

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A SEA0400 hatása az emlős kamrai szívizom kalcium homeosztázisára

Birinyi Péter



Témavezetők:

Dr. Nánási Péter és Dr. Magyar János

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

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 membránpotenciál-változások 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) felszabaduló Ca^{2+} -hoz köthető, amely az SR membránjában található Ca^{2+} -csatornákon, a ryanodin-receptorokon (RyR2) keresztül lép ki az SR ürteréből. 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 sejtéből. 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 változások és az élettani funkció között. 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. Az energiaigényes folyamat akkor zárul le, amikor a Ca^{2+} -szint az összehúzódás előtti nyugalmi értékre tér vissza. A Ca^{2+} -tranziens relaxációja is három kompetitíven működő mechanizmus eredménye. A sejtplazma szabad Ca^{2+} -tartalmának legalább kétharmadát az SR veszi vissza az SR membránjában lévő Ca^{2+} -ATPáz (SERCA) segítségével. Az NCX fajtól függően a sejtplazma szabad Ca^{2+} -tartalmának 7-30%-át távolítja el a sejtéből és csak egy igen kis Ca^{2+} mennyiség távozik a lassú Ca^{2+} -transzport rendszereken: a szarkolemmális Ca^{2+} -ATPázon és a mitokondriális Ca^{2+} -transzporton keresztül.

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

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

emlős sejttípus felszíni membránjában megtalálható, a szívizomban már 40 éve azonosították. Az NCX elektrogén voltát először Mullins vetette fel felismerve, hogy a cseremechanizmus $3 \text{ Na}^+ / 1 \text{ Ca}^{2+}$ ionarányal működik. A cseremechanizmus mindkét irányba funkcionál: lehetséges 3 Na^+ transzportja intracelluláris irányba és 1 Ca^{2+} transzportja extracelluláris irányba vagy fordítva. Az NCX aktuális működésének irányát az elektrokémiai hajtóerő határozza meg, amely a mindenkori membránpotenciál és az NCX egyensúlyi potenciáljának különbségéből számítható. A hajtóerő nagysága és ezért a transzport intenzitása tehát a megfelelő ionkoncentrációktól (az extracelluláris és intracelluláris tér Na^+ - és Ca^{2+} -koncentrációitól), valamint a membránpotenciál nagyságától függ. Fentiek értelmében az NCX működhet úgy, hogy befelé irányuló (inward) áramot generálva Ca^{2+} -ot távolít el a sejtől ("forward mode operation"), vagy fordítva, amikor kifelé irányuló (outward) áramot indukálva Ca^{2+} -ot juttat a sejtbe ("reverse mode operation"). Az NCX tehát - részben a sejt 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.

1/3. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus szerepe az aritmogenezisben

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

A digitálisz származékok, mint pozitív inotrop hatású szerek, főleg a Na^+/K^+ ATPáz gátlása útján hatnak. Az intracelluláris térben a megnövekedett Na^+ -koncentráció

hatására az NCX a Na^+ -ot kifelé, míg a Ca^{2+} -ot a szívizomsejtbe szállítja. Az intracelluláris térben a megnövekedett Ca^{2+} -koncentráció erősebb kontrakciót fog kiváltani. Digitálisz-intoxikáció során a szívizomsejtek túltöltődnek Ca^{2+} -mal és aritmiák alakulnak ki. "Reverse mode" NCX-gátlással a digitálisz-aritmia kivédhető, hiszen ily módon megelőzhető a szívizomsejt Ca^{2+} -mal való túltöltődése és a következményes utódepolarizációk kialakulása.

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

Ha egy transzportrendszer működését kívánjuk vizsgálni, akkor célszerű, 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 gátolják a Na^+/H^+ cseremechanizmust is. Néhány kétszeresen illetve háromszorosan pozitív kation is gátolja az NCX-et. Ezek közül leggyakrabban a nikkell ionokat használják NCX-gátlásra, mivel gátló hatásuk reverzibilis. Mivel ezek a polivalens kationok más kationcsatornákat is gátolnak, nem tekinthetők szelektív NCX-gátlószereknek.

Az elmúlt években új fejlesztésű, hatásos NCX-gátlók kerültek bemutatásra. Ezen molekulákat az NCX Ca^{2+} -homeosztázisban betöltött szerepének a tanulmányozására használták intakt sejtekben fiziológiás körülmények között. Ilyen vegyület az SN-6 (2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester), amely egyaránt kedvezően csökkenti az intracelluláris Na^+ -aktivált Ca^{2+} -beáramlást és az intracelluláris Ca^{2+} -aktivált Na^+ -beáramlást. A molekula már alacsony dózisban hatásosan véd a hipoxia/reoxigenizáció indukálta sejtkárosodás ellen. A szert hipoxiás/iszkémiás állapotokban javasolják.

Bár a fenoxi-benzil származék KB-R7943-at (2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]-isothiourea) is az NCX szelektív gátlása céljából fejlesztették ki, a farmakológiai vizsgálatok hamar bebizonyították, hogy már alacsony koncentrációban gátolja a Na^+ -áramot, az L-típusú Ca^{2+} -áramot és a különböző K^+ -áramokat. Jelenleg a 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).

I/5. A SEA0400 ismert hatásai

A SEA0400 a kísérleti körülmények és az alkalmazott szerkoncentrációk függvényében csökkentette tengerimalac szívizomsejteken a befelé valamint kifelé irányuló NCX-áramokat. A SEA0400 ezirányú 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 μM koncentrációban sem a gyors Na^+ -áramra, sem a vizsgált K^+ -áramokra tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken.

A vegyület szignifikánsan csökkentette iszkémia/reperfúzió után az infarktusos terület nagyságát patkányon, valamint nagytestű állatmodelleken (kutyán és sertésen). Kutyán a SEA0400 az NCX-blokkolásán keresztül jelentősen csökkentette a digitális-túladagolás által kiváltott aritmiák gyakoriságát, továbbá a korai és késői utódepolarizációk kialakulását. Izolált nyúl szíven a SEA0400 koncentráció-függő módon csökkentette az infarktus nagyságát és 1 μM koncentrációban javította a posztisztkémias 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.

Az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a SEA0400 egy igen hatásos és valószínűleg magas 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 rendelkeznek. Ezt azért tartottuk fontosnak, mert a kistestű rágcsálók (patkány, egér) és a nagytestű emlősök szívműködése mind elektrofiziológiai szempontból, mind a Ca^{2+} -háztartás szempontjából nagyon jelentős különbségeket mutat. Kísérleteinkhez ezért elsősorban kutya szívet használtunk, mert elektrofiziológiai sajátosságai (akciós potenciál és transzmembrán ionáramok) alapján ez hasonlít legjobban a humán szívhez.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja a SEA0400 kódjelű NCX-gátló membránáramokra és a szívizomsejtek 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 Ca^{2+} -tranziensének amplitúdóját, a diasztolés és szisztolés Ca^{2+} -koncentrációkat, valamint a sejtrövidülést?
2. Milyen hatása van a SEA0400-nak a kutyaszívből izolált SR vezikulákból történő Ca^{2+} -felszabadulásra és a vezikulák Ca^{2+} -felvételére?
3. Módosítja-e a SEA0400 a lipidkettősrétegbe beépített izolált RyR2 csatornák kapuzását?
4. Befolyásolja-e a SEA0400 a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} -érzékenységét?
5. A SEA0400 NCX-gátló hatásán túlmenően módosítja-e a Ca^{2+} -háztartás másik fontos tényezőjét, az L-típusú Ca^{2+} -csatornán keresztül belépő 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 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 az NCX szelektív gátlószerének és klinikailag ígéretes hatású vegyületnek.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III/1. Elektrofiziológiai vizsgálatok

III/1.1. Szívizomsejtek izolálása kutya bal kamrájából

Elektrofiziológiai méréseinkhez enzimatikusan izolált kutya kamrai szívizomsejteket használtunk, amelyeket szegmentperfúziós eljárással nyertünk. Az állatok altatása után eltávolítottuk a szívet, majd Tyrode-oldattal átmostuk. Kanüláltuk a bal elülső leszálló koronária artériát (LAD) és a preparátumot kalciummentes JMM oldattal 5 percig perfundáltuk. Ezután 1 mg/ml CLS-2 típusú kollagenáz enzimet, 2 mg/ml borjú szérum albumint és 50 μM CaCl_2 -ot tartalmazó JMM oldattal kb. 30 percig emésztettük a szívet 37 °C-on. Az így nyert izolált bal kamrai sejteket a felhasználásig JMM tápoldatban 15 °C-on tároltuk.

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

Az NCX-áramot kutya kamrai szívizomsejteken patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában 37°C-on mértük. Az NCX-áram mérésekor egy speciális K^+ -mentes extracelluláris oldatot használtunk. Az oldathoz 20 μM ouabaint, 1 μM nisoldipint és 50 μM lidocaint adva a Na^+/K^+ pumpa áramát, a Ca^{2+} -áramot és a Na^+ -áramot gátoltuk. Az NCX-áram méréséhez használt háromszög alakú 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. A kontroll áramgörbék rögzítése után alkalmaztuk a SEA0400-t, végül a teljes NCX-áramot 10 mM NiCl_2 hozzáadásával gátoltuk. Ily módon az NCX-áramot a NiCl_2 -szenzitív áramként definiálva megállapítottuk, hogy az áram mekkora hányadát gátolta a SEA0400.

III/1.3. Az L-típusú Ca^{2+} -áram mérése feszültség-clamp technikával

Az $I_{\text{Ca,L}}$ -áramot kutya kamrai szívizomsejteken patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában 37°C-on mértük Tyrode-oldatban. 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, mely membránpotenciálon a gyors Na^+ -csatornák inaktiválódtak, így nem zavarták

az $I_{Ca,L}$ mérését. 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. Az $I_{Ca,L}$ mérése során a mintavételezés az első 20 ms során 20 μ s-onként, ezt követően 200 μ 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. 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 regisztrált áramjelünk nulla lesz, hiszen az egészséges sejt számára semmilyen külső áramra nincs ahhoz szükség, hogy saját akciós potenciálját fenntartsa. Akciós potenciál clamp technikával elvileg 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 ionáramok egyikét - azt, amelyiket blokkoltunk - intracelluláris erősítőnk fogja biztosítani. Az egyes ionáramok "ujjlenyomatainak" ismeretében megállapítható, hogy a vizsgált molekula milyen ionáramokat gátol, vagy aktivál. Az akciós potenciál clamp mérésekhez a hagyományos feszültség-clamp technikánál alkalmazott mérőrendszert használtuk.

III/1.5. Ionárammérések kutyaszívából izolált és mesterséges lipidkettősrétegbe ágyazott ryanodin receptoron

Kutya szívének bal kamrájából nehéz SR vezikulákat izoláltunk, majd a szolubilizált RyR2-t tisztítottuk. A RyR2-t lipidkettősrétegbe építettük be, majd ezt a kettősréteget egy 250 μ m átmérőjű nyílásra feszítettük ki. A kettősréteg egyik oldalát cisz oldalnak, a másikat transznak neveztük el, ezen utóbbit elektromosan földeltük. A feszültség-clamp körülmények között kapott áramjeleket 1 kHz frekvencián 8 pólusú Bessel szűrő segítségével szűrtük, majd 3,3 kHz-en analóg-digitális átalakítás után rögzítettük. 250 mM K^+ -ot használva töltéshordozóként a 400 pS-nél magasabb vezetőképességgel rendelkező csatornákat tekintettük RyR2-nek. A SEA0400 hozzáadása a cisz (citoplazmatikus) oldalon történt. Minden kísérlet végén 2 μ M ryanodint adtunk a cisz oldal folyadékához a csatornabeépülés irányának megállapítása

céljából. A méréseket 23 °C-on végeztük, a szabad Ca^{2+} -koncentráció értékeit mindkét kompartmentben a Fabiato által közölt számítógépes program és stabilitási állandók segítségével határoztuk meg.

III/2. A 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 300-500 g tömegű hím tengerimalacokat elaltattuk, majd mellkasuk megnyitása után a szívet gyorsan eltávolítottuk és a Langendorff perfúziós rendszer kanüljéhez rögzítettük. Perisztaltikus pumpa segítségével a koronáriákat 37 °C-os Krebs oldattal perfundáltuk. A bal kamrai nyomás folyamatos mérésére egy a bal kamra üregébe helyezett Braun 2021-02 típusú artériás nyomásmérőt alkalmaztunk. A szív ingerlése 200/perc-es frekvenciával a bal pitvar üregébe vezetett elektróda segítségével történt. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek mérése egy acetoxi-metilészter formájában bejuttatott kalciumérzékeny fluoreszcens festék, a Fura-2 segítségével történt. A festéket 340 és 380 nm-es hullámhosszon gerjesztve, az emittált fényt 510 nm-en összegyűjtve Deltascan rendszer segítségével regisztráltuk a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranzienseket. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ számolásához a háttérre-korrigált fluoreszcencia intenzitások hányadosát (F_{340}/F_{380}) használtuk. Az analóg fluoreszcencia jeleket és nyomásértékeket 1 kHz gyakorisággal mintavételeztük. Mindkét esetben 10 egymást követő kontrakció során mért értékek átlagát képeztük, és az így kapott adatokat a későbbi elemzés céljából számítógépen rögzítettük.

III/2.2. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változások és a sejtrövidülés követése kutyából izolált kamrai szívimomsejteken

A korábban leírt módon, szegmentperfúziós technika alkalmazásával nyert szívimomsejteket 2 μM Fura-2-AM jelenlétében 30 percig inkubáltuk, majd Tyrode-oldatban 37 °C-on tartottuk. A sejteket extracellulárisan elhelyezett platina elektródapáron keresztül 1 Hz frekvencián ingereltük. A sejteket xenon ívlámpa segítségével 360 és 380 nm hullámhosszúságú fényel gerjesztettük. Az alkalmazandó hullámhosszokat galvanometrikus monokromátor segítségével választottuk ki. Az emittált fényt egy szűrőn keresztül egy fotoelektronsokszorozóval detektáltuk. Az így kapott optikai jeleket az Acquisition Engine Program alkalmazásával rögzítettük és analizáltuk. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásait a 360 és a 380 nm hullámhosszak által gerjesztett

fluoreszcencia intenzitás hányadosával jellemeztük (F_{360}/F_{380}). Az így kapott értékeket minden esetben a nonspecifikus háttérre és a kioltásra korigáltuk. A sejtrövidülés méréséhez videódetektor rendszert 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 metallokróm festék segítségével, 37 °C-on követtünk nyomon. A méréseket 1x1 cm alapú küvettákban, Fluoromax spektrométerben végeztük. A vezikulán kívüli Ca^{2+} -koncentrációt a másodpercenként mintavételezett 710 és 790 nm hullámhosszokon történő fényelnyelés különbségéből számoltuk, majd analóg-digitális átalakítás után a későbbi kiértékelésig számítógépen rögzítettük. A küvettában a vezikulák kalciummal való töltését megfelelő mennyiségű $CaCl_2$ hozzáadásával, a Ca^{2+} -felvétel elindítását 1 mM ATP hozzáadásával végeztük. Az ATP-ADP átalakulás befejezése után az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentrációt Ca^{2+} hozzáadásával 20 μ M értékre állítottuk be abból a célból, hogy a RyR2 csatornák aktivált állapotba kerüljenek. A Ca^{2+} -kiáramlás stabilizálódását követően alkalmaztuk a SEA0400-at. Közvetlenül a SEA0400 hozzáadása előtt és után meghatároztuk a kalciumfelszabadulás mértékét, amelyet a görbe meredekségéből számoltunk. A SEA0400 hatását megvizsgáltuk a nyugalomban lévő (zárt) RyR2 csatornákra is. ilyenkor a vezikulák töltése után az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentrációt 2 μ M értékre állítottuk be - ilyenkor a csatorna aktivációja viszonylag csekély mértékű - majd SEA0400 kezelést végeztünk. A Ca^{2+} -kiáramlás mértékét a fényintenzitás változásából számoltuk. A kísérlet végén 2 μ M koncentrációjú A23187 Ca^{2+} -ionofor segítségével a vezikulák teljes Ca^{2+} -tartalmát felszabadítottuk.

Megvizsgáltuk a SEA0400 hatását a könnyű SR vezikulák (LSR) Ca^{2+} -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. A Ca^{2+} -felvételt ATP és Ca^{2+} hozzáadásával indítottuk el. A Ca^{2+} -felvétel mértékét, minden esetben a Ca^{2+} hozzáadása után határoztuk meg, amelyet a fényintenzitás-változás meredekségéből számoltunk egy az átlagot jól

reprezentáló 30 és 150 s közötti időtartam analízise során.

III/2.4. Kontraktilis funkciók vizsgálata kutyából izolált permeabilizált szívizomsejteken

A lefagyasztott szövetmintákból különálló sejteket mechanikai izoláció segítségével állítottunk elő. Az izolált sejtek membránját a mérés előtt 5 percig 0,5%-os triton-X-100 kezeléssel aspecifikusan permeabilissá 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 mérésekhez szükséges relaxáló és aktiváló oldatok összetételét a számítógépes program szerint határoztuk meg. Az alap relaxáló és aktiváló oldatok Ca^{2+} -koncentrációja rendre $\text{pCa}=10$ és $\text{pCa}=4,75$ volt. A két oldat arányának változtatásával tetszőleges Ca^{2+} -koncentrációjú oldatot állíthattunk elő. A szívizomsejt relaxáló oldatból aktiváló oldatba történő átvitelét a kontraktilis erő fokozódása követte. Az összehúzódás amplitúdóját több különböző Ca^{2+} -koncentrációjú aktiváló oldatban meghatározva lehetőség nyílt a Ca^{2+} -érzékenység görbéjének megszerkesztésére, és ebből a félmáximális erőt eredményező Ca^{2+} -koncentráció, az úgynevezett pCa_{50} érték, meghatározására.

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.

IV. EREDMÉNYEK

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

A SEA0400 hatását 0,3 és 1 μM koncentrációban vizsgáltuk 25-25 percen keresztül 6 Langendorff szerint perfundált tengerimalac szíven. Nem találtunk szignifikáns változást a szisztolés nyomásban, (kontroll körülmények között $55,5 \pm 2,7$ Hgmm, míg 0,3 és 1 μM 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 μM SEA0400 jelenlétében rendre $6,8 \pm 0,4$ illetve $6,4 \pm 0,4$ Hgmm) és a pulzusnyomásban sem (rendre $49,5 \pm 2,8$, $51,8 \pm 3,5$ és $46,6 \pm 3,8$ Hgmm). A fluoreszcencia-hányados értékeket, amelyekkel az intracelluláris kalciumtranziens paramétereit jellemeztük, a SEA0400 szintén nem változtatta meg. A fluoreszcencia-hányados csúcsértékei a következők voltak: kontroll körülmények között: $1,04 \pm 0,01$, míg 0,3 és 1 μM SEA0400 jelenlétében rendre $1,04 \pm 0,02$ és $1,05 \pm 0,03$. Az alapvonalnál mért fluoreszcencia-hányadosok rendre a következők voltak: $0,81 \pm 0,04$, $0,81 \pm 0,04$ és $0,83 \pm 0,04$, míg a fluoreszcencia-hányadosok amplitúdói: $0,23 \pm 0,03$, $0,22 \pm 0,03$ és $0,22 \pm 0,03$. 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 nyomásgörbék és a kalciumtranziensek kinetikai paramétereiben. Meghatároztuk a bal kamrai nyomás, valamint a kalciumtranziens csúcsértékének kialakulásáig eltelt időt (TtP), a félrelaxációs időt (HRT) és a bal kamrai nyomásgörbe idő szerinti első deriváltjának maximum és minimum értékeit a szisztolé illetve diasztolé alatt (+dP/dt, -dP/dt). Nem találtunk szignifikáns változást ezen paraméterek vizsgálata során. A kalciumtranziens lecsengésének időállandóját monoexponenciális függvénnyel határoztuk meg a relaxáció 30%-ától a 90%-áig terjedő szakaszának illesztésével. Bár 0,3 és 1 μM SEA0400 nem változtatta meg szignifikánsan sem a HRT, sem a TtP értékeit a kalciumtranziens esetében sem, a kalciumtranziens lecsengésének időállandóját viszont szignifikánsan növelte 127 ± 7 ms-ról 0,3 μM SEA0400 jelenlétében 165 ± 7 ms-ra, míg 1 μM SEA0400 esetében 177 ± 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.

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

Az izolált szívizomsejteket elektronikus stimulátorral 1 Hz frekvencián ingereltük. Miután a sejtrövidülés és $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek paraméterei egyensúlyba kerültek a sejteket 0,1, 0,3, és 1 μ M koncentrációjú SEA0400 tartalmú oldattal perfundáltuk 5 percig, amely elegendő volt a teljes hatás kialakulásához. A SEA0400 alkalmazása előtt és után regisztráltuk a $[Ca^{2+}]_i$ -tranzienseket és a sejtrövidülést. A diasztolés fluoreszcencia hányados, az F_{360}/F_{380} amplitúdó és a sejtrövidülés esetében a kapott átlagértékeket a kontroll százalékában adtuk meg. A mért adatok alapján megállapítottuk, 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 μ M extravezikuláris Ca^{2+} jelenlétében. Az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentráció emelésének hatására a RyR2 csatornák nyitott állapotba kerültek. A SEA0400 alkalmazása nem módosította a Ca^{2+} -felszabadulás sebességét, 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 μ 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 is. 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 fokozza a Ca^{2+} -felszabadulás sebességét. Ezzel szemben az A23187 nevű Ca^{2+} -ionofor molekula már 2 μM koncentrációban erőteljes Ca^{2+} -felszabadulást okozott, amely a vezikulák kalciummal való megfelelő töltöttségét bizonyítja. A fenti körülmények mellett, a SEA0400 alkalmazása előtti Ca^{2+} -felszabadulás mértéke $2,2 \pm 0,31$ nmol/perc/mg fehérje volt, míg 0,3, 1 és 3 μM SEA0400 jelenlétében rendre $2,2 \pm 0,3$, $2,3 \pm 0,28$, és $2,3 \pm 0,3$ nmol/perc/mg fehérje értékeket mértünk ($n=6$). Ebből arra következtetünk, hogy a SEA0400 nem fokozza a RyR2 csatornákon keresztül megvalósuló Ca^{2+} -felszabadulást.

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

Az SR kalciumpumpájának aktivitását az LSR vezikulák kezdeti Ca^{2+} -felvételének sebességéből határoztuk meg oly módon, hogy maximális pumpa aktivitás mellett mértük az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentráció változását az idő függvényében. A Ca^{2+} -felvétel sebességét meghatároztuk kontroll körülmények között valamint 0,3, 1 és 3 μM SEA0400 jelenlétében. A kezdeti Ca^{2+} -felvétel sebessége azonos volt a SEA0400 általunk vizsgált valamennyi koncentrációjánál és a kontroll esetében. Ezen eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a SEA0400 nem módosította az intracelluláris térből az SR lumenébe történő Ca^{2+} -felvétel intenzitását.

IV/5. A SEA0400 hatása kutya bal kamrájából származó és lipidkettősrétegbe beépített szívizomsejtek RyR2 csatornáira

Bár 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. A cisz oldali 50 μM Ca^{2+} jelenlétében a csatornák szinte teljesen nyitva voltak, a nyitvatartási valószínűség értéke megközelítette az 1-et ($P_0=0,987 \pm 0,047$). Amikor a cisz oldalon lévő Ca^{2+} -koncentrációt 472 nM-ra csökkentettük, a csatornák nyitvatartási valószínűsége $0,043 \pm 0,008$ értékre csökkent. 3 μM SEA0400 hozzáadása után sem a csatornák nyitvatartási valószínűsége ($P_0=0,032 \pm 0,005$, $n=6$), sem a nyitott csatornák vezetőképessége nem változott szignifikánsan. A reprezentatív mérésekből nyitvatartási idő hisztogramot készítettünk kontroll körülmények között és 3 μM SEA0400 jelenlétében. Az így kapott értékeket

biexponenciális függvénnyel illesztettük meg. A kontroll körülmények között kapott eredményekkel összevetve a 3 μM SEA0400 sem a gyorsabb, sem a lassúbb nyitvatartási időállandót nem módosította szignifikánsan. Összefoglalva, a 3 μM SEA0400 sem a RyR2 kapuzási kinetikáját sem a nyitott csatorna vezetőképességét nem módosította.

IV/6. A SEA0400 hatása a kutya bal kamrájából származó szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek Ca^{2+} -érzékenységre

Mivel a kontrakció nagyságát az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráción kívül a kontraktilis fehérjék 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 Ca^{2+} -koncentrációját lépcsőzetesen emeltük. Így meg tudtuk mérni a preparátum félaktivációs Ca^{2+} -koncentrációját ($p\text{Ca}_{50}$). A méréseink alapján a $p\text{Ca}_{50}$ értéke 6,4 volt. A maximális izometriás Ca^{2+} -aktivált erő (P_{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 μM SEA0400 jelenlétében mértük az erő kialakulását $p\text{Ca}=6,4$ mellett. A SEA0400-at DMSO-ban oldottuk fel, ezért megvizsgáltuk a DMSO hatását is a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} -érzékenységre. A Ca^{2+} -aktivált kontraktilis erő nagyságát a P_{max} százalékában kifejezve kontroll körülmények között $0,55 \pm 0,03\%$ -ot, DMSO-ban $0,55 \pm 0,04\%$ -ot és 1 μM SEA0400 jelenlétében $0,57 \pm 0,03\%$ -ot kaptunk. Mérési eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy sem a SEA0400, sem a DMSO nem változtatta meg a szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek Ca^{2+} -érzékenységet.

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 kutyaszívből enzimatikusan izolált kamrai szívizomsejteken. A SEA0400 hatását az NCX forward mode (inward áram), valamint reverse mode (outward áram) működésére egyaránt megvizsgáltuk.

A kifelé és befelé irányuló Ni^{2+} -érzékeny NCX-áramok meghatározásához +60 mV-tól -100 mV-ig tartó leszálló feszültség rámpa protokollt használtuk. A kifelé és

a befelé irányuló NCX-áramokat rendre +40 és -80 mV feszültség értékeken olvastuk le. A SEA0400 növekvő koncentrációit (mindegyiket 3 percig) kumulatíván alkalmaztuk. 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 μM volt, de még ez a koncentráció is kevésnek bizonyult az NCX-áram teljes gátlásához.

A SEA0400 hatásának NCX-áramon való tanulmányozásakor a pipettaoldat szabad Ca^{2+} -koncentrációját a mérések során 55, 140, 500 és 1000 nM koncentrációkra állítottuk be CaCl_2 és EGTA megfelelő arányú hozzáadásával. Az 1 μM SEA0400 gátló hatása az NCX-áramon az intracelluláris kalciumkoncentráció függvényében változott: a gátlás a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedésével folyamatosan csökkent. 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 amplitúdójára.

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. A SEA0400 - a KB-R7943-hoz hasonlóan - dózis-függő módon csökkentette az $I_{\text{Ca,L}}$ -t. A KB-R7943 kumulatív dózis-hatás görbéjének Hill egyenlettel történő illesztése során a félgátló koncentráció (EC_{50}) értéke $3,2 \pm 0,36 \mu\text{M}$, 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, míg a Hill koefficiens értékére $1,1 \pm 0,01$ -et kaptunk. A kapott adatok alapján megállapítottuk, hogy mindkét vizsgálandó szer hasonló hatáserősséggel gátolta az L-típusú kalciumáramot.

A KB-R7943 $I_{\text{Ca,L}}$ -ra kifejtett gátló hatása viszonylag gyorsan (egy percen belül),

stabilizálódott és nagyrészt kimosható volt, bár az eredeti áramamplitúdót a 15 perces kimosás után sem érte el. 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. A két vizsgált szer hatását a fluoxetinével hasonlítottuk össze, amelyről tudjuk, hogy reverzibilisen gátolja az L-típusú kalciumáramot. Kísérleti körülményeink között a fluoxetin gátló hatása már a kimosás 3. perce után visszatért a kontroll érték közelébe, ami azt bizonyítja, hogy a tapasztalt amplitúdó-csökkenés nem „rundown” következménye volt, továbbá a SEA0400 hatása valóban csak lassan és csak részlegesen mosható ki a szívizomsejtből.

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 mV -os lépésközökkel -30 és $+40 \text{ mV}$ közötti, 400 ms hosszú depolarizáló tesztimpulzusokat alkalmaztunk -40 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.

Mindkét szer jelentősen módosította az $I_{Ca,L}$ steady-state inaktivációjának feszültség-függését. Az $I_{Ca,L}$ steady-state inaktivációjának vizsgálatánál kettős impulzus protokollt használtunk. Először egy 500 ms hosszú -55 és $+15 \text{ mV}$ közötti 5 mV -os lépésközzel növekvő előimpulzust, ezt követően pedig egy 400 ms időtartamú $+5 \text{ mV}$ -ra depolarizáló tesztimpulzust alkalmaztunk. A különböző nagyságú előimpulzusokat követő tesztimpulzusokkal kiváltott csúcsáramokat a -55 mV előimpulzust követő tesztimpulzussal 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 inaktívált 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 toltta el. A görbe eltolódásának mértéke a $10 \mu\text{M}$ SEA0400 jelenlétében 12 ± 2 mV-nak, a $10 \mu\text{M}$ KB-R7943 esetében 5 ± 1 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 $I_{Ca,L}$ amplitúdóját az első impulzus alatt mért amplitúdóra normalizáltuk és az így kapott hányadost (I_2/I_1) a két impulzus között eltelt idő függvényében ábrázoltuk. Az ábrázolt pontokat monoexponenciális függvénnyel illesztettük. Mindkét szer hatására az L-típusú Ca^{2+} -csatorna inaktivációból való visszatérési időállandójának szignifikáns növekedését tapasztaltuk. Míg kontroll állapotban az inaktivációból való visszatérés időállandója $301 \pm 31,5$ ms volt, $10 \mu\text{M}$ SEA0400 kezelést követően $1101 \pm 230,2$ ms, míg $10 \mu\text{M}$ 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 $10 \mu\text{M}$ SEA0400 által okozott lassulás lényegesen nagyobb volt, mint a KB-R7943-nál tapasztalt változás. 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 ($0,3 \mu\text{M}$) csak csekély, kb. 5% nagyságú, míg magasabb koncentrációban ($1 \mu\text{M}$) 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 $1 \mu\text{M}$, vagy annál magasabb koncentrációk esetében a molekula $I_{Ca,L}$ -ra irányuló gátló hatásával is számolnunk kell.

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 lehetett eldönteni, amikor az egyes ionáramok sajátos "ujjlenyomatait" alapján a gátolt ionáramokat azonosíthattuk. Mindkét molekulát 10 μM koncentrációban alkalmaztuk. Az áramgörbe kezdeti szakaszán mindkét szer egy nagy amplitúdójú, gyorsan inaktíváló, kifelé irányuló áram gátlását okozta, amely a tranziens outward K^+ -áramnak felelt meg. A plató alatt egy szintén nagy amplitúdójú, de lassabban inaktíváló befelé irányuló áram gátlását figyeltük meg, amelyet $I_{\text{Ca,L}}$ -ként azonosítottunk. Végül, a terminális repolarizáció során ismét egy kifelé irányuló áramkomponens gátlását látjuk, amely valószínűleg a késői K^+ -áram gyors komponensének és a befelé egyenirányító nyugalmi K^+ -áramnak volt a keveréke. Méréseink alapján kijelenthetjük, hogy mind a SEA0400, mind pedig a KB-R7943 magas koncentrációi - a $I_{\text{Ca,L}}$ -on kívül - számos K^+ -áram gátlását is okozzák, tehát magasabb koncentrációknál egyik szer sem tekinthető szelektív NCX-blokkolószernek.

V. MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a SEA0400 hatását a felszíni membrán ionáramaira valamint az intracelluláris 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-blokkolószernek. Rövid válaszuk a feltett kérdésre az, hogy szubmikromólos koncentrációknál a SEA0400 egy olyan viszonylag szelektív NCX-gátló molekula, amely speciális tulajdonságai folytán (Ca^{2+} -függő hatás, dominánsan reverse mode gátlás) nem vezet a sejtek 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 Ca^{2+} -mal való túltöltődéstől. Ily módon válik lehetségessé az NCX-et hatékonyan gátolni anélkül, hogy fokoznánk a sejtek 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 Ca^{2+} -háztartására kutyából és tengerimalacból származó kardiális preparátumokon. A SEA0400 NCX-gátló hatását korábban több munkacsoport vizsgálta, de a szelektivitás kérdését ezidáig nem sikerült megnyugtató módon tisztázni. Kísérleteink egyik célja éppen ezért a szelektivitás vizsgálata volt egy olyan preparátumon (kutya kamrai szívizomsejtek), amely ionáramainak valamint Ca^{2+} -háztartásának tekintetében meglehetősen hasonlít a humán szívizomhoz.

3 μM SEA0400 nem módosította a Ca^{2+} felszabadításáért felelős RyR2 csatorna vezetőképességét, kinetikai tulajdonságait. Nem befolyásolta sem a Ca^{2+} -felszabadulás, sem a Ca^{2+} -felvétel sebességét és nem változtatta meg a miofilamentumok Ca^{2+} -érzékenységét. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a SEA0400 nem befolyásolja közvetlenül az SR Ca^{2+} -forgalmát, azaz a szer esetleges 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 - ez azonban terápiás szempontból kifejezetten hasznos lehet.

Érdeemes ebből a szempontból a SEA0400 és a KB-R7943 vegyületeket összehasonlítani. Tengerimalacból izolált kamrai sejteken mások korábban azt találták, hogy leszámítva az $I_{\text{Ca,L}}$ -áramra irányuló kb. 10% gátlást, 1 μM SEA0400 nem módosított szignifikánsan egyetlen ionáramot sem az NCX-áramon kívül, míg a KB-R7943 10 μM 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 indokolt óvatosan fogalmazni, ugyanis mások tengerimalac kamrai sejteken a SEA0400-at 1 μM koncentrációban is szelektív szernek tartották. Az $I_{\text{Ca,L}}$

amplitúdójának 20%-os csökkenése (amelyet kísérleteinkben 1 μM SEA0400 jelenlétében találtunk) olyan mértékű kalciumbelépés-csökkenést jelent, amely nem hagyható figyelmen kívül a vegyület hatásmechanizmusának elemzése során. Az egészen magas koncentrációnál (10 μM) látott diverz ioncsatorna-gátlóhatás 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziens lecsengésének időállandóját növelte meg szignifikánsan, amely a molekula hatásának egyetlen - ugyanakkor rendkívül fontos - bizonyítéka. Az NCX-gátlás következtében a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -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 tengerimalac szíveken végzett kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a SEA0400 által kiváltott NCX-gátlás nem okozott intracelluláris kalcium akkumulációt, mivel sem a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -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. A várható pozitív inotrop hatás elmaradásáért kutya és tengerimalac szívek esetében az alábbi mechanizmusok tehetők felelőssé: 1. A SEA0400 nagyobb affinitással gátolta a „reverse mode” NCX-áramot, mint a „forward” irányút, azaz jobb hatásfokkal gátolta a kalciumbelépést, mint a kalciumkilépést az NCX-en keresztül. 2. A SEA0400 NCX-gátló hatása nagymértékben függ a sejtplazma szabad Ca^{2+} -koncentrációjától. 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 $I_{\text{Ca,L}}$ -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.

Fenti eredményeink élesen ellentmondanak a kistestű rágcsálók (patkány és egér) korábban kapott eredményeknek, ahol a SEA0400 növelte a kontrakció mértékét és a $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek amplitúdóját. Ez azzal magyarázható, hogy a kísérleti állatként gyakran használt kis testű rágcsálók a többiekétől eltérő akciós potenciál paraméterekkel és intracelluláris ionösszetétellel rendelkeznek. 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. A tengerimalac, kutya és az ember kamrai akciós potenciáljának időtartama kb. 250 ms és az intracelluláris Na^+ -koncentráció ezekben a fajokban kb. 8 mM. 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, 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 speciesek esetében (beleértve az embert is), az NCX-gátlás hatására nem változik szignifikánsan sem a $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens nagysága, sem a kontrakciós erő. A fentiek fontos gyakorlati jelentősége egyrészt az lehet, hogy a kistestű rágcsálók expliciten alkalmatlanok az NCX-gátlók 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 szívizomsejtekben a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció a korai reperfüzió alatt halmozott aritmiákat okozhat. A Ca^{2+} -túltöltődés kialakulása és ezáltal az aritmiák létrejötte az NCX szelektív gátlásával megakadályozható. 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 proaritmias mechanizmus iktatható ki anélkül, hogy a Ca^{2+} -túltöltődés fenyegetésével kellene szembenézni.

A SEA0400 NCX-re irányuló gátló hatását az intracelluláris Na^+ erősíti és az intracelluláris Ca^{2+} gyengíti. Ez megmagyarázza, hogy a SEA0400 miért véd az iszkémia/reperfúzió okozta Ca^{2+} -túltöltődés ellen. Az iszkémia/reperfúzió fennállásakor az NCX főleg „reverse” üzemmódban 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 $I_{\text{Ca,L}}$ -ra irányuló gátló hatása, elmarad a szívműködés fokozott Ca^{2+} -terhelése és a következményes reperfúziós aritmia kialakulása.

Az NCX-áram és az $I_{\text{Ca,L}}$ 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 szívműködésben ATP depléció alakul ki. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a SEA0400 egy ígéretes NCX-blokkoló szer, amelynek főleg az iszkémia/reperfúzióval együttjáró kóros állapotok kezelésében lehet terápiás alkalmazása.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Az NCX központi szerepet játszik a szívműködés Ca^{2+} -homeosztázisában, mivel a Ca^{2+} -elimináció legfontosabb celluláris mechanizmusa. Patológias körülmények között szerepet játszik életveszélyes szívritmuszavarok kialakulásában is. Az NCX szelektív gátlásával ezen aritmia kialakulása megelőzhető. Az irodalomban eddig bemutatott NCX-gátlók többségéről 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 Ca^{2+} -tranzienst és a kontraktilis válasz sajátságaira 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 sajátságai 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 Ca^{2+} -felszabadulást, sem az LSR vezikulákba történő Ca^{2+} -felvételt, sem a RyR2 receptorok kapuzási sajátságait, sem a szívizomsejtek kontraktilis fehérjéinek 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 Ca^{2+} -koncentráció emelkedése.
4. A SEA0400 koncentráció-függő módon gátolta az L-típusú 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 (Ca^{2+} -függő, dominánsan reverse mode gátlás) nem vezet a sejtek 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 Ca^{2+} -mal való túltöltődéstől. Ily módon válik lehetségessé az NCX-et hatékonyan blokkolni anélkül, hogy fokoznánk a sejtek Ca^{2+} -terhelését. A SEA0400-nak fenti tulajdonságai alapján várhatóan az iszkémia/reperfúzióval együttjáró kóros állapotok kezelésében lehet szerepe.

KÖZLEMÉNYEK

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ 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⁺/Ca²⁺ exchange current and L-type Ca²⁺ 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⁺/Ca²⁺ exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca²⁺ 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 Ca²⁺ transients and contractions in Langendorff-perfused guinea pig heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008; Közlésre elfogadva [IF=2.098]

TOVÁBBI, A TÉZISEKBEN FEL NEM HASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK:

Magyar J, Horváth B, Bányász T, Szentandrassy N, **Birinyi P**, Varró A, Szakonyi Zs, Fülöp F, Nánási PP: L-364,373 fails to activate the slow delayed rectifier K⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006;373:85-90 [IF=2.779]

Horváth B, Magyar J, Szentandrassy N, **Birinyi P**, Nánási PP, Bányász T: Contribution of I_{Ks} to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflügers Arch* 2006;452:698-706 [IF=4.807]

Bányász T, Magyar J, Szentandrassy N, Horváth B, **Birinyi P**, Szentmiklósi J, Nánási PP: Action potential clamp fingerprints of K⁺ currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiologica* 2007; 190:189-198 [IF=2.23]

Szabó A, Szentandrassy N, **Birinyi P**, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J: Effects of articaine on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. *Br J Anaesthesia* 2007;99:726-733 [IF=2.679]

Szabó A, Szentandrassy N, **Birinyi P**, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Magyar J, Nánási PP: Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Anesthesiology* 2008; Közlésre elfogadva [IF=4.207]

Farkas AS, Acsai K, Tóth A, Fülöp F, Seprényi Gy, **Birinyi P**, Nánási PP, Forster T, Csanády M, Papp JGy, Varró A, Farkas A: Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition exerts a positive inotropic effect in the rat heart, fails to influence the contractility of the rabbit heart. *Br J Pharmacol* 2008; Közlésre elfogadva [IF=3.825]

Fenti közlemények összesített impakt faktora: 30,549

ELŐADÁSOK:

A. Szabó, N. Szentandrásy, **P. Birinyi**, B. Horváth, G. Szabó, T. Bányász, I. Márton, J. Magyar, P. P. Nánási: Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology 31. találkozója; Manchester, 2007

Birinyi P., Magyar J., Horváth B., Szentandrásy N., Szabó., Nánási P.P.: Az articain (Ultracain) mellékhatás profiljának vizsgálata kutya kamrai szívműködéseken. Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése; Pécs, 2007

Horváth B., Harmati G., Szabó G., **Birinyi P.**, Szentandrásy N., Magyar J., Nánási P.P.: Kálium áramok szerepe a kutya kamrai szívműködés repolarizációjában akciós potenciál clamp körülmények között. Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése; Pécs, 2007

Szabó G., Horváth B., **Birinyi P.**, Szentandrásy N., Bíró T., Fülöp L., Magyar J., Nánási P.P.: Nemi hormonok hatása az EKG paraméterekre és ioncsatorna expresszióra kutyákban. Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése; Pécs, 2007

Bányász T., **Birinyi P.**, Horváth B., Nánási P.P.: A késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének szerepe az emlős miokardium repolarizációjában. Magyar Kardiológusok Társasága Tudományos Kongresszusa; Balatonfüred, 2005

Bányász T., **Birinyi P.**, Horváth B., Nánási P.P.: The role of the slow component of delayed rectifier potassium current in the repolarization of mammalian myocardium. Membrántranszport Konferencia; Sümeg, 2005

POSZTEREK:

G. Szabó, **P. Birinyi**, A. Szabó, N. Szentandrásy, B. Horváth, T. Bányász, I. Márton, J. Magyar, P. P. Nánási: Cardiac electrophysiological profile of articaine. European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology 31. találkozója; Manchester, 2007

Birinyi P., Magyar J., Horváth B., Szentandrásy N., Nánási P. P.: A Ropivacain (Naropin) mellékhatás profiljának vizsgálata emlős szívműködéseken. Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése; Szeged, 2006.

Horváth B., **Birinyi P.**, Bányász T., Nánási P. P.: Emberi és kutya szívműködés ioncsatornáinak megoszlása a bal kamra rétegeiben. Magyar Élettani Társaság LXIX. vándorgyűlése; Budapest, 2005.

Birinyi P., Horváth B., Nánási P. P., Bányász T.: Az ioncsatornák megoszlásának apico-basalis különbségei kutya és humán balkamrai szívműködésben. Magyar Élettani Társaság LXIX. vándorgyűlése; Budapest, 2005.

P. Birinyi, R. Koncz, G. Szabó, B. Horváth, T. Bányász, P. P. Nánási: Effects of SEA0400 and KB-R7943 on L-type calcium current in canine ventricular myocytes. European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology 28. találkozója; Szeged, 2004.