

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A CBA és az ABT-333 emlős kamrai akciós
potenciálra és az azt kialakító ionáramokra kifejtett
hatásai**

Dr. Dienes Csaba Bálint

Témavezető: Dr. Szentandrassy Norbert



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

**A CBA és az ABT-333 emlős kamrai akciós potenciálra
és az azt kialakító ionáramokra kifejtett hatásai**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Dienes Csaba Bálint okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
Élettan és Neurobiológia programja keretében

Témavezető: Dr. Szentandrassy Nortbert, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Farkas András, PhD

Dr. Hajdu Péter Béla, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

tagok: Dr. Farkas András, PhD

Dr. Hajdu Péter Béla, PhD

Dr. Czirják Gábor, az MTA doktora

Prof. Dr. Juhász Béla, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület
2024. április 11. 13:00

1. Bevezetés

A TRPM4 a tranziens receptor potenciál csatornacsalád melasztatin alcsaládjának tagja. Expresszióját több humán szervben is kimutatták már. Részt vesz többek közt a membránpotenciál és a Ca^{2+} homeosztázis szabályozásában ingerlékeny, valamint nem ingerlékeny szövetek sejtjeiben egyaránt. Szereppel bír az inzulinszekrécióban, az immunválaszban, daganatok kialakulásában és az agyi érszűkületben is.

A TRPM4-csatornák a szívben mind a munkaizomrostokban, mind pedig az ingerületvezető rendszerben kimutathatók, mutációjuk ingerületvezetési zavarokat okozhat, továbbá feltételezik, hogy a TRPM4 részt vesz a szívizom hipertrófia, valamint ischaemia-reperfúziós sérülés kialakulásában.

Eddig a TRPM4 fiziológiai és patofiziológiai funkcióit vagy knock-out állatmodelleken vagy farmakológiai megközelítéssel vizsgálták a csatorna gátlószereivel, beleértve a 9-phenanthrolt, a glibenklamidot vagy a flufenaminsavat. Sajnos ezeknek a vegyületeknek egyike sem elég szelektív. A csatorna funkcionális vizsgálataihoz azonban szelektív vegyületre lenne szükség, vagy legalábbis a rendelkezésre álló TRPM4-re ható anyagok megfelelő kiegészítő farmakonokkal való kombinációs alkalmazására, ez utóbbi módszer viszont nagy körültekintést igényel.

Munkámban egy célzottan a TRPM4-csatorna gátlására kifejlesztett szer, a CBA bal kamrai kutya szívizom sejtekre gyakorolt hatásait mutatom be. A CBA potenciálisan szelektívnek vélt TRPM4 gátlószer, azonban mielőtt a TRPM4 funkcionális szerepének vizsgálatára használhatnánk szelektivitási vizsgálatokat végeztünk, hogy lássuk, befolyásol-e a CBA a kamrai szívizom akciós potenciált (AP) kialakító bármilyen áramot, illetve hogy a CBA hogyan befolyásolja az AP morfológiáját. Továbbá kollaborációs munka kereteiben megvizsgáltuk a TRPM4 csatornaexpresszióját is, melynek eredményeit szintén bemutatom.

A késői egyenirányító káliumáram a kamrai izomsejtek repolarizációjában elsődleges szerepet játszik. Kamrai munkaizomsejteken két komponensét írták le: a gyors komponens (I_{Kr}) az AP 3. fázis repolarizációjának kialakításáért, míg a lassú komponens (I_{Ks}) az ún. repolarizációs tartalék kialakításáért felel. Ez utóbbi azt jelenti, hogy az áram nem vesz részt a normális repolarizáció biztosításában, viszont az AP megnyúlt állapotában az áram fokozódik és

repolarizálja a szívizomsejteket. A csökkent I_{Kr} áram hosszú QT-szindrómához és korai utódepolarizációhoz (EAD) vezet, ezért potenciálisan életveszélyes ritmuszavarokat és hirtelen szívhalált okozhat.

Az I_{Kr} több szelektív gátlószere is ismert, mint például a dofetilid vagy az E-4031. Ezen két vegyület közös tulajdonsága, hogy kémiai szerkezetükben metánszulfonamid csoportot tartalmaznak, továbbá jelentősen megnövelik a kamrai AP időtartamát.

Az ABT-333 (dasabuvir) egy vírusellenes szer, amelyet a hepatitis C kezelésében alkalmaznak. A molekula, hasonlóan az I_{Kr} kialakításáért felelős hERG- csatornák egyes gátlószereihez (dofetilid és E-4031), metánszulfonamid csoportot tartalmaz. Ezen hasonlóság alapján az ABT-333 is potenciálisan I_{Kr} gátló hatással bír, azonban a vegyület kamrai szívizomzatra gyakorolt hatásai még nem ismertek. Munkámban az ABT-333 kutya kamrai szívizomsejtek AP morfológiára gyakorolt hatásait és az annak hátterében álló ionáramokra kifejtett hatásokat mutatom be. Kollaborációs partnereinknek köszönhetően megvalósult az ABT-333 hERG csatornákra gyakorolt hatásainak vizsgálata expresszált sejteken is, melyből származó eredmények szintén bemutatásra kerülnek.

2. Célkitűzések

Tekintettel a TRPM4 szívben korábban ismertetett szerepére kutatásaink során az alábbi vizsgálatok elvégzését tűztük ki célul:

- először is a TRPM4 fehérje expresszióját szeretnénk volna bizonyítani.

Célul tűztük ki egy, a közelmúltban kifejezetten a TRPM4-csatorna gátlására kifejlesztett vegyület, a CBA hatásának vizsgálatát a következőkre:

- az akciós potenciál morfológiájára
- a repolarizáció rövid távú variabilitására

Ahhoz, hogy a TRPM4-áram vizsgálható legyen ezzel a vegyülettel, először ki kell zárni a szer más ionáramokra gyakorolt hatását, így

- egyrészt célul tűztük ki a CBA-érzékeny áram felderítését akciós potenciál feszültség-zár (APVC) technikával,
- továbbá vizsgálni kívántuk a CBA hatását a repolarizáció ionáramaira.

Az ABT-333 kémiai szerkezetéből adódóan potenciálisan gátolja az egyik fő repolarizáló áramot (I_{Kr}), azonban a szer kamrai AP-ra gyakorolt hatása még nem ismert. Célunk volt tehát megvizsgálni:

- 1 μ M ABT-333 hatását a kutyaszív bal kamrai akciós potenciálra
- az ABT-333 koncentrációfüggő hatásait az AP különböző paramétereire
- az ABT-333-érzékeny áramprofilt APVC technikával
- végül, de nem utolsósorban az ABT-333 hatását expresszált hERG-csatornákon.

Természetesen kísérleti céllal egészséges humán szívből származó sejtekhez jutni nem egyszerű, ezért kísérleteinkhez a bal kamrai szívmusclesejteket kutyák szívéből izoláljuk, amely elektrofiziológiai szempontból a humán szívmusclesejtek egyik legjobb modellje.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kifejezetten kísérleti célra tenyésztett, vegyes nemű és fajtájú, 1-3 év körüli, ivarérett kutyák szívének bal kamrájából enzimatikusan izolált szívizomsejtjein végeztük. A szívizomsejtek izolálásához az anterográd szegmentperfúziós technikát alkalmaztuk. Az alkalmazott protokollunk összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publikációs száma: 85-23., 1996. évben átdolgozott verzió) és a Helsinki Deklaráció 1964-ben lefektetett alapelveivel. A kísérleti protokollt jóváhagyta a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is (engedély száma: 9/2015/DEMÁB).

3.2. A szívizomsejtek akciós potenciáljának elvezetése

Az AP-kat egy elektronikus stimulátorral, az ingerküszöb 120-130%-ának megfelelő nagyságú áramimpulzusokkal váltottuk ki és konvencionális mikroelektrod technikával mértük. Az AP-ket digitalizáltuk, kiértékelésük során tíz egymást követő AP-ból a következő paramétereket határoztuk meg, majd átlagoltuk: APD_{50} , APD_{75} és APD_{90} értékek (az AP időtartama a csúcstól a repolarizáció 50, 75 és 90%-áig), a 0., 1. és 3. fázis maximális sebessége (V_{max}^+ , V_{Ph1max} és a V_{max}^-), nyugalmi membránpotenciál (RMP), túllövési potenciál (OSP), APA (akciós potenciál amplitúdó, amelyet az OSP és az RMP különbségeként határoztunk meg), $Plat_{20}$ és $Plat_{50}$ amplitúdó (a nyugalmi membránpotenciál és a 90%-os repolarizációig eltelt idő 20, illetve 50%-ánál mért membránpotenciál értékek közti különbség) valamint a membránpotenciál értéke az APD_{90} érték 50%-ánál ($Plat_{50}$).

3.3. Az akciós potenciál repolarizáció variabilitásának elemzése

50 egymást követő akciós potenciálból álló sorozatot rögzítettünk és offline elemeztük a repolarizáció rövid távú variabilitásának (SV) az alábbi képlettel való meghatározása céljából:

$$SV = \frac{\sum_{n=1}^i (|APD_{n+1} - APD_n|)}{i\sqrt{2}}$$

ahol SV a rövid távú variabilitás, APD_n és APD_{n+1} az n-edik és n+1-edik AP APD_{90} értékét jelöli, i pedig az elemzett egymást követő AP-k számát jelöli. Mivel az SV értéke erősen függ az

APD₉₀ értékétől, az SV legjobban az APD függvényében ítélték meg. A repolarizációs variabilitás további elemzéséhez az egymást követő APD₉₀ értékek közötti különbségeket tartományokba csoportosítottuk (20 ms alatt 1 ms-os tartományokba, 20 ms felett pedig 5 ms-os tartományokba) és minden egyes sejtben kiszámítottuk a megjelenésük valószínűségét.

3.4. Feszültség-zár vizsgálatok

A membránáramok rögzítése patch-clamp technikával történt teljes-sejtes konfigurációban. Kísérleteinket hagyományos feszültség-zár és akciós potenciál feszültség-zár (APVC) technikával végeztük. Hagyományos feszültség-zár kísérletek során a vizsgálni kívánt ioncsatornát négyszögimpulzusokkal ingereltük miközben a többi ionáramot gátoltuk. Az akciós potenciál feszültség-zár kísérletek során a sejteket négyszögimpulzusok helyett egy úgynevezett "kanonikus" AP-val ingereltük, mely egy midmiokardiális sejten korábban rögzített, átlagos alakú AP. Az így módon ingerelt sejteken az AP alatt folyó összes, az adott vegyület által befolyásolt ionáram együtt vizsgálható. A CBA- vagy ABT-333-érzékeny áramot farmakológiai kivonással kaptuk: az 5 perces 10 μ M CBA vagy 15 perces 10 μ M ABT-333 perfúzió végén rögzített áramjeleket kivontuk a kontrollban (fiziológiás Tyrode-oldatban) mért jelekből. A sejteket CBA-t követően 5 percig, ABT-333 esetén 20 percig ismét fiziológiás Tyrode-oldattal perfundáltuk (kimosás).

3.5. A hERG-áramok rögzítése

A hERG-csatornákat stabilan expresszáló HEK sejteken teljes áramot rögzítettünk hagyományos feszültség-zár technikával. Az 1, 3, 10 és 30 μ M ABT-333 hERG csatornák kapuzására (aktiváció, inaktiváció, deaktiváció) kifejtett hatását megfelelő négyszögimpulzusokkal szobahőmérsékleten (20-24°C) tanulmányoztuk.

3.6. Fehérjeminta előkészítése és Western Blot analízis

A Western blot kísérletekhez a teljes sejtizátumokat kutyák bal kamrai szívmusclesejtjeiből és szív szövetmintákból mechanikai módszerekkel állítottunk elő. A fehérjekoncentrációt BCA (Bicinchoninic acid) fehérje-tesztel határoztuk meg, majd a mintákat SDS-PAGE-nek (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis) vetettük alá és

nitrocellulóz membránokra vittük át. A membránokat PBS (Phosphate Buffered Saline) alapú 5 %-os, nem-zsíros tejport tartalmazó oldattal blokkoltuk, majd anti-TRPM4 és anti- α -aktinin primer antitestekkel inkubáltuk, amelyet HRP-konjugált szekunder antitest jelölés követett. A TRPM4-specifikus kemilumineszcenciával meghatározott sávok háttérre korrigált optikai sűrűségét ImageJ programmal végzett denzitometriával határoztuk meg és a minták α -aktinin specifikus sávjának optikai denzitására normalizáltuk.

3.7. Statisztikai analízis

Minden érték számtani átlagként $\pm$ az átlag standard hibájaként (SEM) szerepel. Tekintettel a sejtek közötti biológiai változékonyságra, a statisztikai vizsgálatokban minden egyes sejtet függetlenként kezeltünk, bár ugyanabból az állatból több sejtet is nyerhettünk. A különbségek statisztikai szignifikanciáját JASP programban (verzió: 0.16.3.0) eloszlás és szóráshomogenitás vizsgálatát követően egyirányú ANOVA, majd Student féle t-próba segítségével értékeltük. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. A TRPM4 fehérje expressziója

A fehérjeexpressziós vizsgálatokhoz öt állatból gyűjtöttünk szövetmintákat és izolált bal kamrai sejteket. A fehérjék elektroforézissel történő szétválasztását és az azt követő megfelelő antitestekkel történő jelölést minden mintánál legalább kétszer végeztük el. A TRPM4 a szív mind a 4 üregének falában, valamint izolált bal kamrai sejtjeiben is kimutatható volt. A TRPM4 expresszió α -aktinin expressziójára normalizált értékei $0,47 \pm 0,08$; $0,59 \pm 0,05$; $0,49 \pm 0,10$; $0,62 \pm 0,09$ és $0,51 \pm 0,09$ voltak sorrendben a jobb pitvarból, bal pitvarból, jobb kamrából, bal kamrából és izolált bal kamrai sejtekből származó minták esetében, melyek között nem volt szignifikáns különbség.

4.2. A CBA hatása az akciós potenciál morfológiájára

Az AP-eket 3 M KCl-dal töltött hegyes mikroelektrodákkal rögzítettük, amely technika a legközelebb áll a fiziológias helyzethez (változatlan intracelluláris tér nem pufferelt Ca^{2+} koncentrációval). Hat állatból izolált nyolc sejtet 5 percig 10 μM CBA-val perfundáltuk, majd a kísérlet végén 5 perces kimosási periódust alkalmaztunk. A CBA nem befolyásolta a RMP, a OSP, Plató_{50} és $V_{\max}$ értékeit. A CBA jelenlétében az AP időtartamának rövidülésére minden vizsgált repolarizációs szinten mutatkozott tendencia. Az APD_{50} , APD_{75} és APD_{90} értékei az alábbiak szerint csökkentek CBA jelenlétében: APD_{50} : $214,7 \pm 22,3$ ms versus $191,9 \pm 18,2$ ms ($p = 0,09$); APD_{75} : $254,2 \pm 21,2$ ms versus $229,0 \pm 17,4$ ms ($p = 0,07$); APD_{90} : $266,8 \pm 21,0$ ms versus $241,1 \pm 17,0$ ms ($p = 0,07$). Az APD_{75} és az APD_{90} esetében a kontrollra való normalizálás után az APD_{75} $91,0 \pm 3,6\%$ -ra, az APD_{90} pedig $91,3 \pm 3,4\%$ -ra csökkent a CBA jelenlétében, mely mindkét esetben szignifikáns volt. A CBA szignifikánsan csökkentette a $V_{\max}^+$ értékét ($133,2 \pm 12,9$ V/s versus $113,1 \pm 13,6$ V/s) és a V_{Ph1max} értékét ($-5,1 \pm 1,2$ V/s versus $-3,9 \pm 1,0$ V/s); az APA értéke azonban szignifikáns mértékben nőtt ($114,7 \pm 1,8$ mV versus $117,6 \pm 1,4$ mV).

Kimosáskor a CBA szinte minden fent említett hatása reverzibilis volt, az egyetlen kivétel a $V_{\max}^+$, ami $114,9 \pm 10,4$ V/s maradt a kimosás után.

4.3. A CBA hatása a repolarizáció rövid távú variabilitására

Az APD_{90} rövid távú variabilitása (SV) és a relatív SV a módszereknél bemutatott képlet

segítségével került meghatározásra nyolc vizsgált sejten. Az SV értéke szignifikánsan kisebb, mintegy 27%-kal alacsonyabb volt a CBA-ban a kontroll körülményekhez képest ($4,8 \pm 0,9$ ms versus $3,2 \pm 0,4$ ms). Ez a csökkenés reverzibilis volt (SV a kimosás után: $4,2 \pm 0,9$ ms). Az egymást követő APD₉₀ értékek különbségeinek szórását bemutató kumulatív eloszlási görbe a CBA jelenlétében reverzibilis módon eltolódott a kisebb APD különbségek felé.

4.4. Az APVC technikával mért CBA-érzékeny áram

Ezt követően meg akartunk bizonyosodni arról, hogy a CBA szelektív a TRPM4-re, vagyis a megfigyelt hatások nem a TRPM4-től eltérő ionáramok CBA általi befolyásolása miatt jöttek létre. Ezért teljes-sejtes patch clamp méréseket végeztünk 10 mM BAPTA-t tartalmazó belső oldattal. A BAPTA puffereli az intracelluláris Ca^{2+} tartalmat és így megakadályozható a TRPM4-csatornák aktiválódása. Kísérleteinkben a CBA alkalmazását csak akkor kezdtük meg, ha meggyőződünk a BAPTA alkalmazásra jellemző AP nyúlásról.

A CBA-érzékeny áramokat (I_{CBA}) három állatból izolált öt egyedi sejten mértük. Az I_{CBA} rövid kifelé irányuló komponenssel rendelkezett az AP korai repolarizációs fázisában, és egy sokkal hosszabb befelé irányuló komponenssel az AP további részében. A kifelé illetve a befelé folyó áramcsúcsok denzitása $1,38 \pm 0,32$ és $-0,53 \pm 0,06$ pA/pF volt. Előbbi $2,33 \pm 0,48$ ms-mal utóbbi $11,73 \pm 0,67$ ms-mal követte az AP csúcscsúcsértékét. A CBA hatása reverzibilis volt, az I_{CBA} csúcsáram denzitás értékek kimosás után szignifikánsan kisebbek voltak: $0,16 \pm 0,06$ és $-0,25 \pm 0,07$ pA/pF. A reverzibilitást a CBA legtöbb, hagyományos mikroelektrodákkal rögzített AP paraméter kapcsán is tapasztaltuk (lásd fent).

4.5. A CBA hatása a repolarizáció ionáramaira

Az APVC-kísérletek eredményei azt sugallták, hogy a CBA a TRPM4-en kívül más ioncsatornákat is befolyásol. A CBA-érzékeny áramprofil alapján a CBA által kiváltott gátlás lehetséges célpontjai a tranziens kifelé irányuló K^+ áram (I_{to}) és az L-típusú Ca^{2+} áram ($I_{\text{Ca,L}}$). Ezért ezeket az ionáramokat hagyományos feszültség-zár technikával külön-külön is megvizsgáltuk. Az APVC kísérleteinkhez hasonlóan BAPTA-tartalmú belső oldatot használtunk a TRPM4-csatornák aktiválódásának megakadályozására.

Az I_{to} áramokat $I_{\text{Ca,L}}$ és I_{Kr} gátlás ($1 \mu\text{M}$ nisoldipin és $1 \mu\text{M}$ E4031) jelenlétében, -80 mV-

os tartópotenciálról indított 200 ms hosszúságú, +60 mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk 0,2 Hz-es ingerlési frekvencia mellett. A depolarizáció előtt 5 ms-ig -40 mV-ra történő előimpulzust alkalmaztunk a gyors Na^+ áram aktiválása, majd inaktiválása érdekében. Az I_{to} amplitúdót az áramcsúcs és a fenntartott komponens közötti különbséggént mértük. A CBA $20,4 \pm 6,2\%$ -kal csökkentette az I_{to} amplitúdót ($16,0 \pm 1,8$ pA/pF áramsűrűségről $12,5 \pm 1,4$ pA/pF-re) az öt állatból izolált hét vizsgált sejten. Ez a gátló hatás teljesen reverzibilis volt (kimosás utáni áramsűrűség: $15,9 \pm 2,0$ pA/pF).

Az $I_{\text{Ca,L}}$ mérések során a külső Tyrode-oldat $1 \mu\text{M}$ E4031-et, $1 \mu\text{M}$ HMR1556-ot és 3 mM 4-AP-t tartalmazott az I_{Kr} , az I_{Ks} és az I_{to} blokkolására. Az $I_{\text{Ca,L}}$ aktiválását 400 ms hosszúságú, $+5 \text{ mV}$ -ra történő depolarizációval értük el, amely a -80 mV -os tartópotenciálról $0,2 \text{ Hz}$ -es ingerlési frekvencia mellett. Ezen mérésekben is egy előimpulzussal aktiváltuk, majd inaktiváltuk a gyors Na^+ áramot. Az $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdót az áramcsúcs és a fenntartott komponens közötti különbséggént mértük. A CBA nem volt hatással a sejtkapacitásra normalizált áramamplitúdóra (kontrollban $-9,4 \pm 0,6$ pA/pF, CBA jelenlétében pedig $-9,3 \pm 0,8$ pA/pF) a négy állatból nyert nyolc sejten mérve.

Az $I_{\text{Na,L}}$ mérések során a Tyrode-oldat $1 \mu\text{M}$ nisoldipint, 100 nM dofetilidet és $100 \mu\text{M}$ chromanol-293B-t tartalmazott a Ca^{2+} és K^+ -áramok gátlásához. A -120 mV -os tartópotenciálról indított, 2 s hosszú -20 mV -ra történő teszimpulzusokat $0,2 \text{ Hz}$ -es ingerlési frekvenciával alkalmaztuk. Az $I_{\text{Na,L}}$ -t $20 \mu\text{M}$ TTX érzékeny áramként határoztuk meg, amplitúdóját pedig az impulzus kezdete után 50 ms -mal olvastuk le. Az áramintegrál meghatározásánál a kezdeti 20 ms -ot kizártuk az értékelésből, annak érdekében, hogy minimalizáljuk a korai nátrium áramcsúcsnak az integrálhoz való hozzájárulását. A CBA $47,3 \pm 7,0\%$ -kal csökkentette az $I_{\text{Na,L}}$ értékét az öt állatból izolált kilenc vizsgált sejten ($-0,70 \pm 0,12$ pA/pF és $-0,33 \pm 0,07$ pA/pF). Ez a gátló hatás nagyrészt reverzibilis volt (kimosása után $-0,56 \pm 0,08$ pA/pF áramsűrűség). Hasonló eredményeket kaptunk, amikor az $I_{\text{Na,L}}$ integrálját határoztuk meg (a teljes töltés értékei kontrollban: $-160,9 \pm 36,1 \text{ mC/F}$, CBA jelenlétében: $-60,0 \pm 16,6 \text{ mC/F}$, illetve annak kimosása után: $-117,8 \pm 21,1 \text{ mC/F}$ voltak).

Az I_{K1} -et $50 \mu\text{M}$ BaCl_2 -érzékeny áramként definiáltuk és egy 300 ms hosszú, 0 mV -tól -135 mV -ig tartó rámpa-protokollal mértük. A CBA nem befolyásolta a négy állatból nyert hét

vizsgált sejtben az I_{K1} -et ($2,09 \pm 0,33$ pA/pF és $2,11 \pm 0,36$ pA/pF áramsűrűség értékek -50 mV-on mérve kontrollban és CBA jelenlétében). A CBA kimosása után az áramsűrűség $2,29 \pm 0,44$ pA/pF volt.

4.6. $1 \mu\text{M}$ ABT-333 megnyújtotta a bal kamrai akciós potenciált

Először is kutyák bal kamrai sejtjeit $1 \mu\text{M}$ ABT-333-mal perfundáltuk 15 percig, amelyet 20 perces kimosás követett. Az ABT-333 perfúzió előtt rögzített utolsó tíz akciós potenciált tekintettük kontrollnak (bikarbonát puffert tartalmazó Tyrode-oldat (BTY)), az ABT-333 hatásának a kimosás előtti utolsó tíz AP átlagát tekintettük, míg a 20 perces kimosást követő tíz AP átlagát kimosásként jelöltük, az elemzett AP paramétereket pedig átlagoltuk.

Az $1 \mu\text{M}$ koncentrációban alkalmazott ABT-333 növelte a bal kamrai sejtek AP időtartamát $258,3 \pm 15,4$ ms-ról $277,4 \pm 15,3$ ms-ra (12.A, B ábra), ami $7,84 \pm 3,09$ %-os APD_{90} növekedést eredményezett. Az APD_{50} változása nem volt statisztikailag szignifikáns ($p = 0,08$), de a megnyúlási tendencia kimosásra reverzibilis volt, csakúgy, mint az ABT-333 által kiváltott APD_{90} növekedés. Az ABT-333 szignifikánsan, de nem reverzibilis módon csökkentette a 0. fázis, és az 1. fázis maximális sebességét (V_{Ph1max}) $82,8 \pm 5,1$ illetve $51,6 \pm 11,3$ %-kal. Az APA, az APD_{50} és az APD_{90} , az OSP, az RMP, a Plató_{20} és Plató_{50} amplitúdók, valamint a V_{max} értékei nem változtak.

4.7. Az ABT-333 koncentrációfüggő hatása a kamrai akciós potenciál paraméterekre

Miután kimutattuk a kutya bal kamrai AP $1 \mu\text{M}$ ABT-333 által kiváltott megnyúlását, a magasabb ABT-333 koncentrációk hatását kumulatív módon ellenőriztük, koncentrációnként 5 perces, 1 és $30 \mu\text{M}$ közötti, növekvő ABT-333 perfúziójával. A magasabb ABT-333 koncentrációk jelenlétében gyakran észleltünk korai utódepolarizációkat (EAD).

Az ABT-333 koncentráció függő módon nyújtotta a bal kamrai sejtek AP-ját, ami $1 \mu\text{M}$ esetén $8,1 \pm 2,7$ %-os; $3 \mu\text{M}$ esetén $26,3 \pm 5,9$ %-os; $10 \mu\text{M}$ esetén $37,6 \pm 7,6$ %-os; valamint $30 \mu\text{M}$ alkalmazás esetén $54,3 \pm 15,2$ %-os növekedést eredményezett az APD_{50} értékekben. Hasonlóképpen, az APD_{90} értékeket az ABT-333 $1, 3, 10$ és $30 \mu\text{M}$ koncentrációban $7,4 \pm 2,9$ %-kal, $26,2 \pm 6,0$ %-kal, $42,6 \pm 8,6$ %-kal és $52,6 \pm 13,6$ %-kal növelte. A magasabb ABT-333 koncentrációk (3 - $30 \mu\text{M}$) szintén növelték a korai platófázis magasságát, mivel a Plató_{20}

amplitúdó értékei enyhén, de szignifikánsan, 3, 10 és 30 μM koncentrációban $4,3 \pm 0,7\%$ -kal, $6,1 \pm 1,7\%$ -kal, valamint $9,2 \pm 1,2\%$ -kal nőttek. Az ABT-333 csökkentette V_{max}^+ , V_{Ph1max} és a V_{max}^- értékeit. 10 és 30 μM ABT-333 szignifikáns mértékben csökkentette a V_{max}^+ -ot ($84,4 \pm 6,2$; illetve $77,8 \pm 10,9\%$ -a a kontrollnak). 3, 10 és 30 μM ABT-333 szintén csökkentette a V_{max}^- értékeit a kontroll $95,1 \pm 0,9\%$ -ára, $87,1 \pm 4,2\%$ -ára és $84,4 \pm 5,6\%$ -ára. Az ABT-333 3, 10 és 30 μM koncentrációban a V_{Ph1max} értékét $78,5 \pm 6,3\%$ -ra, $57,7 \pm 6,8\%$ -ra és $40,0 \pm 8,3\%$ -ra csökkentette a kontrollhoz képest.

Az ABT-333 terápia során alkalmazott dóziséval elérhető maximális plazmakoncentráció értéke önkéntesekben kb. 1 nM volt. Mivel az általunk vizsgált koncentrációk egy nagyságrenddel magasabbak ettől, így az ABT-333 terápiás koncentrációjának (1 nM) akciók potenciálra gyakorolt hatásait is vizsgáltuk és kimutattuk, hogy az az AP semmilyen paraméterére nincs szignifikáns hatással.

4.8. Korai utódepolarizációk kialakulása az ABT-333 jelenlétében

Az ABT-333 jelenlétében bizonyos sejtekben EAD-ket mutattunk ki. Az EAD megjelenését attól a legalacsonyabb ABT-333 koncentrációtól kezdve állítottuk, amelyben az első EAD megjelent, még akkor is, ha később az EAD-k nem maradtak fenn. A kontrollban, sőt 1 μM ABT-333 jelenlétében sem figyeltünk meg EAD-ket, de az ABT-333 magasabb koncentrációiban fokozatosan nőtt az EAD-ket kialakító sejtek aránya a 30 μM ABT-333 jelenlétében egészen 70%-ig.

4.9. ABT-333-érzékeny áramprofil AP feszültség clamp technikával (APVC)

Az ABT-333 által kiváltott AP-megnyúlás és a V_{max}^- csökkenése az I_{Kr} , a V_{Ph1max} csökkenése pedig az I_{to} gátlására utal. Ennek a hipotézisnek a megerősítése érdekében 10 μM ABT-333 hatását rögzítettük az APVC technika során, kanonikus AP-t használva feszültség parancsjelként és meghatároztuk az ABT-333-érzékeny áramot, ami tartalmazta mindazokat az ionáramokat, amelyeket az ABT-333 befolyásolt. Az APVC technika sajátossága, hogy egy kifelé irányuló (pozitív) áram látható mind az ABT-333-indukált kifelé irányuló áram gátlása, mind pedig az ABT-333-indukált befelé irányuló áram növekedése esetén is. A 10 μM ABT-333-érzékeny áram a teljes AP alatt kifelé irányuló volt. Megfigyeltünk egy korai kifelé irányuló

áramcsúcsot, amelynek sűrűsége $2,76 \pm 0,64$ pA/pF volt és $2,90 \pm 0,81$ ms-mal követte a feszültség parancsjel AP V_{ph1max} időpontját. A vizsgált sejtek saját AP-jának alakja alapján negatív korreláció volt a V_{ph1max} értékek és a korai kifelé irányuló áramsűrűség csúcserőssége között. A kifelé irányuló áram sűrűsége a feszültség parancsjel AP időtartamának felénél $0,89 \pm 0,24$ pA/pF-nak adódott. A tartós kifelé irányuló áram végét (I_{endsus}) közvetlenül a nullára való visszatérés kezdete előtt mértük. Az I_{endsus} értéke $0,83 \pm 0,16$ pA/pF volt és a pozíciója $7,82 \pm 1,64$ ms-mal volt a kanonikus AP V_{max} ideje előtt. A mért sejtek saját AP-jának V_{max} értékei és az I_{endsus} sűrűsége között nem volt korreláció.

4.10. Az ABT-333 idő- és koncentrációfüggő módon blokkolta az expresszált hERG csatornákat áramát

Az ABT-333 koncentrációfüggő módon gátolta a hERG-áramot, amit egy -80 mV tartópotenciálról, 30 másodpercenként indított, 3 másodperces, $+20$ mV-ra történő depolarizációt követő -40 mV-ra történő repolarizációval vizsgáltunk. 30 μ M ABT-333 a hERG-áram csökkenését okozta mind $+20$, mind -40 mV-on. A $+20$ mV-nál monoton növekvő kontroll áram az ABT-333 jelenlétében csökkenő árammá változott, amelyet egyexponenciális függvénnyel illesztve $0,87 \pm 0,09$ s időállandót kaptunk. A megmaradó áramhányad értékei 1 , 3 , 10 és 30 μ M ABT-333 esetén rendre $0,93 \pm 0,04$, $0,63 \pm 0,05$, $0,26 \pm 0,04$ és $0,15 \pm 0,02$ voltak ($n \geq 4$ minden koncentráció esetén). A koncentráció-hatás görbe $3,2$ μ M félgátló koncentrációt (IC_{50}) eredményezett.

Az ABT-333 hatását a hERG-csatornák feszültségérzékelésére egy áram-feszültség protokollal vizsgáltuk, amely -50 mV-tól $+50$ mV-ig terjedő, 10 mV-onként emelkedő depolarizáló impulzusokból állt. A normalizált farokáram-csúcsokból létrehoztuk a kontroll oldat és a 30 μ M ABT-333-mal perfundált mérések konduktancia-feszültség görbéit. Ezeket Boltzmann-egyenlettel illesztve a $V_{1/2}$ értéke a kontroll oldat esetében $6,50 \pm 1,03$ mV volt. Az ABT-333 esetében a kis áram nagyság miatt a $V_{1/2}$ érték megfelelő meghatározása nem volt lehetséges.

Mivel az ABT-333 időfüggő gátlást okozott (időállandó $0,87 \pm 0,09$ s), megvizsgáltuk az ABT-333 lehetséges hatásait a hERG-csatorna kapuzási átmeneteire. Az ABT-333 már 3 μ M-os koncentrációban szignifikánsan csökkentette a deaktiválási időállandó arányát ($\tau_{ABT-333} / \tau_{Kontroll}$

= $0,46 \pm 0,04$, $p = 0,0001$), 30 μM ABT-333 perfúziója pedig az inaktiválási időállandó arányát csökkentette $0,78 \pm 0,15$ -ra. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az ABT-333 blokkolja a csatorna pórusát, főként a csatorna nyitott állapotában.

5. Megbeszélés

5.1. *TRPM4 expresszió a kutyaszívben*

A TRPM4 számos szövetben, többek között a szívben is nagy mennyiségben expresszálódik de munkacsoportunk első ízben mutatta ki egészséges kutyaszívben való expresszióját. Bár a TRPM4 expresszióban nem tudtunk szignifikáns különbségeket kimutatni a kutyaszív négy különböző üregének falából származó minták között, korábbi kutatások patkányban a jobb kamrában hatszor magasabb expressziót írtak le a bal kamrához képest. Bár a szívszövetben a sejtek túlnyomó többségét a kamrai sejtek teszik ki, a vizsgált minták más sejttypusokat is tartalmaznak, beleértve a fibroblasztokat, a simaizomzatot és az endothel sejteket. Az egyéb sejttypusok interferenciájának minimalizálása érdekében a TRPM4 expresszióját közvetlenül az enzimatikusan izolált bal kamrai sejteken is meghatároztuk. A TRPM4 expressziójában nem volt szignifikáns különbség a bal kamra izolált sejtjei és a teljes bal kamra falszövet között, ami arra utalhat, hogy a TRPM4 jel forrása főként a kardiomiocitákból származik. Eredményeink összhangban vannak egy nemrégiben végzett vizsgálattal, ahol egér pitvari és kamrai mintákban, valamint izolált kamrai kardiomiocitákban azonos TRPM4 expressziót mutattak ki.

5.2. *A CBA hatása az akciós potenciál morfológiájára*

Az AP mérések során a hagyományos hegyes mikroelektroda technikát használtuk a TRPM4 inhibitor CBA hatásának vizsgálatára a kutya bal kamrai szívműködősejteken. Ez a technika közelíti leginkább a fiziológias állapotot, mert a vizsgált sejtek intracelluláris terének összetételét nem befolyásolja.

Jelen vizsgálatban a CBA-t 10 μ M-ban használtuk, ahol egy korábbi tanulmány szerint legalább 90%-os a TRPM4 áram gátlása, de nem tapasztaltak jelentős hatást sem a hERG, sem az L-típusú kalciumcsatornákra. Jelen vizsgálatunk az első eset, ahol a CBA hatását natív szívsejtekben elemeztük - minden korábbi vizsgálatban vagy TRPM4 génkiütött állatokat, vagy más TRPM4-gátlókat, például 9-phenanthrolt használtak. Eredményeink azt mutatják, hogy a CBA reverzibilis módon csökkentette az 1. fázis meredekségét és növelte az akciós potenciál amplitúdóját. A depolarizáció maximális sebességének CBA által kiváltott csökkenése azonban

nem volt visszafordítható. Csak tendenciózus volt az AP rövidülése, de az APD_{90} értékek normalizálása után, a kontroll körülmények között rögzített értékekhez képest kis mértékű (kb. 9%), de szignifikáns csökkenést eredményezett. Ezek a változások vagy a CBA által közvetített TRPM4 gátlás, vagy a CBA nem specifikus, a TRPM4-től eltérő ioncsatornákon kiváltott hatásai, vagy ezek kombinációja miatt következhetnek be. A TRPM4 gátlása által okozott lehetséges elektrofiziológiai változások feltételezéséhez el kell képzelnünk, hogyan nézhet ki a TRPM4 által közvetített áram a kamrai AP alatt. Ehhez figyelembe kell venni a TRPM4 Ca^{2+} -függő aktiválódását és a monovalens kationok iránti szelektivitását. A kamrai sejtekben a membránpotenciál és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció is dinamikusan változik a szív ciklus során. Ráadásul a Ca^{2+} koncentrációk jelentősen eltérnek a különböző sejtkompartimentekben. A Ca^{2+} csúcskoncentrációja megközelítőleg 600 nM-ig emelkedhet a citoplazmában, 6 μ M-ig a szubsarkolemmális térben, de akár 10-50 μ M-ig a szubmembrán hasadéokban (a szarkolemmális Ca^{2+} belépési és a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} felszabadulási helyei közötti szűk tér). Ami a TRPM4 aktiválásához szükséges Ca^{2+} koncentrációt illeti, az EC_{50} értékek az irodalomban igen változatosak és a kísérleti körülményektől függően 400 nM-tól egészen 1 mM-ig terjednek. A natív sinoatrialis és kamrai sejtekben a csatorna aktiválásához szükséges minimális Ca^{2+} koncentráció 0,1-1 μ M között volt, az EC_{50} pedig 10 μ M volt patkány kamrai sejtekben. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a TRPM4 valóban aktiválódhat a szív akciós potenciálja során a kalcium beáramlás és az azt követő Ca^{2+} felszabadulás révén. A legnagyobb aktiváció kevéssel az AP-csúcs után és a korai platófázisban várható, mivel a kalcium az AP-csúcs után a szubsarkolemmális térben néhány ms alatt, a szubmembrán hasadéokban még gyorsabban éri el maximális koncentrációját. Abból kiindulva, hogy a TRPM4 mind a Na^+ , mind a K^+ számára permeábilis (a Ca^{2+} számára viszont nem), áramának várható reverzálpotenciálja 0 mV körül van. Ezek szerint a TRPM4 aktiválása várhatóan 0 mV felé mozdítja el a membránpotenciált, ami közvetlenül az AP csúcs után repolarizáló áramot eredményez. Ezért a CBA által kiváltott TRPM4 gátlás hatására az 1. fázis repolarizáció lassulása várható, ahogyan azt a kísérleteinkben is láttuk. A TRPM4 által közvetített áram viszont csökkentheti a plató potenciált a plató korai fázisában, amikor a membránpotenciál 0 mV-nál magasabb. Elméletileg minél pozitívabb a membránpotenciál, annál nagyobb lesz ez a csökkenés. Ezenkívül

megemelheti a plató késői potenciálját, ha az áram ekkor még aktív, de a TRPM4-csatornák közelében a kalciumszintek vélhető gyors csökkenése alapján ez eléggé valószínűtlen. Ezért a TRPM4 CBA-val történő blokkolása várhatóan némileg megemeli a plató korai potenciálját, és talán kis mértékben csökkenti a plató késői membránpotenciálját. Kísérleteinkben a plató potenciálját a CBA nem változtatta meg jelentősen (a kezdetben enyhén pozitív Plat_{50} potenciál körülbelül 2 mV-os növekedése ellenére). Ez (1) a Plat_{50} közel 0 értékével magyarázható, vagy (2) arra utal, hogy az AP ezen későbbi fázisában a TRPM4 aktiválásához nem elegendő a Ca^{2+} szint, vagy (3) a CBA-nak a TRPM4-től eltérő, ebben a fázisban aktív csatornákra gyakorolt hatása is lehet.

Elméletileg az AP időtartamának rövidülése várható a TRPM4 gátlásától, ahogyan azt a nyúl Purkinje rostokban egy másik TRPM4 blokkoló (30 μM 9-phenanthrol) jelenlétében és a TRPM4-et nem expresszáló egér pitvari sejtekben is megfigyelték. A mi eredményeink hasonlóak ezekhez, de csak az APD_{90} csökkenésének tendenciáját figyeltük meg (körülbelül 25 ms), és ez csak az egyes vizsgált sejtek kezdeti APD_{90} értékeire való normalizálás után volt szignifikáns (9%-os APD_{90} csökkenés).

A CBA hatása az AP amplitúdóra bár statisztikailag szignifikáns, de nagyon kicsi volt (3 mV vagy 2,5%-os növekedés), és a túllövési potenciál nem szignifikáns növekedésének és a nyugalmi membránpotenciál nem szignifikáns csökkenésének összegéből adódhat. Az AP-csúcs alatti TRPM4-gátlástól ez várható, mivel a TRPM4 árama a membránpotenciált 0 mV felé mozgatná, így ellensúlyozva a depolarizációt. Ha ezt a hatást a CBA csökkenti akkor a túllövési potenciál és/vagy az AP-amplitúdó növekedése várható. Ami a depolarizáció maximális sebességét illeti, annak CBA által kiváltott csökkenése a gyors Na^+ -áram gátlásának köszönhető, mivel a V_{max}^+ meglehetősen jó mérőszáma a Na^+ áramsűrűségének. A V_{max}^+ és az áramsűrűség közötti kapcsolat azonban nem lineáris, ezért a V_{max}^+ kis mértékű változása a gyors Na^+ -áram nagyobb mértékű csökkenésének is köszönhető. A CBA által kiváltott irreverzibilis V_{max}^+ csökkenés körülbelül 15%-os volt és egér kamrai izomzatban nem tapasztalták. Egy nemrégiben végzett vizsgálatban a V_{max}^+ értéke kisebb volt a TRPM4 knockout egerek kamrai szívizomsejtjeiben, mint a vad típusú állatokéban. A kisebb V_{max}^+ érték a Na^+ -áramcsúcs sűrűségének csökkenésével magyarázható, mivel az körülbelül 30%-kal kisebb volt a TRPM4

knockout egerekben. Lehetséges, hogy a $V_{\max}^+$ CBA által kiváltott csökkenése a mi vizsgálatunkban a Na^+ csúcsáram csökkenését tükrözi, hiszen egy tanulmányban a TRPM4 deléciója a Nav1.5 funkcionális csökkenését okozta.

Munkacsoportunk 9-phenanthrollal végzett korábbi kísérleteinek eredményei jó összhangban vannak a CBA-val mért eredménnyel a $V_{\max}^+$ és az 1. fázis meredekség tekintetében, mivel mindkét szer mindkét paramétert csökkentette. Ezzel szemben a CBA nem hatott a Plat_0 -re, ellentétben a 30 μM 9-phenanthrol általi csökkentésével. Hasonlóképpen a CBA és a 9-phenanthrol hatása az APD_{90} tekintetében is eltérő volt, mivel a CBA esetében rövidülő tendencia volt megfigyelhető, de 10 és 30 μM 9-phenanthrol esetében az APD csökkenése csak a sejtek kisebb hányadában volt jellemző, egyébként az AP átlagban megnyúlt.

Úgy tűnik tehát, hogy a CBA és a 9-phenanthrol hasonló TRPM4-gátlása ellenére a kutya kamrai AP morfológiára gyakorolt hatásuk jelentősen különbözik. Ez valószínűleg az egyéb, nem TRPM4-csatornákra gyakorolt eltérő hatásuknak köszönhető.

5.3. A CBA hatása a repolarizáció rövid távú variabilitására

A TRPM4-csatornák tranziens befelé irányuló áramot közvetíthetnek (mint a kalcium-aktivált kloridáram és nátrium-kalcium csereáramok), ami kalciummal túltöltődött sejtekben késői utódepolarizáció kialakuláshoz vezet, mely Torsade de Pointes típusú malignus kamrai tachyritmiát indíthat el.

Vizsgáltuk a CBA által kiváltott TRPM4 gátlás hatását a repolarizáció rövid távú variabilitására (SV), melynek növekedése a szívritmuszavarok jó előrejelzője. Az SV csökkentése antiaritmiás tulajdonságokkal bírhat. Mivel a TRPM4 CBA általi gátlása az SV reverzibilis csökkenését okozta, úgy tűnik, hogy a TRPM4-nek proaritmiás hatása van. Az egymást követő APD értékek nagymértékű, hirtelen változása (különösen, ha ez a teljes szívizomban nem egyenletes módon történik) hatékonyabban indukálhat szívritmuszavart. Ezért az esetlegesen előforduló 1-1 rövid vagy hosszú AP-k könnyebb észlelése érdekében az egymást követő APD értékek különbségét tartományokba rendeztük és megjelenésük valószínűségét ábrázoltuk. A görbe CBA jelenlétében reverzibilisen balra tolódott, ami ismét alátámasztja a szívritmuszavar esélyének csökkenését. Ezek alapján a korábbi vizsgálatokkal összhangban úgy tűnik, hogy a natív TRPM4 áram aritmogén lehet. Eredményeink azonban inkább a TRPM4-áram által

közvetített SV növekedésen alapuló mechanizmusra utalnak, mint az EAD indukciójára, ahogy azt korábban kimutatták. Meg kell említeni, hogy mivel a CBA más ionáramokkal is interferálhat (lásd a következő fejezetben), ezek is hozzájárulhatnak a CBA SV-re, valamint a relatív SV-re gyakorolt hatásához. Ezért az SV csökkenése mögött a CBA által gátolt I_{to} és az $I_{Na,L}$ állhat, mivel ez a két áram valószínűleg növeli az SV-t, és ezzel párhuzamosan a TRPM4 által közvetített áram szerepe az SV növekedésében kisebb lehet. Mivel ezek a változások a CBA nem-TRPM4 ioncsatornákra kifejtett hatásai is lehetnek, ennek a lehetőségét hagyományos feszültség-zár mérésekkel teszteltük.

5.4. A CBA APVC-vel és hagyományos feszültség-zár technikával mért hatásai

A TRPM4-csatornák közvetlen gátlása mellett a CBA által kiváltott AP-morfológiai változásokat a vegyület nem specifikus hatásai is okozhatják. Például a V_{max}^+ csökkenése a Na^+ csatornák gátlásának, az 1. fázis meredekség csökkenése és az APA növekedése az I_{to} gátlásának eredménye lehet. Emellett az AP rövidülésére való hajlam pedig az $I_{Na,L}$ vagy az $I_{Ca,L}$ gátlásának, vagy akár késői K^+ áramok (I_{Kr} , I_{Ks} , esetleg I_{K1}) aktiválásának következménye is lehet. Annak kizárására, hogy a CBA a TRPM4-en kívül más ioncsatornákon is hatna, a patch clamp technika teljes-sejtes konfigurációját használtuk, ahol a TRPM4 aktiváció megelőzésére 10 mM BAPTA formájában egy gyors kalcium kelátort alkalmaztunk. Ez a BAPTA koncentráció nemcsak az intracelluláris Ca^{2+} -tranziens teljes megszüntetésére képes, hanem a szubsarkolemmális és valószínűleg a szubmembrán hasadék Ca^{2+} -szintjének szisztolés emelkedésének megakadályozására is. Ennek megfelelően, legalábbis artériás simaizomban 10 mM BAPTA csökkentette a Ca^{2+} -szintet a mikrodoménekben és megakadályozta a TRPM4 aktiválódását. Bár nem közvetlen TRPM4 áram mérések, de más vizsgálatok is arra utalnak, hogy a BAPTA blokkolhatja a TRPM4-et. Nyilvánvalóan meg kell említeni, hogy a BAPTA alkalmazása nem csak a TRPM4 aktiválódását akadályozza meg, hanem az összes Ca^{2+} érzékeny áramot befolyásolja, beleértve az L-típusú Ca^{2+} áramot (ahol a Ca^{2+} -függő inaktiválódása megszűnik, ami nagyobb áramot eredményez), a Ca^{2+} -aktivált Cl^- áramot (ahol az aktiválódás akadályozott), az I_{Ks} -t (ahol a csatorna egy normál időtartamú AP alatt egyébként is kismértékű aktiválódása valószínűleg tovább csökken) és az I_{NCX} -et (amely BAPTA alkalmazásakor fordított üzemmódban működik, mely Ca^{2+} belépést és kifelé irányuló áramot eredményez). Ezek minden bizonnyal módosítják

az egyes sejtek AP-jainak alakját, de ezt a méréseink során azzal küszöböltük ki, hogy ugyanazzal a kanonikus AP-vel ingereltünk minden sejtet. Tulajdonképpen a Ca^{2+} -aktivált Cl^- áram blokkolása, és - az amúgy is meglehetősen kicsi - I_{Ks} csökkenése előnyös volt, mivel így a CBA nem volt képes ezeket módosítani a 10 mM BAPTA alkalmazásával végzett APVC kísérletek esetében. A hagyományos feszültségprotokollok során a vizsgált áramokat specifikus inhibitorok és feszültségimpulzusok alkalmazásával egyenként vizsgáltuk, tanulmányozva a CBA lehetséges hatását az adott áramra.

Mint már említettem, a CBA-t csak azután alkalmaztuk, hogy megerősítettük a BAPTA AP alakjára gyakorolt hatását. A CBA-érzékeny áram korai, rövid, kifelé irányuló csúcsa a CBA által indukált, az 1. fázis alatt folyó tranziens kifelé irányuló áram gátlásának köszönhető. Mivel a kalcium-aktivált kloridáram aktiválódását 10 mM BAPTA-val megakadályoztuk, a gátolt áram csak a tranziens kifelé irányuló K^+ -áram lehet. Ezt meg is erősítettük hagyományos feszültségzár protokollal megvizsgálva, ahol az összes többi fő áramot vagy inhibitorokkal gátoltuk (nisoldipin és E4031) vagy egy előimpulzussal inaktíváltuk.

Az I_{to} reverzibilis csökkenése magyarázhatja az APVC kísérletek CBA-érzékeny áramának kifelé irányuló komponensét és egybevégt a CBA által indukált 1. fázis meredekség csökkenéssel és az AP amplitúdó enyhe növekedésével. A CBA-érzékeny áramban megfigyelhető hosszú befelé irányuló áram az L-típusú Ca^{2+} -, vagy a késői nátriumáram CBA általi gátlásának lehet a következménye. A CBA által indukált I_{NCX} gátlás a fent említett erős Ca^{2+} pufferek miatt valószínűtlen a méréseink során, mert ilyenkor az I_{NCX} főként kifelé irányul. A CBA nem volt hatással az L-típusú Ca^{2+} -áramra, ami összhangban van egy korábbi vizsgálattal. A késői nátriumáramot azonban csökkentette a CBA, ami hozzájárulhat az AP mérések során tapasztalt AP időtartam kis mértékű csökkenéséhez. Mint korábban említettem, a TRPM4 knockout egerekben kisebb Na^+ áramcsúcsot figyeltek meg, de a késői nátriumáramot nem regisztrálták. Mindazonáltal lehetséges, hogy a késői nátriumáram is nagyobb lehet a TRPM4 jelenlétében.

Eredményeink alapján nem valószínű, hogy a CBA gátolná az AP-t alakító késői egyenirányító K^+ -áramokat (I_{Kr} és I_{Ks}), mivel ez kifelé irányuló áramokat eredményezne az APVC-vel mért CBA-érzékeny áramban a plató fázis alatt. Továbbá, ha ezeket az áramokat a CBA csökkentené az AP-t megnyújtaná. Az I_{K1} szintén fontos szerepet játszik a terminális

repolarizációban, de annak CBA-érzékenységét kizártuk. Ezzel összhangban az AP mérések során a CBA sem a nyugalmi membránpotenciál, sem pedig a terminális repolarizáció maximális sebességének értékét nem befolyásolta. Ráadásul az APVC kísérletek során, ahol a BAPTA jelenléte miatt a TRPM4 nem aktiválódott, még valószínűbb lenne a CBA ezen nem specifikus gátló hatásainak megfigyelése. A CBA-érzékeny áramgörbéken nem volt megfigyelhető az I_{K1} gátlására utaló áramjel változás, valamint az AP vége felé növekvő, vagy csúcspontot elérő kifelé irányuló áram sem (ami az I_{Kr} és az I_{K1} gátlására utalna). Mivel sem az AP-változások, sem a CBA-érzékeny áram nem utalt az I_{K1} , az I_{Kr} és az I_{Ks} potenciális gátlására, az I_{Kr} és az I_{Ks} esetében a közvetlen árammérések hiányában is kizárhatjuk e három K^+ -áram CBA általi gátlását. A CBA hatásának elmaradása az I_{Kr} -re várható volt, mivel korábbi kísérletekben a szív hERG csatornákra (az I_{Kr} pórusképző alegysége) nem volt hatással a CBA, valamint 10 μM CBA hatására kevesebb, mint 5%-os csökkenést észleltek a specifikus antagonistá (dofetilid) kötődésében.

5.5. 1 μM ABT-333 AP-ra kifejtett hatásai

Először 1 μM ABT-333 kutya bal kamrai szívizomsejtek AP-jára gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az APD_{90} jelentősen és reverzibilisen megnőtt, valószínűleg az ABT-333 feltételezett I_{Kr} gátló hatása miatt. Az I_{Kr} felelős a 3. fázis repolarizáció megindulásáért, de annak maximális sebessége (a V_{max}^- értéke) elsősorban, de nem kizárólag a befelé egyenirányító káliumáram, az I_{K1} áramsűrűségétől függ.

Az ABT-333 nem csökkentette a V_{max}^- -ot 1 μM koncentrációban, ami arra utal, hogy nem gátolja az I_{K1} -et. Az APD_{50}/APD_{90} arányt gyakran használják az AP-trianguláció markereként. Minél kisebb az érték, annál háromszögletesebb az AP-k alakja, ami gyakran megfigyelhető az I_{K1} gátlása során. Mivel az APD_{50}/APD_{90} arány nem változott jelentősen ABT-333 jelenlétében, ez is megerősíti, hogy 1 μM ABT-333 nem gátolta az I_{K1} -et.

Az ABT-333 által kiváltott V_{Ph1max} és V_{max}^+ csökkenést az I_{to} és az I_{Na} gátlása okozhatja. Ezek a hatások a 20 perces kimosás után is jelen voltak, ami felveti az ABT-333 által okozott irreverzibilis csatornagátlás lehetőségét.

5.6. Az ABT-333 magasabb koncentrációinak hatása

1 μM -nál magasabb koncentrációkban alkalmazott ABT-333 további változásokat okozott az AP paraméterekben. Az APD_{50} , az APD_{90} valamint a Plat_{20} amplitúdó is koncentrációfüggő módon nőtt, ami ismét arra utal, hogy az ABT-333 csökkentette az I_{Kr} -t.

A V_{Ph1max} és V_{max}^+ értékek ezzel szemben csökkentek ABT-333 jelenlétében, ami felveti az I_{to} és az I_{Na} gátlásának lehetőségét az I_{Kr} blokkolásán kívül. Az ABT-333 nagyobb koncentrációinál EAD-k jelentek meg, ami szintén az I_{Kr} gátlására utalhat, mivel az AP megnyúlása gyakran előzi meg EAD-k képződését. Egy számítógépes szimulációs vizsgálatban jelentős (több mint 90%-os) I_{Kr} csökkenés volt szükséges az EAD kialakuláshoz. Az APD növekedése azonban nem mindig az I_{Kr} gátlásának köszönhető, elvileg lehet a plató fázis alatti nátrium- vagy kalciumáramok növekedésének következménye is. Az előbbi valószínűleg kizárható, mivel az ABT-333 hatására észlelt V_{max}^+ csökkenés nem áll összhangban a nagyobb nátriumárammal. Az ABT-333 által okozott kalciumáram növekedés egy valószínűbb lehetőség, különösen mivel ez a korai plató potenciál emelkedéséhez vezetne, amit valóban észleltünk az ABT-333 alkalmazásakor. Összegezve tehát, a főleg magasabb ABT-333 koncentrációkban tapasztalt EAD-k megjelenése a nagy mértékű I_{Kr} gátlás, vagy az I_{Kr} gátlás és az egyidejű kalciumáram növelés következménye lehet.

5.7. ABT-333-érzékeny áramprofil APVC-vel

Az ABT-333 által kiváltott V_{Ph1max} csökkenés az I_{to} gátlására utalt az I_{Kr} gátláson felül. Ezt próbáltuk megerősíteni az APVC mérésekkel. Az ABT-333-érzékeny áram korai, kifelé irányuló csúcsának tulajdonságai nagyon hasonlóak voltak ahhoz, amit korábban az I_{to} gátló 4-AP-vel mutattunk ki. 1 mM 4-AP az I_{to} körülbelül 70%-át gátolja és körülbelül 3 pA/pF csúcsáramsűrűséget eredményezett. Az ABT-333-érzékeny áram korai, kifelé irányuló csúcsának áramsűrűsége valamivel kisebb volt: $2,76 \pm 0,64$ pA/pF, aminek oka lehet a kis I_{to} árammal rendelkező sejtek nagyobb arányú előfordulása. Ezen kívül az ABT-333-érzékeny áramcsúcs időpontja mindig a V_{Ph1max} időpontja után, de a parancspotenciál incisura legmélyebb pontja előtt volt. További bizonyíték arra, hogy az ABT-333 gátolja az I_{to} -t, a saját AP-k V_{Ph1max} értékeinek és a korai áramcsúcs-sűrűség értékek közötti erős korreláció és az

áram 4-AP-érzékeny áramhoz hasonló gyors lecsengése. Az I_{to} tanulmányozására 100 μ M chromanol-293B is használható, ahol az áram lecsengése kevésbé volt gyors. Megjegyzendő, hogy az ABT-333-érzékeny áram a 4-AP-érzékeny árammal szemben nem csökkent le közel nullára. Ez az ABT-333-nak az AP korai platófázisa alatt aktív egyéb ioncsatornákra gyakorolt hatásával lehet magyarázható. Eredményeink alapján tehát úgy tűnik, hogy 10 μ M ABT-333 jelentősen gátolja az I_{to} -t.

Az ABT-333-tól várt I_{Kr} gátló hatást APVC-vel is megerősítettük. Az I_{endsus} pozíciója $7,82 \pm 1,64$ ms volt a parancspotenciál V_{max} időpontját megelőzően, ami jó összhangban van a korábbi eredményekkel. Az 1 μ M E4031-érzékeny áram csúcsértéke körülbelül 0,6 pA/pF volt, ami valamivel kisebb, mint a jelenlegi vizsgálatban megfelelő helyen mért ABT-333-érzékeny áramsűrűség (kb. 0,8 pA/pF). Ennek oka az lehetett, hogy a jelenlegi vizsgálat sejtjeiben nagyobb I_{Kr} áramok voltak, mint a korábbi vizsgálatunkban, mivel az abban használt 1 μ M E4031 az I_{Kr} kb. 80%-át gátolja, hasonlóan a hERG 10 μ M ABT-333 általi szintén kb. 80%-os gátlásához. Ezen kívül lehetséges, hogy az ABT-333-érzékeny áram az I_{to} és az I_{Kr} mellett egy aktivált kalciumáram-komponenst is tartalmaz, ahogy azt korábban is említettem. Ez az aktivált kalciumáram, ha még aktív a plató késői fázisában, hozzáadódhat az ABT-333-érzékeny áram késői csúcsértékéhez az I_{Kr} -en felül, ami magyarázhatja az E4031-érzékeny áramnál nagyobb ABT-333 érzékeny áram értéket. Ez a lehetőség nyilvánvaló, ha megfigyeljük az I_{to} és az I_{Kr} áramgörbéit, mivel az I_{to} legkésőbb az AP csúcs után 50 ms-mal nullára csökken, míg az I_{Kr} csak az AP csúcs után kb. 70-80 ms-mal kezd aktiválódni. Az I_{to} azonban lassabban is lecsökkenhet és ezért hozzájárulhat az ABT-333-érzékeny áram kifelé irányuló komponensének fenntartásához a korai platófázisban. Az ABT-333-érzékeny áram késői csúcsáért felelős lehet az ABT-333-indukált nátrium- vagy kalciumáram fokozódása is, mivel az kifelé irányuló áramként jelenik meg. A késői nátriumáram hozzájárulása azonban valószínűtlen, mivel az ABT-333 csökkentette az AP V_{max}^+ értékét, ami a nátriumáram aktiválása ellen szól.

5.8. A hERG-csatorna-áramok ABT-333-indukált csökkenése

Az ABT-333 által kiváltott AP paraméter változások, nevezetesen az APD_{50} és az APD_{90} növekedése, főként arányuk megváltozása nélkül, valamint a V_{max} csökkenése az I_{Kr} gátlására utalt. Ez várható volt az ABT-333-ban található metánszulfonamid csoport miatt. Ezen kívül az

ABT-333-érzékeny áram a késői platófázisban is kifelé irányuló volt, ami szintén az I_{Kr} gátlására utal. Tekintettel arra, hogy az I_{Kr} áramért a hERG-csatornák felelősek, kísérleteket végeztünk a hERG-csatornákat stabilan expresszáló HEK-sejteken. Várakozásunknak megfelelően, a hERG-mediált áramot az ABT-333 koncentrációfüggő módon, 3,2 μ M-os IC_{50} értékkel gátolta. Hasonlóan néhány AP paraméterhez, ahol az ABT-333 által kiváltott változások (részben) irreverzibilisek voltak kimosásra, a hERG-áram ABT-333 általi csökkentése sem volt teljesen visszafordítható. Sőt, az ABT-333 30 μ M koncentrációban történő alkalmazása a depolarizáló impulzus során időfüggő gátlást okozott, amelynek időállandója $0,87 \pm 0,09$ s. Ez arra készítetett minket, hogy megvizsgáljuk az ABT-333 lehetséges hatásait a hERG-csatorna kapuzási átmeneteire. Ennek alapján 3 μ M ABT-333 szignifikánsan csökkentette a deaktiválási időállandó arányát ($\tau_{ABT-333} / \tau_{Kontroll} = 0,46 \pm 0,04$), 30 μ M ABT-333 perfúziója pedig az inaktiválási időállandó arányát csökkentette $0,78 \pm 0,15$ -ra. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az ABT-333 blokkolja a csatorna pórusát, főként a csatorna nyitott állapotában.

5.9. Orvosi relevancia

Várakozásunknak megfelelően az ABT-333 valóban blokkolta az I_{Kr} áramot. Ezt alátámasztotta (1) a kutya kamrai AP megnyúlása; (2) a V_{max} csökkenése; (3) az ABT-333-érzékeny áram késői fázisának hasonlósága a I_{Kr} -hez (E4031-érzékeny áram); és végül (4) az expresszált hERG-csatornák, az I_{Kr} -ért felelős csatornafehérje áramának gátlása. Ebben a kísérletsorozatban 1-30 μ M közötti ABT-333-at használtunk, de tekintettel a terápiás ABT-333 dózis (1 nM) és az általunk vizsgált koncentrációk közötti nagy különbségre, az ABT-333 terápiás koncentrációját is vizsgáltuk. Eredményeink alapján a terápiás dózis biztonságosnak mondható, az ABT-333 nem befolyásolja szignifikánsan a bal kamrai AP semelyik paraméterét.

6. Összefoglalás

6.1. CBA - TRPM4

A TRPM4 fehérje kifejeződését a kutyaszív mind a négy üregének falában, valamint az izolált bal kamrai kutya kardiomiocitákban is kimutattuk. A CBA egy meglehetősen új, a 9-phenanthrolnál specifikusabb TRPM4 gátló, így alkalmasabb a TRPM4 szív fiziológiában betöltött szerepének tanulmányozására.

A CBA csökkentette az 1. fázis repolarizáció meredekségét, valamint enyhén növelte az AP amplitúdóját, mely hatásokért valószínűleg a szer I_{to} gátló hatása felelős. Az AP rövidülésének tendenciája a befelé irányuló áramok gátlásával magyarázható, amelyek az APVC méréseken láthatóak a plató fázisban. Ez a hatás a CBA befelé irányuló valószínűleg a $I_{Na,L}$ áramra gyakorolt gátló hatásának köszönhető.

Eredményeink alapján a CBA nem teljesen szelektív a TRPM4-csatornákra, így a csatorna funkcionális vizsgálatára önmagában natív szöveten nem használható, farmakológiai kombinációban való alkalmazása pedig fokozott körültekintést igényel.

6.2. ABT-333 – I_{Kr} (hERG)

Az ABT-333 a molekuláris szerkezete alapján potenciálisan blokkolja a hERG-csatornákat és az I_{Kr} áramot. 1 μ M ABT-333 alkalmazása reverzibilis módon megnyújtotta az AP hosszát. A 0. és 1. fázis maximális sebessége irreverzibilis csökkenést mutatott. Magasabb ABT-333 koncentrációk nagyobb AP megnyúlást, a korai platópotenciál növekedését, és a 0., az 1. és a 3. fázis maximális sebességének csökkenését okozták. Egyes sejtekben 3-30 μ M koncentrációjú ABT-333 alkalmazása során EAD-k jelentek meg.

Az APVC technikával mért 10 μ M ABT-333-érzékeny áram egy I_{Kr} -ként azonosítható késői kifelé irányuló komponenst, valamint egy I_{to} -ként azonosítható korai kifelé irányuló komponenst is tartalmazott. Az ABT-333 koncentrációfüggő, részben reverzibilis módon csökkentette a hERG-csatorna által közvetített ionáramot, 3,2 μ M-os félgátló koncentrációval.

Mindezek ellenére az ABT-333 szívritmuszavarok szempontjából biztonságosnak tekinthető, mivel plazmaszintje még túladagolás esetén sem ér el μ M-os koncentrációt, terápiás koncentrációja pedig nem befolyásolta az AP-t.



Nyilvántartási szám: DEENK/532/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dienes Csaba

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10068161

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kovács, Z. M., Óvári, J., **Dienes, C.**, Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Fehér, Á., Varga, Z., Szentandrassy, N.: ABT-333 (Dasabuvir) Increases Action Potential Duration and Provokes Early Afterdepolarizations in Canine Left Ventricular Cells via Inhibition of IKr. *Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (4), 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16040488>
IF: 4.6 (2022)
2. **Dienes, C.**, Hézsó, T., Kiss, D. Z., Baranyai, D., Kovács, Z. M., Szabó, L., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Gönczi, M., Szentandrassy, N.: Electrophysiological Effects of the Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Inhibitor (4-Chloro-2-(2-chlorophenoxy)acetamido) Benzoic Acid (CBA) in Canine Left Ventricular Cardiomyocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (17), 9499, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179499>
IF: 6.208

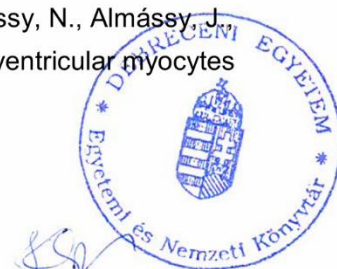
További közlemények

3. Horváth, B., Kovács, Z. M., **Dienes, C.**, Óvári, J., Szentandrassy, N., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P.: Conductance Changes of Na⁺ Channels during the Late Na⁺ Current Flowing under Action Potential Voltage Clamp Conditions in Canine, Rabbit, and Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (4), 1-14, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16040560>
IF: 4.6 (2022)





4. Naveed, M., Mohammed, A. S. A., Topal, L., Kovács, Z. M., **Dienes, C.**, Óvári, J., Szentandrassy, N., Magyar, J., Bányász, T., Prorok, J., Jost, N., Virág, L., Baczkó, I., Varró, A., Nánási, P. P., Horváth, B.: Selective Inhibition of Cardiac Late Na⁺ Current Is Based on Fast Offset Kinetics of the Inhibitor.
Biomedicines. 11 (9), 2383, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11092383>
IF: 4.7 (2022)
5. Horváth, B., Szentandrassy, N., **Dienes, C.**, Kovács, Z. M., Nánási, P. P., Chen-Izu, Y., Izu, L. T., Bányász, T.: Exploring the Coordination of Cardiac Ion Channels With Action Potential Clamp Technique.
Front. Physiol. 13, 864002, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.864002>
IF: 4
6. Horváth, B., Szentandrassy, N., Almássy, J., **Dienes, C.**, Kovács, Z. M., Nánási, P. P., Bányász, T.: Late Sodium Current of the Heart: where Do We Stand and Where Are We Going?
Pharmaceuticals (Basel). 15 (2), 231, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15020231>
IF: 4.6
7. Kovács, Z. M., **Dienes, C.**, Hézső, T., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Szentandrassy, N.: Pharmacological Modulation and (Patho)Physiological Roles of TRPM4 Channel-Part 1: modulation of TRPM4.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (1), 81, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15010081>
IF: 4.6
8. **Dienes, C.**, Kovács, Z. M., Hézső, T., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Szentandrassy, N.: Pharmacological Modulation and (Patho)Physiological Roles of TRPM4 Channel-Part 2: TRPM4 in Health and Disease.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (1), 40, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15010040>
IF: 4.6
9. Horváth, B., Kiss, D. Z., **Dienes, C.**, Hézső, T., Kovács, Z. M., Szentandrassy, N., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P.: Ion current profiles in canine ventricular myocytes obtained by the "onion peeling" technique.
J. Mol. Cell. Cardiol. 158, 153-162, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmcc.2021.05.011>
IF: 5.763





10. Kiss, D. Z., Horváth, B., Hézső, T., **Dienes, C.**, Kovács, Z. M., Topal, L., Szentandrassy, N., Almássy, J., Prorok, J., Virág, L., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P., Magyar, J.: Late Na⁺ Current Is [Ca²⁺]_i-Dependent in Canine Ventricular Myocytes. *Pharmaceuticals (Basel)*. 14 (11), 1142, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14111142>
IF: 5.215
11. Hézső, T., Naveed, M., **Dienes, C.**, Kiss, D. Z., Prorok, J., Árpádfy-Lovas, T., Varga, R., Fujii, E., Mercan, T., Topal, L., Kistamás, K., Szentandrassy, N., Almássy, J., Jost, N., Magyar, J., Bányász, T., Baczkó, I., Varró, A., Nánási, P. P., Virág, L., Horváth, B.: Mexiletine-like cellular electrophysiological effects of GS967 in canine ventricular myocardium. *Sci. Rep.* 11, 9565, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-88903-3>
IF: 4.996
12. Horváth, B., Hézső, T., Szentandrassy, N., Kistamás, K., Árpádfy-Lovas, T., Varga, R., Gazdag, P., Veress, R., **Dienes, C.**, Baranyai, D., Almássy, J., Virág, L., Nagy, N., Baczkó, I., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P.: Late sodium current in human, canine and guinea pig ventricular myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 139, 14-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.12.015>
IF: 5
13. Veress, R., Baranyai, D., Hegyi, B., Kistamás, K., **Dienes, C.**, Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrassy, N., Horváth, B.: Transient receptor potential melastatin 4 channel inhibitor 9-phenanthrol inhibits K⁺ but not Ca²⁺ currents in canine ventricular myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 96 (10), 1022-1029, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2018-0049>
IF: 2.041

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 60,923

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,808

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2023.12.05.