

# EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

---

## A SEA0400 hatása az emlős kamrai szívizom kalcium homeosztázisára

Birinyi Péter



**Témavezetők:**

**Dr. Nánási Péter és Dr. Magyar János**

**Programvezető:**

**Dr. Márton Ildikó**

**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
ÉLETTANI INTÉZET  
DEBRECEN, 2008.**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>I. Bevezetés</b> .....	4
I/1. A szívizomsejtek kalcium homeosztázisa.....	4
I/2. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus szerepe a kalcium homeosztázisban.....	5
I/3. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus szerepe az aritmogenezisben .....	5
I/4. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus gátlók farmakológiája .....	6
I/5. A SEA0400 ismert hatásai .....	7
<b>II. Célkitűzések</b> .....	9
<b>III. Anyagok és módszerek</b> .....	10
III/1. Elektrofiziológiai vizsgálatok.....	10
III/1.1. Szívizomsejtek izolálása kutya bal kamrájából .....	10
III/1.2. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus mérése feszültség-clamp technikával.....	10
III/1.3. Az L-típusú $\text{Ca}^{2+}$ -áram mérése feszültség-clamp technikával.....	12
III/1.4. Ionárammérések akciós potenciál clamp technikával .....	12
III/1.5. Ionárammérések mesterséges lipidkettősrétegbe ágyazott kutyaszívából izolált ryanodin receptoron .....	13
III/2. A $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis és a kontraktilitás vizsgálata .....	14
III/2.1. Bal kamrai nyomásváltozások és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek regisztrálása Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven.....	14
III/2.2. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásainak követése és a sejtrövidülés mérése kutyából izolált kamrai szívizomsejteken .....	15
III/2.3. Kalciumfelszabadulás és -felvétel meghatározása kutya kamrai szívizomból izolált HSR vezikulákon.....	15
III/2.4. Kontraktilis funkciók vizsgálata izolált szívizomsejteken .....	16
III/3. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis .....	17
III/4. A vizsgált molekula oldása .....	18

<b>IV. Eredmények</b> .....	19
IV/1. A SEA0400 hatása a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szívre.....	19
IV/2. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó szívimomsejtek $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensére és sejtrövidülésére.....	23
IV/3. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó SR vezikulák kalciumfelszabadulására.....	23
IV/4. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó SR vezikulák kalciumfelvételére.....	26
IV/5. A SEA0400 hatása lipidkettősrétegbe beépített, kutya bal kamrájából származó szívimomsejtek RyR2 csatornáira.....	26
IV/6. A SEA0400 hatása a kutya bal kamrájából származó szívimomsejtek kontraktilis fehérjéinek $Ca^{2+}$ -érzékenységre.....	29
IV/7. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó szívimomsejtek NCX-áramára.....	29
IV/8. A SEA0400 és a KB-R7943 hatása kutya bal kamrájából származó szívimomsejtek L-típusú kalciumáramára.....	33
IV/9. A SEA0400 és a KB-R7943 hatása kutya bal kamrájából származó szívimomsejtek nettó membránáramára.....	39
<b>V. Megbeszélés</b> .....	41
V/1. A SEA0400 szelektíven gátolja a $Na^+/Ca^{2+}$ cseremechanizmust?.....	41
V/2. A SEA0400 hatásmechanizmusa.....	42
V/3 A SEA0400 alkalmazásának terápiás lehetőségei.....	44
<b>VI. Összefoglalás</b> .....	45
<b>VII. Köszönetnyilvánítás</b> .....	47
<b>VIII. Irodalomjegyzék</b> .....	48
<b>IX. A téziseket megalapozó in extenso közlemények</b> .....	54

# I. BEVEZETÉS

## I/1. A szívizomsejtek kalcium homeosztázisa

A szív ritmikus működését a sinuscsomóban kialakuló és onnan az ingerületvezető rendszeren, majd a munkaizomzaton tovaterjedő akciós potenciálok hozzák létre. A sejt membránpotenciál-változásának következtében az intracelluláris kalciumkoncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) átmenetileg megemelkedik (ezt  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensnek nevezzük), amely aktiválja a kontraktilis rendszert. A  $[Ca^{2+}]_i$  megnövekedésében, tehát a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek kialakulásában, három mechanizmus vesz részt. A  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés kisebbik részéért az extracelluláris térből a sejtmembrán L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornáin ( $I_{Ca,L}$ ) keresztül belépő  $Ca^{2+}$  felelős. A  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés nagyobbik része a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) szabadul fel az SR membránjában található  $Ca^{2+}$ -csatornákon, a ryanodin-receptorokon (RyR2) keresztül (Jorgensen és mtsai., 1988; Sipido és Wier, 1991). Az intracelluláris térbe kerülő kalcium ionok harmadik forrása a  $Na^+/Ca^{2+}$  cseremechanizmus (NCX) lehet, amely az akciós potenciál kezdeti fázisában  $Ca^{2+}$ -ot juttat a sejt belsejébe és  $Na^+$ -t pumpál ki a sejtől. Ilyenkor a membránpotenciál pozitív és az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint még viszonylag alacsony. A sejten belül szabaddá váló  $Ca^{2+}$  egy része speciális  $Ca^{2+}$ -kötő fehérjékhez kapcsolódik, melyek konformációváltozása közvetít a sejten belüli  $Ca^{2+}$ -szintben beálló változás és az élettani funkció között (Fabiato, 1983; Bers, 2000). Az összehúzódást a vékony filamentumon elhelyezkedő troponin komplex szabályozza, amely a  $Ca^{2+}$  megkötése után lehetővé teszi a vékony és a vastag filamentumok közötti kötés kialakulását, ezáltal a szívizomsejt megrövidülését (Bers, 2001). Az energiaigényes folyamat akkor zárul le, amikor a  $Ca^{2+}$ -szint az összehúzódás előtti nyugalmi értékre tér vissza (De Clerck, 1991). A  $Ca^{2+}$ -tranziens relaxációja három kompetitíven működő mechanizmus eredménye (Bers, 2001). A sejt plazma szabad  $Ca^{2+}$ -ának legalább kétharmadát az SR veszi vissza az SR  $Ca^{2+}$ -ATPáz (SERCA) segítségével. Az NCX fajtól függően a sejt plazma szabad  $Ca^{2+}$ -tartalmának 7-30%-át távolítja el a sejtől és csak egy igen kis  $Ca^{2+}$  mennyiség távozik a lassú  $Ca^{2+}$ -transzport rendszereken: a szarkolemmális  $Ca^{2+}$ -ATPáz és a mitokondriális  $Ca^{2+}$ -transzporton keresztül.

## I/2. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus szerepe a kalcium homeosztázisban

A sejt élettani működéséhez nélkülözhetetlen a  $\text{Ca}^{2+}$ -egyensúly. Fontos, hogy szélsőséges körülmények között is, a be- és kiáramló  $\text{Ca}^{2+}$  mennyisége hosszú távon azonos legyen, elkerülve ezzel a  $\text{Ca}^{2+}$ -vesztést vagy a  $\text{Ca}^{2+}$ -túltöltődést. Az NCX ezen  $\text{Ca}^{2+}$  egyensúlyi folyamat kialakításában játszik lényeges szerepet.

Az NCX valamennyi emlős sejtípus felszíni membránjában megtalálható. A szívizomban már 40 éve azonosították (Reuter és Seitz, 1968.). Az NCX elektrogén voltát először Mullins vetette fel felismerve, hogy a cseremechanizmus  $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$  ionarányban működik. A cseremechanizmus mindkét irányba funkcionál: lehetséges  $3\text{Na}^+$  transzportja intracelluláris irányba és  $1\text{Ca}^{2+}$  transzportja extracelluláris irányba vagy fordítva (Janvier és mtsai, 1996; Fozzard, 1992). Az NCX aktuális működésének irányát az elektrokémiai hajtóerő határozza meg, amely a mindenkori membránpotenciál és az NCX egyensúlyi potenciáljának különbségéből számítható (Janvier és mtsai, 1996, Noma és mtsai, 1991). A hajtóerő nagysága és ezért a transzport intenzitása tehát a megfelelő ionkoncentrációktól (az extracelluláris és intracelluláris tér  $\text{Na}^+$ - és  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjától), valamint a membránpotenciál nagyságától függ. Fentiek értelmében az NCX működhet úgy, hogy befelé irányuló (inward) áramot generálva  $\text{Ca}^{2+}$ -ot távolít el a sejtől ("forward mode operation"), vagy fordítva, amikor kifelé irányuló (outward) áramot indukálva  $\text{Ca}^{2+}$ -ot juttat a sejtbe ("reverse mode operation"). Az NCX tehát - részben a sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmának szabályozása révén, másrészt a működése során keletkező ionáram miatt - jelentős szerepet játszhat az aritmogenezisben, ezért szelektív gátlása az aritmia terápiájában kulcsfontosságú lehet.

## I/3. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus szerepe az aritmogenezisben

A miokardiális iszkémiát kísérő két legfontosabb biokémiai változás az anaerob működés következtében kialakuló acidózis és a csökkent ATP termelés miatt létrejövő ATP-depléció. Az ATP depléció további következménye a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa csökkent működése, amely az intracelluláris  $\text{Na}^+$ -felhalmozódásához vezet, amit súlyosbít a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cseremechanizmuson keresztül megvalósuló további  $\text{Na}^+$ -belépés. A megnövekedett intracelluláris  $\text{Na}^+$ -koncentráció az NCX-en keresztül csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -eliminációhoz illetve fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -belépéshez vezet. Az iszkémiát túlélő szívizomsejtekben a megemelkedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció a korai reperfüzió alatt halmozott aritmiákat okozhat. A  $\text{Ca}^{2+}$ -túltöltődés kialakulása és ezáltal az aritmiák létrejötte az NCX szelektív gátlásával megakadályozható (Imahashi és mtsai., 1999;

Murphy és mtsai., 1999; Miura és mtsai., 1997; Imanishi és mtsai., 1998). Az NCX-gátlásával mérsékelhető mind a korai mind, a késői típusú utódepolarizációk kialakulása. A "forward mode" gátlás következtében kisebb lesz ugyanis az a befelé irányuló áram, amely az utódepolarizációs epizódokat kiváltja, míg a "reverse mode" gátlás csökkenti a sejtbe belépő  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségét.

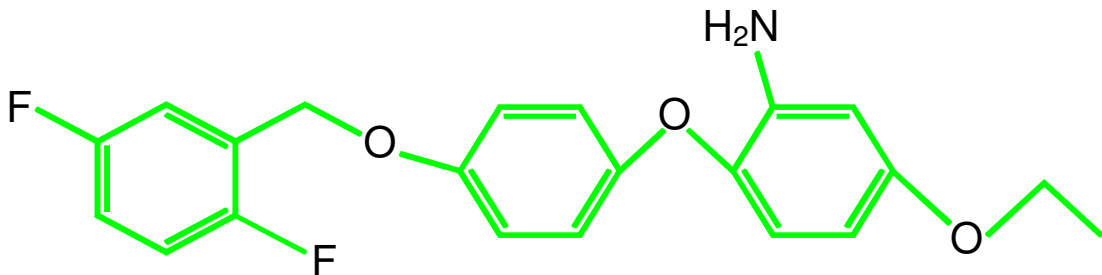
A digitális származékok, mint pozitív inotrop hatású szerek, főleg a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáz gátlása útján hatnak. Az intracelluláris térben a megnövekedett  $\text{Na}^+$  hatására az NCX a  $\text{Na}^+$ -ot kifelé, míg a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot a szívizomsejtbe szállítja. A sejtplazmában a megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció erősebb kontrakciót fog kiváltani. Digitális-intoxikáció során a szívizomsejtek túltöltődnek  $\text{Ca}^{2+}$ -mal és aritmiák alakulnak ki. "Reverse mode" NCX-gátlással a digitális-aritmia megszüntethető (Shigeki és mtsai., 2002.), hiszen ily módon megelőzhető a szívizomsejt  $\text{Ca}^{2+}$ -mal való túltöltődése és a következményes utódepolarizációk kialakulása.

#### 1/4. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus gátlók farmakológiája

Ha egy transzport rendszer működését kívánjuk vizsgálni, akkor fontos, hogy legyen egy szelektív gátlószerünk. Ez a feltétel az NCX esetében jelenleg csak kompromisszumokkal teljesül. Bár számos NCX-gátlószerrel rendelkezünk, ezen vegyületek nagyrésze csak korlátozott szelektivitást mutat, tehát az NCX mellett más transzport rendszereket és ionáramokat is gátolnak. Például az amilorid-analógok az NCX-gátlása mellett gátolja a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cseremechanizmust is (Brown és mtsai., 1991). Néhány kétszeresen, illetve háromszorosan pozitív kation is gátolja az NCX-et. Ezek közül a leggyakrabban a nikkell ionokat használják NCX-gátlásra, mivel gátló hatásuk reverzibilis (Hinde és mtsai., 1999). Ezek a polivalens kationok azonban más kation csatornákat is gátolnak, így nem tekinthetők szelektív gátlószereknek.

Az elmúlt években új fejlesztésű, hatásos NCX-gátlók kerültek bemutatásra. Ezen molekulákat az NCX  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban betöltött szerepének a tanulmányozására használták intakt sejtekben fiziológiai körülmények mellett (Watanabe és mtsai., 2006; Bouwman és mtsai., 2006; Iwamoto, 2004). Ilyen vegyület az SN-6 (2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester), amely kedvezően csökkenti az intracelluláris  $\text{Na}^+$ -függő  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Na}^+$ -beáramlást. A molekula alacsonyabb dózisban ( $\text{EC}_{50}=0,63 \mu\text{M}$ ) hatásosan véd a hipoxia/reoxigenizáció indukálta sejtkárosodás ellen. A szert hipoxiás/iszkémiás állapotokban javasolják (Takahiro és mtsai., 2004.).

Bár a fenoxi-benzil származék, KB-R7943-at (2-[2-[4-(94-nitrobenzyloxy)-phenyl]ethyl]-isothiourea) is az NCX szelektív gátlása céljából fejlesztették ki, a farmakológiai vizsgálatok hamar bebizonyították, hogy már alacsony koncentrációban gátolja a  $\text{Na}^+$ -áramot, az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot és a különböző  $\text{K}^+$ -áramokat (Tanaka és mtsai., 2002; Matsuda és mtsai., 2004). Az eddig legszelektívebbnek tartott és ezért a leggyakrabban alkalmazott NCX-gátló molekula az anilin származékok közé tartozó SEA0400 (2-[4-[(2,5-difluorophenyl)-methoxy]phenoxy]-5-ethoxy-aniline), amelynek képlete az 1. ábrán látható.



1. ábra

**A SEA0400 szerkezeti képlete**

2-[4-[(2,5-difluorophenyl)-methoxy]phenoxy]-5-ethoxy-aniline

1/5. A SEA0400 ismert hatásai

A SEA0400 az NCX-et az intracelluláris  $\text{Na}^+$  és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjának arányában gátolta (Lee és mtsai., 2004; Bouchard és mtsai., 2004). A kísérleti körülmények és az alkalmazott szerkoncentrációk függvényében csökkentette tengerimalac szívizomsejteken a befelé, valamint kifelé irányuló NCX-áramokat. A SEA0400 NCX-gátló hatása tízszer erősebb volt a korábban említett KB-R7943 hatásához képest. Megvizsgálták a SEA0400 kötődését különböző receptorokon, ioncsatornákon, transzportereken és úgy találták, hogy a vegyület erősen szelektív. A SEA0400-nak nem volt szignifikáns hatása  $1 \mu\text{M}$  koncentrációban sem a gyors  $\text{Na}^+$ -áramra, sem a vizsgált  $\text{K}^+$ -áramokra, tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken (Tanaka és mtsai., 2002.; Matsuda és mtsai., 2001).

A SEA0400 szignifikánsan csökkentette a szívinfarktus mértékét iszkémia/reperfúzió után patkányon (Takahashi és mtsai., 2003; Motegi és mtsai., 2007; Seki és mtsai., 2002; Tani, 1990), nyúlön (Magee és mtsai., 2003), valamint nagytestű állatmodelleken pl.: kutyán (Takahashi és mtsai., 2004) és sertésen (Inserte és mtsai.,

2002). A SEA0400 az NCX blokkolásán keresztül jelentősen csökkentette a digitális-túlادagolás által kiváltott aritmiák gyakoriságát és a korai, valamint késői utódepolarizációk kialakulását kutyán (Nagasawa és mtsai., 2005). Izolált nyúl szíven (Langendorff preparátum) a SEA0400 koncentráció-függő módon csökkentette az infarktus nagyságát és 1 $\mu$ M koncentrációban javította a posztisztkémiai funkció visszatérését.

A SEA0400 NCX-re vonatkozó szelektivitását *in vivo* és *in vitro* körülmények között egyaránt jónak találták. Mivel a vegyület minden vizsgált iszkémia/reperfúziós modellben csökkentette az infarktusos terület nagyságát és javította a miokardiális funkciót, a SEA0400 NCX-gátló hatását a klinikumban is ígéretesnek prognosztizálják (William és mtsai, 2003).

Tanulmányozták a SEA0400 idegrendszerre gyakorolt hatását is. A molekula lipidoldékony kémiai csoportjai miatt könnyen átjut a vér-agy gáton, a sejtmembránon és ott a másodrendű kémiai kötéseknek köszönhetően felhalmozódik. Neuron kultúrákon, astrocytákon és a microglia sejteken a SEA0400 nagy affinitással ( $EC_{50} = 5-30$  nM) gátolta az NCX-áramot (Matsuda és mtsai, 2001.). A SEA0400 mérsékelte az infarktus volumenét a középső cerebrális artéria elzárása esetén patkány agykéregben és corpus striatumban, valamint astrocyta kultúrákon csökkentette a  $Ca^{2+}$  által előidézett sejtkárosodást (Matsuda és mtsai, 2001).

Az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a SEA0400 egy igen hatásos és valószínűleg nagy szelektivitással rendelkező, klinikailag ígéretes NCX-gátlószer. Ezért tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk a SEA0400 hatásait a szívizomsejtek  $Ca^{2+}$ -háztartására, az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -tranziensek paramétereire és a kontraktilis válaszra olyan preparátumokon (kutya, tengerimalac), amelyek akciós potenciálja az emberével összevethető hosszúságú plató fázissal rendelkezik. Ezt azért tartottuk fontosnak, mert a kistestű rágcsálók (patkány, egér) és a nagytestű emlősök szív működése mind elektrofiziológiai szempontból, mind a  $Ca^{2+}$ -háztartás szempontjából nagyon jelentős különbségeket mutat (Bers, 2001.; Blaustein és Lederer, 1999.). Kísérleteinkhez ezért elsősorban kutyaszívet használtunk, mert elektrofiziológiai sajátosságai (akciós potenciál és transzmembrán ionáramok) alapján ez hasonlít legjobban a humán szívhez (Szentandrassy és mtsai, 2005; Szabó és mtsai, 2005).

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja a SEA0400 kódjelű NCX-gátló membránáramokra és a szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartására kifejtett hatásainak részletes analízise volt, kutyából és tengerimalacból származó kardiális preparátumokon. Ezen belül a következő konkrét kérdések tisztázását tűztük ki célul:

1. Hogyan befolyásolja a SEA0400 a kutya kamrai szívizomsejtek intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensének amplitúdóját, a diasztolés és szisztolés  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációkat, valamint a sejtrövidülést?
2. Milyen hatása van a SEA0400-nak a kutya szívből izolált SR vezikulákból történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulásra és a vezikulák  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételére?
3. Módosítja-e a SEA0400 a lipidkettősrétegbe beépített izolált RyR2 csatornák kapuzását?
4. Befolyásolja-e a SEA0400 a kontraktilis fehérjék  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét?
5. A SEA0400 NCX-gátló hatásán túlmenően módosítja-e a  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartás másik fontos tényezőjét, az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornán keresztül belépő  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségét?
6. Milyen további ionáramokat gátolhat a SEA0400 kutya kamrai szívizomsejteken, vagyis mennyire tekinthető a SEA0400 NCX-gátló hatása szelektívnek?
7. Összevethető-e a SEA0400  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartásra és kontraktilitásra irányuló hatása kutyából izolált kamrai szívizomsejteken és dobogó tengerimalac szíven?

Fenti kérdések megválaszolása lehetővé teszi annak megítélését, hogy tekinthető-e a SEA0400 (1) klinikailag ígéretes szernek, valamint (2) az NCX szelektív gátlószerének.

### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### III/1. Elektrofiziológiai vizsgálatok

##### *III/1.1. Szívizomsejtek izolálása kutya bal kamrájából*

A sejteket kutatási célra tenyésztett vegyes nemű ivarérett kutyák szívéből nyertük anterográd irányú szegmentperfúziós technika alkalmazásával (Magyar és mtsai, 2000). A 10–15 kg súlyú állatokat 10 mg/tskg ketamin (Calypsol) és 1 mg/tskg xylazin-hidroklorid (2% CP-xylazine) intramuszkuláris injektálásával altattuk el. A mellkas megnyitása után a szívet gyorsan kiemeltük, majd hideg Tyrode-oldattal mostuk át és leválasztottuk a pitvarokat. A bal elülső leszálló artéria koronáriaágba kanült vezetünk és az artéria vérellátási területének megfelelően perfundáltuk a bal kamrai szívizmot. A perfúzió első 5 percében  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes, taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l) és  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -tal (200 mg/l) kiegészített, karbogénnel egyensúlyozott, szobahőmérsékletű JMM oldatot (Joklik féle módosított Minimum Essential Medium Eagle, SIGMA) alkalmaztunk a szövet  $\text{Ca}^{2+}$  és vértartalmának eltávolítása céljából.

Az emésztést 25-30 percig végeztük ugyanezen alapoldattal, amelyhez még kollagenáz enzimet (0,66 mg/ml, Worthington OK-1), borjú szérum albumint (2 g/l) és  $\text{CaCl}_2$ -ot (50  $\mu\text{M}$ ) adtunk. Az izoláció folyamán az oldatokat végig karbogénnel egyensúlyoztuk és a hőmérsékletet 37 °C-on tartottuk. A szövet elfolyósodása után a sejteket fokozatosan emelkedő  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú JMM oldatban szűrtük és mostuk. Az így nyert sejteket MEM oldatban (Minimal Essential Medium, SIGMA) tároltuk 15 °C hőmérsékleten. Az izolálás során kapott szuszpenzióban a szabályos téglalap alakú, ép harántcsíkolatú, éles szélű és tiszta citoplazmával rendelkező sejtek aránya 10% és 60% között változott. A sejteket az izolálást követően 36 órán belül felhasználtuk.

##### *III/1.2. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus mérése feszültség-clamp technikával*

Az NCX-áramot kutya kamrai szívizomsejteken patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában, feszültség-clamp körülmények között, 37 °C hőmérsékleten mértük (Hamill és mtsai, 1981).

A mérőkád aljához kitapadt szívizomsejtek egyikét először a mikropipettával óvatosan megérintettük, majd a pipetta belsejében addig csökkentettük a nyomást, amíg a sejt membránjának egy kis darabja betüremkedett a pipettába. Ennek

eredményeként jött létre a nagy ellenállású kapcsolat (gigaseal, 1-4 G $\Omega$ ) a pipetta és a sejt felszíni membránja között. Ezután a sejtet jobbra-balra és előre-hátra mozgatva fokozatosan felemeltük a mérőkád fenekéről, majd kompenzáltuk a pipetta kapacitását. A teljes-sejtes konfiguráció eléréséhez a szívóerőt tovább növeltük és ezzel egyidejűleg rövid áramimpulzus alkalmazásával átszakítottuk a pipetta alatti membránt, így hozva létre a kapcsolatot a pipetta belső oldata és az intracelluláris tér között. Minden mérés kezdetén egyedileg meghatároztuk a sejt kapacitását és a kapott eredményeket a későbbiekben erre normalizáltuk. A méréseink során a soros ellenállás általában 4 M $\Omega$  volt, melyet 75%-ban kompenzáltunk. Azokat a méréseket, ahol a soros ellenállás nagyobb volt, vagy a mérés során megnövekedett, kihagytuk az értékelésből. A kapott áramjeleket a PClamp 6.04 szoftverrel vezérelt Axoclamp-2B típusú erősítő (Axon Instruments) segítségével vezettük el, majd Digidata 1200 A/D kártyával végzett analóg-digitális átalakítást követően a számítógép merevlemezén rögzítettük későbbi elemzés céljából.

Az NCX-áram mérésekor egy speciális K<sup>+</sup>-mentes extracelluláris oldatot használtunk, amelynek az összetétele mM-ban kifejezve a következő volt: 135 NaCl, 10 CsCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0,2 BaCl<sub>2</sub>, 0,33 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 TEACl, 10 HEPES, 10 glükóz (pH=7,4). Az oldathoz 20  $\mu$ M ouabaint, 1  $\mu$ M nisoldipint és 50  $\mu$ M lidocaint adva a Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- és a Na/K pumpa által generált áramokat gátoltuk. A méréseinkhez a következő összetételű pipetta-oldatot használtuk (mM-ban kifejezve): 140 CsOH, 75 aszpartát, 20 TEACl, 5 Mg-ATP, 10 HEPES, 20 NaCl, 20 EGTA, 10 CaCl<sub>2</sub> (pH=7,2). Ebben az intracelluláris oldatban a Ca<sup>2+</sup>-koncentráció 140 nM volt. A mérések egy részében a pipetta-oldatban lévő Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt 55 és 1000 nM értékek között változtattuk CaCl<sub>2</sub> és EGTA ismert koncentrációinak hozzáadásával, amelyeket a Fabiato-féle algoritmussal számítottunk. Az NCX-áram méréséhez használt fűrészfog szerű rámpa-protokollt, amelynek meredeksége 100 mV/s volt, 20 másodpercenként ismételtük. Ilyenkor a membránt -40 mV tartófeszültségről először +60 mV-ra depolarizáltuk, majd -100 mV-ra hiperpolarizáltuk és végül a tartófeszültségre állítottuk vissza a membránpotenciált. Az outward és az inward NCX-áramokat rendre +40 és -80 mV feszültségeken olvastuk le (10/A ábra). A kontroll áramgörbék rögzítése után alkalmaztuk a SEA0400-t, végül a teljes NCX-áramot 10mM NiCl<sub>2</sub> hozzáadásával gátoltuk. Ily módon az NCX-áramot NiCl<sub>2</sub>-szenzitív áramként definiálva megállapítottuk, hogy az áram mekkora hányadát gátolta a SEA0400.

### *III/1.3. Az L-típusú $Ca^{2+}$ -áram ( $I_{Ca,L}$ ) mérése feszültség-clamp technikával*

Az  $I_{Ca,L}$  áramot kutya kamrai szívműsejteken patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában, feszültség-clamp körülmények között, 37°C-on mértük Tyrode-oldatban. A Tyrode-oldat összetétele a következő volt (mM-ban megadva): 153 NaCl, 5,4 KCl, 2,7  $CaCl_2$ , 1,05  $MgCl_2$ , 5,4 HEPES, 11 glükóz, pH=7,4. A pipetta-oldat összetétele a következő volt (mM-ban kifejezve): 110 KCl, 40 KOH, 10 EGTA, 10 HEPES, 20 TEACl, 3 K-ATP, 0,25 GTP, pH=7,4. A kálium áramokat a pipettaoldathoz adott 20 mM tetraetilammónium és a perfundáló oldathoz adott 3 mM 4-aminopyridin segítségével gátoltuk. A tartófeszültség értékét -40 mV-ra állítottuk be, amely membránpotenciálon a gyors  $Na^+$ -csatornák inaktíválódtak, így nem zavarták az  $I_{Ca,L}$  mérést. Azokban a kísérletekben, amelyekben koncentráció-függő módon vizsgáltuk a SEA0400 hatását a kalciumáram amplitúdójára, az áramokat 400 ms hosszú +5 mV feszültségre történő depolarizációval váltottuk ki. A többi kísérletben alkalmazott speciális impulzusprotokollok az eredmények során kerülnek bemutatásra. Az  $I_{Ca,L}$  mérése során a mintavételezés az első 20 ms során 20  $\mu$ s-onként, ezt követően 200  $\mu$ s-onként történt.

### *III/1.4. Ionárammérések akciós potenciál clamp technikával*

Az akciós potenciál clamp technika a feszültség-clamp technika egy olyan speciális változata, amely lehetővé teszi valamely ionáram profiljának láthatóvá tételét az akciós potenciál alatt. A módszer lényege, hogy parancsjelként a sejtnak a saját akciós potenciálját alkalmazzuk, nem a hagyományos feszültség-clamp eljárásnál megszokott négyszögimpulzust vagy feszültségrámpát. További lényeges eltérés a két eljárás között, hogy a hagyományos feszültség-clamp technika használatakor az extracelluláris és az intracelluláris terek ionösszetételét, továbbá az impulzusprotokollokat úgy állítjuk be, hogy a mérés során lehetőleg csak az általunk vizsgálni kívánt áram haladjon keresztül a membránon - tehát a zavaró többi áramot farmakológiai módszerekkel gátoljuk. Ezzel szemben az akciós potenciál clamp technika alkalmazása során a fiziológias állapotokat a lehető legjobban megközelítő feltételeket biztosítjuk. A sikeres mérés feltétele, hogy a membránon áthaladó valamennyi nem vizsgált áram a kísérlet teljes időtartama alatt változatlanul maradjon, az intakt sejthez hasonlóan.

Az akciós potenciál clamp technika alkalmazásakor először rögzítenünk kell a

sejt saját akciós potenciálját áram-clamp körülmények között. Ha ezt a feszültségmintázatot parancsjelként játszuk vissza feszültség-clamp üzemmódban, az akciós potenciál alatt mérhető áramjelünk folyamatosan nulla lesz, hiszen az egészséges sejt számára semmilyen külső áramra nincs ahhoz szükség, hogy saját akciós potenciálját fenntartsa. Bármely áramot láthatóvá tehetünk, mert annak specifikus gátlószerét alkalmazva megjelenik a gátolt áram akciós potenciál alatti teljes profilja ellentétes előjellel. Ebben az esetben ugyanis az akciós potenciál normális lefutásához szükséges áramok egyikét - amelyiket mi magunk blokkoltunk - intracelluláris erősítőnk fogja biztosítani. Az egyes ionáramok "ujjlenyomatainak" ismeretében megállapítható, hogy a vizsgált molekula milyen ionáramokat gátol (vagy esetleg aktivál).

Az akciós potenciál clamp mérésekhez a hagyományos feszültség-clamp technikánál alkalmazott mérőrendszert használtuk. A pipetta belső oldatának összetétele mM-ban kifejezve az alábbi volt: K-aszpartát 160; KCl 4; HEPES 10; EGTA 2,6; MgCl<sub>2</sub> 1. Az oldat pH-ja 7,24 volt. Külső oldatként a Tyrode-oldatot használtuk.

### *III/1.5. Ionárammérések mesterséges lipidkettősrétegbe ágyazott, kutyaszívből izolált ryanodin receptoron*

A kutyaszív kamrájából nehéz SR (HSR) vezikulákat izoláltunk, majd a szolubilizált RyR2 molekulákat tisztítottuk (Laver és mtsai, 1995). Foszfatidil-etanolamin, foszfatidil-serin és L-foszfatidil-kolin 5:4:1 arányú keverékéből sík lipidkettősréteget hoztunk létre, majd ezt n-dekánban oldottuk a végső lipidkoncentráció (20 g/l) eléréséig (Herrmann-Frank és mtsai, 1996; Csernoch és mtsai, 1999). Ebbe a lipidkettősrétegbe építettünk be egy-egy CHAPS puffer segítségével szolubilizált RyR2 molekulát. A kettősréteg mindkét oldalán azonos pufferösszetételű oldatot használtunk (összetétel: 250 mM KCl, 150  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M EGTA, és 20 mM PIPES, pH=7,2). A kettősréteg egyik oldalát cisz oldalnak (citoplazmatikus), a másikat pedig transznak (az SR lumene felé néző) neveztük el, ez utóbbit elektromosan földeltük. A RyR2 sikeres beépülésére utalt a két kompartment között folyó áram lépcsőhöz hasonló minta szerinti ingadozása. A feszültség-clamp körülmények között kapott áramjeleket 8 pólusú Bessel szűrő segítségével szűrtük 1 kHz frekvencián, majd Axopatch 200 intracelluláris erősítővel és pClamp 6,03-es szoftverrel analóg-digitális átalakítás után rögzítettük azokat. Töltéshordozóként 250 mM K<sup>+</sup>-ot használva, a 400 pS értéket meghaladó vezetőképességgel rendelkező csatornákat tekintettük RyR2-nek. A nyitvatartási

valószínűség értékeit 10-90 s hosszú reprezentatív görbeszakaszokból számítottuk. A SEA0400-at a cisz oldalról adagoltuk 3  $\mu\text{M}$  koncentrációban. Az oldatcserék után legalább 5 percet vártunk a mérések megkezdése előtt, mely időtartam elegendőnek bizonyult a csatorna kapuzásában kialakuló új egyensúlyi állapot létrejöttéhez (Szegedi és mtsai, 1999). Minden kísérlet kezdetén, a cisz oldalon a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt 50  $\mu\text{M}$ -ról 472 nM-ra csökkentettük abból a célból, hogy megállapítsuk a csatornabeépülés tényleges irányát. Ellentétes beépülés esetében a mért adatokat nem használtuk fel. A méréseket 23 °C-on végeztük, a szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció értékeit mind a cisz, mind a transz oldalon a Fabiato által 1998-ban közölt számítógépes program és stabilitási állandók segítségével határoztuk meg.

### III/2. A $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis és a kontraktilitás vizsgálata

#### *III/2.1. Bal kamrai nyomásváltozások és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek regisztrálása Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven*

A mérésekhez 300-500 g tömegű hím tengerimalacokat használtunk. Az állatoknak intravénásan Heparint adtunk, majd 150 mg/kg dózisú Na-pentobarbitállal elaltattuk azokat. Az állatok mellkasának megnyitása után a szívet gyorsan eltávolítottuk és a Langendorff perfúziós rendszer kanüljéhez rögzítettük, majd Krebs oldattal perfundáltuk. Perisztaltikus pumpa segítségével a koronária átáramlást 10 ml/perc/g értéken tartottuk. A bal kamrai nyomás folyamatos mérésére egy, a bal kamra üregébe helyezett Braun 2021-02 típusú artériás nyomásmérőt alkalmaztunk (Edes és Kranias, 1990). A szív ingerlése 200/perc frekvenciával a bal pitvar üregébe vezetett elektróda segítségével történt. A kontrollmérések után 25-25 percen keresztül 0,3  $\mu\text{M}$  és 1  $\mu\text{M}$  koncentrációjú SEA0400-t alkalmaztunk.

Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek megjelenítésére a fluoreszcens  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -indikátor festéket, a Fura-2-t használtuk. A festéket a sejtmembránon átjutni képes acetoxi-metilészter formájában (5 mM Fura-2-AM, Molecular Probes) juttattuk be a kamrai szívizomba 0,6 mM probenecid, 1,25 g/l Synperonik és 50 g/l albumin kíséretében. Az utóbbi összetevők a Fura-2-AM feltöltés hatékonyságát és tartósságát növelték. Ilyen körülmények között 120 percen keresztül stabil  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jeleket tudtunk regisztrálni. A festéket 340 és 380 nm hullámhosszokon gerjesztve, az emittált fényt 510 nm hullámhosszon összegyűjtve monitoroztuk a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  változásait Deltascan típusú (Photon Technology International) fluoriméter segítségével. Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  számolásához a háttérre korrigált fluoreszcencia intenzitások hányadosát ( $R = F_{340}/F_{380}$ ) használtuk (Grynkiewicz

és mtsai, 1985.). Az analóg fluoreszcencia jeleket 0,2 kHz, a nyomásértékeket 1 kHz gyakorisággal mintavételeztük és az így kapott adatokat a későbbi elemzés céljából számítógépen rögzítettük. Mindkét esetben 10 egymást követő szív ciklus során mért értékek átlagát képeztük.

### *III/2.2. A $[Ca^{2+}]_i$ változásainak követése és a sejtrövidülés mérése kutyából izolált kamrai szívizomsejteken*

A korábban leírt módon, szegmentperfúziós technika alkalmazásával nyert szívizomsejteket 2  $\mu$ M Fura-2-AM jelenlétében 30 percig inkubáltuk, majd Tyrode-oldatban 37 °C-on tartottuk. A sejteket elektronikus stimulátorral (DS-R1, Főnixcomp), extracellulárisan elhelyezett platina elektródapár segítségével 1 Hz frekvencián ingereltük. A méréseket invertált fluoreszcens mikroszkópon (IX71, Olympus) végeztük. A sejteket xenon ívlámpa segítségével 360 és 380 nm hullámhosszúságú fényel gerjesztettük. Az alkalmazandó hullámhosszokat galvanometrikus monokromátor (Optoscan) segítségével választottuk ki. Az emittált fényt egy szűrőn keresztül egy fotoelektron-sokszorozóval detektáltuk. Az így kapott optikai jeleket az Acquisition Engine Program (Cairn) alkalmazásával rögzítettük és analizáltuk. A  $[Ca^{2+}]_i$  változásait a 360 és a 380 nm hullámhosszak által gerjesztett fluoreszcencia intenzitáshányadosával jellemeztük ( $F_{360}/F_{380}$ ). Az így kapott értékeket minden esetben a nonspecifikus háttérre és a kioltásra korrigáltuk. A sejtrövidülés méréséhez videódetektor-rendszert (VED-105, Crescent Electronics) használtunk és a rövidülés mértékét minden esetben a diasztolés sejthossz százalékában adtuk meg.

### *III/2.3. Kalciumfelszabadulás és -felvétel meghatározása kutya kamrai szívizomból izolált HSR vezikulákon*

A HSR vezikulákat kutya balkamrai miokardiumból izoláltuk. A vezikulákból történő  $Ca^{2+}$ -felszabadulás és a vezikulákba irányuló  $Ca^{2+}$ -felvétel nagyságára az extravezikuláris térben bekövetkező  $Ca^{2+}$ -koncentráció-változásokból következtettünk, melyeket 0,25 mM antipyrilazo III (ICN Biomedicals) metallokróm festék segítségével, 37 °C-on követtünk nyomon. A méréseket 1x1 cm alapú küvettákban, Fluoromax spektrométerben (Jobin-Yvon, Spex Industries) végeztük. A vezikulán kívüli  $Ca^{2+}$ -koncentrációt a másodpercenként mintavételezett 710 és 790 nm hullámhosszokon történő fényelnyelés különbségéből számoltuk (Pallade, 1987.), majd analóg-digitális átalakítás után a későbbi kiértékelésig számítógépen rögzítettük. A

vezikulákat a következő összetételű oldatban szuszpendáltuk: 92,5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 180 μM antipyrilazo III, 54 μM CaCl<sub>2</sub>, és 18,5 mM K-MOPS. A végleges fehérjekoncentráció 260 μg/ml volt. A küvettában a vezikulák kalciummal való töltését megfelelő mennyiségű CaCl<sub>2</sub> hozzáadásával, a Ca<sup>2+</sup>-felvétel elindítását 1 mM ATP hozzáadásával végeztük. Az ATP-ADP átalakulás befejezése után az extravezikuláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt Ca<sup>2+</sup> hozzáadásával 20 μM értékre állítottuk be abból a célból, hogy a RyR2 csatornák aktivált állapotba kerüljenek. A Ca<sup>2+</sup>-kiáramlás stabilizálódását követően alkalmaztuk a SEA0400-t. Közvetlenül a SEA0400 hozzáadása előtt és után meghatároztuk a kalciumfelszabadulás mértékét, amelyet a görbe meredekségéből számoltunk (6/A. ábra). A következő kísérletben a SEA0400 hatását vizsgáltuk a nyugalomban lévő (zárt) RyR2 csatornákra. A vezikulák töltése után az extravezikuláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt 2 μM értékre állítottuk be - ilyenkor a csatorna aktivációja viszonylag csekély mértékű - majd SEA0400 kezelést végeztünk. A Ca<sup>2+</sup>-kiáramlás mértékét a fényintenzitás változásából számoltuk. A kísérlet végén 2 μM koncentrációjú A23187 Ca<sup>2+</sup>-ionofor segítségével a vezikulák teljes Ca<sup>2+</sup>-tartalmát felszabadítottuk (6/B. ábra).

Megvizsgáltuk a SEA0400 hatását a könnyű SR vezikulák (LSR) Ca<sup>2+</sup>-felvételére is. A mérések során a korábban leírtakhoz hasonló protokollt használtunk, viszont ebben az esetben először 15 percig inkubáltuk a vezikulákat a SEA0400 különböző koncentrációival (0,3, 1, és 3 μM). A Ca<sup>2+</sup>-felvételt ATP és Ca<sup>2+</sup> hozzáadásával indítottuk el. A Ca<sup>2+</sup>-felvétel mértékét, minden esetben a Ca<sup>2+</sup> hozzáadása után határoztuk meg, amelyet a fényintenzitás-változás meredekségéből számoltunk egy, az átlagot jól reprezentáló 30 és 150 s közötti időtartam analízise során (7. ábra).

#### *III/2.4. Kontraktilis funkciók vizsgálata izolált szívizomsejteken*

A lefagyasztott szövetmintákból különálló sejteket mechanikai izoláció segítségével állítottunk elő. Ezt megelőzően a szövetdarabokat relaxáló oldatban olvasztottuk fel (összetétele mM-ban: 1 MgCl<sub>2</sub>, 145 KCl, 2 EGTA, 4 ATP, 10 imidazol, pH=7,0), majd az izolált sejteket mérés előtt 5 percig 0,5%-os triton-X-100 (Sigma) kezelésnek tettük ki, amit a relaxáló oldathoz adtunk. Ezzel a sejtmembránt aspecifikusan permeábilissá téve „kémiaailag nyúzott” szívizomsejteket állítottunk elő, amely lehetővé tette a miofibrilláris funkciók kontrollált körülmények között történő vizsgálatát. A mechanikai mérőrendszerben elhelyezett szívizomsejt egyik végét érzékeny erőmérőhöz, másik végét egy piezoelektromos motorhoz rögzítettük.

A szívizomsejtek kontraktilitását izometriás körülmények között 15°C-on

rögzítettük. A sejtek aktiválása előtt a szarkomerek átlagos hosszát a mikroszkóphoz kapcsolt számítógépes videojel-feldolgozó rendszer segítségével 1,9  $\mu\text{m}$ -es, majd 2,3  $\mu\text{m}$ -es értékekre állítottuk be. A mérésekhez szükséges relaxáló és aktiváló oldatok összetételét a számítógépes program (Fabiato és Fabiato, 1979) szerint határoztuk meg. Az alap relaxáló és aktiváló oldatok  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációja rendre  $\text{pCa}=10$  és  $\text{pCa}=4,75$  volt. A két oldat arányának változtatásával tetszőleges  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú oldatot állíthattunk elő. A szívizomsejt relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő átvitelét a kontraktilis erő fokozódása követte. A maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált erő kifejlődése után egy úgynevezett „release-restretch” manővert végeztünk, melynek során a sejtet eredeti hosszának 20%-ával megrövidítettük, majd ezt követően visszaállítottuk a kiindulási hosszát. Ezt a rendszer – előzetesen beállított protokollja szerint – az elektromágneses motorhoz rögzített rovartű mozgatásával érte el. Az igen nagysebességű (20 ms alatt kivitelezett) hosszváltoztatás során a kialakult aktin-miozin keresztkötések döntő többsége felszakadt, majd azok újból felépültek. Ezt az eseményt a regisztrátumon a kontraktilis erő megszűnése, majd annak gyors regenerációja kísérte. Az erő regenerációjának üteme elsősorban az aktin-miozin ciklus sebességétől függ, melyet az erőgörbék „release-restretch” manővert követő részének illesztésével lehetett becsülni. Az izometriás csúcserőt (mely az aktív és passzív komponensek összege) a gyors rövidüléssel párhuzamos hirtelen erőcsökkenésből határoztuk meg. A relaxáló oldatban lényegesen hosszabb ideig tartó hosszváltoztatás révén a sejtben ébredt passzív erőkomponenst az aktivációs ciklust követően mértük.

Az összehúzódnás amplitúdóját több különböző  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú aktiváló oldatban meghatározva, lehetőség nyílt a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenység görbéjének megszerkesztésére. A félmaximális erőt eredményező  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció, az úgynevezett  $\text{pCa}_{50}$  érték, a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységet önmagában jellemző számadat.

### III/3. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A mérések során kapott adatokat átlagoltuk és kiszámítottuk a standard errort (SE). Az átlagértékek különbségeinek megítélésakor ANOVA-t és Student-féle t-próbát használtunk. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p értéke kisebb volt mint 0,05. Valamennyi statisztikai analízist IBM kompatibilis személyi számítógépen, Microsoft Excel szoftver segítségével végeztünk. Az ábrákon a mért értékek átlagát és a hozzájuk tartozó standard errort (SE) tüntettük fel. Az ábrákon a szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük.

#### III/4. A vizsgált molekula oldása

A SEA0400-ból dimetil-szulfoxidban (DMSO, SIGMA) 3 mM koncentrációjú törzsoldatot készítettünk és a vizsgálni kívánt koncentrációkat a törzsoldatokból a kísérletek kezdetén Tyrode-oldattal hígítottuk. Az alkalmazott legmagasabb DMSO koncentráció 0,1% volt. Annak érdekében, hogy kizárjuk a DMSO hatására bekövetkező változásokat, próbaméréseket végeztünk a kizárólag DMSO-t tartalmazó oldatokkal. Ezek eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a DMSO önmagában nem okozott szignifikáns változásokat az általunk vizsgált preparátumokon. A későbbiekben bemutatott eredményekért tehát nem lehet a SEA0400 oldására használt DMSO-t felelőssé tenni.

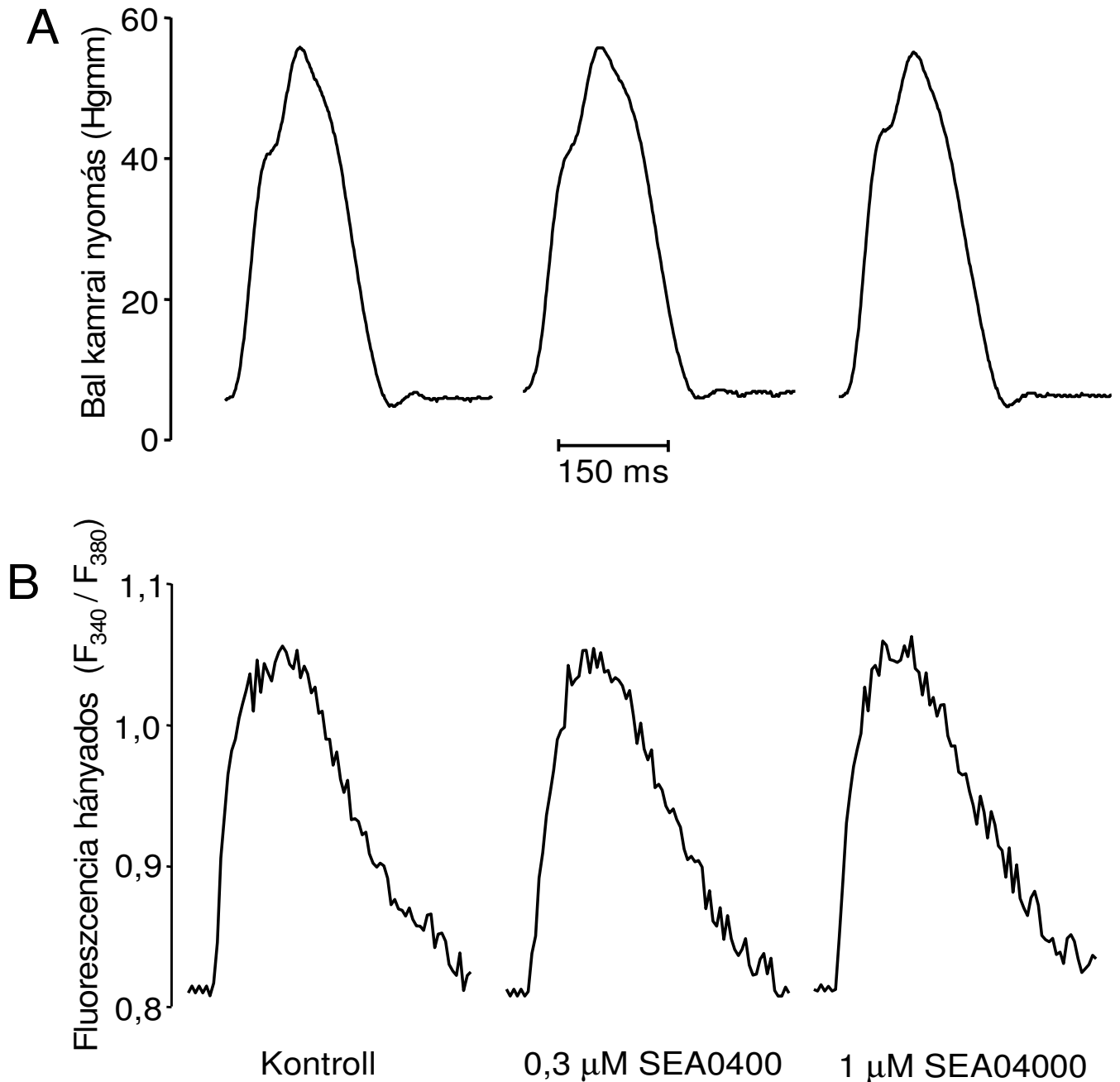
## IV. EREDMÉNYEK

### IV/1. A SEA0400 hatása a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szívre

A SEA0400 hatását 0,3 és 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban vizsgáltuk 25-25 percen keresztül 6 Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven. Ahogyan az analóg görbék is mutatják (2/A. ábra), a SEA0400-nak nem volt hatása a bal kamrai nyomásra. Nem találtunk szignifikáns változást a szisztolés nyomásban, (kontroll körülmények között  $55,5 \pm 2,7$  Hgmm, míg 0,3 és 1  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében rendre  $58,6 \pm 3,5$  és  $53,0 \pm 3,9$  Hgmm), a végdiasztolés nyomásban (a kontroll esetében:  $6,0 \pm 0,2$  Hgmm, míg 0,3 és 1  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében rendre  $6,8 \pm 0,4$  illetve  $6,4 \pm 0,4$  Hgmm) és a pulzusnyomásban sem (rendre  $49,5 \pm 2,8$  Hgmm,  $51,8 \pm 3,5$  és  $46,6 \pm 3,8$  Hgmm) (3/A-C. ábra). A 2/B. ábrán látható, hogy a SEA0400 a fluoreszcencia hányadosát, amely az intracelluláris kalciumtranziens paramétereit jellemzi, szintén nem változtatta meg. A fluoreszcencia hányados csúcsértékei a következők voltak: kontroll körülmények között:  $1,04 \pm 0,01$ , míg 0,3 és 1  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében rendre  $1,04 \pm 0,02$  és  $1,05 \pm 0,03$  (3/D. ábra). Az alapvonal fluoreszcencia hányadosok rendre a következők voltak:  $0,81 \pm 0,04$ ,  $0,81 \pm 0,04$  és  $0,83 \pm 0,04$  (3/E. ábra), míg a fluoreszcencia hányados amplitúdói:  $0,23 \pm 0,03$ ,  $0,22 \pm 0,03$  és  $0,22 \pm 0,03$  (3/F. ábra). Ezen paramétereket valamennyi esetben az idő függvényében ábráztuk. Egyik paraméterben sem találtunk szignifikáns változást SEA0400 jelenlétében.

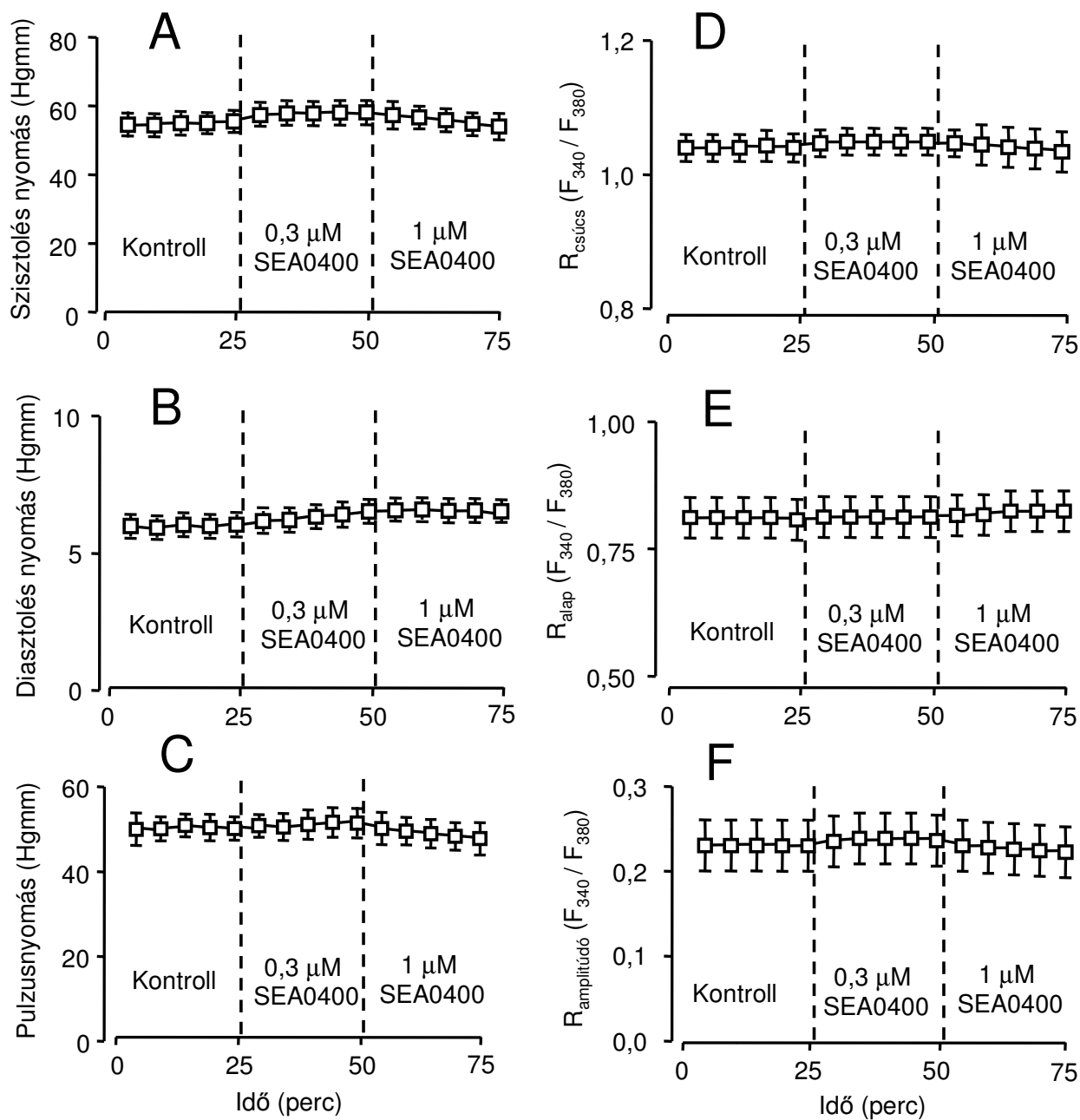
Megvizsgáltuk azt is, hogy okoz-e a SEA0400 valamilyen változást a bal kamrai nyomás görbék és a kalciumtranziens kinetikai paramétereiben. Meghatároztuk a bal kamrai nyomás és a kalciumtranziens csúcsértékének kialakulásáig eltelt időt (TtP), a félrelaxációs időt (HRT) és a bal kamrai nyomásgörbe idő szerinti első deriváltjának a maximum és a minimum értékeit szisztolé illetve diasztolé alatt (+dP/dt, -dP/dt). Nem találtunk szignifikáns változást ezen paraméterek vizsgálata során (4/A-C. ábra). A 4/D. ábrán a kalciumtranziens lecsengésének időállandóját tüntettük fel, melyet monoexponenciális függvénnyel határoztunk meg a relaxáció 30%-ától a 90%-áig terjedő szakaszának illesztésével. Bár 0,3 és 1  $\mu\text{M}$  SEA0400 nem változtatta meg szignifikánsan sem a HRT, sem a TtP értékeit a kalciumtranziens esetében sem, viszont a kalciumtranziens lecsengésének időállandóját szignifikánsan növelte  $127 \pm 7$  ms-ról 0,3  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében  $165 \pm 7$  ms-ra, míg 1  $\mu\text{M}$  SEA0400 esetében  $177 \pm 14$  ms-ra. A kalciumtranziens lecsengésének elnyúlása azért fontos, mert ez

bizonyítja, hogy a SEA0400 valóban kifejtette hatását az NCX-re. Ezen eredményeinket összefoglalva azt állapíthatjuk meg, hogy a SEA0400 tengerimalac szíven sem a kalciumtranziensek nagyságát, sem a kontraktilis sajátságokat nem változtatta meg, annak ellenére, hogy NCX-gátló hatását nyilvánvalóan kifejtette.



2. ábra

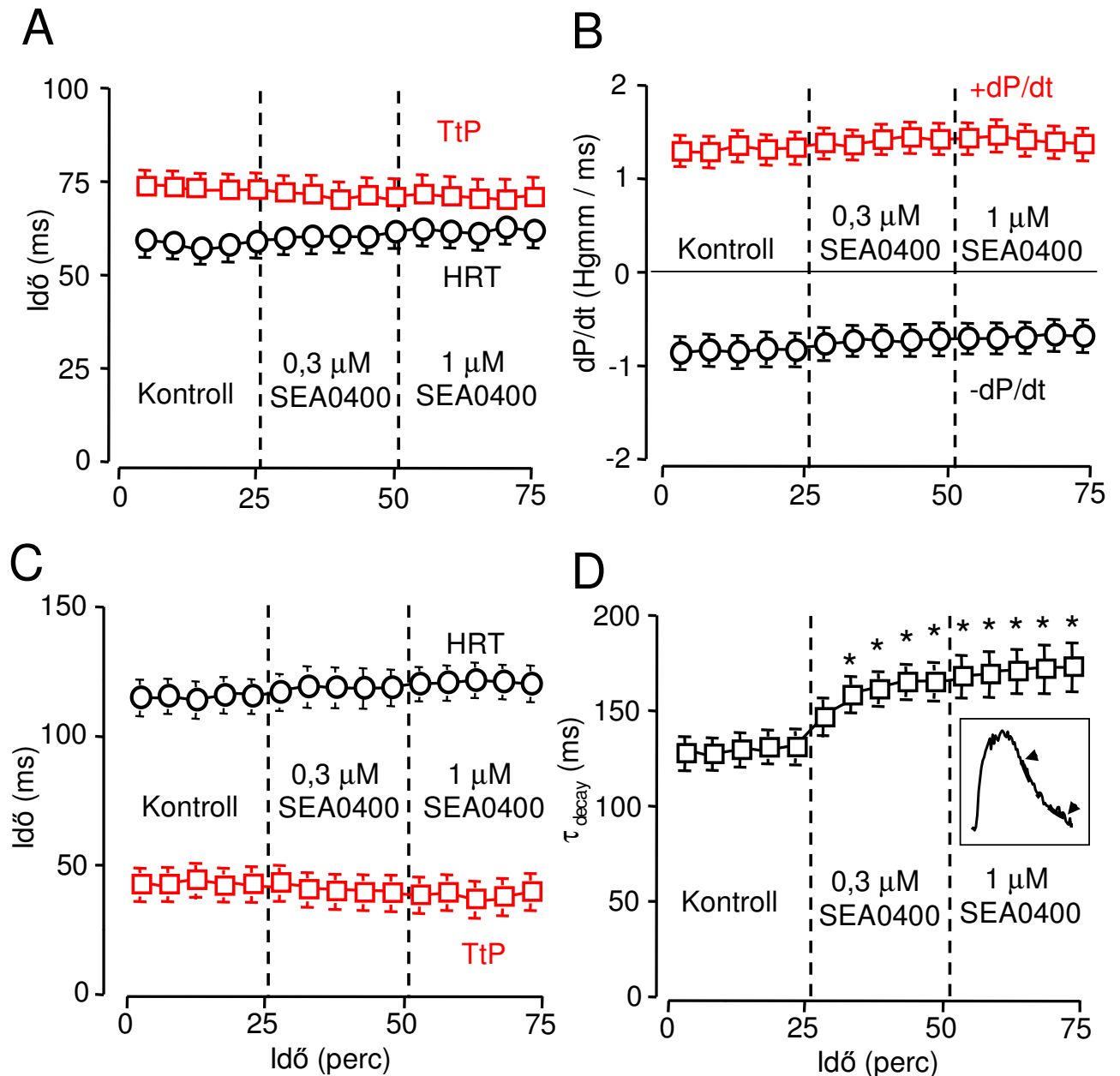
Langendorff szerint perfundált tengerimalac szív reprezentatív bal kamrai nyomásgörbéi kontroll körülmények között illetve 0,3 és 1  $\mu$ M SEA0400 jelenlétében (A). Ugyanezen preparátum reprezentatív kalciumtranziensei (B).



3. ábra

**Növekvő koncentrációban alkalmazott SEA0400 hatása Langendorff szerint perfundált tengerimalac szív bal kamrai nyomásgörbéire (A-C) és kalciumtranzienseire (D-F)**

A SEA0400-at 0,3 és 1 μM-os koncentrációban, 25-25 percen keresztül alkalmaztuk. A pulzusnyomás értékei (C) a szisztolés és a diasztolés nyomások különbségeinek felelnek meg, míg az  $R_{csúcs}$  (D) és az  $R_{alap}$  (E) értékek különbsége. Az  $R_{amplitúdó}$  (F) az  $R_{csúcs}$  és az  $R_{alap}$  értékek különbsége. Az ábrákon 6 Langendorff szerint perfundált tengerimalac szív mérési eredményeinek az átlaga és standard errorja látható.



4. ábra

**Tengerimalacból származó szív bal kamrai nyomás (A, B) és kalciumtransziens (C, D) kinetikai tulajdonságainak változása SEA0400 jelenlétében**

TtP: a bal kamrai nyomás (A) és a kalciumtransziens (C) csúcsértékének kialakulásáig eltelt idő. HRT: a bal kamrai nyomás (A) és a kalciumtransziens (C) félrelaxációs ideje. A bal kamrai nyomás első deriváltjának a maximum és a minimum értékei (B). A kalciumtransziens lecsengésének időállandóját ( $\tau_{\text{decay}}$ ) monoexponenciális függvénnyel határoztuk meg a relaxáció 30%-tól 90%-ig terjedő szakaszának illesztésével (D). Minden egyes pont 6 szív mért értékeinek az átlagát (n=6) jelöli, és a standard error.

#### IV/2. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensére és sejtrövidülésére

Az izolált szívizomsejteket elektronikus stimulátorral 1 Hz frekvencián téringertük. Miután a szívizomsejtek kontrakcióinak és  $[Ca^{2+}]_i$ -tranzienseinek az egyensúlyi állapota kialakult 0,1, 0,3, és 1  $\mu$ M koncentrációjú SEA0400-t perfundáltattunk 5 percig azaz az adott koncentrációhoz tartozó teljes hatás kialakulásáig. A SEA0400 alkalmazása előtt és után regisztráltuk a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranzienst és a sejtrövidülést. A diasztolés fluoreszcencia hányados, az  $F_{360}/F_{380}$  amplitúdó és a sejtrövidülés esetében is a kapott átlag értékeket a kontroll százalékában adtuk meg (5. ábra). A mért adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a SEA0400 az általunk alkalmazott koncentrációkban nem okozott szignifikáns változást a kutya kamrai szívizomsejtek  $[Ca^{2+}]_i$ -tranzienseinek és kontraktilitásának vizsgált paramétereire. Ezen eredményeink megegyeznek a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven tapasztaltakkal.

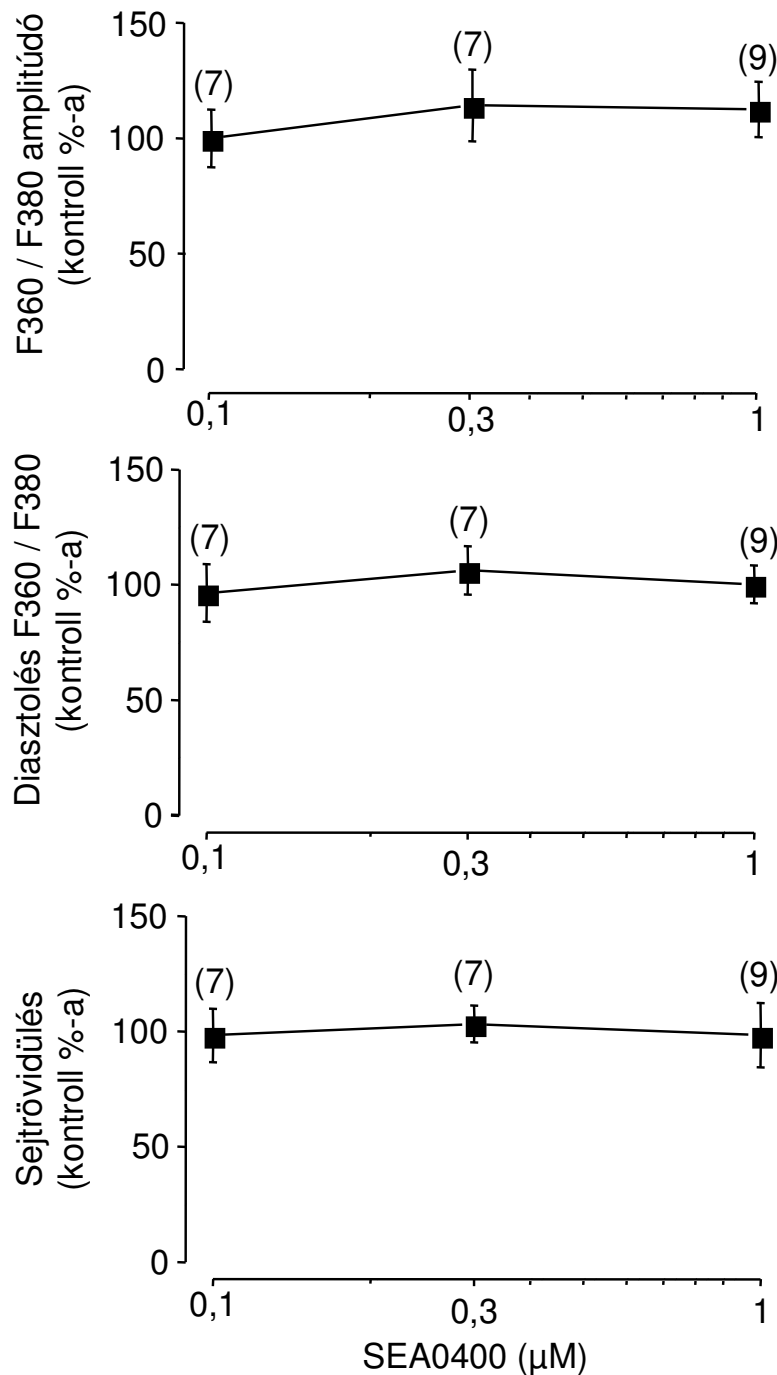
#### IV/3. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó SR vezikulák kalciumfelszabadulására

A SEA0400 szelektív hatásának feltétele, hogy ne módosítsa az SR kalciumforgalmát, tehát a  $Ca^{2+}$ -felszabadulás valamint a  $Ca^{2+}$ -visszavétel sebességét. Ezeket a vizsgálatokat rendre kutya kamrai szívizomból preparált nehéz SR és könnyű SR vezikulákon végeztük.

Elsőként megvizsgáltuk a SEA0400 hatását a HSR vezikula preparátumokból történő kalciumfelszabadulásra 20  $\mu$ M extravezikuláris  $Ca^{2+}$  jelenlétében. Az extravezikuláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció emelésének hatására a RyR2 csatornák nyitott állapotba kerültek (6/A. ábra). A SEA0400 alkalmazása nem módosította a  $Ca^{2+}$ -felszabadulás mértékét, minthogy a mért fényintenzitás meredeksége változatlan maradt. A  $Ca^{2+}$ -felszabadulás a SEA0400 alkalmazása előtt  $12,4 \pm 0,9$  nmol/perc/mg fehérje volt, míg 0,3, 1 és 3  $\mu$ M SEA0400 jelenlétében rendre  $11,8 \pm 1,1$ ,  $13,1 \pm 1,2$  és  $13,2 \pm 1,2$  nmol/perc/mg fehérje értékeket mértünk. Tehát a SEA0400 nem gátolta a nyitott RyR2 csatornán keresztüli  $Ca^{2+}$ -felszabadulást.

Az előző mérési protokollhoz hasonlóan megvizsgáltuk a SEA0400 hatását a zárt RyR2 csatornákra (6/B. ábra). Ebben az esetben küszöbérték alatti extravezikuláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációt alkalmaztunk. A görbe vízszintes lefutása azt mutatja, hogy a csatornák gyakorlatilag zárva voltak és SEA0400 jelenlétében is zárva maradtak, ami

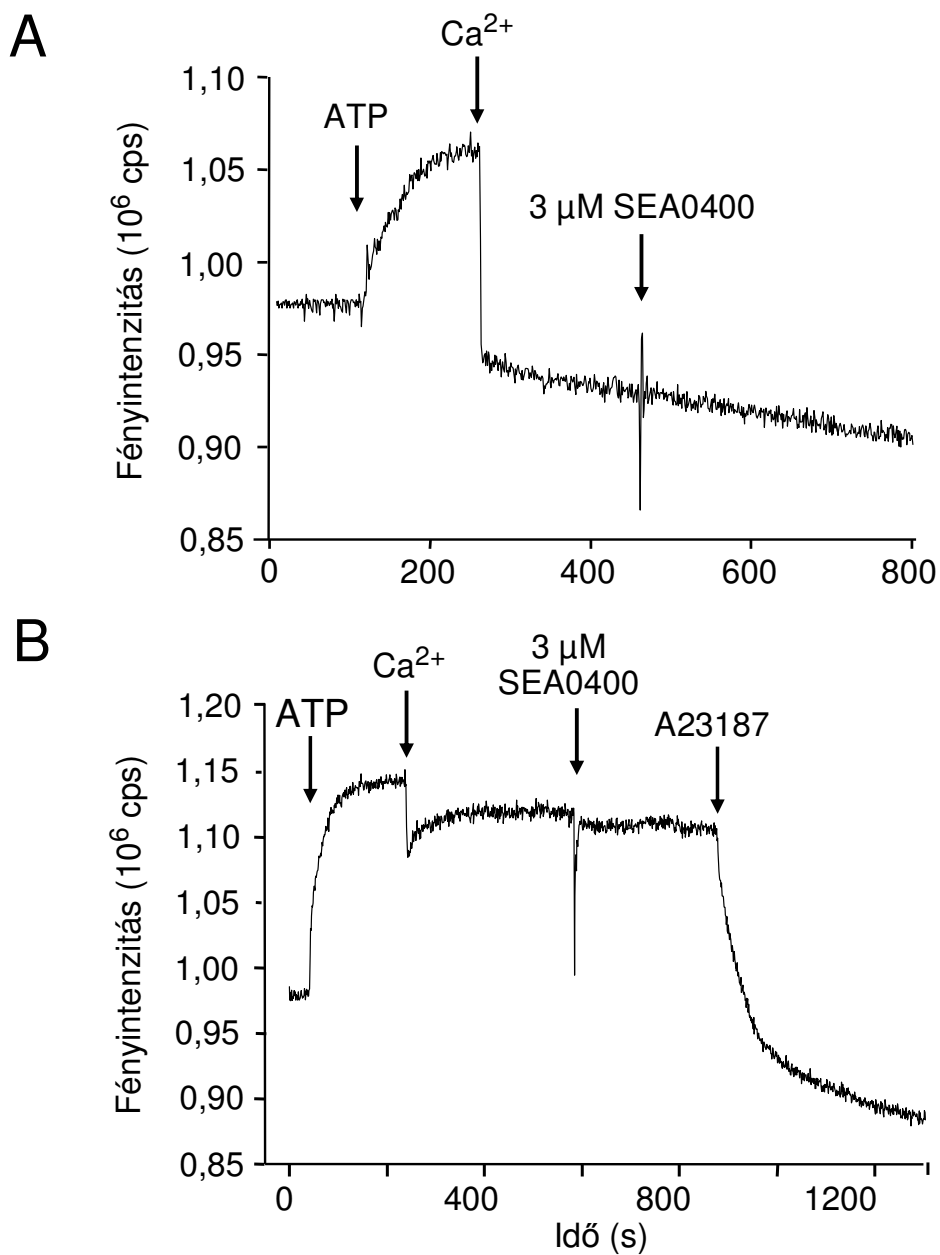
azt valószínűsíti, hogy a SEA0400 az alkalmazott koncentrációkban nem növeli a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást. Ezzel szemben az A23187 nevű  $\text{Ca}^{2+}$ -ionofor molekula már  $2 \mu\text{M}$  koncentrációban erőteljes  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást okozott, amely a vezikulák kalciummal való megfelelő töltöttségét támasztja alá.



5. ábra

**A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienására és a sejtrövidülésére**

A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ot a fluoreszcencia hányadosával (F360/F380) jellemeztük, míg a sejtrövidülést a diasztolés sejthosszhoz viszonyítva számoltuk. A növekvő koncentrációban alkalmazott SEA0400 jelenlétében kapott átlagértékeket valamennyi esetben a kontroll százalékában adtuk meg. Az ingerlési frekvencia 1 Hz volt. A zárójelben lévő értékek a vizsgált sejtek számát jelölik.



6. ábra

**A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó SR vezikulák kalciumfelszabadulására**

A vezikulákat ATP jelenlétében  $Ca^{2+}$ -mal töltöttük. **(A)** Az extravezikuláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációt  $20 \mu M$ -ra növeltük, amely aktiválta a RyR2 csatornákat. Közvetlenül a SEA0400 hozzáadása előtt és után határoztuk meg a kalciumfelszabadulás mértékét, amelyet a görbe meredekségéből számoltunk. A fényintenzitást az ordináta tengelyen ábrázoltuk, amely fordítottan arányos az extravezikuláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációval. **(B)** A SEA0400 hatása a nyugalomban lévő (zárt) RyR2 csatornákra. Ebben az esetben a vezikulák töltése után az extravezikuláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációt  $2 \mu M$ -ra állítottuk be. Ilyenkor a csatorna aktiváció elhanyagolhatóan tekinthető, melyet a SEA0400 hozzáadása sem módosított. Végül a  $2 \mu M$  koncentrációjú A23187  $Ca^{2+}$ -ionofor segítségével a vezikulák össz  $Ca^{2+}$ -tartalmát felszabadítottuk. Mindkét ábra egy-egy reprezentatív mérés eredményeit tükrözi.

A fenti mérési körülmények mellett, a SEA0400 alkalmazása előtti  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás mértéke  $2,2 \pm 0,31$  nmol/perc/mg fehérje volt, míg 0,3, 1 és 3  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében rendre  $2,2 \pm 0,3$ ,  $2,3 \pm 0,28$ , és  $2,3 \pm 0,3$  nmol/perc/mg fehérje értéket mértünk ( $n=6$ ). Ebből arra következtetünk, hogy a SEA0400 nem fokozza a RyR2 csatornákon keresztül megvalósuló  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást.

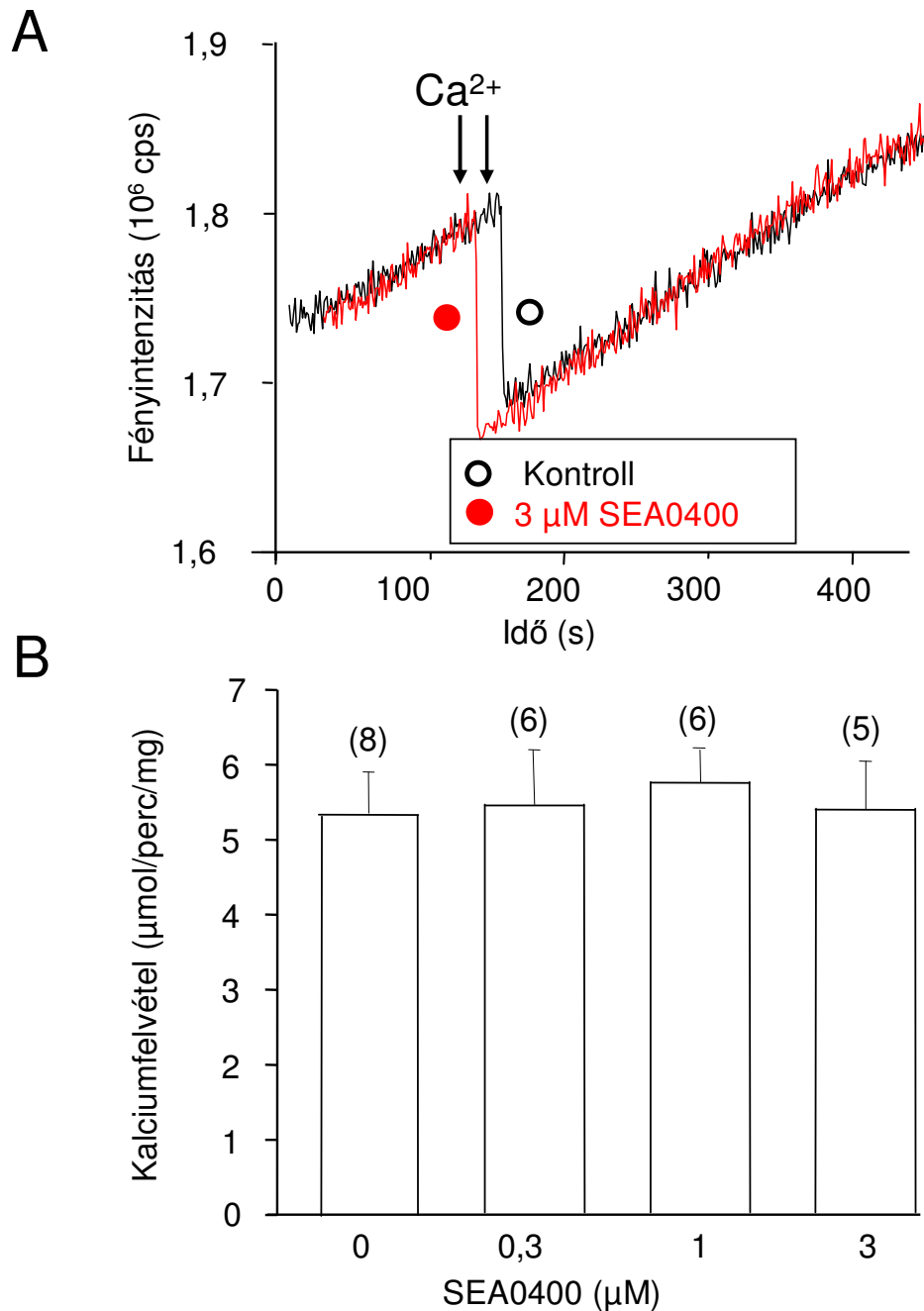
#### IV/4. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó SR vezikulák kalciumfelvételére

Az SR kalciumpumpa-aktivitását az LSR vezikulák kezdeti  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételének mértékéből határoztuk meg oly módon, hogy mértük az extravezikuláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció-változását az idő függvényében maximális pompa aktivitás mellett. A  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel mértékét meghatároztuk kontroll körülmények között, valamint 0,3, 1 és 3  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében (7/A.,B. ábra). A kezdeti  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel mértéke ugyanannyi volt a SEA0400 általunk vizsgált valamennyi koncentrációjában, mint kontroll esetben. Ezen eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a SEA0400 nem módosította az intracelluláris térből az SR lumenébe történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételt.

#### IV/5. A SEA0400 hatása lipidkettősrétegbe beépített, kutya bal kamrájából származó szívmembránok RyR2 csatornáira

A HSR vezikulákon végzett mérések alapján feltételezhető volt, hogy a vegyületnek nincs drasztikus hatása a RyR2 csatornára. A részletes kinetikai elemzést Müller-féle lipidkettősrétegbe ágyazott egyetlen RyR2 csatornán végeztük el feszültség-clamp technika alkalmazásával (8/A. ábra). A cisz oldali 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében a csatornák szinte teljesen nyitva vannak, a nyitvatartási valószínűség értéke: ( $P_0$ )  $0,987 \pm 0,047$  volt ( $n=9$ ). Ha a cisz oldalon lévő  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt 472 nM-ra csökkentjük, akkor a csatornák nyitvatartási valószínűsége  $0,043 \pm 0,008$ -ra csökkent ( $n=9$ ). 3  $\mu\text{M}$  SEA0400 hozzáadása után a csatornák nyitvatartási valószínűsége szignifikánsan nem változott ( $P_0 = 0,032 \pm 0,005$ ,  $n=6$ ). A 8/A. ábrán egyértelműen látszik, hogy a SEA0400 jelenlétében a RyR2 csatornák vezetőképessége, azaz a csatornákon folyó áram amplitúdója változatlan maradt. A reprezentatív mérésekből nyitvatartási időhisztogramot készítettünk kontroll körülmények között (ahol egy 54 s hosszú periódust vizsgáltunk) és 3  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében (ahol egy 20 s hosszú időintervallumot tanulmányoztunk). A kapott értékeket biexponenciális függvénnyel illesztettük meg, az eredményeket a 8/B. ábrán mutatjuk be. A kontroll körülmények

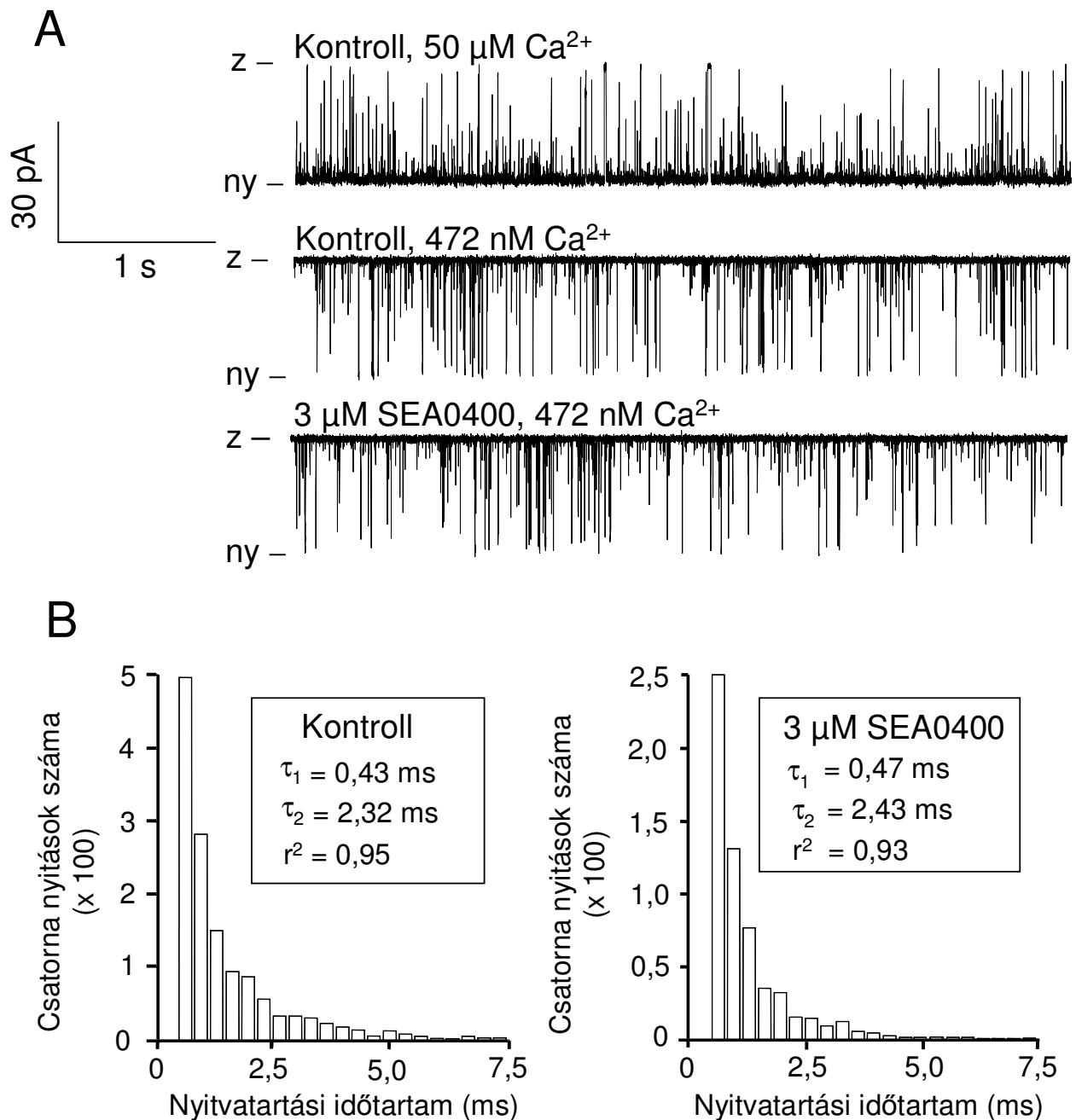
között kapott eredményekkel összevetve a 3  $\mu\text{M}$  SEA0400 sem a gyorsabb, sem a lassúbb nyitvatartási időállandót nem változtatta meg szignifikánsan. Összefoglalva, a 3  $\mu\text{M}$  SEA0400 sem a RyR2 kapuzási kinetikáját, sem a nyitott csatorna vezetőképességét nem módosította.



7. ábra

**A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó SR vezikulák kalciumfelvételére**

(A) A Ca<sup>2+</sup>-felvétel reprezentatív görbéi láthatóak. Az SR Ca<sup>2+</sup>-felvételét Ca<sup>2+</sup> hozzáadásával aktiváltuk. A fény intenzitás változás alapján a késői Ca<sup>2+</sup>-szegmens meredekségéből határoztuk meg a Ca<sup>2+</sup>-felvétel mértékét. A kontroll görbével összehasonlítva a SEA0400 nem mutatott eltérést. (B) A Ca<sup>2+</sup>-felvétel mértékének az átlagai láthatók, kontroll körülmények között illetve 0,3, 1, és 3  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében. A zárójelbe tett értékek a mérések számát jelölik.



8. ábra

**A SEA0400 hatása lipidkettősrétegbe beépített, kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek RyR2 csatornáira**

Az egy csatornás technikával mért áramokat 57 mV tartópotenciálon regisztráltuk (A). A csatorna nyitott és zárt állapotát bal oldalon jelöltük, a nyílások a lefelé irányuló kitéréseknek felelnek meg. Az első mérést a cis oldalon 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében végeztük (felső panel), majd a cis  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt lecsökkentettük 472 nM-ra  $\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$  hozzáadásával (középső panel). Ez azt eredményezte, hogy a csatorna nyitvatartási valószínűsége nagymértékben lecsökkent. Végül, a SEA0400-t alkalmaztuk 3  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban (alsó panel). (B) A reprezentatív mérésekből nyitvatartási időhisztogramot készítettünk, kontroll körülmények között, ahol egy 54 s hosszú periódust vizsgáltunk és 3  $\mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében, ahol egy 20 s hosszú időintervallumot tanulmányoztunk. A kapott értékeket biexponenciális függvénnyel illesztettük meg.

#### IV/6. A SEA0400 hatása a kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységére

Mivel a kontrakció nagyságát az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráción kívül a kontraktilis fehérjék  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége is befolyásolja, a SEA0400 hatását ebben a vonatkozásban is megvizsgáltuk. Az anyagok és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően először az erő-pCa összefüggést határoztuk meg oly módon, hogy a preparátum külső  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációját lépcsőzetesen emeltük. Így meg tudtuk mérni a preparátum félaktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációját ( $\text{pCa}_{50}$ ). A méréseink alapján a  $\text{pCa}_{50}$  értéke 6,4 volt (9/A. ábra). A maximális izometriás  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált erő ( $P_{\text{max}}$ )  $27,9 \pm 9,8 \text{ kN/m}^2$  és a passzív erő  $3,6 \pm 1,7 \text{ kN/m}^2$  volt. Ezen mérésekhez 4 különböző kutya szívéből származó permeabilizált szívizomsejtet használtunk. Kontroll körülmények között és  $1 \mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében mértük az erő kialakulását  $\text{pCa}=6,4$  mellett. A SEA0400-t DMSO-ban oldottuk fel, ezért megvizsgáltuk a DMSO hatását is a kontraktilis fehérjék  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységére. A  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált kontraktilis erő nagyságát a  $P_{\text{max}}$  százalékában kifejezve kontroll körülmények között  $0,55 \pm 0,03\%$ -ot, DMSO-ban  $0,55 \pm 0,04\%$ -ot és  $1 \mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében  $0,57 \pm 0,03\%$ -ot kaptunk (9/B. ábra). Mérési eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy sem a SEA0400, sem a DMSO nem változtatta meg a szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét.

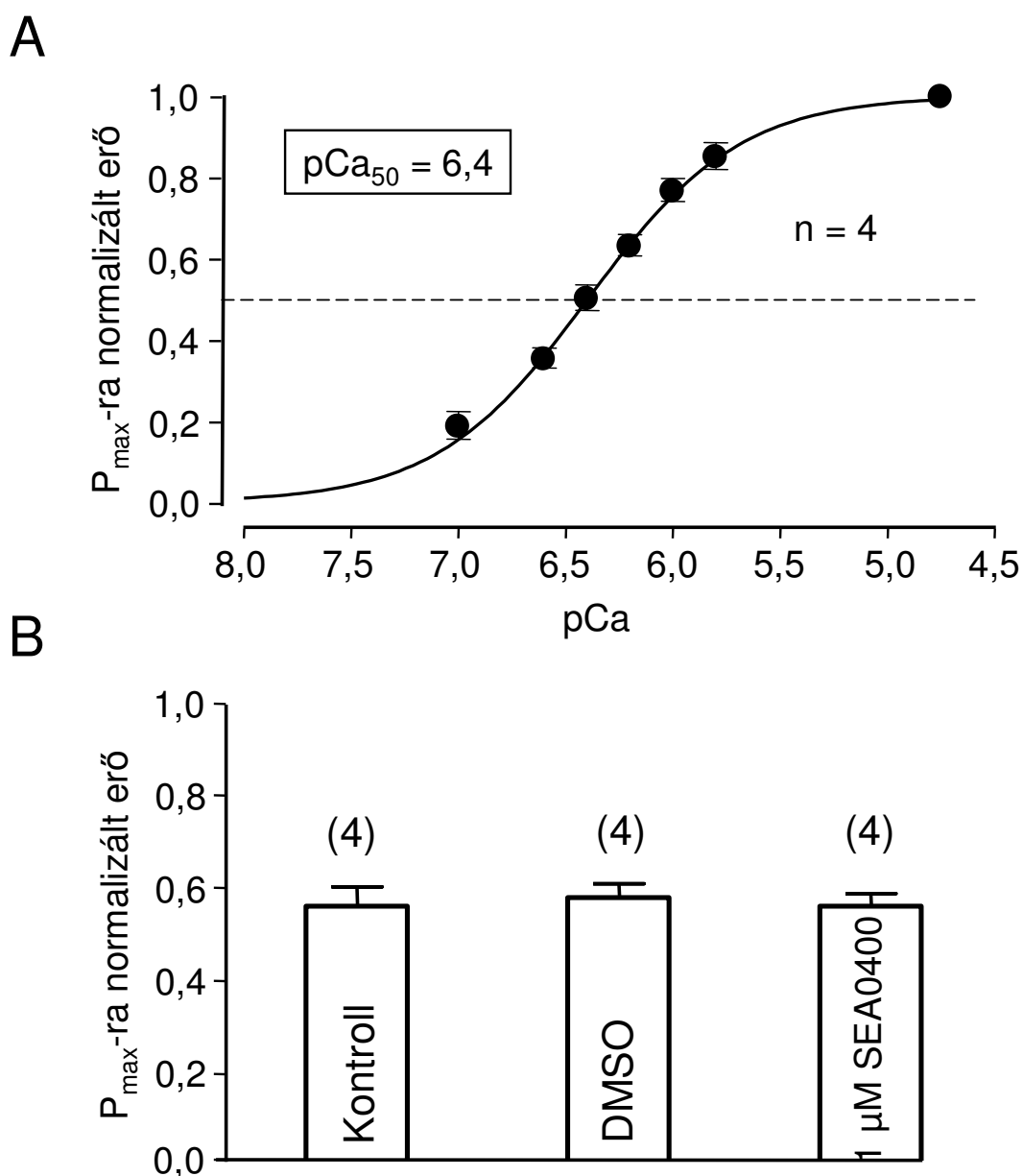
#### IV/7. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek NCX-áramára

Bár a SEA0400 NCX-re irányuló gátló hatását tengerimalac szívizomsejteken korábban leírták, kutyából származó kamrai sejteken ezirányú adatot nem találtunk az irodalomban. Ezért tanulmányoztuk a SEA0400 NCX-gátló hatását kutya szívéből származó enzimatikusan izolált kamrai szívizomsejteken. A SEA0400 hatását az NCX forward mode (inward áram), valamint reverse mode (outward áram) működésére egyaránt megvizsgáltuk.

A kifelé és a befelé irányuló  $\text{Ni}^{2+}$ -érzékeny NCX-áram meghatározásához  $+60 \text{ mV}$ -tól  $-100 \text{ mV}$ -ig tartó leszálló feszültség rámpa protokollt használtuk. A kifelé és a befelé irányuló NCX-áramokat rendre  $+40$  és  $-80 \text{ mV}$  feszültség értékeken olvastuk le (10/A. ábra). A SEA0400-at növekvő koncentrációkban 3-3 perc időtartamig, kumulatíván alkalmaztuk (10/B. ábra). A SEA0400 koncentráció-függő módon gátolta

mind a befelé, mind pedig a kifelé irányuló NCX-áramot, bár a gátlás mértéke a kifelé irányuló áram esetében nagyobb volt a befelé irányuló áramhoz képest. A méréseink során alkalmazott legnagyobb koncentráció a 3  $\mu\text{M}$  volt, de még ez a koncentráció is kevésnek bizonyult az NCX-áram teljes gátlásához.

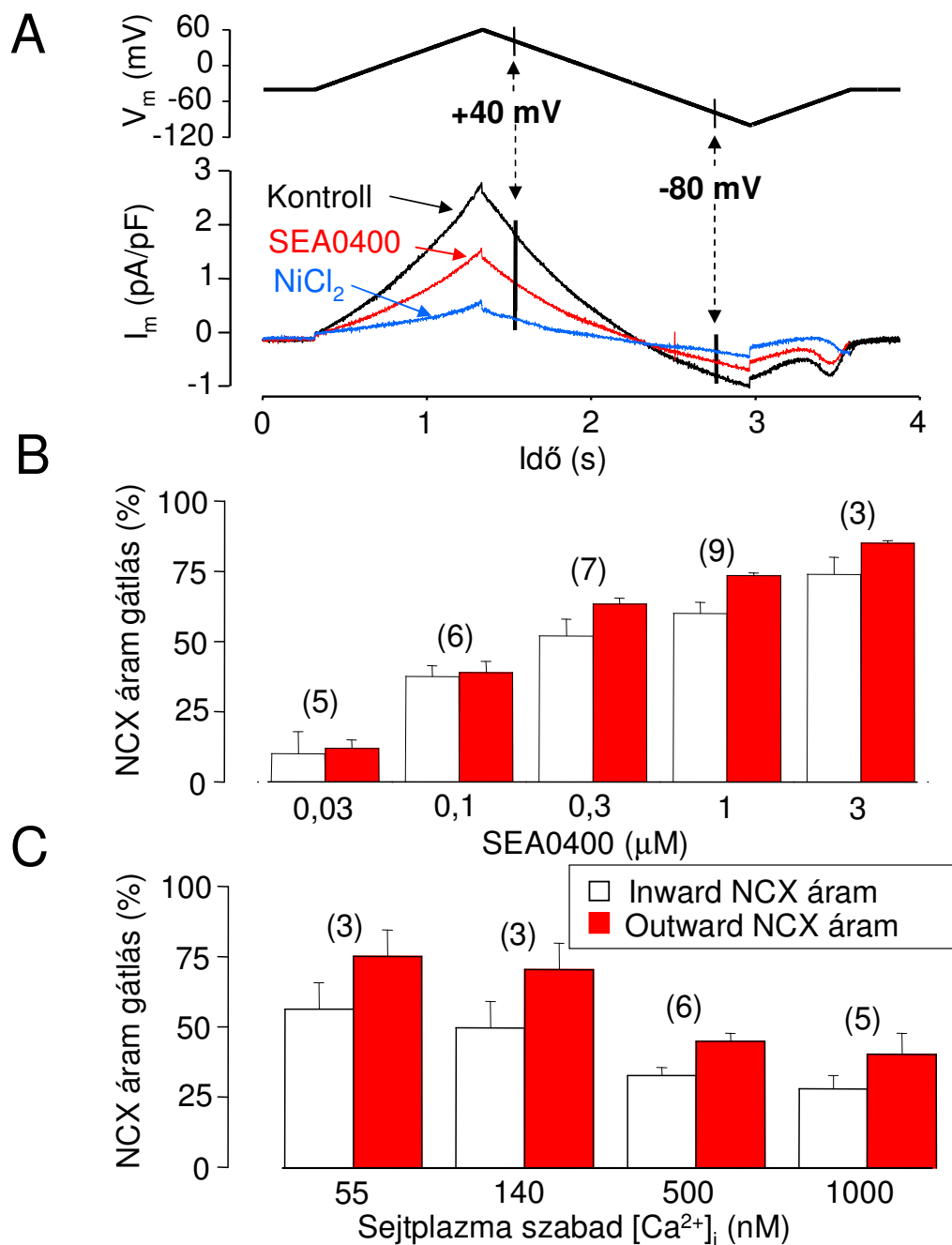
A SEA0400 hatásának NCX-áramon való tanulmányozásakor a pipettaoldat szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációját a mérések során 55, 140, 500 és 1000 nM koncentrációkra állítottuk be  $\text{CaCl}_2$  és EGTA megfelelő arányú hozzáadásával. Az 1  $\mu\text{M}$  SEA0400 gátló hatása az NCX-áramon az intracelluláris kalciumkoncentráció függvényében változott: a gátlás a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedésével folyamatosan csökkent (10/C. ábra). Ez a tény, valamint az, hogy a SEA0400 markánsabban gátolta a kifelé irányuló, mint a befelé irányuló NCX-áramot, részben megmagyarázhatja a SEA0400 hatásának hiányát a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranzien্স amplitúdóján.



9. ábra

**A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek kontraktilis fehérjének  $Ca^{2+}$ -érzékenységére**

Az erő-pCa összefüggés meghatározásához 4 kémiaileg kezelt kutya kamrai szívizomsejtet használtunk. A  $Ca^{2+}$ -koncentráció kifejezésére a moláris koncentráció tízes alapú negatív logaritmusát alkalmaztuk (pCa, vízszintes tengely) (A). A  $Ca^{2+}$ -koncentráció balról jobbra nő (a pCa érték ezzel párhuzamosan csökken). A  $Ca^{2+}$ -koncentráció növekedésével az izometriás körülmények között mért izomerő a maximális  $Ca^{2+}$ -aktivált erő ( $P_{max}$ ) eléréséig fokozódik (függőleges tengely). A kontraktilis rendszer  $Ca^{2+}$ -érzékenységének jellemzésére gyakorta a félmáximális erő ( $P_{max}/2$ ) eléréséhez szükséges  $Ca^{2+}$ -koncentrációt ( $pCa_{50}$ ) alkalmaztuk. A  $P_{max}$ -ra normalizált kontraktilis erő mért értékei (pCa=6,4) kontroll körülmények között, DMSO jelenlétében és 1  $\mu$ M SEA0400-ban. A zárójelben lévő értékek a mérések számát mutatják (B).



10. ábra

**A SEA0400 hatása kutya bal kamrából származó szívizomsejtek NCX-áramára**

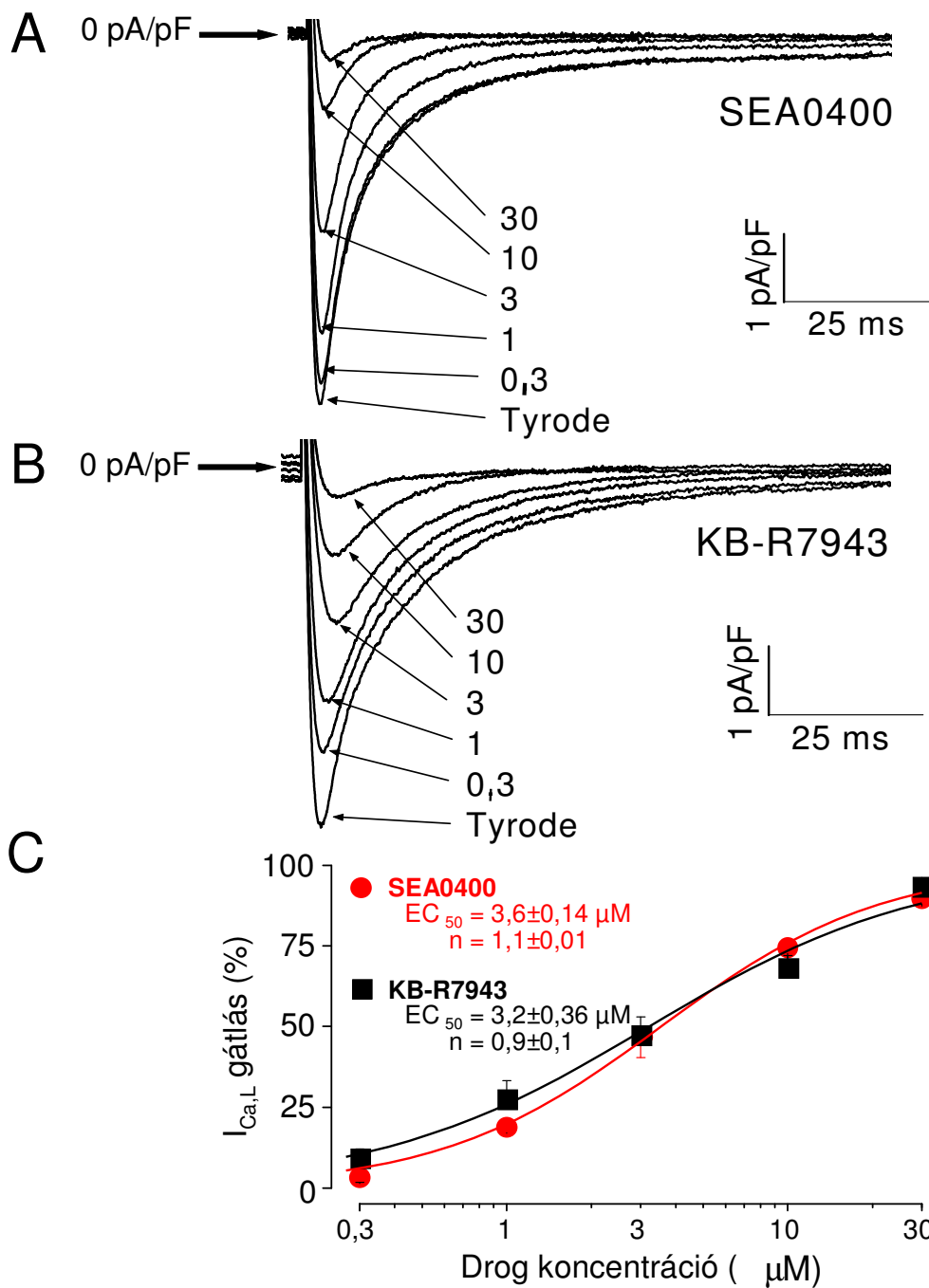
Rámpa protokollt használtunk a NCX-áram tanulmányozásához (A). A reprezentatív áram görbék a következő mérési protokollt tükrözik: kontroll körülmények között  $K^+$ -mentes oldatban rögzítettük az áram jeleket, majd ezt követően  $1 \mu M$  SEA0400-at alkalmaztunk, végül  $10 mM NiCl_2$ -t perfundáltattunk, abból a célból, hogy a NCX-áramot teljesen legátoljuk. A kifelé irányuló (reverse mode) és a befelé irányuló (forward mode) NCX-áramokat  $+40 mV$ -tól  $-80 mV$ -ig tartó rámpa leszálló ágával határoztuk meg. A nyilak a feszültség protokollhoz tartozó áram görbéket jelölik. (B) A SEA0400 koncentráció függő gátló hatása a befelé irányuló (üres négyzet) és a kifelé irányuló (tömött négyzet) NCX-en. (C) Az  $1 \mu M$  SEA0400 gátló hatása a befelé irányuló és a kifelé irányuló NCX-áramra a sejt plazma szabad  $Ca^{2+}$ -koncentrációjának a függvényében. A szabad  $Ca^{2+}$ -ot  $55, 140, 500, \text{ és } 1000 nM$ -ra állítottuk be a pipettaoldat  $CaCl_2$  és EGTA koncentrációjának a változtatásával. A mérések során felhasznált szívizomsejtek számát a zárójelben tüntettük fel.

#### IV/8. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek L-típusú kalciumáramára

A szelektív NCX-gátlás további feltétele, hogy a vizsgált molekula ne módosítsa jelentős mértékben a felszíni membrán egyéb ionáramait. A SEA0400 hatását az L-típusú kalciumáramra egész sejtes konfigurációban feszültség-clamp technikával mértük, és a hatást egy másik NCX-gátló, a KB-R7943-mal kapott eredményekhez hasonlítottuk. A kísérletek megkezdése előtt legalább 5 percig figyeltük a mért áramjelet és az amplitúdó csökkenése esetén a sejtet nem használtuk fel a további mérésekhez.

Ha az áram amplitúdója stabil volt, akkor a SEA0400 növekvő koncentrációit 4-4 percen keresztül kumulatív módon alkalmaztuk. Amint az a 11/A-B. ábrán látható, a SEA0400 - a KB-R7943-hoz hasonlóan - dózis-függő módon csökkentette az  $I_{Ca,L}$ -t. A KB-R7943 kumulatív dózis-hatás görbéjének Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló-koncentráció ( $EC_{50}$ ) értékére  $3,2 \pm 0,36 \mu\text{M}$ -t kaptunk, míg a Hill koefficiens értéke  $0,9 \pm 0,1$  volt. A SEA0400 esetében a félgátló-koncentráció értékére  $3,6 \pm 0,14 \mu\text{M}$ -t kaptunk, míg a Hill koefficiens értéke  $1,1 \pm 0,01$ -nek adódott (11/C. ábra). A kapott adatok alapján megállapítottuk, hogy mindkét vizsgálandó szer hasonló hatáserősséggel blokkolta az L-típusú kalciumáramot.

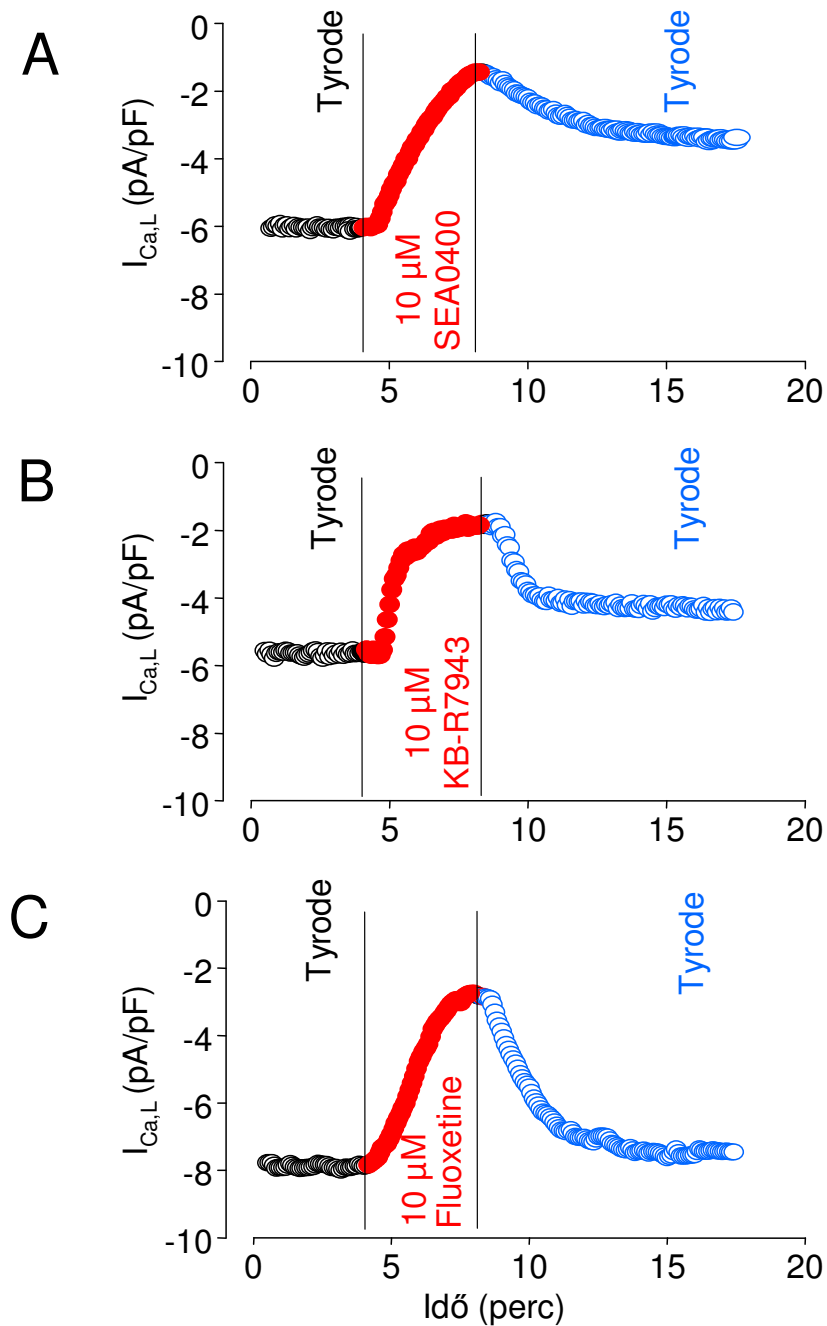
A KB-R7943  $I_{Ca,L}$ -ra kifejtett gátló hatása viszonylag gyorsan kialakult (egy percen belül), stabil maradt, és nagyrészt kimosható volt, de az eredeti áram-amplitúdót nem érte el 15 perces kimosás után sem (12/B. ábra). A SEA0400  $I_{Ca,L}$ -ra kifejtett gátló hatása a KB-R7943 hatásánál lassabban alakult ki (4 perc alatt csupán mintegy 85%-os hatás  $10 \mu\text{M}$  alkalmazása esetén). A kimosás során az  $I_{Ca,L}$  amplitúdója szinte alig tért vissza, a szer csak nagyon kismértékben volt kimosható (12/A. ábra). A két vizsgált szer hatását a fluoxetinével hasonlítottuk össze, amelyről tudjuk, hogy reverzibilisen gátolja az L-típusú kalciumáramot (12/C. ábra). Kísérleti körülményeink között a fluoxetin gátló hatása már a kimosás 3. perce után visszatért a kontroll érték közelébe, ami azt bizonyítja, hogy a tapasztalt amplitúdócsökkenés nem „rundown” következménye volt, továbbá a SEA0400 hatása valóban csak lassan és csak részlegesen mosható ki a szívizomsejtből.



11. ábra

**A SEA0400 és a KB-R7943 koncentráció függő hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek L-típusú kalciumáramának amplitúdójára**

Reprezentatív áramgörbék kontroll körülmények között (Tyrode) illetve egymást követően alkalmazott 0,3, 1, 3, 10, 30  $\mu M$  koncentrációjú SEA0400 (A) és KB-R7943 (B) jelenlétében. A SEA0400 (n=8) és a KB-R7943 (n=7) kumulatív dózis-hatás görbéje kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek L-típusú kalciumáramának amplitúdójára (C). A folyamos vonalak a mért pontok Hill egyenlettel történő illesztésének görbéje.



12. ábra

**A SEA0400, a KB-R7943 és a Fluoxetine hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek L-típusú kalciumáramának amplitúdójára.**

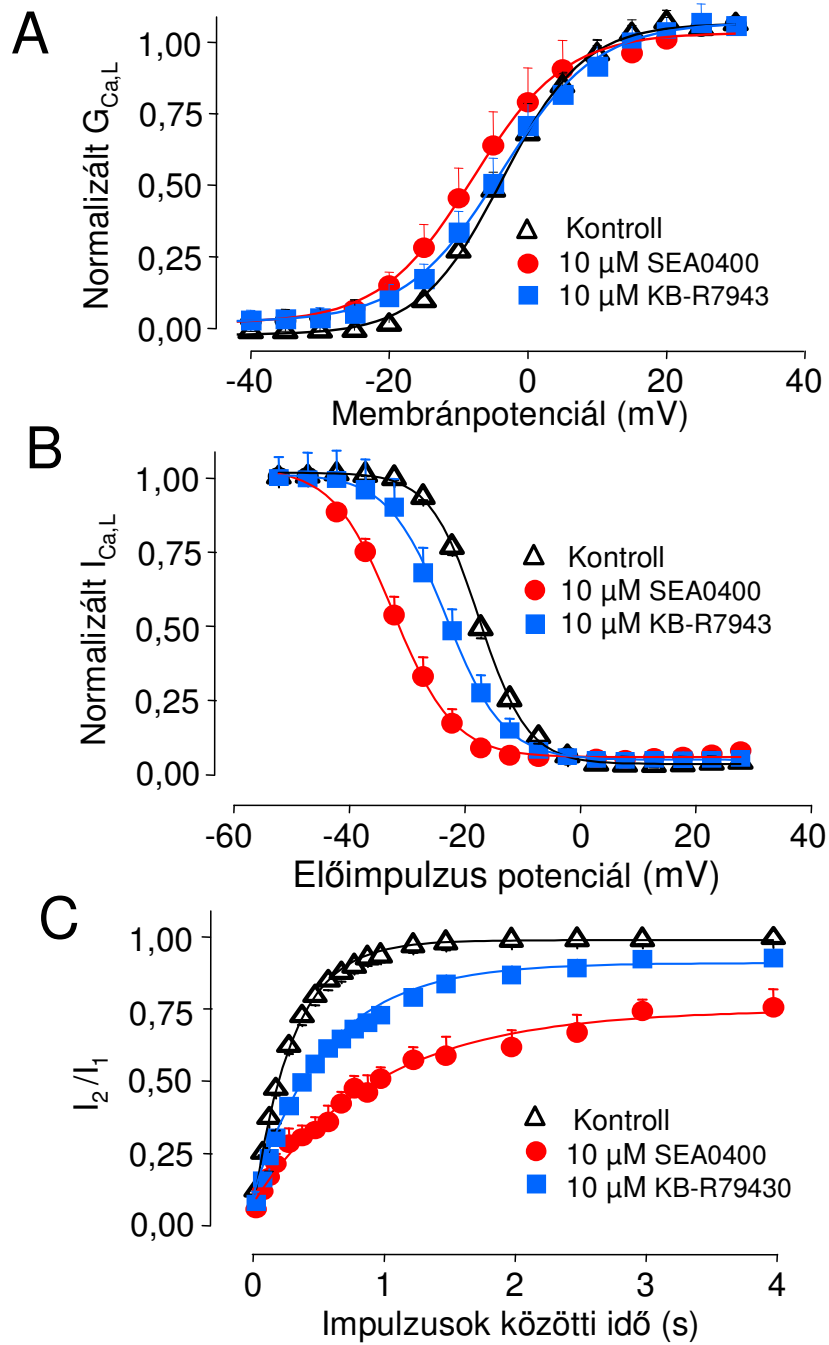
Az ábrán az átlagot jól reprezentáló mérési eredmények láthatóak. A 10  $\mu$ M SEA0400 - a 10  $\mu$ M Fluoxetinehez hasonlóan - nagyon lassú kinetikával gátolta az  $I_{Ca,L}$ -t és ez a hatás nem mutatkozott stabilnak. A kimosás során a SEA0400 esetében az  $I_{Ca,L}$  amplitúdója alig változott, csak elenyésző mértékben volt kimosható, míg a Fluoxetine hatása közel teljesen kimosható bizonyult. A 10  $\mu$ M KB-R7943  $I_{Ca,L}$ -ra kifejtett gátló hatása egy percen belül kialakult, stabil volt, és nagyrészt kimoshatónak mutatkozott, bár az eredeti áram nagyságát nem érte el 15 perces kimosás után sem.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy okoz-e a SEA0400 illetve a KB-R7943 változást az  $I_{Ca,L}$  kinetikai tulajdonságaiban. Először meghatároztuk az  $I_{Ca,L}$  aktivációjának feszültség-függését kontroll körülmények között, majd  $10\ \mu\text{M}$  SEA0400 valamint  $10\ \mu\text{M}$  KB-R7943 jelenlétében. A mérések során  $5\ \text{mV}$ -os lépésközökkel  $-30$  és  $+40\ \text{mV}$  közötti,  $400\ \text{ms}$  hosszú depolarizáló teszimpulzusokat alkalmaztunk  $-40\ \text{mV}$  tartópotenciálról. A csatornák vezetőképességét az egyes depolarizáló feszültségeknél mért csúcsáram értékekből és az azokhoz tartozó hajtóerő hányadosából számoltuk. A hajtóerőt az alkalmazott depolarizáló impulzus feszültsége és az áram  $+55\ \text{mV}$ -nak feltételezett reverzálpotenciáljának különbségeként határoztuk meg. Mindkét szer minden vizsgált feszültségen szignifikánsan csökkentette a kalciumcsatornák vezetőképességét. A SEA0400 esetében a vezetőképesség csökkentése erősebbnek bizonyult a KB-R7943-hoz képest. Ha azonban az eredményeket a  $+30\ \text{mV}$ -nál mért vezetőképesség értékére - mint maximumra - normalizáltuk, a kapott vezetőképesség-feszültség összefüggések csak kismértékben különböztek egymástól, illetve a kontroll görbétől. Mindez arra utal, hogy a SEA0400 csak kismértékben, míg a KB-R7943 egyáltalán nem befolyásolta az  $I_{Ca,L}$  aktivációjának feszültség-függését (13/A. ábra).

Mindkét szer jelentősen módosította az  $I_{Ca,L}$  steady-state inaktivációjának feszültség-függését (13/B. ábra). Az  $I_{Ca,L}$  steady-state inaktivációjának vizsgálatánál kettős impulzus protokollt használtunk. Először egy  $500\ \text{ms}$  hosszú  $-55$  és  $+15\ \text{mV}$  közötti  $5\ \text{mV}$ -os lépésközzel növekvő előimpulzust, ezt követően pedig egy  $400\ \text{ms}$  időtartamú  $+5\ \text{mV}$ -ra depolarizáló teszimpulzust alkalmaztunk. A teszimpulzussal kiváltott csúcsáramokat a  $-55\ \text{mV}$  előimpulzust követő teszimpulzussal kiváltott csúcsáram értékére normalizáltuk és a kapott hányadosokat az alkalmazott előimpulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk. Az ábrázolt pontokat kétállapotú Boltzmann függvénnyel illesztettük. Meghatároztuk az illesztett görbe meredekségét, valamint azt a feszültség értéket, ahol a csatornák fele volt inaktivált állapotban ( $E_{0,5}$ ). Az egyes mérésekből meghatározott félértékfeszültségeket és a meredekségeket átlagoltuk. A két szer közül egyik sem okozott változást a steady-state inaktivációs görbe meredekségében, de azt mindkét szer szignifikáns mértékben a negatívabb feszültségértékek felé tolta el. A görbe eltolódásának mértéke a  $10\ \mu\text{M}$  SEA0400 jelenlétében  $12\pm 2\ \text{mV}$ -nak, a  $10\ \mu\text{M}$  KB-R7943 esetében  $5\pm 1\ \text{mV}$ -nak adódott.

Megvizsgáltuk a SEA0400 és a KB-R7943 hatását az  $I_{Ca,L}$  inaktivációból történő visszatérésére is. A méréseknél két azonos, 400 ms hosszú +5 mV-ra történő depolarizáló impulzust használtunk, ahol a két impulzus közötti időtartamot 50 ms és 3 s között változtattuk. A második impulzussal kiváltott  $I_{Ca,L}$ -amplitúdót az első impulzussal kiváltottra normalizáltuk és az így kapott hányadost ( $I_2/I_1$ ) a két impulzus közötti idő függvényében ábrázoltuk. Az ábrázolt pontokat monoexponenciális függvénnyel illesztettük meg (13/C. ábra). Mindkét szer hatására az L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatorna inaktivációból való visszatérési időállandójának szignifikáns növekedését tapasztaltuk. Míg a kontroll állapotban az inaktivációból való visszatérés időállandója  $301 \pm 31,5$  ms volt, 10  $\mu$ M SEA0400 kezelést követően  $1101 \pm 230,2$  ms, míg 10  $\mu$ M KB-R7943 jelenlétében  $571,3 \pm 47,6$  ms értékeket kaptunk. A 15 perces kimosás utáni időállandó a SEA0400 esetében  $578 \pm 85,9$  ms, míg a KB-R7943-nál  $292,8 \pm 12$  ms volt. A 10  $\mu$ M SEA0400 által okozott lassulás lényegesen nagyobb volt, mint a KB-R7943-nál tapasztalt változás. Látható az is, hogy a KB-R7943 hatása tökéletesen kimosható volt, míg a SEA0400 alkalmazása után csak részleges helyreállást tudtunk elérni.

Összegzésül megállapíthatjuk tehát, hogy a SEA0400 alacsony koncentrációban (0,3  $\mu$ M) csak csekély, kb. 5% nagyságú, míg magasabb koncentrációban (1  $\mu$ M) kb. 20%-os gátlást okozott az L-típusú  $Ca^{2+}$ -áramon. Figyelembe véve az NCX-re meghatározott  $EC_{50}$  értékeket, azt mondhatjuk, hogy szubmikromólos koncentrációknál a SEA0400 viszonylag szelektív NCX-gátlóként viselkedik, míg az 1  $\mu$ M, vagy annál magasabb koncentrációk esetében a molekula  $I_{Ca,L}$ -ra irányuló gátló hatásával is számolnunk kell.

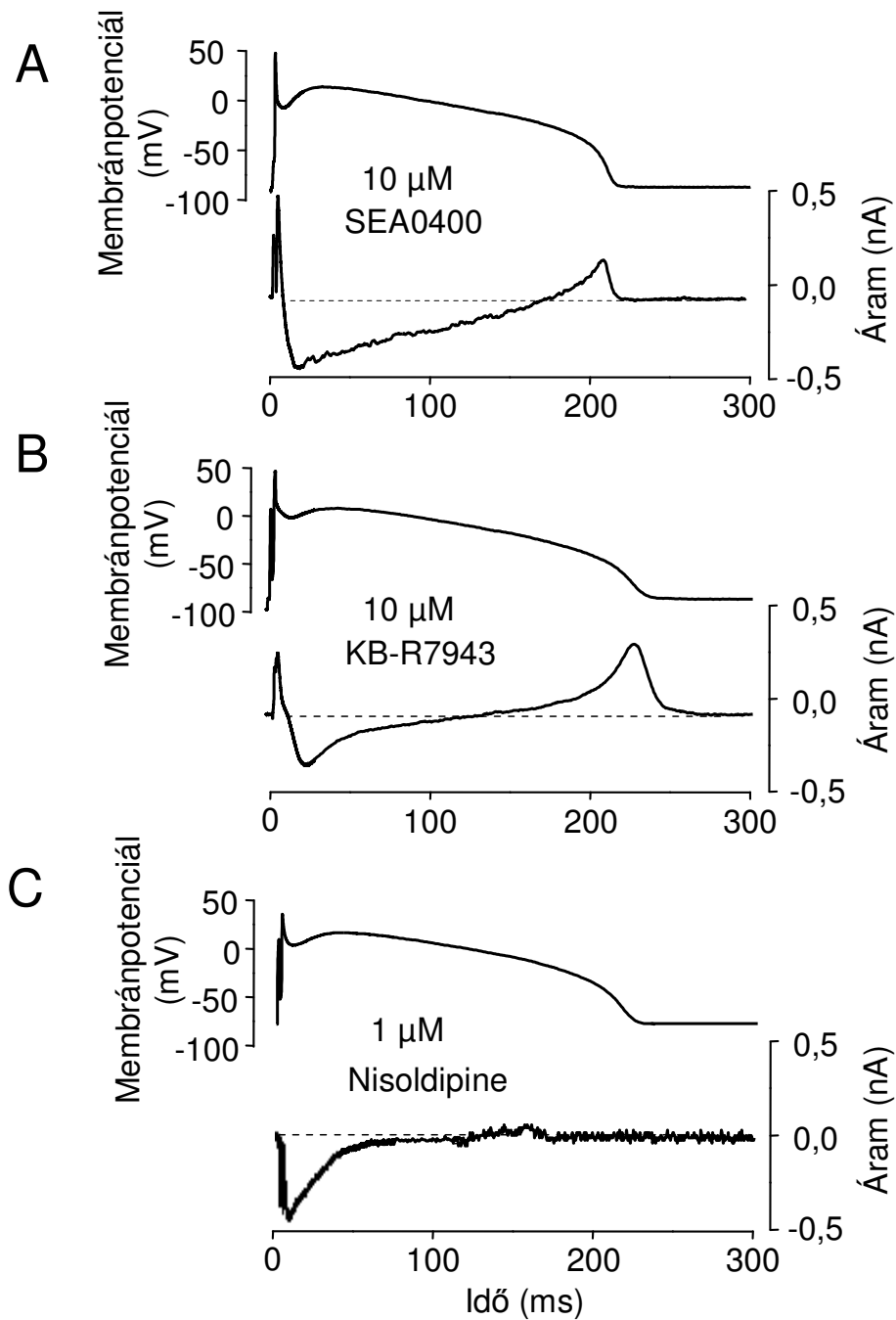


13. ábra

**A SEA0400 és a KB-R7943 hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek L-típusú kalciumáramára**  
**(A)** A két szer hatása látható az  $I_{Ca,L}$  normalizált konduktanciájának feszültségfüggésére, amelyet az  $I_{Ca,L}$  áram-feszültség összefüggésből számítottunk -40 mV és +30 mV közötti tartományban Tyrode-oldatban, 10  $\mu$ M SEA0400-ban (n=6) illetve 10  $\mu$ M KB-R7943-ban (n=7). A membránpotenciál függvényében feltüntetett  $G_{Ca}$  értékeket a +30 mV-nál kapott, maximális értékekre normalizáltuk. **(B)** Az  $I_{Ca,L}$  kettős impulzusprotokollal meghatározott steady-state inaktivációjának feszültségfüggése kontroll körülmények között, illetve 10  $\mu$ M SEA0400 (n=7) és 10  $\mu$ M KB-R7943 (n=8) jelenlétében. **(C)** A SEA0400 (n=5) és a KB-R7943 (n=7) hatása az L-típusú kalciumáram inaktivációból való visszatérésére.

#### IV/9. A SEA0400 és a KB-R7943 hatása kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek nettó membránáramára

Utolsó kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy gátolják-e a SEA0400 valamint a KB-R7943 magas koncentrációi a felszíni membrán többi ionáramát. Ezt legegyszerűbben akciós potenciál clamp körülmények között lehet eldönteni, amikor az egyes ionáramok sajátos "ujjlenyomatait" alapján a gátolt ionáramokat azonosíthatjuk. A 14. ábrán az akciós potenciál alatti nettó membránáram változása látható 10  $\mu\text{M}$  SEA0400 valamint KB-R7943 alkalmazása után. Az áramgörbe kezdeti szakaszán (az akciós potenciál első 30 ms-os tartománya) mindkét szer egy nagy amplitúdójú, gyorsan inaktiválódó, kifelé irányuló áram gátlását okozta, amely a tranziens outward  $\text{K}^+$ -áramnak felel meg. A plató alatt egy szintén nagy amplitúdójú, de lassabban inaktiválódó befelé irányuló áram gátlását figyeltük meg, amelyet  $I_{\text{Ca,L}}$ -ként azonosítottunk (összehasonlításként feltüntettük a nisoldipin-szenzitív áramot, amely tisztán  $I_{\text{Ca,L}}$ -nek felel meg). Végül, a terminális repolarizáció során ismét egy kifelé irányuló áramkomponens gátlását látjuk, amely valószínűleg a késői  $\text{K}^+$ -áram gyors komponensének és a befelé egyenirányító nyugalmi  $\text{K}^+$ -áramnak a keveréke. Méréseink alapján kijelenthetjük, hogy mind a SEA0400, mind pedig a KB-R7943 magas koncentrációi - a  $I_{\text{Ca,L}}$ -on kívül - számos  $\text{K}^+$ -áram gátlását is okozzák, tehát magasabb koncentrációknál egyik szer sem tekinthető szelektív NCX-blokkoló szernek.



14. ábra

**A SEA0400, a KB-R7943 és a Nisoldipine hatása a nettó membránáramra**

Az ábrán AP-clamp technikával készült reprezentatív rekordok láthatóak. Az áramgörbe 0 vonala alatti területen a befelé irányuló áram látható, míg a 0 vonal feletti területen a kifelé irányuló áram látható. Az egyes panelek a vizsgált szerek által gátolt áram időbeli lefutását mutatják az akciós potenciál alatt. Az akciós potenciál első és harmadik fázisában a kifelé-, az akciós potenciál második fázisának elején pedig a befelé irányuló áramot gátolta a SEA0400 és a KB-R7943, míg a Nisoldipine csak az akciós potenciál elején, a befelé irányuló áramot gátolta.

## V. MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a SEA0400 hatását a felszíni membrán ionáramaira valamint az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens és a kontraktilis válasz sajátosságaira abból a célból, hogy meghatározzuk a SEA0400 terápiás hatásainak lehetséges mechanizmusait, továbbá megállapítsuk, hogy mennyire tekinthető a vegyület szelektív NCX-blokkoló szernek. Rövid válaszuk a feltett kérdésre az, hogy szubmikromólos koncentrációknál a SEA0400 egy olyan viszonylag szelektív NCX-gátló molekula, amely speciális tulajdonságai folytán ( $\text{Ca}^{2+}$ -függő, dominánsan reverse mode gátlás) nem vezet a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -mal való túltöltődéséhez. Magasabb koncentrációnál a fokozódó NCX-gátlást jól kompenzálja az  $I_{\text{Ca,L}}$  szintén növekvő gátlása, amely megóvja a sejtet a  $\text{Ca}^{2+}$ -mal való túltöltődéstől. Ily módon válik lehetségessé az NCX-et hatékonyan gátolni anélkül, hogy fokoznánk a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -terhelését.

### V/1. A SEA0400 szelektíven gátolja a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmust?

Munkánk során a SEA0400 NCX-gátló molekula hatását tanulmányoztuk a szívizomsejtek membránáramaira és  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartására kutyából és tengerimalacból származó kardiális preparátumokon. A SEA0400 NCX-gátló hatását már több munkacsoport is vizsgálta, de a szelektivitás kérdése ezidáig nem volt megnyugtatóan tisztázva. Kísérleteink egyik célja éppen a szelektivitás vizsgálata volt egy olyan preparátumon (kutya kamrai szívizomsejtek), amely ionáramainak valamint  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartásának tekintetében meglehetősen hasonlít a humán szívizomra.

3  $\mu\text{M}$  SEA0400 nem módosította a RyR2  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadításáért felelős csatorna vezetőképességét, kinetikai tulajdonságait. Nem befolyásolta a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást, sem a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel sebességét, továbbá nem változtatta meg a miofilamentumok  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a SEA0400 nem befolyásolja közvetlenül az SR  $\text{Ca}^{2+}$ -forgalmát, azaz a szer esetleges  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartásra irányuló hatásai kizárólag a felszíni membránon kell, hogy érvényesüljenek. Ezzel kapcsolatban megállapíthatjuk, hogy alacsony (szubmikromólos) koncentrációknál a SEA0400 csak minimális gátló hatást fejt ki az  $I_{\text{Ca,L}}$ -áramra, miközben az NCX-áramot már jelentős mértékben gátolja. Mikromólos, vagy annál magasabb koncentrációk esetében a molekula  $I_{\text{Ca,L}}$ -áramra irányuló gátló hatásával is fokozott mértékben kell számolnunk, amely azonban terápiás szempontból kifejezetten hasznos lehet.

Érdeemes ebből a szempontból a SEA0400 és a KB-R7943 vegyületeket összehasonlítani. Tengerimalacból izolált kamrai sejteken Tanaka és munkatársai azt találták, hogy leszámítva az  $I_{Ca,L}$ -áramra irányuló kb. 10% gátlást, 1  $\mu$ M SEA0400 nem módosított szignifikánsan egyetlen ionáramot sem az NCX-áramon kívül, míg a KB-R7943 10  $\mu$ M koncentrációban a különböző áramokat jelentős mértékben (60-95%-ban) gátolta. Ugyanakkor az NCX-re irányuló gátló hatás  $EC_{50}$  értéke egy nagyságrenddel alacsonyabb volt a SEA0400 esetében, mint a KB-R7943-nál. Ezzel teljesen egybecsengenek a kutya NCX-áramán és L-típusú kalciumáramán nyert saját adataink, azzal a különbséggel, hogy tengerimalacon a SEA0400 egyforma intenzitással gátolta a befelé, valamint a kifelé irányuló áramokat, míg saját, kutya kamrai sejteken végzett kísérleteinkben dominánsan "reverse mode" gátlást találtunk. Ami a szelektivitási adatok interpretációját illeti, a kutya szívizomsejteken nyert adatok birtokában indokoltnak látjuk valamivel óvatosabban fogalmazni, mint az említett munkacsoport kutatói, akik a SEA0400-at 1  $\mu$ M koncentrációban is szelektív szernek tartották. Az  $I_{Ca,L}$  amplitúdójának 20%-os csökkenése (amelyet kísérleteinkben 1  $\mu$ M SEA0400 jelenlétében találtunk) olyan mértékű kalciumbelépés-csökkenést jelent, amely nem hagyható figyelmen kívül a vegyület hatásmechanizmusának elemzése során. Az egészen magas koncentrációnál (10  $\mu$ M) látott diverz ioncsatornagátló-hatás arra utal, hogy ilyen körülmények között fokozódhat a szer proaritmiás hatásának kockázata. Ennek pontos felmérése további vizsgálatokat igényel.

#### V/2. A SEA0400 hatásmechanizmusa

A SEA0400 nem módosította számottevően a bal kamrai nyomás és a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens amplitúdóját a Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven és nem volt hatása a kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek intracelluláris  $Ca^{2+}$ -tranziensére és a sejtrövidülésre sem. A SEA0400 a vizsgált paraméterek közül egyedül a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens lecsengésének időállandóját növelte meg szignifikánsan (4/D. ábra), amely a molekula hatásának egyetlen - ugyanakkor rendkívül fontos - bizonyítéka. Az NCX-gátlás következtében a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens relaxációjának időállandója megnőtt, mert az NCX mellett működő egyéb  $Ca^{2+}$ -eltávolító transzportrendszerek nem voltak képesek az NCX kiesését megfelelő mértékben kompenzálni.

A kutya és a tengerimalac szíven végzett kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a SEA0400 által kiváltott NCX-gátlás nem okozott intracelluláris kalcium

akkumulációt, mivel sem a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens amplitúdója, sem a bal kamrai nyomás illetve a sejtrövidülés mértéke nem változott meg szignifikánsan SEA0400 jelenlétében. Mindez igen meglepő annak tükrében, hogy ma az irodalom egységesen az NCX-et tartja a sejtől történő  $Ca^{2+}$ -elimináció döntő tényezőjének (Blaustein és Lederer 1999; Bers 2000, Bers 2001). A várható pozitív inotrop hatás elmaradásáért kutya és tengerimalac szívek esetében az alábbi mechanizmusok tehetők felelőssé: 1. A SEA0400 nagyobb affinitással gátolta a „reverse módban” működő NCX-áramot, mint a „forward” irányút, azaz jobb hatásfokkal gátolta a kalciumbelépést, mint a kalciumkilépést az NCX-en keresztül (10/B,C ábra, továbbá Lee és mtsai. 2004). 2. A SEA0400 NCX-gátló hatása nagymértékben függ a sejtplazma szabad  $Ca^{2+}$ -koncentrációjától (10/C. ábra). A sejt fokozódó  $Ca^{2+}$ -terhelésekor az NCX-gátlás csökken, amely lehetővé teszi a szükséges mértékű  $Ca^{2+}$ -eliminációt, ugyanakkor fennmarad a kalciumcsatornára irányuló gátló hatás (lásd a következő pontban). 3. A SEA0400 koncentrációjának emelésével egyre dominánsabbá váló  $I_{Ca,L}$ -gátlás teljes mértékben kompenzálhatja a csökkent  $Ca^{2+}$ -elimináció következményeit. Ebből adódóan kevesebb lesz az intracelluláris térbe belépő  $Ca^{2+}$  mennyisége. A SEA0400 ezen hatásai miatt a kutya és a tengerimalac kamrai szívműködés nem alakul ki intracelluláris kalcium-akkumuláció az NCX-gátlásának ellenére sem.

Ezen eredményeink élesen ellentmondanak a kistestű rágcsálók (patkány és egér) korábban kapott eredményekkel, ahol a SEA0400 növelte a kontrakció mértékét és a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek amplitúdóját (Acsai és mtsai. 2007, Tanaka és mtsai. 2005). Ez azzal magyarázható, hogy a kísérleti állatként gyakran használt kis testű rágcsálók a többiekétől eltérő akciós potenciál paraméterekkel és intracelluláris ionösszetétellel rendelkeznek (Blaustein és Lederer, 1999). Patkányban és egérben az akciós potenciál időtartama sokkal rövidebb (50 ms) és az intracelluláris  $Na^+$ -koncentráció magasabb (15 mM), mint más emlős fajok (tengerimalac, kutya, ember) esetében (Bers, 2001). A tengerimalac, kutya és az ember kamrai akciós potenciáljának időtartama kb. 250 ms és az intracelluláris  $Na^+$ -koncentrációja ezekben a fajokban kb. 8 mM (Bers, 2001). Patkányban és egérben tehát a rövidebb akciós potenciál időtartam és a magasabb intracelluláris  $Na^+$ -koncentráció az NCX „forward mode” működésének kedveznek. Érthető, hogy ilyen körülmények között az NCX-gátlását pozitív inotrop hatás kíséri. Az irodalmi adatok és a méréseink alapján elmondhatjuk tehát, hogy az NCX-gátlása a rövid akciós potenciál időtartammal rendelkező fajok esetében (patkányban és egérben) növeli a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens amplitúdóját és a szívizom kontrakciós erejét, ugyanakkor a

hosszú akciós potenciál időtartammal rendelkező speciestek esetében (beleértve az embert is), az NCX-gátlás hatására nem változik szignifikánsan sem a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranzien nagysága, sem a kontrakciós erő. A fentiek fontos gyakorlati jelentősége egyrészt az lehet, hogy a kistestű rágcsálók explicite alkalmatlanok az NCX-gátló szerek hatásának tanulmányozására, illetve releváns humán következtetések levonására. Másrészt a SEA0400 speciális tulajdonságai révén alkalmas lehet bizonyos kóros állapotok klinikai kezelésére.

### V/3 A SEA0400 alkalmazásának terápiás lehetőségei

A miokardiális iszkémia kialakulása során acidózis lép fel, az intracelluláris  $Na^+$ -koncentráció megemelkedik, amely végül az NCX-en keresztül csökkent  $Ca^{2+}$ -eliminációhoz illetve fokozott  $Ca^{2+}$ -belépéshez vezet. Az iszkémiát túlélő szívműködésben a megemelkedett intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció a korai reperfúzió alatt halmozott aritmiákat okozhat. A  $Ca^{2+}$ -túltöltődés kialakulása és ezáltal az aritmiák létrejötte az NCX szelektív gátlásával megakadályozható (Imahashi és mtsai.,1999; Murphy és mtsai.,1999; Miura és mtsai.,1997; Imanishi és mtsai., 1998). A késői (és egyes esetekben a korai) típusú utódepolarizációk kialakulása döntő mértékben a túltelített SR-ből történő robbanásszerű  $Ca^{2+}$ -felszabadulásnak köszönhető. Ha az intracelluláris térben a  $Ca^{2+}$ -koncentrációja megemelkedik, akkor az NCX a  $Ca^{2+}$ -ot  $Na^+$ -ra cseréli, amely elektrogén folyamat révén depolarizálja a membránt. Tehát az NCX-gátlásával egy fontos proaritmiás mechanizmus iktatható ki anélkül, hogy a  $Ca^{2+}$ -túltöltődés fenyegetésével kellene szembenézni.

A SEA0400 NCX-csatornán kifejtett gátló hatását az intracelluláris  $Na^+$  erősíti és az intracelluláris  $Ca^{2+}$  gyengíti (Lee és mtsai, 2004.; Iwamoto és mtsai, 2007.). Ez megmagyarázza, hogy a SEA0400 miért véd az iszkémia/reperfúzió okozta  $Ca^{2+}$ -túltöltődés ellen. Az iszkémia/reperfúzió fennállásakor az NCX főleg „reverse” módban működik, mert a szívműködésben magas a  $Na^+$ -koncentráció. Mivel a SEA0400 ilyenkor hatékonyan gátolja a dominánsan "reverse" módban működő NCX-et, amelyet nagyon hasznosan kiegészít a szer  $I_{Ca,L}$ -ra irányuló gátló hatása, elmarad a szívműködésben fokozott  $Ca^{2+}$ -terhelése és a következményes reperfúziós aritmiák kialakulása.

Az NCX-áram és az  $I_{Ca,L}$  együttes gátlása csökkenti a szívműködésbe jutó  $Ca^{2+}$  mennyiségét. Ezen új  $Ca^{2+}$  egyensúlyi állapotnak köszönhetően a szívműködésbe kevesebb  $Ca^{2+}$  jut be, így a kisebb mennyiségű  $Ca^{2+}$  eltávolításához kevesebb ATP

felhasználásra van szükség. A SEA0400 ezen hatása különösen kedvező lehet iszkémiás/reperfúziós epizódok után, amikor a szívizomsejtekben ATP depléció alakul ki. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a SEA0400 egy ígéretes NCX-blokkoló szer, amelynek főleg az iszkémia/reperfúzióval együttjáró kóros állapotok kezelésében lehet szerepe.

## VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A nátrium-kalcium cseremechanizmus (NCX) központi szerepet játszik a szívizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisában, a  $\text{Ca}^{2+}$ -elimináció legfontosabb celluláris mechanizmusa. Patológias körülmények között szerepet játszik életveszélyes szívritmuszavarok kialakulásában. Az NCX szelektív gátlásával ezen aritmiák kialakulása megelőzhető. Az irodalomban eddig sokféle NCX-gátlót leírtak, de szinte valamennyiről bebizonyosodott, hogy megfelelő szelektivitás hiányában terápiás felhasználásra csak korlátozott mértékben lehetnek alkalmasak. A közelmúltban szintetizált SEA0400 kódjelű új NCX-gátló molekulát az irodalmi adatok szerint szelektívnek és terápiásan ígéretesnek tartják.

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a SEA0400 hatását a felszíni membrán ionáramaira valamint az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienst és a kontraktilis válasz sajátosságaira abból a célból, hogy meghatározzuk a SEA0400 terápiás hatásainak lehetséges mechanizmusait, továbbá megállapítsuk, hogy mennyire tekinthető a vegyület szelektív NCX-blokkoló szernek. Kísérleteinkhez olyan preparátumokat választottunk (kutyából izolált kamrai szívizomsejtek és tengerimalac dobogó szíve), amelyek elektrofiziológiai sajátosságai nagymértékben hasonlítanak a humán kamrai szívizoméhoz. Vizsgálatainkat elektrofiziológiai (patch-clamp) és optikai (fluorimetria) módszerekkel végeztük. Megállapítottuk, hogy:

1. Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven és kutya bal kamrájából származó szívizomsejteken a SEA0400 nem befolyásolta sem a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranzienst amplitúdóját, sem a bal kamrai nyomást, illetve a sejtrövidülést.
2. A SEA0400 nem befolyásolta sem a HSR vezikulákból történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást, sem az LSR vezikulákba történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételt, sem a RyR2 receptorok kapuzási sajátosságait, sem a szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenységét.
3. A SEA0400 kutya bal kamrájából származó szívizomsejteken koncentráció-függő

módon gátolta mind a befelé irányuló, mind pedig a kifelé irányuló NCX-áramot. A SEA0400 erősebb gátló hatást fejtett ki a kifelé irányuló, mint a befelé irányuló NCX-áramra, hatását csökkentette az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció emelkedése.

4. A SEA0400 koncentráció-függő módon gátolta az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot is, de egy nagyságrenddel magasabb félhatásos koncentrációban, mint az NCX-áramot.

Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy szubmikromólos koncentrációban alkalmazva a SEA0400 egy olyan viszonylag szelektív NCX-gátló molekula, amely speciális tulajdonságainak köszönhetően ( $\text{Ca}^{2+}$ -függő, dominánsan reverse mode gátlás) nem vezet a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -mal való túltöltődéséhez. Magasabb koncentrációnál a fokozódó NCX-gátlást jól kompenzálja az  $I_{\text{Ca,L}}$  szintén növekvő gátlása, amely megóvja a sejtet a  $\text{Ca}^{2+}$ -mal való túltöltődéstől. Ily módon válik lehetségessé az NCX-et hatékonyan blokkolni anélkül, hogy fokoznánk a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -terhelését. A SEA0400-nak fenti tulajdonságai alapján várhatóan az iszkémia/reperfúzióval együttjáró kóros állapotok kezelésében lehet szerepe.

## VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

Köszönettel tartozom Dr. Bányász Tamásnak, Dr. Horváth Balázsnak, Dr. Szabó Gergelynek és Dr. Szentandrassy Norbertnek bátorításért és hasznos tanácsokért és Dr. Víghné Horváth Katalinnak a technikai segítségért.

Köszönettel tartozom továbbá mindazoknak, akik hozzájárultak az értekezésben bemutatott anyagok elkészítéséhez, névszerint Dr. Acsai Károlynak, Almássy Jánosnak, Dr. Fülöp Ferencnek, Dr. Hertelendi Zitának Dr. Jóna Istvánnak, Dr. Nagy Norbertnek, Dr. Papp Zoltánnak, Dr. Prorok Jánosnak, Dr. Szigeti Gyulának, Dr. Tóth Andrásnak, Dr. Varró Andrásnak, és Dr. Virág Lászlónak.

## VIII. IRODALOMJEGYZÉK

**Acsai K, Kun A, Farkas AS, Fülöp F, Nagy N, Balázs M et al.** Effect of partial blockade of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger by SEA0400 on  $\text{Ca}^{2+}$  handling in isolated rat ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*, 576:1-6, 2007.

**Bers DM.** Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res*, 87: 275-281, 2000.

**Bers DM.** Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001.

**Blaustein MP, Lederer WJ** Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*, 79:763-854, 1999.

**Bouchard R, Omelchenko A, Le HD, Choptiany P, Matsuda T, Baba A, Takahashi K, Nicoll DA, Philipson KD, Hnatowich M, Hryshko LV.** Effects of SEA0400 on mutant NCX1.1  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers with altered ionic regulation. *Mol Pharmacol*, 65:802-810, 2004.

**Bouwman RA, Salic K, Padding FG, Eringa EC, van Beek-Harmsen BJ, Matsuda T, Baba A, Musters RJ, Paulus WJ, de Lange JJ, Boer C.** Cardioprotection via activation of protein kinase C-delta depends on modulation of the reverse mode of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Circulation*, 114, 1226-1232, 2006.

**Brown L, Cragoe EJ, Abel KC, Manley SW, Bourke JR.** Amiloride analogues induce responses in isolated rat cardiovascular tissues by inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 344, 220-224, 1991.

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

**De Clerck, N.M.** Increased force levels after shortening and restretching skinned cardiac muscle. *J Muscl Res Cell Motil* 12, 192-200. 1991.

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

**Fabiato A, Fabiato F.** Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Paris)*, 75:463-505, 1979.

**Fabiato, A.** Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-C14. 1983.

**Fozzard, H. A.** Afterdepolarizations and triggered activity. *Basic. Res. Cardiol.* 87 Suppl 2: 105-113, 1992.

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

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

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

**Hinde AK, Perchenet L, Hobai IA, Levi AJ, Hancox JC.** Inhibition of Na/Ca exchange by external Ni in guinea-pig ventricular myocytes at 37 degrees C, dialysed internally with cAMP-free and cAMP-containing solutions. *Cell Calcium*, 25, 321-331, 1999.

**Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K, Yoshioka J, Yamaguchi H, Nishimura T.** Intracellular  $Na^{+}$  accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circ Res*, 84, 1401-1406, 1999.

**Imanishi, K.,** Kusuoka, H., Hashimoto, K., Yoshioka, J., Yamaguchi, H., Nishimura, T., Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circ. Res.* 84, 1401-1406. 1998.

**Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabes JA, Pina P, Agullo L, Piper HM, Soler-Soler J.** Effect of inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res*, 55, 739-748, 2002.

**Iwamoto T, Watanabe Y, Kita S, Blaustein MP.** Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitors: a new class of calcium regulators. *J Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*; 7: 188-198, 2007.

**Iwamoto T.** Forefront of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger studies: molecular pharmacology of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitors. *J Pharmacol Sci*, 96, 27-32, 2004.

**Janvier, N. C. and M. R. Boyett.** The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Cardiovasc. Res.* 32: 69-84, 1996.

**Jorgensen A.O.,** Broderick R., Somlyo A.P. Somlyo A.V. Two structural distinct calcium storage sites in rat cardiac sarcoplasmic reticulum: an electron microprobe analysis study. *Circ Res* 63, 1060-1069. 1988.

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

**Lee C, Visen NS, Dhalla NS, Le HD, Isaac M, Choptiany P, Gross G, Omelchenko A, Matsuda T, Baba A, Takahashi K, Hnatowich M, Hryshko LV** Inhibitory profile of SEA0400 [2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline] assessed on the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX1.1. *J Pharmacol Exp Ther* 311:748-757, 2004.

**Magee WP, Deshmukh G, Deninno MP, Sutt JC, Chapman JG, Tracey WR.** Differing cardioprotective efficacy of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitors SEA0400 and KBR7943. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H903-H910, 2003.

**Magyar J, Bányász T, Szigligeti P, Körtvély Á, Jenákovits A, Nánási PP** Electrophysiological effects of bimoclomol in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361: 303-310, 2000.

**Matsuda T, Koyama Y, Baba A.** Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> for drug development: pharmacology of SEA0400 0400, a specific inhibitor of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Pharmacol Sci*, 97, 339-343, 2004.

**Matsuda, T., Arakawa, N., Takuma, K.** SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 298, 249-256, 2001.

**Miura, T.,** Ogawa, T., Suzuki, K., Goto, M., Shimamoto, K., Infarct size limitation by a new Na<sup>+</sup> - H<sup>+</sup> exchange inhibitor, Hoe 642: difference from preconditioning in the role of protein kinase C. *J. Am. Coll. Cardiol.* 29, 693-701. 1997.

**Motegi K, Tanonaka K, Takenaga Y, Takagi N, Takeo S.** Preservation of mitochondrial function may contribute to cardioprotective effects of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitors in ischaemic/reperfused rat hearts. *Br J Pharmacol*, Jun 4 [Epub ahead of print] 2007.

**Murphy E, Cross H, Steenbergen C.** Sodium regulation during ischemia versus reperfusion and its role in injury. *Circ Res*, 84, 1469-1470, 1999.

**Nagasawa Y, Zhu BM, Chen J, Kamiya K, Miyamoto S, Hashimoto K.** Effects of SEA0400, a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in the in vivo dogs. *Eur J Pharmacol*, 506, 249-255, 2005.

**Noma, A., T. Shioya, L. F. Paver, V. W. Twist, and T. Powell.** Cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  during operation of sodium-calcium exchange in guinea-pig heart cells. *J. Physiol. Lond.* 442: 257-276, 1991.

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

**Reuter H, Seitz N.** The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol*, 195, 451-470, 1968.

**Seki S, Taniguchi M, Takeda H, Nagai M, Taniguchi I, Mochizuki S.** Inhibition by KB-r7943 of the reverse mode of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger reduces  $\text{Ca}^{2+}$  overload in ischemic-reperfused rat hearts. *Circ J*, 66, 390-396, 2002.

**Shigeki Miyamoto, Bing-Mei Zhu, Kazunori Kamiya.** KB-R7943, a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange inhibitor, Does Not Suppress Ischemia/ Reperfusion Arrhythmias nor Digitalis Arrhythmias in Dogs. *Jpn. J. Pharmacol.* 90, 229-235, 2002.

**Sipido K.R.** and Wier, W.G. Flux of  $\text{Ca}^{2+}$  across the sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells during excitation-contraction coupling. *J Physiol* 435, 605-630. 1991.

**Szabó G,** Szentandrassy N, Bíró T, Tóth IB, Czifra G, Magyar J et al. Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflügers Arch*;450:307-316. 2005.

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

**Szentandrassy N,** Bányász T, Bíró T, Szabó G, Tóth IB, Magyar J et al. Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*;65:851-860. 2005.

**Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Onishi M, Tanaka Y, Hamano-Takahashi A, Ota T, Kameo K, Matsuda T, Baba A.** Protective effects of SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, on myocardial ischemia-reperfusion injuries. *Eur J Pharmacol*, 458, 155-162, 2003.

**Takahashi T, Takahashi K, Onishi M, Suzuki T, Tanaka Y, Ota T, Yoshida S, Nakaike S, Matsuda T, Baba A.** Effects of SEA0400, a novel inhibitor of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, on myocardial stunning in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol*, 505, 163-168, 2004.

**Takahiro Iwamoto, Yutaka Inoue, Kazuhiko Ito.** The Exchanger Inhibitory Peptide Region-Dependent Inhibition of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange by SN-6 [2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester], a Novel Benzyloxyphenyl Derivative. *Mol. Pharmacol.* 66: 45-55, 2004

**Tanaka H, Namekata I, Takeda K, Kazama A, Shimizu Y, Moriwaki R et al.** Unique excitation-contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Naunyn-Sch. Arch Pharmacol*; 371: 526-534, 2005.

**Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K** Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br J Pharmacol* 135: 1096-1100, 2002.

**Tani, M.** Mechanism of overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu. Rev. Physiol.*, 52, 543-559, 1990.

**Watanabe Y, Koide Y, Kimura J.** Topics on the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: pharmacological characterization of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitors. *J Pharmacol Sci*, 102, 7-16, 2006.

**William P. Magee, Gayatri Deshmukh, Michael P. Deninno.** Differing cardioprotective efficacy of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.* 284: H903-H910, 2003.

## IX. A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK

**Birinyi P**, Acsai K, Bányász T, Tóth A, Horváth B, Virág L, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Ferenc Fülöp, Nánási PP.: Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current and L-type Ca<sup>2+</sup> current in canine ventricular cardiomyocytes. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2005;372:63-70 [IF=2.098]

**Birinyi P**, Tóth A, Jóna I, Acsai K, Almássy J, Nagy N, Prorok J, Gherasim I, Papp Z, Hertelendi Z, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp F, Papp JGy, Varró A, Nánási PP, Magyar J: The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes. Cardiovasc Res 2008; Közlésre elfogadva [IF=5.826]

Szentandrassy N, **Birinyi P**, Szigeti Gy, Magyar J, Tóth A, Csernoch L, Varró A, Nánási PP: SEA0400 fails to alter the magnitude of intracellular Ca<sup>2+</sup> transients and contractions in Langendorff-perfused guinea pig heart. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2008; Közlésre elfogadva [IF=2.098]