

**ENDOTELIN-1 ÉS STRESSZFEHÉRJE-INDUKTOROK
SZÍVELEKTROFIZIOLÓGIAI HATÁSAI**

Körtvély Ágnes

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET**

Debrecen, 2001

BEVEZETÉS

Kedvezőtlen környezeti és metabolikus változások túlélésére az élő szervezetek számos védőmechanizmust (komplex biokémiai, biofizikai és patofiziológiai változások együttesét) fejlesztettek ki. Ezen kompenzáló folyamatok közül a stresszfehérjék minden sejtben megtalálható potenciális védőmechanizmust jelentenek. A stresszfehérjéknek (gyakran nevezik őket hősokkfehérjéknek, Hsp) a sejtek fiziológias funkciójának fenntartása mellett fontos szerepük van a stresszhatások okozta károsodások kivédésében vagy mérséklésében, valamint a fiziológias funkció helyreállításában. Jelenlétük és megfelelő működésük elengedhetetlen feltétele a sejtek túlélésének a különböző stresszhelyzetekben. Ezért az olyan molekulák kifejlesztése, melyek a sejt számára kedvezőtlen helyzetekben indukálják a stresszfehérjék transzkripcióját vagy fokozzák azok aktivitását, nagy jelentőséggel bírnak. A stresszfehérjék keletkezését számos tényező befolyásolhatja, amelyek között egyaránt találunk fiziológias folyamatokat (egyedfejlődés, differenciálódás), környezeti tényezőket (hősokk, aminosav-analógok, átmeneti- és nehézfémionok) és patofiziológias állapotokat. Általánosan igaz, hogy a stressz nem minden formája hat minden sejtre egyaránt és a hatás mértéke változhat a különböző típusú sejtek esetén. A láz, gyulladás, vírus vagy baktériális fertőzés, ischaemia, oxidációs károsodás gyakran előforduló potenciális veszélyforrások a cardiovascularis szervrendszer és szűkebb értelemben a szívizomzat vonatkozásában. A szív funkciója azonban nemcsak ezen állapotokban károsodhat, hanem olyankor is, amikor felborul a különböző szabályozó folyamatok közötti egyensúly. Már régóta ismert, hogy az érfal és az endokardium endothelsejtjei fontos szabályozó szerepet játszanak a cardiovascularis rendszer működésében az általuk termelt hírvivő molekulákon keresztül, amelyek egyik csoportját az endotelin peptidcsalád képviseli. Fentiek fényében nem meglepő, hogy napjainkban egyre szélesebb körben vizsgálják a stresszfehérjék és az endotelinek szerepét a kardiovaszkuláris betegségek és egyéb kórfolyamatok patomechanizmusában. Bár az endotelinek cardiovascularis hatásait az utóbbi 15 év kutatómunkájának következtében

viszonylag jól ismerjük, celluláris szívelektrofiziológiai hatásaik nem kellően tisztázottak vagy ellentmondásosak.

Az endothelin peptidcsalád

Az 1988-ban először leírt, 21 aminosavból álló peptid három izoformája ismert, az ET-1, ET-2 és ET-3, amelyeket külön gének kódolnak. Ezen izopeptidek aminosav sorrendjében jelentős homológiát találtak. Nagyfokú szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutatnak a sarafotoxinokkal, az *Atractaspis engaddensis* mérgéből izolált peptidcsaláddal, ami a peptidok közös evolúciós eredetére utal. Bár a vascularis endothelsejtek az ET-1 fő forrásai, a kódoló gének megtalálhatók egyéb sejtekben is (pl. szívmusclesejtek, vaszkuláris simaizomsejtek, vesetubulusok epithelsejtjei, mesangium sejtek, gliasejtek, hipofízis sejtjei, makrofágok és hízósejtek), ami azt sugallja, hogy az endothelin peptidcsalád számos szerv működésének szabályozásában vesz részt. Az endothelinek hatásaikat részben G_i -fehérjékkel kapcsolt, 7 transzmembrán doménből álló receptorokon (ET_A és ET_B) keresztül fejtik ki többféle szignalizációs útvonal párhuzamos aktiválásával. A specifikus receptorok felfedezése fontos előrelépést jelentett a peptidcsalád cardiovascularis betegségei (krónikus szívelégtelenség, esszenciális és pulmonális hipertenzió, ischaemiás szívbetegségek) patomechanizmusában betöltött szerepének tisztázásában.

Az endothelinek vasoaktív és mitogén hatásaik mellett stimulálják egyes citokinek, növekedési faktorok termelődését és autokrin mechanizmussal befolyásolják a sejtciklus folyamatait. Az ET_A -receptorhoz kötődve vazokonstriktiót, sejtnövekedést, sejtheadhéziót, trombózt idézhetnek elő, mely hatások a foszfolipáz C enzimek (PLC) aktiválásának következményei. Az ET_B -receptorokon keresztül hatással vannak a NO és a prosztaciklinek

termelődésére, befolyásolják az apoptózis folyamatát és gátolják az endotelinkonvertáló-enzim (ECE) expresszióját.

Irodalmi adatok alapján az ET-1 emlős szívműködésre gyakorolt hatásai ellentmondásosak. Több emlős preparátumon pozitív inotrop és chronotrop, más esetekben hiperpolarizáló és akciós potenciál időtartamot rövidítő hatását írták le. Patkány kamrai sejteken nyújtotta az akciós potenciál időtartamát, míg tengerimalac és nyúl pitvari sejteken rövidítette azt. Különböző eredetű emlős preparátumokon kimutatták, hogy az ET-1 gátolta a PKA-dependens kloridáramot és a kalciumáramot, de növelte egyes káliumáramok amplitúdóját. Mindezek ismeretében kijelenthetjük, hogy az ET-1 ionáramokra gyakorolt hatásában jelentős fajok közötti különbségek vannak, ráadásul a megfigyelt hatások erősen függenek a vizsgált preparátum eredetétől (pitvari vagy kamrai) valamint a kísérleti körülményektől.

A bimoclomol és a BRX-005, mint Hsp-koinduktorok

A bimoclomol egy nemrég kifejlesztett citoprotektív hatású hidroxilamin származék, melyeknek akut és krónikus stresszhatások elleni protektív hatásait írták le különböző egészséges és patológiás állatmodelleken valamint sejtenyészeten. Kimutatták, hogy a vegyület gyorsította az égés ill. UVB sugárzás utáni sebgyógyulást, csökkentette a szubarachnoideális vérzéssel vagy arachidonsavval kiváltott vér-agy gát permeabilitás fokozódását. Krónikus bimoclomol kezeléssel helyre lehetett állítani a spontán hipertenzív patkányok aortagyűrűinek kóros acetilkolin érzékenységét. Diabéteszes állatmodellben csökkentette az angiopátiás szövődményeket, a neuropathia, retinopathia és nephropathia kialakulása csökkenthető, illetve kivédhető volt megfelelő bimoclomol előkezeléssel. A bimoclomol kardioprotektív és antiaritmiás hatását igazolták ischaemiás miokardiumon, ahol a szer jelentősen csökkentette a

pumpafunkció ischaemia hatására bekövetkező romlását, a perctérfogat csökkenésének nagyságát, valamint az ST-eleváció mértékét és a reperfúziós kamrai fibrilláció kialakulásának gyakoriságát. A BRX-005 a bimoclolomolhoz hasonló szerkezetű és aktivitású molekula (annak egyik követője), amelynek lehetséges hatásairól kevesebbet tudunk. Mindkét vegyület fontos tulajdonsága, hogy fiziológias körülmények között csak minimális mértékben fokozták a hősokkfehérjék termelődését, ugyanakkor a stresszhatások kivédésében igen hatékonyak bizonyultak: protektív hatásukat kifejtették trauma, sokk, égés esetén. Ezek a tulajdonságok összhangban vannak a molekulák Hsp-koinduktor hatásmechanizmusával.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám egyrészt az endotelin-1, másrészt a jelenleg intenzív fejlesztés alatt álló és sokrétű terápiás előnyöket ígérő, hősokkfehérje-koinduktor hatású molekulák (bimoclomol és BRX-005) emlős szívizomsejtek elektromos tevékenységére kifejtett hatásainak vizsgálatára irányult különböző eredetű (humán, kutya és tengerimalac) szívpreparátumokon.

Késérleteink során a következő fontosabb kérdések tisztázását tűztük ki célul:

1. Jellemezni kívántuk az ET-1 kalcium- és káliumáramokra gyakorolt hatását kutyából izolált kamrai szívizomsejteken.
2. Milyen szignalizációs útvonal(ak) igénybe vételével fejt ki hatásait az endotelin-1 az ET_A-receptorhoz való kötődés után?
3. Az egészséges humán szívből izolált sejteken nyert eredmények mennyire felelnek meg a kutya kamrai sejteken kapott adatoknak? Ennek alapján választ kívántunk adni arra a kérdésre, hogy a kutya szívizomsejt mennyire jó modellje a humán szívizomsejteknek az ET-1 hatásainak vizsgálatakor?
4. Célunk volt a hasonló Hsp-koinduktor hatással rendelkező bimoclomol és BRX-005 szívhatásainak összevetése, az esetleges különbségek feltárása.
5. Megpróbáltunk választ adni arra a kérdésre is, hogy vajon az ET-1, a bimoclomol és a BRX-005 sokrétű *in vivo* hatásai közül melyek és milyen mértékben vezethetők vissza az általunk vizsgált celluláris elektrofiziológiai hatásokra?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Sejtizolálás

Elektrofiziológiai kísérleteink többségét kutyaszívből enzimatikusan izolált kamrai sejteken végeztük, amelyeket szegmentperfúziós eljárással nyertünk. A kutya altatása után eltávolítottuk a szívet, amelyet normál Tyrode oldattal mostunk át. A bal elülső leszálló koronária ágat (LAD) kanuláltuk és 5 percig kalcium mentes JMM-oldattal (pH=7,0) perfundáltuk. A bal kamrai szegmens emésztése a JMM-oldathoz adott kollagenázzal történt (660 mg/l Worthington CLS-1), 2 g/l borjú szérum albumin és 50 μ M CaCl_2 jelenlétében. A kb. 30 perces emésztés után a sejteket felhasználásig 14°C hőmérsékletű tápoldatban (Minimum Essential Medium, pH=7,4) tároltuk. Hasonló eljárást követtünk a kardioplégias oldatban tárolt humán szívek esetében is, de ilyenkor a frissen izolált sejteket azonnal felhasználtuk.

2. Akciós potenciál elvezetése izolált szívizomsejtekről

A mérőedény aljára kitapadt szívizomsejteket 37 °C hőmérsékletű normál Tyrode oldattal perfundáltuk, amelynek összetétele a következő volt (mM-ban megadva): 150 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl_2 , 5 HEPES, 10 glükóz; pH=7,4. A sejtek membránpotenciáljainak regisztrálására használt 25-50 $\text{M}\Omega$ ellenállású üveg mikroelektrodát 3 M koncentrációjú KCl oldattal töltöttünk fel. A sejteket 1 ms időtartamú és a kétszeres ingerküszöbnek megfelelő amplitúdójú depolarizáló négyszögimpulzusokkal ingereltük a mérőelektrodán keresztül. Erősítés után (Axoclamp-2B) az akciós potenciálokat oszcilloszkóp képernyőjén monitoroztuk. A későbbi analízis céljából az adatok digitalizálását Digidata 1200 A/D kártya segítségével 100 kHz mintavételezési frekvencia mellett végeztük.

3. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

Az áramméréseink során használt patch pipetták ellenállása 2-3 M Ω volt. Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejt konfigurációjában, feszültség-clamp körülmények között mértük. A sejteket 37 °C hőmérsékletű Tyrode oldattal perfundált kádba szuszpendáltuk.

A kalciumáram mérésekor a káliumáramokat 4-aminopiridin (4-AP) és tetraetilammónium-klorid (TEACl) hozzáadásával gátoltuk. Az ekkor használt belső oldat összetétele az alábbi volt (mM-ban megadva): 110 KCl, 40 KOH, 10 EGTA, 10 HEPES, 20 TEACl, 3 K-ATP, 0,25 GTP, pH=7,3. Az L-típusú kalciumáramot ($I_{Ca,L}$) a 0,2 Hz frekvenciával alkalmazott, 400 ms hosszú depolarizáló négyszögimpulzusokkal váltottuk ki a -35 és +60 mV közötti feszültségtartományban, 5 mV-os lépésközökkel. A tesztimpulzusokat -40 mV tartó potenciálról alkalmaztuk. Az áramamplitúdókat a sejt kapacitására normalizálva adtuk meg.

A káliumáramok mérése során a kalciumáramot 5 μ M nifedipinnel gátoltuk. Ilyenkor az elektródákat a következő összetételű oldattal töltöttük fel (mM-ban megadva): 110 K-aszpartát, 45 KCl, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 3 K-ATP, 0,25 GTP, 5 HEPES, pH=7,4. A *transziens káliumáramot* (I_{to}) 400 ms hosszú, -80 mV-ról induló és 10 mV-os lépésközökkel növekvő depolarizáló négyszögimpulzusokkal aktiváltuk a -30 és +60 mV közötti feszültségtartományban. A *késői káliumáramnak* (I_K) két komponense van, melyek kinetikai tulajdonságokban és amplitúdóban egyaránt különböznek. Az izolált kutyasejteken történő méréseink során nem szeparáltuk a két áramkomponenst, mivel ekkor még nem állt rendelkezésünkre az egyes komponensek specifikus gátlószere. Ekkor az áramot egy 3 másodperc időtartamú, -40 mV-ról +60 mV-ra depolarizáló tesztimpulzussal aktiváltuk, majd a depolarizáció alatt aktiválódó áram, valamint a -40 mV-ra történő visszatérés után megjelenő úgynevezett farokáram amplitúdóját leolvastuk. Az így mért farokáram a késői káliumáram mindkét, lassú (I_{Ks}) és gyors (I_{Kr}), komponensét tartalmazta. A humán szívizomsejteken az ET-1 hatását a késői káliumáram

gyors komponensének farokáramán teszteltük, mivel humán sejteken a lassú komponens amplitúdója elhanyagolható.

Minden árammérés előtt kompenzáltuk a soros ellenállást, a pipetta kapacitását és a junkciós potenciált. A kapott áramjeleket Axopatch-200B erősítő segítségével erősítettük, amelynek kimenőjelét analóg-digitális átalakítás után mágneslemezen tároltuk. Az adatok gyűjtését és analízisét pCLAMP szoftver segítségével végeztük.

4. Bal kamrai nyomásgörbék és intracelluláris kalciumtranziensek regisztrálása dobogó szíven

Az altatott tengerimalacból kimetszett szívet Langendorff-oszlophoz csatlakoztatva 37 °C hőmérsékletű Krebs oldattal perfundáltuk, melynek mM-ban kifejezett összetétele a következő volt: 118 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, 0,5 Na₂EDTA, 0,23 KH₂PO₄, 5,5 glükóz. Az oldat pH-ját a 5% CO₂ és 95% O₂ gázkeverékkel oxigenizáltuk (pH=7,4). A koronária-áramlást perisztaltikus pumpával állandó értéken tartottunk. A bal kamrai nyomást folyamatosan monitoroztuk a bal kamra üregébe helyezett Braun 2021-02 artériás nyomásmérő transzdúcer segítségével. Az előterhelést 10 Hgmm, a szívfrekvenciát a bal pitvar folyamatos ingerlésével 3,3 Hz értékre állítottuk be. A kalciumtranziensek regisztrálása előtt a szívet fluoreszcens festék (Fura-2) acetoxi-metilészterével töltöttük fel. Gerjesztése két hullámhosszon (340 és 380 nm) történt, az emittált fényt 510 nm-en detektáltuk. Minden esetben 10 egymást követő analóg görbét átlagoltunk össze, és ezek kerültek későbbi elemzésre.

5. BRX-005 vazorelaxáló hatásának mérése izolált truncus pulmonális preparátumon

A tengerimalacból preparált és 37 °C hőmérsékletű Krebs oldattal perfundált artéria pulmonális (truncus pulmonális) érszegmens feszülését izometrikus körülmények között mértük a preparátumhoz rögzített mechanoelektromos transzdúcer és potenciometriás rekorder segítségével. A preparátumok nyugalmi feszülését 10 mN-ra állítottuk be, majd 120 percen

keresztül regisztráltuk a mérés előtt. A preparátumok feléről az endotél réteget mechanikusan eltávolítottuk, melynek sikerességét a 10 μM végkoncentrációjú ATP relaxáló hatásának kifejlődésével ellenőriztük. Minden kísérletben a preparátumot 1 μM fenilefrinnel előkezeltük, majd az ily módon kontrahált ereken vizsgáltuk BRX-005 kumulatív növekvő koncentrációinak hatását.

6. Statisztika

A kapott eredmények statisztikai értékelését ANOVA valamint Student féle t-próba segítségével végeztük, szignifikánsnak tekintve a $P < 0,05$ eseteket.

EREDMÉNYEK

1. Az ET-1 hatása a kutyából izolált kamrai szívizomsejtek kalcium- és káliumáramaira

Méréseinket izolált kutya miocitákon három különböző kísérleti elrendezésben végeztük. Nyugalmi intracelluláris cAMP koncentrációt tételeztünk fel az előkezeltlen sejteken (a). A cAMP koncentrációját 50 nM izoproterenol hozzáadásával emeltük meg (b), míg a maximális PKA-aktivációt a 250 μM 8-bromo-cAMP-ot tartalmazó belső oldat alkalmazásával értük el (c).

a) Az *L-típusú kalciumáram* amplitúdóját -35 és +60 mV közötti feszültségtartományban mértük 8 nM ET-1 jelenlétében és anélkül. Előkezeltlen sejteken az ET-1 32 \pm 5%-kal csökkentette a +5 mV-on mért $I_{\text{Ca,L}}$ csúcsamplitúdóját. A maximális hatás néhány percen belül kialakult és gyakorlatilag irreverzibilis volt ($P < 0,05$; $n=6$). Az ET-1 nem változtatta meg sem az $I_{\text{Ca,L}}$ aktivációjának feszültségfüggését sem az inaktiváció időállandóját. Endotelin-1 hatására nem változott meg a vizsgált káliumáramok (I_{K1} , I_{to} , I_{K}) amplitúdója, csupán a tranziens káliumáram inaktivációból való visszatérésének időállandója növekedett meg szignifikánsan (26,4 \pm 4,6 ms-ról 59,5 \pm 1,8 ms-ra).

b) Tanulmányoztuk az ET-1 proteinkináz A (PKA)-függő áramokra kifejtett hatását úgy, hogy az enzimrendszert 50 nM izoproterenollal részlegesen aktiváltuk. Az izoproterenol kezelés hatására a kalciumáram a kontroll érték $263 \pm 29\%$ -ára nőtt, ami ET-1 jelenlétében $17,8 \pm 2\%$ -kal csökkent. Ez százalékos értékben kisebb, de abszolút értékben nagyobb mértékű csökkenést jelent az előkezeletlen sejtekhez képest. Hasonló mértékben ($16,2 \pm 1,5\%$ -kal) csökkentette az ET-1 az izoproterenol hatására a kontroll érték $213 \pm 18\%$ -ra növekedett késői káliumáram farokáramának amplitúdóját.

c) A PKA-függő áramok ($I_{Ca,L}$ és I_K) amplitúdóit maximálisan aktivált PKA szintek mellett ($250 \mu\text{M}$ 8-bromo-cAMP jelenlétében) az ET-1 nem csökkentette szignifikánsan.

2. Az ET-1 hatása egészséges humán szívműködés kalcium- és káliumáramaira nyugalmi intracelluláris cAMP szint mellett

Megállapítottuk, hogy egészséges humán szívműködésen az L-típusú kalciumáram amplitúdóját az ET-1 - a kutya sejteken kapott gátlással összevethető mértékben - $33 \pm 3\%$ -kal csökkentette és nem változtatta meg az áram aktivációjának és steady-state inaktivációjának feszültségfüggését.

A tranziens (I_{to}) és a nyugalmi (I_{K1}) káliumáramok amplitúdójára és kinetikai paramétereire az ET-1 nem volt hatással.

Az ET-1 a késői káliumáram gyors komponensét (I_{Kr}) $79,7\%$ -kal csökkentette. Az áramot a lassú komponenset szelektíven gátló chromanol-293B jelenlétében mértünk, és az E-4031-érzékeny farokáram amplitúdójaként azonosítottuk.

3. A bimoclozolol és a BRX-005 alacsony koncentrációinak hatása a kontraktilitásra és a kalciumtranziens amplitúdójára dobogó szíven

Langendorff-perfundált tengerimalac szívpreparátumon vizsgáltuk a bimoclozolol és a BRX-005 hatását a bal kamrai nyomásra és az intracelluláris kalciumtranziensek amplitúdójára. A két molekula koncentráció-függő hatásait azonos tartományban követtük.

A bimoclolomol bifázisos hatást fejtett ki a kontraktilitásra. Alacsony koncentrációban (10-100 nM) növelte, míg magasabb koncentrációkban (10 μ M) nem változtatta meg szignifikánsan vagy csökkentette a bal kamrai szisztolés nyomást ill. a kalciumtranziensek amplitúdóját. A fenti bifázisos hatással ellentétben a diasztolé alatt mért intracelluláris kalciumkoncentráció monoton emelkedett az alkalmazott bimoclolomol koncentrációjának függvényében. A kalciumtranziens nagyságát a szisztolé és diasztolé alatt mért fluoreszcenciahányadosok különbségéből számítottuk.

A BRX-005 – hasonlóan a bimoclolomolhoz – koncentráció-függő módon fokozta a szívizom kontraktilitását, de – ellentétben a bimoclolomollal – csak kismértékben emelte meg a szisztolés és diasztolés kalcium szinteket és nem fejtett ki szignifikáns hatást az intracelluláris kalciumtranziensek amplitúdójára

4. A bimoclolomol és BRX-005 magas koncentrációinak hatása az akciós potenciál paramétereire kutya kamrai szívizomsejteken

A bimoclolomol (10-100 μ M) koncentráció-függő módon rövidítette az akciós potenciál időtartamát, csökkentette az akciós potenciál amplitúdóját és a depolarizáció maximális sebességét. Az akciós potenciál időtartamot rövidítő hatás a repolarizáció 50%-os szintjén mérve szignifikánsan nagyobb volt, mint a 90%-os szinten. Fenti hatások részlegesen reverzibilisek voltak. A BRX-005 azonos koncentrációi nem változtatták meg az akciós potenciál paramétereit.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció csökkentése (BAPTA-AM jelenlétében) vagy a kalcium-függő kloridáram specifikus gátlása (0,5 mM antracén-9-karboxilsav) ill. a kalcium-függő káliumáram blokkolása (20 nM karibdotoxin) szignifikánsan csökkentette, de nem védte ki teljesen a 100 μ M bimoclolomol akciós potenciál időtartamot rövidítő hatását. Részleges védő hatása volt az ATP-szenzitív káliumáramot gátló glibenklamidnak is.

5. Magas koncentrációjú bimocloamol hatása a transzmembrán áramokra

A 100 μM bimocloamol a kalciumáram amplitúdóját nem, de az inaktiváció időállandóját szignifikánsan ($19,8 \pm 1,6$ ms-ról $16,8 \pm 1,2$ ms-ra) rövidítette. Nem volt hatással a tranziens és a késői káliumáramok amplitúdójára és kinetikai paramétereire.

A nyugalmi káliumáram (I_{K1}) amplitúdóját 100 μM bimocloamol szignifikánsan csökkentette ($20,1 \pm 1,3\%$ -kal -135 mV-on). BaCl_2 jelenlétében, amely hatásosan gátolja az I_{K1} áramot, a bimocloamol hatására megjelenő extra áramkomponens egyensúlyi potenciálja -90 mV-nak adódott, nagysága -135 mV-on $-1,04 \pm 0,33$ pA/pF, míg $+45$ mV-on $+1,25 \pm 0,21$ pA/pF volt.

6. A BRX-005 vazorelaxáns hatása

A BRX-005 vaszkuláris simaizomra kifejtett hatását tengerimalac pulmonális artériájából készített preparátumon vizsgáltuk. Az 1 μM fenilefrinrel való előkezelést követően kumulatív hatásgörbét vettünk fel, miután a fenilefrin steady-state hatása beállt. A BRX-005 koncentráció-függő módon relaxálta az előzetesen fenilefrinrel prekontrahált preparátumot. Ez a hatás nem függött az érfal endotéliumának épségétől.

MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Munkám során eltérő támadáspontú és hatású molekulák szívelektrofiziológiai hatásait vizsgáltam. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján úgy ítéljük meg, hogy a vizsgált molekulák legfontosabb és egyben közös vonásaik, hogy hatásaik nem a szívimomsejtek elektromos tevékenységének közvetlen megváltoztatására irányulnak, de rendelkeznek ilyen hatásokkal is.

Az ET-1 a jelenleg ismert legpotensebb vazokonstriktor hatású molekulák egyike, melyről megállapítottuk, hogy gátolja az L-típusú kalciumáramot kutya és humán kamrai szívimomsejteken. Mindkét speciesben közel egyforma nagyságú gátlást kaptunk, ami arra utal, hogy valószínűleg a gátló hatás mechanizmusa is azonos a két faj szívimomsejtjein. Kuttyából izolált sejteken vizsgálva azt találtuk, hogy az ET-1 kalciumáramra irányuló százalékban kifejezett gátló hatása csökken, ha a cAMP – PKA rendszert részlegesen aktiváljuk (pl. izoproterenollal), és a PKA rendszer maximális aktivációja után (8-Br-cAMP) a gátló hatás elmarad. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az ET-1 kardiális kalciumcsatornákra gyakorolt gátló hatása kuttyán is az intracelluláris cAMP koncentráció csökkentése útján valósul meg. Ez egyaránt bekövetkezik a PTX-érzékeny G-fehérjék közvetítésével az adenilát cikláz gátlása vagy a foszfodiesteráz aktiválása útján (mindkettő az ET_A-receptorok közreműködésével).

Azt is megállapítottuk, hogy az ET-1 gátolja a késői káliumáramot mindkét speciesben, de jelentős különbségeket találtunk e tekintetben a kutya és a humán kamrai szívimomsejtek között. Sem nyugalmi cAMP szintek mellett, sem maximálisan aktivált cAMP – PKA rendszer esetében nem gátolta az ET-1 a késői káliumáramot kuttyán, gátlást kizárólag az izoproterenollal részlegesen aktivált káliumcsatornákon sikerült kimutatni. Ezzel szemben humán szívimomsejteken az ET-1 ötödére csökkentette a késői káliumáram gyors komponensének amplitúdóját izoproterenol kezelés nélkül. Ez a markáns különbség nem magyarázható azzal, hogy kuttyán teljes I_K-t, míg humán sejteken csak I_{Kr}-t mértünk, hanem inkább arra utal, hogy különbségek vannak a két

species között a káliumáramok szabályozási mechanizmusában. Az ET-1 eltérő hatásait a kutya szívizomsejtek kalcium- és káliumáramainak vonatkozásában a két cAMP-érzékeny áram különböző cAMP-érzékenységgel magyarázzuk, aminek háttérében eltérő proteinkináz enzimek részvétele valószínűsíthető. Nyugalmi cAMP szintek mellett a kalciumáram cAMP-dependens komponense részlegesen aktiválható, míg a késői káliumáramé nem, így ez utóbbi nem csökkenthető az intracelluláris cAMP csökkentésével. 8-Br-cAMP jelenlétében a PKA rendszer maximálisan aktivált, ezért azt a cAMP szint csökkentése a továbbiakban nem befolyásolja lényegesen a rendszer aktiváltsági szintjét. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a kalciumáram vonatkozásában a kutya kamrai sejteken jól modellezhetőek az ET-1 humán sejtekre irányuló hatásai, míg a késői káliumáram esetében nem.

A stresszkörülmények túlélésében az endogén molekulák mellett exogén, szintetikus anyagok is szerepet játszhatnak. A bimoclolol és a szerkezetileg nagyon hasonló BRX-005 protektív hatásait több kísérleti modellen leírták, de szívelektrofiziológiai hatásait elsőként jellemeztük. Megállapítottuk, hogy mindkét molekula pozitív inotróp hatással rendelkezik alacsony koncentrációban (0.1 – 1 μM). Ennek háttérében a BRX-005 esetében kalcium-érzékenyítő hatás valószínűsíthető, míg a bimoclolol megnöveli a rianodin-receptorok nyitvatartási valószínűségét, ezáltal fokozva a kalciumtranziensek amplitúdóját. Alacsony koncentrációban egyik szer sem módosítja az akciós potenciál paramétereit, tehát feltehetően nincs ioncsatornákra irányuló közvetlen hatásuk.

A bimoclolol magasabb koncentrációinak (100 μM) negatív inotróp hatása van, mert csökkenti a kalciumtranziensek amplitúdóját. Ennek oka a rianodin-receptorok olyan mérvű aktiválása, amely a diasztolés kalcium szint markáns megnövekedéséhez vezet, bár extrém magas koncentrációban (1 mM) a szer már gátolja a rianodin-receptorokat. A megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció kalcium-függő mechanizmusokon keresztül (a kalciumcsatornák fokozott inaktivációja, kalcium-függő klorid- és káliumáramok

aktivációja) rövidíti az akciós potenciálok időtartamát. A bimoclomol jelenlétében aktiválódó extra-áramot – egyensúlyi potenciálja alapján – klorid- és/vagy káliumáramként azonosítottuk. Farmakológiai kísérleteink tanúsága szerint a bimoclomol aktiválja az ATP-függő káliumcsatornákat is.

A bimoclomol alacsony koncentrációi tehát mérsékelten fokozzák az intracelluláris kalcium szintet, amely hatás hozzájárulhat a stresszfehérjék indukciójához, ugyanakkor a BRX-005 esetében semmilyen elektrofiziológiai hatását nem tudtuk kimutatni. Fentiek miatt valószínűsíthető, hogy a BRX-005 (esetleg annak sztereoizomerjei) kevesebb mellékhatást okoznak majd a klinikai kipróbálás során, mint a bimoclomol.

PUBLIKÁCIÓK

A téziseket megalapozó in extenso közlemények

1. Magyar J, Bányász T, Szigligeti P, **Körtvély Á**, Jednákovits A, Nánási PP: Electrophysiological effects of bimoelomol in canine ventricular myocytes. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2000; 361: 303-310 [IF=2.414]
2. Magyar J, Iost N, **Körtvély Á**, Bányász T, Virág L, Szigligeti P, Varró A, Papp JGy, Nánási PP: Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes. Pflügers Arch. 2000; 441: 144-149 [IF=2.529]
3. **Körtvély Á**, Szigeti Gy, Gesztelyi R, Zsuga J, Bányász T, Magyar J, Szigligeti P, Kovács L, Jednákovits A, Szentmiklósi AJ, Nánási PP: Cardiovascular effects of BRX-005: comparison to bimoelomol. Life Sci. 2000; 67: 1783-1789 [IF=2.275]
4. Bányász T, Magyar J, **Körtvély Á**, Szigeti Gy, Szigligeti P, Papp Z, Mohácsi A, Kovács L, Nánási PP: Different effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in canine ventricular cells. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2001; 363: 383-390 [IF=2.414]

További in extenso közlemények az értekezés tárgyköréből

1. Nánási PP, Sárközi S, Szigeti Gy, Jóna I, Szegedi Cs, Szabó Á, Bányász T, Magyar J, Szigligeti P, **Körtvély Á**, Csernoch L, Kovács L, Jednákovits A: Biphasic effect of bimoelomol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. Br. J. Pharmacol. 2000; 129: 405-412 [IF=3.722]

2. Szigeti Gy, Bányász T, Magyar J, **Körtvély Á**, Szigligeti P, Kovács L, Jednákovits A, Nánási PP: Effects of bimoclomol, the novel heat shock protein coinducer, in dog ventricular myocardium. Life Sci. 2000; 67: 73-79 [IF=2.275]

3. Jednákovits A, Ferdinandy P, Jaszlits L, Bányász T, Magyar J, Szigligeti P, **Körtvély Á**, Szentmiklósi AJ, Nánási PP: In vivo and in vitro cardiovascular effects of bimoclomol. Gen. Pharmacol. 2000; Közlésre elfogadva [IF=1.056]

A fenti közlemények összesített impakt faktora: 16,68.