májban metabolizálódnak.

A zsírodékony terciér amin bázis, élettani pH-n részben neutrális, zsírodékony, részben protonált, azaz pozitív töltésű kationos, vízdékony formában van jelen. Mindkét formának lényeges szerepe van az ingerületvezetés gátlásának kialakulásában. A helyi érzéstelenítők sósavas sóik formájában kerülnek forgalomba, így beadáskor a sejtmembránon átjutni nem képes, protonált formában vannak jelen. A szöveti pufferek hatására disszociációjuk visszaszorul, a szöveti pH és a vegyület pK_a értékének függvényében a terciér és kvaterner formák között egyensúly alakul ki. A lokálanesztetikumok fontos jellemzője a pK_a , az a pH érték, ahol a molekulák 50-50 %-ban vannak protonált illetve neutrális formában. Valamennyi hatékony lokálanesztetikum pK_a -ja magasabb, mint a szöveti pH, ezért a beadás helyén nagyobb hányadban vannak jelen a töltéssel bíró, vízdékony molekulák.

Az érzéstelenítő hatás kialakulásához szükséges időt, ami leginkább attól függ, hogy milyen mértékben képes a vegyület átalakulni a terciér, töltés nélküli, membránpermeabilis formába, a szöveti pH és a vegyület pK_a -ja szabja meg. Gyulladásos szövetekben a savas irányba eltolódó pH miatt még kevesebb molekula van jelen lipidoldékony formában [2]. Ilyen körülmények között a legalacsonyabb pK_a -val jellemzett vegyület a leghatékonyabb helyi érzéstelenítőszer.

A molekulában lévő aromás gyűrű biztosítja a biológiai membránokon való átjutáshoz szükséges lipidoldékonytságot. A vegyület hidrofób karakterét a neutrális és a kationos forma octanol / puffer megoszlási hányadosával jellemezzük [3]. A gyógyszer relatív érzéstelenítő potenciálja a zsírodékonyosságával arányos, mely tulajdonság tovább fokozható az aromás gyűrűhöz növekvő hosszúságú alifás csoportok hozzákapcsolásával, továbbá az amincsoportokhoz kapcsolódó alkilánc növekvő hosszával [4, 5]. A zsírodékonyosság jól korrelál a helyi érzéstelenítők receptorukhoz való affinitásával, míg a receptorról történő leválás a molekulásúly csökkenésével egyre gyorsabbá válik [6, 7]. Általában elmondható, hogy a helyi érzéstelenítők fehérjekötő képessége arányos a nátriumcsatornához való kötődés erősségével és így a hatástartammal.

A fenti paraméterek alapján megkülönböztetünk gyenge, rövid hatástartamú (procain, chloroprocaïn), közepes erősségű és hatástartamú (lidocain, mepivacain, articain) és magas anesztetikus potenciállal rendelkező hosszú hatástartamú (bupivacain, etidocain, ropivacain) szereket [1]. A lidocain kivételével a helyi érzéstelenítőkkel kapcsolatban fontos fogalom a kiralitás. A molekulában jelenlévő aszimmetrikus szénatom miatt ezek a vegyületek két enantiomer (S és R) formában léteznek, amelyek térbeli elrendeződésére a tükörszimmetria jellemző. Bár fizikokémiai tulajdonságaik megegyeznek, eltérő térbeli struktúrájukból fakadóan alapvetően különbözhet a receptorukhoz való affinitásuk.

1.2. A helyi érzéstelenítők hatása az idegrostok működésére

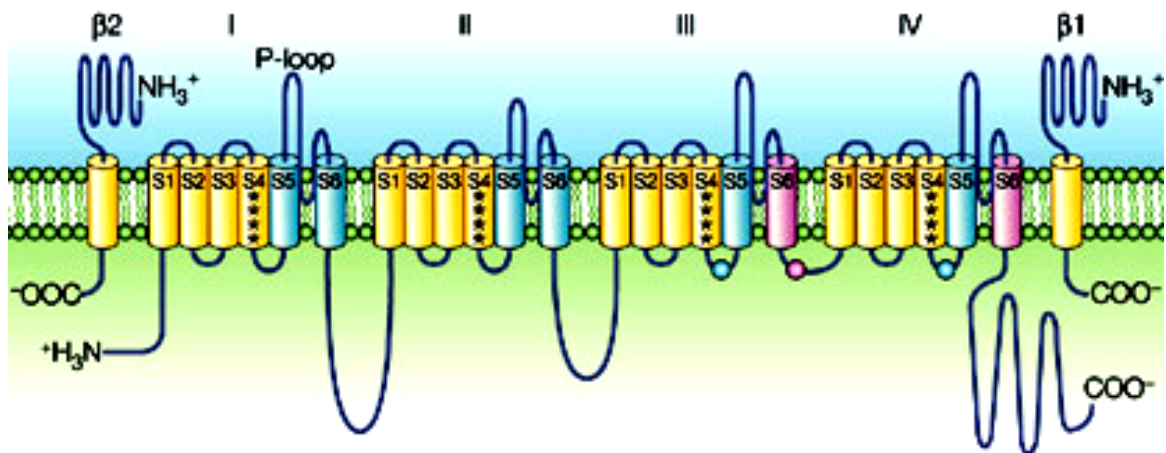
Az afferens (szenzoros) és efferens (motoros) információ átvitele, az idegsejtek egymás közötti és a perifériás szervekkel történő kommunikációja gyors és nagy hatótávú jelátvitelt tesz szükségessé. Ez a folyamat az inger hatására fellépő transzmembrán ionáramok keletkezésén, a minden vagy semmi jellegű elektromos válasz, az akciós potenciál kialakulásán és tovaterjedésén keresztül valósul meg. A helyi érzéstelenítők a különböző idegrostok ingerületvezetését nem egyformán gátolják [8]. Az egyes érzéskvalitások a következő sorrendben iktatódnak ki: éles fájdalom, hőérzés, tapintás, amit végül a motoros rostok bénulása követ. Az érzéstelenítő szerekkel szembeni érzékenység elsősorban az ideg által vezetett impulzusok frekvenciájától függ. Az A-gamma szervomotoros és a fájdalomérzés közvetítésében fontos szerepet játszó A-delta vékony myelinizált rostok a legérzékenyebbek a gátló hatással szemben. Ezeket követik a masszív myelinhüvellyel körülvett motoros vastag A-alfa és mechanoszenzitív A-béta rostok, míg a legkevésbé érzékenyek a vékony, myelinhüvely nélküli nociceptív C rostok. Ezek közül a legkisebb ingerületvezetési sebességgel rendelkező idegek a legrezisztensebbek [9]. Ennek egyik lehetséges magyarázataként felvetődött, hogy a különböző típusú rostok a helyi érzéstelenítőkre nézve eltérő érzékenységű ioncsatornákat expresszálnak [10], bár a klinikailag észlelt blokádnak erősségét a gyógyszer több, különböző vastagságú anatómiai rétegen történő áthaladásának jellemzői is jelentősen befolyásolhatják. Izolált idegeken a mechanoszenzitív A-béta, a nociceptív A-delta és a C típusú rostokat vizsgálva a lidocainnal szemben

különböző érzékenységet figyeltek meg, ami nem volt arányos átmérőjükkel [11]. Ugyanakkor, a myelinhüvelyes rostok sokkal érzékenyebbek voltak a lidocain vezetési sebességet csökkentő hatásával szemben, mint a myelinhüvellyel nem rendelkező társaik [12].

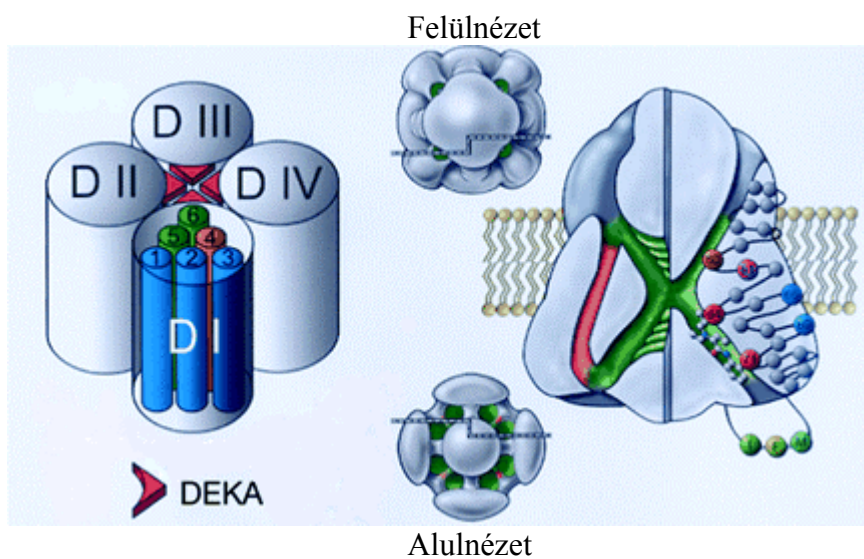
1.3. A feszültségfüggő nátriumcsatorna működése

A lokálanesztikumok az akciós potenciál kialakulását és tovaterjedését függesztik fel a gyors befelé irányuló nátriumáram gátlása révén [13]. A feszültségfüggő nátriumcsatornák kívülről harang alakú, belül több üreget tartalmazó transzmembrán glikoprotein molekulák [14], melyek egy, az ionvezető pórust is tartalmazó 220-260 kD molekulatömegű α -alegységből, valamint két, modulációs szerepet betöltő 33-36 kD tömegű béta-alegységből állnak [15-20]. Az α -alegységnek eddig 9 különböző izoformáját írták le, melyekre aminosav szekvenciájukat tekintve nagyfokú homológia jellemző [21, 22]. Az egyetlen polipeptid láncból álló α -alegységet 4 homológ szerkezetű domén alkotja, melyek mindegyike 6 hidrofób, α -hélix szerkezetű transzmembrán szegmenst (S1-S6) tartalmaz. Az α -alegység rendelkezik a csatorna meghatározó jellemzőivel, a feszültségfüggő kapuzással és a nátriumionokra nézve erős szelektivitással. A β -alegységek a kapuzás kinetikáját módosítják és befolyásolják a csatorna expresszióját [23]. A csatorna tulajdonképpen ionvezető részét, a pórust, a négy domén pszeudoszimmetrikus elrendeződésének centrumában, az S5-S6 szegmensek és az S5-S6 transzmembrán szegmenseket összekötő hurkok alkotják. A membránba visszatérő hurkok képezik a pórus szűk extracelluláris végét és a külső szájadék alatt található 4 aminosavból álló szelektív filtert, mely a csatorna legszűkebb része [24-27]. Ide kapcsolódik a csatorna specifikus gátlószere, a tetrodotoxin is, mely a szívizomra jellemző izoformához sokkal gyengébben kötődik, mint az idegi izoformához [28, 29]. A csatorna szelektív filter alatt elhelyezkedő szélesebb szakaszát, a csatorna citoplazmatikus szájadékát, a négy domén konvergáló S6 szegmentumai alkotják. A csatorna aktivációs kapuja a pórus belső szájadéka közelében található és az S6 szegmensek hidrofób csoportjait tartalmazza. Az S4 szegmentumon sűrűn

elhelyezkedő, pozitív töltésű arginin és lizin oldalláncok feszültségszenzorként működnek [18, 30].



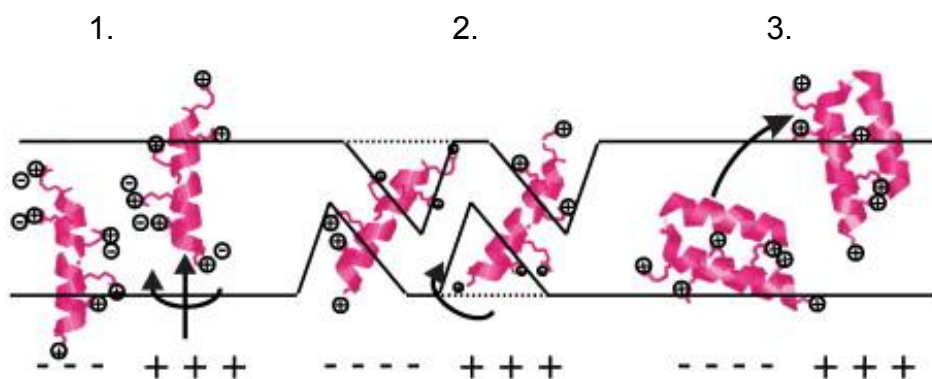
1. ábra. A NaV1.2 feszültségfüggő nátriumcsatorna alegységeinek elsődleges szerkezete. A 4 homológ doménből (I-IV) felépülő α -alegységet két járulékos β -alegység szegélyezi. A hengerek az α -hélix szerkezetű transzmembrán szegmentumokat szimbolizálják. A kék színnel jelölt szegmentumok (S5, S6 a közöttük lévő SS1/SS2 (P loop) szegmentumokkal) képezik az ionvezető pórust. A csillagok az S4 feszültségszenzort, a lila korong a gyors inaktivációs részecskét, míg a kék korong az inaktivációs kapu receptorát szimbolizálják. A lila színnel jelölt IIIS6 és IVS6 szegmentumokon található a gyógyszer (helyi érzéstelenítők, antiepileptikumok) okozta csatorna moduláció receptora (Rogawski és Löscher, 2004) [31].



2. ábra. Az α -alegység térbeli szerkezete. A négy domén (I-IV) mindegyike hat transzmembrán szegmentumból áll. Az S5-S6 szegmentumok közti aminosav kötések

képezik a csatorna külső szájadékat és valamennyi doménban ugyanazt a DEKA aminosavszekvenciát hordozzák. Ez a struktúra a csatorna ionszelektivitási filtere. A nagy keresztmetszeti kép a baloldalon az S4, a jobb oldalon az S6 szegmentumnak megfelelő síkban ábrázolja a csatorna szerkezetét. A felül-és alulnézeti képen a keresztmetszet síkjait szaggatott vonalak jelzik. A bal oldali keresztmetszeten a pirossal jelzett, az S4 szegmentumot tartalmazó kapuzó apparátusnak a zölddel jelzett központi ionvezető pórushoz való viszonyát mutatja az ábra. Az ábra jobb felén a központi ionvezető pórust béleelő aminosavak közül a pirossal jelzettek a helyi érzéstelenítők iránti affinitásban játszanak fontos szerepet. Az S5-és S6 szegmentumok között a citoplazma felőli oldalon a gyors inaktivációért felelős IFM szekvenciát tartalmazó belső inaktivációs kapu látható (Catterall, 2001 és Scholz, 2002 nyomán) [32, 33].

A feszültségfüggő nátrium csatornák dinamikus, térbeli szerkezetüket a sejtmembrán feszültségváltozásaira változtató molekulák, melyeknek egy zárt, egy nyitott, egy gyors és több lassú inaktivációs állapotát tételezik fel. Depolarizáció hatására a nyugalmi membránpotenciálon zárt állapotú csatornában a feszültség-szenzor az extracelluláris irányban elmozdulva elindítja a csatorna megnyílását eredményező szerkezetváltozást, melynek következtében a membrán nátriumpermeabilitása hirtelen megnő, a sejtbe nátriumionok tódulnak be és létrejön az akciós potenciál felszálló ágát kialakító befelé irányuló nátriumáram (I_{Na}).



3. ábra. Az S4 feszültség-szenzor mozgásának molekuláris modelljei (Elinder és mtsai., 2007 nyomán) [34].

Az S4 mozgásának leírására 3 elmélet született. **1:** a spirális csavar vagy csúszó spirál elmélet szerint az S4 pozitív töltései a csatorna más területeinek negatív töltéseivel létesítenek kapcsolatot. A membrán potenciál megváltozásakor az alegységenként 3

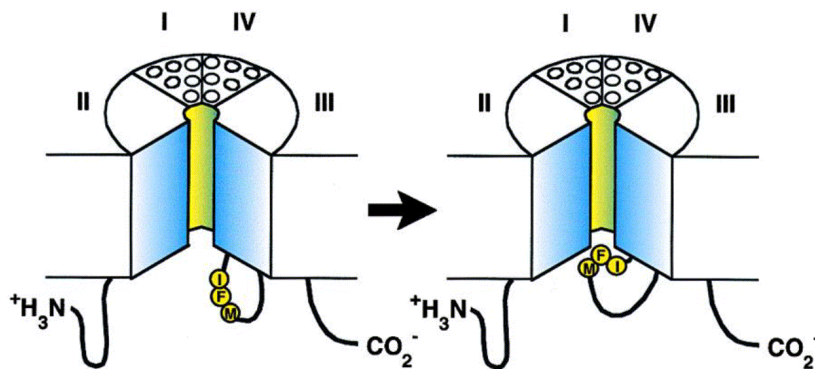
töltés elmozdításához az S4 szegmentum 3 lépésben összesen 13,5 Å-nyit mozdul el extracelluláris irányban és 180°-t rotálódik a hossz tengelye körül az új negatív töltésekkel történő kapcsolat kialakításához [26]. **2:** a transzporter modell szerint főleg rotációt (180°) és csak kismértékű (2-4 Å) translációs mozgást végez az S4 [35].

3.modell: Az S4 és az S3b (a feszültség szenzor lapátja) szoros kapcsolatban vannak, és mindig együtt mozognak a teljes kapuzási ciklus alatt. A csatorna zárt állapotában a citoplazma felőli felszín közelében helyezkednek el, a csatorna kinyílásakor extracelluláris irányban mozdulnak el evezőlapátszerűen, viszonylag nagy terjedelmű, 15-20 Å -nyi mozgást végezve a membránon belül. [36]

Ezt követően kb. 1,5 ms-on belül a nátriumionok beáramlása a gyors inaktiváció következtében gyakorlatilag megszűnik. A gyors inaktiváció olyan nem vezető, zárt állapotot eredményez, melyből a csatorna nem képes közvetlenül újra nyílt állapotba jutni mindaddig, ameddig a membrán nem repolarizálódik. A gyors inaktiváció kialakulásáért a III. és IV. domének közötti intracelluláris hurok tehető felelőssé. Ez a csatorna inaktivációs kapuja, amelynek egy három aminosavból álló szekvenciája koordinálja a IV. domén S6 szegmentumán és az S4-S5 szegmentumokat összekötő intracelluláris hurkon lévő dokkoló hely közötti hidrofób kapcsolat kialakulását [30, 37-41]. Ez - mint egy fedél – belülről lezárja a pórust, megállítva ezzel a nátriumionok további beáramlását.

Hosszan tartó depolarizáció hatására a csatornák lassú inaktivációs állapotokba kerülnek. Ezeket a különböző kinetikával jellemezhető és a csatorna különböző régióit érintő folyamatokat a néhány ms-tól (gyors inaktiváció) néhány száz ms-on át (intermediér inaktiváció) a néhány s-ig (lassú inaktiváció) terjedő időtartamuk alapján különböztetik meg [42, 43]. A szelektív filter környéki mutációk ultralassú inaktivációs kinetikát eredményeznek [44, 45]. A lassú inaktivációs kapu a külső kapu és a szelektív filter területén található [46, 47]. A lassú inaktiváció során a csatornán található, a pórust kialakító ún. P-kacsok átrendeződését valamint a külső kapu konformáció-változásait írták le [48, 49]. Feltételezik, hogy az S6 szegmentum szerkezetváltozásai indítják el a lassú inaktivációs kapu záródását a külső pórus szintjében. A lassú inaktivációs folyamatot egy igen konzervatív, a külső vestibulumban elhelyezkedő, töltéssel rendelkező aminosavakból álló struktúra, az ún. EEDD gyűrű szabályozza [47]. A

lassú inaktívációs állapot az ingerlékenység szabályozásában játszhat szerepet [50].



4. ábra. A feszültségfüggő nátrium csatorna gyors inaktívációjának mechanizmusa. Az inaktívációs folyamatban alapvető szerepet játszik a III és IV doméneket összekötő intracelluláris hurok IFM (izoleucin 1488, fenilalanin 1489 és metionin 1490) szekvenciája, a gyors inaktíváció során a csatorna citoplazmatikus szájadékát a fenilalanin (F) molekula zárja el (West és mtsai., 1992 nyomán) [38].

1.4. A helyi érzéstelenítők hatása a nátriumcsatornákra

A helyi érzéstelenítők a csatorna aktuális állapotától függően képesek ahhoz kötődni. A feszültségfüggő nátriumcsatornákra gyakorolt gátló hatásuk két formában jelentkezhet, az egyik a tónusos vagy nyugalmi gátlás, amely alacsony ingerlő frekvenciák mellett is kialakul, de viszonylag magas koncentrációt igényel, amit a zárt állapotú csatornához való alacsony affinitású kötődés magyaráz. A másik forma, a frekvenciafüggő, use-dependens vagy fázisos gátlás, ami a növekvő frekvenciák esetén egyre fokozódó nátriumáram-gátlásban nyilvánul meg [51]. Ez utóbbi hatást a helyi érzéstelenítőnek elsősorban az inaktívált nátriumcsatorna receptorához való nagy affinitású kötődése okozza, miután a nyitott csatornán keresztül a molekula eléri receptorát [52]. A nyitott illetve inaktívált állapotú csatornához általában nagyobb affinitással kötődnek, mint a zárt állapotúhoz [53-55], így ismétlődő ingerlés során egyre több csatorna köt gyógyszerre, ezért a gátlás egyre mélyül. A hidrofób molekulákra erősebb tónusos, míg a töltéssel rendelkezőkre markánsabb use-dependens hatás jellemző [4]. A use-dependens hatás kialakításában a terciér aminok kationos formában vesznek részt [51]. Két elmélet született a use-dependens hatás magyarázatára. A modulált

receptor elmélet értelmében a helyi érzéstelenítő molekulák a csatorna minden állapotához képesek kötődni, de eltérő affinitással [56]. A „guarded-receptor” hipotézis szerint a gyógyszerek állandó affinitású receptorhoz kötődnek, a kötőhely hozzáférhetőségét a csatorna kapuinak konformációs állapota szabályozza az akciós potenciál alatt [57].

A fiziológias körülmények között túlnyomórészt pozitív töltésű kation és töltés nélküli szabad bázis formájában jelenlévő helyi érzéstelenítők kétféle úton érhetik el kötőhelyüket. A lipidoldékony neutrális molekulák receptorukat a membrán lipid-fázisán keresztül a gyorsabb hidrofób útvonalon, míg a töltéssel rendelkezők a csatorna citoplazma felőli nyitott szájadéknál keresztül, a lassúbb hidrofil útvonalon érik el [56]. A csatorna zárt állapotában a citoplazmatikus szájadéknál konvergáló belső hélixek elzárják az ionpermeációs útvonalat, ezért a helyi érzéstelenítők csak a feltételezett hidrofób útvonalon keresztül juthatnak el receptorukhoz.

A kizárólag neutrális formában létező benzocain csak tónusos blokádot okoz, use-dependens hatása gyakorlatilag nincs. Ezzel szemben a helyi érzéstelenítők kvaterner amin, analógjai nem képesek átjutni a membrán kettős lipidrétegén, mégis képesek gátló hatást kifejteni, ami vagy a csatornaszájadékon keresztüli vagy járulékos útvonalon való bejutást feltételezi [58-61]. A nyitott ill. inaktivált konformációhoz az állandó töltéssel bíró kvaterner lokálanesztetikumok kötődnek a legnagyobb affinitással.

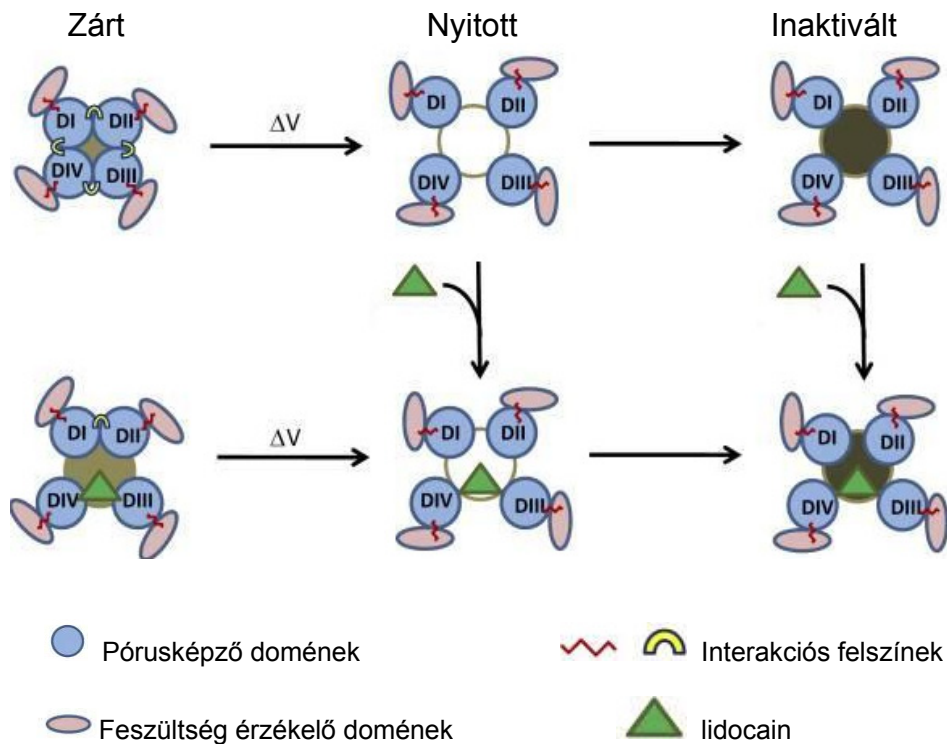
A helyi érzéstelenítőknek a nyitott és inaktivációs állapotokhoz való nagyobb affinitásának hátterében korábban a gyors inaktivációs állapotnak e szerek általi stabilizációját feltételezték [62]. Újabb vizsgálatok szerint nem a gyors inaktivációs struktúrát befolyásolják a helyi érzéstelenítők [63], hanem kötődésük hatására a csatornák lassú inaktivációs állapotot vesznek fel [49, 64-65]. Néhány kivétellel a lokálanesztetikumok a csatorna aktiválódásakor a citoplazma felőli nyitott kapun át a csatornába belépve az ionvezető hidrofil útvonalon keresztül [66, 67] érik el kötőhelyüket, amely a csatorna belső vestibulumában, az ionszelektív filter alatt, annak közvetlen közelében található és a különböző nátriumcsatorna izoformákban ugyanaz a nagymértékben konzervatív, egymástól hat másik aminosavval elválasztott 2 aromás aminosav alkotja. Irányított mutagenézis vizsgálatok igazolták, hogy a kötőhelyen kulcspozícióban lévő fenilalanin és tirozin aminosav molekula a IV. domén S6 szegmentumán, az ionvezetési útvonalon helyezkedik el. Alaninnal való helyettesítésük nagyságrendekkel csökkentette a

helyi érzéstelenítőszer affinitását a nyitott és inaktivált csatornához [68]. A különböző helyi érzéstelenítők a szelektív filter melletti, pórust bélelő oldalláncokkal kölcsönhatásban stabilizálják a lassú inaktivációval kapcsolatos szerkezetváltozást. Feltételezik, hogy az egyes szerek use-dependens hatásában megmutatkozó különbségek részben a gyógyszert kötő szerkezeti állapot stabilitásbeli különbségét tükrözik [65].

A helyi érzéstelenítőszer okozta feszültségfüggő nátrium csatorna gátlásnak egyik alapvető mechanizmusa az ionáramlás gátlása a pórus elzárásával. A molekula aszimmetrikusan helyezkedik el a pórusban, ahol a III. és IV. domének S6 szegmentuma és az érzéstelenítő molekula között erős π -elektron kapcsolat létrejötte valószínű. [69]. A csatorna molekuláris modellje szerint a helyi érzéstelenítő pozitív töltést hordozó alkilamino része elsősorban van der Waals erők révén a IV. domén S6 szegmentumában lévő kulcspozícióban lévő fenilalaninnal, míg aromás gyűrűje a tirozinnal lép kapcsolatba és a szelektív filter alatt elhelyezkedve pozitív elektrosztatikus gátat képez a nátriumionokkal szemben [54,70]. A nyitott csatornában lévő vízmolekulák hatására a neutrális terciér aminok protonálódnak, így lehetővé téve a kölcsönhatást az érzéstelenítőszer és a fenilalanin között. A helyi érzéstelenítők aszimmetrikus elhelyezkedésük miatt a csatornát csak beszűkítik, és - a mutagenézis kísérletekkel igazolt elektrosztatikus gátlás hipotézise alapján - elektrosztatikus akadályt képezve függesztik fel teljesen az ionpermeabilitást [71, 72].

A csatorna zárt állapotában a konzervatív fenilalanin oldallánc elektrosztatikusan láthatatlan a neutrális, töltés nélküli helyi érzéstelenítő számára. A nyitott csatornában elfoglalt helyzetéhez képest horizontálisabban elhelyezkedő gyógyszer molekula és a zárt pórust bélelő oldalláncok között lipofil kölcsönhatás jön létre. [54]

A gátlás további feltételezett mechanizmusa, hogy a helyi érzéstelenítők az inaktivációs állapot konformációjának stabilizálásával megszakítják a csatorna aktivációs folyamatait. Ismert a lokálanesztetikumok okozta use-dependens gátlás során a kapuáram csökkenése [73]. Feltehetően a nyitott illetve inaktivált csatornákra irányuló gátló hatás a III.-IV. domének feszültségszenzorként működő S4 szegmente stabilizációjával jár, ami megakadályozza a zárt állapot létrejöttéhez szükséges, domének közötti kölcsönhatásokat [74, 75].



5. ábra. A helyi érzéstelenítők okozta nátriumcsatorna moduláció sematikus ábrája. Az első sorban a nyitott és inaktivált állapotú csatornához kötődő helyi érzéstelenítőszer stabilizálja a III. domén és bizonyos mértékig a IV. domén pórust képző szegmentumait a csatorna nyitott állapotában. Mivel a pórust képző hélixek (kék korongok) mozgása a feszültség szenzorhoz csatolt (lila ellipszisek), a lokálanesztetikumok a domének feszültség szenzorait szintén nyitott állapotban stabilizálják. A domének között csatorna zárt állapotában észlelt kölcsönhatás megszakad, ha a helyi érzéstelenítő molekula beékelődése megakadályozza a III. és IV. domének S6 szegmentumainak a csatorna zárt állapotához szükséges teljes záródását (Muroi és Chanda, 2007 nyomán) [75].

A tónusos gátlás a feszültség-szenzor mozgását nem érinti [76]. A kulcsfontosságú fenilalanin nem aromás aminosavval való helyettesítése alapján két különböző csatorna konformációval kapcsolatos gátló hatást lehetett definiálni. A feszültség független, alacsony affinitású (mM-os koncentrációknál jelentkező), zárt csatornára irányuló gátlás, a csatornafal és a neutrális gyógyszer közti lipofil kapcsolat révén valósul meg. A nagy affinitású (μM -os koncentrációkban kiváltott), a nyitott ill. inaktivált csatornára gyakorolt hatás melyet a III.-IV. doménokban a

feszültség-szenzor S4 szegmentumok stabilizálása és a kapuáram gátlása kíséri, a gyógyszermolekula és a számára a depolarizált állapotban az S6 szegmentumok konformációs változása következtében teljesen hozzáférhetővé váló fenilalanin között létrejövő kölcsönhatáson keresztül [72, 77].

A zárt csatornáról történő leválás gyorsabb a zsíroidékonyabb vegyületek, az alkalikusabb külső pH és az alacsonyabb pK_a esetén. A nyitott csatornáról történő leválást kevésbé befolyásolja a zsíroidékonyság, az extracelluláris pH és a vegyület disszociációs konstansa: a kisebb molekulású szerek gyorsabban válnak le [78-79]. Ennek háttérében az a megfigyelés állhat, hogy a receptorhelyet a helyi érzéstelenítők két (hidrofil és hidrofób) útvonalon hagyhatják el.

1.5. A helyi érzéstelenítők farmakokinetikai tulajdonságai

A lokálanesztetikumok hatáserősségét, hatásuk kialakulásának gyorsaságát, hatástartamukat *in vivo* nem pusztán a vegyület fiziko-kémiai sajátosságai határozzák meg, hanem a vegyület és az élő szervezet kölcsönhatása is komplex szerepet játszik benne. A helyi érzéstelenítők terápiás hatása, a lokális alkalmazás során az idegeken az ingerületvezetés felfüggesztése független a szer plazmaszintjétől. A gyógyszer tulajdonságain túl (kötődés az alkalmazás helyén, vasoconstrictor illetve vasodilatator hatás), a beteg életkora (pl. a kisgyermekkorban a felnőttekéhez viszonyítva nagyobb perctérfogat és nagyobb vérátáramlás), a beadás helyének érzettség, és a zsírszövet lokális mennyisége egyaránt meghatározzák helyi hatást csökkentő szisztémás felszívódás mértékét. A leggyorsabb felszívódást az intrapleurális [80], és intercostalis beadást követően [81], a leglassúbb felszívódást a has bőre alá infiltrált szerek esetén lehetett detektálni [82]. Az egyes aminoamid típusú helyi érzéstelenítők alacsony koncentrációban vasoconstrictor, nagyobb koncentrációban vasodilatator hatásúak [83-85]. Endogén érszűkítő hatásuk csökkentheti a felszívódás mértékét, csakúgy, mint a gyakran hozzájuk adott adrenalin, amely megnöveli a hatás időtartamát. A beadás után a plazmában elért csúcskoncentráció az alkalmazott dózison, a beadás és felszívódás sebességén kívül függ a gyógyszer fehérjékhez történő kötődésétől, a megoszlásától és a szervezetből való eliminációjától.

A helyi érzéstelenítők, mint gyenge bázisok, nagy affinitással kötődnek a plazmában kis mennyiségben jelenlévő α -1 savas glikoproteinhez, melynek

telítődését követően a nagy mennyiségben jelenlévő albumin valamint a vörösvértestek kezdik kis affinitással megkötni a gyógyszert [86, 87]. A nem specifikus fehérjekötések kialakulásával a plazmaszint lassan csökken. Amint ezek a kötőhelyek is telítődnek, az emelkedő vérszint toxicitáshoz vezethet. Acidózis és hyperkapnia esetén a fehérje kötésből disszociáló helyi érzéstelenítők a szabad frakció hirtelen emelkedését okozzák. Újszülöttekben a bilirubin leszoríthatja a helyi érzéstelenítőket a fehérjekötésből, megemelve ezzel a szabad vérszintet és a toxicitás esélyét. A nagyobb zsírolékonysággal bíró, amidtípusú vegyületek felhalmozódhatnak a zsírszövetben és a tüdőszövetben, ezzel átmenetileg csökkentve a plazmaszintet [88].

Az aminoészter helyi érzéstelenítők gyorsan metabolizálódnak a plazma nem specifikus észterázai és a pszeudokolinészteráz által [89, 90], míg az aminoamid típusúak átalakulása lassabb folyamat, a májban a citokróm p450 rendszeren keresztül dealkiláláson, hidroxiláción majd konjugáción mennek keresztül, végül a metabolitok a vizelettel ürülnek [91, 92]. Az érintett mikroszómális enzimek működését befolyásolhatják a beteg életkora és esetleges kísérő betegségei. Ismert, hogy ezek az enzimek újszülöttkorban és csecsemőkorban még viszonylag éretlenek, aktivitásuk májbetegségekben is csökkenhet. A perctérfogat csökkenésével járó betegségek esetén a májba jutó gyógyszer mennyisége, így az elimináció sebessége is csökken [92]. Májcirrózisban a parenchyma csökkenésével arányos mértékben lassul a biotranszformáció [91]. Az ugyanazon enzimrendszeren keresztül metabolizálódó gyógyszerek csökkenthetik a helyi érzéstelenítők átalakításának sebességét. Azamid típusú gyógyszerek additív módon növelik egymás szisztémás toxicitását [93, 94].

1.6. A helyi érzéstelenítők szisztémás toxicitása

A véráramba bejutó helyi érzéstelenítők a vérátáramlás arányában oszlanak meg az egyes szervek között. A legnagyobb veszélynek a gazdag vérellátással rendelkező szív, agy, és vesék vannak a kitéve. A véletlen érbe történő beadás vagy a terület gazdag érzettségéből okozta váratlan, gyors felszívódás miatt fellépő relatív vagy abszolút túladagolás következtében egyéb ingerlékeny szervek, pl. az agy és a szív-és érrendszer jelentős koncentrációjú helyi érzéstelenítőszerekkel kerülnek kapcsolatba, így hatásának nem kívánt célpontjaivá válnak.

Legsúlyosabb mellékhatásként központi idegrendszeri és kardiális szövődmények léphetnek fel.

A helyi érzéstelenítők toxicitása a szer hatáserősségétől és az érpályában jelenlévő szabad gyógyszer szinttől függ. A központi idegrendszeri tünetek alacsonyabb plazmaszint mellett jelentkeznek, jellegzetesen két lépcsőben alakulnak ki, míg altatott betegen hiányozhatnak is [95]. Bevezető tünetei a periorális zsibbadás, fémes szájíz, félelemérzés, hyperacusis, végtagok zsibbadása. Magasabb gyógyszer szintek mellett a prekonvulzív stádiumban a kérgi gátló neuronok bénulása miatt izommerevség, akaratlan izomrángás, izomremegés, dysarthria, homályos látás lépnek fel [96]. A tovább emelkedő gyógyszer szint hatására jelentkező, eszméletvesztéssel járó generalizált tónusos-klonusos görcsök jellemezték a konvulzív stádiumot a légzésleállással, kómával járó teljes központi idegrendszeri bénulás váltja fel. A központi idegrendszeri toxicitást az acidózis jelentős mértékben fokozza [97]. Ijesztő tünetei ellenére - adekvát kezeléssel - maradvány nélkül gyógyítható.

A tovább emelkedő szabad gyógyszer szintek hatására kardiális intoxikáció alakul ki. A helyi érzéstelenítők kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt hatása részben indirekt, a központi idegrendszer által mediált bifázisos válasz: a kezdeti, a központi idegrendszeri excitatorikus fázisra jellemző stimuláló hatást a magasabb gyógyszer szintek mellett kialakuló depresszív komponens követi [98]. Ez előbb hyperdinámiás keringésben, majd a teljes központi idegrendszeri depresszió bradycardiában és hypotóniában nyilvánul meg [99, 100]. Az egyes helyi érzéstelenítők aneszteziológiai potenciáljuk arányában, különböző mértékben befolyásolják a szív működését. A közvetlen kardiális hatások sejtszinten a kardiális akciós potenciálok és az azokat kialakító ionáramok befolyásolása révén jönnek létre.

1.7. A szívműködés akciós potenciálja és az azt kialakító ionáramok

Az akciós potenciál létrejöttéhez és elvezetéséhez szükséges elektromos jelek a feszültségfüggő nátrium-, kálium- és kalciumcsatornák működését tükrözik [101]. A szív különböző részeiről elvezetett akciós potenciálok morfológiája eltérő és markánsan különbözik a neuronokról elvezetett akciós potenciálétól [102,103].

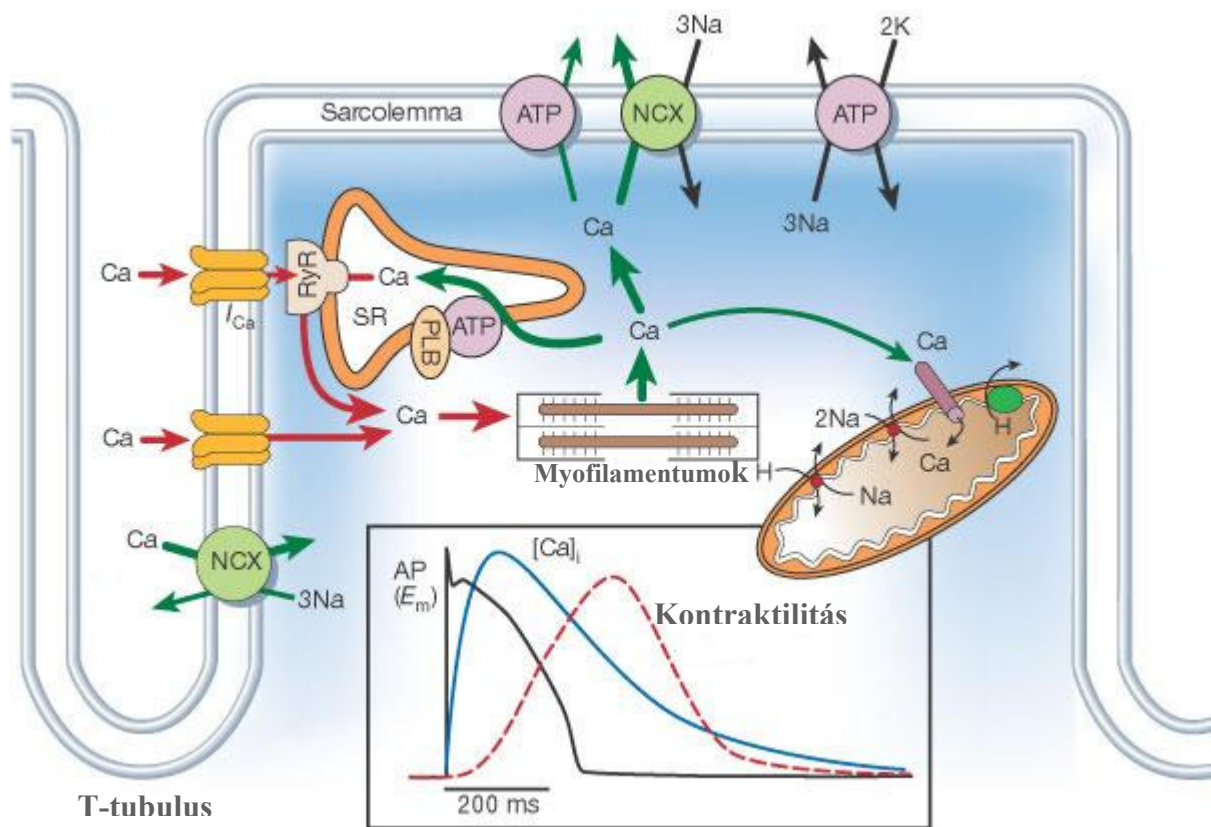
A -80 mV nyugalmi potenciállal rendelkező kamrai izomsejteken az inger hatására létrejön az akciós potenciál kb. 200 V/s maximális depolarizációs sebességgel jellemezhető felszálló ága (0. fázis), amely kb. $30-40$ mV túllövést ér el. A felszálló ágat rövid korai repolarizáció követi (1. fázis), amely különösen intenzív a subepicardialis és midmyocardialis kamrai sejteken. A subepicardialis sejteken az akár $20-30$ mV nagyságot elérő korai repolarizációt egy újabb depolarizáció követi, jellegzetes spike-and-dome morfológiát hozva létre [104]. A platófázist (2. fázis) a membránpotenciál nagyon lassú repolarizációja jellemzi. A platófázisnak a terminális repolarizáció (3. fázis) vet véget, amelynek végére a membránpotenciál a nyugalmi értékre tér vissza (4. fázis).

Az akciós potenciál felszálló ágát szívizomban is a rendkívül gyors aktivációs és inaktivációs kinetikával rendelkező befelé irányuló nátriumáram (I_{Na}) hozza létre. A feszültségfüggő nátriumcsatornák megnyílásához a sejtmembránnak valamilyen inger hatására kb. -70 mV-ra kell depolarizálnia. A nátriumcsatornák megnyílásával a membrán tovább depolarizálódik, ami további feszültségfüggő nátriumcsatornák megnyílását eredményezi (Hodgkin-ciklus). Azt a membránpotenciál értéket, ahol a befelé irányuló nettó áram elég nagy az autoregeneratív depolarizáció fenntartásához, küszöbpotenciálnak nevezzük. Ennek elérésekor a pozitív feed back reguláció eredményeként kevesebb, mint 1 ms alatt $110-120$ mV feszültségváltozást eredményező nátriumáram irányul a sejtbe. Ezt követően a csatornák gyorsan inaktiválódnak, csak a negatív membránpotenciál értékeknél bekövetkező inaktivációból való visszatérést követően képesek újra megnyílni. A depolarizáció során a nátrium egyensúlyi potenciáljához közelítve a nátrium beáramlásának hajtóereje csökken. Az akciós potenciál csúcsán kb. $+35$ mV membránpotenciál mérhető. A membránpotenciál függvényében ábrázolva az áramerősséget, a legnagyobb áramerősség -20 mV-nál mérhető. A befelé irányuló nátriumáram idő- és feszültségfüggő inaktivációt mutat, az inaktivációból való visszatérés is feszültség- és időfüggő folyamat [105-107]. Egy szűk membránpotenciál tartományban, ahol a steady-state aktivációs és inaktivációs görbék átfedésben vannak, kis amplitúdójú nátriumáram, az úgynevezett window nátriumáram észlelhető, amelynek szerepet tulajdonítanak a platófázis kialakításában [108, 109]. Az I_{Na} klasszikus gátlószerei a tetrodotoxin, a saxitoxin, továbbá a helyi érzéstelenítők.

A korai repolarizációt létrehozó tranziens kifelé irányuló áram (I_{to}) legalább két, egymástól teljesen különböző komponensből áll [110-113]. Egyikük az intracelluláris kalcium koncentrációjától független, de 4-aminopyridinre érzékeny káliumáram (I_{to1}), a másik egy kalciumdependens, 4-aminopyridinre nem érzékeny kloridáram (I_{to2}). Maga az I_{to1} áram is legalább két különböző káliumcsatorna izoforma működése révén jön létre (kutyában és emberben dominánsan Kv4.3 és Kv1.4). A két komponens közötti döntő különbség az inaktivációból való visszatérés időállandójában van, ez a Kv4.3 esetén néhány 10 ms-on belül, míg a Kv1.4 esetében kb 1 s alatt játszódik le [114-116]. A két izoforma aránya az áram kialakításában változó, emberben és kutyában a Kv4.3, míg nyúlban a Kv1.4 dominál. Az I_{to} nagysága a repolarizációban egy adott fajon belül is a szív egyes területein különböző, ami az akciós potenciálok morfológiájában is megnyilvánul. Az I_{to} valamennyi szívműködésben kimutatható, sűrűsége a kamrai subepicardialis és a pitvari sejtekben a legnagyobb [102, 117]. Az I_{to} jelentősége a korai repolarizáció kialakításában és ezáltal a megfelelő mértékű kalciumbelépéshez szükséges elektromos hajtóerő fenntartásában van. Myocardialis infarctust követően illetve szívelégtelenségben az áram down-regulációját írták le [118].

A befelé és kifelé irányuló áramok finom egyensúlya észlelhető az akciós potenciál platófázisa alatt. Depolarizált feszültségértékek mellett a feszültségfüggő kalciumcsatornán keresztül az extracelluláris térből a sejtbe irányuló L-típusú kalciumáram (I_{Ca}) valamint a repolarizáló hatású, főleg a gyors késői egyenirányító káliumcsatornákon keresztül kifelé folyó káliumáram (I_{Kr}) párhuzamosan aktív. Mivel az I_{Ca} amplitúdója folyamatosan csökken, miközben az I_{Kr} nagysága folyamatosan nő az idő előrehaladásával, a repolarizáció egyre gyorsabbá válik. A platófázis elején az I_{to} is csekély mértékben hozzájárulhat a kifelé irányuló áramokhoz, míg a befelé irányuló áramok közül a window nátriumáram játszik még szerepet a platófázis alakításában és ezen keresztül az akciós potenciál időtartamának meghatározásában [101]. Az I_{Ca} lényegesen lassabb aktivációs és inaktivációs kinetikát mutat, mint a I_{Na} és aktiválódása is nagyobb depolarizációt igényel. Az I_{Ca} néhány ms-on belül eléri a maximális erősséget, de teljes inaktivációja több tíz, esetenként száz ms alatt játszódik le. Aktivációs küszöbe kb. -25 mV-nál van, maximumát 0 mV körüli feszültségnél éri el [119]. Steady-state körülmények között egy adott feszültségtartományban nem inaktiválódó, window kalciumáram észlelhető [120]. Az I_{Ca} steady-state inaktivációs görbéje 0 mV körül

minimumot mutat, majd a pozitív membránpotenciál-tartományban ismét emelkedni kezd. Ennek oka a kettős, kalciumdependens és feszültségfüggő inaktivációs mechanizmusok szimultán működése [121]. Az áram inaktivációból való visszatérése lassú. A szívizomban az I_{Ca} az extracelluláris térből történő kalciumbelépés fő mechanizmusa. Az intracelluláris kalciumszint emelkedése a ryanodin receptorokon keresztüli Ca^{2+} felszabadulást vált ki a szarkoplazmatikus retikulumból (SR). A szabad intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) következményes növekedése lehetővé teszi a kalcium kötődését a troponin C myofilament fehérjéhez, ami beindítja a kontraktilis fehérjék működését [115]. A relaxációhoz a $[Ca^{2+}]_i$ -nak csökkennie kell, hogy a kalcium leválhasson a troponin C-ről. Diasztolében az intracelluláris kalcium jelentős része a SR Ca^{2+} -ATP-áz által visszapumpálódik az SR-be, ezenkívül a sejtmembrán Na^+/Ca^{2+} exchanger és Ca^{2+} -ATP-áz működése valamint a mitokondriális Ca^{2+} uniport révén képes még a kalcium elhagyni a citoplazmát [116]. Az L-típusú kalciumcsatorna a négy transzmembrán doménből álló pórusformáló α_1 alegységén kívül egy-egy α_2 , β és δ modulációs funkcióval bíró alegységet is tartalmaz [124]. A kalciumcsatornát a nátriumcsatornáéhoz képest bonyolultabb kapuzási technika jellemzi. Mielőtt kinyílna, a csatornafehérjének több zárt állapotot kell keresztülhaladnia. Jellemző gátlószerei a nifedipin-származékok, a verapamil és a diltiazem.



6. ábra. A szívizom elektro-mechanikai csatolása, valamint az akciós potenciál, a Ca²⁺ tranziens és a kontrakció időbeli lefutása nyúl kamrai szívizomsejtekben. NCX: Na⁺ Ca²⁺ exchanger; PLB: foszfolambán, RYR: rianodin receptor, SR: szarkoplazmatikus retikulum (Bers, 2002 nyomán) [125].

A repolarizáció alatt aktiválódó késői egyenirányító káliumáram háttérében legalább két különböző, eltérő kinetikájú áram volt kimutatható [126-128]. Ezek közül legfontosabbak az áram gyors (I_{Kr}) és a lassú (I_{Ks}) komponense, melyek aránya és denzitása fajonként, sejtípusonként, a kamrákban transmuralisan valamint az apico-basalis tengely mentén is változó. A fiziológias kamrai repolarizációban fő szerepet játszó I_{Kr} áramért felelős csatornákat a pórusformáló HERG alegység és az ehhez kapcsolódó regulatórikus alegység, a MIRP1 fehérjék alkotják [129-131]. Az I_{Kr} -40 mV membránpotenciál felett kb. 50 ms-os időállandóval aktiválódik. Deaktivációs időállandójuk igen lassú, másodperces tartományban van. C-típusú inaktivációja következtében a csatorna markánsan befelé egyenirányító. Szelektív gátlószere a dofetilid, a d-sotalol és az E4031

kódjelű vegyület [132]. Az I_{kr} az akciós potenciál platófázisában fokozatosan aktiválódik, majd az aktivált csatornák csaknem azonnal inaktiválódnak. Ezt követően csak a terminális repolarizáció során térnek vissza inaktivált állapotukból, lehetővé téve a repolarizáció felgyorsulását [133].

A KVLQT1 és a minK alegységek együttesen alkotják az I_{ks} áramot létrehozó csatornát. Emberi szíven az I_{ks} a plató alatt -20 mV feletti membránpotenciál tartományban nagyon lassan aktiválódik, majd viszonylag gyorsan, néhány száz ms alatt deaktiválódik. Az I_{ks} aktiválódásának az akciós potenciál megnyúlása esetén a további extrém megnyúlás megelőzésében tulajdonítanak szerepet. Az I_{ks} -t jelen ismereteink szerint inkább a repolarizációs rezerv részeként képzeljük el, mint a repolarizációt vezérlő áramként [134, 135]. Inaktivációs kapuzó mechanizmusa nincs, szelektív gátlószere a chromanol 293B [132]. Egyes feltételezések szerint magasabb szívfrekvenciáknál egy gyors aktivációt lehetővé tevő zárt állapotban akkumulálódnak a csatornák, ami lehetővé tenné a gyorsabb aktivációt a plató során [136].

Az I_{kr} és az I_{ks} áramok létrehozásáért felelős gének különböző mutációi a megnyúlt kamrai repolarizációval, és a polimorf kamrai tachycardia nagy kockázatával járó long-QT szindróma különböző formáit hozzák létre. Számos, köztük sok nem antiarrhythmias gyógyszer is gátolja a HERG csatornát, a long-QT szindróma szerzett formáját hozva létre. Krónikus szívelégtelenségben vagy hipertrófiás szíven a csatornák down-regulációja következtében csökkenhet a repolarizációs rezerv, ami fokozott proarrhythmias kockázatot hordoz [103].

Az I_{k1} befelé egyenirányító káliumáram az akciós potenciálok közötti, erősen negatív nyugalmi membránpotenciál kialakításáért felelős áram. Legfőbb jellemzője a befelé történő egyenirányítás, amit a csatorna intracelluláris magnézium- és kalciumionok okozta gátlásának tulajdonítanak. Az áram egyenirányító sajátsága teszi lehetővé, hogy a csatornák a nyugalmi potenciál közelében nyitva legyenek, de depolarizáció hatására záródjanak. Az I_{k1} fontos szerepet játszik a terminális repolarizáció felgyorsításában és teljessé tételében is. Az áramot a Kir családba tartozó fehérjék közvetítik tetramer elrendezésben, kutyában és emberben a Kir2.1 a domináns izoforma. Az I_{k1} -nek nincs szelektív gátlószere, 50 μ M BaCl₂ alkalmazásával kielégítő gátlás érhető el [137].

1.8. A klinikumban használt új helyi érzéstelenítőszer

1.8.1. Ropivacain

A ropivacain, a levobupivacain propyl analógja (N-2,6-dimethylphenyl-1-propylpiperidine-2-carboxamid), a bupivacain szívre gyakorolt mellékhatásainak és fizikokémiai tulajdonságainak ismeretében az első olyan, kizárólag levoizomert tartalmazó hosszú hatású helyi érzéstelenítő, amelyet célzottan az alacsonyabb kardiotoxicitás reményében fejlesztettek ki. Kisebb zsíroldékonysággal és fehérjekötő képességgel valamint szignifikánsan rövidebb terminális fél életidővel rendelkezik, mint a bupivacain [138, 139]. Általánosan elfogadott, hogy hasonló anesztetikus potenciálja mellett a bupivacainhoz képest a kardiotoxicitás szempontjából biztonságosabban alkalmazható szer a regionális anesztéziában.

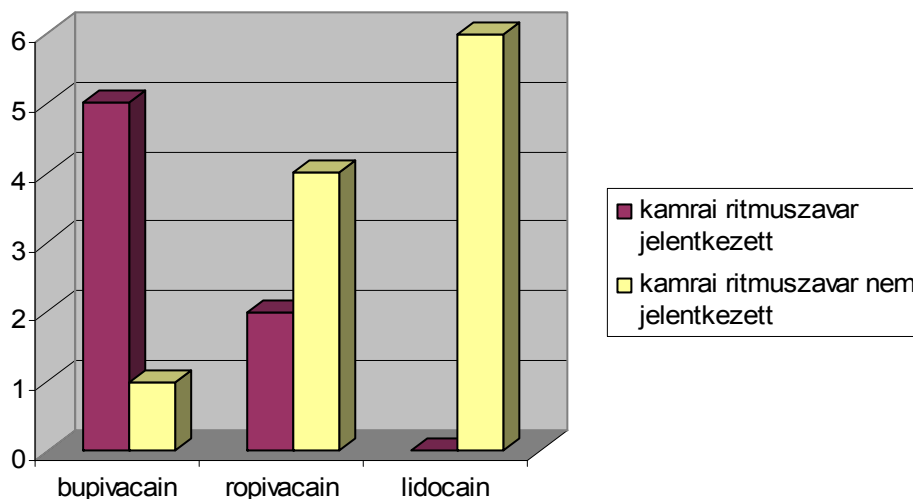
A ropivacain *n. ischiadicuson* vizsgálva hosszabb hatásúnak bizonyult, mint dextroizomerje vagy a racém vegyület, 0,25-1 %-os oldatát infiltrálva hatása tovább tartott, mint a bupivacainé. Idegtörzs-érezéstelenítés során egyforma hatékonyságú volt a bupivacainnal, epidurális és intrathecalis alkalmazása során, feltehetően a molekula rosszabb zsíroldékonysága miatt, hatása valamivel rövidebb ideig tartott, mint a bupivacainé [140]. *In vivo* körülmények között a ropivacain relatíve alacsonyabb motoros gátlás mellett csaknem azonos szenzoros hatást fejtett ki, mint a bupivacain, nem volt szignifikáns eltérés a gátlásból való visszatérés idejében sem, a szer koncentrációjának emelésével azonban mélyült a motoros gátlás [141, 142]. Más megfigyelések szerint az epidurálisan alkalmazott ropivacain motoros gátló potenciálja kisebb és hatástartama rövidebb volt, mint az azonos koncentrációjú bupivacainé. Perineuralis infiltrációban a motoros gátlás gyorsabban állt be a ropivacain esetében, a hatástartam rövidebb volt, azonban két szer hatékonyságában nem találtak eltérést és a ropivacain koncentrációjának növelése nem gyorsította tovább a hatás beálltát [139, 143, 144-146].

Klinikai alkalmazásuk során a bupivacain és a ropivacain hatásai között az enyhén különböző anesztetikus potenciáljuknak megfelelően minimális különbségeket találtak, azonban ekvipotens dózisban adva mindkét szer hasonló tulajdonságokkal rendelkezett [147,148]. *N. ischiadicuson* vizsgálva 7,5 mg/ml ropivacain és 5 mg/ml bupivacain azonos mennyisége bizonyult ekvipotensnek a szenzoros gátlás erősségét, az érzéstelenítő hatás kialakulásának gyorsaságát és

időtartamát tekintve, ez esetben a ropivacain plazmakoncentrációja szignifikánsan magasabb volt, mint a bupivacainé [149]. Spinális és epidurális érzéstelenítésben a ropivacain anesztetikus potenciálja 65 %-a, míg relatív motoros gátló potenciálja 59 %-a volt a bupivacainénak [150-153].

Széleskörű alkalmazása és alacsonyabbnak tartott kardiotoxikus potenciálja ellenére a ropivacain esetében is többször fordult elő központi idegrendszeri toxicitás [154-159], szívmegállás illetve súlyos arrhythmia [159-167]. E szövődmények többnyire nagy gyógyszer mennyiségek beadását igénylő eljárások során vagy érbe történő véletlen befecskendezés következtében alakultak ki, és a szükségessé váló reanimáció túlnyomórészt eredményes volt [161-168].

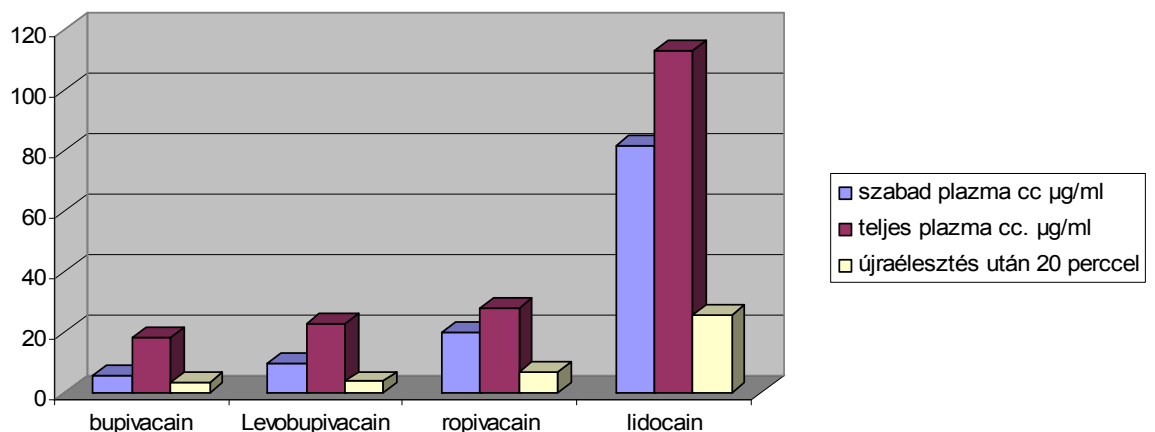
Önkéntesekben már az idegrendszeri toxicitás prodromális fázisában voltak jelei a vezetési sebesség és kontraktilitás csökkenésének, a tolerált dózis szempontjából a ropivacain 25 %-kal volt kevésbé toxikus a bupivacainnál, míg a szabad ropivacain maximális tolerálható szintje önkéntesekben a bupivacainénak kétszerese volt [96, 169]. Állatkísérletekben intravénás alkalmazást követően a ropivacain negatív inotróp és kronotróp hatását, valamint proarrhythmias potenciálját a bupivacainéhoz képest gyengébbnek találták [170, 171].



7.ábra. Kamrai ritmuszavarok jelentkezése a helyi érzéstelenítőszeres konvulzív adagjainak 2x-esét követően (Feldman és mtsai. 1989. nyomán) [172]

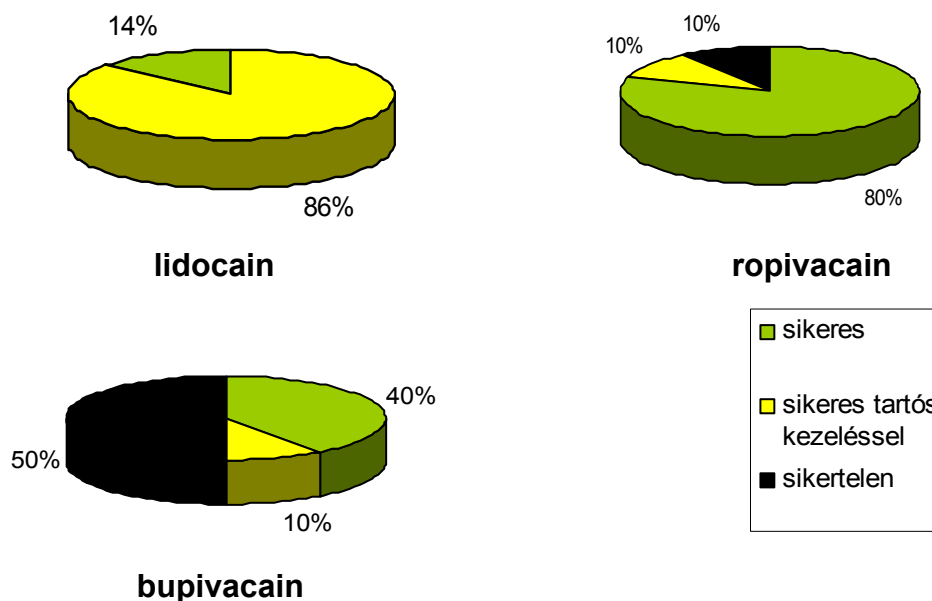
Különböző állatfajokból izolált szíven a ropivacain ugyancsak gyengébb negatív inotróp és kronotróp hatást mutatott, mint a bupivacain és kevésbé volt arrhythmogen [173-175]. A ropivacain ekvipotens adagjait tesztelve

megállapították, hogy a szer kevésbé kardiotoxikus, mint a bupivacain [176]. Más tanulmányok szerint, melyek anesztetikus potenciáljuk alapján hasonlították össze a vegyületeket, a szubletális dózisok alkalmazása mennyiségileg és minőségileg hasonló hemodinamikai változásokat okozott, [172,177], bár közvetlen a koszorúerekbe juttatva, a bupivacain erősebben gátolta a kamrai ingerületvezetést [178]. A bupivacain, a ropivacain és a lidocain sertésből izolált idegen mutatott relatív anesztetikus potenciáljuk arányában csökkentették a kontraktilitást. A QRS komplexum megnyúlása alapján meghatározott elektrofiziológiai toxicitási arányuk (bupivacain : ropivacain : lidocain)=15 : 6,7 :1 volt, míg a halálos dózis vonatkozásában a lidocain : bupivacain : ropivacain : arány 9:1:2 –nek adódott. A bupivacainnal szemben a ropivacain alkalmazása során ritkábban fordult elő kamrai ritmuszavar [179, 180]. Kutyában a ropivacain szélesebb terápiás indexet mutatott, mint a bupivacain [181].



8.ábra. Helyi érzéstelenítők szívmegállást okozó plazmakoncentrációi kutyában. A rangsor hasonló, mint az érzéstelenítő hatás tekintetében. (Groban és mtsai. 2001 nyomán) [181].

Mások - ezzel szemben - nem találtak lényeges különbséget a ropivacain és a bupivacain letális és konvulzív adagjaiban. A bupivacain és a ropivacain halálos dózisa és a QRS komplexum időtartamának megkettőződése alapján számított relatív kardiotoxikus potenciálját 2,1-nek határozták meg [182]. Bár mindkét szer magasabb koncentrációi szívmegállást okoztak, ez a ropivacain esetében jobban reagált a kezelésre, mint a bupivacainnal kiváltott szívmegállás [183].



9.ábra. A sikeres, a sikeres, de tartós epinephrin kezelést igénylő és sikertelen reanimáció aránya lidocain, ropivacain és bupivacain túladagolást követően kutyában (Groban és mtsai., 2001 nyomán) [181].

Amennyiben a szereket a *coronarian* keresztül juttatták bárányok szívébe, nem találtak szignifikáns eltérés a halálos dózis vonatkozásában a bupivacain és a ropivacain között: a kamrafibrilláció hasonló incidenciával jelentkezett [184]. Szemben a bupivacainnal - a ropivacainnal nem észlelték állatkísérletben a terhesség szisztémás toxicitást fokozó hatását. Ebből arra következtettek, hogy a ropivacain esetében a terhesség nem vezet a szabad gyógyszer koncentráció fokozódásához [185-187].

A ropivacain negatív inotrop hatása mellett use-dependens és feszültségfüggő módon csökkentette az akciós potenciál maximális depolarizációs sebességét. Ezen hatása gyengébb volt, mint a bupivacainé, de erősebb, mint a lidocainé [188, 189]. A ropivacain a lidocainhoz képest alacsonyabb frekvenciáktól kezdve csökkentette a depolarizáció sebességét. Ezzel összhangban, a csatornáról való leválási időállandóját sokkal hosszabbnak találták, mint a lidocainét, bár rövidebbnek, mint a bupivacainét [190]. Izolált nyúlszíven mindkét szer use-dependens és koncentrációfüggő módon csökkentette az ingerületvezetés sebességét [191].

A ropivacain több humán klónozott kardiális ioncsatorna működését is gátolja. Az I_{to} molekuláris alapját képező Kv4.3/KChIP csatornát 117 μ M félhatásos

koncentrációval jellemezhető módon gátolta [192]. A ropivacain a pitvari szívizom egyik fontos repolarizáló áramát, az I_{Kur} áramot mediáló humán Kv1.5 csatornára irányuló gátló hatását a kísérleti körülményektől függően 3-20-szor találták gyengébbnek, mint a bupivacain levo- és dextroizomerjeinek a hatását, a gátlás küszöbkoncentrációja magasabb volt a rutin klinikai alkalmazás során mért plazmaszinteknél [193]. A ropivacain toxikológiailag releváns koncentrációban, a bupivacainéval azonos potenciállal gátolta a humán I_{Kr} áram háttérében expresszált HERG csatornákat [194]. Tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken a ropivacain csökkentette az I_{Na} és a I_{Ca} áramok nagyságát, de nem befolyásolta szignifikánsan az I_K és I_{K1} áramokat [195]. Ezek az ioncsatornákra irányuló gátló hatások valószínűleg hozzájárulnak a ropivacain kardiotoxicitásához.

1.8.2. Articain

Az articaint (3-n-propiaminopropionylamido-2-carbomethoxy-4-methylthiophen hydrochlorid) racém keverék formájában ma is széles körben alkalmazzák fogászati érzéstelenítésre az 1976-ban történt klinikai bevezetése óta. Egyedülálló az amid típusú helyi érzéstelenítők között, mert egy a zsíroldékonyságot fokozó tiofén gyűrűt tartalmaz, észtercsoportja pedig lehetővé teszi az észterázok hatására bekövetkező hidrolízist a plazmában és a szövetekben a máj mikroszómális enzimjei által mediált biotranszformáción túlmenően [196]. Primer metabolitja az inaktív articainsav, amely az articainnal együtt a vesén keresztül ürül a szervezetből [197]. A szöveti észterázok általi metabolizmusa viszonylag könnyen telíthető, ami előnyös a szövetek közé infiltrált szer helyi hatásának fenntartásában [198].

Az articain széles körű elterjedését a fogorvosi gyakorlatban az érzéstelenítő hatás gyors kialakulásának, a megfelelő mélységű anesztéziának és alacsony toxicitásának köszönheti. Valamennyi fogászati érzéstelenítési protokollban, minden szempontból megfelelő fájdalommentességet biztosít [199-202]. Szupplementális intraosseális injekció formájában 86 %-os sikert értek el articainnal [203]. Bár *in vitro* körülmények között a 2% és 4% töménységű articain hatékonyabban gátolta az A-rostok akciós potenciáljának kialakulását, mint a hasonló töménységű lidocain és mepivacain oldat, a fogászati felhasználása során

a 4%-os articain oldat a 2 %-os lidocain oldattal mutatott azonos anesztetikus hatást. A hasonló hatáserősség mellett sem lokális, sem pedig egyéb mellékhatásaik vonatkozásában nem találtak számottevő eltérést [204-210]. Plazmafehérje-kötése 70 %-os, az articain jobban diffundál a csontba és légyszövetekbe, mint más anesztetikumok [206]. A felső állcsont alveolusaiban százszor magasabb lokális koncentrációban lehetett kimutatni, mint a szisztémás keringésben. Az articain eliminációs féleletideje 20 perc. Gyors lebontása lehetővé teszi a dózisok ismétlését és csökkenti a toxicitást [211].

Lényeges, hogy eddig az irodalomban nem jelent meg közlemény articain okozta szivmegállásról. Irodalmi adatok alapján fogászati alkalmazása során a kardiovaszkuláris rendszerre nem gyakorolt szignifikáns gátló hatást. Klinikai és önkénteseken végzett megfigyelések szerint 80 mg articain véletlen intravasculáris injekciója nem okozott egészséges egyéneken toxikus hatásokat. Egészséges idős önkéntesekben vizsgálva az articain metabolizmusa függetlennek bizonyult az életkortól, s bár a kisebb megoszlási térfogat miatt adott articain dózist követően magasabb szérumszint volt mérhető, nem kellett módosítani az idős betegek gyógyszeradagján [212]. Fiatal önkéntesekben sem a lidocain, sem az articain nem mutatott szignifikáns hatást a kardiovaszkuláris paraméterekre [213]. Állatmodellben sem észleltek súlyos toxicitást, a szöveti lokális toleranciát is jónak találták 25 ill. 40 mg/kg/nap adagok alkalmazása során patkányban és kutyában [214]. Intravénás regionális anesztézia során az érzéstelenítés beállta hamarabb jelentkezett az articain, mint a lidocain esetében, ugyanakkor azonos mértékű motoros blokádról számoltak be a prilocain, a lidocain és az articain használatakor [215]. Az articain teljes test clearance tízszer nagyobb, mint a lidocainé. A lidocainéhoz képest gyorsabb hatás, a rövidebb eliminációs idő, valamint az alacsony plazmakoncentráció miatt az ambuláns sebészet során alkalmazott regionális anesztéziában is előnyös lehet a használata [215-217].

Széleskörű alkalmazása ellenére az articain sejtszintű szívelektrófiológiai hatásai kevésbé ismertek. Egy korai közleményben csökkentette a nyúl kamrai akciós potenciáljának amplitudóját és a depolarizáció sebességét. A klinikai plazmaszintet tízszeresen meghaladó koncentrációban az articain szignifikánsan kisebb mértékben volt kardiodepresszív, mint a bupivacain ötszörös koncentrációban [218]. A HERG csatornákat a klinikailag releváns koncentrációkban nem gátolta az articain [219]. Kevés ismeret áll

rendelkezésünkre az articain más ingerlékeny struktúrákra kifejtett hatásainak vonatkozásában is. Nyúlból származó harántcsíkolt izomsejteken gátolta a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -függő ATP-áz aktivitását, csökkentve a kalciumionok kötődését a nagy affinitású transzport helyekhez, így csökkentette a Ca^{2+} -visszavétel sebességét [220, 221]. Mindez elhúzódó izomspazmushoz vezethet, ha a szer az izomba diffundál.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az articain és a ropivacain viszonylag rövid ideje használt érzéstelenítőszer a klinikai gyakorlatban. Széleskörű alkalmazásuk és általában alacsonyabbnak tartott kardiotoxikus potenciáljuk ellenére kevés releváns adat áll rendelkezésünkre celluláris szintű kardiális hatásaik vonatkozásában. Jelen vizsgálataink célja az articain és a ropivacain várható sejtszintű szívelektrofiziológiai hatásaira vonatkozó adatok nyerése kutyaszívből izolált kamrai izomsejteken, mivel a kutya szívizomsejtek elektrofiziológiai tulajdonságait tartják a leginkább hasonlónak a humán cardiomyocytákéhoz az ionáramok megoszlását és kinetikáját tekintve [222, 223].

Vizsgálataink során az alábbi fontosabb kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen koncentrációfüggő hatást gyakorol az articain és ropivacain a szívizomsejtek elektromos folyamataira?
2. Ezen belül hogyan befolyásolja az articain és a ropivacain az akciós potenciál alakját (korai repolarizáció mélysége, platófázis magassága) és jellegzetes paramétereit (amplitúdó, depolarizációs sebesség, időtartam) különböző ingerlő frekvenciák mellett?
3. Az akciós potenciál alakváltozásainak hátterében milyen, az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramok módosulása áll?
4. Milyen hatást gyakorol az articain és a ropivacain a myocardium kalcium-homeosztázisára (intracelluláris kalcium-tranziensek nagysága, a kalcium-felszabadulás és -felvétel sebessége) és kontraktilitására?
5. A többi, klinikai gyakorlatban használatos helyi érzéstelenítővel összehasonlítva milyen proarrhythmias kockázattal kell számolnunk rutin klinikai alkalmazásuk illetve véletlen intravascularis beadás esetén?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kamrai szívizomsejtek izolálása kutyából

A szívizomsejt preparátumokat vegyes nemű ivarérett kutyákból nyertük. Az állatokat 10 mg/kg dózisú ketamin hidroklorid és 1 mg/kg xylazin hidroklorid intravénás alkalmazásával altattuk el. A szíveket gyorsan eltávolítottuk és Tyrode oldatba helyeztük. A szívizomsejteket a szegmentális perfúziós technika alkalmazásával, enzimatis kezeléssel nyertük [223]. A bal elülső leszálló koszorúér (LAD) által ellátott kamrafalból egy ék alakot távolítottunk el, az eret kanüláltuk, majd a végágak szükség szerinti lezárását követően oxigenizált Tyrode oldattal perfundáltuk. A Tyrode oldat összetétele a következő volt: 144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES és 11 mM dextrose (pH=7,4). A perfúziót a koszorúér rendszerből a vér eltávolításáig folytattuk, majd áttértünk egy Ca²⁺-mentes tápoldattal végzett 5 perces perfúzióra. Ezt 1 mg/ml kollagenázzal (Worthington-II) és 0,2 % bovin szérum albuminnal kiegészített, 50 µM Ca²⁺ tartalmú oldattal végzett perfúzió követte 30 percig. A bal kamrafal megemésztett részeit kis kockákra vágtuk és az eljárás végén nyert sejtsuszpenziót többször átmosva a Ca²⁺-koncentrációt fokozatosan 2,5 mM-ra visszaállítottuk. A sejteket felhasználásukig 15 °C hőmérsékleten tároltuk.

3.2. Akciós potenciál elvezetése intracelluláris mikroelektróda technikával

Valamennyi elektrofiziológiai mérést 37 C° hőmérsékleten végeztük. Az egyértelmű harántcsíkolatot mutató, téglalap alakú, élő sejteket egy oxigenizált Tyrode oldattal folyamatosan átáramoltatott mérőkádban ülepítettük. Az akciós potenciál elvezetését 3M kálium-kloriddal töltött, 20 és 40 MOhm közötti ellenállású, hegyes üveg mikroelektródák segítségével végeztük, amelyeket Axoclamp 2B típusú erősítő bemenetéhez kapcsoltunk. A sejteket az elektródán keresztül 1 Hz frekvenciával folyamatosan ingereltük 1 ms időtartamú négyszög alakú impulzusokkal. Ilyen kísérleti feltételek mellett az akciós potenciál időtartamának időfüggő változásai 60 percen belül elhanyagolható mértékűek [224]. Az articain és a ropivacain koncentrációfüggő hatásainak vizsgálatokor a

szerek koncentrációját kumulatív módon növeltük 1-300 μM között. Valamennyi koncentrációt 3 percig alkalmaztunk, az ezt követő mosás 10 percig tartott. Ezek az inkubációs periódusok és kimosási periódusok elegendőek voltak a steady-state szerhatások teljes kialakulásához illetve azok gyakorlatilag teljes reverzibilitásához. A frekvenciafüggő mérések esetén 5 s ciklushosszon kezdtük az ingerlést, majd a ciklushosszat több lépésben csökkentettük, minden frekvencián legalább 5 perc időt hagyva az egyensúly beálltához. Az akciós potenciálokat 200 kHz-en Digidata 1200 típusú analóg-digitális konverter segítségével digitalizáltuk és az analízisig számítógép merevlemezén tároltuk.

3.3. Ionáramok mérése konvencionális voltage clamp technikával

A sejteket oxigenizált Tyrode oldattal perfundáltuk 37 °C hőmérsékleten. Káliumáramok mérésekor a pipettában lévő belső oldat összetétele a következő volt: 100 mM K-aszpartát, 45 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 10 mM EGTA, 3 mM K-ATP, míg a kalciumáram mérése esetén: 110 mM KCl, 40 mM KOH, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 20 mM TEA-klorid és 3 mM K-ATP (pH=7.2 mindkét esetben). A pipettaoldattal való feltöltést követően a boroszilikát üvegpipetták ellenállása 2 M Ω volt. A membránáramokat Axopatch 2B erősítővel vezettük el a patch clamp technika teljes sejt konfigurációját használva [225]. Miután enyhe szívással 1-10 G Ω ellenállású kapcsolatot, ún. gigaseal alakítottunk ki, az elektróda hegye alatt lévő membránt további szívással vagy rövid elektromos impulzusokkal felszakítottuk. A soros ellenállás jellegzetesen 4-8 M Ω volt, amit a mérés előtt általában 50 és 80% közötti szinten kompenzáltunk. Minden olyan kísérletet kihagytunk az értékelésből, mely során a soros ellenállás magas volt vagy a mérés alatt jelentősen növekedett. A mintavételezést az Axon pClamp 6.0 program segítségével végeztük 100 kHz frekvencián. A mért ionáramokat valamennyi esetben a sejt kapacitására normalizáltuk, melyet minden sejten egy -10 mV-ról -20 mV-ra történő rövid hiperpolarizáló impulzus segítségével határoztunk meg.

3.4. Ionáramok mérése akciós potenciál clamp technikával

A gigaseal kapcsolat kialakítása után, a sejtbe való betörést követően a Tyrode oldattal szuperfundált szívizomsejtekről az akciós potenciálokat áram

clamp üzemmódban vezettük el. Ilyenkor a pipetta feltöltéséhez használt oldat összetétele megegyezett a káliumáram mérésekor használt folyadékéval. A sejteket az elektródán keresztül folyamatosan 1 Hz frekvenciával ingereltük oly módon, hogy legalább 1-2 ms eltérés legyen a stimulus artefaktum és az akciós potenciál felszálló ága között. Minden sejtről 10 egymást követő akciós potenciált vezettünk el, amelyeket digitalizáltunk és on-line átlagoltunk. Ezt az átlagolt jelet, mint parancsjelet alkalmaztuk ugyanazon sejten változatlan frekvenciával, miután az erősítőt feszültség clamp üzemmódba kapcsoltuk. Az ilyen körülmények között elvezetett áramjel a nulla szint közelében futó vízszintes vonal volt, leszámítva az akciós potenciál felszálló szárának megfelelő rövid szakaszt, ahol a feszültségkontroll nem volt megfelelő [226]. Valamely ionáram vizsgálatakor az adott áram specifikus gátlószerét alkalmaztuk. Ilyenkor a vizsgált áramot az erősítőnek kell pótolnia, ami membránáramként jelenik meg, az eredetivel ellentétes előjellel. Ezt az analízis során a konvencionális polaritásnak megfelelően megfordítottuk.

Az articaint és a ropivacaint kumulatív módon 10 μM és 1000 μM közötti koncentrációkban alkalmaztuk. A szerek által gátolt ionáramokat úgy határoztuk meg, hogy a szer hozzáadása után nyert áramgörbéből kivontuk a szer adása előtt elvezetett áramjelet. Ez a művelet három, jól elkülönülő csúccsal jellemezhető összetett áramprofil eredményezett: a legkorábban jelentkező kifelé irányuló áramcsúcsot I_{to} -ként, az ezt követően kialakuló befelé irányulót I_{Ca} -ként, míg a terminális repolarizációval szinkron megjelenő késői kifelé irányuló áramcsúcsot az I_{Kr} és I_{K1} keverékeként azonosítottuk.

3.5. A kontraktilis erő mérése

Az 1 mm-nél kisebb átmérőjű vékony kamrai trabekulákat folyamatosan perfundáltuk 37 °C hőmérsékletű Krebs oldattal, amelynek összetétele a következő volt: 120 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 2,7 mM CaCl₂, 1,1 mM MgCl₂, 1,1 mM NaH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃ és 5,5 mM glükóz. Az oldatot 5% CO₂ tartalmú karbogénnel buborékolattuk, ezáltal a pH-t 7,4 \pm 0.05 értékre állítottuk be. A kontrakciós erőt egy mikromanipulátorhoz rögzített kapacitív mechano-elektromos transzducer segítségével vezettük el. Valamennyi preparátum a maximális erőt eredményező nyugalmi hosszra lett beállítva. A preparátumokat a mérés előtt 60

percig hagytuk stabilizálódni 0,5 Hz ingerlő frekvencia mellett. Az articain és ropivacain kumulatív módon növekvő koncentrációit (minden koncentrációt 20 percig) alkalmaztuk, majd a sejteket 60 percig Tyrode oldattal mostuk.

Az adatokat 1 kHz mintavételi frekvencia mellett Digidata 1200 analóg-digitális konverter segítségével digitalizáltuk, majd számítógép merevlemezén rögzítettük, ahol azokat a későbbi feldolgozásig tároltuk.

3.6. Az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek elvezetése

A sejten belüli szabad Ca^{2+} -koncentráció változásait egy ratiometriás alapú kalciumszenzitív festék, a Fura-2 fluoreszcenciájának követésével határoztuk meg 37 °C hőmérsékleten [227]. A szegmentperfúziós technika segítségével nyert izolált szívizomsejteket szobahőmérsékleten 3 μ M Fura-2-acetoximetilésztert tartalmazó Tyrode oldatban, Pluronic F-127 jelenlétében inkubáltuk 10 percig. Ezután, valamint a festék legalább 30 percig tartó deészterifikációját követően a sejteket a felhasználásig 15 C°-on tároltuk. A feltöltött sejteket fluoreszcens invert mikroszkóp (Nikon, Eclipse TE-2000-U) tárgyasztalára helyeztük, amely PTI DeltaScan típusú fluoriméterrel volt összekapcsolva. A sejteket platinából készült elektródapár segítségével 1 Hz frekvenciával ingereltük. A festéket xenon-ívlámpából származó 340 és 380 nm hullámhosszúságú fénysugarakkal gerjesztettük, az emittált fényt 510 nm-en monitoroztuk Hamamatsu Photonics R1527P típusú fotoelektron-sokszorozó segítségével. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} -szinteket a nem specifikus háttér fluoreszcencia korrekcióját követően, a 340 és 380 nm hullámhosszakon történt gerjesztés után kapott fluoreszcencia intenzitások hányadosával határoztuk meg, mindig 10 egymást követő $[Ca^{2+}]_i$ -tranzienst átlagolva össze. Az articain és ropivacain kumulatív módon növekvő koncentrációit (minden koncentrációt 3 percig) vizsgáltuk, majd a sejteket 10 percig Tyrode oldattal mostuk.

3.7. A nehéz SR vezikulák preparálása

A szarkoplazmatikus retikulum terminális ciszternáinak membránjából lefűződött nehéz SR vezikulákat Lai és Meissner módszerének kisebb módosításával izoláltuk kutya bal kamra izomzatából [228, 229]. A szövetminták

homogenizációját 100 mM NaCl, 20 mM EGTA és 20 mM HEPES tartalmú oldatban végeztük (pH=7,5). A 4500 g-n végzett centrifugálást követően a nyers mikroszómákat a felülúszóból 40000 g-n végzett centrifugálással tovább tisztítottuk. Az aktomiozin szennyeződést 600 mM KCl oldatban végzett oldással távolítottuk el, a mikroszóma frakciót 109000 g-n centrifugálással nyertük. A pelletet újraszuszpendáltuk, majd 20-45 %-os lineáris cukorgrádiensre rétegeztük. A nehéz SR vezikulákat a folyamatos cukorgrádiens 36-38 %-os régiójából nyertük, majd 0,4 M cukorban és 10 mM K-PIPES-ben (pH=7,0) reszuszpendáltuk. A preparátumban a fehérje koncentrációját Biuret módszerrel határoztuk meg.

3.8. Az ATP-áz aktivitás meghatározása

Az ATP-áz aktivitást kapcsolt enzim assay technikával mértük 37 °C hőmérsékleten 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCL, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 0,42 mM foszfo-enolpiruvát, 1 μM calcimycin (A23187), 0,2 mM NADH, 7,5 U/ml piruvátkináz és 18 U/ml laktátdehidrogenáz tartalmú közegben (pH=7,5). A Ca²⁺ ATP-áz működése során ATP-t hasít. A keletkező ADP jelenlétében a foszfoenolpiruvát a piruvátkináz enzim révén piruváttá alakul. A következő reakcióban a piruvátból laktát keletkezik a laktát dehidrogenáz enzim hatására, miközben a NADH-ból NAD⁺ szabadul fel. A teljes hidrolitikus aktivitást a NADH elnyelési hullámhosszánál (340 nm) észlelt fényintenzitás változásaként mértük és μmol P_i/mg fehérje/perc aktivitásegységet jelentő nemzetközi egységben fejeztük ki. A nehéz SR vezikulák teljes hidrolitikus aktivitása 2,7 - 2,82 IU között mozgott, a Ca²⁺-függő ATP-áz aktivitást a teljes hidrolitikus aktivitás 5 mM thapsigargin által gátolt részeként definiáltuk. A szert 5 perccel az enzimaktivitás mérés kezdete előtt adtuk a preparátumhoz. A vizsgálatot Ca²⁺ és EGTA adott keverékének jelenlétében végeztük, amellyel a becsült szabad Ca²⁺-koncentrációt a maximális SERCA aktivitást kiváltó 2,4 μM értékre állítottuk be.

3.9. A kalciumfelvétel és - felszabadulás mérése a nehéz SR vezikulákon.

A szarkoplazmatikus retikulum nehéz vezikuláiba történő Ca²⁺-felvétel és felszabadulás meghatározását a Ca²⁺-érzékeny antipirilazo III festék segítségével

végeztük. Az elnyelést 710 nm-en SPEX spektrofotométerrel mértük. A Ca^{2+} -felvétel mérésekor a vezikulákat artocain vagy ropivacain jelenlétében aktívan töltöttük fel Ca^{2+} -mal 37 °C hőmérsékleten 100 mM KCl, 7,5 mM Na-pirofoszfát, 20mM MOPS, 1mM ATP/MgCl₂ és 0,25 mM antipirilazo III tartalmú pufferban. A feltöltést 100 μM CaCl₂-nak a közeghez adása indította el, a felvétel sebességét az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentráció csökkenéseként monitoroztuk. Az abszorpciós szignált CaCl₂ ismételt hozzáadásaival kalibráltuk.

A Ca^{2+} -felszabadulás mérésekor a vezikulákat 200 μM CaCl₂ jelenlétében egy éjszakán át inkubálva, passzív módon töltöttük fel Ca^{2+} -mal. A mintát úgy hígítottuk, hogy 10 mg/ml fehérje koncentrációt kapjunk. A Ca^{2+} -felszabadulást artocain illetve ropivacain adott koncentrációival történt 5 perces előinkubációt követően 0,3 mM timol hozzáadása indította el. A Ca^{2+} - felszabadulás kezdeti sebességét az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentráció növekedéséből határoztuk meg.

3.10. Statisztikai elemzés

A mérések során nyert adatokat átlagoltuk és kiszámítottuk a standard errorrt (SE). Az átlagértékek különbségeinek megítélésére ANOVA-t és Student-féle t próbát illetve Dunnett tesztet használtunk. A kapott eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A kumulatív dózis-hatás görbéket az adatok Hill egyenlettel történő illesztésével nyertük, Microsoft Origin 6.0 program felhasználásával. Az ábrákon a mért értékek átlagát és a hozzájuk tartozó standard errorrt tüntettük fel, a csillag a szignifikáns eltérést jelölik.

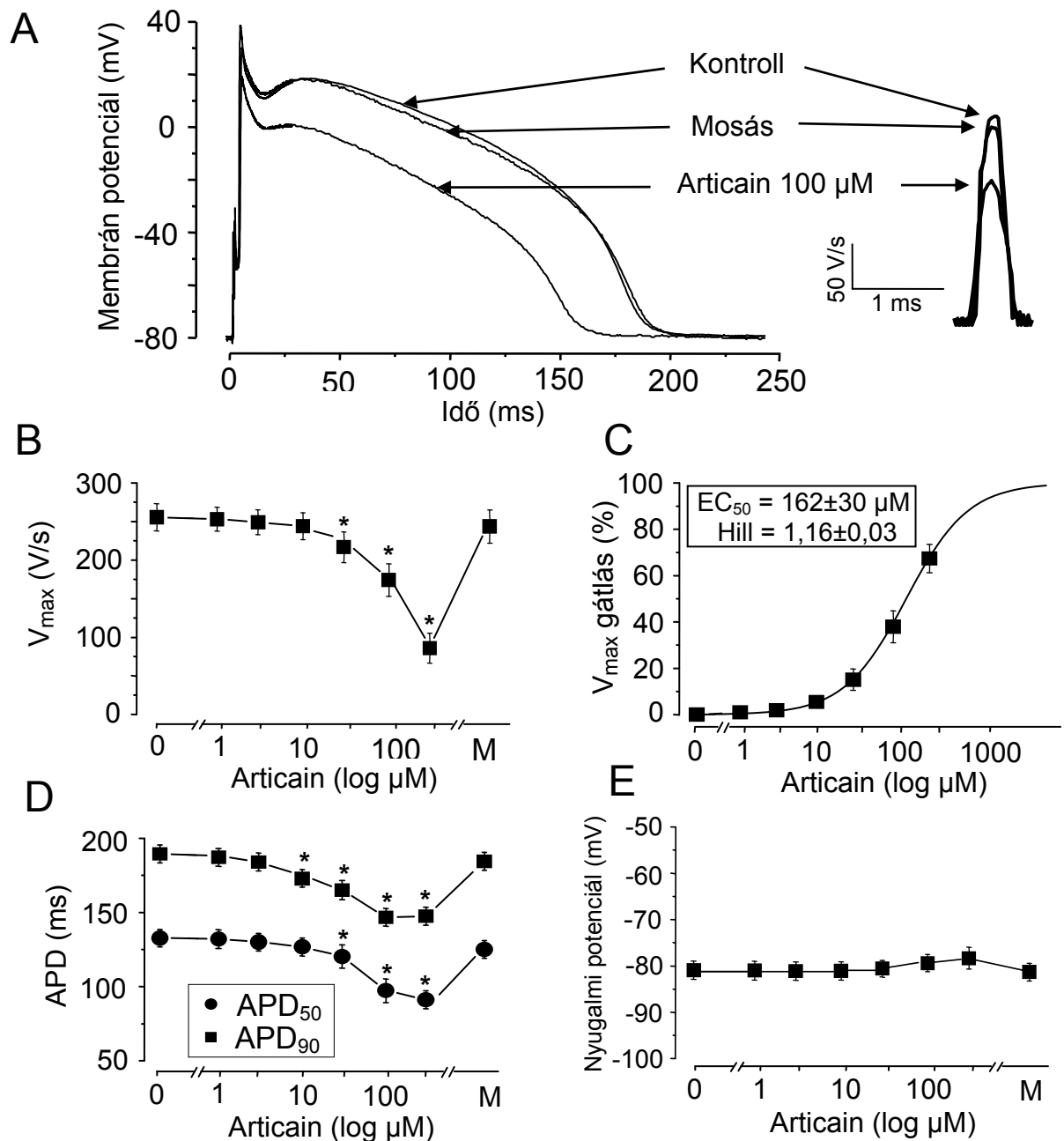
3.11. Vegyszerek

Az artocaint (Ultracain 5 ml 2 %-os oldat) az Aventis Pharma Deutschland GmbH-től szereztük be. A ropivacaint (Naropin 20 ml 7,5 mg/ml) az AstraZeneca AB-től vásároltuk és a felhasználás napján frissen készítettük Tyrode oldattal a végső koncentrációig hígítva. A többi vegyszer a Sigma Aldrich Co.-tól származott.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az articain hatása az akciós potenciál paramétereire

A kutyaszívből izolált, állandó 1Hz frekvencián ingerelt kamrai szívizomsejteken az articain koncentrációfüggő módon megváltoztatta az akciós potenciál alakját és jellemző paramétereit. Az articain csökkentette az akciós potenciál amplitúdóját, a depolarizáció maximális sebességét és a korai repolarizáció amplitúdóját, rövidítette az akciós potenciál időtartamát és platófázisának depresszióját okozta (10. ábra). Ezek közül az akciós potenciál időtartamának a rövidülése és a V_{max} csökkenése 10 μM illetve 30 μM koncentrációktól volt szignifikáns. A V_{max} értékeket a Hill egyenlethez illesztve $162 \pm 30 \mu\text{M}$ EC_{50} félgátló koncentrációt, és $1,16 \pm 0,03$ Hill koefficienszt kaptunk a vizsgált 5 szívizomsejt átlagában. A fenti hatások mindegyike reverzibilisnek bizonyult 5 perc articain-mentes Tyrode oldattal történő kimosást követően. Bár az articain nem okozott statisztikailag szignifikáns változásokat a sejtek nyugalmi membrán potenciáljában, magasabb koncentrációknál (100 és 300 μM) depolarizációs tendencia volt megfigyelhető.



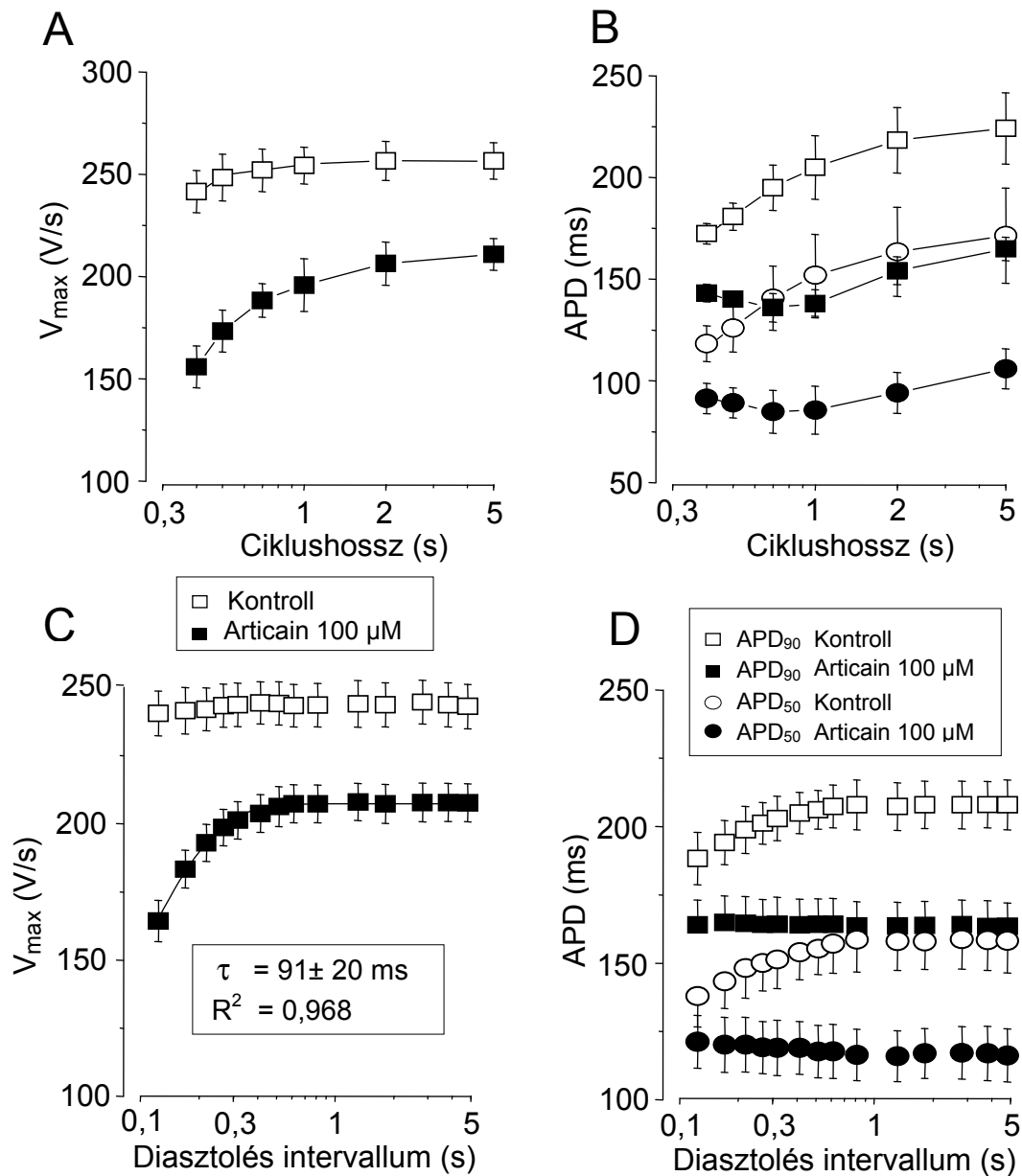
10. ábra. A: 100 μ M articain hatása az akciós potenciál alakjára. A jobb oldali ábrán a membránpotenciál változások idő szerinti első deriváltja látható az akciós potenciál kezdeti szakaszán. **B, D, E:** az articain kumulatív koncentrációfüggő hatása a depolarizáció maximális sebességére (V_{max}), a repolarizáció 50%-os és 90%-os szintjénél mért akciós potenciál időtartamra (APD_{50} és APD_{90}) valamint a nyugalmi membránpotenciálra. (M): kimosás. **C:** az articainnak a V_{max} -ra vonatkozó kumulatív dózishatás görbéje. Az egyes koncentrációk által kiváltott V_{max} gátlást a teljes gátlás %-ában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. $n = 5$.

4.2. Frekvenciafüggő sajátosságok

Mind a V_{\max} értékének csökkenése, mind az akciós potenciál időtartamának artocain okozta megrövidülése frekvenciafüggő volt (**11. A és 11. B ábra**). Míg az első hatás a magasabb frekvenciánál volt kifejezettebb (normál frekvenciafüggés), addig az utóbbi az alacsonyabb frekvenciák mellett volt hangsúlyosabb (fordított frekvenciafüggés). Mindkét tulajdonság jellemzője az ioncsatorna gátlóknak, beleértve számos helyi érzéstelenítőt.

Meghatározzuk a V_{\max} és az akciós potenciál időtartamának restitúciós kinetikáját is. Ezen vizsgálatok során a sejteket 1 Hz frekvenciával 20 alapstimulusból álló ingersorozattal ingereltük. Valamennyi sorozatot egyetlen extrastimulus követett folyamatosan növekvő kapcsolási intervallumokkal. Az extrastimulust követően az alap ingersorozatot megismételtük. Így minden huszadik alap akciós potenciált egy-egy extra akciós potenciál követett, egyre hosszabb diasztolés időközökkel. A diasztolés intervallumot a sorozat utolsó alap akciós potenciáljának 90 %-os repolarizációs szintjétől az extra akciós potenciál felszálló száráig eltelt időként definiáltuk.

A restitúciós görbéket az extra akciós potenciálokhoz tartozó V_{\max} és APD értékeknek a megfelelő diasztolés intervallum függvényében való ábrázolásával nyertük. A leghosszabb, 5 s időtartamú diasztolés időközöt követően mért $16,2 \pm 2$ %-os tónusos V_{\max} -gátlás mellett egyre kifejezettebb frekvenciafüggő gátlás alakult ki a diasztolés intervallumok rövidülésével. A frekvencia-függő V_{\max} -gátlás offset kinetikáját az artocain mérési eredmények alapján monoexponenciális függvény illesztésével határoztuk meg. Az artocain leválási időállandója 92 ± 20 ms-nak adódott (**11. C ábra**). Ez kisebb, mint amit más helyi érzéstelenítő szerek esetében tapasztaltak. Az akciós potenciál időtartamának restitúciós görbéi artocain jelenlétében laposak voltak. Ez arra utal, hogy a különböző diasztolés időközöket követően kiváltott akciós potenciálok időtartama részlegesen elvesztette a normál Tyrode oldatban észlelt természetes frekvenciafüggő sajátosságát (**11. D ábra**).



11. ábra. A,B: 100 μ M articain frekvenciafüggő hatása a depolarizáció maximális sebességére és az akciós potenciál időtartamára steady-state körülmények között (n=5). **C, D:** a V_{max} illetve az akciós potenciál időtartamának (APD₅₀ és APD₉₀) restitúciós kinetikája kontroll körülmények között, valamint 100 μ M articain jelenlétében (n=6). A **C** ábra folytonos vonalát exponenciális illesztéssel nyertük.

4.3. Az articain hatása a szívizomsejtek ionáramaira konvencionális voltage clamp körülmények között

Ezekben a kísérletekben az articain koncentrációfüggő hatásait tanulmányoztuk a szívizomsejtek egyes ionáramaira konvencionális feszültség clamp technikával, kumulatív módon növelve a szerkoncentrációt a 10 és 1000 μM közötti tartományban. Eredményeinket a **12. ábrán** összegezzük.

Az L típusú Ca^{2+} -áramot (I_{Ca}) a sejtek -40 mV tartó potenciálról $+5$ mV-ra történő, 200 ms hosszúságú depolarizációjával aktiváltuk. Ezekben a kísérletekben a Tyrode oldat 3 mM 4-aminopyridin, $1\mu\text{M}$ E 4031 és 30 μM chromanol 293B elegyét tartalmazta a különböző káliumáramok gátlása céljából. Az articain koncentrációfüggő módon gátolta a Ca^{2+} -áramot (**12. A ábra**), mely gátló hatást 471 ± 75 μM EC_{50} és $1,07\pm 0,14$ Hill koefficiens értékekkel jellemeztünk az adatok Hill egyenlethez történő illesztésével.

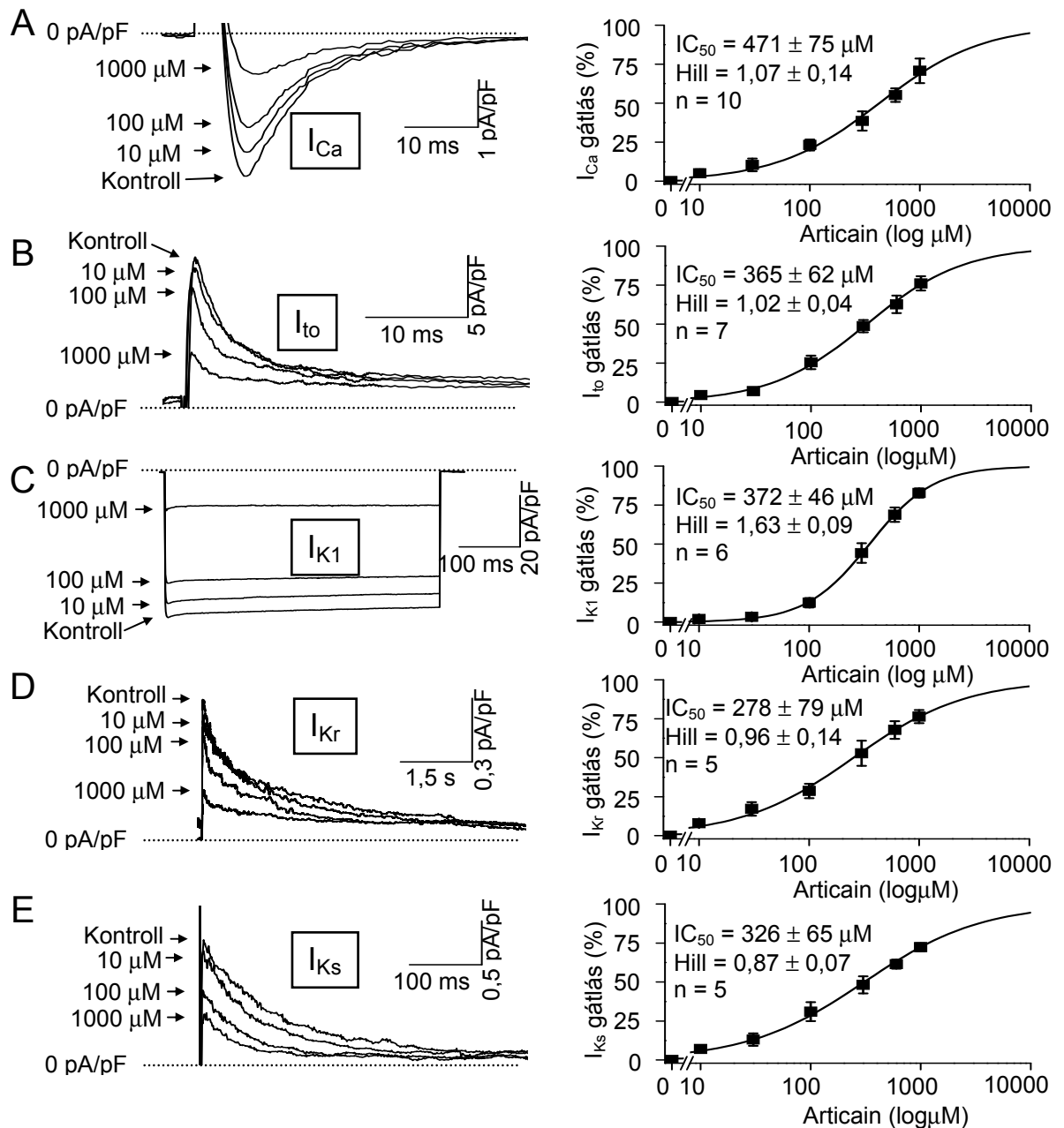
A tranzienst káliumáramot (I_{to}) a -80 mV-on tartott sejtek 200 ms időtartamú, $+50$ mV-ra történő depolarizálásával aktiváltuk. Minden tesztimpulzust egy-egy 5 ms időtartamú -40 mV-ra történő depolarizáció előzött meg a gyors Na^+ -áram inaktiválása céljából, míg a Ca^{2+} -áramot 1 μM nisoldipin hozzáadásával gátoltuk. Az articain koncentrációfüggő módon gátolta az I_{to} áramot (**12. B ábra**), mely gátló hatást 365 ± 62 μM EC_{50} és $1,02\pm 0,04$ Hill koefficiens értékekkel írtunk le a vizsgált 7 szívizomsejt átlagában.

A befelé egyenirányító káliumáramot (I_{K1}) a -80 mV-on tartott sejtek -135 mV-ra történő hiperpolarizációjával vizsgáltuk. A steady-state áramot 400 ms után határoztuk meg. Az articain $\text{EC}_{50} = 372\pm 46$ μM félgátló koncentrációval valamint $1,63\pm 0,09$ Hill koefficienssel jellemezhető módon gátolta az I_{K1} áramot a hat vizsgált szívizomsejtben (**12. C ábra**).

A késői egyenirányító káliumáram gyors komponensét (I_{Kr}) a -80 mV potenciálon tartott sejtek $+40$ mV-ra történő 1 s időtartamú depolarizációjával aktiváltuk. Az áram nagyságát a -30 mV-ra történő repolarizációt követően rögzített farokáram amplitúdójával jellemeztük. E kísérletekben a Ca^{2+} -áramot 1 μM nisoldipinnel, míg a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensét 30 μM chromanol 293 B-vel gátoltuk. Amint a **12. D ábra** mutatja, az I_{Kr} farokáramok amplitúdói progresszíven csökkentek az articain egyre növekvő koncentrációinak

hatására. Az 5 vizsgált sejt átlagában az EC_{50} értéke $278 \pm 79 \mu\text{M}$, a Hill-koefficiens nagysága $0,96 \pm 0,14$ volt.

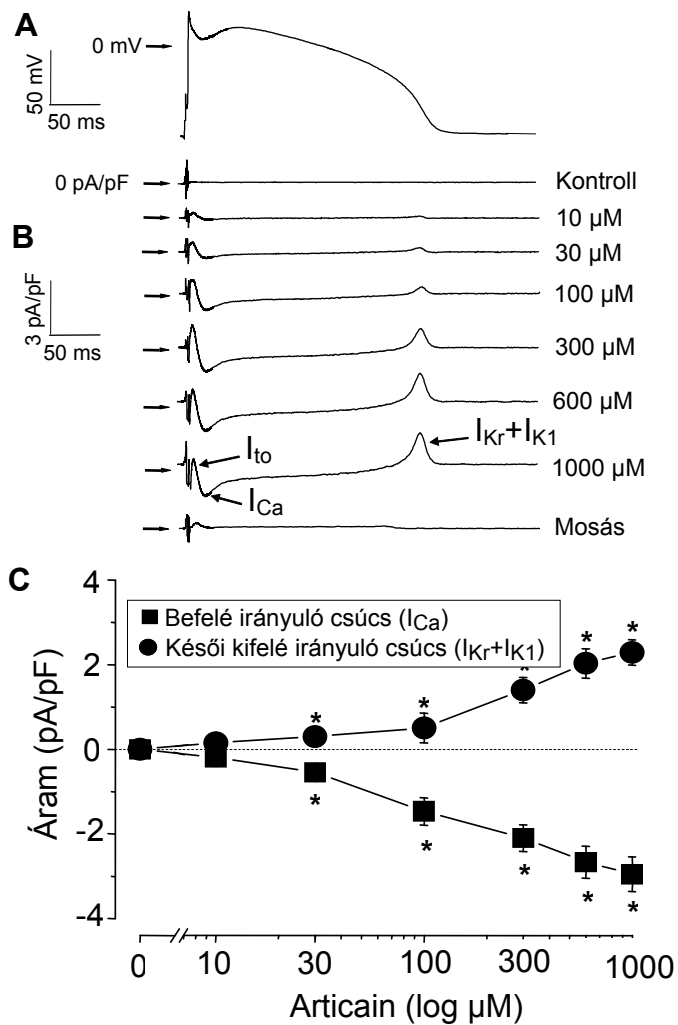
A késői egyenirányító kálium áram lassú komponensét (I_{Ks}) szintén farokáramként értékeltük. Az áramot a sejtek 3 s hosszú, +50 mV-ra történő depolarizálásával aktiváltuk, a farokáram amplitúdóját repolarizációt követően a -40 mV tartópotenciálon mértük. A Ca^{2+} -áramot $1 \mu\text{M}$ nisoldipin, az I_{Kr} áramot $1 \mu\text{M}$ E4031 segítségével gátoltuk. Az I_{Ks} gátlás vonatkozásában a félgátló koncentráció $326 \pm 65 \mu\text{M}$, a Hill koefficiens $0,87 \pm 0,07$ volt a vizsgált 5 sejt átlagában (12. E ábra).



12. ábra. Az articain koncentrációfüggő hatása a kamrai szívizomsejtek legfontosabb ionáramaira konvencionális voltage clamp körülmények között. A bal oldali ábrák kontroll esetben, 10, 100 és 1000 μ M articain jelenlétében mért áramokat mutatnak be egy-egy az átlagot jól reprezentáló kísérletben. Az áramerősség értékeket az adott sejt kapacitására normalizáltuk. A jobb oldalon az articain különböző ionáramokra vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje látható. Az egyes articain koncentrációk okozta csúcsáram gátlást minden áram esetében a teljes gátlás %-ában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. n= a vizsgált sejtek száma

4.4. Az articain ionáramokra gyakorolt hatása akciós potenciál clamp körülmények között

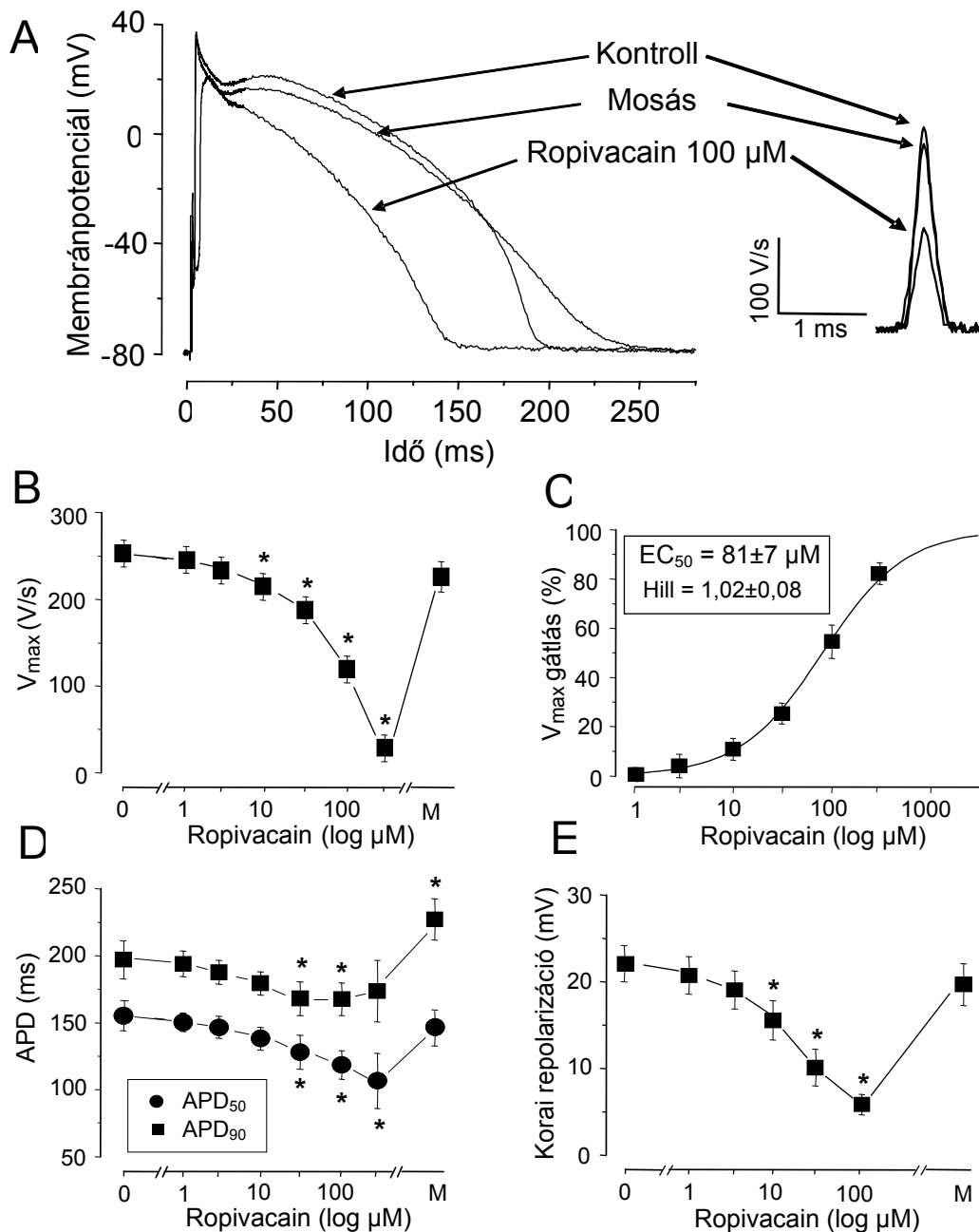
A konvencionális és az akciós potenciál clamp technikákkal összehasonlítva egy ionáram profilja jelentősen különbözhet [230]. Az akciós potenciál clamp technika előnye, hogy az valamely szernek a nettó membránáramra gyakorolt hatását rögzíti, így módon szerencsés esetben több ioncsatornára gyakorolt szerhatást tudunk párhuzamosan monitorozni. Ez a technika lehetővé teszi továbbá a valódi áram profilok elvezetését az akciós potenciál alatt. Amennyiben egy szer több ionáramra is fejt ki gátló hatást, mint pl. az articain, ilyenkor több csúcs jelenik meg az áramjelen, valamennyi egy-egy ioncsatorna ujjlenyomata. Ennek megfelelően a **13. B ábra** áramjelein látott korai kifelé irányuló áramcsúcs az I_{to} gátlását, míg a befelé irányuló áramcsúcs a Ca^{2+} -áram gátlását jelzi. A késői kifelé irányuló áramcsúcs az akciós potenciál terminális repolarizációjával esik egybe, ezt az I_{K1} és az I_{Kr} 3:1 arányban alkotják [231]. A **13. ábra** tanúsága szerint az articain szignifikánsan gátolta az I_{to} -t, az I_{Ca} -ot, az I_{K1} -et és I_{Kr} -t. A fenti áramok gátlása az articain koncentrációjának 1000 μ M koncentrációig történő emelésével párhuzamosan fokozódott, és jelentős mértékben reverzibilis volt. A hagyományos feszültség clamp technikával szemben 100 μ M articain a befelé irányuló áramot (I_{Ca}) erőteljesebben gátolta, mint a késői kifelé irányuló áramcsúcsot.



13. ábra. Az articain hatása az ionáramokra akciós potenciál clamp körülmények között. Az **A** ábrán a sejtről elvezetett és parancsjelként használt akciós potenciált, a **B** ábrán az egyre növekvő articain koncentrációk jelenlétében rögzített áramjeleket mutatjuk be egy reprezentatív kísérletben. A bal oldalon lévő vízszintes nyilakkal jelölt nulla vonaltól felfelé való kitérés a kifelé, a lefelé való kitérés a befelé irányuló, az articain által gátolt áramokat jelöli. A **C** ábra az articainnak a befelé irányuló (I_{Ca}) és a késői kifelé irányuló ($I_{K1}+I_{Kr}$) áramcsúcsokra gyakorolt koncentrációfüggő gátló hatását mutatja be a 4 vizsgált sejten.

4.5. A ropivacain hatása az akciós potenciál paramétereire

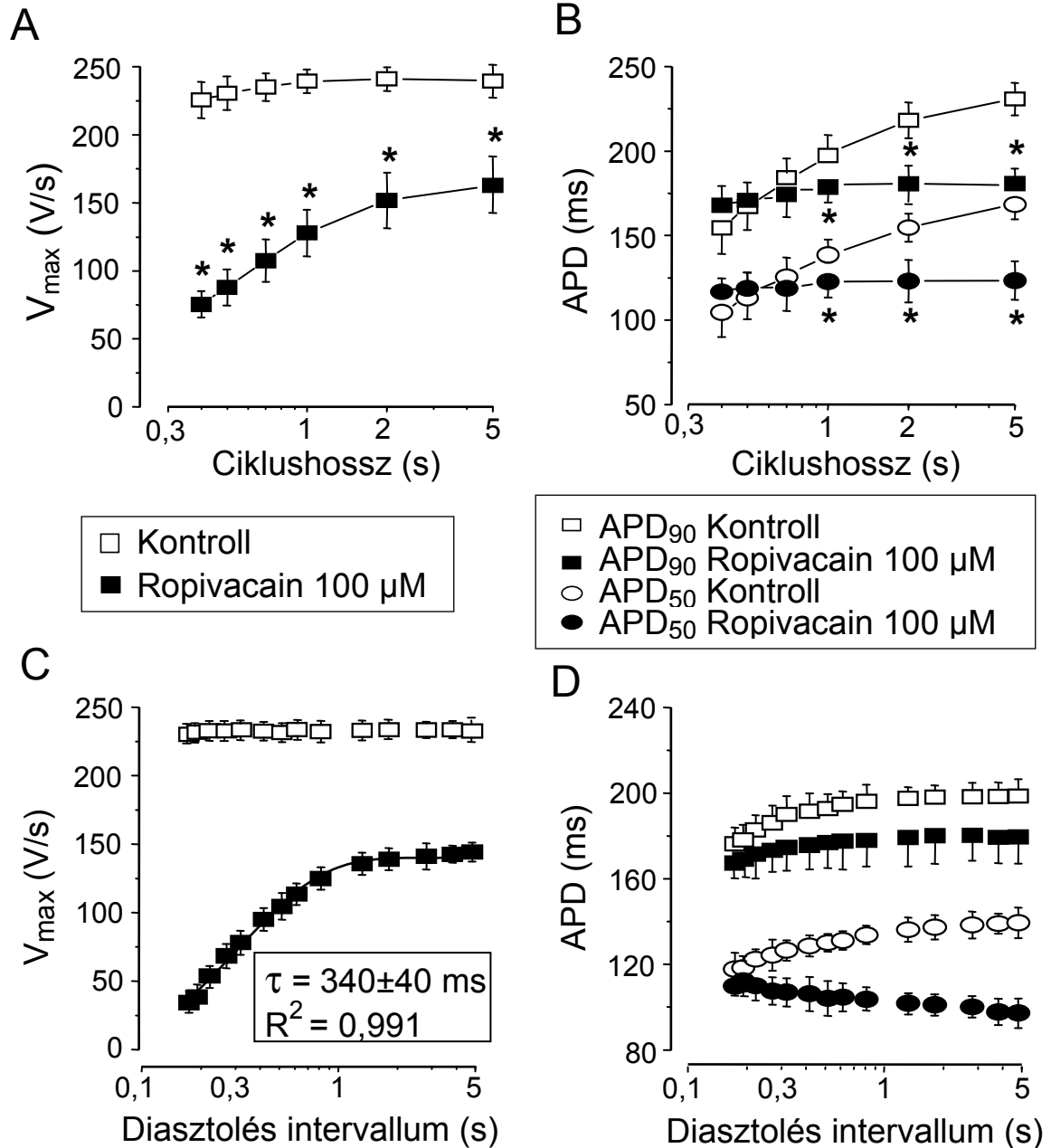
A ropivacain kezelés – az articainhoz hasonlóan – koncentrációfüggő változásokat okozott a szívizomsejtek akciós potenciáljának alakjában és jellemző paramétereiben, beleértve a V_{max} csökkenését, az akciós potenciál időtartamának rövidülését, a korai repolarizáció amplitúdójának a csökkenését és a plató depresszióját (14. ábra). Ezen hatások közül a korai repolarizáció amplitúdójának és a depolarizáció sebességének a csökkenése 10 μM koncentrációtól, míg az akciós potenciál rövidülése 30 μM -tól volt statisztikailag szignifikáns. A V_{max} értékeket a Hill egyenlethez illesztve $81 \pm 7 \mu\text{M}$ EC_{50} értéket kaptunk, míg a Hill koefficiens $1,02 \pm 0,08$ volt a vizsgált 6 szívizomsejt átlagában. A V_{max} és a korai repolarizáció gátlása teljesen reverzibilis volt 10 perces mosás után. Érdekes módon az APD_{90} feltűnő rebound jelenséget mutatott: a normál szint felé nőtt a ropivacain-mentes Tyrode oldattal történt kimosást követően. Az akciós potenciál amplitúdója 100 μM ropivacain koncentráció hatására $114,6 \pm 2,2 \text{ mV}$ értékről $100,8 \pm 2,8 \text{ mV}$ értékre csökkent ($p < 0,05$, $n=6$), ami $113,8 \pm 2,9 \text{ mV}$ értékre tért vissza a 10 perces kimosást követően. Bár a ropivacain nem okozott statisztikailag szignifikáns változásokat a sejtek nyugalmi membránpotenciáljában, magas (100 μM feletti) koncentrációknál depolarizációs tendencia volt megfigyelhető.



14. ábra. A: 100 μM ropivacain hatása az akciós potenciál konfigurációjára állandó 1 Hz frekvencián történő ingerlés mellett. Az akciós potenciál felszálló ágának idő szerinti első deriváltját mutatja a jobb oldali ábra. **B, D, E:** a ropivacain kumulatív koncentrációfüggő hatása a depolarizáció maximális sebességére, a repolarizáció 50 és 90 %-os szintjénél mért akciós potenciál időtartamra (APD_{50} és APD_{90}) és a korai repolarizáció amplitúdójára. M: kimosás. **C:** a ropivacain V_{max} -ra vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje. Az egyes koncentrációk által kiváltott V_{max} gátlást a teljes gátlás %-ában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. $n=6$

4.6. Frekvenciafüggő sajátosságok

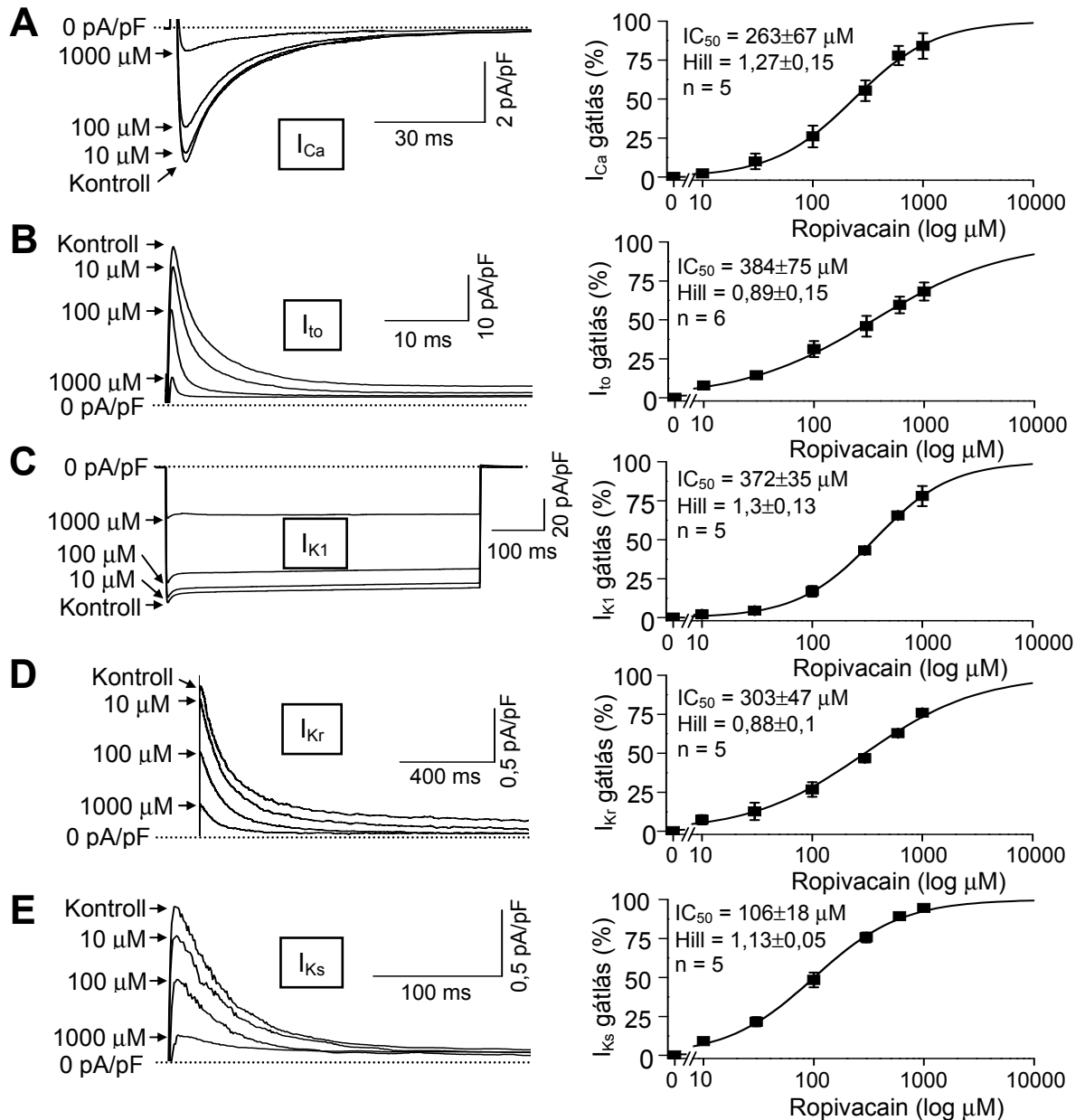
A ropivacain hatására kialakuló V_{\max} -csökkenés és akciós potenciál rövidülés frekvenciafüggő volt. A V_{\max} csökkenése a magasabb ingerlési frekvenciáknál erősödött (normál frekvenciafüggés), ami a ropivacain Na^+ -csatornákra gyakorolt use-dependens hatásának tulajdonítható (**15. A ábra**). Ezzel szemben az APD rövidülése az alacsonyabb ingerlési frekvenciák esetén volt kifejezettebb és teljesen hiányzott 1000 ms alatti ciklushosszak esetén (**15. B ábra**). Ez a fordított frekvenciafüggő hatás számos ioncsatorna-gátlószer általános tulajdonsága, és a kisebb nettó kifelé irányuló árammal magyarázható, amely a hosszabb ciklusok során észlelt hosszabb akciós potenciálok platója alatt folyik. Feltételezhető, hogy a ropivacain rövidítő hatásának oka az I_{Ca} valamint a window I_{Na} gátlása, mely változások jelentős hatást gyakorolhatnak az APD-re a hosszabb ciklusok során. A V_{\max} és az akciós potenciál időtartamának restitúciós kinetikáját a **15. C** és **15. D ábrákon** mutatjuk be. A restitúciós görbéken minden extra akciós potenciál V_{\max} illetve az APD értékét a megfelelő diasztolés intervallum függvényében ábrázoltuk. A leghosszabb, 5000 ms diasztolés időközöt követően mért $37 \pm 1\%$ tónusos gátlás mellett jelentős frekvenciafüggő gátlás volt észlelhető a diasztolés intervallumok csökkenésével. A frekvenciafüggő V_{\max} gátlás offset kinetikáját monoexponenciális függvény illesztésével határoztuk meg. A ropivacain leválási időállandója 340 ± 40 ms-nak adódott. Az APD-diasztolés időköz kapcsolatát ábrázoló görbék $100 \mu\text{M}$ ropivacain jelenlétében laposak voltak, és szemben a kontroll görbékkel, amikor az APD a diasztolés intervallum hosszabodásával jelentős mértékben növekedett, az APD_{50} értékek ropivacain jelenlétében a diasztolés időköz növekedésével csökkentek.



15. ábra. **A, B:** 100 μ M ropivacain frekvenciafüggő hatása a depolarizáció maximális sebességére (V_{max}) és az akciós potenciál időtartamára (APD) steady-state körülmények között ($n=5$). **A C és D:** a depolarizáció maximális sebességének illetve az akciós potenciál időtartamának restitúciós kinetikája kontroll körülmények között és 100 μ M ropivacain jelenlétében ($n=6$). A **C** ábra folytonos vonalát exponenciális illesztéssel nyertük

4.7. A ropivacain hatása a szív ionáramaira konvencionális voltage clamp körülmények között

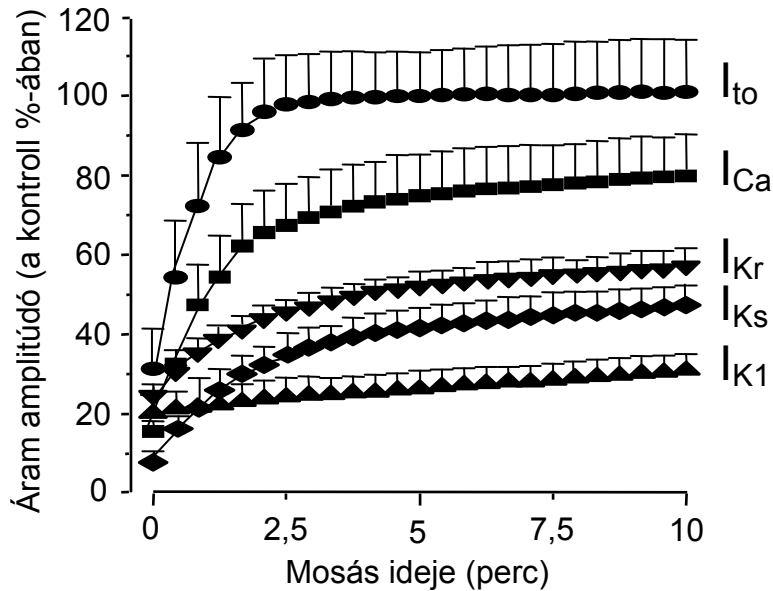
Amint azt a **16. ábrán** bemutatjuk, a ropivacain számos ionáramot gátolt koncentrációfüggő módon. A ropivacain koncentrációját kumulatív módon növeltük 10 μM és 1000 μM között, a gátló hatásokat Hill egyenlettel illetve meghatároztuk az EC_{50} értékét és a Hill koefficiensét. A mérésekhez használt feszültséglépcsők és ioncsatorna gátlószerrek megfelelnek az articainnal végzett kísérletek során alkalmazott protokolloknak. A vizsgált ionáramok mindegyikét 250 és 400 μM közötti EC_{50} értékekkel gátolta a ropivacain – kivéve az I_{Ks} áramot, amire vonatkozóan 106 ± 18 μM félgátló koncentrációt kaptunk. A Hill koefficiens nagysága minden esetben 1 körüli érték volt, jelezvén, hogy a ropivacain valószínűleg egyetlen kötőhelyhez kötődve fejt ki gátló hatását a kardiális ionáramokra.



16. ábra. A ropivacain koncentrációfüggő hatása a sejtek ionáramaira konvencionális voltage clamp körülmények között. A baloldali ábrák reprezentatív analóg méréseket mutatnak kontroll esetben, 10, 100, és 1000 μM ropivacain jelenlétében. Az áramerősség értékeket az adott sejt kapacitására normalizáltuk. A jobb oldalon a ropivacain különböző ionáramokra vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje látható. Az egyes koncentrációk okozta csúcsáram gátlást minden áram esetében a teljes gátlás %-ában adtuk meg. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. n= a vizsgált sejtek száma.

A ropivacain jelenlétében megfigyelt ioncsatorna-gátlások jelentős különbségeket mutattak a hatás kimozhatósága szempontjából (**17. ábra**). A I_{to}

áramra irányuló gátlás a kimosás első 3 percében gyakorlatilag teljesen megszűnt. A I_{Ca} gátlása nem volt teljesen reverzibilis, bár az áram a 10 perc kimosást követően a kezelés előtti szint 80 %-ára tért vissza. Ezzel szemben az I_{Kr} , I_{Ks} - és különösen az I_{K1} - áramok esetében csak lassú és részleges helyreállást találtunk a 10 perces kimosási időszakban.



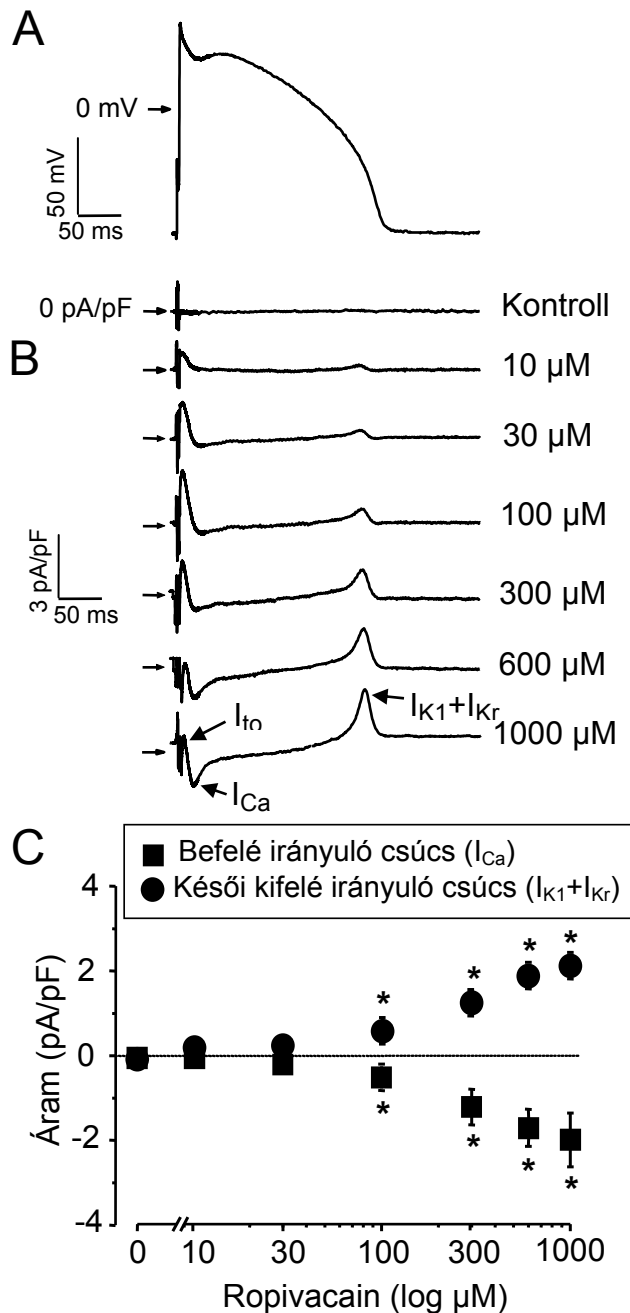
A

17. ábra. A ropivacain ionáramokra gyakorolt gátló hatásának visszafordíthatósága. Az áramamplitúdókat a ropivacain adása előtti kontroll %-ában adtuk meg és a kimosási idő függvényében ábrázoltuk.

4.8. A ropivacain ionáramokra gyakorolt hatásai akciós potenciál clamp körülmények között

Az artocainhoz hasonlóan a ropivacain hatását akciós potenciál clamp körülmények között is megvizsgáltuk. A ropivacain koncentrációját 10 μM -tól kiindulva növeltük 1000 μM -ig. Az egyes áramok jellegzetes „ujjlenyomatait” figyelembe véve az I_{to} , I_{Ca} , I_{Kr} és I_{K1} áramokra irányuló gátló hatások a ropivacain koncentrációjának fokozásával egyre erősödtek (**18. B ábra**). A ropivacain szignifikánsan gátolta az I_{to} , az I_{Ca} , valamint az I_{K1} és az I_{Kr} áramokat. A szer legerősebben az I_{to} áramot gátolta akciós potenciál voltage clamp körülmények között. A befelé irányuló áramcsúcs (I_{Ca}) és a késői kifelé irányuló áramcsúcsok

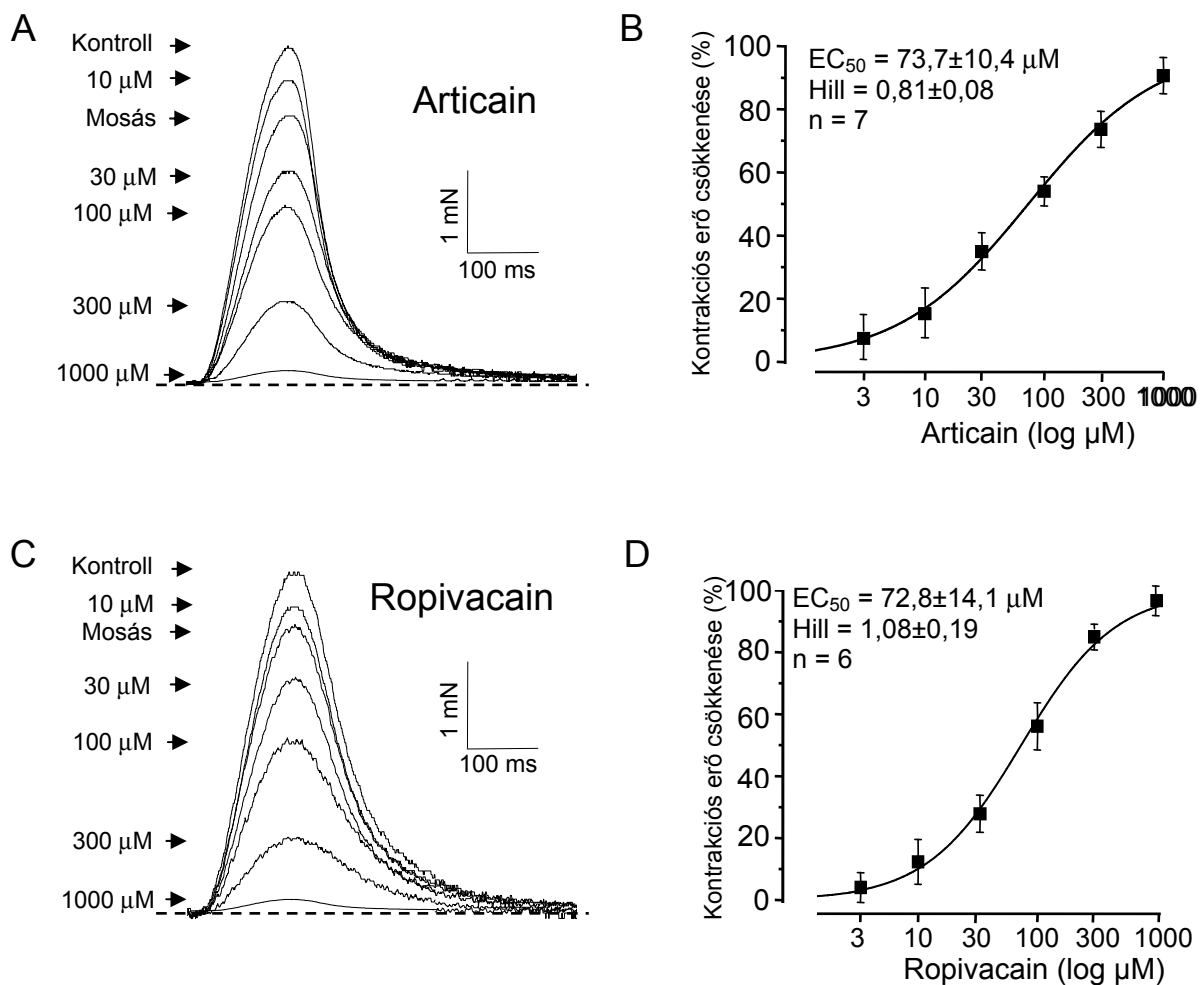
($I_{K1} + I_{Kr}$) megjelenése közel szimmetrikusan történt, ami jól megfelel a hasonló EC_{50} értékeknek (18. C ábra).



18. ábra. A ropivacain ionáramokra gyakorolt hatása akciós potenciál voltage clamp körülmények között. **A:** egy jellemző mérés során a parancsjelként használt akciós potenciál **B:** a ropivacain növekvő koncentrációinak jelenlétében rögzített reprezentatív analóg áramjelek. A vízszintes nyilak minden esetben a nulla vonalat jelölik. **C:** a ropivacainnak az I_{Ca} -ot reprezentáló befelé irányuló és az $I_{K1}+I_{Kr}$ összetételű kifelé irányuló áramcsúcsokra gyakorolt gátló hatása.

4.9. Az articain és a ropivacain hatása a kontraktilitásra

Mind az articain, mind a ropivacain koncentrációfüggő módon negatív inotróp hatást gyakorolt a 0,5 Hz állandó frekvenciával stimulált kamrai trabekulákra (**19. ábra**). Ez a hatás statisztikailag szignifikáns volt 10 μM koncentrációtól és a kontraktilis erő gyakorlatilag teljes gátlását figyeltük meg 1000 μM koncentrációnál. A szermentes Tyrode oldattal történő kimosást követően az articain és a ropivacain hatása részlegesen reverzibilisnek bizonyult: a kontrakciós erő az articain esetében a kontroll érték 73 ± 21 %-ára, a ropivacain esetében 85 ± 10 %-ára tért vissza a 60 perces kimosást követően. A kontrakciós görbe alakját enyhén módosították a szerek nagy koncentrációi. Egy kicsiny, de statisztikailag szignifikáns megnyúlást észleltünk a félrelaxációs időben 300 μM ropivacain ($75,2\pm 2$ ms-ról 88 ± 4 ms-ra) illetve articain (74 ± 4 ms-ról 85 ± 6 ms-ra) jelenlétében. Nem volt változás a maximális kontrakció eléréséhez szükséges időben (100 ± 5 és 102 ± 10 ms 300 μM articain adása előtt és után). A ropivacain azonos koncentrációja mellett a megfelelő értékek 91 ± 6 ms és 95 ± 4 ms voltak. A szereknek a kontraktilitásra gyakorolt gátló hatását a Hill egyenlet segítségével jellemeztük. Az articain esetében a félhatásos gátló koncentráció $73,7\pm 10,4$ μM ($n=7$), míg a ropivacain esetében $72,8\pm 14,1$ μM ($n=6$) volt, a megfelelő Hill koefficiensek közel egységnyi nagyságúak ($0,81\pm 0,08$ illetve $1,08\pm 0,19$) voltak. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a két szer kontraktilis paraméterekre gyakorolt hatásaiban.



19. ábra. Az articain (**A, B**) és a ropivacain (**C, D**) kumulatív koncentrációfüggő hatása a kontrakció erejére kutya kamrai trabekulákon 0,5 Hz állandó frekvencián történő ingerlés mellett. Az **A** és **C** ábrák a szerek kumulatíván növekvő koncentrációi mellett elvezetett analóg kontrakciós görbéket ábrázolják, míg a kumulatív dózis-hatás görbék Hill egyenlethez illesztését a **B** és **D** ábrák mutatják. Az egyes szerkoncentrációk által kiváltott kontrakciós erő csökkenést a teljes kontrakciós erő csökkenés %-ában adtuk meg. Az articain és ropivacain valamennyi koncentrációjával 20 percig szuperfundáltuk a preparátumokat, a szerek kimosása 60 percig tartott.

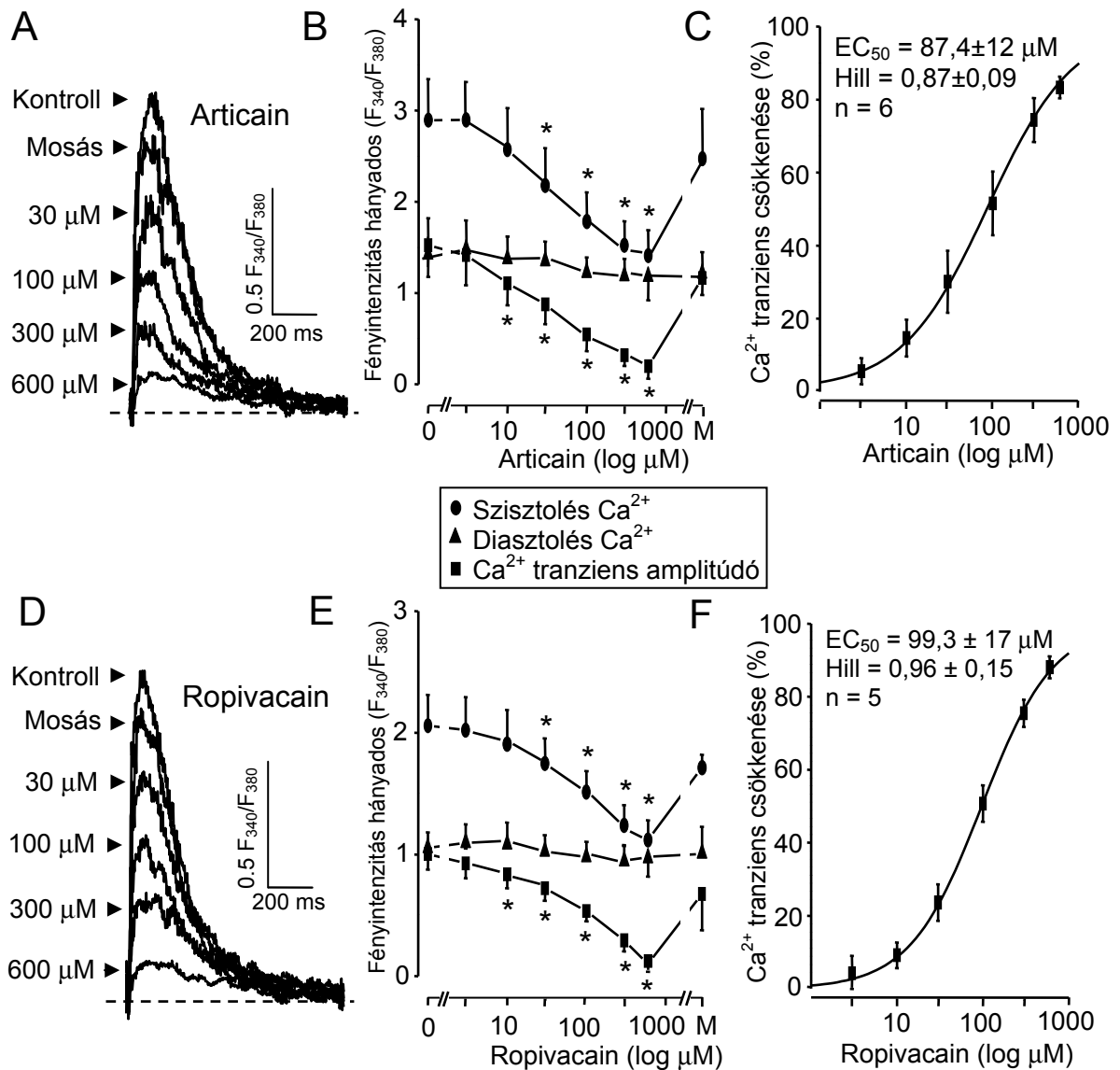
4.10. Az articaín és a ropivacain hatása az intracelluláris kalcium tranziensekre

Izolált kutya kamrai szívizomsejteken mindkét szer koncentrációfüggő módon csökkentette a szisztolés $[Ca^{2+}]_i$ értékeket valamint a $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens amplitúdóját (**20. ábra**). Ez a hatás 10 μM vagy magasabb koncentrációk esetén szignifikáns volt. A diasztolés $[Ca^{2+}]_i$ értékeket egyik szer sem befolyásolta szignifikánsan. Mindkét szer $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensre gyakorolt gátló hatása teljes mértékben reverzibilis volt. A $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens amplitúdó adatokat a Hill egyenlettel megillesztve az articaín esetében $87,4 \pm 12 \mu\text{M}$ ($n=6$), a ropivacain esetében $99,3 \pm 17 \mu\text{M}$ ($n=6$) félgátló koncentrációkat kaptunk $0,87 \pm 0,09$ illetve $0,96 \pm 0,15$ Hill koefficiens értékkel.

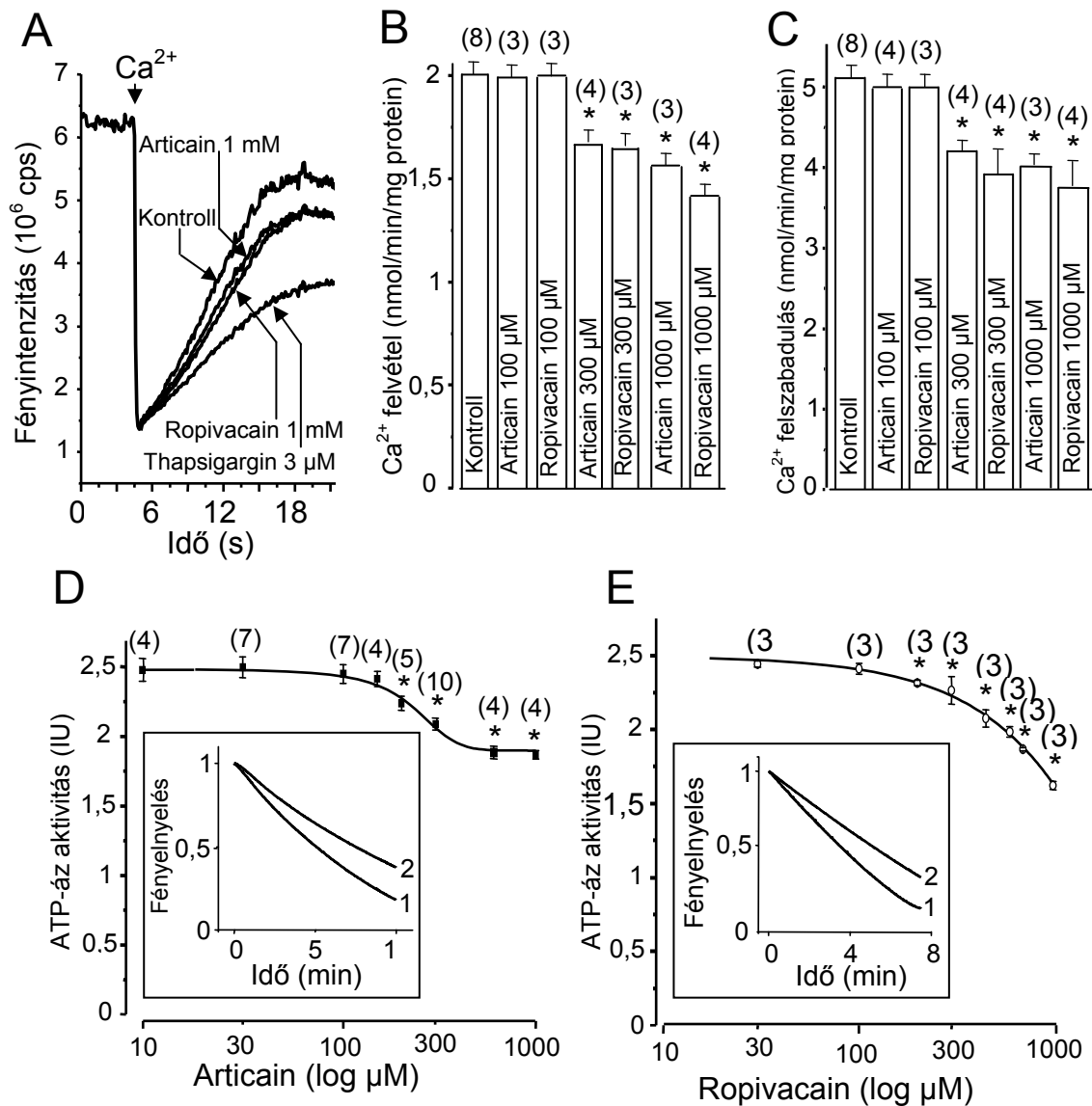
Magasabb koncentrációban mindkét szer a $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek relaxációjának mérsékelt megnyúlását eredményezte. Míg 300 μM articaín illetve ropivacain szignifikánsan növelte a monoexponenciális lecsengési időállandót (200 \pm 22 ms-ról 284 \pm 40ms-ra, illetve 199 \pm 20 ms-ról 326 \pm 39 ms-ra), ez a hatás 100 μM koncentrációnál nem volt szignifikáns. A két szer hatását összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbségeket.

4.11. Az articaín és a ropivacain hatása a nehéz SR vezikulák kalcium felvételére és kalcium leadására

Az articaín és a ropivacain mérsékelt, de statisztikailag szignifikáns csökkenést okozott a nehéz SR vezikulák Ca^{2+} -felvételében és leadásában 300 μM -os valamint ennél magasabb koncentrációnál. (**21. ábra**). Ebben a vonatkozásban nem volt szignifikáns különbség a ropivacain és az articaín hatása között. A csökkent Ca^{2+} -felvételét a szarkoplazmatikus retikulumban lévő Ca^{2+} -ATP-áz aktivitásának arányos gátlása kísérte, ami 200 μM koncentrációtól szignifikáns volt. Bár e változások viszonylag csekély amplitúdójúak voltak, az articaín koncentrációjának 200 μM fölé történő emelése nem fokozta tovább sem a Ca^{2+} -felvételre sem az ATP-áz aktivitásra kifejtett gátló hatást. Ezzel szemben a ropivacain ATP-áz aktivitásra gyakorolt hatása nem telítődött az alkalmazott legmagasabb 1000 μM -os koncentráció mellett sem.



20.ábra. Az articain (A-C) és a ropivacain (D-F) kumulatív koncentrációfüggő hatása a citoszolikus szabad kalcium koncentrációkra Fura-2-vel töltött izolált kamrai szívizomsejteken. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásait a fluoreszcencia hányados (F_{340}/F_{380}) változásaival fejeztük ki. A, D: a kontroll körülmények között, a szerek növekvő koncentrációnak jelenlétében, majd a kimosást követően regisztrált analóg kalcium transziens görbék. B, E: a szisztolés és diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékekben és a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -transziens amplitúdójában bekövetkező változások. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -transziens amplitúdóját a szisztolés és a diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékek különbségeként definiáltuk. C, F: az articain illetve a ropivacain $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -transziens amplitúdójára vonatkozó kumulatív dózis-hatás görbéje. Az egyes gyógyszerkoncentrációk kiváltotta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -transziens csökkenést a teljes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -transziens csökkenés %-ában adtuk meg. A pontokat a Hill egyenlettel illesztettük. .



21. ábra. Az articain és a ropivacain hatása az SR kalcium transzport rendszereire. **A:** a szerek hozzáadása nélkül (kontroll), 1 mM articain, 1 mM ropivacain valamint 3 μ M thapsigargin jelenlétében rögzített görbék, amelyek a 100 μ M CaCl₂ hozzáadásával kiváltott Ca²⁺-felvétel kezdeti sebességét mutatják. A vezikulák Ca²⁺-felvételével párhuzamosan csökken az extravezikuláris Ca²⁺-koncentrációja, amely a fényintenzitás növekedését vonja maga után. **B, C:** 100-1000 μ M articain és ropivacain hatása a Ca²⁺-felvétel illetve a Ca²⁺-felszabadulás kezdeti sebességére. **D, E:** az articain és a ropivacain koncentrációfüggő hatása a nehéz SR vezikulák Ca²⁺-ATP-áz aktivitására. A pontokat Hill egyenlettel illesztettük. Az ábrabetétek egy-egy reprezentatív vizsgálat analóg görbéit ábrázolják (1: kontroll, 2: 1 mM articain illetve ropivacain). A mérések számát a zárójelben lévő számok jelölik.

5. MEGBESZÉLÉS

A helyi érzéstelenítés a fogászatban a fájdalommentesség elérésének fő eszköze. A diagnosztikus és számos sebészeti beavatkozás során alkalmazott regionális érzéstelenítés az aneszteziológia jelenleg is fejlődőben lévő ága. A fogászatban a leggyakrabban alkalmazott szer a lidocain [232], míg a regionális anesztézia céljaira a hosszú hatástartamú, nagy hatáserősségű bupivacaint fejlesztették ki. Fontos szerepe van a regionális és az általános érzéstelenítés integrálásának az akut fájdalomcsillapításban, a regionális anesztéziát az intraoperatív fájdalomcsillapításon túl a posztoperatív szakban is kiterjedten használják kedvező élettani hatásai miatt. Az utóbbi évtizedekben a gyermekkori regionális anesztézia iránt is egyre növekvő igény van. A krónikus fájdalmak esetében a kevesebb mellékhatással járó kiváló fájdalomcsillapítás javítja az életminőséget és kedvező élettani hatásai mellett csökkenti a tartós kórházi kezelés és a posztoperatív fájdalom miatt pszichésen is sérülékeny gyermekeken a kedvezőtlen magatartásbeli változások kialakulásának lehetőségét [233]. Legsúlyosabb mellékhatásuk a toxicitás, amely a kezdetektől fogva ismert és folyamatos a törekvés az egyre biztonságosabb készítmények előállítására és klinikai gyakorlatba való bevezetésére. A bupivacain alkalmazása során észlelt súlyos - gyakran szívmegállással társult – szövődmények miatt került sor az alkalmazás módjának szigorú szabályozására, de a legnagyobb körültekintés mellett is előforduló szisztémás toxicitás miatt hasonlóan hatékony, de biztonságosabb szerek kifejlesztésére került sor. Ilyennek tartjuk elsősorban az articaint, de bizonyos értelemben a ropivacain is ebbe a kategóriába sorolható.

Az idegi Na^+ -csatornák frekvenciafüggő gátlása a helyi érzéstelenítők hatásának döntő mechanizmusa az ingerület terjedésének megakadályozásában. A különböző feszültségfüggő K^+ áramok (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks}) gátlása azáltal fokozhatja az érzéstelenítő hatást, hogy az akciós potenciál időtartamát megnyújtva megnövelik az inaktivált Na^+ -csatorna populációt. A nyugalmi potenciál fenntartásában fontos szerepet játszó I_{K1} áram gátlása ugyanakkor enyhén depolarizáló hatású, amely szintén kedvez az inaktivált állapotban lévő Na^+ -csatornák akkumulációjának. A lokálanesztetikumok legnagyobb hátránya éppen a szelektivitás hiánya. A többféle támadáspont minden helyi érzéstelenítő jellemző tulajdonsága – hasonlóan a

szívizomra ható legtöbb antiarrhythmias vegyülethez. Nem meglepő tehát, hogy a helyi érzéstelenítő szereknek többféle mechanizmusú antiarrhythmias hatásai lehetnek, ugyanakkor potenciális proarrhythmias aktivitásukat is – amely a kardiotoxicitás jelentős eleme – a különféle ioncsatornákra irányuló gátló hatások okozzák.

5.1. Az articain akciós potenciál paramétereire gyakorolt hatásai összhangban vannak a voltage clamp technikával nyert adatokkal

Tanulmányunkban elsőként elemeztük az articain szívizomsejtekre gyakorolt elektrofiziológiai hatásait. Eredményeink azt mutatták, hogy az articain koncentrációfüggő módon számos ionáramot gátol, ami az akciós potenciál alakjának megváltozásában is tükröződik, hiszen e változások mindegyikét valamely ionáram gátlására lehet visszavezetni. A depolarizáció maximális sebességének és az akciós potenciál amplitúdójának a csökkenése nyilvánvaló következménye a gyors Na^+ -áram gátlásának, ugyanis a V_{\max} értéke szívizmon a I_{Na} áramsűrűség indikátora, és egyenesen arányosnak tekintik a gyors nátriumárammal [234]. Az articain a leghatékonyabban a Na^+ -áramot gátolta, tekintettel a V_{\max} gátlásra kapott 162 μM félgátló koncentrációra. Az articain okozta frekvenciafüggő V_{\max} -gátlás a 91 ms leválási időállandóval különösen gyors offset kinetikát mutatott. Ismereteink szerint ez a leggyorsabb leválási időállandó, amit kardiális szövetekben a gyors Na^+ -áram gátlásával kapcsolatban leírtak. Mindez azt sugallja, hogy az articainnak a Vaughan Williams osztályozás szerinti 1 B antiarrhythmias tulajdonságai lehetnek [235]. A I_{Na} áram gátlása valószínűleg szerepet játszik az akciós potenciál articain okozta megrövidülésében is, ez a hatás már a viszonylag alacsony, 10 μM -os koncentrációtól szignifikáns volt, ahol az articain még nem okozott szignifikáns nagyságú V_{\max} -gátlást. Nem példa nélküli, hogy egy szer megfelelően alacsony koncentrációban gátolja a window Na^+ -áramot, míg a gyors Na^+ -áram és a V_{\max} érintetlenek maradnak [236]. Az akciós potenciál articain okozta megrövidülésében valószínűleg szerepet játszó másik tényező a Ca^{2+} -áram gátlása. Bár az articain az I_{Ca} -ot viszonylag magas EC_{50} értékkel gátolta hagyományos feszültség clamp körülmények között, az akciós potenciál clamp kísérletek azt mutatták, hogy az articain már alacsonyabb koncentrációknál (30-100 μM között) is markánsabb gátló hatást fejtett ki a befelé

irányuló, az L-típusú kalciumáramnak tartott áramcsúcsra, mint a késői kifelé irányuló áramcsúcsra, ami összhangban van rövidítő hatásával. Mivel az I_{Na} -ra és I_{Ca} -ra irányuló gátló hatás összességében erősebb, mint a K^+ - áramokra gyakorolt, az akciós potenciál artocain hatására megrövidül. Az artocain jelenlétében megfigyelt plató depresszió szintén az I_{Ca} gátlásának tulajdonítható. Végül a korai repolarizáció amplitúdójának csökkenése az I_{to} áram gátlásával magyarázható, amint ezt a konvencionális és akciós potenciál voltage clamp technikákkal demonstráltuk. Az artocain ioncsatorna gátló hatásának lehetséges mechanizmusát illetően arra a következtetésre jutunk, hogy a szer (az I_{K1} kivételével) valószínűleg valamennyi csatornafehérjén egyetlen kötőhellyel kapcsolódik – erre utal a Hill koefficiensek egyhez közeli értéke.

5.2. Az artocain szívhatásainak összevetése más érzéstelenítők hatásaival

Amint azt a voltage clamp mérések kimutatták, a különböző ionáramokra vonatkozó EC_{50} értékek az artocain esetében 200 - 500 μM közötti koncentráció tartományban vannak. Ebből a szempontból az artocain jelentősen különbözik a másik két, leggyakrabban használt helyi érzéstelenítőtől, a lidocaintól és a bupivacaintól. A bupivacain a V_{max} , az I_{to} és az I_{Ca} nagyságát az artocainnál jobban gátolja: 1 μM bupivacain a V_{max} értékeket 26 %-kal csökkentette [237], az I_{to} gátló hatására vonatkozó EC_{50} érték 22 μM volt [189], míg az I_{Ca} 22 %-kal csökkent 10 μM bupivacain jelenlétében [238]. Az artocainhoz hasonlóan a lidocain is gátolja a Na^+ - áramot (95 μM valamint 226 μM EC_{50} értékeket jelentettek) [239, 240], míg a lidocainnak a I_{Ca} áramra vonatkozó félgátló koncentrációja csak 27 μM volt [239]. Ez az érték több mint egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint az artocain esetében. Az artocainnal ellentétben sem a lidocain sem a bupivacain nem gátolja a I_{K1} áramot 1000 μM koncentrációig [239, 241]. Érdekes megjegyezni - hogy szemben az eddig taglalt különbségekkel - csak viszonylag csekély különbséget találtak az említett szerekkel érzéstelenített betegek plazmájában mért csúcskoncentrációkban: ezek az értékek a bupivacain esetén 3-6 μM , az artocain esetén 6-7 μM , a lidocain esetén 5-10 μM voltak [87, 243-244].

A lidocain hatékony 1 B osztályba tartozó antiarrhythmias szer, melynek többek között negatív inotróp hatása is van, míg a bupivacain magasabb koncentrációkban proarrhythmiasnak bizonyult. Ellentétben a lidocainnal és a

bupivacainnal, az articainnal kapcsolatban eddig még nem közöltek végzetes kardiovaszkuláris szövődményt. Mivel a statisztikailag szignifikáns változásokat okozó legalacsonyabb articain koncentrációk vizsgálatunkban magasabbak voltak, mint általában az articainnal kezelt betegek vérében mért csúcskoncentrációk, valószínűnek látszik, hogy az articain normál érzéstelenítés során nem okoz durva változásokat az emberi szív elektromos aktivitásában. Bár az articain magasabb koncentrációkban a szívizom több ionáramát is gátolta, az akciós potenciál időtartamát rövidítő hatása viszonylag mérsékelt volt és ami még fontosabb, ez a hatás 100-300 μM között telítődni látszik (**10. D ábra**). Ezzel összhangban, e tartomány fölött észleltük a késői kifelé irányuló áramcsúcsra gyakorolt gátlás legélesebb növekedését a **13. C ábrán**. Mindez arra utal, hogy a növekvő koncentrációval a kifelé irányuló áramok egyre kifejezettebb gátlása kivédi az akciós potenciál időtartamának további rövidülését, ami a refrakter periódus lerövidülése miatt arrhythmogén lenne. Az articain e tulajdonsága a többi helyi érzéstelenítővel összehasonlítva kisebb proarrhythmias kockázatot jósol egy esetleges véletlen érpályába jutás okozta mérgezés vagy túladagolás esetén.

5.3. A ropivacain szívhatásainak jellemzői

Kísérleteink alapján született az első olyan közlemény, amelyben a ropivacain kardiális ionáramokra gyakorolt hatásait kutya kamrai szívizomsejteken vizsgálták. Ez azért lényeges, mert jelenlegi ismereteink szerint a kutyaszív akciós potenciálja, valamint a háttérben lévő ionáramok denzitása és megoszlása hasonlít legnagyobb mértékben a humán szívre jellemző paraméterekhez. Eredményeink azt mutatják, hogy a ropivacain - a bupivacainhoz hasonlóan - számos ionáramot gátol koncentrációfüggő módon, ami az akciós potenciál jellemző paramétereinek változását vonja maga után. A ropivacain a legerősebben a Na^+ -áramot gátolta, tekintetbe véve az 1 Hz-nél kapott 81 μM EC_{50} értékét a V_{max} -gátlás vonatkozásában. Ez összhangban van mások feszültség clamp technikával nyert eredményeivel, miszerint 50 μM és 100 μM ropivacain a Na^+ -áram 33,3 % illetve 62,5 % gátlását eredményezte szobahőmérsékleten tengerimalacból származó kamrai szívizomsejteken [195]. Ugyanakkor, ha a ropivacain általunk meghatározott EC_{50} értékét (81 μM) a bupivacainéhoz hasonlítjuk (41 μM), a ropivacainnak a Na^+ -áramra gyakorolt gátló

hatása gyengébb. Hasonló következtetéseket vontak le mások is multicelluláris tengerimalac kamrai preparátumokon végzett V_{max} mérések eredményeiből [191]. Ami a csatornáról történő disszociáció sebességét illeti, az általunk mért 340 ms leválási időállandó jól megfelel egy átlagos 1 B osztályú antiarrhythmicumnak. A window I_{Na} -ra és az L-típusú Ca^{2+} áramra gyakorolt gátló hatás valószínűleg hozzájárult az akciós potenciál rövidüléséhez és a platófázis depressziójához. A korai repolarizáció amplitúdójának csökkenését a I_{Na} és a I_{to} ropivacain okozta gátlása magyarázhatja.

Jól ismert, a gyors nátriumáramot gátló hatása mellett megmutattuk, hogy a ropivacain más inward és outward áramokat is gátol, úgymint az I_{Ca} , I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} és I_{K1} ionáramok. Érdekes módon, a ropivacain I_{to} áramra gyakorolt gátló hatása erősebb volt akciós potenciál clamp, mint konvencionális voltage clamp körülmények között. Ezt a különbséget talán az alkalmazott feszültség protokollok közti eltérések magyarázzák. A ropivacainnak a kutya kamrai szívizomsejtek ionáramaira gyakorolt hatását minőségileg hasonlóknak találtuk a tengerimalacban kapott eltérésekhez, kivéve az I_{K1} áramra gyakorolt gátló hatást, amely kutyában kifejezett volt, míg tengerimalacban gyakorlatilag nem volt kimutatható. Ennek a fajok közti különbségnek nem ismerjük az okát, de mindenképpen aláhúzza az emberi vagy kutya szívizomsejteken végzett mérések jelentőségét. Érdekes megemlíteni, hogy a humán I_{Kr} áram (HERG) a ropivacain iránt érzékenyebbeknek tűnik, mint a kutya I_{Kr} árama [192, 245].

Jelen elektrofiziológiai adatok klinikai relevanciáját csak akkor tudjuk helyesen megbecsülni, ha a kísérleteinkben használt koncentrációkat az érzéstelenített betegek plazma ropivacain szintjeivel hasonlítjuk össze. A ropivacain csúcskoncentrációja a plazmában az érzéstelenítés során elérheti a 2,6-2,9 mg/l értéket, amely kb. 10-12 μ M koncentrációnak felel meg [246-250]. Bár a V_{max} ill. a korai repolarizáció statisztikailag szignifikáns változását okozó legalacsonyabb ropivacain koncentráció 10 μ M volt vizsgálatunkban, a ropivacain nem valószínű, hogy jelentősen befolyásolja a szív elektrofiziológiáját a neuroaxialis és regionális anesztézia alkalmazása során jellemzően előforduló plazmaszintek esetén. De mire lehet számítani egy esetleges ropivacain túladagolás vagy véletlen érpályába adás esetén? Ilyen körülmények között sokkal magasabb plazmaszintek fordulhatnak elő: pl. 40 μ M, ha a 14 liter teljes extracelluláris folyadéktérrel számolunk, vagy 180 μ M, ha csak a 3 liter plazmatérfogatra vonatkoztatunk a 7,5

mg/ml koncentrációjú ropivacain oldat 20 ml-ét tartalmazó ampulla intravénás beadása esetén. Bár a ropivacain I_{Ca} , I_{Kr} , I_{K1} és I_{to} áramokra kapott félgátló koncentrációi egy viszonylag szűk, 250-400 μM közötti tartományban voltak, az akciós potenciál platófázisa alatt a befelé irányuló áramok ropivacain okozta gátlása erősebbnek tűnik, mint a kifelé irányuló áramokra gyakorolt gátló hatás. Mindezzel összhangban az akciós potenciál időtartamát a ropivacain különösen hosszabb ciklushosszak mellett rövidítette.

Érdekes módon, a ropivacain kimosása az akciós potenciál időtartamának a kontrollértéken túli megnyúlását eredményezte. Ezt a rebound hatást a különböző ioncsatornákból való kimosás eltérő kinetikájával lehet magyarázni, amint ezt a ropivacainnal demonstráltuk. A V_{max} (az I_{Na} indikátora) és az I_{to} esetében a gátlás teljesen reverzibilis volt, az I_{Ca} 10 percen belül 80 %-os visszatérést mutatott. Ezzel ellentétben, a repolarizációért felelős többi áram (az I_{Kr} , I_{Ks} és még inkább az I_{K1}) csak lassú és részleges helyreállást mutattak a 10 perces kimosás során. A reverzibilitásbeli különbségek oka nem ismert, talán a kötőhelyek eltérő intramolekuláris elhelyezkedése állhat a háttérben. Érdeemes megjegyezni, hogy a I_{K1} áramért felelős K_{ir} csatornák molekuláris szerkezete alapvetően más, mint a többi vizsgált ioncsatornáé. A kifelé irányuló áramok kimosás során is megmaradó részleges gátlásának következményeként az akciós potenciál időtartama a mosás alatt megnyúlt. Ez a megfigyelés arra utal, hogy valószínűleg az érzéstelenítést követően a gyógyszer eliminációjának egész ideje alatt a normálnál hosszabb akciós potenciál időtartamokkal kell számolni, ami fokozott proarrhythmias kockázatot jelent a long QT szindróma öröklött és szerzett formáiban szenvedő betegek számára. Ezek a betegek csökkent repolarizációs rezervvel rendelkeznek a kifelé irányuló áramok relatív deficitje miatt, ezért esetükben könnyebben kialakulhat az akciós potenciál időtartamának további megnyúlása, ami torsades de pointes típusú kamrai arrhythmia kialakulásával fenyegető korai utódepolarizációt eredményezhet [251]. Jóllehet az I_{Ks} normál szívfrekvenciánál csak csekély hatással van a repolarizációra [252, 253], a repolarizációs rezerv fontos komponense [254, 255]. A ropivacain viszonylag magas I_{Ks} gátló potenciálja miatt ($EC_{50} = 106 \mu\text{M}$) azoknál a már csökkent repolarizációs rezervvel rendelkező betegeknél is, akiknek nyugalomban normális az akciós potenciál időtartama, megnövekedhet az arrhythmia kockázata [256, 257]. Valóban, több esetben jelentettek kamra-fibrillációt és szív-megállást a ropivacainnal történt érzéstelenítéssel kapcsolatban

[160-165], hasonlóan a bupivacain-érzéstelenítés során előfordult esetekhez [258-261]. Ezzel összhangban, celluláris elektrofiziológiai vizsgálataink nem igazoltak alapvető minőségi különbségeket a ropivacain és a bupivacain kardiális hatásaiban. A bupivacain a ropivacainnál erősebb ioncsatorna blokkoló, ugyanakkor terápiás adagja is arányosan alacsonyabb [243]. Következtetésként azt mondhatjuk, hogy bár a ropivacain általában nem okoz kardiális mellékhatásokat a normál populációban történő rendszeres alkalmazása során, speciális körülmények, mint pl. véletlen intravénás injekció, túladagolás, vagy az arrhythmiaák iránt fogékony betegek esetén használata különleges figyelmet igényel, nemcsak az érzéstelenítés során, hanem a posztoperatív időszakban is.

5.4. Az articain és a ropivacain negatív inotróp hatásának mechanizmusa

Az articain és a ropivacain koncentrációfüggő módon csökkentette a kontraktilis erőt és a $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek amplitúdóját a kutya kamrai szívizomsejteken. Az articain ezen hatására vonatkozóan egyéb tanulmányt még nem közöltek.

Nem találtunk szignifikáns különbséget az articain és a ropivacain kontraktilitásra illetve az $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensekre gyakorolt gátló hatása között, ami arra utal, hogy hasonló mértékű lehet a két gyógyszer kardiodepresszív mellékhatása. A bupivacainnal összevetve az articainnak gyengébb kardiodepresszív hatást jósolhatunk, mivel kutyaszívől izolált kamrai sejteken a bupivacain sokkal erősebben gátolta az I_{Ca} -ot, mint a ropivacain vagy az articain. A ropivacain negatív inotróp hatását mások is szignifikánsan gyengébbnek találták, mint a bupivacainét kutya, nyúl és tengerimalac preparátumokon [173, 263, 264].

A kontraktilitásra és az $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensekre gyakorolt gátló hatás $10 \mu\text{M}$ koncentrációnál statisztikailag szignifikáns volt, és nagyon hasonló koncentrációfüggést mutatott: a megfelelő EC_{50} értékek $74 \mu\text{M}$ illetve $87 \mu\text{M}$ voltak az articain esetében, míg a ropivacain félgátló koncentrációi 73 illetve $99 \mu\text{M}$ voltak. Ebből arra lehet következtetni, hogy a csökkent kontraktilitás oka az $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek csökkenése. Az L-típusú Ca^{2+} -áram gátlása valamivel magasabb koncentrációkat igényelt, $30 \mu\text{M}$ értéktől volt szignifikáns és a félhatásos dózis $300 \mu\text{M}$ közeli érték volt. Az I_{Ca} -gátlás nagyságrendje jó összhangban van kutyán, illetve tengerimalacon mások által kapott korábbi eredményekkel [195, 265].

Az $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek csökkenése a szarkoplazmatikus retikulumban a Ca^{2+} -felszabadulás és/vagy a Ca^{2+} -felvétel megváltozott kinetikájával vagy a felszíni membránon keresztül történő Ca^{2+} -fluxus változásával magyarázható. Mivel a 200 μM -alatti koncentrációk esetén egyik gyógyszer sem módosította a Ca^{2+} -felszabadulást és -felvételt a nehéz SR vezikulákban valamint a SERCA ATP-áz aktivitást is érintetlenül hagyta, úgy tűnik, hogy a transzmembrán Ca^{2+} -belépés csökkenése állhat a jelenség háttérében. Ez összhangban van az I_{Ca} articaín és ropivacain jelenlétében észlelt csökkenésével, bár 10 μM koncentrációnál a I_{Ca} gátlása nem volt szignifikáns, szemben az $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens és a kontraktilitás szignifikáns csökkenésével. Ezért valószínűnek tartjuk, hogy a ropivacain és articaín negatív inotróp hatásában a Na^+ -áram csökkenése is fontos szerepet játszik, amely a Na^+/Ca^{2+} exchangeren keresztül csökkenti a Ca^{2+} beáramlást a sejtbe [266]. Mindez azt sugallja, hogy a szarkoplazmatikus retikulum kisebb nettó transzmembrán Ca^{2+} -beáramlás okozta alacsonyabb Ca^{2+} -tartalma lehet az oka a $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek csökkent amplitúdójának és az ezt kísérő kontraktilitás csökkenésnek.

5.5. A helyi érzéstelenítők hatása a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} homeosztázisára

Bár 300 μM alatti koncentrációk esetén sem az articaín, sem a ropivacain nem befolyásolta a Ca^{2+} -felszabadulást és -felvételt az általunk vizsgált kutya nehéz SR vezikulákban, magasabb koncentrációkban mindkét gyógyszer szignifikánsan gátolta azokat a SERCA ATP-áz aktivitás ezzel együtt jelentkező csökkentésével. Ebből a szempontból a két gyógyszer eltérő módon hatott. Az articaín okozta gátlás 0,5 mM érték körül telítődött, maximális nagysága kb. 20 % volt, míg a ropivacain esetében a gyógyszer növekvő koncentrációival a gátló hatás progresszíven emelkedett, hasonlóan a lidocainnak a kutya SR ATP-ázra gyakorolt hatásához [267]. Ahogy ez várható volt, az ATP-áz aktivitás gátlása jó korrelációt mutatott a Ca^{2+} -felvétel gátlásával. Ugyanakkor nincs magyarázat a magas articaín és ropivacain koncentrációknak a Ca^{2+} -felvételre és felszabadulásra gyakorolt hasonló hatására. A ropivacainnak és az articainnak a RyR2-ra gyakorolt hatására vonatkozó irodalmi adatok hiányában csak a más helyi érzéstelenítők hasonló hatásaival tudjuk eredményeinket összevetni. A procain és a QX222 csökkentették

a RYR2 csatornák konduktanciáját bárányban, a tetracain és a bupivacain pedig csökkentette a ryanodin kötődését a sertés szarkoplazmatikus retikulumában [268, 269]. A tetracain kivételével, melynek EC_{50} értéke $100 \mu\text{M}$ volt, ezen hatások mindegyike csak milimólos koncentrációban volt megfigyelhető, ami a helyi érzéstelenítők és a RYR2 közötti nem specifikus kölcsönhatásra utal.

A jelen adatok klinikai jelentőségét csak a kísérletekben használt szerkoncentrációkat az articainnal és ropivacainnal kezelt betegek plazmájában az érzéstelenítés alatt mért gyógyszer szintekkel összehasonlítva tudjuk értékelni. A plazmában mért csúcskoncentrációk mind az articaín, mind a ropivacain esetében jellemzően $6-7 \mu\text{M}$ voltak [243, 244], bár a ropivacain nagy dózisainak alkalmazását követően $10-12 \mu\text{M}$ koncentrációt is mértek [246, 247]. Mivel a legalacsonyabb, a kontrakciós erőt és a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek amplitúdóját szignifikánsan csökkentő koncentráció $10 \mu\text{M}$ volt vizsgálatunkban, valószínű, hogy sem az articaín, sem a ropivacain nem változtatja meg jelentősen a szívizom Ca^{2+} homeosztázisát és kontraktilitását a neuroaxialis és regionális érzéstelenítés kapcsán jellemző plazmaszintek esetén. Ugyanakkor a túladagolás vagy véletlen intravénás injekció okozta intoxikáció esetén a plazmaszintek átmenetileg $100 \mu\text{M}$ felé emelkedhetnek. Ezek a koncentrációk erőteljesen ronthatják a szívizom mechanikai működését.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az articaín és a ropivacain a klinikai gyakorlatban viszonylag rövid ideje alkalmazott lokálanesztetikumok. Széleskörű használatuk ellenére keveset tudunk sejtszintű kardiális hatásaikról. Munkánkban ezért célul tűztük ki az articaín és a ropivacain celluláris szintű szívelektrofiziológiai hatásainak vizsgálatát kutyából izolált kamrai szívizomsejteken, egy olyan preparátumon, amelyet a humán szív legjobb jelenlegi modelljének tartanak.

Az articaín és ropivacain koncentrációfüggő módon megváltoztatta az akciós potenciálok alakját és jellemző paramétereit: csökkentették az akciós potenciál amplitúdóját és a depolarizáció maximális sebességét, általában rövidítették az akciós potenciál időtartamát, csökkentették a korai repolarizáció amplitúdóját, és a

plató depresszióját okozták. A Na^+ -csatornákra irányuló gátló hatást - a V_{\max} csökkenése alapján jellemezve - az articain esetében $162 \pm 30 \mu\text{M}$, míg a ropivacain esetén $81 \pm 7 \mu\text{M}$ EC_{50} értékeket kaptunk 1 Hz ingerlő frekvencia mellett. E tónusos gátlás mellett gyors offset kinetikájú frekvenciafüggő V_{\max} -gátlást lehetett megfigyelni mindkét szer jelenlétében, amelyet az articain esetén 91 ± 20 ms, míg a ropivacain esetén 340 ± 40 ms leválási időállandóval jellemeztünk.

Feszültség clamp körülmények között az articain és a ropivacain számos ionáramot gátolt. A gátlás erősségét rendre az alábbi EC_{50} értékekkel jellemeztük articain és ropivacain esetén: I_{Ca} : 471 ± 75 és $263 \pm 67 \mu\text{M}$, I_{to} : 365 ± 62 és $384 \pm 75 \mu\text{M}$, I_{Kr} : 278 ± 79 és $303 \pm 47 \mu\text{M}$, I_{Ks} : 326 ± 65 és $106 \pm 18 \mu\text{M}$, I_{K1} : 372 ± 46 és $372 \pm 35 \mu\text{M}$. A Hill koefficiensek egyhez közeli értéke egy-egy jól definiált kötőhely részvételére utal. Az egyes ioncsatornákra irányuló gátló hatásokat akciós potenciál clamp technikával is igazoltuk.

Az articain és ropivacain a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek amplitúdójának koncentrációfüggő csökkenését okozta ($\text{EC}_{50} = 87,4 \pm 12$ és $99,3 \pm 17 \mu\text{M}$), ami összhangban volt a kontraktilitás gátlásával ($\text{EC}_{50} = 73,7 \pm 10$ és $72,8 \pm 14 \mu\text{M}$). Sem az articain, sem a ropivacain nem befolyásolta közvetlenül a szarkoplazmatikus retikulum vezikuláiba történő Ca^{2+} -visszavétel, illetve az onnan történő Ca^{2+} -felszabadulás sebességi állandóit $300 \mu\text{M}$ koncentráció alatt. Az articain és ropivacain negatív inotróp hatása között nem találtunk számottevő minőségi különbséget.

Mivel a klinikailag releváns mikromoláris koncentráció tartományban sem az articain sem a ropivacain nem okozott szignifikáns változásokat a sejtek elektromos és mechanikai paramétereiben, arra következtetünk, hogy mindkét szer biztonságosan alkalmazható. Az articain és a ropivacain a szív akciós potenciálját és ionáramait csak a terápiás szinteknél magasabb, túladagolással vagy vénába történő véletlen bejuttatással elérhető koncentrációk esetén gátolja. Ilyen körülmények között az articain esetében kevesebb mellékhatásra számíthatunk, mint a ropivacain túladagolása esetén. Ráadásul a ropivacain esetében fokozott proarrhythmias kockázat várható az anesztéziát követő rövidebb időszakban is.

7. ÚJ EREDMÉNYEK

Közleményünkben elsőként elemeztük az articain celluláris szívelektrofiziológiai hatásait. Az articain koncentrációfüggő módon csökkenti az akciós potenciál időtartamát, amplitúdóját, a depolarizáció maximális sebességét (V_{max}), a korai repolarizáció nagyságát és plató-depressziót okoz. A tónusos V_{max} -gátlás mellett egy gyors kinetikájú frekvenciafüggő V_{max} -gátlás is kialakul. A klinikai alkalmazás szempontjából releváns plazmaszinteknél magasabb koncentrációkban az articain számos ionáramot (I_{Ca} , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}) gátol, a befelé és kifelé irányuló áramokra viszonylag kiegyensúlyozott hatást gyakorolva. Ez utóbbi miatt az akciós potenciál morfológiájának csak mérsékelt változása várható egy esetleges túladagolás esetén.

Elsőként vizsgáltuk a ropivacain kardiális ionáramokra kifejtett hatásait kutya kamrai szívizmon, egy olyan modellen, amelynek akciós potenciálja és az annak háttérében lévő ionáramok denzitása és megoszlása nagyon hasonlít a humán szív megfelelő jellemzőire. A ropivacain a Na^+ -áramra gyakorolt jól ismert gátló hatásán kívül az akciós potenciál háttérében álló egyéb befelé és kifelé irányuló ionáramokat (I_{Ca} , I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) is gátolja. A klinikai alkalmazás során mért plazmaszintek felett - pl. esetleges túladagolás esetén - szívritmuszavarokra lehet számítani az anesztézia közben és főleg után, mivel a ropivacain hatásának eliminációja a befelé és kifelé irányuló áramok vonatkozásában kiegyensúlyozatlan.

Elsőként vizsgáltuk az articain negatív inotróp hatásának mechanizmusát. Az articain és a ropivacain reverzibilis és koncentrációfüggő módon csökkenteti a $[Ca^{2+}]_i$ tranziensek amplitúdóját, amely összhangban van a kontraktilis erő csökkenésével. Sem az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulás, sem az oda történő Ca^{2+} -visszavétel, sem az SR ATP-áz aktivitása nem változik szignifikánsan 200 μM alatti articain és ropivacain koncentrációk jelenlétében. Mivel az articain és a ropivacain közel azonos mértékben ($EC_{50} = 327$ és $263 \mu M$) gátolja az L-típusú Ca^{2+} -áramot, a szerek hasonló mértékű negatív inotróp hatását elsősorban a transzmembrán Ca^{2+} -belépés csökkenésével magyarázzuk, bár valószínűleg a Na^+ -belépés gátlása is hozzájárul az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak csökkenéséhez..

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, Dr. Márton Ildikó professzornak, a DEOEC Fogorvostudományi Kar előző dékánjának és Dr. Nánási Péter professzornak a Fogorvosi Élettani és Gyógyszertani Tanszék vezetőjének, akik kutatómunkámat mindvégig irányították.

Köszönöm Dr. Magyar Jánosnak hasznos szakmai tanácsait, Dr. Szentandrásy Norbertnek és Dr. Birinyi Péternek önzetlen segítőkészségüket és Dr. Víghné Horváth Katalinnak a kísérleti munkában nyújtott technikai segítséget.

Köszönetemet nyilvánítom továbbá mindazoknak, akik munkájukkal a jelen értekezés alapját képező közlemények elkészítéséhez hozzájárultak, név szerint Dr. Almássy Jánosnak, Dr. Bányász Tamásnak, Dr. Horváth Balázsnak, Dr. Jóna Istvánnak és Dr. Szabó Gergelynek.

9. IRODALOMJEGYZÉK

9.1 Az értekezésben hivatkozott irodalom

1. Covino BG. Pharmacology of local anesthetic agents. *Br J Anaesth* 1986 ;58: 701-16
2. Schwarz W, Palade PT, Hille B. Local anesthetics. Effect of pH on use-dependent block of sodium channels in frog muscle. *Biophys J.* 1997;20: 343-68
3. Strichartz GR, Sanchez V, Arthur GR, Chafetz R, Martin D. Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficients and pKa values of clinically used drugs. *Anesth Analg.*1990 ;71(2): 158-70
4. Bräu ME, Vogel W, Hempelmann G: Fundamental properties of local anesthetics: half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na⁺ and K⁺ channels in peripheral nerve. *Anaesth Analg.*1998;87: 885-9.
5. Bokesch PM, Post C, Strichartz G. Structure-activity relationship of lidocaine homologues producing tonic and frequency –dependent impulse blockade in nerve. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986 ;237: 773-81
6. Ehring GR, Moyer JW, Hondeghem LM. Quantitative structure activity studies of antiarrhythmic properties in a series of lidocaine and procainamide derivatives. *J Pharmacol Exp Ther.*1988;244: 479-92
7. Courtney KR. Structure–activity relations for frequency–dependent sodium channel block in nerve by local anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980 ;213: 114-9
8. Gissen AJ, Covino BG, Gregus J. Differential sensitivities of mammalian nerve fibers to local anesthetic agents. *Anesthesiology.*1980;53: 467-74
9. Gokin AP, Philip B, Strichartz GR. Preferential block of small myelinated sensory and motor fibres by lidocaine: in vivo electrophysiology in the rat sciatic nerve. *Anesthesiology.* 2001;95: 1441-54
10. Quasthoff S, Grosskreutz J, Schröder JM, Schneider U, Grafe P. Calcium potentials and tetrodotoxin–resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve. *Neuroscience.*1995;69: 955-65
11. Huang JH, Thalhammer JG, Raymond SA, Strichartz GR. Susceptibility to lidocaine of impulses in different somatosensory afferent fibers of rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282: 802-11
12. Jaffe RA, Rowe MA. Differential nerve block. Direct measurement on individual myelinated and unmyelinated dorsal root axons. *Anesthesiology.*1996;84: 1455-64
13. Weidmann S. The effects of calcium ions and local anesthetics on electrical properties of Purkinje fibres. *J Physiol.*1955;129: 568–82
14. Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, Fujiyoshi Y. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature.* 2001; 409:1047-51
15. Beneski DA, Catterall WA . Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A .*1980;77: 639-43

16. Harsthorne RP, Catterall WA. The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *J Biol Chem.* 1984;259: 1667-75
17. Agnew WS, Moore AC, Levinson SR, Raftery MA. Identification of a large molecular weight peptide associated with tetrodotoxin binding proteins from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980; 92: 860-6
18. Noda M, Ikeda T, Suzuki T, Takeshima H, Kurasaki Takahashi H, Numa S: Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature* 1986;322: 826-8
19. Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL, Catterall WA. Primary structure and functional expression of the beta1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science.* 1992;256: 839-42
20. Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, Catterall WA. Structure and function of the beta2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell.* 1995;83: 433-42
21. Catterall WA: From ionic currents to molecular mechanisms. The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 2000;26: 13-25
22. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure - function relationships of voltage - gated sodium channels. IUPHAR compendium of voltage -gated ion channels. *Pharmacol Rev .* 2005;57: 397-409
23. Isom LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist.* 2001;7: 42-54.
24. Lipkind GM, Fozzard HA. A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na⁺ channel. *Biophys J.*1994;66: 1-13
25. Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science.*1991;251: 939-42
26. Guy HR , Seetharamulu P. Molecular model of the action potential sodium current. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83: 508-12
27. Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutation. *Nature.* 1992; 356:441-3
28. Bhattachayya ML, Vassalle M. Effects of tetrodotoxin on electrical and mechanical activity of cardiac Purkinje fibers. *J Electrocardiol.* 1982;15: 351-60
29. Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W: Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett.* 1991;293:93-6
30. Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature.* 1989;339: 597-603
31. Rogawski MA, Löscher W: The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.*2004;(7):553-64
32. Scholz A: Mechanisms of (local) anesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br. J Anaesth.* 2002;89(1):52-61

33. Catterall WA: A 3D view of sodium channels. *Nature*. 2001;409(6823):988-9,991
34. Elinder F, Nilsson J, Arhern P: On the opening of voltage-gated ion channels, *Physiol Behav*. 2007;92(1-2):1-7
35. Papazian DM, BEzanilla F: How does an ion channel sense voltage? *News Physiol Sci*. 1977;12:203-210
36. Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, McKinnon R: The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. 2003;423(6935):42-8
37. Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*. 1988; 241: 1658–61
38. West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA: A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺- channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10910-4
39. Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL: Amino acid residues required for fast Na⁺ - channel inactivation: charge neutralization and deletion in the III-IV linker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10905-9
40. McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA. A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J Biol Chem*. 1998;273: 1121-9
41. Rohl CA, Boeckman FA, Baker C, Scheuer T, Catterall WA, Klevit RE. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry*. 1999;38: 855-61
42. Adelman WJ, Jr, Palti Y. The effects of external potassium and long duration voltage conditioning on the amplitude of sodium currents in the giant axon of the squid, *Loligo pealei*. *J Gen Physiol*. 1969;54:589–606.
43. Kambouris NG, Hastings LA, Stepanovic S, Marban E, Tomaselli GF, Balser JR. Mechanistic link between lidocaine block and inactivation probed by outer pore mutations in the rat micro 1 skeletal muscle sodium channel. *J Physiol*. 1998 512: 693–705
44. Todt H, Dudley SC Jr, Kyle JW, French RJ, and Fozzard HA. Ultra-slow inactivation in micro 1 Na⁺ channels is produced by a structural rearrangement of the outer vestibule. *Biophys J*. 1999;76: 1335–45
45. Sandtner W, Szendroedi J, Hilber K, Zarrabi T, Fozzard HA, Dudley SC Jr, Todt H. Lidocaine: a foot in the door of the inner pore of the voltage-gated Na channel. *Mol Pharmacol*. 2004; 66:648-57
46. Bénitah JP, Chen Z, Balser JR, Tomaselli GF, Marbán E. Molecular dynamics of the sodium channel pore vary with gating: interactions between P- segment motions and inactivation. *J Neurosci*. 1999;19:1577-85
47. Xiong W, Farukhi YZ, Tian Y, Disilvestre D, Li RA, Tomaselli GF. A conserved ring of charge in mammalian Na⁺ channels: a molecular regulator of the outer pore conformation during slow inactivation. *J Physiol*. 2006;576: 739-54
48. Balser J, Nuss HB, Chiamvimonvat N, Pérez-García M, Marban E, Tomaselli GF. External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J Physiol*. 1996;494: 431–42

49. Ong BH, Tommaselli GF, Balsler JR. A structural rearrangement in the sodium channel pore linked to slow inactivation and use-dependence. *J Gen Physiol.* 2000;116: 653-62
50. Ruff RL, Simoncini L, Stühmer W. Slow sodium channel inactivation in mammalian muscle: a possible role in regulating excitability. *Muscle Nerve.* 1988; 11: 502–10
51. Courtney KR. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by lidocaine derivate GEA. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975 ;195: 225-36
52. Gintant GA, Hoffman BF. Use-dependent block of cardiac sodium channels by quaternary derivatives of lidocaine. *Pflugers Arch.* 1984 ;400: 121-9
53. Courtney KR, Kendig JJ, Cohen EN. The rates of inactivation of local anesthetics with sodium channels in nerve. *J Pharmacol Exp Ther.* 1978 ;207: 594-604.
54. Li HL, Galue A, Meadows L, Ragsdale DS. A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channels. *Mol Pharmacol.* 1999 ;55: 134-41
55. Matsubara T, Clarkson C, Hondeghem L . Lidocaine blocks open and inactivated cardiac sodium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arc Pharmacol.* 1987;336: 224-31
56. Hille B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug–receptor interaction. *J Gen Physiol.* 1977;69: 497-515
57. Starmer CF, Grant AO, Strauss HC. Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics, *Biophys J.* 1984 ;46: 15-27
58. Sunami A, Glaaser IW, Fozzard HA: A critical residue for isoform difference in tetrodotoxin affinity is a molecular determinant of the external access path for local anesthetics in the cardiac sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97: 2326-31
59. Lee PJ, Sunami A, Fozzard HA. Cardiac-specific external paths for lidocaine, defined by isoform-specific residues, accelerate recovery from use-dependent block. *Circ. Res.* 2001;89; 1014-21
60. Bruhova I, Tikhonov DB, Zhorov B: Access and binding of local anesthetics in the closed sodium channel. *Mol Pharmacol.* 2008 ; 74: 1033-45
61. Yang YC, Hsieh JY, Kuo CC. The external pore loop interacts with S6 and S3-S4 linker in domain 4 to assume an essential role in gating control and anticonvulsant action in the Na⁺ channel. *J Gen Physiol.* 2009 ;134: 95-113
62. Cahalan MD. Local anesthetic block of sodium channels in normal and pronase-treated squid giant axons. *Biophys J.* 1978;23: 285–311
63. Vedantham V, Cannon SC. The position of the fast-inactivation gate during lidocaine block of voltage-gated Na⁺ channels. *J Gen Physiol.* 1999;113: 7–16.
64. Chen Z, Ong BH, Kambouris NG, Marbán E, Tomaselli GF, Balsler JR. Lidocaine induces a slow inactivated state in rat skeletal muscle sodium channels. *J Physiol.* 2000;524: 37–49.

65. Fukuda K , Nakajima T, Viswanathan PC, Balsler JR. Compound specific Na⁺ channel pore conformational changes induced by local anesthetics. *J Physiol.* 2005;564: 21-31
66. Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* 2003;423: 33-41
67. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* 1998 Apr;280: 69-77
68. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science.* 1994;265: 1724-8
69. Kondratiev A, Tomaselli GF. Altered gating and local anesthetic block mediated by residues in the I-S6 and II-S6 transmembrane segments of voltage-dependent Na⁺ channels. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 741-752
70. Lipkind GM, Fozzard HA. Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol.* 2005;68: 1611-22.
71. McNulty MM, Edgerton GB, Shah RD, Hanck DA, Fozzard HA, Lipkind GM. Charge at the lidocaine binding site residue Phe-1759 affects permeation in human cardiac voltage-gated sodium channels. *J Physiol.* 2007; 581: 714-55
72. Ahern CA, Eastwood AL, Dougharty DA, Horn R. Electrostatic contributions of aromatic residues in the local anesthetic receptor of voltage-gated sodium channels. *Circ Res.* 2008;102: 86-94
73. Sheets MF and Hanck DA. Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium channels. *J Gen Physiol.* 2003; 121: 163–75.
74. Sheets MF, Hanck DA. Outward stabilization of the S4 segments in domain III and IV enhances lidocaine block of sodium channels. *J Physiol.* 2007; 582: 317-34
75. Muroi Y, Chanda B. Local anesthetics disrupt energetic coupling between the voltage-sensing segments of a sodium channel. *J Gen Physiol.* 2009;133: 1-15
76. Sheets MF, McNulty MM, Chen T, Hanck DA. Modification of gating differentiates rested state block from use-dependent block for lidocaine with Na⁺ channels. *Biophys J.* 2008;94: 3085. Abstract
77. Hanck DA, Nikitina E, McNulty MM, Fozzard HA, Lipkind GM, Sheets MF. Using lidocaine and benzocaine to link sodium channel molecular conformations to state dependent antiarrhythmic drug affinity. *Circ Res.* 2009; 105: 492-9
78. Chernoff DM, Strichartz GR. Kinetics of local anesthetic inhibition of neuronal sodium currents. pH and hydrophobicity dependence. *Biophys J.* 1990; 58: 69-81
79. Courtney KR. Sodium channel blockers: the size/solubility hypothesis revisited. *Mol Pharmacol.* 1990;37: 855-9
80. Braid DP, Scott DB. The systemic absorption of local analgesic drugs. *Br J Anaesth.* 1965 ;37:394-404
81. Behnke H, Worthmann F, Cornelissen J, Kahl M, Wulf H. Plasma concentrations of ropivacaine after intercostal blocks for video-assisted thoracic surgery. *Br J Anaesth.* 2002 ;89: 251-3

82. Mottura AA, Procickievicz O. The fate of lidocaine infiltrate during abdominoplasty and a comparative study of absorption of local anesthetic in 3 different regions: experimental studies in a porcine model. *Aesthet Surg J.* 2001;5: 418-22
83. Aps C, Reynolds F. The effect of concentration on vasoactivity of bupivacaine and lignocaine. *Br J Anaesth.* 1976;48: 1171-4
84. Johns RA, DiFazio CA, Longnecker DE. Lidocaine constricts or dilates rat arterioles in a dose-dependent manner. *Anesthesiology.* 1985;62: 141-4.
85. Nakamura K, Toda H, Kakuyama M, Nishiwada M, Yamamoto M, Hatano Y, Mori K: Direct vascular effect of ropivacaine in femoral artery and vein of the dog. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1993;37:269-73
86. Routledge PA. The plasma protein binding of basic drugs. *Br J Clin Pharmacol.* 1986;5: 499-506
87. Rygnestad T, Brevik BK, Samdal F. Plasma concentrations of lidocaine and alpha1-acid glycoprotein during and after breast augmentation. *Plast Reconstr Surg.* 1999;103: 1267-72
88. Post C, Andersson RG, Ryrfeldt A, Nilsson E. Physico-chemical modification of lidocaine uptake in rat lung tissue. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1979;44:103-9
89. O'Brien JE, Abbey V, Hinsvark O, Perel J, Finster M. Metabolism and measurement of chlorprocaine, an ester-type local anesthetic. *J. Pharm Sci.* 1979;68: 75-8
90. Tucker GT, Mather LE. Clinical pharmacokinetics of local anesthetics. *Clin Pharmacokinet.* 1979; 4: 241-78
91. Orlando R, Piccoli P, De Martin S, Padrini R, Floreani M, Palatini P. Cytochrome P450 1A2 is a major determinant of lidocaine metabolism in vivo: effects of liver function. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;75:80-8
92. Sato T, Ono T, Ozaki M, Sakio H, Yasuda S. Lidocaine metabolism associated with epidural anesthesia in patients for hepatic surgery. *Masui.* 1999;48: 1318-22
93. Kytta J, Heavner J, Badgwell J, Rosenberg P. Cardiovascular and central nervous system effects of coadministered lidocaine and bupivacaine. *Reg Anesth.* 1991;16: 89-94
94. Reinikainen M, Hedman A, Pelkonen O, Ruokonen E. Cardiac arrest after interscalene brachial plexus block with ropivacaine and lidocaine. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2003;47: 904-6
95. Copeland SE, Ladd LA, GU XQ, Mather LE. The effects of general anesthesia on the central nervous and cardiovascular system toxicity of local anesthetics. *Anesth Analg* 2008;106: 1429-39
96. Knudsen K, Beckman Suurkula M, Blomberg S, Sjövall J, Edvardsson N. Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. *Br J Anaesth.* 1997;78: 507-14
97. Englesson S, Matousek M. Central nervous system effects of local anesthetic agents. *Br J Anaesth.* 1975;47 Suppl: 241-6
98. Denson DD, Behbehani MM, Gregg RV: Enantiomer-specific effects of an intravenously administered arrhythmogenic dose of bupivacaine on neurons of the nucleus tractus solitarius and the cardiovascular system in the anesthetized rat. *Reg Anesth.* 1992; 17:311-6

99. Pickering AE, Waki H, Headley PM, Paton JF. Investigation of systemic bupivacaine toxicity using the in situ perfused working heart-brainstem preparation of the rat. *Anesthesiology*. 2002;97:1550-6
100. Thomas RD, Behbehani MM, Coyle DE, Denson DD. Cardiovascular toxicity of local anesthetics: an alternative hypothesis. *Anesth Analg*. 1986;65: 444-50
101. Varró A, Papp JG. The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. *Cardioscience*. 1992;3:131-44.
102. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Diego JM, Gintant GA, Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res*. 1991;69: 1427-49
103. Ravens U, Cerbai E. Role of potassium currents in cardiac arrhythmias. *Europace*. 2008; 10:1133-7
104. Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res*. 1988;62:116-26
105. Berman MF, Camardot JS, Robinson RB, Siegelbaum SA. Single sodium channels from canine ventricular myocytes :voltage dependence and relative rates of activation and inactivation. *J Physiol*.1989;415: 503-31
106. Sakakibara Y, Wasserstrom JA, Furukawa T, Jia H, Arentzen CE, Hartz RS, Singer DH. Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circ. Res*. 1992;71: 535-46.
107. Sakakibara Y, Furukawa T, Singer DH, Jia H, Backer CL, Arentzen CE, Wasserstrom JA . Sodium current in isolated human ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1993;265 :H1301-9.
108. Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M, Ojeda C. The steady-state TTX-sensitive („window”) sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch*.1979; 379: 137-42
109. Colatsky TJ. Mechanism of action of lidocaine and Quinidine on action potential duration in rabbit cardiac Purkinje fibres. An effect on steady-state sodium currents ? *Circ Res*. 1982; 50: 17-27
110. Belluzzi O, Sacchi O, Wanke E. A fast transient outward current in the rat sympathetic neurone studied under voltage-clamp conditions. *J Physiol*. 1985 ;358: 91-108
111. Josephson JR, Sanchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res*. 1984;54: 157-62
112. Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch*. 1982;392: 352-9.
113. Tseng, GN, Hoffman BF. Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res*. 1989;64: 633-47
114. Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Back PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33: 851-72
115. Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. Role of the Kv4.3 K^+ channel in ventricular muscle. *A*

- molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res.*1996; 79:659–68
116. Franqueza L, Valenzuela C, Eck J, Tamkun MM, Tamargo J, Synders DJ. Functional expression of an inactivating potassium channel (Kv4.3) in a mammalian cell line. *Cardiovasc Res* 1999;41: 212-19
 117. Li Gr, Feng J, Yue L, Carrier M. Transmural heterogeneity of action potentials and I_{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol.* 1998;275: 369-77
 118. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K^+ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res.* 1993; 73: 379-85
 119. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA, Twist VW. Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1983;219: 447-69.
 120. Hirano Y, Moscucci A, January CT. Direct measurement of L-type Ca^{2+} window current in heart cells. *Circ Res.* 1992;70 :445-55
 121. Lee KS, Marban E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol.* 1985;364: 395-411.
 122. Fabiato A. Calcium induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1983;245: C1-C14.
 123. Barry WH, Bridge JHB. Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Circulation.* 1993;87: 1806-15
 124. Mikami A., Imoto K., Tanabe T., Niidome T., Mori Y., Takeshima H., Narumiya S., Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature.*1989;340:230–3
 125. Bers DM: Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205
 126. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol.* 1990;96:195-215
 127. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol.* 1991;260: H393-H399.
 128. Chinn K. Two delayed rectifiers in guinea-pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;264: 553-560
 129. Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 1995; 269: 92–5
 130. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999; 97: 175–87
 131. McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SA, Fishman GI. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current $I(Kr)$. *Nature.* 1997;388: 289-92.
 132. Mitcheson JS, M.C. Sanguinetti MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem.* 1999;9: 201-16

133. Rudy Y. Molecular basis of cardiac action potential repolarization. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1123:113-8
134. Varró A, Baláti B, Iost N, Takács J, Virág L, Lathrop DA. The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fiber repolarization. *J Physiol.* 2000;523: 67-81
135. Cheng J, Kodama I. Two components of delayed rectifier K⁺ current in heart: molecular basis, functional diversity, and contribution to repolarization. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25 : 137-45
136. Rudy Y. Modelling the molecular basis of cardiac repolarization. *Europace.* 2007; 9 Suppl 6:vi17-9
137. Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res.* 1999; 42:377-90
138. Rosenberg PH, Kytä J, Alila A. Absorption of bupivacaine, etidocaine, lignocaine and ropivacaine into n-heptane, rat sciatic nerve, and human extradural and subcutaneous fat. *Br J Anaesth.* 1986;58:310-4
139. Kopacz DJ, Emanuelsson BM, Thompson GE, Carpenter RL, Stephenson CA. Pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine for bilateral intercostal blockade in healthy male volunteers. *Anesthesiology.* 1994;81: 1139-48
140. Akerman B, Hellberg IB, Trossvik C. Primary evaluation of the local anesthetic properties of the aminoamid agent ropivacaine (LEA 103). *Acta Anaesthesiol Scand.*1988;32:571-8
141. Bader AM, Datta S, Flanagan H, Covino BG. Comparison of bupivacaine and ropivacaine-induced conduction blockade in the isolated rabbit vagus nerve. *Anesth. Analg.* 1989;68: 724-7
142. Concepcion M, Arthur GR, Steele SM, Bader AM, Covino BG. A new local anesthetic, ropivacaine. Its epidural effects in humans. *Anesth Analg.* 1990;70: 80-5.
143. Feldman HS, Covino BG. Comparative motor–blocking effects of bupivacaine and ropivacaine a new amino amide local anesthetic in the rat and dog. *Anesth Analg.* 1988; 67: 1047-52
144. Greengrass RA, Klein SM , D’Ercole FJ, Gleason DH, ,Shimer CL, Steele SM. Lumbar plexus and sciatic nerve block for knee arthroplasty: comparison of ropivacaine and bupivacaine. *Can J Anesth.* 1998;45: 1094-6
145. Eroglu A, Uzunlar H, Senser M, Akinturk Y, Erciyes N. A clinical comparison of equal concentrations and volume of ropivacaine and bupivacaine for interscalene brachial plexus anesthesia and analgesia in shoulder surgery. *Reg Anaesth Pain Med.* 2004 ;29: 39-43
146. Klein SM, Greengrass RA, Steele SM, D’Ercole FJ, Speer KP, Gleason DH, DeLong ER, Warner DS. A comparison of 0.5 % bupivacaine, 0.5 % ropivacaine and 0.75 % ropivacaine for interscalene brachial plexus block. *Anesth Analg.* 1998;87:1316-9
147. Casati A, Putzu M. Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different ? *Best Prct Rs Clin Anaesthesiol.* 2005;19: 247-68.
148. McDonald SB, Liu SS, Kopacz DJ, Stephenson CA. Hyperbaric spinal ropivacaine: a comparison to bupivacaine in volunteers. *Anesthesiology.* 1999; 90: 971-7

149. Connolly C, Coventry DM, Wildsmith JA. Double-blind comparison of ropivacaine 7,5 mgml⁻¹ with bupivacaine 5 mgml⁻¹ for sciatic nerve block. *Br J Anaesth.* 2001;86: 674-7
150. Capogna G, Celleno D, Fusco P Lyons G, Columb M. Relative potencies of bupivacaine and ropivacaine for analgesia in labor. *Br J Anaesth.* 1999;82: 371-3
151. LeeYY, Kee WD, Fong SY, Liu JT, Gin T. The median effective dose of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine after intrathecal injection in lower limb surgery. *Anesth Analg.* 2009;109: 1331-4
152. Camorcia M, Capogna G, Columb MO. Minimum local analgesic doses of ropivacaine, levobupivacaine and bupivacaine for intrathecal labor analgesia. *Anesthesiology.* 2005;102: 646-50
153. Camorcia M, Capogna G, Berritta C, Columb MO. The relative potencies for motor block after intrathecal ropivacaine, levobupivacaine, and bupivacaine. *Anesth Analg.* 2007;104: 904-7
154. Takeuchi M, Hirabayashi Y, Hotta K, Inoue S, Seo N. Ropivacaine-induced grand-mal convulsion after obturator nerve blockade. *Masui.* 2005;54: 1309-12
155. Müller M, Litz RJ, Hüler M, Albrecht DM. Grand mal convulsions and plasma concentrations after intravascular injection of ropivacaine for axillary brachial plexus blockade. *Br J Anaesth.* 2001;87: 784-7
156. Kimura Y, Kamada Y, Kimura A, Orimo K Ropivacaine-induced toxicity with overdose suspected after axillary brachial plexus block. *J Anesth.* 2007;21: 413-6
157. Dhir S, Ganapathy S, Lindsay P, Athwal GS. Case report: ropivacaine neurotoxicity at clinical doses in interscalene brachial plexus block. *Can J Anaesth.* 2007; 54: 912-6.
158. Cherng CH, Wong CS, HO ST. Ropivacaine-induced convulsion immediately after epidural administration – a case report. *Acta Anaesthesiol Sin.* 2002;40: 43-5
159. Petitjeans F, Mion G, Puidupin M, Tourtier JP, Hutson C, Saissy JM. Tachycardia and convulsions induced by accidental intravascular ropivacaine injection during sciatic block. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002;46: 616-7
160. Huet O, Eyrolle LJ, Mazoit JX, Ozier YM. Cardiac arrest after injection of ropivacaine for posterior lumbar plexus blockade. *Anesthesiology.* 2003;99: 1451-3
161. Chazalon P, Tourtier JP, Villevielle T, Giraud D, Saissy JM, Mion G, Benhamou D. Ropivacaine induced cardiac arrest after peripheral nerve block: successful resuscitation *Anesthesiology*, 2003;99: 1449-50
162. Klein SM, Pierce T, Rubin Y, Nielsen KC, Steele SM. Successful resuscitation after ropivacaine-induced ventricular fibrillation. *Anesth Analg* 2003;97: 901-3
163. Gielen M, Slappendel R, Jack N. Successful defibrillation immediately after the intravascular injection of ropivacaine. *Can J Anaesth* 2005; 52:490-2
164. Litz RJ, Popp M, Stehr SN, Koch T. Successful resuscitation of a patient with ropivacaine-induced asystole after axillary plexus block using lipid infusion. *Anaesthesia* 2006;61: 800-1

165. Khoo LP, Corbett AR. Successful resuscitation of an ASA 3 patient following ropivacaine-induced cardiac arrest. *Anaesth Intensive Care* 2006;34: 804-7
166. Ludot H, Tharin JY, Belouadah M, Mazoit JX, Malinovsky JM : Successful resuscitation after ropivacaine and lidocaine-induced ventricular arrhythmia following posterior lumbar plexus block in a child. *Anesth Analg.*2008;106: 1572-4
167. Yoshida M, Matsuda H, Fukuda I, Furuya K. Sudden cardiac arrest during cesarean section due to epidural anaesthesia using ropivacaine: a case report. *Arch Gynecol Obstet.*2008;277: 91-4
168. Lascarrou JB, Thibaut F, Malinovsky JM. Cardiac arrest after axillary plexic anaesthesia with ropivacaine in a chronic kidney failure dialysis patient *Ann Fr Anesth Reanim.* 2008; 27: 495-8
169. Scott DB, Lee A, Fagan D, Bowler GM, Bloomfield P, Lundh R. Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine. *Anesth Analg.* 1989; 69: 563-9
170. Bariskaner H, Tuncer S, Ulusoy H, Dogan N. Effects of bupivacaine and ropivacaine on hemodynamic parameters in rabbits. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2001;23: 89-92
171. Guinet P, Estebe JP, Ratajczak-Enselme M, Bansard JY, Chevanne F, Bec D, Lecorre P, Wodey E, Ecoffey C. Electrocardiographic and hemodynamic effects of intravenous infusion of bupivacaine, ropivacaine, levobupivacaine and lidocaine in anesthetized ewes. *Reg Anesth Pain Med.* 2009;34: 17-23
172. Feldman HS, Arthur GR, Covino BG. Comparative systemic toxicity of convulsant and supraconvulsant doses of intravenous ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine in the conscious dog. *Anesth Analg.* 1989 ;69: 794-801
173. Pitkanen M, Feldman HS, Arthur GR, Covino BG. Chronotropic and inotropic effects of ropivacaine, bupivacaine and lidocaine in the spontaneously beating and electrically paced isolated, perfused rabbit heart. *Reg Anesth.* 1992;17: 183-92
174. Bilir A, Yelken B, Kaygisiz Z, Senturk Y. The effects of dexmedetomidine in bupivacaine and ropivacaine induced cardiotoxicity in isolated rat heart. *Saudi Med J.*200;27: 1194-8.
175. Mazoit JX, Decaux A, Bouaziz H, Edouard A. Comparative ventricular electrophysiologic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine on the isolated rabbit heart. *Anesthesiology* 200;93: 784-93
176. Dony P, Dewinde V, Vanderick B, Cuignet O, Gautier P, Legrand E, Lavand'homme P, De Kock M. The comparative toxicity of ropivacaine and bupivacaine at equipotent doses in rats. *Anesth Analg.* 2000;91: 1489-92
177. Rutten AJ, Nancarrow C, Mather LE, Ilsley AH, Runciman WB, Upton RN. Hemodynamic and central nervous system effects of intravenous bolus doses of lidocaine, bupivacaine and ropivacaine in sheep. *Anesth Analg.* 1989;69: 291-9
178. Lefrant JY, de La Coussaye JE, Ripart J, Muller L, Lalourcey L, Peray P, Mazoit X, Sassin A, Eledjam JJ. The comparative electrophysiologic and hemodynamic effects of a large dose of ropivacaine and bupivacaine in anesthetized and ventilated piglets. *Anesth Analg* 2001;93:1598-1605

179. Reiz S, Häggmark S, Johansson G, Nath S. Cardiotoxicity of ropivacaine—a new amide local anesthetic agent. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1989;33: 93-8
180. Nancarrow C, Rutten AJ, Runciman WB, Mather LE, Carapetis RJ, McLean CF, Hipkins SF. Myocardial and cerebral drug concentrations and the mechanism of death after fatal intravenous doses of lidocaine, bupivacaine and ropivacaine in sheep. *Anesth Analg.* 1989;69: 276-83
181. Groban L, Deal DD, Vernon JC, James RL, Butterworth J. Cardiac resuscitation after incremental overdosage with lidocaine, bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine in anesthetized dogs. *Anesth Analg.* 2001;92: 37-43
182. Morrison SG, Dominguez JJ, Frascarolo P, Reiz S. A comparison of the electrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine in anesthetized swine. *Anesth Analg.* 2000;90: 1308-14
183. Ohmura S, Kawada M, Ohta T, Yamamoto K, Kobayashi T. Systemic toxicity and resuscitation in bupivacaine-levobupivacaine –or ropivacaine –infused rats. *Anesth Analg.* 2001;93: 743-8
184. Chang DH, Ladd LA, Copeland S, Iglesias MA, Plummer JL, Mather LE: Direct cardiac effects of intracoronary bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine in the sheep. *Br J Pharmacol.* 2001;132: 649-58
185. Santos AC, Arthur GR, Pedersen H, Morishima HO, Finster M, Covino BG. Systemic toxicity of ropivacaine during ovine pregnancy. *Anesthesiology.* 1991;75: 137-4
186. Moller RA, Covino BG. Effect of progesterone on the cardiac electrophysiologic alterations produced by ropivacaine and bupivacaine. *Anesthesiology.* 1992;77: 735-41
187. Santos AC, Arthur GR, Wlody D, De Armas P, Morishima HO, Finster M. Comparative systemic toxicity of ropivacaine and bupivacaine in nonpregnant and pregnant ewes. *Anesthesiology* 1995;82: 734-40; discussion 27A.
188. Wulf H, Petry A, Gödicke J. The potential dependence of the effect of bupivacaine and ropivacaine on the heart. In-vitro studies on the effect of local anesthetic on the force of contraction and the action potential in the left guinea pig atria. *Anaesthesist.*1993;42: 516-20
189. Moller R, Covino BG: Cardiac electrophysiologic properties of bupivacaine and lidocaine compared with those of ropivacaine, a new amide local anesthetic. *Anesthesiology.* 1990;72: 322-9
190. Arlock P. Action of three local anesthetics, lidocaine, bupivacaine and ropivacaine on guinea pig papillary muscle sodium channel (V_{max}). *Pharmacol Toxicol.* 1988;63: 96-104
191. Aya AG, de la Cousaye JE, Robert E, Ripart J, Cuvillon P, Mazoit JX, Jeannes P, Fabbro-Péray P, Eledjam JJ. Comparison of the effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on ventricular conduction, refractoriness, and wavelength: an epicardial mapping study. *Anesthesiology.* 2002; 96: 641-50
192. Friederich P, Solth A. Interaction of ropivacaine with cloned cardiac Kv4.3/KChIP2.2 complexes. *Anesthesiology.* 2004;101: 1347-56

193. Valenzuela C, Delpón E, Franqueza L, Gay P, Synders D, Tamargo J. Effects of ropivacaine on a potassium channel (hKv1.5) cloned from human ventricle. *Anesthesiology*. 1997;86: 718-28
194. Friederich P, Solth A, Schillemeit S, Isbrandt D. Local anesthetic sensitivities of cloned HERG channels from human heart: comparison with HERG / MliRP1 and HERG/MiRP1_{T8A}. *Br J Anaesth*. 2004;92: 93-101
195. Ding HL, Zeng YM, Li XD, Jiang WP, Duan SM. Effects of ropivacaine on sodium, calcium and potassium currents in guinea pig ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin*. 2002;29: 50-54
196. Vree TB, Simon MA, Gielen MJ, BOOij LH. Regional metabolism of articaine in 10 patients undergoing intravenous regional anaesthesia during day case surgery. *Br j Clin Pharmacol*. 1997 Jul;44(1):29-34
197. Vree TB, Van Oss GE, Gielen MJ, Booij LH. Epidural metabolism of articaine to its metabolite articainic acid in five patients after epidural administration of 600 mg articaine. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49: 158-63
198. Oertel R, Brendt A, Kirch W. Saturable in vitro metabolism of articaine by serum esterases. Does it contribute to the persistence of the local anesthetic effect? *Reg Anesth*. 1996;21: 576-81
199. Mikesell P, Nusstein J, Reader A, Beck M, Weaver J. A comparison of articaine and lidocaine for inferior alveolar nerve blocks. *J Endod*. 2005;31: 265-70
200. Rosenberg PA, Amin KG, Zibari Y, Lin LM. Comparison of 4% Articaine with 1:100,000 Epinephrine and 2 % Lidocaine with 1:100,000 epinephrine when used as a supplemental anesthetic. *J Endod*. 2007;33: 403-5
201. Jung IY, Kim JH, Kim ES, Lee CY, Lee SJ. An evaluation of buccal infiltrations and inferior alveolar nerve blocks in pulpal anesthesia for mandibular first molars. *J Endod*. 2008;34: 11-3
202. Evans G, Nusstein J, Drum M, Reader A, Beck M. A prospective, randomized, double-blind comparison of articaine and lidocaine for maxillary infiltrations. *J Endod*. 2008;34: 389-93.
203. Bigby J, Reader A, Nusstein J, Beck M, Weaver J. Articaine for supplemental intraosseus anesthesia in patients with irreversible pulpitis. *J Endod*. 2006;32:1044-7
204. Potocnik I, Tomsic M, Sketelj J, Bajrovic FF. Articaine is more effective than lidocaine or mepivacaine in rat sensory nerve conduction block in vitro. *J Dent Res*. 2006;85: 162-6
205. Kanaa MD, Whitworth JM, Corbett IP, Meechan JG. Articaine and lidocaine mandibular buccal infiltration anesthesia: a prospective randomized double-blind cross-over study. *J Endod*. 2006;32:296-8.
206. Robertson D, Nusstein J, Reader A, Beck M, McCartney M. The anesthetic efficacy of articaine in buccal infiltration of mandibular posterior teeth. *J Am Dent Assoc*. 2007;138: 1104-12
207. Nusstein J, Berlin J, Reader A, Beck M, Weaver JM: Comparison of injection pain , heart rate increase, and postinjection pain of articaine and lidocaine in a primary intraligamentary injection administered with a

- computer-controlled local anesthetic delivery system. *Anesth Prog.* 2004;51: 126-33
208. Malamed SF, Gagnon S, LeBlanc D. Articaine hydrochloride: a study of safety of a new amid local anesthetic. *J Am Dent Assoc.* 2001;132: 177-85
 209. Malamed SF, Gagnon S, Leblanc D. A comparison between articaine HCL and lidocaine HCL in pediatric dental patients. *Pediatr Dent.* 2000;22: 307-11
 210. Malamed SF, Gagnon S, Leblanc D. Efficacy of articaine: a new amide local anesthetic. *J Am Dent Assoc.* 2000;131: 635-42
 211. Oertel R, Rahn R, Kirch W: Clinical pharmacokinetics of articaine. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Dec;33(6):417-25
 212. Oertel R, Ebert U, Rahn R, Kirch W Effect of age on pharmacokinetics of the local anesthetic drug articaine. *Reg Anesth Pain Med.* 1999;24: 524-8
 213. Pittrow D, Schindler C, Maywald U, Tölge D, Kirch W. Cardiovascular parameters during submaximal exercise following submucous administration of articaine: a comparison with lidocaine and placebo in young healthy volunteers. *Clin Drug Investig.* 2003;23: 219-23
 214. Leuschner J, Leblanc D. Studies on the toxicological profile of the local anesthetic articaine. *Arzneimittelforschung.* 1999;49: 126-32
 215. Simon MA, Vree TB, Gielen MJ, Booij LH, Lagerwerf AJ. Similar motor block effects with different disposition kinetics between lidocaine and (+ or -) articaine in patients undergoing axillary plexus block during day case surgery. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1999;37: 598-607
 216. Simon MA, Vree TB, Gielen MJ, Booij LH. Comparison of effects and disposition kinetics of articaine and lidocaine in 20 patients undergoing intravenous regional anesthesia during day case surgery. *Pharm World Sci.* 1998;20: 88-92
 217. Vree TB, Gielen MJ. Clinical pharmacology and the use of articaine for local and regional anesthesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2005;19: 293-308
 218. Moller RA, Covino BG. Cardiac electrophysiologic effects of articaine compared with bupivacaine and lidocaine. *Anesth Analg.* 1993;76: 1266-73
 219. Siebrands CC, Friederich P: Inhibition of HERG channels by the local anaesthetic articaine. *Eur J Anaesthesiol.* 2007;24: 148-53
 220. Takara D, Sánchez GA, Alonso GL. Effect of carticaine on the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -dependent adenosine triphosphatase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362: 497-503.
 221. Takara D, Sánchez GA, Toma AF, Bonazzola P, Alonso GL. Effect of carticaine on the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -adenosine triphosphatase. II. Cations dependence. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005;371: 375-82.
 222. Szentandrassy N, Bányász T, Bíró T, Szabó G, Tóth IB, Magyar J, Lázár J, Varró A, Kovács L, Nánási PP. Apico-basal inhomogeneity in

- distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res.* 2005;65: 851-60
223. Szabó G, Szentandrassy N, Bíró T, Tóth IB, Czifra G, Magyar J, Bányász T, Varró A, Kovács L, Nánási PP. Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Arch.* 2005; 450: 307-16
 224. Horváth B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nánási PP, Bányász T. Contribution of I_{Ks} to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflugers Arch.* 2006; 452: 698-706
 225. 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.* 1981; 391: 85-100
 226. Fischmeister R, DeFelice LJ, Ayer RK, Levi R, DeHaan RL. Channel currents during spontaneous action potentials in embryonic chick heart cells. The action potential patch clamp. *Biophys J.* 1984; 46: 267-71
 227. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985; 260: 3440-50.
 228. Lai FA, Meissner G. Structure of the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum and its regulation by calcium. *Adv Exp Med Biol.* 1990;268:73-77
 229. Sarkozi S, Szegedi C, Lukacs B, Ronjat M, Jona I. Effect of gadolinium on the ryanodine receptor/sarcoplasmic reticulum calcium release channel of skeletal muscle. *FEBS J* 2005; 272: 464–471.
 230. Bányász T, Fülöp L, Magyar J, Szentandrassy N, Varró A, Nánási PP. Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. *Cardiovasc Res.* 2003; 58: 66-75
 231. Bányász T, Magyar J, Szentandrassy N, Horváth B, Birinyi P, Szentmiklósi J, Nánási PP. Action potential clamp fingerprints of K^+ currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiol.* 2007;190:189-98
 232. Daubländer M, Müller R, Lipp MD: The incidence of complications associated with local anesthesia in dentistry. *Anesth. Prog.* 1997;44:132-41.
 233. Gunter JB. Benefit and risks of local anesthetics in infants and children. *Paediatr. Drugs.* 2002;4: 649-72.
 234. Strichartz G, Cohen I. V_{max} as a measure of G_{Na} in nerve and cardiac membranes. *Biophys J.* 1978;23: 153-6
 235. Vaughan Williams EM. Subgroups of class 1 antiarrhythmic drugs. *Eur Heart J.* 1984;5: 96-8
 236. Wasserstrom JA, Salata JJ. Basis for tetrodotoxin and lidocaine effects on action potentials in dog ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1988; 254: H1157-H1166
 237. Shibuya N, Momose Y, Ito Y. Effects of bupivacaine on contraction and membrane potential in isolated canine papillary muscles. *Pharmacology.* 1993;47: 158-66
 238. Shibuya N, Hatakeyama N, Yamazaki M, Masuda A, Satone T, Ito Y, Momose Y. Effects of bupivacaine on Na^+ and Ca^{2+} currents in single canine ventricular cells. *Masui* 1995;44: 193-9

239. Ono K, Kiyosue T, Arita M. Effects of AN-132, a novel antiarrhythmic lidocaine analogue, and of lidocaine on membrane ionic currents of guinea-pig ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1989; 339: 221-9
240. Chahine M, Chen LQ, Barchi RL, Kallen RG, Horn R. Lidocaine block of human heart sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1992; 24: 1231-6
241. Castle NA.: Bupivacaine inhibits the transient outward K⁺ current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 255: 1038-46
242. Odoom JA, Zuurmond WW, Sih IL, Bovill J, Osterlof G, Oosting HV. Plasma bupivacaine concentrations following psoas compartment block. *Anaesthesia.* 1986; 41: 155-8
243. Hersh EV, Giannakopoulos H, Levin LM, Secreto S, Moore PA, Peterson C, Hutcheson M, Bouhajib M, Mosenkis A, Townsend RR. The pharmacokinetics and cardiovascular effects of high-dose articaine with 1:100,000 and 1:200,000 epinephrine. *J Am Dent Assoc.* 2006;137: 1562-71
244. Muller WP, Weiser P, Scholler KL. Pharmacokinetics of articaine in mandibular nerve block. *Reg Anaesth.* 1991;14: 52-5
245. Gonzalez T, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpón E, Tamargo J, Valenzuela C. Effects of levobupivacaine, ropivacaine and bupivacaine on HERG channels: stereoselective bupivacaine block. *Br J Pharmacol.* 2002; 137: 1269–79.
246. Wulf H, Worthmann F, Behnke H, Bohle AS: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ropivacaine 2 mg/ml, 5mg/ml or 7,5 mg/ml after ilioinguinal blockade for inguinal hernia repair in adults. *Anesth Analg* 1999;89(6):1471-1474
247. Costello TV, Cormack IR, Hoy C, Wyss A, Braniff V, Martin K, Murphy M. Plasma ropivacaine levels following scalp block for awake craniotomy. *J Neurosurg Anesth.* 2004;16(2):147.150
248. Niemi TT, Neuwonen PJ, Rosenberg PH: Comparison of ropivacaine 2mg/ml and prilocaine 5 mg/ml for i.v. regional anesthesia in outpatient surgery. *Br J Anaesth* 2006;96(5):640-644
249. Salonen MH, Haasio J, Bachmann M, Xu M, Rosenberg PH. Evaluation of efficacy and plasma concentrations of ropivacaine in continuous axillary brachial plexus block: high dose for surgical anesthesia and low dose for postoperative analgesia. *Reg Anesth Pain Med.* 2000;25: 47-51
250. Burm AG, Stienstra R, Brouwer RP, Emanuelsson BM, van Kleef JW. Epidural infusion of ropivacaine for postoperative analgesia after major orthopedic surgery: pharmacokinetic evaluation. *Anesthesiology.* 2000;93: 395-403
251. Roden DM, Viswanathan PC. Genetics of acquired long QT syndrome. *J Clin Invest.* 2005;115: 2025-32
252. Lengyel C, Iost N, Virág L, Varró A, Lathrop DA, Papp JG. Pharmacological block of the slow component of the outward delayed rectifier current (I_{Ks}) fails to lengthen rabbit ventricular muscle QT_c and action potential duration. *Br J Pharmacol.* 2001;132:101-10

253. Horváth B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nánási PP, Bányász T: Contribution of I_{Ks} to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflügers Arc* 2006;452: 698-706
254. Roden DM. Taking the "idio" out of "idiosyncratic": predicting torsades de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1998;21: 1029-34
255. Varró A, Baláti B, Iost N, Takács J, Virág L, Lathrop DA, Lengyel Cs, Tálosi L, Papp JG. The role of the delayed rectifier component I_{Ks} in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol.* 2000;523: 67-81
256. Jost N, Virág L, Bitay M, Takács J, Lengyel C, Biliczki P, Nagy Z, Bogáts G, Lathrop DA, Papp JG, Varró A. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for I_{Ks} in human ventricular muscle. *Circulation.* 2005;112: 1392-9
257. Biliczki P, Virág L, Iost N, Papp JG, Varró A. Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve. *Br J Pharmacol.* 2002;137: 361-8
258. Albright GA. Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine. *Anesthesiology.* 1979; 51: 285-7
259. Long WB, Rosenblum S, Grady IP. Successful resuscitation of bupivacaine-induced cardiac arrest using cardiopulmonary bypass. *Anaesth Analg.* 1989;69: 403-6
260. Yan AC, Newman RD. Bupivacaine-induced seizures and ventricular fibrillation in a 13-year-old girl undergoing wound debridement. *Pediatr Emerg Care.* 1998;14: 354-5
261. Sprung J, Lesitsky MA, Jagetia A, Tucker C, Saffian M, Gottlieb A. Cardiac arrest caused by coronary spasm in two patients during recovery from epidural anesthesia. *Reg Anesth.* 1996;21: 253-60
262. Mio Y, Fukuda N, Kusakari Y, Amaki Y, Tanifuji Y, Kurihara S. Comparative effects of bupivacaine and ropivacaine on intracellular calcium transients and tension in ferret ventricular muscle. *Anesthesiology.* 2004;101: 888-894
263. Royse CF, Royse AG. The myocardial and vascular effects of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine using pressure volume loops. *Anesth Analg.* 2005;101: 679-87
264. Graf BM, Abraham I, Eberbach N, Kunst G, Stowe DF, Martin E. Differences in cardiotoxicity of bupivacaine and ropivacaine are the result of physicochemical and stereoselective properties. *Anesthesiology.* 2002;96: 1427-34.
265. Hatakeyama N, Yamada M, Shibuya N, Yamazai M, Yamamura S, Sugaya M, Momose Y. Effects of ropivacaine on membrane potential and voltage –dependent calcium channel current in single guinea-pig ventricular myocytes. *J Anesth.* 2002;16: 273-8
266. Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res.* 2000;87: 275-81.
267. Karon BS, Geddis LM, Kutchai H, Thomas DD. Anesthetics alter the physical and functional properties of the Ca-ATPase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biophys J.* 1995;68: 936-45.

268. Tinker A, Williams AJ. Charged local anesthetics block ionic conduction in the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Biophys J.* 1993;65: 852-64.
269. Komai H, Lokuta AJ. Interaction of bupivacaine and tetracaine with the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel of skeletal and cardiac muscle. *Anesthesiology.* 1999;90(3):835-43.

9.2 Az értekezés alapjául szolgáló in extenso publikációk

Szabó A , Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J. Effects of articaine on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. Br J Anaesth. 2007; 99:726-33 [IF=2,948]

Szabó A , Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Magyar J, Nánási PP . Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. Anesthesiology. 2008; 108:693-702 [IF=5,124]

Szentandrassy N, **Szabó A** , Almássy J, Jóna I, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J. Effects of articaine and ropivacaine on calcium handling and contractility in canine ventricular myocardium. Eur J Anaesthesiol. 2010;27:153-61 [IF=1,55]

10. FÜGGELÉK

10.1. Summary. The cellular cardiac electrophysiological effects of articaine and ropivacaine were analyzed in isolated canine cardiomyocytes.

Both drugs caused concentration-dependent changes in the action potential configuration: decrease in their amplitude and the maximum velocity of depolarization, shortening of the action potential, suppression of phase-1 repolarization, and depression of plateau. Characterization of the block of sodium channels by the decrease in maximal rate of depolarization at 1 Hz pacing frequency yielded an EC_{50} of $162 \pm 30 \mu\text{M}$, and $81 \pm 7 \mu\text{M}$, while the frequency-dependent V_{max} blockade was characterized by an offset time constant of $91 \pm 20 \text{ ms}$, and $340 \pm 40 \text{ ms}$ for articaine and ropivacaine respectively.

Under voltage clamp conditions a variety of ion currents were blocked by articaine and ropivacaine: L-type calcium current with an EC_{50} of $471 \pm 75 \mu\text{M}$ and $263 \pm 67 \mu\text{M}$, transient outward current with an EC_{50} of 365 ± 62 and $384 \pm 75 \mu\text{M}$, inward rectifier potassium current with an EC_{50} of $372 \pm 46 \mu\text{M}$ and $372 \pm 35 \mu\text{M}$, rapid delayed rectifier potassium current with an EC_{50} of $278 \pm 79 \mu\text{M}$ and $303 \pm 47 \mu\text{M}$, and slow delayed rectifier potassium current with an EC_{50} of $326 \pm 65 \mu\text{M}$ and $106 \pm 18 \mu\text{M}$ for articaine and ropivacaine respectively.

Articaine and ropivacaine caused a concentration-dependent reduction in amplitude of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients ($EC_{50} = 87,4 \pm 12$ és $99,3 \pm 17 \mu\text{M}$), which was congruent with the suppression of contractility ($EC_{50} = 73,7 \pm 10$ és $72,8 \pm 14 \mu\text{M}$ for articaine and ropivacaine respectively). Neither of drugs influenced directly the Ca^{2+} release and Ca^{2+} reuptake at concentrations lower than $300 \mu\text{M}$. The negative inotropic actions of articaine and ropivacaine are similar in magnitude, and can be mainly attributed to reduction of net transsarcolemmal Ca^{2+} influx.

Articaine and ropivacaine alter the cardiac action potential and the underlying ion currents at concentrations higher than the therapeutic range, caused by accidental venous injection or overdose. Under these circumstances fewer side-effects can be expected in the case of articaine than during ropivacaine overdose. In addition, in the case of ropivacaine an increased proarrhythmic risk may be anticipated even in the postoperative recovery period.

Key words: *articaine, ropivacaine, cardiomyocytes, action potential, ion currents, contractility, calcium transients, overdose*

10.2. Az értekezésben felhasznált közlemények