

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

Körtvély Ágnes

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

Debrecen, 2001

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	2
<i>Az endotelin peptidcsalád.....</i>	3
<i>A bimoclolol és a BRX-005, mint Hsp-koinduktorok.....</i>	8
CÉLKITŰZÉSEK	10
ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS KÍSÉRLETI MÓDSZEREK	11
1. <i>Kontrakciós erő mérése multicelluláris preparátumon</i>	11
2. <i>Sejtizolálás.....</i>	11
3. <i>Akciós potenciál elvezetése izolált szívizomsejtekről.....</i>	12
4. <i>Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával.....</i>	13
5. <i>Bal kamrai nyomásgörbék és intracelluláris kalciumtranziensek mérése dobogó szíven.....</i>	14
6. <i>BRX-005 vazorelaxáló hatásának mérése izolált truncus pulmonális preparátumon</i>	14
7. <i>Adatfeldolgozás</i>	15
EREDMÉNYEK	15
1. <i>Az ET-1 hatása kutyából izolált kamrai szívizomsejtek kalcium- és káliumáramaira.....</i>	15
2. <i>Az ET-1 hatása egészséges humán szívizomsejtek kalcium- és káliumáramaira</i>	21
3. <i>Az ET-1 hatása a kalciumtranziens és a kontrakciós erő nagyságára, valamint az akciós potenciál paramétereire</i>	26
4. <i>A bimoclolol és a BRX-005 alacsony koncentrációinak hatása a kontraktilitásra és a kalciumtranziens amplitúdójára dobogó szíven</i>	27
5. <i>A BRX-005 vazorelaxáns hatása.....</i>	30
6. <i>A bimoclolol és a BRX-005 magas koncentrációinak hatása az akciós potenciál paramétereire kutya kamrai szívizomsejteken</i>	31
7. <i>Magas koncentrációjú bimoclolol hatása a transzmembrán áramokra</i>	33
MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	37
IRODALOMJEGYZÉK.....	43
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	51
PUBLIKÁCIÓK	52
FÜGGELÉK.....	55

BEVEZETÉS

A 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 (Feder és Hofmann, 1999). A legtöbb károsító hatásra adott válaszként fokozódik a stresszfehérjék szintézise a sejtekben, miközben számos más fehérje termelődése a minimumra csökken. A stresszfehérjéket a szakirodalom többféle elnevezéssel illeti, gyakran nevezik őket hősokkfehérjéknek vagy glükózregulált fehérjéknek, melyeket az angolszász nomenklatura alapján **Hsp** (**H**eat **s**hock **p**roteins) ill. **Grp** (**G**lucose **r**egulated **p**roteins) mozaikszavakkal rövidítik, vagy funkciójuk alapján chaperonoknak, mivel részt vesznek számos fehérje negyedleges szerkezetének kialakításában. A sejtek fiziológias funkcióinak folyamatos fenntartása mellett a stresszfehérjéknek fontos szerepük van a különböző stresszhelyzetek okozta kóros folyamatok kivédésében, azok lassításában, és végül a funkció helyreállításában. Jelenlétük és megfelelő működésük elengedhetetlen feltétele a sejtek túlélésének. Ezért olyan molekulák kifejlesztése, melyek a sejt számára kedvezőtlen helyzetekben indukálják ezen fehérjék transzkripcióját vagy fokozzák azok aktivitását nagy jelentőséggel bírnak. A stresszfehérjék keletkezését számos tényező kiválthatja, gyakorlatilag minden, ami a sejt számára a környezet hirtelen változásaként jelenik meg. Fiziológias folyamatok (egyedfejlődés, sejt differenciáció, fagocitózis, szekréció) mellett különböző környezeti tényezők (hősokk, hidegsokk, aminosav-analógok, átmeneti- és nehézfémionok, parazitatoxinok) és patofiziológias állapotok (hipoglikémia, ozmotikus-sokk, mentális stressz, acidózis, a sejtek kalcium-terhelése) válhatnak ki stresszválaszt (Kabakov és Gabai, 1997). Általánosan igaz, hogy a stressz nem minden formája hat minden sejtre egyformán és a hatás mértéke jelentősen különbözhet az egyes sejt típusok esetén. A láz, gyulladás, vírális vagy bakteriális fertőzés, ischaemia, oxidációs károsodás gyakran előforduló potenciális veszélyforrások a cardiovascularis szervrendszer, és szűkebb értelemben, a

szívizomzat vonatkozásában. A szív funkciója azonban nemcsak ezekben az állapotokban károsodhat, hanem olyankor is, amikor a különböző szabályozó folyamatok közötti egyensúly felborul. Már régóta ismert, hogy az érfal és az endokardium endothelsejtjei fontos szabályozó szerepet játszanak a cardiovascularis rendszer működésének szabályozásában az általuk termelt hírvivő molekulákon keresztül, amelyek egyik csoportját az endotelin peptidcsalád képviseli (Furchgott és Vanhoutte, 1989). Fentiek fényében nem meglepő, hogy napjainkban egyre szélesebb körben vizsgálják a stresszfehérjék és az endotelinek szerepét a cardiovascularis betegségek és más kórfolyamatok patomechanizmusában. Az endotelinek cardiovascularis hatásait az utóbbi 15 év kutatómunkájának következtében viszonylag jól ismerjük, de elektrofiziológiai hatásaik részben tisztázatlanok, részben ellentmondásosak. Az értekezésben az endotelin peptidcsaládba tartozó endotelin-1, valamint a fejlesztés alatt álló hősokkfehérje-koinduktor hatású bimocloamol és BRX-005 szívelektrofiziológiai hatásait taglaljuk.

Az endotelin peptidcsalád

Az endothelium eredetű relaxáló faktorok felfedezését követően (Furchgott és Zawadzki, 1980) az 1980-as évek közepétől több vazokonstriktor hatású molekulát izoláltak az endothelsejtekből (Gillespie és mtsai., 1986; O'Brien és mtsai., 1987). A kódoló gének szekvenciáját 1987-ben meghatározták és azok termékét endotelineknek nevezték el (Yanagisawa és mtsai., 1988; Masaki, 1998). Ma már ismert, hogy az endotelin peptideknek több izoformája van, az egyes izoformákat külön gének kódolják (Inoue és mtsai., 1989). A 21 aminosavból álló endotelin-1 (ET-1) az endotelin peptidcsalád legismertebb és a szövetekben legnagyobb mennyiségben kimutatható izoformája (Haynes és Webb, 1993; Rubanyi és Polokoff, 1994). Az ET-2 a vesében, az ET-3 főleg a vékonybélben és a mellékvesében mutatható ki, de olyan 31 aminosavból felépülő endotelineket is azonosítottak, amelyek a bioszintézis közbeeső útvonalain keresztül keletkeznek. Az endotelinek felépítésükben nagyfokú hasonlóságot mutatnak az *Atractaspis engaddensis* kígyó mérgéből izolált peptidekkel, a sarafotoxinokkal (Takasaki és mtsai., 1988), amely azt bizonyítja, hogy az endotelinek ősi és konzervatív felépítésű molekulák.

Az endotelinek szintézisét elsősorban olyan fiziko-kémiai faktorok szabályozzák, mint az érfal pulzáló feszülése, a sejtekre ható nyíróerő, vagy az extracelluláris pH savanyodása. Ezek mellett a hipoxia, ischaemia, oxidált LDL, koleszterin, glükóz, trombin, növekedési faktorok, citokinek, idős kor, elhízás, kokain fogyasztás is fokozzák, míg a nitrogén-monoxid, prosztaciklinek, ösztrogének és a nátriuretikus peptid gátolják az ET-1 elválasztását (Lüscher és Barton, 2000).

Ismert, hogy az endotelinek hatásait - legalábbis azok egy részét - a 7 transzmembrán domént tartalmazó, G_i -fehérjékhez kapcsolt receptorok aktiválásával fejtik ki. Emlősökben azonosították az ET_A és ET_B receptorokat, továbbá patkányban leírtak egy angiotenzin II-re és ET-1-re egyaránt érzékeny receptort is. Az egyes izopeptideket a receptorok különböző affinitással kötik. Az ET_B közel azonos affinitással köti az egyes izoformákat, míg az ET_A az ET-1 és ET-2 peptidekre százszor érzékenyebb, mint az ET-3 izoformára. Madarakban azonosítottak egy új típusú ET_B (Lecoin és mtsai., 1998) és békában az ET-3-at specifikusan kötő ET_C receptort is (Karne és mtsai., 1993).

Az ET-1 az ET_A receptoron keresztül többféle szignalizációs útvonal aktiválásával vazokonstriktiót okoz (Pollock és mtsai., 1995) és különböző szövetekben sejtproliferációt indukál (Ohlstein és mtsai., 1992), míg az ET_B -hez kapcsolódó jelátvitel lassítja az apoptózist, gátolja az ECE-1 gén expresszióját az endothelsejtekben és szabályozza az ET-1 eliminációját. Az endotelinek vasoaktív és mitogén hatásai mellett stimulálják egyes citokinek és növekedési faktorok termelődését, autokrin mechanizmussal befolyásolják a sejtciklus folyamatait (Wang mtsai., 1994). Az ET_A -hoz kötődve vazokonstriktiót, sejtnövekedést, sejtdhéziót, trombózist idéznek elő, amely hatások kifejlődésében a foszfolipáz C (PLC) enzim aktiválásának is szerepet tulajdonítanak. Az endotelinek főleg az endothelsejteken, kisebb mennyiségben a simaizomsejteken és makrofágokon található ET_B receptoron keresztül befolyásolják a NO és a prosztaciklinek termelődését, az apoptózis folyamatát, ugyanakkor gátolják az endotelin-convertáló-enzim (ECE) expresszióját (Karwatowska-Prokopczuk és Wennmalm, 1990). Az endotelineknek - cardiovascularis hatásikon túl - szerepük van az embrionális fejlődésben (Kurihara és mtsai., 1994), a hörgők szűkítésében (Uchida és mtsai., 1988), a karcinogenezisben (Lahav és mtsai., 1999), valamint a gasztrointesztinális- és endokrin funkciók szabályozásában (Ferri és mtsai., 1995).

Az ET-1-nek erős mitogén hatása miatt szerepet tulajdonítanak a kardiális hipertrófia kialakulásában, mely több cardiovascularis betegség kísérője. Valószínűsítik, hogy az endogén endotelineknek szerepe lehet a miokardiális infarktus súlyosbodásában (Camilión de Hurtado és mtsai., 2000) és a magas ET-1 plazmaszintek kedvezőtlen kimenetelt prognosztizálnak. Viszonylag magas ET-1 plazmaszinteket (1-2 pg/ml) mértek gyermekekben és különböző megbetegedések (atheroszklerózis, miokardiális infarktus, pulmonális hipertenzió, szív- és veseelégtelenség) esetén (McMurray és mtsai., 1992; Wei és mtsai., 1994; Miyauchi és Masaki, 1999). Leírták, hogy az ET-1 stimulálja az angiotenzin II termelést is, melynek a hipertenzióban kifejlődő hipertrófiában lehet szerepe (Ito, 1997). Tenyésztett pitvari sejteken az ET-1 közvetlenül fokozta az ANP szekrécióját (Grossman és Morgan, 1997). Ezen megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az ET-1 lokálisan, elsősorban autokrin ill. parakrin hatású mediátorként működik, és nem mint keringő hormon (Eguchi és mtsai., 1995).

Az endotelin-1 egyik legjobban karakterizált hatása az artériák és vénák falában található simaizomsejtek feszülésének fokozása (Clarke és mtsai., 1989; Cocks és mtsai., 1989). A simaizomsejteken az endotelin-1 hatásait az intracelluláris kalciumkoncentráció növelésén keresztül fejt ki, amely nem a kalciumcsatornák közvetlen aktiválása útján valósul meg. A tapasztalt bifázisos kalciumszint emelkedés kezdetén gyors és nagymértékű kalciumkoncentráció növekedést regisztráltak, amelyet egy hosszabb ideig tartó, alacsonyabb Ca^{2+} -koncentráció emelkedés kísért. Az emelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció aktiválva a nem specifikus kationcsatornákat a sejtmembrán depolarizációjához, a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák megnyílásához és azon keresztül további Ca^{2+} -ionok belépéséhez vezet, amely fokozza a simaizomsejtek kontraktilitását (Simonson és Dunn, 1990; Inui és mtsai., 1999). Az ET_A receptorok valószínűleg a G-fehérjéken keresztül a foszfolipáz C enzimeket is aktiválják (Takuwa és mtsai., 1990). Ezzel összhangban van az megfigyelés, hogy az IP_3 indukált Ca^{2+} -koncentráció emelkedés független az extracelluláris Ca^{2+} -koncentrációtól, míg a dihidropiridin (DHP) szenzitív, feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákon keresztüli, vagy a DHP inszenzitív, nem specifikus kationcsatornákon keresztüli kalcium influx mértéke az extracelluláris kalciumkoncentráció függvénye (Silberberg és mtsai., 1989; Goto és mtsai., 1989; Iwamuro és mtsai., 1998). Az endotelin-1 receptorain keresztül valószínűleg aktiválja

a foszfolipáz A₂ és D enzimeket is, így hatással van az arachidonsav metabolizmusára (Liu és mtsai., 1992). Az ET-1 indirekt módon aktiválja a proteinkináz C enzimet. Ez részben a foszfolipáz C aktiválódást követő DAG akkumuláció, részben a Na⁺-H⁺ csere aktiválása miatt bekövetkező intracelluláris lúgosodás következménye (Lonchamp és mtsai., 1991; Krämer és mtsai., 1991). Mindkét változás a PKC aktivitásának fokozódásával jár. A fenti példa azt bizonyítja, hogy érsimaizmon az ET-1 számos párhuzamos, egymáshoz többszörösen kapcsolódó szignalizációs útvonal igénybevételével fejti ki hatását.

Az endotelin-1 receptorait szívizomsejteken is kimutatták (Sakurai és mtsai., 1992), azonban az ET-1 kardiális hatásai jelentős mértékben függöttek az alkalmazott speciéstől, a vizsgált sejtek miokardiális lokalizációjától, a szívizom fejlettségi fokától és a kísérleti körülményektől. Éretlen sejteken negatív inotrop, kalciumtranzienst csökkentő hatásáról számoltak be, míg felnőtt kamrai sejteken pozitív inotrop, kalciumtranzienst növelő hatást találtak (Grossmann és Morgan, 1997). Ishikawa 1988-ban írta le az ET-1 pozitív inotrop és chronotrop hatását tengerimalac pitvari preparátumon, bizonyítva, hogy az ET receptorok a szívizomsejteken is jelen vannak (Ishikawa és mtsai., 1988). Hasonló eredményeket kaptak patkány és humán kamrai trabekulákon (Moravetcz és mtsai., 1989; Kelly és mtsai., 1990), míg mások tengerimalac pitvari preparátumokon az ET-1 negatív kronotrop hatását demonstrálták (Ono és mtsai., 1995). Később az ET-1 acetil-kolin-szerű hatását írták le számos emlős preparátumon (Zhu és mtsai., 1997).

Ma sem tisztázott kérdés, hogy az ET-1 milyen szignalizációs mechanizmusok igénybevételével és milyen ioncsatornák közvetítésével fejti ki hatásait emlős szívizomban. Az elmúlt 10 évben több szignalizációs útvonal és ioncsatorna vonatkozásában felmerült a lehetőség, hogy részt vesz az ET-1 kardiális hatásainak mediálásában. A kezdeti megfigyelések (inotrop hatás) alapján feltételezték, hogy az endotelinek növelik a feszültségfüggő kalciumáramot (Ishikawa és mtsai., 1988). Hasonló eredményekről számoltak be nyúl és tengerimalac preparátumokon (Lauer és mtsai., 1992; Bkaily és mtsai., 1995; Kasai és mtsai., 1994). Mások ezzel ellentétben azt találták, hogy az ET-1 csökkenti a kalciumáramot (Tohse és mtsai., 1990; Ono és mtsai., 1994), ismét mások szerint az ET-1 nem befolyásolja a kalciumáram amplitúdóját adult tengerimalac kamrai sejteken (Habuchi és mtsai., 1992), míg neonatális patkány sejteken a T-típusú kalciumáram

növekedést írtak le (Furukawa és mtsai., 1992). Az ET-1 nyúl kamrai sejteken az ET_A receptoron keresztül gátolta a kalciumáramot, míg az ET-3 az ET_B receptoron keresztül növelte az áram amplitúdóját (Kelso és mtsai., 1998). Az ET-1 káliumáramokra kifejtett hatásait tengerimalac kamrai sejtjein vizsgálva megállapították, hogy az növeli a késő káliumáramot (Habuchi és mtsai., 1992), míg pitvari sejteken növeli a nyugalmi káliumáramot (Kim, 1991) és az acetil-kolin-függő káliumáramot (Ono és mtsai., 1994). Nyúl pitvari sejteken leírták, hogy az ET-1 gátolja az acetil-kolin-függő káliumáramot (Spiers és mtsai., 1996). Tengerimalac és nyúl preparátumokon azt találták, hogy az ET-1 gátolja ischaemiás miokardiumban az ATP-szenzitív káliumáramot (Kobayashi és mtsai., 1996), és a proteinkináz A-függő kloridáramot (James és mtsai., 1994). Ezek a hatások részben magyarázhatók az ET-1 feltételezett intracelluláris cAMP koncentrációt csökkentő hatásával, melynek következménye lehet az a másik megfigyelés, miszerint izoproterenol-kezelést követően megnőtt az ET-1 gátló hatása az egyes cAMP-függő transzmembrán áramok vonatkozásában (Delpech és mtsai., 1995; Delpech és mtsai., 1997).

Az ET-1 szívhatásainak mechanizmusával kapcsolatban az alábbi elméletek születtek elmúlt 10 év során:

1. Növeli az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt (Vigne és mtsai., 1990)
2. Gátolja az adenilát cikláz aktivitását (Hilal-Dandan és mtsai., 1992; Vogelsang és mtsai., 1994)
3. A PLC enzim aktiválásán keresztül fokozza a foszfoinozitol hidrolízisét (Vigne és mtsai., 1989; Aramori és Nakanishi, 1992)
4. Fokozza a proteinkináz C aktivációját (Hattori és mtsai., 1993; Woo és mtsai., 1999)
5. Fokozza a kontraktilis proteinek kalcium-érzékenységét (Kelly és mtsai., 1990; Wang és mtsai., 1991)

Az ET-1 szívhatásairól publikált - számos ellentmondással terhelt - információhalmazt értékelve arra a következtetésre juthatunk, hogy az ET-1, a simaizomsejtekénél leírtakhoz hasonlóan, a szívizomsejteken is különböző szignalizációs útvonalak aktiválásával fejt ki hatását. Ugyanakkor válaszra vár az a kérdés, hogy humán kardiális preparátumokon az ET-1 milyen ioncsatornák működését változtatja meg. A humán kardiális preparátumok limitált hozzáférhetősége miatt célszerűnek látszott egy olyan emlős preparátumot is bevonni a vizsgálatokba, amelyek az eddigi irodalmi adatok alapján elektrofiziológiai szempontból szoros hasonlóságot mutatnak a humán kamrai sejtekkel. Ezért kézenfekvő volt az endotelin-1 hatásainak tanulmányozása kutya kamrai szívizomsejteken is.

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

A BIOREX által kifejlesztett, jelenleg klinikai kipróbálás alatt álló gyógyszerjelölt bimoclozol egyik fontos jellemzője, hogy fokozza a stresszfehérjék szintézisét azokban a sejtekben, amelyek stresszhatásnak voltak kitéve. A bimoclozol tehát egy olyan újonnan kifejlesztett citoprotektív hatású hidroxilamin származék, melynek akut és krónikus stresszhatások elleni protektív hatásai vannak különböző egészséges és patológiás állatmodelleken, továbbá sejtenyészetekeken (Vígh és mtsai., 1997). Állatkísérletek során a bimoclozol gyorsította az égés ill. az UVB sugárzás utáni sebgyógyulást és csökkentette a szubarachnoideális vérzés vagy arachidonsav bejuttatásával kiváltott vér-agy gát permeabilitás fokozódást (Erdő és mtsai., 1998). Krónikus bimoclozol kezeléssel helyre lehetett állítani a spontán hipertenzív patkányok aortagyűrűinek kóros acetil-kolin érzékenységét (Jednákovits és mtsai., 2000). Diabéteszes állatmodellben csökkentette az angiopátiás szövődményeket (Jednákovits és mtsai., 1994), a neuropathia, retinopathia és nephropathia kialakulása csökkenthető, illetve kivédhető volt megfelelő bimoclozol előkezeléssel (Hegedűs és mtsai., 1994; Bíró és mtsai., 1997). A bimoclozol

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 bimoclolomhoz hasonló szerkezetű molekula (annak egyik követője), amelynek szívhatásairól nem álltak rendelkezésünkre adatok.

Mindkét vegyület fontos tulajdonsága, hogy a fiziológias körülmények között csak minimális mértékben befolyásolják a hősokkfehérjék termelődését, ugyanakkor a stresszhatások kivédésében igen hatékonyak: protektív hatásukat egyaránt kifejtették trauma, sokk és égés esetén. Ezek a tulajdonságok összhangban vannak a molekulák Hsp-koinduktor hatásmechanizmusával. Mivel mindkét vegyület szívhatásait meggyőzően demonstrálták, felmerült a kérdés, hogy ezekben a hatásokban van-e szerepe – és ha igen, akkor milyen – a szívizomsejtek membránjában lévő ioncsatornáknak. Ismert másrészt, hogy a hősokkfehérje termelés megindításának egyik legfontosabb szignálja az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelkedése. Ennek alapján kézenfekvőnek tűnt megvizsgálni a bimoclolom és a BRX-005 hatását a szívizomsejtek kalcium háztartására.

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. Vizsgáltuk, hogy vajon az endothelin-1 milyen szignalizációs útvonalon, esetleg útvonalakon keresztül fejt ki hatásait az ET_A receptorhoz való kötődés után?
3. Az egészséges humán szívből izolált sejteken nyert eredményeink mennyire felelnek meg a kutya kamrai sejteken mért adatoknak? Ennek alapján választ kívántunk adni arra a kérdésre, hogy vajon 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 igen sokrétű *in vivo* hatásai közül melyek és milyen mértékben vezethetők vissza az általunk vizsgált celluláris elektrofiziológiai hatásokra?

ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

1. Kontrakciós erő mérése multicelluláris preparátumon

Multicelluláris preparátumon történő kontrakciós erő méréshez jobb kamrából kimetszett vékony trabekulákat használtunk. A trabekula egyik végét a mérőkád aljához, a másik végét mechanoelektromos transzdúcerhez rögzítettük és 37 °C fokos Tyrode oldattal perfundáltuk (10 ml/perc). A transzdúcer 0,1 és 10 mN között lineáris jelet adott. A preparátumokat 1 Hz frekvenciájú téringerléssel folyamatosan ingereltük, az ingerlő négyszögjelek amplitúdója a küszöbinger kétszerese volt. A mérések előtt a preparátumot a perfundáló Tyrode oldatban legalább 90 percig ekvilibráltuk a steady-state állapot elérése érdekében. Az izometriás kontrakciók paramétereinek értékelését analóg-digitális átalakítás után számítógéppel végeztük. Meghatároztuk az egyes kontrakciók maximális feszülési értékét, a maximális feszülés kialakulásáig eltelt időt, a maximális feszülés 20 és 75 %-a közötti görbeszakasz meredekségét és a félrelaxációhoz szükséges időt.

2. Sejtizolálás

Elektrofiziológiai kísérleteink többségét kutyaszívából enzimatikusan izolált kamrai sejteken végeztük, amelyeket szegmentperfúziós eljárással nyertünk. A különböző nemű és korú kutyák elaltatására izomrelaxáns és kábító hatással rendelkező, 0,1 ml/tskg SBH-KETAMIN és 0,05 ml/tskg Rometar injekciókat alkalmaztunk. Az alkalmazott gyógyszerek farmakokinetikája olyan, hogy a kísérlet megkezdésének idejére a szívizomból eliminálódtak. Az altatott állatokból a mellkas megnyitása után eltávolítottuk a szívet, melyet normál Tyrode oldattal mostunk át. A bal elülső leszálló koronária ágat kanuláltuk és 5 percig perfundáltuk a szobahőmérsékletű, kalcium mentes "Joklik Modification for Suspension Culture" (JMM, Sigma, pH=7,0) oldattal, melyet frissen kiegészítettünk - 1 l oldatra vonatkoztatva - allopurinol (13,5 mg), ribóz (750 mg), piroszőlősav (175 mg), taurin (2,5 g), NaHCO₃ (1,3 g), NaH₂PO₄ (200 mg) hozzáadásával. A bal kamrai szegmens emésztése JMM-oldathoz adott, 660 mg/l CLS-1 kollagenázzal (Worthington) történt, 2 g/l borjú szérum albumin és 50 µmol/l CaCl₂ jelenlétében. A kb. 30 perces emésztés alatt az elfolyósodott bal kamrai szövetszegmenst feldaraboltuk és

emelkedő kalcium koncentrációjú JMM oldatban mostuk, a 2,5 mmol/l végkoncentráció eléréséig. A sejteket felhasználásig 14°C hőmérsékletű, pH=7,4 és 0,5 g/l streptomycint és 0.5 g/l penicillint tartalmazó tápoldatban (Minimum Essential Medium, Sigma) tároltuk. Az ily módon nyert sejtuszpenzióban a mérésre alkalmas sejtek aránya 50-90% volt. Ezek a sejtek ép szélűek és téglalap alakúak voltak, tiszta citoplazmával és jól látható harántcsíkolattal rendelkeztek, átlagos túlélési idejük 24-48 óra volt. A méréseket a sejtizolálást követően 4 és 36 óra elteltével végeztük. Hasonló eljárást követtünk a kardioplégiás oldatban tárolt humán szívek esetében is, de ilyenkor az izolált sejteket azonnal felhasználtuk.

3. Akciós potenciál elvezetése izolált szívizomsejtekről

A mérőedény aljára kitapadt szívizomsejteket normál Tyrode oldattal perfundáltuk, amelynek összetétele a következő volt (mmol/l-ben megadva): 150 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 5 HEPES, 10 glükóz, pH=7,4. Az oldat állandó hőmérsékletét (37 °C) termosztát segítségével biztosítottuk. A méréseket invert mikroszkóp (Olympus CK-2) tárgyasztalán végeztük. Az állandó perfúziót a hidrosztatikai nyomás biztosította, a sejtek oxigénszükségletét az inkubáló oldaton átáramoltatott 100% oxigén fedezte. Az alkalmazott anyagokat a perfundáló Tyrode oldattal juttattuk el a sejtekhez.

A sejtek transzmembrán potenciáljának elvezetésére használt hegyes végű, 25-50 MΩ ellenállású boroszilikát üveg mikroelektrodát (Science Products) 3 mol/l káliumklorid oldattal buborékmentesen töltöttünk fel. Az elektrodát a kísérlet megkezdése előtt digitális elektrodahúzóval (P-87, Sutter Instruments) készítettük. A sejteket a mérőelektrodán keresztül ingereltük 1 ms időtartamú és a kétszeres ingerküszöbnek megfelelő amplitúdójú depolarizáló négyszögimpulzusokkal. Erősítés után (Axoclamp-2B erősítő, Axon Instruments) az elektromos jeleket digitális tároló oszcilloszkópon (Hitachi VC-6025) és a számítógép képernyőjén monitoroztuk. A későbbi analízis céljából az adatok digitálizálását Digidata 1200 A/D kártya segítségével 100 kHz mintavételezési frekvencia mellett végeztük. Az adatokat a PCLAMP 6.0 szoftver (Axon Instruments) segítségével analizáltuk.

4. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

Az árammérések 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 kádban szuszpendáltuk.

A kalciumáram mérésekor a káliumáramokat 4-aminopiridin (4-AP) és tetraetil-ammónium-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 teszimpulzusokat -40 mV holding potenciálról alkalmaztuk. Az áram-amplitúdókat 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 *tranzients 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 szívműsejteken 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.

5. Bal kamrai nyomásgörbék és intracelluláris kalciumtranziensek mérése 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 pH=7,4-re állítottuk be. 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 (5 µmol/l Fura-2) acetoximetilészterével töltöttük fel. A 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.

6. 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.

7. Adatfeldolgozás

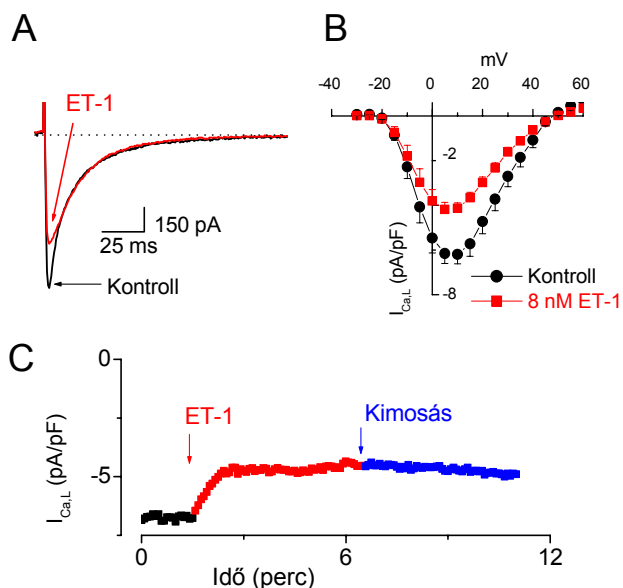
A kapott eredmények statisztikai értékelését ANOVA valamint Student féle t-próbával végeztük a SZIGMASTAT szoftver segítségével, szignifikánsnak tekintve a $P < 0,05$ eseteket. Az adatok feldolgozásához és az ábrák készítéséhez az EXCEL, POWERPOINT és ORIGIN szoftvereket használtunk.

EREDMÉNYEK

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

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

a.) Az L-típusú kalciumáram amplitúdóját -35 és +60 mV feszültségtartományban, 5 mV-os lépésközökkel növekvő depolarizáló négyszögimpulzusok alkalmazásával határoztuk meg előbb Tyrode oldatban majd 5 percig tartó 8 nmol/l ET-1 kezelést követően. (**1. ábra**). A kísérletek egy részében ET-1 mentes Tyrode oldatban mostuk a sejteket az ET-1 kezelés után. Az ET-1 minden vizsgált potenciálértéken csökkentette a kalciumáram amplitúdóját. A maximális hatás néhány percen belül kialakult és gyakorlatilag nem lehetett visszamosni. 8 nmol/l ET-1 $32 \pm 5\%$ -kal ($-6,2 \pm 0,45$ pA/pF-ról $-4,2 \pm 0,31$ pA-pF-ra) csökkentette a +5 mV-on mért áram amplitúdóját ($P < 0,05$, $n=6$). Az ET-1 nem változtatta meg az $I_{Ca,L}$ áram-feszültség összefüggését (**1.B. ábra**), ami arra utal, hogy ET-1 hatására nem változott meg az aktiváció feszültségfüggése. A csatornák inaktivációjának sebességét az aktivációs küszöböt meghaladó depolarizáló négyszögimpulzusokkal kiváltott áramtranziensek megszűnéséből határoztuk meg. Az inaktiváció sebességét jellemző időállandó értékét az ET-1 nem változtatta meg.



1. ábra: Az ET-1 hatása a kalciumáramra (kezeletlen sejteken). **A.** Normál Tyrode oldatban és 8 nmol/l ET-1 jelenlétében +5 mV-on mért reprezentatív kalciumáram-görbék. **B.** Hat sejten gyűjtött adatokból számított áram-feszültség karakterisztika. **C.** Az ET-1-hatás kialakulásának időfüggése és a reverzió hiánya +5 mV-on mért áramamplitúdók esetén.

A membrán steady-state áram-feszültség összefüggését -130 és +60 mV közötti membránpotenciál sávban vizsgáltuk. Az alkalmazott teszimpulzusok 400 ms hosszúak voltak, a holding potenciál -80 mV volt, a kalciumáramot 0,25 mmol/l CdCl₂-dal blokkoltuk. Az ilyen körülmények között 400 ms-nál felvett áram-feszültség karakterisztika -130 és -50 mV közötti tartománya a nyugalmi kálium áramot (I_{K1}) reprezentálja (**2.A. ábra**). A -130 mV-on mért áramamplitúdó ET-1 hatására nem változott szignifikánsan ($-15 \pm 1,4$ pA/pF-ről $-13,6 \pm 1,3$ pA/pF-ra csökkent, $n=5$), ami azt jelenti, hogy 8 nmol/l ET-1 nem gátolja az I_{K1} áramot.

A tranziens káliumáram (I_{to}) vizsgálata a -30 +60 mV feszültségtartományban történt. Az áram csúcsamplitúdójára az ET-1 nem volt hatással egyetlen vizsgált membránpotenciálon sem (**2.B. ábra**). A +50 mV-on mért csúcsértékek rendre $14,3 \pm 0,14$ és $14,3 \pm 0,32$ pA/pF voltak ET-1 kezelés előtt és 8 nmol/l ET-1 jelenlétében ($n=6$). Hasonlóképpen nem találtunk szignifikáns különbséget a +50 mV-on mért áram inaktivációs időállandójában sem, amelyet exponenciális illesztés útján határoztunk meg ($6,9 \pm 0,2$ versus $6,6 \pm 0,2$ ms, $n=7$).

A tranziens káliumáram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését kettős impulzusprotokoll alkalmazásával határoztuk meg. Az előimpulzus amplitúdóját -100 és +10 mV közötti feszültségtartományban változtattuk, majd ezt követően depolarizáltuk a membránt +50 mV-ra (tesztimpulzus). A tesztimpulzusok alatt mért csúcsamplitúdókat elosztottuk a -100 mV-os előimpulzus után mért csúcsamplitúdóval és az így nyert relatív áramértékeket az előimpulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk (**2.C. ábra**). Az így kapott adatsort kétállapotú Boltzmann függvénnyel illesztettük:

$$F(V) = \frac{1}{1 + e^{(V_{1/2} - V)/k}} \quad (1. \text{ egyenlet})$$

ahol, V az aktuális membránpotenciál, $V_{1/2}$ az a feszültségérték, ahol a csatornák 50%-a van inaktivált állapotban, míg a k az inaktiváció membránpotenciál függését leíró paraméter.

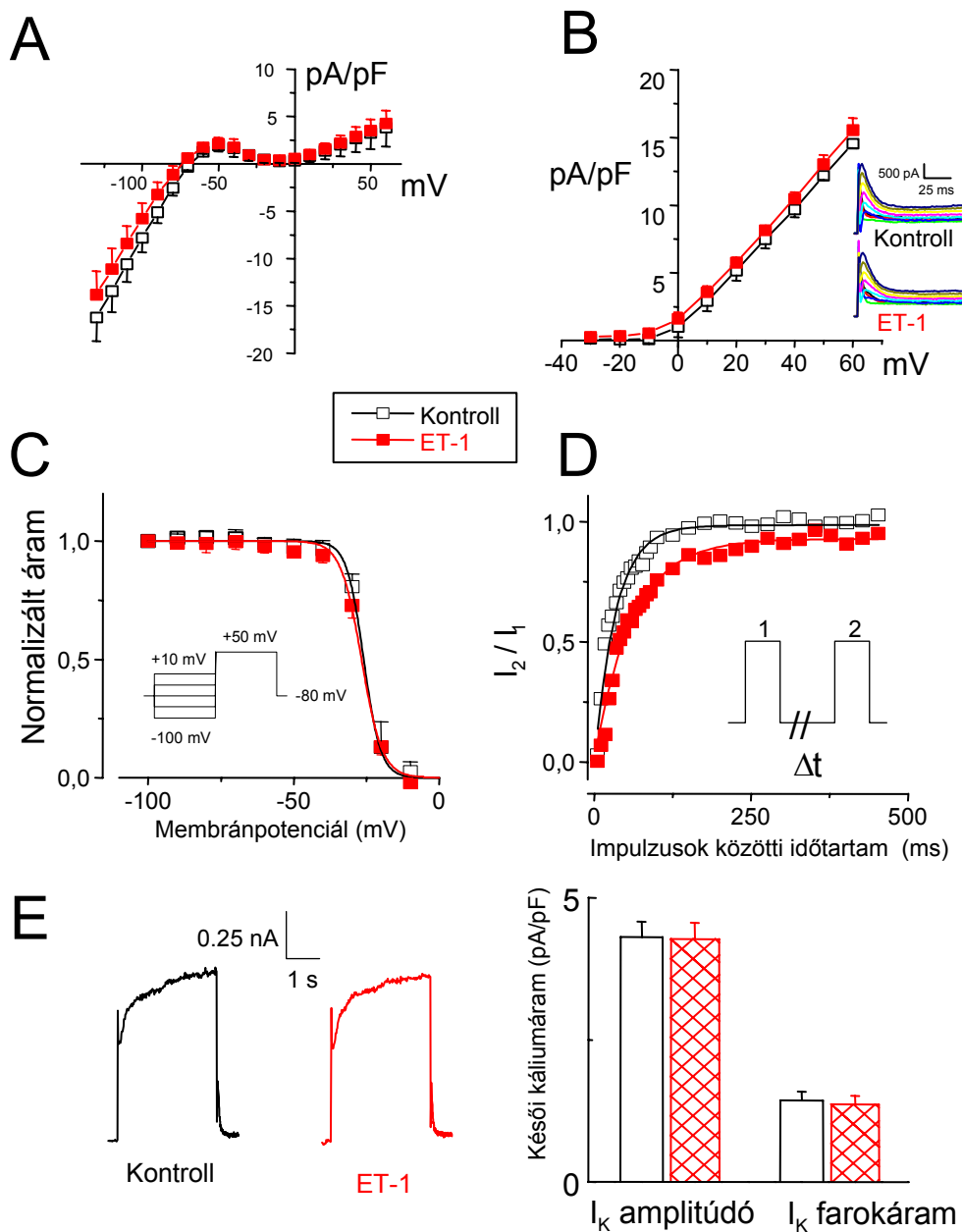
Megállapítottuk, hogy 8 nmol/l ET-1 egyik paramétert sem változtatta meg szignifikánsan. A $V_{1/2}$ értékek rendre $-25,9 \pm 1,4$ és $-26,7 \pm 0,4$ mV, a k értékek $2,9 \pm 0,9$ és $3,5 \pm 0,5$ mV voltak ET-1 kezelés előtt és után ($n=3$). Fentiek alapján kimondhatjuk, hogy a tranziens káliumáram inaktivációjának sajátosságaira az ET-1 nincs hatással.

A tranziens káliumáram inaktivációból való visszatérésének sebességét is páros impulzusokkal határoztuk meg folyamatosan növelve a két impulzus között eltelt időtartamot. Az első, 500 ms időtartamú és +50 mV feszültségű impulzus (előimpulzus) által inaktiváltuk a csatornákat, majd az azt követő második impulzussal (tesztimpulzus) teszteltük, hogy a két impulzus között eltelt idő alatt a csatornapopuláció hányad része került ismét aktiválható állapotba. Az elő- és tesztimpulzus között a membránpotenciált -80 mV értékre állítottuk be, az impulzusok közötti időtartam hosszát 10 és 500 ms között változtattuk. A tesztimpulzus alatt mért áramot az előimpulzus alatt mért áramamplitúdóra normáltuk és az így kapott hányadost (I_2/I_1) az impulzusok között eltelt időintervallum függvényében ábrázoltuk (**2.D. ábra**). Kapott eredményeinket monoexponenciális függvénnyel illesztettük:

$$I_2 / I_1 = I_1 \cdot (1 - e^{-t/\tau}) \quad (2. \text{ egyenlet})$$

ahol, τ az időállandó, t a két impulzus között eltelt idő.

A csatornák inaktivációból való visszatérésének időállandóját 8 nmol/l ET-1 szignifikánsan, $26,5 \pm 4,6$ ms-ról $59,5 \pm 1,8$ ms-ra megnövelte ($n=3$, $P < 0,05$).



2. ábra: 8 nmol/l ET-1 hatása a káliumáramokra. **A.** A membrán steady-state áram-feszültség karakterisztikája. **B.** Az I_{to} csúcsamplitúdójának feszültségfüggése. **C.** Az I_{to} inaktívációjának feszültségfüggése. **D.** Az I_{to} inaktívációból való visszetérésének kinetikája. **E.** I_K amplitúdója a depolarizáció alatt és a repolarizációt követő farokáram. A satírozott szimbólumok és oszlopok 8 nmol/l ET-1 hatását mutatják a kontrollhoz képest, amit üres szimbólumokkal és oszlopokkal jelöltünk.

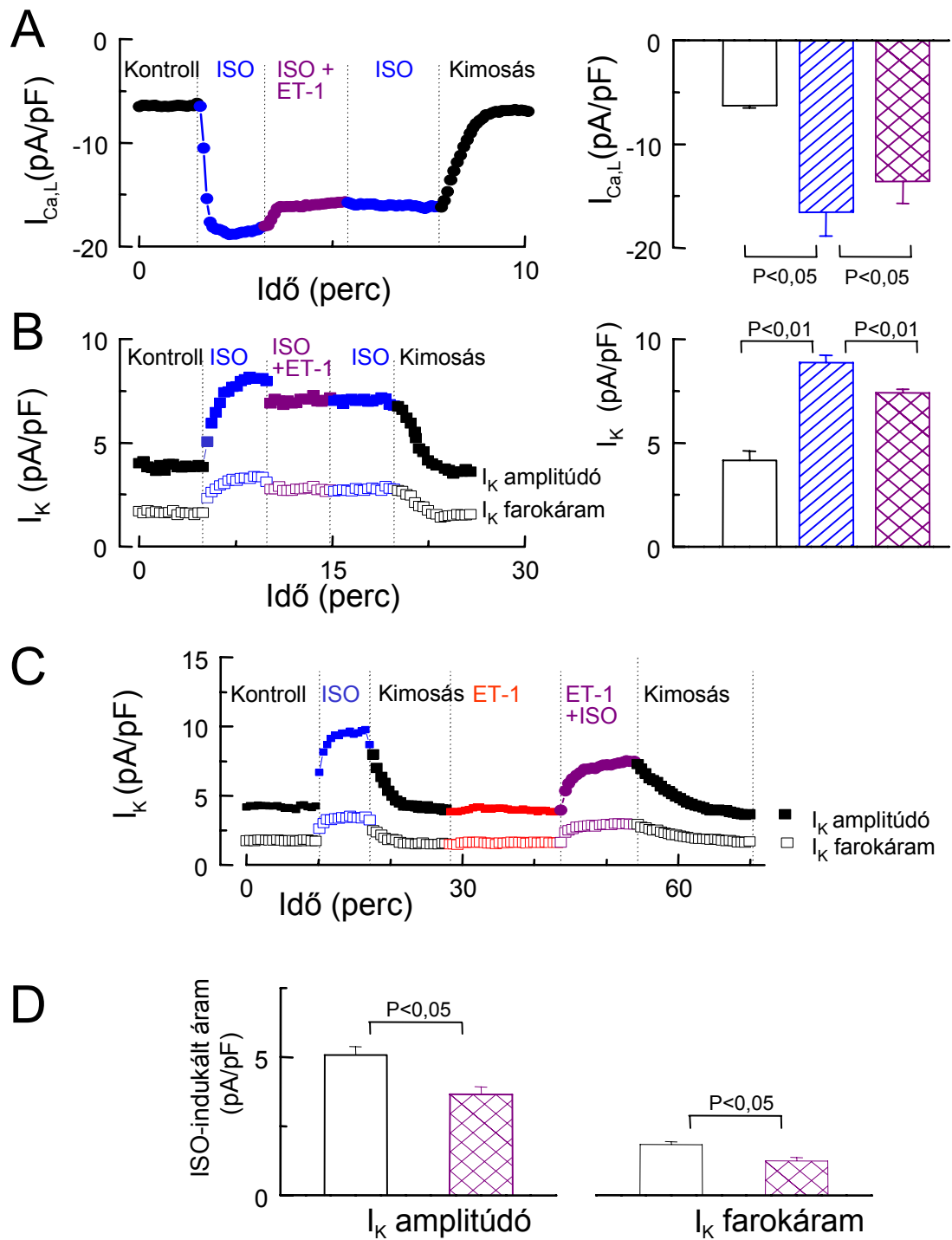
A késői kálium áramot (I_K) a 3 s hosszú, -40 mV-ról +60 mV-ra depolarizáló tesztimpulzussal aktiváltuk. A tesztimpulzust követően -40 mV-on tartottuk a membránt. Az ekkor megjelenő farokáram (tail current) amplitúdóját mértük. Ezzel a módszerrel nincs lehetőségünk az áram két komponensének szétválasztására, de Varró és mtsai. (2000) megfigyeléseit alapul véve feltételeztük, hogy a depolarizáló négyszögimpulzus ideje alatt főleg a lassú komponens (κ_s), a repolarizációt követően főleg a gyors komponens (I_{Kr}) alakítja az áramjelet. ET-1 hatására egyik áramkomponens (sem a depolarizációval aktivált áram, sem a farokáram) amplitúdója nem változott szignifikánsan (rendre: $4,31 \pm 0,27$ pA/pF versus $4,28 \pm 0,29$ pA/pF, és $1,43 \pm 0,15$ pA/pF versus $1,36 \pm 0,16 \pm 0,16$ pA/pF, $n=7$, **2.E. ábra**).

b.) Tanulmányoztuk az ET-1 proteinkináz A-függő áramokra gyakorolt hatását, úgy hogy az enzimrendszert 50 nmol/l izoproterenollal részlegesen aktiváltuk (**3. ábra**).

Izoproterenol kezelést követően a kalciumáram a kontroll érték $263 \pm 29\%$ -ára nőtt ($-6,3 \pm 0,2$ pA/pF-ről $-16,6 \pm 2,3$ pA/pF-ra), ami ET-1 jelenlétében $-13,6 \pm 2,1$ pA/pF-ra, vagyis $17,8 \pm 2\%$ -kal csökkent (**3.A. ábra**). Ez százalékban kifejezve kisebb, de abszolút értékben nagyobb mértékű csökkenést jelent az izoproterenollal nem kezelt sejtekhez képest.

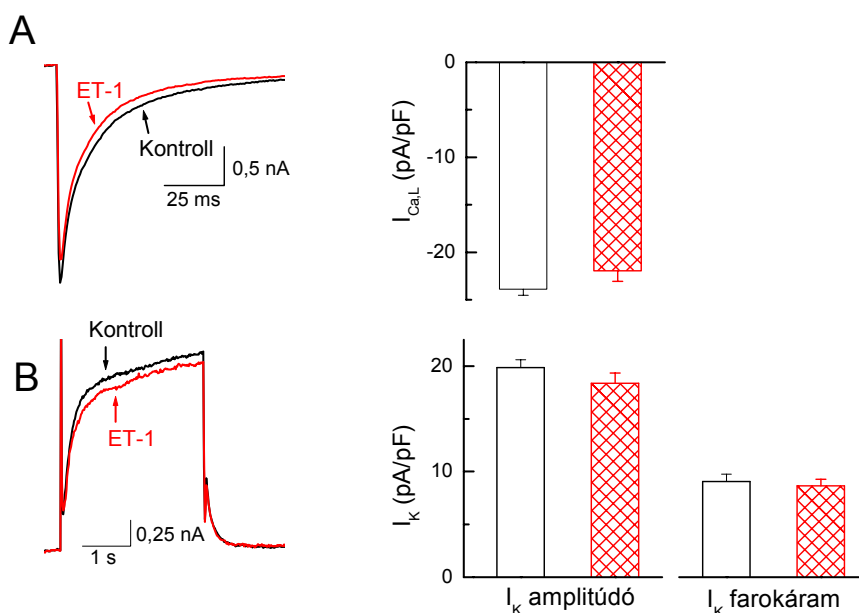
Izoproterenol hatására a késői káliumáram (I_K) tesztimpulzus alatt aktiválódó komponense $4,17 \pm 0,44$ pA/pF-ről $8,87 \pm 0,37$ pA/pF-ra (a kontroll érték $213 \pm 18\%$ -ára), míg a farokáram a $1,72 \pm 0,21$ pA/pF-ről $3,29 \pm 0,18$ pA/pF-ra (kontroll érték $191 \pm 16\%$ -ára) nőtt (**3.B. ábra**). Ezen izoproterenol által megnövelt I_K áramkomponenseket az ET-1 rendre $7,41 \pm 0,18$ pA/pF-ra ($16,2 \pm 1,5\%$ -kal) és $2,78 \pm 0,22$ pA/pF-ra ($15,6 \pm 4,8\%$ -kal) csökkentette ($P < 0.05$, $n=5$).

Egy másik kísérleti protokollban, melyet a **3.C. ábra** mutat, az ET-1 és izoproterenol alkalmazásának sorrendjét megcseréltük. ET-1 előkezelés után az izoproterenol hatására bekövetkező áramamplitúdó-növekedés a depolarizáció alatt aktiválódó I_K és a farokáram vonatkozásában rendre $31,8 \pm 4,8\%$ és $36 \pm 3,4\%$ -kal volt kisebb, mint amikor az izoproterenol hatását ET-1 által nem előkezelt sejteken teszteltük (**3.D. ábra**).



3. ábra. A és B: Az ET-1 hatása az 50 nmol/l izoproterenollal előkezelt sejtek kalcium- (A) és káliumáramaira (B). Üres oszlop: kontroll, sávozott oszlop: 50 nmol/l izoproterenol, satírozott oszlop: izoproterenol + ET-1 jelenlétében mért áramamplitúdók. **C és D:** Izoproterenol hatása az I_K áramra kontroll (üres oszlop) és ET-1 előkezelt sejteken (satírozott oszlop).

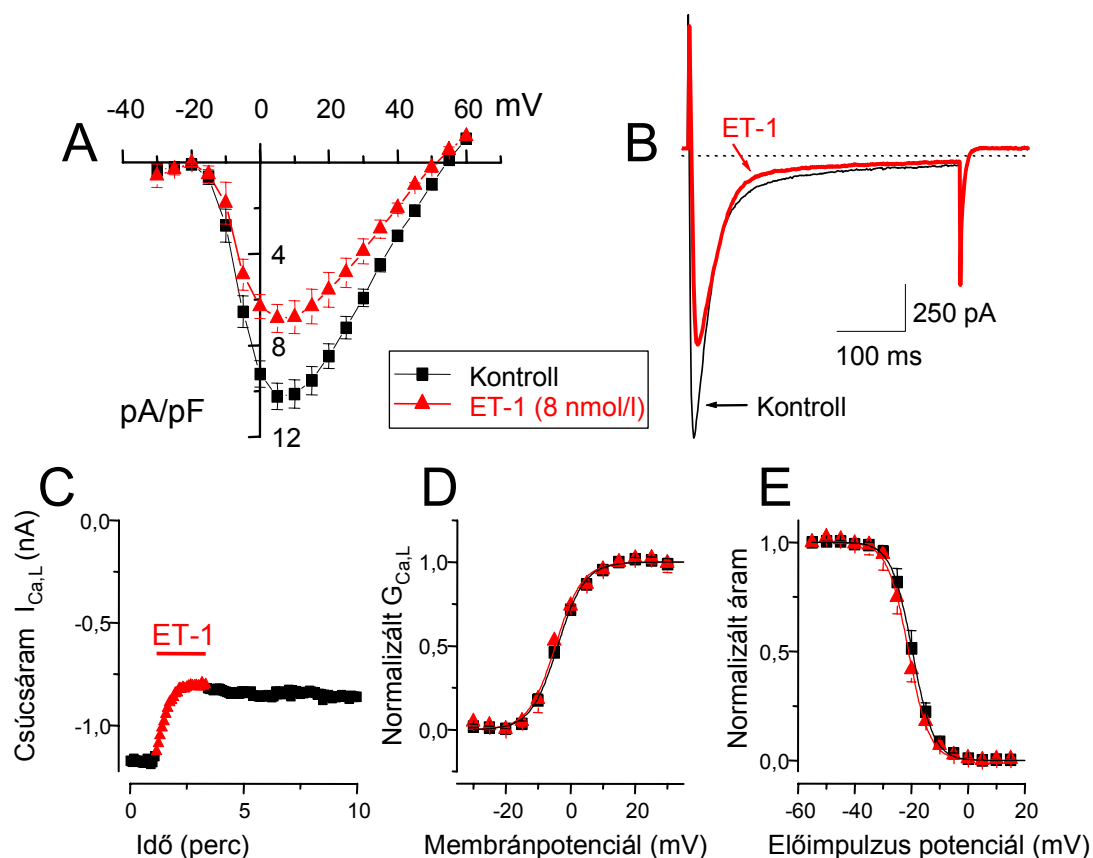
c.) A PKA-függő áramok ($I_{Ca,L}$ és I_K) amplitúdóit maximálisan aktivált PKA mellett (250 μ M 8-bromo-cAMP jelenlétében) az ET-1 nem változtatta meg szignifikánsan. A kalciumáram amplitúdója a $-23,9 \pm 0,6$ pA/pF-ról $-21, \pm 1,1$ pA/pF-ra csökkent (N.S., $n=5$, **4.A. ábra**). Az I_K farokáram amplitúdója $4,15 \pm 0,27$ pA/pF-ról $3,96 \pm 0,24$ pA/pF-ra, a depolarizáció alatt aktiválódó I_K áramkomponens amplitúdója $9,99 \pm 0,19$ pA/pF-ról $9,53 \pm 0,29$ pA/pF-ra változott 8 nmol/l ET-1 kezelést követően (N.S., $n=6$, **4.B. ábra**).



4. ábra: 8 nmol/l ET-1 hatása a $I_{Ca,L}$ és I_K áram amplitúdóira 250 μ M intracellulárisan alkalmazott 8-bromo-cAMP jelenlétében. A sátrózott oszlopok az ET-1 jelenlétében mért áramamplitúdókat jelölik.

2. Az ET-1 hatása egészséges humán szívműködés kalcium- és káliumáramaira

Az egészséges humán kamrai szívműködés kalcium- és káliumáramaira a 8 nmol/l ET-1 hatásának vizsgálatát Tyrode oldatban, izoproterenollal nem előkezelt sejteken végeztük. Megállapítottuk, hogy az ET-1 a +5 mV-on mért kalciumáram amplitúdóját - a kutya kamrai sejteken kapott gátlással összevethető mértékben, $33,3 \pm 1,1\%$ -kal csökkentette ($-10,2 \pm 0,6$ pA/pF-ról $-6,8 \pm 0,8$ pA/pF-ra, $n=5$, $P < 0,05$; **5.A. ábra**).



5. ábra: 8 nmol/l ET-1 hatása a kalciumáram sajátosságaira humán kamrai szívizomsejteken. **A.** Az $I_{Ca,L}$ áram-feszültség karakterisztikájára. **B.** +5 mV-on mért kalciumáram. **C.** Az ET-1 hatásának időfüggése a +5 mV-on mért kalciumáram amplitúdójára. Az áram steady-state aktivációjának (**D**) és inaktivációjának (**E**) feszültségfüggése.

Az áram inaktivációjának időállandóit a +5 mV-on mért áramtransziens inaktíváló szakaszából két exponenciális tag összegeként illesztettük az alábbi egyenlet szerint:

$$I(t) = A_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + A_2 \cdot e^{-t/\tau_2} + A_0 \quad (3. \text{ egyenlet})$$

ahol,

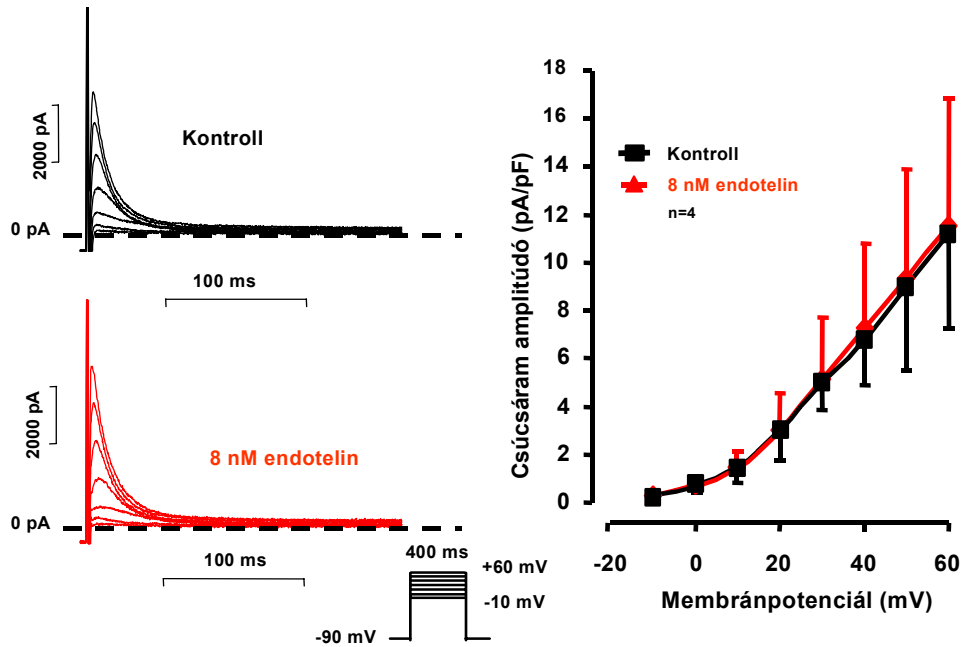
- A_1 az áram gyors inaktíváló komponensének amplitúdója
- A_2 az áram lassan inaktíváló komponensének amplitúdója
- A_0 az áram konstans komponensének amplitúdója
- τ_1 az áram gyorsan inaktíváló komponensének időállandója
- τ_2 az áram lassan inaktíváló komponensének időállandója

Az inaktiváció sebességét jellemző két időállandó értéke ET-1 hatására nőtt, a τ_1 12,8±1,1 ms-ról 17,2±1,2 ms-ra ($P < 0.05$, $n=5$), a τ_2 97,4±11 ms-ról 122±9 ms-ra (N.S., $n=5$; **5.B. ábra**).

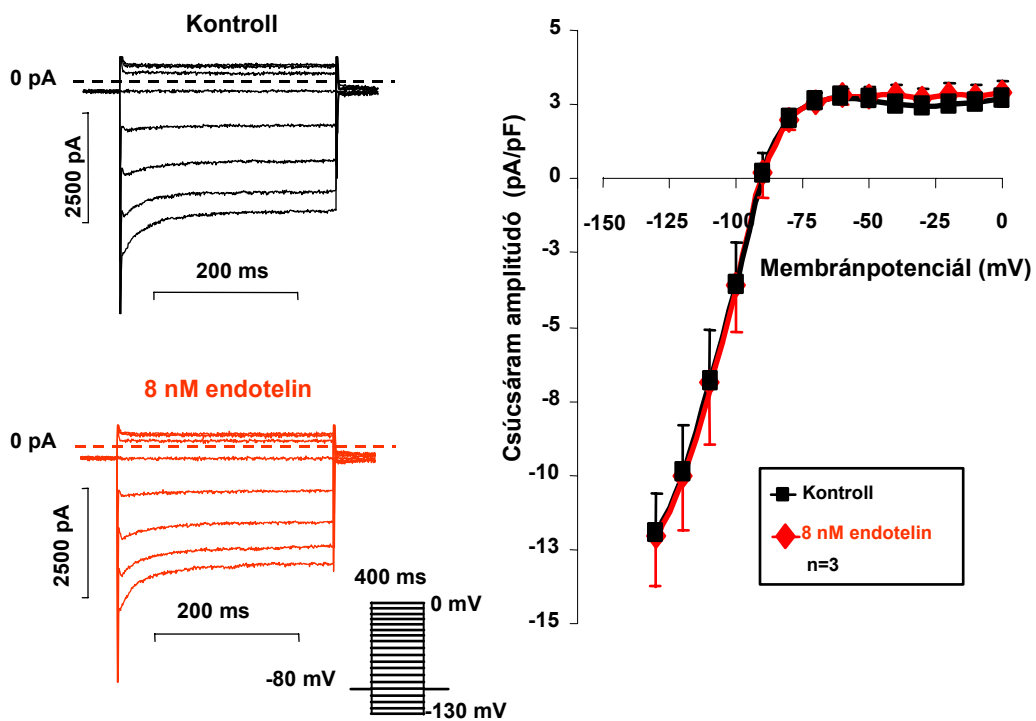
Az ET-1 hatása a +5 mV-on mért kalciumáram amplitúdójára – hasonlóan a kutya kamrai sejteken tapasztaltakkal – 2 percen belül maximálisan kifejlődött és csak minimális reverziót mutatott az ET-1 eltávolítása után (**5.C. ábra**).

Az áram steady-state aktivációjának feszültségfüggését (**5.D. ábra**) az adott membránpotenciál értékekhez tartozó konduktanciák (**G**) alapján számítottuk ki, a $G=I/(V-E_{rev})$ egyenlet alapján, ahol **I** a sejten mérhető ionáram, **V** az aktuális membránpotenciál, E_{rev} az áram reverzálpotenciálja, mely értékeket a kalciumáram áram-feszültség összefüggéséből határoztuk meg. A számított konduktanciákat a maximális konduktancia értékére normalizáltuk és a membránpotenciál függvényében ábrázoltuk. Az így kapott értékeket a kétállapotú Boltzmann függvénnyel illesztettük. Az a membránpotenciál, ahol a csatornák 50%-a van nyitott állapotban -4,7±0,7 mV-ról -4,9±0, mV-ra, a görbe meredekségét leíró paraméter 3,7±0,3 mV-ról 4,1±0,8 mV-ra változott az ET-1 kezelést követően (N.S., $n=5$).

A kalciumáram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését kettős impulzusprotokoll alkalmazásával határoztuk meg (**5.E. ábra**). Az 500 ms hosszú előimpulzus amplitúdóját -55 és +15 mV membránpotenciál-tartományban változtattuk. Az inaktiváció mértékének a megítélésére a 400 ms hosszú, +5 mV-ra depolarizáló tesztimpulzust használtunk. A tesztimpulzusokkal kiváltott csúcsáram amplitúdókat a -55 mV előimpulzust követő áram amplitúdójára normáltuk (az 1. egyenletben leírtak szerint), majd a hányadosokat az előimpulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk. A Boltzmann függvénnyel történő illesztéssel kapott paramétereket az ET-1 nem változtatta meg szignifikánsan. Az a membránpotenciál, ahol a csatornák 50%-a inaktivált állapotban van -19,3±1,2 mV-ról -21,6±0,7 mV-ra, a görbe meredekségét leíró paraméter 3,45±0,27 mV-ról 3,83±0,63 mV-ra változott ET-1 kezelést követően (N.S., $n=5$). Fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy az ET-1 nem okozott szignifikáns változásokat a kalciumáram feszültségfüggő kapuzási paramétereiben.



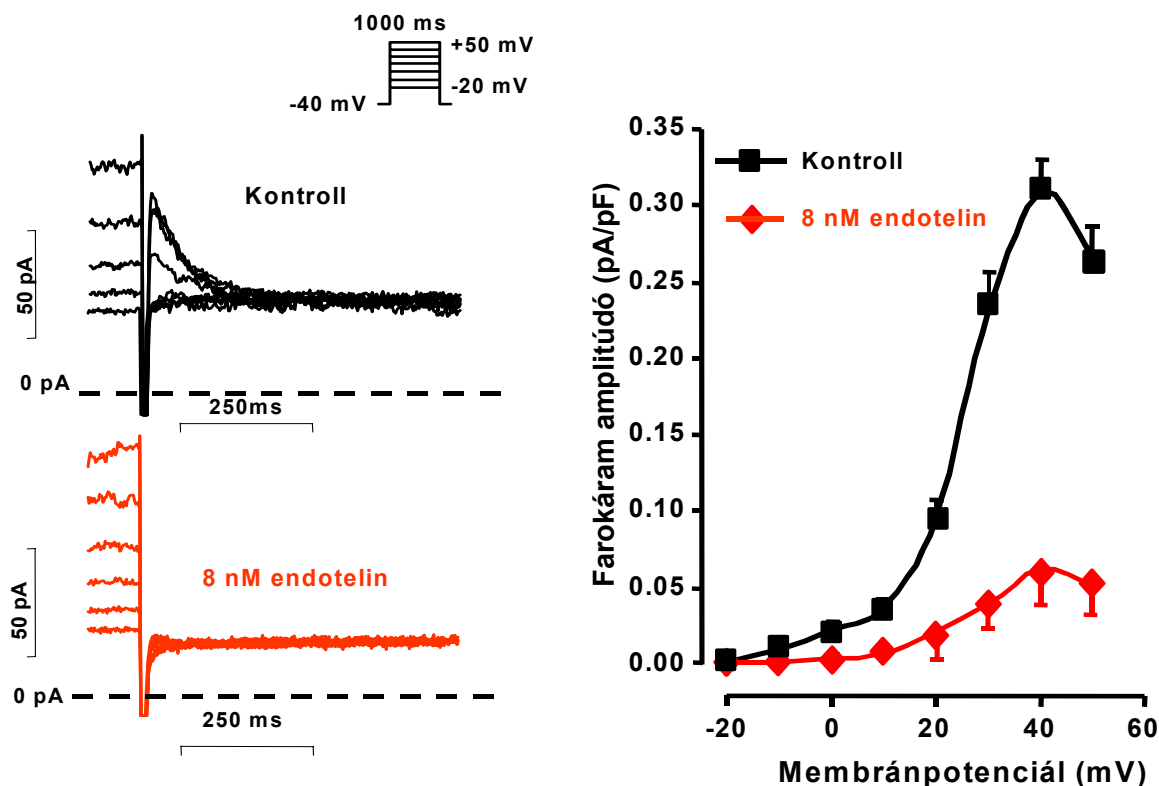
6. ábra: Az ET-1 hatásának hiánya a tranziens káliumáramra (I_{to})



7. ábra: Az ET-1 hatásának hiánya a nyugalmi káliumáramra (I_{K1}) és a membrán steady-state áramfeszültség karakterisztikájára.

Az ET-1 előkezelés (8 nmol/l, 5 perc) nem volt hatással sem a tranzienst káliumáram (+5 mV-on mérve: $9,3 \pm 4,4$ pA/pF versus $9,0 \pm 4,4$ pA/pF) sem a nyugalmi káliumáram (-100 mV-on mérve: $-3,6 \pm 1,4$ pA/pF versus $-3,7 \pm 1,4$ pA/pF) amplitúdóira és kinetikai paramétereire és nem változtatta meg a membrán steady-state áram-feszültség karakterisztikáját (N.S., $n=4$; **6. és 7. ábra**).

A késői káliumáram gyors komponensét (I_{Kr}) 8 nmol/l ET-1 79,7%-kal csökkentette humán kamrai szívizomsejteken (**8. ábra**). Az áramot a lassú komponenszt szelektíven gátló chromanol-293B jelenlétében mértük és a depolarizáló négyszögimpulzus után megjelenő, E-4031-szenzitív farokáram amplitúdójaként azonosítottuk. Az áram amplitúdója $0,31 \pm 0,02$ pA/pF-ről $0,06 \pm 0,02$ pA/pF-ra csökkent 5 perces ET-1 kezelést követően ($P < 0,05$, $n=4$).

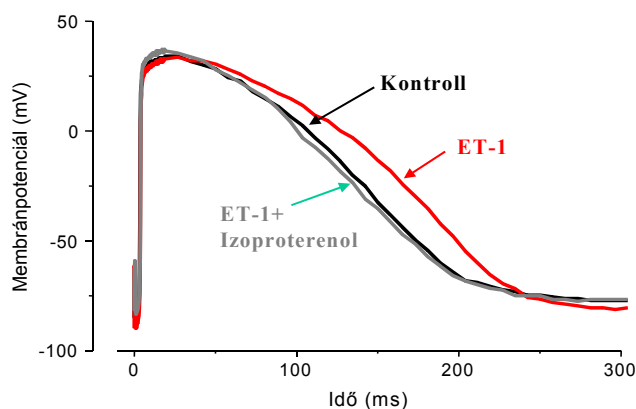


8. ábra: Az ET-1 hatása a késői káliumáram gyors komponensére (I_{Kr}). Az ábra bal oldalán a farokáramokat, jobb oldalán a farokáramok amplitúdóját ábrázoltuk az áramot aktiváló depolarizáló négyszögjel feszültségének függvényében.

3. Az ET-1 hatása a kalciumtranziens és a kontrakciós erő nagyságára, valamint az akciós potenciál paramétereire

Az ET-1 hatását a kutya jobb kamrai trabekulák kontraktilitására izometriás körülmények között vizsgáltuk. A 30 percig alkalmazott 8 nmol/l ET-1 nem volt szignifikáns hatással a kontrakciós erő nagyságára ($1,22 \pm 0,14$ mN versus $1,21 \pm 0,17$ mN, N.S., $n=5$). A feszültség-clamp körülmények között izolált sejteken mért kalciumtranziens nagyságát a 350 s hosszú, 0 mV-ra depolarizáló négyszögimpulzus alkalmazásával vizsgáltuk. Az intracelluláris kalciumkoncentrációt kifejező, relatív egységben megadott fluoreszcencia hányados értéke (F_{340}/F_{380}) sem a szisztolé ($1,319 \pm 0,04$ versus $1,364 \pm 0,06$), sem a diasztolé ($1,007 \pm 0,004$ versus $1,009 \pm 0,06$) során nem változott szignifikánsan 8 nmol/l ET-1 kezelés hatására (N.S., $n=5$). Hasonlóképpen nem befolyásolta az ET-1 előkezelés az intracelluláris kalciumtranziensek lecsengésének időállandóját (558 ± 30 ms versus 563 ± 80 ms, N.S., $n=5$).

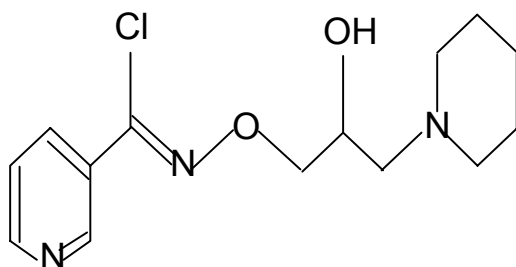
Multicelluláris preparátumon konvencionális mikroelektrodák segítségével vizsgáltuk az ET-1 akciós potenciál paramétereire kifejtett hatását. ET-1 hatására az APD_{50} értéke 146 ± 6 ms-ról 160 ± 3 ms-ra nőtt ($P < 0.05$), amely hatást 50 nmol/l izoproterenol hozzáadása teljes mértékben visszafordította (az APD_{50} 144 ± 11 ms-ra csökkent). Az APD_{90} értékekben látott változások kevésbé kifejezetek voltak: az APD_{90} 213 ± 7 ms-ról 221 ± 7 ms-ra nőtt (N.S.), majd izoproterenol hatására 209 ± 7 ms-ra csökkent vissza (**9. ábra**). Az akciós potenciál többi paraméterére (nyugalmi



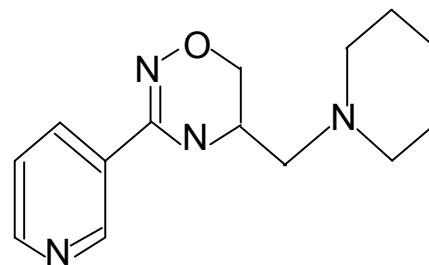
membránpotenciál, depolarizáció maximális sebessége, akciós potenciál amplitúdója) az ET-1 nem volt hatással.

9. ábra: Az ET-1 és az izoproterenol hatása az akciós potenciál paramétereire.

4. A bimoclomol és a BRX-005 alacsony koncentrációinak hatása a kontraktilitásra és a kalciumtranziens amplitúdójára dobogó szíven



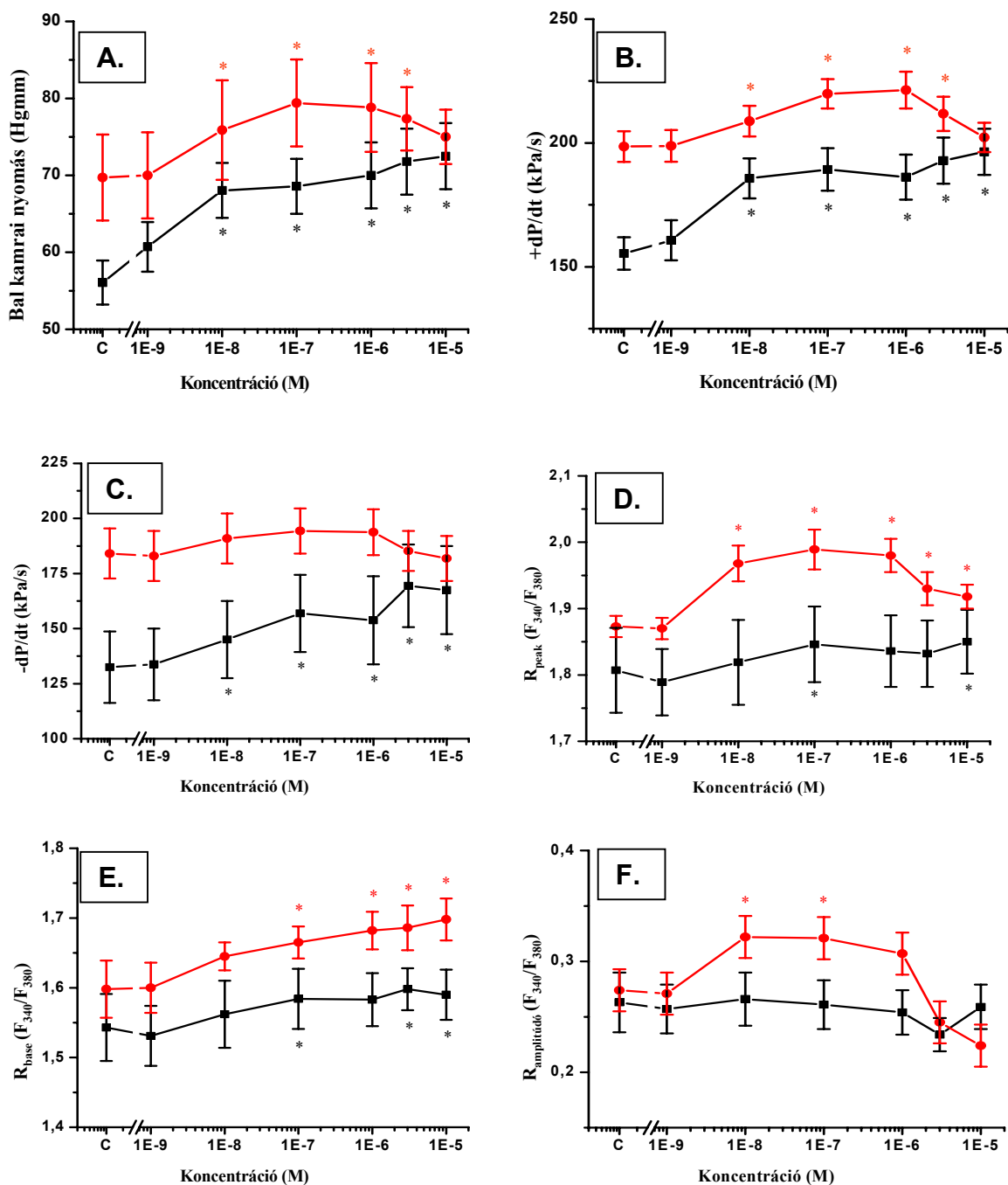
Bimoclomol



BRX-005

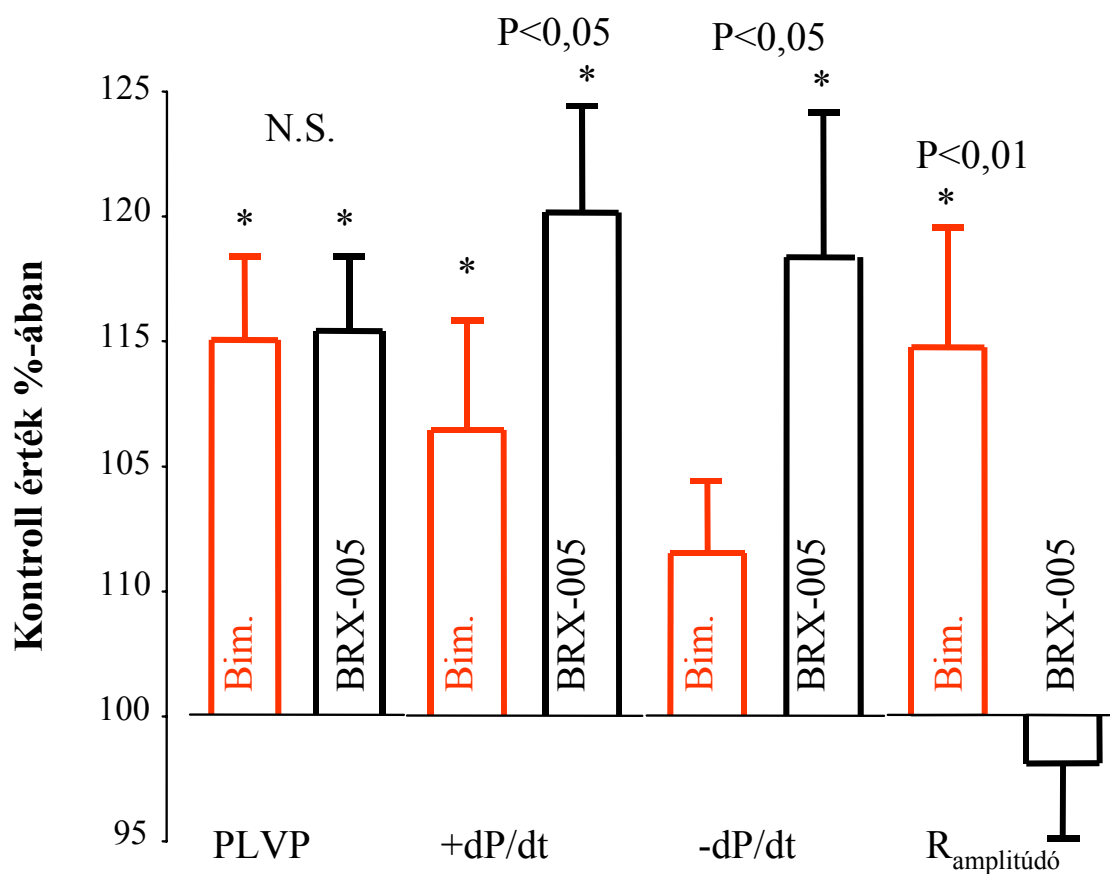
10. ábra: A Bimoclomol és a BRX-005 szerkezeti képlete

Langendorff-perfundált tengerimalac szívpreparátumokon külön kísérletsorozatban vizsgáltuk a bimoclomol ($n=6$) és a BRX-005 ($n=5$) hatását a bal kamrai nyomás és az intracelluláris kalciumtranziensek paramétereire (**11. ábra**). Megállapítottuk, hogy alacsony koncentrációjú (10 nmol/l - $1 \text{ } \mu\text{mol/l}$) bimoclomol vagy BRX-005 előkezelés hatására szignifikánsan megnőtt a bal kamrai nyomás csúcértéke (**11.A. ábra**) és a nyomás kialakulásának maximális sebessége (**11.B. ábra**). Ezen felül a bimoclomol a fenti koncentrációtartományban szignifikánsan növelte a szisztolés (**11.D. ábra**) és diasztolés (**11.E. ábra**) kalciumkoncentrációkat is, míg magasabb koncentrációknál ($1\text{-}10 \text{ } \mu\text{mol/l}$) inkább a diasztolés kalciumszint emelkedése dominált. Ebből fakadóan a bimoclomol bifázisos hatást fejtett ki az intracelluláris kalciumtranziensek amplitúdójára: $10\text{-}100 \text{ nmol/l}$ között szignifikánsan növelte, ennél magasabb koncentrációknál nem változtatta meg vagy csökkentette a kalciumtranziensek nagyságát (**11.F. ábra**). A bifázisos hatás időfüggő jellegének megítélése érdekében a 100 nmol/l bimoclomol hatását 30 percig követtük. Leszámítva a hatás kialakulásához szükséges kezdeti 5 percet, nem találtunk időfüggő változást sem a kontrakciós paraméterekben sem a kalciumtranziensek nagyságában a vizsgált 30 perc alatt.



11. ábra: A bimoctamol (●) és a BRX-005 (■) kumulatív koncentrációfüggő hatásai a kontraktilitás paramétereire és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációkra. **A.** A bal kamrai nyomás csúcsértéke. **B.** A kontrakció kialakulásának maximális sebessége a szisztolé alatt. **C.** A relaxáció kialakulásának maximális sebessége a diasztolé alatt. **D.** A szisztolé alatt mért intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció. **E.** A diasztolé alatt mért intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció. **F.** Az intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója. A kalciumkoncentrációkat fluoreszcens hányadosként (F_{340} / F_{380}) jellemeztük.

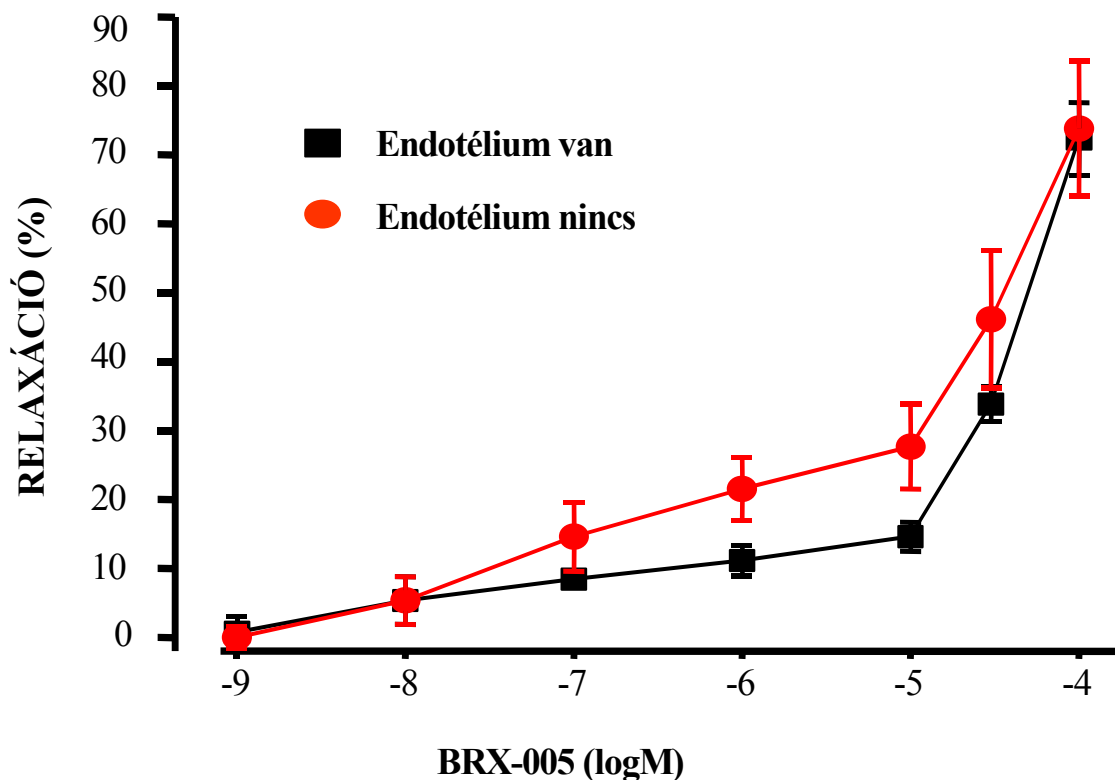
A BRX-005, a bimeclomolhoz hasonlóan, koncentráció-függő módon fokozta a szívizom kontraktilitását. A kontrakció és a relaxáció maximális sebességére kifejtett hatása (pozitív inotrop és luzitrop hatások) szignifikánsan nagyobb volt, mint a bimeclomolnak, de ellentétben a bimeclomollal csak csekély mértékben emelte meg a szisztolés és diasztolés kalcium szinteket és nem változtatta meg az intracelluláris kalciumtranziensek amplitúdóját (**11.** és **12. ábra**). Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy míg a bimeclomol hatásának fontos komponense az intracelluláris kalciumkoncentráció emelése, addig a BRX-005 esetében inkább kalcium-érzékenyítő hatás valószínűsíthető.



12. ábra: Azonos koncentrációjú (100 nM) bimeclomol (n=6) és BRX-005 (n=5) hatásainak összehasonlítása a bal kamrai nyomás (PLVP), a kontrakció kialakulásának maximális sebessége (+dP/dt), a relaxáció maximális sebessége (-dP/dt), és az intracelluláris kalciumtranziens nagyságának tekintetében.

5. A BRX-005 vazorelaxáns hatása

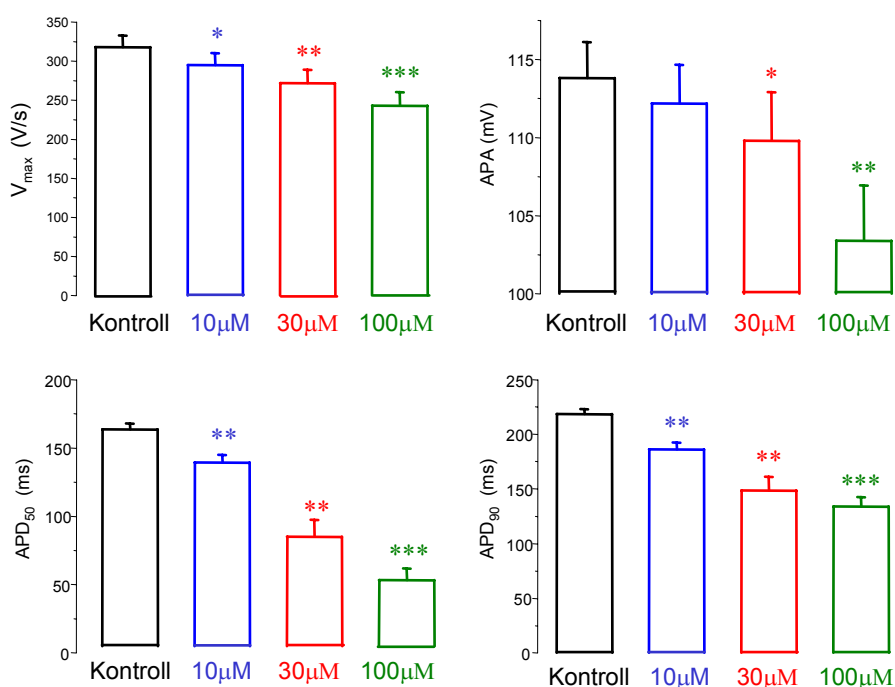
A BRX-005 vaszkuláris simaizomra kifejtett hatását tengerimalac pulmonális artériájából készített preparátumon vizsgáltuk. Az 1 μ M fenilefrinrel történő előkezelést követően kumulatív dózis-hatásgörbét vettünk fel, miután a fenilefrin steady-state hatása beállt. A **13. ábra** a BRX-005 koncentráció-függő relaxáló hatását mutatja az előzetesen prekontrahált preparátumon. Ez a hatás nem függött az érfal endotheliumának épségétől, mivel az előzetesen endotheliumától megfosztott preparátumokon is hasonló eredményt kaptunk: a $\log EC_{50}$ értéke rendre $-4,35 \pm 0,06$ és $-4,54 \pm 0,26$ volt (N.S., $n=5$).



13. ábra: A BRX-005 koncentráció-függő vazorelaxáns hatása tengerimalac pulmonális artéria preparátumon a fenilefrin előkezelés hatására kialakuló kontrakciós szintre vonatkoztatott relaxáció százalékában.

6. A bimoclomol és a BRX-005 magas koncentrációinak hatása az akciós potenciál paramétereire kutya kamrai szívizomsejteken

A bimoclomol akciós potenciál paramétereire kifejtett hatását kutyából izolált kamrai szívizomsejteken vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az akciós potenciál időtartamát (APD) és a depolarizáció maximális sebességét (V_{max}) a bimoclomol magas koncentrációi (10-100 $\mu\text{mol/l}$) koncentráció-függő módon csökkentik (**14. ábra**). A szer hatása 5 perces mosással jelentős mértékben visszafordítható volt.



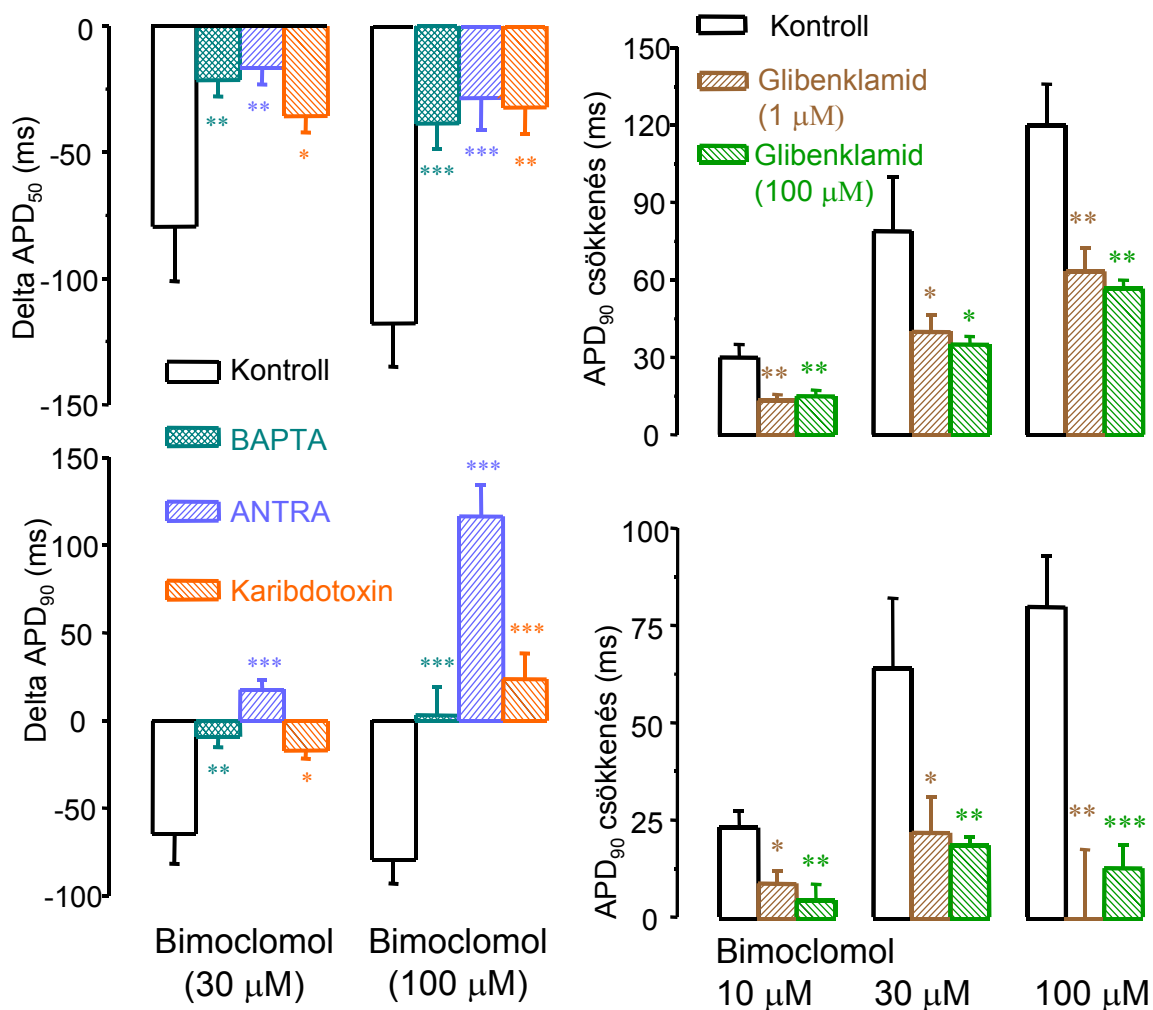
14. ábra: A bimoclomol koncentráció-függő hatása az akciós potenciál paramétereire 1 Hz ingerlőfrekvencia mellett. **A.** Depolarizáció kialakulásának maximális sebessége (V_{max}). **B.** Akciós potenciál amplitúdója (APA). **C. és D.** Az akciós potenciál 50%-os és 90%-os repolarizációjához tartozó időtartamok (rendre APD_{50} és APD_{90}).

A bimoclomol akciós potenciál időtartamot rövidítő hatása a repolarizáció 50%-os szintjén szignifikánsan nagyobb volt, mint a repolarizáció 90%-os szintjén. A rövidítő hatás kifejezett frekvenciafüggést mutatott: 100 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban az APD_{50} értékét 1 Hz ingerlőfrekvencián 71 \pm 9%-kal (162 \pm 6 ms-ról 45 \pm 13 ms-ra), míg 0,2 Hz frekvencián csak 49 \pm 11%-kal (198 \pm 8 ms-ról 101 \pm 21 ms-ra) csökkentette. Az

APD₉₀ értékek csökkenése kisebb mértékű volt: 36±5% 1 Hz-en és 16±9 % 0,2 Hz-en (n=5, P<0,05).

A bimoclomol akciós potenciál időtartamot rövidítő hatását az intracelluláris kalciumkoncentráció nagysága jelentős mértékben módosította, ugyanis a 10 mmol/l EGTA-t is tartalmazó patch-pipettával történő akciós potenciál regisztrálás során szignifikánsan kisebb rövidítő hatást kaptunk (1 Hz-en az APD₅₀ és APD₉₀ értékek rendre 28±6 és 21±6 %-kal csökkentek), mint a fentiekben tárgyalt, kalciumpuffert nem tartalmazó, mikroelektrodával történt méréseknél. Hasonlóképpen, szignifikánsan csökkentette a rövidítő hatást, ha a bimoclomolt 10 µmol/l BAPTA-AM kezelést követően alkalmaztuk (**15. ábra**). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a bimoclomol akciós potenciál időtartamot rövidítő hatásának egy része az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelése során keresztül valósul meg – feltehetően kalcium-függő ionáramok aktiválása révén. Valóban, a kalcium-függő kloridáram gátlása 0,5 mmol/l antracén-9-karboxilsav, illetve a kalcium-függő káliumáram blokkolása 20 nmol/l karibdotoxin segítségével szignifikánsan csökkentette - bár nem védte ki teljesen - a bimoclomol APD₅₀ értéket csökkentő hatását. Figyelemre méltó ugyanakkor, hogy bimoclomol antracén-9-karboxilsav jelenlétében kifejezetten nyújtotta az APD₉₀ időtartamát (**15. ábra**). Részleges védő hatása volt az ATP-szenzitív káliumáramot gátló glibenklamidnak is (1 és 100 µmol/l), ami arra enged következtetni, hogy a bimoclomol akciós potenciál időtartamot rövidítő hatásának van egy kalcium-független komponense is az ATP-szenzitív káliumcsatornák aktiválása révén (**15. ábra**). A fenti gátlószerek egyike sem védte ki a bimoclomol akciós potenciál amplitúdóra és depolarizációs sebességre kifejtett szupresszív hatását, amiket a bimoclomol nátrium csatornákra irányuló gátló hatásával magyarázunk.

Ellentétben a bimoclomollal, a BRX-005 magas koncentrációban (100 µmol/l) sem változtatta meg szignifikánsan az akciós potenciál amplitúdóját (115,3±1,5 versus 115,2±2,2 mV) és a depolarizáció maximális sebességét (351±17 versus 337±32 V/s), és csupán a legmagasabb (100 µM) koncentrációban csökkentette szignifikánsan az APD₅₀ és APD₉₀ értékeket (rendre 157±13 ms-ról 109±15 ms-ra és 204±13 ms-ról 164±16 ms-ra, P<0,05, n=6).



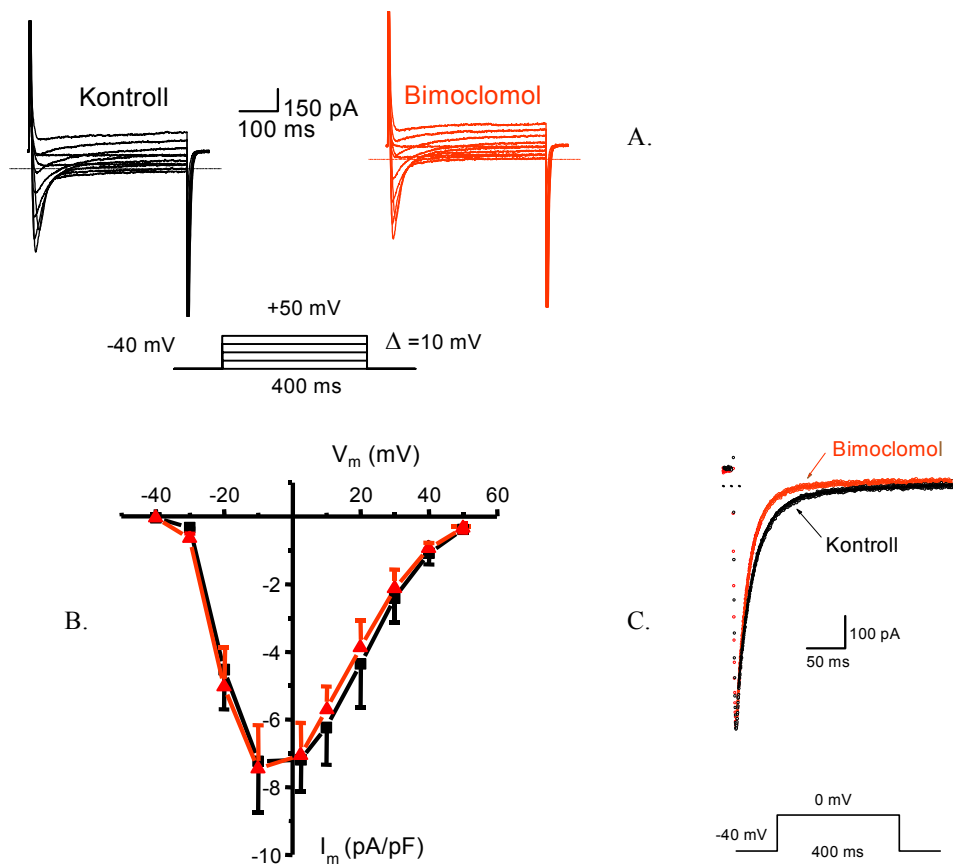
15. ábra: A bimocloamol hatása az akciós potenciál időtartamára (APD₅₀ vagy APD₉₀) 10 μmol/l BAPTA-AM, 0,5 mmol/l antracén-9-karboxilsav (ANTRA), 20 nmol/l karibdotoxin és 1 vagy 100 μmol/l glibenklamid jelenlétében. Kontrollként a 30 vagy 100 μM bimocloamol jelenlétében mért értékeket tekintettük, a változások mértékét a bimocloamol és a blokkolószer hiányában mért akciós potenciál időtartamokhoz viszonyítottuk.

A fenti eredmények fényében arra következtünk, hogy a BRX-005 - szemben a bimocloammal – nem gátolja magas koncentrációban a nátriumáramot és akciós potenciál rövidítő hatása is sokkal gyengébb, mint a bimocloamolé.

7. Magas koncentrációjú bimocloamol hatása a transzmembrán áramokra

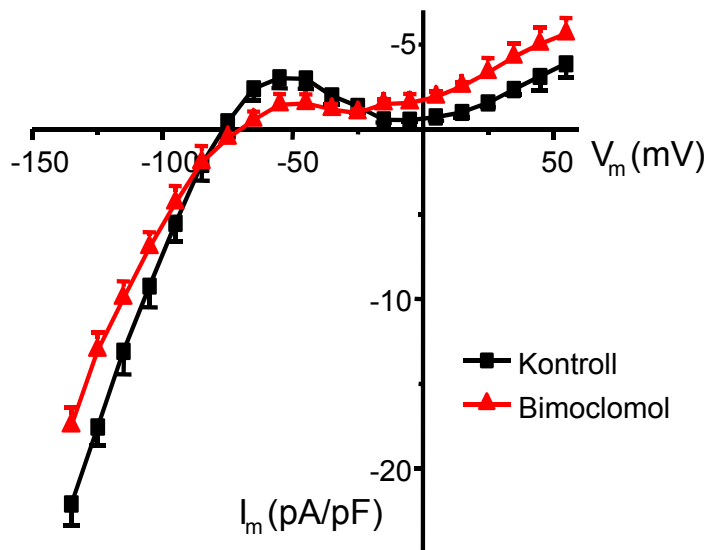
Feszültség-clamp körülmények között 100 μM bimocloamol a kalciumáram amplitúdóját és áram-feszültség karakterisztikáját nem változtatta meg, de 19,8±1,6ms-ról 16,8±1,2 ms-ra csökkentette az áram inaktivációjának időállandóját

(**16. ábra**). Ennek következtében a 150 ms időtartamú és 0 mV feszültségimpulzusok alatt beáramló töltésmennyiséget, amelyet a kalciumáram integráljaként számítottunk, $-9,3 \pm 0,54$ pC-ról $-8,1 \pm 0,63$ pC-ra csökkentette ($n=6$, $P<0,05$).

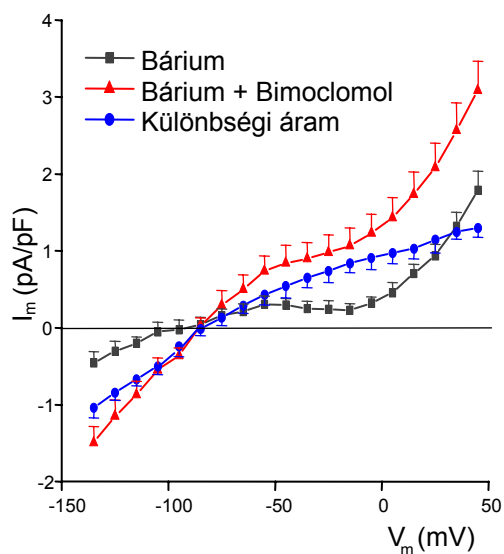


16. ábra: 100 μ M bimocloamol hatása a kalciumáramra. **A.** -40- é +50 mV közötti tesztpotenciálokon regisztrált áramamplitúdók. **B.** Áram-feszültség karakterisztika. **C.** Az áram inaktivációja.

A membrán steady-state áram-feszültség összefüggésének meghatározása a korábbiakban ismertetett protokoll szerint történt: -80 mV holding potenciálról alkalmaztunk depolarizáló és hiperpolarizáló impulzusokat a -135 és +55 mV közötti feszültségtartományban 400 ms időtartamra. A **17. ábrán** látható, hogy 100 μ mol/l bimocloamol csökkentette az áramot a negatív membránpotenciál tartományban, míg pozitív feszültségeken növelte az áramot. A -135 mV-on mért áram (nyugalmi káliumáram) amplitúdóját a bimocloamol 20,1%-kal ($-20,8 \pm 0,7$ pA/pF-ről $-16,6 \pm 0,8$ pA/pF-ra) csökkentette ($n=8$, $P<0,05$). Ez azt bizonyítja, hogy a bimocloamol magas koncentrációban gátolja az I_{K1} áramot.



17. ábra: *Bimoclolomol (100 $\mu\text{mol/l}$) hatása a membrán steady-state áram-feszültség karakterisztikájára.*



18. ábra: *A 100 $\mu\text{mol/l}$ bimoclolomol által indukált áram 0,3 mmol/l BaCl_2 jelenlétében. A különbségi áramot a [Bárium] – [Bárium + Bimoclolomol] görbék különbségeként számítottuk.*

A bimoclomol hatását a továbbiakban az I_{K1} blokkoló 0,3 mmol/l $BaCl_2$ jelenlétében vizsgáltuk (**18. ábra**), ami lehetőséget adott a bimoclomol által indukált áramkomponens jellemzésére. Ennek az extra áramkomponensnek az 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. Egyensúlyi potenciálja alapján a bimoclomol hatására aktiválódó áramkomponens töltéshordozója klorid és/vagy kálium egyaránt lehet.

A tranziens káliumáram +50 mV-on mért amplitúdóját ($7,7 \pm 1$ versus $6,9 \pm 1$ pA/pF), inaktivációjának időállandóját ($7,6 \pm 0,9$ versus $7,7 \pm 0,7$ ms), inaktivációból való visszatérésének időállandóját ($28,2 \pm 0,9$ versus $27,9 \pm 1,3$ ms) nem változtatta meg szignifikánsan 100 μ mol/l bimoclomol ($n=7$, $P>0,05$). Hasonlóképpen nem volt hatással a bimoclomol a késői káliumáram amplitúdójára ($3,6 \pm 0,3$ versus $3,9 \pm 0,2$ pA/pF +50 mV-on, N.S., $n=5$).

MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az értekezésben bemutatott kísérleteink témája több egymástól eltérő támadáspontú és hatású molekula szívelektrofiziológiai hatásainak vizsgálata volt. A rendelkezésünkre álló szakirodalmat áttekintve és saját megállapításainkat összegezve úgy ítéljük meg, hogy a vizsgált molekulák legfontosabb és egyben közös vonása, hogy fő hatásaik nem a szívmusclek elektromos tevékenységének közvetlen megváltoztatására irányulnak, de valamennyien rendelkeznek ilyen hatásokkal is.

A kardiovaszkuláris rendszeren belül az endotelin-1 legfontosabb és legismertebb hatásai a vazokonstriktor és sejtproliferációt előidéző hatások. Mára egyre inkább elfogadott az a nézet, hogy az ET-1 hatásainak egy részét a pertussis toxin (PTX) érzékeny Gi-fehérjével kapcsolt receptorokon keresztül fejti ki (Xie és mtsai., 1996; Ono és mtsai., 1994; Washizuka és mtsai., 1997). Pontos hatásmechanizmusának az egyes sejtípusokban való azonosítása az érdeklődés előterében álló probléma. Az endotelin rendszer kísérletes molekuláris és farmakológiai gátlásának eredményei alapján joggal feltételezi a tudomány, hogy az ET-1 fontos szerepet játszik a normál cardiovascularis rendszer homeosztázisának fenntartásában.

Celluláris szívelektrofiziológiai vizsgálatainkat kutya és humán enzimatikusan izolált kamrai szívmusclejtein végeztük. Megállapítottuk, hogy ezeken a sejteken az ET-1 csökkenti az L-típusú kalciumáram amplitúdóját. Mindkét speciesben közel egyforma mértékű (kb. 30%) gátlást kaptunk, ami azt valószínűsíti, hogy a gátló hatás mechanizmusa is azonos a két faj esetében. Régóta feltételezik, hogy a szívmusclek L-típusú kalciumcsatornáinak β -adrenerg receptorokon keresztüli aktiválása a csatornák cAMP-függő PKA enzimek általi foszforilációjának következménye (Sperelakis és Schneider, 1976; Reuter és Scholz, 1977; Bers és Perez-Reyes, 1999), melyet az elmúlt két évtized elektrofiziológiai kísérletei megerősítették ezt a molekulárbiológiai módszerekkel nehezen bizonyítható feltételezést (Kamp és Hell, 2000). Az ET-1 kalciumáramra kifejtett gátló hatását a cAMP-PKA rendszer részleges aktiválása után is megvizsgáltuk kutya kamrai sejtjein. Hasonló kísérletekről legkorábban Reid számolt be, aki leírta, hogy az ET-1-nek noradrenerg-stimulációt követően negatív inotrop és chronotrop hatása van

tengerimalac és patkány pitvaron. Hasonló eredményről számolt be Delpech 1995 és 1997-ben (Delpech és mtsai., 1995; Delpech és mtsai., 1997). Saját kísérleteink során azt találtuk, hogy az ET-1 kalciumáramra irányuló százalékban kifejezett gátló hatása csökken (kb. 18%-ra), mikor a cAMP-PKA rendszert előzetesen 50 nmol/l izoproterenollal részlegesen aktiváljuk. Ugyanakkor a PKA rendszer maximális aktivációja után (250 μ M 8-bromo-cAMP jelenlétében) az ET-1 gátló hatása elmaradt. Adataink arra utalnak, hogy az ET-1 kardiális kalciumcsatornákra kifejtett gátló hatása kutyán is döntő mértékben az intracelluláris cAMP-koncentráció csökkentése útján valósul meg. Ez egyaránt bekövetkezhet a PTX-érzékeny G_i -fehérjék közvetítésével az adenilát cikláz gátlásán keresztül, vagy a foszfodiészteráz enzim aktiválása útján - mindkét hatás az ET_A receptorok közvetítésével jön létre. Ismert, hogy az L-típusú kalciumcsatorna funkciójának szabályozásában a PKC enzimcsalád is szerepet játszik, ugyanis az endotelinek - hasonlóan az α_1 -adrenerg agonistákhoz és az angiotenzin II-höz - a G_q -fehérjékkal kapcsolt receptorokon közvetítésével a PLC-útvonalon keresztül is aktiválják a proteinkináz C enzimeket (Woo, 1999). Ezért az endotelin-1 elektrofiziológiai hatásainak tárgyalása során nem hagyható figyelmen kívül a különböző szignalizációs útvonalak párhuzamos aktiválódásának lehetősége.

Vizsgálataink során azt is megállapítottuk, hogy az ET-1 mindkét vizsgált speciesben gátolja a késői káliumáramot, de jelentős különbségeket találtunk e tekintetben a kutya és humán kamrai szívizomsejtek között. Kutyán sem nyugalmi cAMP szintek, sem maximálisan aktivált cAMP-PKA rendszer mellett az ET-1 nem gátolta a késői káliumáramot. Gátlást kizárólag az izoproterenollal részlegesen aktivált káliumcsatornák esetében sikerült kimutatni. Ezzel szemben a humán szívizomsejteken az ET-1 a késői káliumáram gyors komponensének amplitúdóját izoproterenol kezelés nélkül is masszívan gátolta. Ez a markáns különbség nem magyarázható azzal, hogy a kutyán az áram lassú és gyors komponensét egyaránt tartalmazó áramot, míg humán sejteken csak a gyors komponensét mértük, sokkal inkább a két species káliumáramainak eltérő szabályozási mechanizmusaira utal. Ezt a magyarázatot érdemes kiegészíteni azzal a megjegyzéssel, hogy a késői káliumáram komponenseinek aránya jelentős fajok közötti különbségeket mutat (Sanguinetti és Jurkiewicz, 1990; Veldkamp, 1998).

Az ET-1 eltérő hatásait a kutya kamrai szívműködés kalcium- és káliumáramainak vonatkozásában a két cAMP-érzékeny áram különböző cAMP érzékenységeivel magyarázzuk, aminek hátterében eltérő proteinkináz enzimek részvétele valószínűsíthető. Nyugalmi cAMP szintek mellett a kalciumáram cAMP-függő komponense részlegesen aktiválódik, a késői káliumáramé nem, így ez utóbbi nem csökkenthető az intracelluláris cAMP koncentráció csökkentésével. A 8-bromo-cAMP jelenlétében a PKA rendszer maximálisan aktivált, melyen a cAMP szint csökkentése nem okoz detektálható változást. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az L-típusú kalciumáram vonatkozásában a kutya kamrai sejteken jól modellezhetők az ET-1 humán sejtekre irányuló hatásai, míg a késői káliumáram esetén nem.

A stresszkörülmények túlélésében az endogén molekulák mellett exogén, szintetikus anyagok is szerepet játszhatnak. A stresszhelyzetek kivédésében szerepet játszó bimoclozol és a szerkezetileg nagyon hasonló BRX-005 hatásait több kísérleti modellben leírták. Szívelektrofiziológiai hatásait elsőként jellemeztük kutya és tengerimalac szívpreparátumokon. Megállapítottuk, hogy mindkét molekula pozitív inotrop hatással rendelkezik alacsony koncentrációban (0,01-1 $\mu\text{mol/l}$). Ennek hátterében a BRX-005 esetében a kalcium-érzékenyítő hatás valószínűsíthető (vazorelaxáló hatása is ezzel magyarázható), míg a bimoclozol megnövelve a rianodin-receptorok nyitvatartási valószínűségét fokozza a kalciumtranziensek amplitúdóját. Alacsony koncentrációban egyik szer sem módosítja markánsan az akciós potenciál paramétereit, tehát feltehetően ionáramokra irányuló közvetlen hatásuk elhanyagolhatóak. A bimoclozol ennél magasabb koncentrációjának (10 $\mu\text{mol/l}$) negatív inotrop hatása volt tengerimalac Langendorff-készítményen, mert csökkentette a kalciumtranziensek amplitúdóját. Ennek oka a rianodin-receptorok olyan mérvű aktiválása volt, amely a diasztolés kalciumkoncentráció jelentős megnövekedéséhez vezetett. Extrém magas koncentrációban (1 mmol/l) a bimoclozol már gátolta a rianodin-receptorokat is.

Kutya kamrai szívműködésen a magas koncentrációjú bimoclozol (100 $\mu\text{mol/l}$) megrövidítette az akciós potenciál időtartamát. Hatása komplex mechanizmusokon keresztül érvényesül: ezek egy része az intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedésével hozható kapcsolatba, míg mások kalcium-függetlenek. A kalcium-függő hatást bizonyítja, hogy a bimoclozol akciós potenciál

időtartamot rövidítő hatása jelentősen csökkent a kalcium-függő klorid- és káliumáramok blokkolása után, vagy amikor az intracelluláris kalciumot EGTA-val vagy BAPTA-val pufferoltuk. A kalciumáram inaktivációjának bimoclomol jelenlétében megfigyelt gyorsulása is feltehetően az intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedésének következménye, amelynek oka az intracelluláris raktárakból történő fokozott kalcium kilépés. A bimoclomol hatására BaCl_2 jelenlétében aktiválódó extra áramkomponens - amelynek reverzálpotenciálját -90 mV-nak mértük - töltéshordozója klorid vagy kálium egyaránt lehet, mivel mindkét áram egyensúlyi potenciálja a nyugalmi membránpotenciál közelében van. Valószínű, hogy a mért -90 mV-os érték az ennél negatívabb kálium egyensúlyi potenciál és az ennél pozitívabb klorid egyensúlyi potenciál kombinációjának eredményeként alakul ki, ami azt sugallja, hogy mindkét kalciumfüggő áram aktiválódik bimoclomol jelenlétében. Ezt összhangban van a farmakológiai kísérletek eredményével is, mert mindkét áramkomponens gátlása csökkentette a bimoclomol hatására bekövetkező akciós potenciál rövidülést.

Ezen túlmenően a bimoclomol legalább három, kalciumtól független hatását azonosítottuk. A szer egyrészt csökkentette az akciós potenciál depolarizációjának sebességét, ami a gyors Na^+ -áram közvetlen gátlására utal, mert nem volt EGTA- ill. BAPTA-kezeléssel kivédhető. Az ionárammérések tanúsága szerint a bimoclomol csökkentette a nyugalmi káliumáram amplitúdóját, ami magyarázhatja a magas bimoclomol koncentrációk enyhe depolarizáló hatását. Végül, a glibenklamid jelenlétében végzett kísérletek alapján kimondhatjuk, hogy a szer aktiválja az ATP-szenzitív kálium csatornákat. Hangsúlyozni szeretném, hogy a fentiekben taglalt ioncsatorna hatások kizárólag a bimoclomol magas – a tervezett terápiás szintet nagyságrendekkel meghaladó – koncentrációinál jelentkeztek, tehát nem jelentenek fenyegető mellékhatásokat. Mindazonáltal, a bimoclomol és BRX-005 hatásainak összevetése alapján, az utóbbi látszik kevesebb potenciális mellékhatással terhelt, ezért terápiás szempontból értékeőbb HSP-koinduktor molekulának.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az értekezésben bemutatott munka célja az volt, hogy karakterizáljuk és összehasonlítsuk az ET-1 celluláris szívelektrofiziológiai hatásait egészséges humán és kutya kamrai szívműsejteken és jellemezzük két fejlesztés alatt álló hőszokkfehérje-koinduktor molekula, a bimoclomol és a BRX-005, koncentráció-függő szívhatásait különböző emlős preparátumokon.

Megállapítottuk, hogy az ET-1 hasonló mértékben csökkenti az L-típusú kalciumáram amplitúdóját egészséges humán és kutya kamrai szívműsejteken. Kutya kamrai sejteken az ET-1 százalékban kifejezett gátló hatás kisebb mértékű volt, amikor az intracelluláris cAMP szintet megemeltük, míg a PKA rendszer maximális aktiválása esetén a gátló hatása elmaradt. Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy az ET-1 kalciumáramra kifejtett hatása hasonló a két faj esetén, és azt az ET_A-receptorhoz kapcsolt PTX-szenzitív gátló G-fehérjén keresztül fejteti ki az intracelluláris cAMP-szint csökkentése által. Az ET-1-nek nem volt hatása a késői káliumáram amplitúdójára kutya kamrai sejteken, míg egészséges humán sejteken az áram gyors komponensét 80±6%-kal csökkentette. Ez a különbség valószínűleg a szabályozási mechanizmusok eltérő jellegéből ered. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a kalciumáram vonatkozásában az ET-1 hatásai jól modellezhetők kutya kamrai miocitákon, míg a késői káliumáram vonatkozásában nem.

A hőszokkfehérje-koinduktor hatású bimoclomol és BRX-005 alacsony koncentrációi összevethető mértékű pozitív inotrop hatást fejtettek ki dobogó tengerimalac szíven, ugyanakkor eltérő mértékben fokozták az intracelluláris kalciumtranziensek amplitúdóját. Szemben a bimoclomollal, amely markánsan megnövelte a szisztolés és diasztolés kalcium-koncentrációt, a BRX-005 ezirányú hatása gyenge volt. Ennek alapján feltételezzük, hogy a BRX-005 pozitív inotrop hatása a molekula kalcium-érzékenyítő tulajdonságával áll kapcsolatban. A bimoclomol magasabb koncentrációi csökkentették az intracelluláris kalciumtranziens amplitúdóját, amelynek oka a masszívan megemelkedett diasztolés kalciumszint. Kutyából izolált kamrai szívműsejteken a bimoclomol csökkentette az akciós potenciál időtartamát és a depolarizáció sebességét, gátolta a nyugalmi kálium áramot, fokozta az ATP-szenzitív káliumcsatornák aktivitását és kalciumfüggő ionáramokat (kálium és/vagy klorid) aktivált. Eredményeink alapján a BRX-005 esetében kevesebb mellékhatással kell számolnunk a klinikai kipróbálás során.

SUMMARY

The aim of the present work was to characterize and compare the cellular cardiac effects of ET-1 on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes and to study the dose-dependent cardiac effects of bimozolol and BRX-005 in mammalian ventricular myocardium.

The results show that ET-1 suppresses similarly the amplitude of the L-type calcium current in healthy human and canine ventricular cells. This effect of ET-1, observed in canine cells, was smaller when cAMP was elevated and was fully abolished when the PKA-system was fully activated. We conclude that the mechanism of regulation of $I_{Ca,L}$ is similar in these two species and ET-1 may exert its effect by reducing the intracellular cAMP level due to inhibition of adenylate cyclase via an ET_A receptor coupled PTX-sensitive inhibitory G-protein. ET-1 alone had no effect on the amplitude of the delayed rectifier potassium current in canine myocytes, but markedly reduced (by $80\pm 6\%$) the amplitude of the rapid components of this current in human cells. These differences may be due to the contribution of different regulatory mechanisms in regulating I_K in the two species. Comparing the effects of ET-1 in canine and human ventricular myocytes, it can be concluded that canine myocytes appear to be a good model for studying the effects of ET-1 on $I_{Ca,L}$ but not on I_K in man.

Low concentrations of the heat shock protein coinducer bimozolol and BRX-005 had comparable positive inotropic effects in working guinea pig heart, however, increased the amplitude of the intracellular calcium transients in a different degree. In contrast to bimozolol, which caused marked increases in both systolic and diastolic calcium levels, this effect of BRX-005 was moderate. Therefore, BRX-005 can be considered as a calcium sensitizer compound. High concentrations of bimozolol decreased the amplitude of the calcium transient due to extreme elevation of diastolic calcium. In isolated canine ventricular cells bimozolol decreased the duration and rate of depolarization of action potentials, suppressed the inward rectifier potassium current, activated ATP-sensitive potassium channels, and induced calcium-dependent outward (chloride and/or potassium) currents. Based on the present results less side effects are anticipated with BRX-005 than bimozolol during clinical trials.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aramori, I., S. Nakanishi.** Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 12468-12474, 1992.
- Bers, D.M., E. Perez-Reyes.** Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc. Res.*, 42: 339-360, 1999.
- Biró, K., A. Jednákovits, T. Kukorelli, E. Hegedűs, L. Korányi.** Bimoclolmol (BRLP-42) ameliorates peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain. Res. Bull.*, 44: 259-263, 1997.
- Bkaily, G., S. Wang, M. Bui, and D. Menard.** ET-1 stimulates Ca^{2+} currents in cardiac cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26: S293-S296, 1995.
- Camilión de Hurtado, M.C., B.V. Alvarez, I.L. Ennis, H.E. Cingolani.** Stimulation of myocardial Na^+ -independent $Cl^-HCO_3^-$ exchanger by angiotensin II is mediated by endogenous endothelin. *Circ. Res.*, 86(6): 622-627, 2000.
- Clarke, J.G., N. Benjamin, S.W. Larkin, D.J. Webb, B.E. Keogh, G.J. Davies, A. Maseri.** Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. *Am. J. Physiol.*, 257: H2033-H2035, 1989.
- Cocks, T.M., N.L. Faulkner, K. Sudhir, J. August.** Reactivity of endothelin-1 on human and canine large veins compared with large arteries *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, 171: 17-24, 1989.
- Delpech, N., H. Soustre, D. Potreau.** Antagonism of beta-adrenergic stimulation of L-type Ca^{2+} current by endothelin in guinea-pig atrial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 285: 217-220, 1995.
- Delpech, N., H. Soustre, D. Potreau.** Endothelin-1 inhibits L-type Ca^{2+} current enhanced by isoprenaline in rat atrial myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 29: 136-143, 1997.
- Eguchi, S., Y. Hirata, T. Imai, F. Marumo.** Endothelin-1 as an autocrine growth factor for endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26: S279-S283, 1995.
- Erdő, F., S.L. Erdő.** Bimoclolmol protects against vascular consequences of experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain. Res. Bull.*, 45: 163-166, 1998.

- Feder**, M.E., G.E. Hofmann. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61: 243-282, 1999.
- Ferri**, C., V. Pittoni, A. Piccoli, O. Laurenti, M.R. Cassone, C. Bellini, G. Properzi, G. Valesini, G. De Mattia, and A. Santucci. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80: 829-835, 1995.
- Furchgott**, R.F., J.V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 299: 373-376, 1980.
- Furchgott**, R.F., P.M., Vanhoutte. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*, 3: 2007-2018, 1989.
- Furukawa**, T., H. Ito, J. Nitta, M. Tsujino, S. Adachi, M. Hiroe, F. Marumo, T. Sawanobori, and M. Hiraoka. Endothelin-1 enhances calcium entry through T-type Ca^{2+} channels in cultured neonatal rat ventricular myocyte. *Circ. Res.*, 71(5): 1242-1253, 1992.
- Gillespie**, M.N., J.O. Owasoyo, I.F. McMurtry, and R.F. O'Brien. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236: 339-343, 1986.
- Goto**, K., Y. Kasuya, N. Matsuki, Y. Takuwa, H. Kurihara, T. Ishikawa, S. Kimura, M. Yanagisawa, and T. Masaki. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3915-3918, 1989.
- Grossman**, J.D., and J.P. Morgan. Cardiovascular effects of endothelin. *News Physiol. Sci.*, 12: 113-117, 1997.
- Habuchi**, Y., H. Tanaka, T. Furukawa, Y. Tsujimura, H. Takanashi, and M. Yoshimura. Endothelin enhances delayed potassium current via phospholipase C in guinea-pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, 262: H345-H354, 1992.
- Hattori**, Y., H. Nakaya, J. Nishihara, M. Kanno. A dual-component positive inotropic effect of endothelin-1 in guinea pig left atria: a role of protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266: 1202-1212, 1993.
- Haynes**, W.G., D.J. Webb. The endothelin family of peptides: Local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin. Sci.*, 84: 485-500, 1993.

- Hegedűs**, E., K. Bíró, L. Jaszlits, A. Jednákovits, M. Küthy, E. Bácsy. Protective effect of BRLP-42 on experimental retinopathy. *Diabetologia*, 37 [Suppl 1]: 137, 1994.
- Hilal-Dandan**, R., K. Urasawa, L.L. Brunton. Endothelin inhibits adenilate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, 267: 10620-10624, 1992.
- Inoue**, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto, T. Masaki. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2863-2867, 1989.
- Inui**, T., H. Ninomiya, Y. Sasaki, M. Makatani, Y. Urade, T. Masaki, and T. Yamamura. Selective activation of excitation-contraction coupling pathways by ET_A and ET_B receptors in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 126: 893-902, 1999.
- Ishikawa**, T., M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto, and T. Masaki. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflügers Arch.*, 413: 108-110, 1988.
- Ishikawa**, T., M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto, and T. Masaki. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea-pig atria. *Am. J. Physiol.*, 255: H970-H973, 1988.
- Ito**, H. Endothelins and cardiac hypertrophy. *Life Sciences*, 61: 585-593, 1997.
- Iwamuro**, Y., S. Miwa, T. Minowa, T. Enoki, X.F. Zhang, M. Ishikawa, N. Hashimoto, and T. Masaki. Activation of two types of Ca²⁺-permeable nonselective cation channels by endothelin-1 in A7r5 cells. *Br. J. Pharmacol.*, 124: 1541-1549, 1998.
- James**, F.J., L.H. Xie, Y. Fujitani, S. Hayashi, M. Horie. Inhibition of the cardiac protein kinase A-dependent chloride conductance by endothelin-1. *Nature*, 370: 297-300, 1994.
- Jednákovits**, A., L. Jaszlits, K. Bíró, G. Pogátsa, E. Hegedűs, M. Kürthy. Effect of BRLP-42 on vascular reactivity of diabetic arterial beds. *Diabetologia*, 37 [Suppl 1]: 19, 1994.

- Jednákovits, A.**, Kurucz, I., Nánási, P.P. Effect of subchronic bimoclolmol treatment on vascular responsiveness and heat shock protein production in spontaneously hypertensive rats. **Life. Sci.** 67: 1791-1797, 2000.
- Kabakov, A.E.**, and V.L. Gabai. *Heat shock proteins and cytoprotection*. Springer, New York, 1997.
- Kamp, T.J.**, J.W. Hell. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. **Circ. Res.**, 87(12): 1095-1102, 2000.
- Karne, S.**, C.K. Jayawickreme, M.R. Lerner. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. **J. Biol. Chem.**, 268: 19126-19133, 1993.
- Karwatowska-Prokopczuk, E.**, and A. Wennmalm. Effects of endothelin on coronary flow, mechanical performance, oxygen uptake, and formation of purines and on outflow of protacyclin in the isolated rabbit heart. **Circ. Res.**, 66: 46-54, 1990.
- Kasai, H.**, M. Takanashi, C. Takasaki, and M. Endoh. Pharmacological properties of endothelin receptor subtypes mediating positive inotropic effects in rabbit heart. **Am. J. Physiol.**, 266: H2220-2228, 1994.
- Kelso, E.J.**, J.P. Spiers, B.J. McDermott, C.N. Scholfield, and B. Silke. Receptor-mediated effects of endothelin on the L-type Ca⁺⁺ current in ventricular cardiomyocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 286: 662-669, 1998.
- Kelly, R.A.**, H. Eid, B.K. Krämer, M. O'Neil, B.T. Liang, M. Reers, T.W. Smith. Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. **J. Clin. Invest.**, 86: 1164-1171, 1990.
- Kim, D.** Endothelin activation of an inwardly rectifying K current in atrial cells. **Circ. Res.**, 69: 250-255, 1991.
- Kobayashi, S.**, H. Nakaya, T. Takizawa, Y. Hara, S. Kimura, T. Saito, Y. Masuda. Endothelin-1 partially inhibits ATP-sensitive K current in guinea pig ventricular cells. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 27: 12-19, 1996.
- Krämer, B.K.**, T. Smith, R.A. Kelly. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes: role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na⁺/H⁺ exchanger. **Circ. Res.**, 68: 269-279, 1991.

- Kurihara**, Y., H. Kurihara, H. Suzuki, T. Kodama, K. Maemura, R. Nagai, H. Oda, T. Kuwaki, W.-H. Cao, N. Kamada, K. Jishage, Y. Ouchi, S. Azuma, Y. Toyoda, T. Ishikawa, M. Kumada, and Y. Yazaki. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. **Nature**, 368:703-710, 1994.
- Lahav**, R., G. Heffner, P.H. Patterson. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96: 11496-11500, 1999.
- Lauer**, M.R., M.D. Gunn, W.T. Clusin. Endothelin activates voltage-dependent Ca^{2+} current by a G protein-dependent mechanism in rabbit cardiac myocytes. **J. Physiol. (Lond.)**, 448: 729-747, 1992.
- Lecoin**, L., T. Sakurai, M. Ngo, Y. Abe, M. Yanagisawa, and N.M. LeDourain. Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 3024-3029, 1998.
- Liu**, Y., B. Geisbuhler, A.W. Jones. Activation of multiple mechanisms including phospholipase D by endothelin-1 in rat aorta. **Am. J. Physiol.**, 262: C941-C946, 1992.
- Lonchampt**, M.O., S. Pinelis, J. Goulin, P.E. Chabrier, P. Braquet. Proliferation and Na^+ - H^+ activation by endothelin in vascular smooth muscle cells. **Am. J. Hypertens.**, 4: 776-779, 1991.
- Lüscher**, T.F., M. Barton. Endothelins and endothelin receptor antagonists. Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. **Circulation**, 102: 2434-2440, 2000.
- Masaki**, T. The discovery of endothelins. **Cardiovasc. Res.**, 39: 530-533, 1998.
- McMurray**, J.J.M., S.G. Ray, I. Abdullah, H.J. Dargie, J.J. Morton. Plasma endothelin in chronic heart failure. **Circulation.**, 85: 1374-1379, 1992.
- Miyauchi**, T., T. Masaki. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. **Annu. Rev. Physiol.**, 61: 391-415, 1999.
- Moravec**, C.S., E.E. Reynolds, R.V. Stewart, M. Bond. Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart *in vitro*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 159: 14-19, 1989.
- O'Brien**, R.F., R.J. Robbins, I.F. McMurtry. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. **J. Cell. Physiol.**, 132: 263-270, 1987.

- Ohlstein**, E.H., A. Arleth, H. Byan, J.D. Elliott, C.P. Sung. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur. J. Pharmacol.*, 225: 347-350, 1992.
- Ono**, K., G. Tsujimoto, A. Sakamoto, K. Eto, T. Masaki, Y. Ozaki, M. Satake. Endothelin-A receptor mediates cardiac inhibition by regulating calcium and potassium currents. *Nature*, 370: 301-304, 1994.
- Ono**, K., K. Eto, A. Sakamoto, T. Masaki, K. Shibata, T. Sada, K. Hashimoto, G. Tsujimoto. Negative chronotropic effect of endothelin 1 mediated through ET_A receptors in guinea pig atria. *Circ. Res.*, 76: 284-292, 1995.
- Pollock**, D.M., T.L. Keith, and R.F. Highsmith. Endothelin receptors and calcium signalling. *FASEB J.*, 9: 1196-1204, 1995.
- Reuter**, H., H. Scholz. A study of ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol (Lond)*, 264: 17-47, 1977.
- Rubanyi**, G.M., and M.A. Polokoff. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rew.*, 46: 325-415, 1994.
- Sakurai**, T., M. Yanagisawa, T. Masaki. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 13: 103-108, 1992.
- Sanguinetti**, M.C., N.K. Jurkiewicz. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol.*, 96: 195-215, 1990.
- Silberberg**, S.D., T.C. Poder, A. Lacerda. Endothelin increases single channel currents in coronary arterial smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, 247: 68-72, 1989.
- Simonson**, M.S., and M.J. Dunn. Cellular signalling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.*, 4: 2989-3000, 1990.
- Spiers**, J.P., E.J. Kelso, B.J. McDermott, C.N. Scholfield, and B. Silke. Endothelin-1 mediated inhibition of the acetylcholine-activated potassium current from rabbit isolated atrial cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.*, 119: 1427-1437, 1996.
- Sperelakis**, N., J.A. Schneider. A metabolic control mechanism for calcium ion influx that may protect the ventricular myocardial cells. *Am. J. Cardiol.*, 37: 1079-1085, 1976.

- Takasaki, C., N. Tomiya, A. Bdolah, Z. Wollberg, E. Kochva.** Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. ***Toxicon.***, 26: 543-548, 1988.
- Takuwa, Y., Y. Kasuya, N. Takuwa, M. Kudo, M. Yanagisawa, et al.** Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin insensitive guanine nucleotide binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. ***J. Clin. Invest.***, 85: 653-658, 1990.
- Tohse, N., Y. Hattori, H. Nakaya, M. Endou, M. Kanno.** Inability of endothelin to increase Ca^{2+} current in guinea-pig heart cells. ***Br. J. Pharmacol.*** 99: 437-438, 1990.
- Uchida, Y., H. Ninomiya, M. Saotome, A. Nomura, M. Ohtsuka, M. Yanagisawa, K. Goto, T. Masaki, S. Hasegawa.** Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. ***Eur. J. Pharmacol.***, 154: 227-228, 1988.
- Varró, A., B. Baláti, N. Iost, J. Takács, L. Virág, D.A. Lathrop, C. Lengyel, L. Tálosi, J.G. Papp.** The role of the delayed rectifier component I_{Ks} in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. ***J. Physiol. (Lond.)***, 523: 67-81, 2000.
- Veldkamp, M.F.** Is the slowly activating component of the delayed rectifier current. I_{Ks} absent from undiseased human ventricular myocardium? ***Cardiovasc. Res.***, 40: 433-435, 1998.
- Vígh, L., P. Literáti-Nagy, I. Horváth, Zs. Török, G. Balogh, A. Glatz, E. Kovács, I. Boros, P. Ferdinándy, B. Farkas, L. Jaszlits, A. Jednákovits, L. Korányi, B. Maresca.** Bimoclolomol: a nontoxic hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. ***Nature Medicine***, 3(10): 1150-1154, 1997.
- Vigne, P., J.P. Brettmayer, R. Marsault, and C. Frelin.** Endothelin mobilizes Ca^{2+} from a caffeine- and ryanodine-insensitive intracellular pool in rat atrial cells. ***J. Biol. Chem.***, 265: 6782-6787, 1990.
- Vigne, P., M. Lazdunski, and C. Frelin.** The inotropic effect of endothelin-1 on rat atria involves hydrolysis of phosphatidylinositol. ***FEBS Lett.***, 249(2): 143-146, 1989.
- Vogelsang, M., A. Broede-Sitz, E. Schafer, H.R. Zerkowski, O.E. Brodde.** Endothelin ET_A -receptors couple to inositol phosphate formation and inhibition of adenylate cyclase in human right atrium. ***J. Cardiovasc. Pharmacol.***, 23: 344-347, 1994.

- Wang**, J.X., G. Paik, and J.P. Morgan. Endothelin1 enhances myofilament Ca^{2+} responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium. *Circ. Res.*, 69(3): 582-589, 1991.
- Wang**, Y., P.M. Rose, M.L. Webb, M.J. Dunn. Endothelins stimulate mitogen-activated protein kinase cascade through either ET_A or ET_B . *Am. J. Physiol.*, 267: C1130-C1135, 1994.
- Washizuka**, T., M. Horie, M. Watanuki, S. Sasayama. Endothelin-1 inhibits the slow component of cardiac delayed rectifier K^+ currents via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Circ. Res.*, 81: 211-218, 1997.
- Wei**, C., A. Lerman, R.J. Rodeheffer, C.G.A. McGregor, R.R. Brandt, S. Wright, D.M. Heublein, P.C. Kao, W.D. Edwards, and J.C. Burnett. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation*, 89: 1580-1586, 1994.
- Woo**, S.H., C.O. Lee. Effects of endothelin-1 on Ca^{2+} signaling in guinea pig ventricular myocytes: role of protein kinase C. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 31: 631-643, 1999.
- Xie**, L.H., M. Horie, A.F. James, M. Watanuki, S. Sasayama. Endothelin-1 inhibits L-type Ca currents enhanced by isoproterenol in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.*, 431: 533-539, 1996.
- Yanagisawa**, M., H. Kurihara, S. Kimsura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, K. Goto, and T. Masaki. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332: 411-415, 1988.
- Zhu**, Y., H.T. Yang, M. Endoh. Negative chronotropic and inotropic effects of endothelin isopeptides in mammalian cardiac muscles. *Am. J. Physiol.*, 273: H119-H127, 1997.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani az Élettani Intézet igazgatójának, Dr. Kovács László akadémikusnak, aki munkámat az Intézetben lehetővé tette és mindvégig támogatta.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Nánási Péternek, aki munkámat irányította és tanácsaival segítette.

Szeretnék köszönetet mondani azoknak a munkatársaimnak, akik a kísérletek kivitelezésében, a technikai háttér elsajátításában nyújtottak pótolhatatlan segítséget: Dr. Bányász Tamásnak, Dr. Magyar Jánosnak, Dr. Szigligeti Péternek, Dr. Fülöp Lászlónak, Dr. Szentandrassy Norbertnek, valamint Dr. Vighné Horváth Katalinnak a kísérletek előkészítésében nyújtott segítségéért.

PUBLIKÁCIÓK

A téziseket megalapozó in extenso közlemények:

1. **Bányász, T., J. Magyar, Á. Körtvély, Gy. Szigeti, P. Szigligeti, Z. Papp, A., Kovács L. Mohácsi, P.P. Nánási.** Different effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in canine ventricular cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 363: 383-390, 2001, [IF=2,414].
2. **Magyar, J., N. Iost, Á. Körtvély, T. Bánász, L. Virág, P. Szigligeti, A. Varró, J.Gy. Papp, P.P. Nánási.** Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes. *Pflügers Arch.*, 441: 144-149, 2000, [IF=2,529].
3. **Magyar, J., T. Bánász, P. Szigligeti, Á. Körtvély, A. Jednákovits, P.P. Nánási.** Electrophysiological effects of bimoelomol in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 361: 303-310, 2000, [IF=2,414].
4. **Körtvély, Á., Gy. Szigeti, R. Gesztelyi, J. Zsuga, T. Bánász, J. Magyar, P. Szigligeti, L. Kovács, A. Jednákovits, A.J. Szentmiklósi, P.P. Nánási.** Cardiovascular effects of BRX-005: comparison to bimoelomol. *Life Sci.*, 67: 1783-1789, 2000, [IF=2,275].

További in extenso közlemények az értekezés témaköréből:

1. **Nánási, P.P., S. Sárközi, Gy. Szigeti, I. Jóna, Cs. Szegedi, Á. Szabó, T. Bánász, J. Magyar, P. Szigligeti, Á. Körtvély, L. Csernoch, L. Kovács, A. Jednákovits.** Biphasic effect of bimoelomol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. *Br. J. Pharmacol.*, 129: 1405-1412, 2000, [IF=3,722].

2. **Szigligeti**, Gy., T. Bányász, J. Magyar, Á. *Körtvély*, P. Szigligeti, L. Kovács, A. Jednákovits, P.P. Nánási. Effects of bimoclolmol, the novel heat shock protein coinducer, in dog ventricular myocardium. *Life Sci.*, 67: 73-79, 2000, [IF=2,275].
3. **Jednákovits**, A., P. Ferdinandy, L. Jaszlits, T. Bányász, J. Magyar, P. Szigligeti, Á. *Körtvély*, A.J. Szentmiklósi, P.P. Nánási. In vivo and in vitro cardiovascular effects of bimoclolmol. *Gen. Pharmacol.*, 2001, Közlésre elfogadva, [IF=1,056].
4. **Magyar**, J., T. Bányász, L. Fülöp, N. Szentandrassy, Á. *Körtvély*, A. Kovács, G. Szénási, P.P. Nánási. Effects of the antiarrhythmic agent EGIS-7229 on calcium and potassium currents in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 363: 604-611, 2001, [IF=2.414].

Előadások, poszterek

1. **Szigligeti**, P., T. Bányász, J. Magyar, Á. *Körtvély*, P. Nánási, A. Jednákovits. Electrophysiological effects of bimoclolmol in canine ventricular myocytes. 23th Meeting of European Working Group of Cardiac Cellular Electrophysiology, Oxford, 1999.
2. **Magyar**, J., T. Bányász, A. Kern, Sz. Szilágyi, J. Bakk, P. Szigligeti, Á. *Körtvély*, P.P. Nánási. Effects of thymol on the mechanical and electrophysiological parameters of canine heart. 23th Meeting of European Working Group of Cardiac Cellular Electrophysiology, Oxford, 1999.
3. **Magyar**, J., T. Bányász, A. Kern, Sz. Szilágyi, J. Bakk, P. Szigligeti, Á. *Körtvély*, P.P. Nánási. A timol hatása emlősszív kontraktilitására és elektrofiziológiai sajátosságaira. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Budapest, 1999.
4. **Nánási**, P.P., J. Magyar, T. Bányász, Á. *Körtvély*, N. Iost, L. Virág, A. Varró. Effects of endothelin on potassium and calcium currents in isolated canine and human ventricular myocytes. Joint Meeting of the English and Hungarian Physiological Societies, Budapest, 2000.

5. **Szentandrassy**, N., T. Bányász, L. Fülöp, *Á. Körtvély*, J. Magyar, P.P. Nánási. Extracellulris bikarbonát hatása a kutya szívizom elektrofiziológiai és mechanikai paramétereire. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, 2001.

6. **Magyar**, J., Z. Rusznák, T. Bányász, Cs. Harasztosi, *Á. Körtvély*, G. Szűcs, P.P. Nánási. Fluoxetin enantiomerek hatása emlős ideg- és szívizomsejteken. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, 2001.

7. **Bányász**, T., L. Fülöp, *Á. Körtvély*, J. Magyar, N. Szentandrassy, P.P. Nánási. Regionális eltérések a kalciumáram kinetikai sajátságában emlős szívizomsejteken. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, 2001.

FÜGGELÉK