

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

TIMOL HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SZÍVIZMON ÉS VÁZIZMON

DR. SZENTANDRÁSSY NORBERT



Témavezető:

Dr. Magyar János

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

BEVEZETÉS

A timol és analógjai (karvakrol, eugenol, guaiakol, vanillin és zingeron) a monociklikus monoterpének csoportjába tartozó fenolszármazékok. A vanillin és a guaiakol kivételével lipofil tulajdonságúak, vízben alig vagy egyáltalán nem, alkoholban, kloroformban és éterben jól oldódnak. Megtalálhatóak a természetben is, többségük növényi olajok gyakori összetevője. A timol például nagy mennyiségben található a kakukkfű (41%) és az oregánó illóolajában (54%), az eugenol a szegfűszeg jellegzetes illatát adja, de előfordul a kakukkfűben is. A vanillint a vanília, a zingeront a gyömbér, a karvakrolt pedig nagyobb mennyiségben a kakukkfű, a majoranna, valamint az oregano tartalmazza. A guaiakol az amerikai honos örökzöldek törzsében található meg. A timolt, a karvakrolt és az eugenolt különböző termékek tartósítására használják fel nemcsak az élelmiszeriparban, de a növényvédelemben, sőt még kozmetikai termékekben is. A vegyiparban szérumminták, oldatok stabilizálására és tárolására is alkalmazzák őket. A guaiakolt a klinikumban köptetőként alkalmazzák, az Erigon hatóanyaga. A vanillint széles körben használják az élelmiszeriparban ételízesítésre.

A timolnak, a karvakrolnak és az eugenolnak baktericid, fungicid, és antioxidáns hatása van. Irodalmi adatok szerint a timol és a karvakrol 1 millimólos koncentrációban specifikusan gátolja egyes patogén baktériumok, például a *Bacillus cereus* ATP termelő enzimrendszereit, míg 3 mM-nál nagyobb koncentrációk esetén károsítják a sejtmembránt és az intracelluláris molekulák gyors kiáramlását okozzák. A timolt antibakteriális hatása miatt a mellkasi folyadékgyülemek megszüntetése céljából végzett pleurodesisek során használják a fertőzések megelőzésére. Számos fogászati kezelés során alkalmazzák mind a timolt, mind a karvakrolt, mind pedig az eugenolt. A fogtömések alá helyezve egyrészt fertőtlenítik a területet, másrészt a tömés alól lassan kiáramolva baktericid hatásuk miatt hatékonyan gátolják a szájból a baktériumok szaporodását. Potens antibakteriális hatása miatt a timol 1 %-os oldata több szájvíznek is összetevője. Puhatestűek (*Helix pomatia*) idegsejtjein végzett kísérletekben azt tapasztalták, hogy a timol és a karvakrol mikromólos koncentrációban a koffeinhez hasonlóan kalciumfelszabadulást idéz elő a sejtek intracelluláris raktáraiból, amely hatásukat simaizmok is leírták. Puhatestűek neuronjain az eugenol és a guaiakol mind a pre-, mind a poszt-szinaptikus membránra hatással van. A preszinaptikus membránon gátolják a kalciumcsatornákat, a poszt-szinaptikus membránon pedig csökkentik a neurotranszmitterek (GABA, ACh, glutám) által kiváltott excitatorikus poszt-szinaptikus potenciálok amplitúdóját. A guaiakol és a vanillin puhatestűek neuronján gátolta a kalcium áramot, csökkentette az A áram amplitúdóját és gyorsította annak inaktivációját. A vanillin ugyanezen preparátumon a késői kálium áramokat nem befolyásolta, de spontán akciós potenciálok megjelenéséhez vezetett és az AP időtartamát kismértékben nyújtotta. A zingeron az A áramot az előbb említett preparátumon már a guaiakolnál és

a vanillinnél kisebb koncentrációban gátolta. Az eugenol patkányokban gátolja a jejunum- és a vesehámszövetek Na/K-ATP-áz aktivitását. A Ca^{2+} -érzékenység és a Ca^{2+} -felvétel módosításával relaxálja a nyúl aorta és a tengerimalac ileum simaizomzatát. Beszámoltak továbbá arról is, hogy az eugenol tengerimalac szívmuszkulaturán szintén gátolta a kalcium áramot, rövidítette az akciós potenciált és negatív inotróp hatása volt. A zingeronról ismert, hogy gyökfogó (scavenger) hatása van, de a timolnál gyengébb antioxidáns. Beszámoltak patkány trigeminus ganglion sejteken inward áramot indukáló hatásáról, ahol a félgátló koncentráció értékére 15,5 mM-t kaptak. Ugyanezen preparátumon a többszöri zingeron adagolás hatására kiváltott áram amplitúdója csökkent (tachifilaxis). Továbbá a vanilloid receptor antagonistá kapszazepin (10 μM) képes volt megakadályozni a zingeron fenti hatását. Patkány kamrai szívmuszkulaturán azt találták, hogy 30 μM zingeron 52 %-kal csökkentette a tranziens kifelé irányuló káliumáram amplitúdóját és 35 %-kal a késői egyenirányító kálium áramét. A timol melanoma B16(F10) sejtvonalon végzett kísérletekben gátolta a tumorsejtek növekedését és osztódását. Egy másik megfigyelés szerint a timol és más terpének *in vitro* javítják az emlőtumorsejtek kezelésében alkalmazott, igen erősen lipofil tulajdonságú tamoxifen bőrön keresztüli felszívódását. A timolt antioxidáns hatása miatt felhasználják a folyékony halotán stabilizálására is. Régóta ismert, hogy a halotánnal történő altatással végzett műtétek szövődmenyeként hepatitis alakulhat ki. Ezen úgynevezett halotán hepatitisért egyes szerzők az altatógáz stabilizálására használt timolt teszik felelőssé.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám egyrészt a timolnak, másrészt analógjainak emlős szívműködésére és harántcsíkolt vázizomrostok elektromos tevékenységére kifejtett hatásainak tisztázására irányult különböző eredetű (humán és kutya, illetve patkány) preparátumokon. Vizsgálni kívántuk továbbá a timolnak a szívműködés összehúzóerejére és a szívműködés kalcium homeosztázisára kifejtett hatásait.

Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan befolyásolja a timol a szívműködés akciós potenciáljának morfológiáját?
- A szívműködés mely ionáramaira fejt ki hatást a timol és hogyan befolyásolja az egyes áramok kinetikai paramétereit?
- Van-e különbség a timol L-típusú kalcium áramra kifejtett hatásaiban kutyából származó és egészséges humán szívműködés között?
- Hogyan hat a timol patkány vázizomrostok ionáramaira?
- Van-e különbség a timol szívműködés és vázizomrostok ionáramaira kifejtett hatásai között?
- Hogyan hat a timol a szívműködés összehúzóerejére?
- Hogyan befolyásolja a timol az intracelluláris kalciumkoncentrációt, a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) történő kalciumfelszabadulást és az SR membránjában elhelyezkedő Ca^{2+} -ATP-áz működését?
- A timol vagy a koffein használható jobban az intracelluláris raktárakból történő kalciumfelszabadulás előidézésére?
- Milyen hatásai vannak a timol analógjainak a szívműködés L-típusú kalcium áramára?
- Hasonló-e a karvakrol L-típusú kalcium áramra kifejtett hatása humán és kutya szívműködéseken?
- Van-e összefüggés az egyes analógok szerkezete és a szerek által okozott hatások között?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Sejtizolálás

Elektrofiziológiai méréseink többségéhez enzimatikusan izolált kutya kamrai szívmusculussejteket használtunk, amelyeket szegmentperfúziós eljárással nyertünk. Az állatok elaltatása után eltávolítottuk a szívet, majd átmostuk normál Tyrode oldattal. Kanuláltuk a bal elülső leszálló koronária artériát (LAD) és a preparátumot kalciummentes “Joklik Modification for Suspension Culture” (JMM) oldattal 5 percig perfundáltuk. Ezután 1 mg/ml CLS-2 típusú kollagenáz enzimet, 2 mg/ml borjú szérum albumint és 50 μ M CaCl_2 -t tartalmazó JMM oldattal kb. 30 percig emésztettük a szívet 37 °C-on. Az így nyert izolált bal kamrai sejteket a felhasználásig Minimal Essential Medium tápoldatban 15 °C-on tároltuk. Hasonló eljárást alkalmaztunk a kardioplégias oldatban tárolt humán szívek esetében is.

A harántcsíkolt izomrostokon történő méréseinket patkányból származó, enzimatikusan izolált izomrostokon végeztük. Az állatokat elaltattuk és az eltávolított izmokat 60-90 percen keresztül 37 °C-on I-es típusú kollagenáz enzimmel emésztettük. Az emésztést követően a rostokat legalább 20 percig pihentettük és a mérésekhez csak a membránkárosodást nem szenvedett rostokat használtuk.

2. Akciós potenciál elvezetése izolált szívmusculussejtekről

Kísérleteink során a mérőkád aljára kitapadt szívmusculussejteket 37 °C hőmérsékletű normál Tyrode oldattal perfundáltuk. A sejtek membránpotenciáljának nyomon követésére 3 M-os KCl-dal töltött, 25-30 M Ω ellenállású mikroelektrodát használtunk. A mérőrendszert a környezetből származó elektromágneses és mechanikai rezgésektől Faraday-kalitka és antivibrációs asztal védte. A mérés során a sejteket a mérőelektrodon keresztül 1 s ciklushosszal, szupramaximális amplitúdójú négyzögimpulzusokkal ingereltük. Az akciós potenciálokat erősítés (Axon 2B) és analóg-digitális átalakítás (Digidata 1200 A/D kártya) után a későbbi elemzéshez számítógépen tároltuk. Az AP-okat kísérlet közben oszcilloszkópon követtük nyomon.

3. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

Az ionáramok mérésére használt patch pipetták ellenállását 2-3 M Ω -nak választottuk. Az áramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában, feszültség-clamp körülmények között mértük. A sejteket 37 °C-on, normál Tyrode oldattal perfundáltuk. A pipetták feltöltésére használt ún. belső oldat összetételét a mérni kívánt ionáramtól függően választottuk meg.

Az L-típusú kalciumáram ($I_{\text{Ca-L}}$) mérésekor a kálium áramokat a belső oldatban jelenlevő tetraetilammónium-klorid (TEACl) alkalmazása mellett, a perfundáló oldathoz adott 3 mM 4-aminopiridin (4-AP) hozzáadásával gátoltuk. A sejtek membránpotenciálját -40 mV-on tartottuk, a

kalcium áramot 400 ms hosszú +5 mV-ra történő depolarizációval váltottuk ki. Az I_{Ca-L} amplitúdóját minden esetben az áram csúcserőssége és nem inaktiválódó komponens 200 ms-nál mért értékének különbségeként határoztuk meg.

A kálium áramok mérésekor a kalcium áramot 5 μ M nifedipin perfundáló oldathoz történő adagolásával gátoltuk. A sejtek membránpotenciálját a tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to}) és a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) mérésekor -80 mV-on, míg a késői egyenirányító káliumáram gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponensének mérésekor -40 mV-on tartottuk. Az utóbbi két komponens elkülönítésére eltérő impulzus protokollokat használtunk. Az áramamplitúdót minden esetben a sejtek kapacitására normalizálva adtuk meg.

Minden mérés kezdetén kompenzáltuk a soros ellenállást és a pipetta kapacitását. A kapott áramjeleket Axopatch-200B erősítő segítségével erősítettük, Digidata 1200 A/D kártyával végzett analóg-digitális átalakítás után pCLAMP 6.04 szoftverrel számítógépen rögzítettük, majd elemeztük. Az árammérések során a mintavételezési frekvencia a mérni kívánt ionáramtól függően 0,5-20 kHz között változott. Az analóg jeleket a Nyquist teóriának megfelelően, az adott mintavételezési frekvencia harmadrészével szűrtük.

A vázizomrostokon történő méréseinket az ún. kettős vazelin gap-es technikával feszültség-clamp körülmények között végeztük. Kísérleteinkben a rostokat -100 mV-on tartottuk és a kísérleteket 16-18 °C-on végeztük. A rost középső részét vazelinnel szigeteltük el a szélső részekről, melyeket 0,01 %-os szaponinnal permeabilizáltuk. A mérések során a permeabilizált végeken az ún. belső oldatot, míg a középső részen a külső oldatot alkalmaztuk, melyek összetételét a mérni kívánt ionáramoktól függően választottuk meg.

A kalciumáram (I_{Ca}) mérések során a nátrium áramot tetrodotoxinnal, a kálium áramokat a külső oldatban 4-aminopiridin és TEACl a belső oldatban pedig CsCl hozzáadásával gátoltuk. Az intracelluláris kalciumszint stabilizálására a belső oldatban EGTA-t használtunk. Az áramjelek kiváltására 800 ms hosszú -50 és +60 mV közötti depolarizáló négyszögimpulzusokat használtunk. A lineáris kapacitív komponens 20 mV-os hiperpolarizáló pulzus segítségével határoztuk meg és az áramjeleket erre korrigáltuk.

A káliumáram (I_K) mérésénél a belső oldat a Cs-glutamát helyett 120 mM K-glutamátot tartalmazott és a külső oldatban a TEA helyett 140 mM N-metil-D-glukamint alkalmaztunk, valamint az abban lévő $MgCl_2$ koncentrációját 4 mM-ra emeltük. Az áramok vizsgálatára 100 vagy 200 ms hosszú -80 és +40 mV közötti depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk.

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

4. Kontrakciós erőmérés

Méréseinket kutyaszív jobb kamrájából származó trabekuláris izomnyalábokon végeztük, melyeket az elaltatott kutyák szívéből frissen metszettünk ki. A szervkádba helyezett trabekulákon a kontrakciós erőt kapacitív mechano-elektronikus jelátalakító segítségével, izometriás körülmények között, 37 °C-on mértük. Kísérleteinkben a preparátumokat 5 % CO₂ és 95 % O₂ gázkeverékkel buborékoltatott Krebs oldattal perfundáltuk. A preparátumokat szupramaximális amplitúdójú, 1 ms széles négyszögimpulzusokkal 1 s-os ciklushosszal ingereltük. Az analóg jeleket erősítés és analóg-digitális átalakítás (Digidata 1200 A/D kártya) után a későbbi kiértékelésig számítógéppel rögzítettük.

5. Bal kamrai nyomás- és intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) mérése Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven

A 300-500 g tömegű hím tengerimalacokat elaltattunk, majd mellkasuk megnyitása után a szívet gyorsan eltávolítottuk és a Langendorff perfúziós rendszer kanüljéhez rögzítettük. Perisztaltikus pumpa segítségével a koronáriákat 37 °C-os Krebs oldattal perfundáltuk. A bal kamrai nyomás folyamatos mérésére egy a bal kamra üregébe helyezett Braun 2021-02 típusú artériás nyomásmérőt alkalmaztunk. A szív ingerlése 200/perc-es frekvenciával a bal pitvar üregébe vezetett elektróda segítségével történt.

Az $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek mérése kalciumérzékeny fluoreszcens festék, Fura-2 acetoxi-metilészter segítségével történt. A festéket 340 és 380 nm-es hullámhosszon gerjesztve, az emittált fényt 510 nm-en összegyűjtve Deltascan segítségével regisztráltuk. Az $[Ca^{2+}]_i$ számolásához a háttérre-korrigált fluoreszcencia intenzitások hányadosát (F_{340}/F_{380}) használtuk. Az analóg fluoreszcencia jeleket és nyomásértékeket 1 kHz-es gyakorisággal mintavételeztük. Mindkét esetben 10 egymást követő kontrakció során mért értékek átlagát képeztük, és az így kapott adatokat a későbbi elemzés céljából számítógépen rögzítettük.

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

Kutyaszív kamrájából nehéz SR vezikulákat izoláltunk, majd a szolubilizált RyR-t tisztítottuk. A RyR-t lipidkettősrétegbe építettük be, majd ezt a kettősréteget egy 250 µm átmérőjű nyílásra feszítettük ki. A kettősréteg mindkét oldalán azonos pufferösszetételű, 7,2-es pH-jú oldatot használtunk. A kettősréteg egyik oldalát cisz oldalnak a másikat pedig transznak neveztük el és ezen utóbbit elektromosan földeltük. A feszültség-clamp körülmények között kapott áramjeleket 1 kHz-es frekvencián 8 pólusú Bessel szűrő segítségével szűrtük, majd 3,3 kHz-en Axopatch 200 intracelluláris erősítővel és pClamp 6,02-es szoftverrel analóg-digitális átalakítás után rögzítettük. 250 mM K⁺-ot használva töltéshordozóként a 400 pS-nél magasabb vezetőképességgel rendelkező csatornákat tekintettük RyR-nak. A timolt a cisz oldalról adagoltuk 150 vagy 300 µM-os koncentrációban.

Minden kísérlet végén 2 μ M rianodint adtunk a cisz oldalra a csatornabeépülés irányának megállapítása céljából. A méréseket 23 °C-on végeztük, a szabad Ca^{2+} -koncentráció értékeit mind cisz, mind pedig transz oldalon a Fabiato által 1998-ban közölt számítógépes program és stabilitási állandók segítségével határoztuk meg.

7. Kutya nehéz SR vezikulákból történő kalciumfelszabadulás meghatározása

A nehéz SR vezikulákból történő kalciumfelszabadulás mérésére az extracelluláris térben bekövetkező Ca^{2+} -koncentráció változásokból következtettünk, melyeket 0,25 mM arzenazo III metallokróm festék segítségével, 37 °C-on követtünk nyomon. A méréseket SPEX Fluoromax single foton számláló spektrométerben végeztük. A vezikulákat egymást követő CaCl_2 adagolással, és a kalciumpumpa 100 nM ciklopiazonsavval történő gátlásával töltöttük fel. A vezikulákból történő kalciumfelszabadulás előidézésére timol hozzáadást alkalmaztunk. A vezikulán kívüli Ca^{2+} -koncentrációt a 710 és 790 nm-en történő fényelnyelés különbségéből számoltuk. Az abszorbancia változást 1 Hz-en mintavételeztük, majd analóg-digitális átalakítás után számítógépen rögzítettük. A kezdeti kalciumfelszabadulás mértékét a fényelnyelési görbe meredekségéből határoztuk meg.

8. Az ATP-áz aktivitás mérése

A kutyaszívből előállított nehéz SR vezikulákban található Ca^{2+} -ATP-áz aktivitásának mérésére úgynevezett „kapcsolt enzim-assay” módszert használtunk. A módszer elve hogy a Ca^{2+} -ATP-áz működése során ATP-t hasít. Az ekkor keletkezett ADP piruvát-kináz segítségével foszfoenol-piruváttal reakcióba lépve piruvátot képez, amelyből laktát-denidrogenáz hatására laktát keletkezik, miközben NADH-ból NAD^+ szabadul fel. A NADH fogyására a 340 nm-en bekövetkező abszorbanciaváltozás mérésével következtethetünk. Az így kapott görbe meredekségéből számítható a Ca^{2+} -ATP-áz aktivitása. A mérések során az SR vezikula frakciót a szubsztrátokat és az enzimet tartalmazó 7,5-ös pH-jú oldatban, 5 percre, 37°C-on inkubáljuk. A reakciót 10 mM ATP hozzáadásával indítottuk el és folyamatosan mértük az oldat 340 nm-en bekövetkező abszorbancia változását, amelyből a hidrolízis mértékére következtethetünk. Az adatokat a kalcium hiányában mért alap ATP-áz aktivitásra korrigáltuk és $\mu\text{mol P}_i/\text{mg fehérje/perc}$ egységekben adtuk meg.

9. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A mérések során a kapott adatokat átlagoltuk és kiszámítottuk a standard errorrt (SE). Az átlagértékek különbségeinek megítélésakor ANOVA-t és Student féle páros t-próbát használtunk. A kapott eredményeket 5%-os szint felett tekintettük szignifikánsnak ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK

1. A timol hatása kutya izolált szívműködésének akciós potenciáljára

A timol AP paramétereire kifejtett hatásai koncentrációfüggőnek bizonyultak. 10 μM -os koncentrációban a timol csökkentette az AP korai gyors repolarizációs fázisát. Nagyobb koncentrációban alkalmazva a szert az AP időtartamának csökkenését és a plató fázis depresszióját figyeltük meg. A molekula AP-t rövidítő hatása nagyobb mértékű volt a repolarizáció 50 %-ánál mért értéknél (APD_{50}), mint a 90 %-os repolarizációhoz tartozó AP időtartamnál (APD_{90}). Magasabb timolkoncentrációk jelenlétében megfigyeltük a depolarizáció maximális sebességének (V_{max}) csökkenését is. A sejtek nyugalmi membránpotenciáljában még az általunk alkalmazott legmagasabb koncentrációjú timol hatására sem tapasztaltunk változást.

2. A timol hatása kutya izolált szívműködésének L-típusú kalcium áramára

A molekula koncentrációfüggő módon csökkentette az $I_{\text{Ca-L}}$ amplitúdóját. A timol $I_{\text{Ca-L}}$ -ra kifejtett gátló hatása gyorsan kialakult (30 s alatt), stabilnak mutatkozott és teljes mértékben kimosható volt. A molekula hatására bekövetkezett gátlás az 50 μM ($14,3 \pm 8,65$ %-os gátlás) és annál nagyobb szerkoncentrációk esetében adódott statisztikailag szignifikánsnak. A timol kumulatív dózis-hatás görbéjének Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére 158 ± 7 μM -t kaptunk, míg a Hill koefficiens értéke $2,96 \pm 0,43$ -nak adódott.

A timol nem változtatta meg az $I_{\text{Ca-L}}$ csúcsértékének és steady-state aktivációjának feszültségfüggését, de koncentrációfüggő módon csökkentette a kalcium csatornák vezetőképességét.

A timol jelentősen módosította az $I_{\text{Ca-L}}$ mind feszültség-, mind időfüggő inaktivációs kinetikáját, mely hatásai visszafordíthatónak bizonyultak. A timol 50, 150 és 250 μM -os koncentrációban nem okozott változást a steady-state inaktivációs görbe meredekségében, de azt statisztikailag szignifikáns módon a negatívabb feszültségértékek felé tolta el. Az eltolódás mértéke 50 μM timol jelenlétében $5,1 \pm 1$ mV-nak, 150 μM timol esetében $10,4 \pm 1,2$ mV-nak, 250 μM timol hatására pedig $17,4 \pm 1,6$ mV-nak adódott a $-21,6 \pm 0,7$ mV-os kontroll körülmények között mért értékhez képest.

A +5 mV-on mért áramgörbék időfüggő inaktivációját biexponenciális illesztéssel jellemeztük. A timol koncentrációfüggő módon gyorsította az áram időfüggő inaktivációját. A lassan és a gyorsan inaktíválódó komponens közül az előbbi a timollal szemben érzékenyebbnek bizonyult.

150 μM timol az inaktivációból való visszatérés mind gyors, mind pedig lassú komponensének időállandóját szignifikáns mértékben növelte ($47,2 \pm 2,7$ ms-ról $83 \pm 4,8$ ms-ra a gyors és 292 ± 33 ms-ról 569 ± 41 ms-ra a lassú komponens esetében). A molekula tehát lassította a kalcium csatornák inaktív állapotból történő visszatérését, mely hatása visszafordíthatónak bizonyult.

3. A timol hatása egészséges humán kamrai szívműködősejtek L-típusú kalcium áramára

250 μM timol hatására a humán szívműködősejtek $I_{\text{Ca-L}}$ -ában a kutyából származó sejteken mért $I_{\text{Ca-L}}$ -nál tapasztaltakhoz hasonló mértékű változásokat kaptunk. A timol minden általunk vizsgált feszültségértéken csökkentette az áram csúcserőértékét (például +5 mV-ra depolarizálva a sejtet $-12,1 \pm 1,1$ A/F-os értékről $-3,8 \pm 1,1$ A/F-ra), de nem változtatta meg annak áram-feszültség összefüggését. Emellett a timol humán szívműködősejteken sem volt hatással az $I_{\text{Ca-L}}$ aktivációjának feszültségfüggésére. Humán szívműködősejteken az $I_{\text{Ca-L}}$ steady-state inaktivációjának feszültségfüggését a timol, a kutyában látottakhoz hasonlóan, a negatívabb feszültségértékek felé tolta el és nem változtatta meg annak meredekségét. A félerőfeszültség kontroll körülmények között $-20,3 \pm 0,5$ mV-nak, míg 250 μM timol jelenlétében $-32,7 \pm 0,2$ mV-nak adódott. 250 μM timol az $I_{\text{Ca-L}}$ mind gyorsan, mind pedig lassan inaktiválódó komponensének amplitúdóját és időállandóit is csökkentette, tehát gyorsította humán szívműködősejtek kalcium áramának inaktivációját.

4. A timol hatása kutya izolált szívműködősejtjeinek tranziens kifelé irányuló kálium áramára

A tranziens kifelé irányuló káliumáramot 400 ms hosszú -80 mV-ról kiinduló -10 és +60 mV közötti feszültségtartományba történő depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Minden egyes ingerlő impulzust egy 5 ms hosszú -40 mV-ra történő előimpulzust követően alkalmaztunk, annak érdekében, hogy a gyors, feszültségfüggő Na^+ csatornákat inaktiváljuk. A timol koncentrációfüggő módon csökkentette az I_{to} amplitúdóját. 1 μM timol az áramot $5,2 \pm 2,4$ %-kal, 10 μM timol pedig $17,4 \pm 2,7$ %-kal gátolta. A I_{to} amplitúdójának 100 μM timol hatására bekövetkezett csökkenése 30 s-on belül kialakult és már a kimosás első perce alatt teljes mértékben visszafordíthatónak bizonyult. A kumulatív dózis-hatás görbe Hill egyenlettel történő illesztésével a félgátló koncentráció értéke $60,6 \pm 11,4$ μM -nak, a Hill koefficiens értéke pedig $1,03 \pm 0,11$ -nek adódott. A timol nem változtatta meg sem az I_{to} áram-feszültség összefüggését sem steady-state inaktivációjának feszültségfüggését (a kapott félerőfeszültségek: $-38,4 \pm 3,0$ mV kontroll esetben és $-39,3 \pm 3,6$ mV 100 μM timol jelenlétében). A I_{to} időfüggő inaktivációjának illesztésekor a legjobb illeszkedést két exponenciális komponens összegével történő illesztéssel nyertük. A +50 mV-os depolarizációval kiváltott áram gyorsan inaktiválódó komponensének időállandójának értékére $2,8 \pm 0,6$ ms-ot, a lassan inaktiválódó komponens időállandójára pedig $9,9 \pm 0,2$ ms-ot kaptunk. A gyorsan inaktiválódó komponens időállandójának értékében a timol az általunk használt koncentrációkban nem okozott szignifikáns változást, de a lassan inaktiválódó komponens időállandóját már 10 μM timol is statisztikailag szignifikáns módon csökkentette (100 μM timol jelenlétében $5,7 \pm 0,9$ ms-ot kaptunk).

5. A timol hatása kutya izolált szívműködéseinek késői egyenirányító kálium áramának gyors és lassú komponensére

A késői egyenirányító káliumáram gyors és lassú komponensét különböző impulzus protokollok alkalmazásával különítettük el. -40 mV-os tartópotenciálról a sejteket 150 ms hosszan $+10$ mV-ra depolarizáltuk, majd a membránpotenciál értékét ismét -40 mV-ra állítottuk. Az ekkor kialakuló úgynevezett farokáramot tekintettük I_{Kr} -nek. Az I_{Kr} amplitúdóját a timol koncentrációfüggő módon csökkentette. A kumulatív dózis-hatás görbe Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére $63,4 \pm 6,1$ μ M-t, a Hill koefficiens értékére pedig $1,29 \pm 0,15$ -t kaptunk. 100 μ M timol nem változtatta meg az áram-feszültség összefüggést, bár a -20 mV feletti impulzusokkal kiváltott farokáramok mindegyikének csökkentette az amplitúdóját.

A késői egyenirányító káliumáram lassú komponensének aktiválására 3 s hosszú $+50$ mV-ra történő depolarizáló impulzust használtunk. Ezen impulzus végén mért teljesen aktiválódott áramot tekintettük a I_{Ks} -nek. A timol a I_{Ks} -t is koncentrációfüggő módon és reverzibilisen gátolta. Az I_{Ks} esetében még az 1 mM koncentrációjú timol jelenlétében sem kaptunk teljes mértékű áramgátlást, így a Hill egyenlettel történő illesztéssel kapott 202 ± 11 μ M-os félgátló timolkoncentráció és $0,72 \pm 0,14$ -es Hill koefficiens csak becslési értékek. Hasonlóan a I_{Kr} -nél kapott eredményekhez a $+10$ és $+60$ mV közötti timol hatására bekövetkezett I_{Ks} gátlás nem mutatott feszültségfüggést.

6. A timol hatása kutya izolált szívműködéseinek befelé egyenirányító kálium áramára

A befelé egyenirányító káliumáram steady-state körülmények között mért áram-feszültség összefüggésének vizsgálata során a -80 mV-on tartott sejteken -125 és $+65$ mV közötti 10 mV-os lépésközökkel alkalmazott 400 ms hosszú impulzusokat alkalmaztunk. 100 μ M timol csökkentette az impulzusok végén mért áramot, de nem változtatta meg az áram-feszültség összefüggést. A -125 mV-ra történő hiperpolarizáló impulzus hatására kontroll körülmények között kialakuló $-43,3 \pm 1,6$ A/F-os áramsűrűség 100 μ M timol hatására $-34,9 \pm 1,6$ A/F-ra csökkent. A timol I_{K1} -re kifejtett gátló hatása gyorsan kialakult, a szer alkalmazása során nem változott és teljesen visszafordíthatónak bizonyult.

7. A timol analógjainak hatása kutya izolált szívműködéseinek L-típusú kalcium áramára

A kísérletek során mindenben a timolnál elmondottak szerint jártunk el. Az analógok közül kutya szívműködése kalcium áramát a vanillin és a guaiakol 300 μ M-os koncentrációban alkalmazva gyakorlatilag nem befolyásolta. Ugyanilyen koncentrációban a zingeron mintegy 17 %-kal, az eugenol és a karvakrol pedig közel azonos mértékben, és reverzibilis módon mintegy 71 %-kal gátolta az I_{Ca-L} -t. A kumulatív dózis-hatás görbéket Hill egyenlettel illesztettük, a félgátló koncentrációk értékeire a timolnál kapott értékhez képest az eugenol esetében valamelyest magasabb (187 ± 15 μ M) a karvakrolnál pedig némileg alacsonyabb (98 ± 11 μ M) koncentrációt kaptunk. A görbe meredekségét

jellemző Hill koeficiens értéke mind az eugenol, mind a karvakrol esetében másfél körül volt, szemben a timolnál megfigyelhető 3-as értékhez képest.

Sem az eugenol, sem a karvakrol nem változtatta meg az I_{Ca-L} áram-feszültség összefüggését. A kalcium csatornák vezetőképességének értékét mind az eugenol, mind pedig a karvakrol koncentrációfüggő módon csökkentette, de ha a kapott pontokat az adott görbe +30 mV-nál mért vezetőképesség értékére, mint maximumra normalizáltuk a kapott vezetőképesség-feszültség összefüggések sem az eugenol, sem a karvakrol esetében nem mutattak eltérést a kontroll körülmények között mért görbétől. A karvakrolnak és az eugenolnak az I_{Ca-L} időfüggő inaktivációjára kifejtett hatásait vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy 300 μ M eugenol és karvakrol szignifikáns mértékben csökkentette a gyorsan inaktiválódó komponens időállandóját.

Az általunk vizsgált 100 és 300 μ M-os koncentrációban mind a karvakrol, mind pedig az eugenol szignifikáns módon balra tolta az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését.

A karvakrol 300 μ M-os oldata szignifikánsan és reverzibilis módon lassította a kalcium csatornák inaktivációból történő visszatérését, ezzel szemben az eugenol nem befolyásolta azt.

A kalciumáram kinetikai paramétereire gyakorolt valamennyi hatás tekintetében a karvakrol hatékonyabbnak bizonyult az eugenolnál.

8. A karvakrol hatása egészséges humán kamrai szívműködés L-típusú kalcium áramára

A karvakrol 100 μ M-os koncentrációban mintegy felére csökkentette az I_{Ca-L} -t, de nem változtatta meg az L-típusú kalciumáram feszültségfüggését és steady-state aktivációjának feszültségfüggését sem. 100 μ M karvakrol humán szívműködésen az L-típusú kalciumáram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését reverzibilis módon balra tolta, de a görbe meredekségét nem változtatta meg. A félértékfeszültség értékeire kontroll körülmények között -21,38 $\pm$ 0,65 mV-ot, 100 μ M karvakrol jelenlétében -29,52 $\pm$ 0,44 mV-ot kaptunk. A kutya szívműködésen tapasztaltakhoz hasonlóan 100 μ M karvakrol gyorsította az I_{Ca-L} időfüggő inaktivációját. Humán szívműködés esetében azonban a szer nem változtatta meg a kalcium csatornák inaktivációból történő visszatérését.

9. A timol hatása a szívműködés kontraktúra

A timol koncentrációfüggő módon csökkentette kutyák jobb kamrájából származó trabekulák kontraktúrák erejét, de nem változtatta meg a kontraktúrák görbék kinetikai paramétereit. A pontok Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére 297 $\pm$ 12 μ M-t kaptunk, míg a Hill koeficiens 0,95 $\pm$ 0,04-nek adódott. A félrelaxációs idő és a csúcsfeszülésig eltelt idő értékeiben még 1 mM timol hatására sem tapasztaltunk szignifikáns változást.

10. A timol hatása a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szívre

A timol koncentrációfüggő módon befolyásolta tengerimalac szív kontrakciós paramétereit és kalciumtranzienseit is. 150 μM , vagy annál nagyobb koncentrációban a timol szignifikáns módon csökkentette a szisztolés nyomás értékét, ugyanekkor a diasztolés nyomás értéke már az 50 μM koncentrációjú timol jelenlétében is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll körülmények között mért értéknél. A timolnak a szisztolés és a diasztolés nyomásra kifejtett hatása összegződve jelentkezett a pulzusnyomás értékeiben, amelyet a molekula 350 μM koncentrációban már közel nullára csökkentett. 150 μM vagy annál nagyobb koncentrációban a szisztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkent, a diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nőtt, míg 350 μM timol jelenlétében a kalciumtranziens amplitúdója közel nullára csökkent. Alacsonyabb timolkoncentrációknál (50-100 μM) azonban a mért nyomás- és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékek nem mutattak jó egyezést. Ezen koncentrációknál úgy tűnt, hogy a timolnak kalcium-érzékenyítő hatása van, hiszen a szisztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szint csökkenésével párhuzamosan a szisztolés nyomás értékeiben még nem figyelhettünk meg csökkenést. Ehhez hasonlóan diasztolés nyomás növekedése a diasztolés $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szignifikáns növekedése nélkül jött létre. A timol kontraktilitásra kifejtett hatása hasonló volt tengerimalac és kutyaszív esetében, bár a tengerimalac preparátum érzékenyebbnek bizonyult a szerrel szemben (350 μM timol praktikusán teljesen gátolta a kontrakciós erőt tengerimalac szíven, míg kutyában ezen koncentráció csak közel 50 %-os gátlást okozott).

11. A timol hatása kutya nehéz SR vezikulák kalciumforgalmára

A timol koncentrációfüggő módon gyors kalciumfelszabadulást idézett elő a nehéz SR vezikulákból, mely hatása 100 μM -os vagy annál nagyobb koncentrációknál statisztikailag szignifikáns mértékűnek bizonyult. A dózis-hatás görbe Hill egyenlettel történő illesztésével a kalciumfelszabadulás maximális sebessége ($V_{\max}$) $0,47 \pm 0,04$ nmol/s-nak adódott. A félgátló koncentráció értékére 258 ± 21 μM -t kaptunk, a Hill koefficiens $3,02 \pm 0,54$ -es értéke pedig a kötőhelyek közötti szoros kooperativitásra utal.

A vezikulákba történő kalciumfelvétel sebessége arányos a preparátum Ca^{2+} -ATP-áz aktivitásával, amely kontroll körülmények között $0,79 \pm 0,07$ $\mu\text{mol P}_i/\text{mg}$ fehérje/perc értéknek adódott. A timol koncentrációfüggő módon gátolta a kalciumpumpa aktivitását. A félgátló koncentráció értékére $253 \pm 4,7$ μM -t kaptunk, míg a Hill koefficiens $1,62 \pm 0,05$ -nek adódott.

12. A timol hatása lipidkettősrétegbe beépített kutya RyR-ra

A timol nem változtatta meg a RyR specifikus vezetőképességét. A timol jelenlétében megnőtt a csatorna megnyílásainak száma, valamint hosszú időtartamú nyitott epizódok jelentek meg. Az átlagos nyitvatartási valószínűség értékére $0,013 \pm 0,024$ -et, míg az átlagos nyitvatartási időtartamra

0,305±0,087 ms-ot kaptunk kontroll körülmények között. 150 µM timol 18-szorosára (0,233±0,103), míg 300 µM timol mintegy 21-szeresére (0,272±0,11) növelte a csatorna nyitvatartási valószínűségét. A két koncentráció jelenlétében mért értékek egymáshoz képest nem voltak szignifikánsan különbözőek, tehát a timol jelenlétében bekövetkezett hatás az általunk vizsgált koncentrációknál már a szaturációhoz volt közel. Ha az analízisből kizártuk a timol jelenlétében kialakuló hosszú időtartamú nyitott epizódokat, akkor az új nyitvatartási valószínűség értékek (0,024±0,025 150 µM timol és 0,031±0,028 300 µM timol jelenlétében) és átlagos nyitvatartási időtartamok (0,357±0,08 ms 150 µM timol és 0,385±0,103 ms 300 µM timol jelenlétében) már nem különböztek a kontroll körülmények között mért értékektől. Ebből arra következtettünk, hogy timol jelenlétében a RyR-nak két, jól elkülöníthető kapuzása létezik.

A timol RyR-ra kifejtett előbbiekben ismertetett hatásai nem mutattak feszültségfüggést. A rianodin a timollal aktivált RyR-hoz is képes volt kapcsolódni, mely arra utal, hogy a csatornafehérje rianodin kötőhelye timol jelenlétében is hozzáférhető.

13. A timol hatása patkány harántcsíkolt izomrostok kalcium áramára

A timol koncentrációfüggő módon csökkentette az I_{Ca} csúcsértékét. A molekula hatására bekövetkezett gátlás a 100 µM (az áram 83±7 %-ára csökkent) és annál nagyobb szerkoncentrációk esetében adódott statisztikailag szignifikánsnak. 600 µM timol jelenlétében közel teljes gátlást kaptunk (az áram 9±3 %-ára csökkent). A timol kumulatív dózis-hatás görbéjének Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére 193±26 µM-t kaptunk, míg a Hill koefficiens értéke 2,52±0,29-nak adódott.

A timol I_{Ca} aktivációjára és inaktivációjára kifejtett hatása egyaránt kétfázisúnak bizonyult. Mind az aktiváció, mind pedig az inaktiváció sebességét 100-200 µM koncentrációban szignifikáns mértékben csökkentette. 600 µM timol ezzel szemben az I_{Ca} aktivációját és inaktivációját egyaránt szignifikáns mértékben gyorsította.

A timol előzőekben említett gátló hatásától eltekintve nem változtatta meg az I_{Ca} csúcsértékének feszültségfüggését. 300 µM timol minden vizsgált feszültségen szignifikánsan csökkentette a kalcium csatornák vezetőképességét, de nem változtatta meg a steady-state aktiváció feszültségfüggését. (A maximális vezetőképesség értéke kontroll körülmények között 120±2,7 S/F-nak 300 µM timol jelenlétében pedig 74,3±1,5 S/F-nak adódott.)

14. A timol hatása patkány harántcsíkolt izomrostok kálium áramára

A timol koncentrációfüggő módon csökkentette patkány harántcsíkolt izomrostok kálium áramát. Már 100 µM timol hatására az áram csúcsértékének szignifikáns mértékű csökkenését

figyelhettük meg. A timol kumulatív dózis-hatás görbéjének Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció értékére $93 \pm 11 \mu\text{M}$ -t kaptunk, míg a Hill koefficiens értéke $1,51 \pm 0,18$ -nak adódott.

Az aktivációs időállandót a timol az általunk használt legnagyobb koncentrációban ($300 \mu\text{M}$) sem változtatta meg szignifikáns mértékben. Az áram inaktivációját ezzel szemben már $200 \mu\text{M}$ timol szignifikáns mértékben gyorsította.

Az I_K áram-feszültség összefüggése alapján elmondhatjuk, hogy a timolnak az áram csúcserékére kifejtett gátló hatása nem mutatott feszültségfüggést. A timol kimosása után kapott eredményekből látszik, hogy a molekula hatása $+20 \text{ mV}$ és attól pozitívabb membránpotenciálokön részlegesen reverzibilisnek bizonyult.

MEGBESZÉLÉS

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

A timol koncentrációfüggő módon gátolta a összes általunk vizsgált ionáramot és módosította az akciós potenciál paramétereit. A molekula hatása eltérő mértékű volt a kalcium és az egyes kálium áramok esetében, mely a kapott félgátló koncentrációk és Hilloefficiensek értékeiben is megnyilvánult. A timollal szemben az I_{to} és az I_{Kr} bizonyult a legérzékenyebbnek, az I_{Ks} -t és az I_{Ca-L} -t a molekula nagyobb koncentrációban gátolta. A kálium áramoknál 1-hez közeli Hilloefficiensektől nagymértékben eltért a kalciumáram esetében kapott 3-as érték, ami arra utal, hogy a kalcium áramnál a molekula három, egymással pozitív kooperativitást mutató kötőhelyen gátolja az áramot. Az is elképzelhető azonban, hogy a timol kalcium áramra kifejtett hatásában több mechanizmus van jelen. A timol az I_{to} időfüggő inaktivációját gyorsította, de nem volt hatással az általunk vizsgált kálium áramok egyéb kinetikai paramétereire. Az I_{Ca-L} esetében ezzel szemben, a konvencionális kalcium csatornagátló verapamilhoz hasonlóan, balra tolta az áram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését. Ez azt jelenti, hogy például 250 μ M timol jelenlétében -30 mV-os membránpotenciálnál a kalcium csatornáknak már kb. 85 %-a inaktív állapotban van szemben a kontroll körülmények közötti 5-10 %-kal. A timol a kalciumcsatornák inaktivációból történő visszatérését lassította, ami különösen a magasabb szívfrekvenciák esetében azt eredményezi, hogy a kalcium csatornák egy része folyamatosan inaktív állapotban található. A timol ezentúl gyorsította az I_{Ca-L} időfüggő inaktivációját, amely háttérében esetleg kalciumfüggő inaktiváció is állhat, hiszen méréseinkben a timol kalciumfelszabadulást okozott a belső raktárakból. Ezen mechanizmus azonban nem lehetett felelős az eredményeinkért tekintve, hogy a pipettaoldat 10 mM EGTA-t tartalmazott, mely képes volt pufferelni a sejten belüli kalciumot. Ezzel szemben az akciós potenciál méréseknél már nem zárhatjuk ki a timol hatására kialakuló kalciumfelszabadulás AP paramétereit befolyásoló hatását, mert ezen méréseknél a nagyellenállású mikroelektrodokban EGTA-mentes KCl oldatot használtunk.

A timol hatására a kalciumáram kinetikai paramétereiben bekövetkező változások együttesen azt eredményezik, hogy a szív működés során kevesebb működőképes csatorna áll rendelkezésre. Emiatt az akciós potenciál alatt kevesebb kalciumion tud az extracelluláris térből a szívizomsejtekbe bejutni, ami végeredményben magyarázhatja a timol általunk is tapasztalt negatív inotróp hatását.

A timol AP alakjára kifejtett hatásai jól magyarázhatóak az egyes ionáramok esetében kapott eltérő félgátló timolkoncentrációk értékeivel. A timol alacsony koncentrációban (10 μ M) csökkentette a korai gyors repolarizáció mértékét anélkül, hogy befolyásolta volna az AP többi paraméterét. 100 μ M vagy azt meghaladó koncentrációban a molekula deprimálta az AP plató fázisát és rövidítette az akciós potenciál időtartamát. Az előbbi hatás háttérében az I_{to} timol hatására bekövetkező gátlása

állhat, míg az utóbbira a I_{Ca-L} gátlása adhat magyarázatot. A timol hatására bekövetkező AP rövidülés azt sugallja, hogy a magas szerkoncentrációk esetében a timol I_{Ca-L} -ra kifejtett gátló hatása dominál a repolarizáló kálium áramokra kifejtett hatással szemben, annak ellenére, hogy a félgátló koncentrációk értékei a kálium áramok esetében az I_{Ks} kivételével alacsonyabbak.

2. A timol hatása egészséges humán kamrai szívműködés L-típusú kalcium áramára

A timol I_{Ca-L} -ra kifejtett hatásai minőségileg hasonlóan bizonyultak kutyaszívből származó kamrai sejteken és egészséges humán kamrai szívműködés esetében, bár mennyiségi eltérések ennek ellenére adódtak. A timol mindkét sejt esetében csökkentette az áram csúcsértékét és gyorsította az áram inaktivációját. A molekula egyik preparátum esetében sem változtatta meg az I_{Ca-L} amplitúdójának és a steady-state aktivációjának feszültségfüggését. A timol mind kutya, mind humán szívműködésen balra tolta az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését. Megállapítottuk, hogy a humán szívműködés L-típusú kalcium árama a timolra kevésbé érzékeny, ugyanakkor ezen kismértékű mennyiségi különbségek ellenére a timol kalcium csatornákra kifejtett hatásmechanizmusa nagyon hasonló lehet a kutya, illetve az egészséges humán szívműködés esetében. Ennek alapján kijelenthetjük, hogy a timol kalcium csatornákra kifejtett hatása szempontjából a kutya kamrai szívműködés a humán sejtek jó modelljének tekinthetőek.

3. A timol hatása patkány harántcsíkos izomrostjainak ionáramaira

A szívműködésnél bemutatottakhoz hasonlóan a timol patkány vázizomrostok kalcium és kálium áramát is koncentrációfüggő módon gátolta. A kalcium áramok esetében a Hill együtthatók értékei mindkét preparátumon 3 körüli értéknek adódtak, míg a kálium áramok esetében 1 körüli értékeket kaptunk. Valószínűsíthető tehát, hogy a timol a szívműködés és a vázizom kálium csatornáinak egy kötőhelyéhez kapcsolódik. Ugyanakkor a kalciumcsatorna esetében a molekula több, egymással pozitív kooperativitást mutató kötőhelyen fejtheti ki hatását, illetve a gátlásban egynél több mechanizmus is részt vehet. Ezen hasonlóságok ellenére számos különbség adódott a két preparátum között: A dózis-hatás görbékből meghatározott félgátló koncentrációk értékei a szívműködésen mind a kalcium- (158 és 193 μM), mind pedig a káliumáram (60 és 93 μM) esetében szignifikánsan kisebbnek adódtak. Szívműködésen a molekula minden általunk vizsgált koncentrációban gyorsította a kalciumáram inaktivációját, míg a vázizomrostokon bifázisos hatást kaptunk, miszerint 100-300 μM közötti koncentrációban a timol növelte az inaktivációs időállandó értékét, míg magasabb koncentrációban (600 μM) a szer gyorsította az áram inaktivációját.

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

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

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

A kutyából izolált és lipidkettősrétegbe ültetett RyR-on végzett single channel méréseinkből arra következtettünk, hogy a timol képes a RyR-hoz kötődve megváltoztatni annak kapuzását és ezáltal az SR-ből kalciumot felszabadítani. A molekula ezen hatásáért a hosszú időtartamú nyitott epizódok timol jelenlétében történő megjelenése lehet a felelős, tekintve, hogy ezen epizódok átlagos nyitvatartási ideje három nagyságrenddel volt nagyobb a normál, timol hiányában megfigyelhető megnyílásokénál (kb. 0,3 s a 0,3 ms-hoz képest). Fontos azonban megjegyezni, hogy ha az analízisből kihagytuk a hosszú időtartamú nyitott epizódokat, a timol nem változtatta meg a csatorna átlagos nyitvatartási valószínűségét. A RyR-nak timol jelenlétében kétféle kapuzási módja lehet: egy normál kapuzás (mely a kontroll esetben tapasztaltakhoz képest nem mutat eltéréseket) és egy másik, mely a hosszú időtartamú nyitott epizódok megjelenését hozza létre. Egy további lehetőség a hosszú időtartamú nyitott epizódok megjelenésének magyarázatára a timol gyors kötődése a

csatornafehérjéhez, illetve az onnan történő lassú leválása. Jelen eredményeink azonban nem teszik lehetővé a felsorolt lehetőségek közötti biztonságos elkülönítést.

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

6. A timollal végzett kísérleteink eredményeiből levonható következtetések

A timollal végzett kísérleteink eredményei fontosak lehetnek mind a további alapkutatások, mind pedig az alkalmazott kutatások szempontjából.

A vázizom és a szívizom excitációs-kontrakciós kapcsolatának tanulmányozása során általában a koffeint alkalmazzák az SR-ből történő kalciumfelszabadulás előidézésére. A koffein azonban egyáltalán nem nevezhető ezen hatása szempontjából ideális molekulának, tekintve a rossz oldékonyságát és a hatás lassú kialakulását. A timol várakozásunknak megfelelően képes volt szívizomsejteken is létrehozni az intracelluláris raktárakból történő kalciumfelszabadulást. Ráadásul a koffeinhez képest sokkal hatékonyabbnak bizonyult, hatása a koffeinétől gyorsabban alakult ki és kimoshatónak bizonyult. A timol hatása továbbá jobban reprodukálható volt, amely valószínűleg a gyorsabb hatásából és könnyebb kimoshatóságából adódik. Mindezeket figyelembe véve a timol leválthatja a koffeint mindazon kísérletekben, ahol gyors, reverzibilis és jól reprodukálható módon kell az intracelluláris raktárakból kalciumot felszabadítani. Amennyiben ez bekövetkezik akkor fontos ismerni a molekula egyéb hatásait, amelyek adott esetben befolyásolhatják a kísérletek eredményeit. Ezen egyéb hatások közül említhetjük a szívizomsejtek és vázizomsejtek elektrofiziológiai működéseire kifejtett hatásokat.

A timolnak a szívizom kalcium háztartására és összehúzódására gyakorolt hatásai következtében szívelégtelenség előfordulásával és szívritmuszavarok megjelenésével is számolni lehet azon esetekben, amikor a szer nagy mennyiségben kerül be a szervezetbe. Mivel a timolt széles körben alkalmazzák, túladagolás esetén mérgezést okozhat (a gyerekek által véletlenül lenyelve vagy a felnőtteknél öngyilkossági szándékból akarattal elfogyasztva). Számos szájvíz tartalmaz például 1 %-os koncentrációban timolt, amelyből 200 ml-t elfogyasztva a szervezet teljes folyadékterében kb.

300 μM -os koncentrációt érhet el a szer egyenletes eloszlást feltételezve az extra- és intracelluláris térben. Ez a koncentráció pedig, mint az az eredményeinkből is következik, a szív működés zavarait idézheti elő.

Talán több klinikai vonatkozással bír a timol szervezetbe történő bekerülése a halotánnal történő altatásban végzett műtétek esetén. Igaz ugyan, hogy kezdetben a timol koncentrációja az altatógáz keverékben elég alacsony (0,01 %), de a molekula a vaporizátorban feldúsulhat. Erre leginkább a vaporizátor nem megfelelő használata esetén lehet számítani (nem kellő gyakorisággal történő szellőztetés, a patron ritka cserélése). A halotánról leírták, hogy gátolja a kalcium és a késői kálium áramot tengerimalac kamrai szívműködésén, és 11 mV-tal balra tolja az előbbi áram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését. Patkány kamrai szívműködésén a halotán gátolja az $I_{\text{to-t}}$. Ezekben a kísérletekben a szerzők a timolt is tartalmazó, folyékony halotánt közvetlenül a perfundáló oldathoz adták. A timollal végzett kísérleteink eredményeivel összevetve ezen adatokat felmerül annak a lehetősége, hogy a fent említett kísérletekben kapott változásokért nemcsak maga a halotán, hanem annak a stabilizálására használt timol is felelős lehet. A bevezetőben már említett ún. halotán hepatitis kialakulásáért a halotánt teszik felelőssé, de nem zárható ki, hogy az altatógázzal a szervezetbe kerülő timol is szerepet játszik a betegség kialakulásában. Ennek biztonsággal történő megválaszolásához azonban további, a timolnak és a halotánnak a sejtek működésére külön-külön kifejtett hatásait összehasonlító vizsgálatok szükségesek.

7. A timol analógjainak hatása kutya izolált szívműködésének L-típusú kalcium áramára

Az általunk vizsgált timol analógok közül a guaiakol és a vanillin volt a legkevesbé hatással kutya szívműködésének $I_{\text{Ca-L}}$ -ára. 300 μM -os koncentrációban egyik szer sem gátolta az áramot és még az általunk vizsgált legnagyobb koncentrációban (1 mM) is csak mintegy 10 %-os gátlást hoztak létre. A zingeron már nagyobb mértékben gátolta az áramot, 300 μM -os koncentrációban az áram amplitúdója mintegy 17 %-kal csökkent. Az általunk vizsgált koncentrációtartományban sem a vanillin, sem a guaiakol, sem pedig a zingeron nem volt képes az $I_{\text{Ca-L}}$ -ot teljes mértékben gátolni. A fenti három szer közül egyik sem változtatta meg az $I_{\text{Ca-L}}$ időfüggő inaktivációját. Ezzel szemben az eugenol és a karvakrol az általunk vizsgált koncentrációkban képes volt a kalciumáram teljes gátlását létrehozni. Eltérőek voltak azonban a kumulatív dózis-hatás görbékből meghatározott félgátló szerkoncentrációk és Hill együtthatók értékei. Az $I_{\text{Ca-L}}$ -ra kifejtett gátlás szempontjából a karvakrol bizonyult a leghatásosabbnak a timol és az eugenol előtt. Ennek ismeretében meglepő lehet, hogy az eugenol és a karvakrol másfél körüli Hill együtthatói lényegesen kisebbek a timol 3-hoz közeli Hill együtthatójához képest. A timolhoz hasonlóan sem az eugenol, sem pedig a karvakrol nem volt hatással az $I_{\text{Ca-L}}$ áram-feszültség összefüggésére. Ezzel szemben mindkét szer gyorsította a kalciumáram időfüggő inaktivációját és lassította a csatorna inaktivációból történő visszatérését.

Mindezen hatások alapján elmondhatjuk, hogy a karvakrol és az eugenol hatására a kalciumcsatorna nyitott és inaktív állapota közötti átmenet gyorsul, míg az inaktív és a zárt állapot közötti átmenet lassul. Mindkét szer esetében megfigyeltük azt is, hogy a timolhoz hasonlóan a kalcium csatornák steady-state inaktivációjának feszültségfüggését koncentrációfüggő módon balra tolják el.

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

A karvakrol hasonlóan hatott a kutyaszívből származó kamrai sejtek és az egészséges humán kamrai szívizomsejtek L-típusú kalcium áramára. A molekula egyik preparátum esetében sem változtatta meg az I_{Ca-L} amplitúdójának és a steady-state aktivációjának feszültségfüggését, azonban mindkét esetben csökkentette az áram csúcsértékét és gyorsította az áram inaktivációját. A karvakrol mind kutya, mind humán szívizomsejteken balra tolta az I_{Ca-L} steady-state inaktivációjának feszültségfüggését. A timollal ellentétben a karvakrol esetében a humán szívizomsejtek bizonyultak érzékenyebbnek, mert 100 μ M karvakrol hatására az I_{Ca-L} amplitúdója 49 %-kal csökkent kutya és 51 %-kal humán szívizomsejteken. Humán szívizomsejteken a steady-state inaktiváció félértékfeszültségének eltolódása 100 μ M karvakrol hatására mintegy $8,1 \pm 0,6$ mV-nak adódott a kutya sejtjein tapasztalt $7,2 \pm 0,4$ mV-tal szemben. Az inaktiváció időállandója 100 μ M karvakrol hatására kutya szívizomsejtjein 30 %-kal, míg humán szívizomsejteken csak 24 %-kal csökkent. Ezen kismértékű mennyiségi különbségek ellenére megállapíthatjuk, hogy a karvakrol kalcium csatornákra kifejtett hatásmachizmusa nagyon hasonló lehet a kutya, illetve az egészséges humán szívizomsejtek esetében.

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

A vizsgált molekulák fiziko-kémiai tulajdonságait több tényező befolyásolja.. Egyrészt a molekula oldékonysága, másrészt az elektronok eloszlása a molekulán belül, amelyeket a fenolgyűrűhöz kapcsolódó oldalláncok minősége és mennyisége fog meghatározni. Az általunk vizsgált timol analógok közül mindegyikben a fenolos alapszerkezet volt a közös. Eltérő volt azonban a gyűrűhöz kapcsolódó hidrofób oldallánc hosszúsága, amely a molekula oldékonyságát döntően befolyásolja. A guaiakol és a vanillin esetében az oldallánc rövid, mely ezen molekulák vízdékonyságáért felelős. Ezen két analóg befolyásolta kísérleteinkben a legkevésbé a szívizomsejtek L-típusú kalcium áramát. Ebből arra lehet következtetni, hogy az analógok nem közvetlenül a csatornafehérje extracelluláris részéhez kapcsolódva hozzák létre gátló hatásukat. A zingeron volt a harmadik analóg, mely csak kismértékben volt képes befolyásolni a kalcium áramot. Ez arra enged következtetni, hogy a fenti három molekulának a kalcium áramra kifejtett gyenge hatása a timoltól lényegesen eltérő szerkezetük következménye lehet. A guaiakol esetében a molekula nem tartalmaz hosszabb oldalláncot, a zingeron esetében pedig az oldallánc túlságosan hosszú volta

akadályozhatja a kalcium csatornához való kötődést, annak ellenére, hogy ezen utóbbi molekula a másik kettővel ellentétben lipidoldékony. A vanillin szerkezetében van a timolhoz legközelebb az oldalláncok szénatomszáma, de ezek minősége és helyzete annyira eltérő, hogy nagy valószínűséggel a molekula töltéeloszlása jelentős mértékben eltér a timoltól. Ez az eltérés okozhatja azt, hogy a vanillin sem befolyásolja a kalcium áramot. Elmondhatjuk tehát, hogy a fenolgyűrűhöz kapcsolódó funkciós csoportok minősége, mennyisége és elhelyezkedése nagyon fontos a molekula töltéeloszlásának és ezáltal a hatásosságának kialakítása szempontjából.

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

Mint láttuk, mind az eugenol, mind pedig a karvakrol számos ponton befolyásolja a kalcium csatornák működését, mely hatásuk több támadásponton keresztül valósulhat meg: 1. az extracelluláris felszín felől kötődhetnek a csatornát alkotó fehérjékhez 2. lipidoldékonyságuk révén a membránban oldódva megváltoztathatják a csatornát alkotó fehérjék mikrokörnyezetét, ily módon azok működését 3. a sejtmembránon átjutva közvetlenül kötődhetnek a csatorna intracelluláris felszínéhez, vagy beavatkozhatnak egyes intracelluláris enzimrendszerek és jelátviteli folyamatok működésébe. Irodalmi adatokból ismert, hogy a vizsgált fenolszármazékok átjutnak a neuronok, simaizomsejtek felszíni membránján és az intracelluláris raktárakból kalciumot szabadítanak fel. Az intracelluláris kalciumszint megemelkedése pedig számos enzim működésére lehet hatással. Amennyiben azonban a vizsgált molekulák a membrán lipid fázisa vagy az intracelluláris oldal felől fejtenék ki hatásukat a csatornafehérjékre, ez esetben az eugenol hatásának rövidebb idő alatt kellene jelentkezni, mint a karvakrolénak vagy a timolénak, mert a benzolgyűrűhöz kapcsolódó hosszabb apoláris oldallánc és a metoxi-csoport miatt az eugenol lipidoldékonysága a karvakrolnál és a timolnál nagyobb. Eredményeink szerint a timolnál megfigyelhetőekhez hasonlóan mind a karvakrol, mind az eugenol hatása 20-30 másodperc alatt kifejlődött. Ez arra utalhat, hogy a fenolszármazékok a csatorna extracelluláris részéhez kötődve fejtik ki gátló hatásukat. Ezt támasztják alá azon tengerimalac

szívizomsejteken végzett kísérletek, ahol megállapították, hogy az eugenol kalcium áramra kifejtett gátló hatása nem korrelál a szer oktanol-víz partíciós koefficiensével. Erre utal az is, hogy ha a fenolszármazékok valóban a lipid fázis felől fejtenék ki hatásukat, akkor kis koncentrációban, de hosszabb ideig alkalmazva őket ugyanolyan mértékű gátlást kellett volna tapasztalni, mint nagyobb szerkoncentrációk rövid ideig történő alkalmazása esetén.

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

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a természetben széles körben előforduló timolnak és analógjainak emlős szívműködés és vázizmok elektrofiziológiai paramétereire kifejtett hatásait. Ezen túlmenően azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a timol a szívműködés összehúzóerőjét és a szívműködés kalcium homeosztázisát.

Eredményeinket összefoglalva a következő megállapításokat tehetjük:

- 1., A timol koncentrációfüggő módon rövidítette kutya bal kamrai szívműködés akciós potenciálját, deprimálta a plató fázist és csökkentette a korai gyors repolarizációt. Ezen hatásaival összhangban gátolta a tranziens kifelé irányuló és a befelé egyenirányító kálium áramot, valamint a késői egyenirányító káliumáram gyors és lassú komponensét és az L-típusú kalciumáramot.
 - 2., A timol gyorsította az L-típusú kalciumáram inaktivációját, de nem volt hatással annak áramfeszültség összefüggésére és a steady-state aktiváció feszültségfüggésére sem. A molekula lassította a kalcium csatornák inaktivációból történő visszatérését és balra tolta a steady-state inaktiváció feszültségfüggését. Ugyanezen változásokat mutattuk ki egészséges humán szívműködésen is.
 - 3., A timol a szívműködéshez hasonlóan patkány harántcsíktal izomrostjain is koncentrációfüggő módon gátolta a kalcium és a kálium áramokat. A timol kis koncentrációban lassította, nagyobb koncentrációban pedig gyorsította a kalciumáram aktivációját és inaktivációját is. A dózis-hatás görbékből meghatározott Hill-koefficiensek értéke mindkét izomtípusban a kalcium csatornák gátlásának összetett mechanizmusára vagy a fehérjén több kötőhely jelenlétére utal.
 - 4., A timol koncentrációfüggő módon csökkentette a kontrakciós erőt kutya trabekuláris izmok és Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven. Az utóbbi preparátumon a szisztolés nyomás csökkenése mellett a diasztolés nyomás növekedését tapasztaltuk, mely eredményekkel összhangban változott az intracelluláris kalciumkoncentráció is. A timol amellett, hogy gátolta az SR kalcium-pumpát, a RyR aktiválásán keresztül koncentrációfüggő módon kalciumfelszabadulást hozott létre kutya nehéz SR vezikulákból.
 - 5., Az általunk vizsgált timol analógok közül a zingeron csak magas koncentrációban, a vanillin és a guaiakol pedig egyáltalán nem befolyásolta kutya szívműködés L-típusú kalcium áramát. A karvakrol és az eugenol a timolhoz hasonló hatást fejtett ki az I_{Ca-L} amplitúdójára és kinetikai paramétereire.
- A karvakrol hatása megegyezett az egészséges humán szívműködésen és a kutya kamrai miocitákon, mely alapján kijelenthetjük, hogy mind a timol, mind pedig a karvakrol kalcium áramra kifejtett hatásainak vizsgálatánál a kutya szívműködésjei a humán sejtek jó modelljének tekinthetők.

A téziseket megalapozó in extenso közlemények:

1. Magyar J, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp L, Varró A, Nánási PP: Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 2002; 136:330-338. **IF=3.45**
2. Szentandrassy N, Szentesi P, Magyar J, Nánási PP, Csernoch L: Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. *BMC Pharmacology* 2003;3:9.
3. Szentandrassy N, Szigeti Gy, Szegedi Cs, Sárközi S, Magyar J, Bányász T, Csernoch L, Kovács L, Nánási PP, Jóna I: Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. *Life Sci.* 2003; Közlésre elfogadva. **IF=1.824**
4. Magyar J, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp L, Varró A, Nánási PP: Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2003; Elbírálás alatt.

További in extenso közlemények:

5. Magyar J, Bányász T, Fülöp L, Szentandrassy N, Körtvély Á, Kovács A, Szénási G, Nánási PP: Effects of the antiarrhythmic agent EGIS-7229 on calcium and potassium currents in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001; 363:604-611. **IF=2.472**
6. Magyar J, Bányász T, Bagi Zs, Pacher P, Szentandrassy N, Fülöp L, Kecskeméti V, Nánási PP: Electrophysiological effects of risperidone in mammalian cardiac cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002; 366:350-356. **IF=2.566**
7. 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. **IF=4.692**
8. Fülöp L, Fiák E, Szentandrassy N, Magyar J, Nánási PP, Bányász T: Role of transmembrane chloride current in afterdepolarizations in canine ventricular cardiomyocytes. *Gen Physiol Biophys* 2003; Közlésre elfogadva. **IF=0.719**
9. Fülöp L, Szigeti Gy, Magyar J, Szentandrassy N, Ivanics T, Miklós Zs, Ligeti L, Kovács A, Szénási G, Csernoch L, Nánási PP, Bányász T: Differences in electrophysiological and contractile properties of mammalian cardiac tissues in bicarbonate- and HEPES-buffered solutions. *Acta Physiol Scand* 2003; Közlésre elfogadva. **IF=1.95**

Fenti közlemények összesített impakt faktora: 17.673