

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Béta-adrenerg stimuláció hatása a kutya kamrai
szívizomsejtek késői káliumáramaira**

Dr. Harmati Gábor

Témavezető:
Dr. Magyar János



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2011

Béta-adrenerg stimuláció hatása a kutya kamrai szívműködésére késői káliumáramaira

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Harmati Gábor okleveles orvos

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

Témavezető: Dr. Magyar János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Várnai Péter, PhD
Dr. Varga Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2011. november 16. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
Dr. Ivanics Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora.
tagok: Dr. Várnai Péter, PhD
Dr. Varga Zoltán, PhD
Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
Dr. Ivanics Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2011. november 16. 13:00

BEVEZETÉS

A késői káliumáram elsődleges szerepet játszik a szívizom akciós potenciáljának repolarizációjában. Az áramot létrehozó csatornafehérjék szerkezetének megváltozása vagy farmakológiai befolyásolása az áram- és így az akciós potenciál hosszának megváltozásához és aritmiák kialakulásához vezethet (veleszületett és szerzett long-QT szindrómában, kamrai tachycardiában és torsades de pointes kamrai tachycardiában). Az így létrejövő aritmiák minden előjel nélkül, gyakran fiatal korban jelentkezhettek, így kiemelkedő szerepük lehet a hirtelen szívhalál fellépésében. A késői káliumáram lassú komponenséről (I_{Ks}) számos emlősfaj szívizomsejtjein kimutatták, hogy β -adrenerg stimuláció hatására nő az áram amplitúdója, azonban az ezen áram gyors komponensére (I_{Kr}) vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak.

Méréseink során izoproterenol alkalmazásával aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat, elsőként a következményes áram-amplitúdó változásokat vizsgáltuk. Munkánk következő lépéseként a β -adrenerg stimuláció közvetítéséért felelős β -adrenerg receptor-altípust kerestük, specifikus gátlószerek segítségével. A receptor azonosítását követte a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli útvonalak azonosítása, ezen kísérletekben a PKA, EPAC és PKC útvonal érintettségét vizsgáltuk. Ezeket a kísérleteket specifikus enzimaktivátorok és gátlószerek alkalmazásával végeztük. Megvizsgáltuk, egy-egy enzimaktivátor vagy gátlószer jelenléte befolyásolja-e az izoproterenol késői káliumáram-aktiváló hatását. A kapott eredményeket összegezve következtettünk a vizsgált útvonal érintettségére.

Számos, a PKC útvonalat befolyásoló gátlószerről ismert, hogy direkt csatornahatásai is vannak. Annak érdekében, hogy a méréseink során nyert eredményekből megfelelő következtetést tudjunk levonni, szerettük volna kizárni az általunk alkalmazott PKC gátlószerek direkt káliumcsatorna gátló

hatását. Ezeket a méréseket hERG csatornákon végeztük, melyeket HEK-293 sejtvonalon stabilan expresszáltattunk.

Megvizsgáltuk a β -adrenerg stimuláció I_{Ks} -re kifejtett hatását is. Az irodalomból jól ismert a β -adrenerg stimuláció I_{Ks} -t aktiváló hatása, így az irodalmi adatokkal megegyező adatainkat az alkalmazott módszer helyességének igazolására, önkontrollként használhattuk.

Eredményeinket összegezve és az irodalmi adatokkal összevetve komplex képet alkottunk a kutya kamrai szívműködéseken megjelenő késői káliumáram-komponensek β -adrenerg stimuláció általi szabályozásáról. Eredményeink ugyanakkor számos kérdést is felvetettek: a későbbiekben vizsgálni szeretnénk a késői káliumáram lassú és gyors komponensének PKA általi szabályozásában megjelenő különbségek pontos molekuláris mechanizmusait, illetve keressük a különböző PKC gátlók esetén megjelenő direkt ioncsatorna hatások molekula szintű magyarázatát.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szívműködés akciós potenciálját számos ionáram finom összjátéka alakítja ki. Ezek az ionáramok az akciós potenciál különböző fázisaiban aktiválódnak, és különböző hatással bírnak annak lefutására. A késői egyenirányító káliumáram (I_K) az akciós potenciál repolarizációs fázisában játszik meghatározó szerepet.

A késői káliumáramot létrehozó ioncsatornák depolarizáció hatására nyílnak meg és negatívabb feszültségértékek mellett meglehetősen lassan zárulnak. A csatornákon keresztülfolyó káliumáram a feszültség és idő függvényében változik. A késői káliumáramot kinetikai- és egyenirányító tulajdonságok, gátlószer érzékenység valamint intracelluláris moduláció szempontjából három komponensre bonthatjuk. Ezek az ultragyors komponens (I_{Kur}), a gyors

komponens (I_{Kr}) és a lassú komponens (I_{Ks}). Az áramot létrehozó csatornafehérjék szerkezetének megváltozása vagy farmakológiai befolyásolása az áram — és így az akciós potenciál hosszának megváltozásához és aritmiák kialakulásához vezethet. Ezek közül a legjellemzőbbek a long-QT szindrómák különböző formái. Ezekben a betegségekben az akciós potenciál megnyúlása miatt fokozódik a korai utódepolarizációk és a torsades de pointes kamrai tachycardia kialakulásának valószínűsége, így gyakrabban fordul elő hirtelen szívhalál.

A késői káliumáram ultragyors komponense (I_{Kur})

Humán pitvari szívizomsejteken kizárólag 4-aminopyridin érzékeny I_{Kur} mutatható ki, kamrai preparátumokon még nem igazolták a jelenlétét. Gyorsan aktiválódó K^+ áram, mely nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik.

A késői káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

Az I_{Ks} depolarizáció hatására lassan aktiválódik és nincs inaktív állapota. Az I_{Ks} áramot főként K^+ ionok hordozzák, de a csatorna kevésbé szelektív K^+ ionokra, mint az I_{Kr} áramot létrehozó KCNH2 ioncsatorna. Irodalmi adatokból ismert, hogy β -adrenerg stimuláció hatására növekszik az áram amplitúdója és megváltoznak kinetikai paraméterei. A csatornát kódoló gén mutációja felelős a long-QT szindróma 5. típusának (LQT5) kialakításáért

A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Az I_{Kr} -t létrehozó ioncsatorna a feszültségfüggő K^+ csatornák *eag* családjának *erg* alcsaládjába tartozik. Az I_{Kr} depolarizáció hatására gyorsan aktiválódik, az áramjel időbeli lefutása szaturációt mutat az inaktiváció legcsekélyebb jele nélkül. Egészen a közelmúltig azt gondoltuk, hogy β -adrenerg stimuláció nem módosítja az I_{Kr} -t, újabb vizsgálatok során azonban a cAMP többféle módosító hatását is leírták. Expresszált Kv11.1 csatornákon kimutatták, hogy a cAMP csökkenti az I_{Kr} -t egyrészt a csatornához kötődve, másrészt a csatorna protein kináz A (PKA) mediált foszforilációja által. Hasonlóak az eredmények tengerimalac szívműködésének β -adrenerg stimulációja esetén is. Ezzel ellentétben állnak azok a tanulmányok, melyekben a β -adrenerg stimuláció hatására növekedett az I_{Kr} amplitúdója. Ezt a szerzők a β -adrenerg hatásra bekövetkező intracelluláris kalciumkoncentráció növekedés, és a következményes PKC aktiválódás hatásának tulajdonították.

A csatornát kódoló gén mutációja a long-QT szindróma 2. típusát (LQT2) okozhatja, míg a KCNE2 gén mutációja felelős a long-QT szindróma 6. típusáért (LQT6).

A β -adrenerg stimuláció

Az adrenerg receptorok

Az adrenerg receptorok a sejtfelszíni 7-transzmembrán receptorok (7-TM-R) családjába tartoznak. Valamennyi 7-TM-receptor jelközvetítési mechanizmusában közös, hogy az agonista ligand megkötését követően a jelközvetítés első lépése a plazmamembrán belső felszínén elhelyezkedő

heterotrimer G-proteinek ($G\alpha\beta\gamma$ - guanin nukleotid kötő fehérje) valamelyik típusának az aktiválása. Az adrenerg receptorokat aminosavszerkezetük és ligandaffinitásuk alapján osztályozhatjuk. Ezek szerint megkülönböztethetünk α_1 , α_2 , β_1 , β_2 és β_3 -adrenerg receptorokat.

Az adrenerg receptorokhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak

cAMP/PKA útvonal

Az útvonal G_s és G_i -fehérje kapcsolt receptorok ligandkötésével aktiválódik. Ennek hatására a G-fehérjék α alegysége GTP kötött formában aktiválja vagy gátolja az adenilát-cikláz. Az aktív adenilát-cikláz fokozza a sejt cAMP szintjét, a cAMP PKA-hoz kötődve aktiválja azt. A PKA számos sejtfolyamatban, többek között a génátírásban, sejtanyagcserében, a sejtciklus és apoptózis szabályozásában játszik szerepet. Az aktiválatlan protein kináz A enzim négy alegységből — két katalitikus (C) és két regulatórikus, homo- vagy heterodimert alkotó (R) alegységből tevődik össze. A cAMP molekulák kötésekor a regulatórikus R-alegység dimerek disszociálnak a C-alegységekről, így a szabaddá váló C-monomerek felszabadulnak a gátlás alól. A PKA enzimnek I (PKA1) és II (PKA2) típusát különíthetjük el. A PKA1-et főként a citoplazmában, míg a PKA2-t különböző sejtorganellumokhoz asszociáltan találhatjuk. Az AKAP fehérjék biztosítják a PKA2 enzim célspecifitását, az így kihorgonyozott PKA molekulák csak a közelükben lévő fehérjék működését képesek befolyásolni, többek között feszültség-függő ioncsatornákét.

Az EPAC útvonal

A cAMP szint emelkedése a PKA-n kívül más célfehérjék működését is képes befolyásolni. Ilyen fehérje például az EPAC. Az EPAC egy, a monomer G-fehérjék GTP kötését fokozó GEF fehérje, ami segíti a monomer G-fehérjék aktivációját. Az EPAC két izoformáját írták le, az EPAC1 -et és EPAC2 -t. Funkciói közül kiemelendő az R-Ras és Rap1/RhoA aktivációja, ezen keresztül a migrációban, sejtpolaritás kialakításában, az integrinek működésében, a sejtadhézióban és sejtalak változtatásában betöltött szerepe. A Rap1-en keresztül aktiválja PLC-t, így befolyásolhatja a PKC útvonalat is.

A PLC/PKC útvonal

A PLC/PKC útvonal G_q fehérjékhez kapcsolódó receptorok stimulációjával indul el. Az általuk aktivált fehérjék $G_q\alpha$ alegysége aktiválja foszfolipáz C-t, amely IP_3 -at és DAG-ot képez a sejtmembrán foszfolipidjeiből. Az IP_3 a DAG-gal együtt közvetlenül aktiválja a sejt PKC enzimeit, emellett növeli az intracelluláris kalcium koncentrációját az ER IP_3 -receptorainak stimulálásán keresztül. A felszabaduló kalcium számos sejtfunció szabályozásában szerepel, ezen kívül egyes PKC izoformák aktivátora.

CÉLKITŰZÉS

Számos munkacsoport vizsgálta mind a cAMP/PKA, mind a PLC/PKC útvonal hatását az I_{Kr} -re. A közölt adatok egymásnak ellentmondóak és speciesfüggők, ezért célkitűzéseink a következők voltak:

1. a β -adrenerg stimuláció hatásának vizsgálata kutya kamrai szívműködősejtek késői kálium áramának gyors komponensére (I_{Kr}) és annak kinetikai paramétereire
2. a hatás közvetítéséért felelős receptor altípus azonosítása
3. a késői kálium áram gyors komponensének szabályozásában résztvevő intracelluláris jelátviteli útvonalak feltérképezése
4. a PKC útvonal gátlószereinek (chelerythrine, GF109203X) közvetlen hERG csatorna gátló hatásának vizsgálata HEK sejteken
5. önkontrollként a β -adrenerg stimuláció kutya kamrai szívműködősejtek késői kálium áramának lassú komponensére (I_{Ks}) kifejtett, az irodalomból már ismert aktiváló hatásának kimutatása.

METODIKÁK

Kutya bal kamrai szívműködősejtek izolálása

Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából izolált szívműködősejteken végeztük. A sejteket ivarérett, kísérleti célra tenyésztett kutyák szívéből nyertük, az anterográd szegment-perfúziós technika alkalmazásával. A mellkas

megnyitása után a szívet kiemeltük, és a bal elülső leszálló koronária ágat kanuláltuk. Ezen artéria vérellátási területének megfelelően Langendorff apparátus segítségével perfundáltuk a miokardiumot. A kimosási fázist követően a preparátumot megközelítőleg 30 percig perfundáltuk kollagenázzal kiegészített „emésztő” JMM oldattal. Az emésztőoldattal történő perfúzió végén a bal kamra falának midmiokardiális rétegét apró darabokra vágtuk, és a szövetdarabokat JMM oldatban szuszpendáltuk. A sejtszuszenziót többször ülepítettük, szűrtük és mostuk az egyre növekvő kalciumkoncentrációjú módosított JMM oldattal. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on tároltuk, Minimum Essential Medium Eagle oldatban (pH=7,4).

Elektrofiziológiai mérések izolált sejteken

Kísérleteink kezdetekor a szívizomsejteket 37 °C hőmérsékletű plexiüveg mérőkádba helyeztük. A kádban levő szívizomsejteket Tyrode oldattal perfundáltuk. A mérések során ezeket az oldatokat egészítettük ki a megfelelő ioncsatorna-gátló szerekkel, illetve a vizsgált jelátviteli útvonalakat befolyásoló drogokkal. A mérésekhez 1,5-2,5 M Ω ellenállású boroszilikát mikroelektródákat használtunk. A mérések során pipetta hegyét a sejt felszínéhez érintve nagyellenállású kapcsolatot (1–10 G Ω ; ún. „gigaseal”) hoztunk létre. A gigaseal kialakulása után áttörtük át a pipetta hegye alatti membrándarabot az egészsejtes elrendezés eléréséhez. Az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez Multiclamp 700A (Axon Instruments) erősítőt használtunk. A számítógépes vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 9.0 szoftvert alkalmaztunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot Digidata 1322 A/D-D/A (Axon Instruments) jelátalakító teremtette meg.

A szívizomsejteken mérhető ionáramokat farmakológiai és kinetikai sajátásaik alapján különítettük el. Az áramgörbék analízise során a farokáram amplitúdóját mértük.

Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei $\pm$ a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egy szempontos variancia analízist, Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollós t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdéseknek megfelelően. Az adatok közötti korrelációk meghatározásához lineáris regressziót használtuk. Az eltéréseket $p \leq 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Az izoproterenol hatása az I_{Kr} -re

Elsőként az izoproterenol kutya kamrai szívizomsejtek I_{Kr} -jére kifejtett hatását vizsgáltuk. Az áramgörbék analízisekor a depolarizáló impulzust követő repolarizáció során kialakuló úgynevezett farokáramot tekintettük I_{Kr} -nek, amplitúdóját a nem inaktiválódó komponenshez képest mértünk. Ezekben a kísérletekben az izoproterenolt 1, 10, 100 és 1000 nM-os koncentrációban, kumulatív módon alkalmaztuk. Egy-egy koncentrációt a teljes hatás kifejlődéséig, mintegy 3-4 percig használtunk. Azt tapasztaltuk, hogy az izoproterenol koncentráció függő módon növelte az I_{Kr} -t. A mért áramot tiszta

I_{Kr} -ként azonosítottuk, mivel a 100 nM izoproterenol mellett alkalmazott specifikus I_{Kr} gátlószer (1 μ M E-4031) a farokáramot eltüntette. 10 nM izoproterenol 13 ± 4 %-kal, 100 nM izoproterenol 33 ± 8 %-kal, 1 mM izoproterenol 34 ± 5 %-kal növelte meg a farokáram denzitását. A különbség 10 nM-os koncentrációtól kezdve szignifikáns volt ($p\leq 0,05$, $n=5$). A kapott adatokat Hill-egyenlettel illesztettük meg, az izoproterenol félhatásos koncentrációja (EC_{50}) $13,63\pm 2,47$ nM-nak adódott, a Hill-koefficiens közel 1 volt ($1,19\pm 0,27$).

Megállapítottuk, hogy 100 nM izoproterenol az I_{Kr} feszültségfüggését balra tolta. Ez azt jelenti, hogy az áramot már kisebb mértékű depolarizáció aktiválja. A kapott adatokat Boltzmann-egyenlettel illesztve a félaktivációs feszültségek ($V_{0,5}$) kontroll esetben $5,6\pm 0,9$ mV-nak, míg 100 nM izoproterenol jelenlétében $-4,6\pm 1,2$ mV-nak adódtak ($p\leq 0,05$, $n=4$).

Az izoproterenol hatásmechanizmusa

Az irodalomból ismert, hogy szívműködő sejtek kalciumáramának módosító hatását a β_1 -receptorok aktiválásán keresztül fejti ki, azonban nem állt rendelkezésünkre adat arról, hogy a β -adrenerg receptorok melyik altípusa (β_1 , β_2) érintett kutya kamrai szívműködő sejtek késői káliumáram gyors komponensének szabályozásában. A β_1 -adrenerg receptorok érintettségét 300 nM CGP-20712A segítségével vizsgáltuk, ami ebben a koncentrációban ezen receptorok specifikus gátlószere. Az I_{Kr} mérését az alábbiak szerint végeztük: kontroll árammérést követően a β_1 -receptorokat 300 nM CGP-20712A-vel blokkoltuk, majd a gátlószer mellett 100 nM izoproterenolt is tartalmazó oldattal perfundáltuk a sejteket. Megállapítottuk, hogy a CGP-20712A nem befolyásolta az I_{Kr} amplitúdóját, azonban teljes mértékben kivédte a 100 nM izoproterenol I_{Kr} -t növelő hatását. Eredményeink alapján arra

következtettünk, hogy az izoproterenol β_1 -receptorok aktiválásán keresztül fejti ki I_{Kr} növelő hatását, a β_2 -adrenerg receptorok valószínűleg nem játszanak szerepet a hatás közvetítésében.

A PKA moduláció hatása az I_{Kr} -re

Az irodalmi adatok alapján azt feltételeztük, hogy az izoproterenol I_{Kr} -t növelő hatásában mind a PKA, mind a PKC jelátviteli útvonal szerepet játszhat. Elsőként megvizsgáltuk, miként befolyásolja az áramot, ha a PKA útvonalat receptor független módon, közvetlenül aktiváljuk. Ezt a mérőoldathoz adott 3 μ M forskolinnal, vagy intracellulárisan, a pipetta-belső oldathoz adott 250 μ M cAMP-vel, 250 μ M 8-Br-cAMP-vel, vagy 100 μ M 6-Bnz-cAMP-vel teszteltük. Kísérleteinkben a farokáram amplitúdója forskolin jelenlétében $31 \pm 5\%$ -kal ($p \leq 0,05$, $n=5$), cAMP jelenlétében $21 \pm 4\%$ -kal ($p \leq 0,05$, $n=5$), 8-Br-cAMP jelenlétében $25 \pm 4\%$ -kal ($p \leq 0,05$, $n=5$), míg 6-Bnz-cAMP jelenlétében $39 \pm 5\%$ -kal ($p \leq 0,05$, $n=5$) növekedett a kontroll áramhoz viszonyítva. Ez a növekedés csaknem azonos mértékű 100 nM izoproterenol által kiváltottal.

Mivel a cAMP nemcsak a PKA útvonalon keresztül fejtheti ki hatását, hanem az EPAC aktivációjával is, ezért 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP segítségével ellenőriztük az EPAC útvonal esetleges érintettségét is. A pipetta-belső oldathoz adott 100 μ M 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP hatására az I_{Kr} amplitúdója nem változott szignifikánsan, $0,42 \pm 0,07$ pA/pF-ot mértünk kontroll, $0,40 \pm 0,09$ pA/pF-ot az EPAC aktivátor jelenlétében. Ez alapján arra következtethetünk, hogy az EPAC β -receptorokon keresztüli aktivációja nem vesz részt a késői káliumáram gyors komponensének szabályozásában.

A PKA közvetlen modulációjával egy időben 100 nM izoproterenollal a β -adrenerg receptorokat is aktiváltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a cAMP-vel előkezelt sejtek kivételével az izoproterenol nem volt képes tovább növelni a farokáram amplitúdóját.

A PKA útvonal aktiválása mellett vizsgáltuk a PKA gátlás I_{Kr} -re kifejtett hatását is. Erre 100 μ M intracellulárisan alkalmazott Rp-8-Br-cAMP-t használtunk. Kontroll körülmények között a PKA gátlószer nem befolyásolta a farokáram amplitúdóját, azonban kivédte az izoproterenol aktiváló hatását. Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy az izoproterenol β_1 -adrenerg receptorok aktiválásával, PKA függő módon növeli az áramot, illetve hogy a bazális PKA aktivitás nem befolyásolja a késői káliumáram gyors komponensét.

A PKC moduláció hatása az I_{Kr} -re

A PKC útvonal érintettségét két PKC gátlószer segítségével vizsgálatuk: a mérőoldatban 1 μ M chelerythrine-t vagy 1 μ M GF109203X-et alkalmaztunk. A két gátlószer eltérő PKC izoforma specificitásában különbözik. Kísérleteinkben mind a chelerythrine, mind a GF109203X szignifikánsan csökkentette az I_{Kr} amplitúdóját. A gátlószerekkel történő előkezelést követően a PKC útvonalat β -receptor függő módon, izoproterenol segítségével aktiváltuk. Azt tapasztaltuk, hogy GF109203X jelenlétében az izoproterenol növelte az I_{Kr} amplitúdóját, ami elmaradt azonban, ha chelerythrine-nel együtt alkalmaztuk. Ezen eredményeink azt sugallják, hogy a PKA útvonal β -adrenerg receptorokon keresztüli aktivációja mellett a PKC útvonal is hatékonyan részt vehet a késői káliumáram gyors komponensének szabályozásában, illetve már a nyugalmi PKC aktivitás is jelentős hatással bírhat az I_{Kr} -re. Ismert azonban, hogy számos, a PKC útvonalat befolyásoló gátlószer direkt csatornahatással is rendelkezhet. Annak érdekében, hogy a méréseink során nyert eredményekből megfelelő következtetést tudjunk

levonni, ki kellett zárjuk az általunk alkalmazott két PKC gátlószer direkt káliumcsatorna gátló hatását. Ezekhez a mérésekhez HEK-293 sejtvonalat használtunk, amelyen stabilan expresszáztattuk a hERG csatornákat, azonban nem tartalmazta a PKC útvonal fehérjéit.

Megállapítottuk, hogy a mérőoldathoz adott chelerythrine koncentráció függő módon gátolta az I_{hERG} -et. A kapott adatokat Hill-egyenlettel illesztettük, az EC_{50} értéke $0,11 \pm 0,01$ μ M-nak adódott, a Hill-koefficiens értéke $1,52 \pm 0,18$ volt. A chelerythrine módosította az áram feszültség- és időfüggő aktivációját is. A félaktivációs feszültségek ($V_{0,5}$) kontroll esetben $0,6 \pm 2,7$ mV-nak, míg $0,1$ μ M chelerythrine jelenlétében $-12,6 \pm 3,7$ mV-nak adódtak ($p \leq 0,05$, $n=4$), az aktiváció időállandója 247 ± 19 ms-ról 146 ± 5 ms-ra csökkent ($p \leq 0,05$, $n=4$).

A fenti eredmények arra utalnak, hogy a chelerythrine közvetlen gátló hatást fejt ki a hERG csatornákra és az I_{Kr} gátlásért elsősorban a chelerythrine közvetlen ioncsatorna hatása lehet a felelős, nem a PKC útvonal gátlása.

Megvizsgáltuk a GF109203X közvetlen I_{Kr} gátló hatását is. Kísérleteinkben a mérőoldathoz adott GF109203X a chelerythrine-hez hasonlóan, koncentrációfüggő módon gátolta az I_{hERG} áramot. A mért adatokat Hill-egyenlettel illesztettük, az EC_{50} értéke $0,76 \pm 0,04$ μ M volt, a Hill-koefficiens értéke $1,21 \pm 0,07$ -nek adódott. A chelerythrine-hez hasonlóan a GF109203X is módosította az áram feszültség- és időfüggő aktivációját. A félaktivációs feszültségek ($V_{0,5}$) kontroll esetben $2,7 \pm 1,2$ mV-nak, míg 1 μ M GF109203X jelenlétében $-9,5 \pm 1,4$ mV-nak adódtak ($p \leq 0,05$, $n=4$), az aktiváció időállandója 301 ± 57 ms-ról 143 ± 22 ms-ra csökkent ($p \leq 0,05$, $n=4$). A GF109203X a chelerythrine-nel ellentétben szignifikánsan lassította a csatornák deaktivációját.

A PKC közvetlen gátlásának hatása az I_{Kr} -re

Az előző kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy mind a chelerythrine, mind a GF109203X közvetlenül is gátolják a hERG csatornákat. A GF109203X 1 μ M-os koncentrációban 60 ± 4 % hERG gátlást okozott, míg a kísérletek során ugyanakkora koncentrációban 81 ± 5 %-kal csökkentette az I_{Kr} amplitúdóját. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a GF109203X direkt csatornahatása mellett a PKC gátlásán keresztül is csökkentheti az I_{Kr} amplitúdóját. Ennek eldöntésére a további mérések során 0,1 μ M GF109203X hatását vizsgáltuk. Ebben a koncentrációban a szer közvetlen ioncsatorna hatása elhanyagolható, míg PKC gátló hatása már jelentős. Pozitív kontrollként a PKC aktivátor PMA-t használtuk. Eredményeink azt mutatják, hogy sem a PKC útvonal gátlása, sem az útvonal aktiválása nem befolyásolja jelentősen az I_{Kr} amplitúdóját. A normalizált áram nagysága alacsony intracelluláris kalcium-koncentráció mellett 0,1 μ M GF109203X jelenlétében 7 ± 3 %-kal, magas intracelluláris kalcium-koncentráció mellett 0,1 μ M GF109203X jelenlétében 6 ± 3 %-kal változott. A PKC útvonal aktiválása 30 perc elteltével sem befolyásolta az áram amplitúdóját, értéke a kiindulási amplitúdó $94 \pm 2\%$ -a volt (N.S., $p=4$).

Az izoproterenol hatása az I_{Ks} -re

Kísérleteink során az izoproterenol koncentráció függő módon növelte az I_{Ks} amplitúdóját. Az áramgörbék analízisekor a depolarizáló impulzust követő repolarizáció során kialakuló úgynevezett farokáramot tekintettük I_{Ks} -nek, amplitúdóját a nem inaktiválódó komponenshez képest mértünk. Az izoproterenol hatása mintegy 3 perc alatt kialakult. A mért áramot tiszta I_{Ks} -ként azonosítottuk, mivel a 100 nM izoproterenol mellett alkalmazott specifikus I_{Ks}

gátlószer (1 μ M HMR-1556) jelenlétében a farokáram amplitúdója közel 0 pA/pF-ra csökkent. Az izoproterenol hatása koncentrációfüggőnek bizonyult, az izoproterenol félhatásos koncentrációja $14,46 \pm 1,11$ nM-nak adódott, a Hill-koefficiens $0,84 \pm 0,04$ volt.

A PKA moduláció hatása az I_{Ks} -re

A PKA útvonal I_{Ks} -re kifejtett hatását receptorfüggő és receptorfüggetlen módon vizsgáltuk. A PKA receptorfüggetlen aktiválásához a sejteket 250 μ M 8-Br-cAMP-vel kezeltük. Megállapítottuk, hogy az irodalmi adatokkal összhangban az I_{Ks} denzitása 8-Br-cAMP jelenlétében a kontroll érték mintegy háromszorosára növekedett.

A következő mérésorozatotban a PKA aktivátor 8-Br-cAMP-vel történt előkezelés után 10, majd 100 nM izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat. Ilyen körülmények között az izoproterenol már nem volt képes további áramnövekedést előidézni. A PKA gátlás I_{Ks} -re kifejtett hatását a pipetta belsőoldatához adott 100 μ M Rp-8-Br-cAMP segítségével teszteltük. Kísérleteink során az Rp-8-Br-cAMP jelenlétében szignifikánsan csökkent a farokáram denzitása, 1,6 $\pm$ 0,04 pA/pF-ról 0,5 $\pm$ 0,09 pA/pF-ra ($p \leq 0,05$, $n=5$). Ha a PKA gátlása mellett izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat azt tapasztaltuk, hogy bár 100 μ M Rp-8-Br-cAMP csökkentette az I_{Kr} -t, de nem volt képes kivédeni az izoproterenol I_{Ks} aktiváló hatását.

A chelerythrine és GF-109203X hatása az I_{Ks} -re

A PKC útvonalat az I_{Kr} vizsgálatánál használt szerekkel, 1 μ M chelerythrine-nel vagy 1 μ M GF109203X-szel gátoltuk. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy

sem a chelerythrine, sem a GF109203X nem befolyásolta szignifikánsan az I_{Ks} nagyságát.

A PKC-gátló szerekkel történt előkezelés után 10, majd 100 nM izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat. Kísérleteink során sem 1 μ M chelerythrine, sem 1 μ M GF109203X nem volt képes kivédeni az izoproterenol I_{Ks} növelő hatását. Az izoproterenol hatása teljes mértékben reverzibilis volt.

Eredményeink arra utalnak, hogy az izoproterenol elsősorban a PKA aktiválásán át fejtheti ki I_{Ks} növelő hatását. Nyugalmi körülmények között a kutya kamrai szívműködősejtek PKA útvonala részben aktivált és ezen keresztül a KCNQ csatornák részben foszforilált állapotban vannak.

MEGBESZÉLÉS

Jelen munkánkban a β -adrenerg receptor agonista izoproterenol kutya kamrai szívműködősejtek késői káliumáramának gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponensére kifejtett hatásait vizsgáltuk. Munkacsoportunk elsőként mutatta ki a β -adrenerg stimuláció kutya kamrai szívműködősejtek késői káliumáramának gyors komponensére kifejtett aktiváló hatását, aminek jelentőségét az adja, hogy fontos védekező mechanizmus lehet az akciós potenciál hosszának β -adrenerg stimuláció alatti nyúlása, és így aritmiák kialakulása ellen.

Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy az izoproterenol β_1 -adrenerg receptorok aktiválásával, PKA függő módon növeli az áramot, mivel mind a PKA útvonal aktivációja, mind az útvonal gátlása kivédte az izoproterenol által kiváltott I_{Kr} aktiváló hatást. Ezen eredményeink ellentétben állnak azon irodalmi adatokkal, amelyek PKA aktivációt követően az I_{Kr} áram

gátlását írják le oocytákon expresszált hERG csatornákon. Az eltérő eredményekre az adhat magyarázatot, hogy az oocyták expresszálták ugyan a hERG csatornákat, a csatorna járulékos fehérjéit azonban nem. Hiányozhattak továbbá ebből az expressziós rendszerből a PKA jelátviteli útvonal egyes elemei is, valamint az egyes fajok közti izoenzim különbségek is állhatnak az eltérő eredmények hátterében.

Az I_{Kr} a PKA jelátviteli útvonal aktivációján keresztüli szabályozását támasztják alá azok a kísérleteink, amelyek során a PKA közvetlen aktivációját követően aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat. Azt tapasztaltuk, hogy a receptorok aktivációja nem volt képes az I_{Kr} amplitúdójának további növelésére. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a PKA aktivációjához elengedhetetlen cAMP alkalmazása — ellentétben a 8-Br-cAMP és 6-Bnz-cAMP használatával — nem volt képes kivédeni az izoproterenol aktiváló hatását. Ennek magyarázatát a PKA-ioncsatorna komplex kompartmentalizációja adhatja. Az enzim-ioncsatorna komplex sejtmembránhoz asszociált formában található, a PKA aktivációjához elengedhetetlen a cAMP citoplazmából a membránban lévő komplexhez jutása. Ezt a sejtmembrán környezetében található foszfodiészteráz barrier akadályozhatja meg, amely a pipetából kidiffundáló cAMP-t még a PKA-ioncsatorna komplexhez jutás előtt részben elbonthatja. A barrier hatása viszont nem érvényesül a PDE rezisztens cAMP formák (8-Br-cAMP és 6-Bnz-cAMP) és a sejtmembránba az extracelluláris tér irányából beoldódó drogok esetén.

Méréseink eredménye összhangban áll a Heath és Terrar által leírttal, kísérleteikben 10 nM izoproterenol 47 %-kal növelte a tengerimalac szívizomsejtek késői kálium áramának gyors komponensét. Heath és Terrar azonban — a mi kísérletei elrendezésünkkel ellentétben — nem gátolták az L-típusú kalcium áramot és nem puffertették az intracelluláris kalciumot, így az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése aktiválhatta a konvencionális

PKC enzimet, ami felelős lehet az I_{Kr} növekedéséért. Irodalmi adatok azonban arról számolnak be, hogy a konvencionális PKC útvonal thymelatoxinnal történt specifikus aktivációja csökkenti az oocytákban expresszált ioncsatornákon átfolyó I_{Kr} áramot. A saját kísérleteink során tapasztalt I_{Kr} növekedés háttérében a konvencionális PKC útvonal aktivációja valószínűleg nem játszott szerepet, mivel az ionáramok mérése során a mérőoldathoz adott 5 μ M nifedipinnel teljes mértékben gátoltuk az L-típusú kalcium áramot, s emellett a pipetta töltőoldatához adott 10 mM EGTA-val kötött állapotban tartottuk az intracelluláris kalcium ionokat.

A PKA vizsgálatával párhuzamosan az EPAC útvonal esetleges érintettségét is tanulmányoztuk. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az EPAC β -adrenerg receptorokon keresztüli aktivációja valószínűleg nem vesz részt az I_{Kr} szabályozásában.

A β -adrenerg stimuláció I_{Ks} -re kifejtett aktiváló hatása az irodalomból jól ismert. Audigane és munkatársai nyúl szívműködéseken, Severi és munkatársai tengerimalac szívműködéseken, Imredy és munkatársai humán ioncsatornákon mutatta ki a jelenséget. Az egybehangzó irodalmi adatok alapján valószínű, hogy az I_{Ks} növelő hatás közvetítéséért a PKA útvonal a felelős. Ezen irodalmi adatok ismeretében vizsgáltuk a β -adrenerg stimuláció hatását kutya kamrai szívműködéseken késői káliumáramának lassú komponensére. A kísérleti elrendezés — az I_{Ks}/I_{Kr} elkülönítésére használt gátlószerek kivételével — azonos volt az I_{Kr} -nél használttal. Eredményeink irodalmi adatokkal való egyezése miatt ezeket a méréseket önkontrollként használhattuk.

Megállapítottuk, hogy a PKA közvetlen aktiválásán keresztül megnövelt I_{Ks} -t az izoproterenol már nem volt képes tovább növelni. A PKA útvonal gátlása esetén jelentős különbségek mutatkoztak az I_{Kr} és I_{Ks} között. A PKA útvonal gátlása nem befolyásolta az I_{Kr} farokáram denzitását, azonban jelentős mértékben gátolta az I_{Ks} -t. Ez alapján arra következtettünk, hogy a bazális PKA

aktivitás részben aktivált állapotban tartja az I_{Ks} létrehozásáért felelős ioncsatornákat ugyanakkor nem befolyásolja az I_{Kr} -t. További különbségeket tapasztaltunk, ha a PKA gátlását követően izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat. I_{Kr} esetén a PKA gátlása teljes mértékben kivédte az izoproterenol aktiváló hatását, míg I_{Ks} esetén csupán csökkentette azt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a PKA útvonal részleges gátlása is elegendő az izoproterenol I_{Kr} -t aktiváló hatásának elnyomásához, és a PKA aktiváló hatása közel sem olyan effektív, mint I_{Ks} esetén. A tapasztalt különbségek magyarázataként nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a különböző, a csatornát aktiváló hatások kivitelezéséért különböző PKA izoenzimek felelősek, melyek eltérő gátlószer érzékenységet mutathatnak. Bár a β -adrenerg stimuláció a késői káliumáram mindkét komponensét növelte, a PKA aktivációjakor és gátlásakor tapasztalt különbségek pontos magyarázata további vizsgálatokat igényel.

A PKC útvonal érintettségét két PKC gátlószer segítségével vizsgálatuk: 1 μ M chelerythrine-t vagy 1 μ M GF109203X-et alkalmaztunk. Méréseink során mindkét gátlószer szignifikánsan csökkentette az I_{Kr} amplitúdóját. Számos, a PKC útvonalat befolyásoló gátlószerről ismert azonban, hogy direkt csatornahatásai is vannak. A direkt csatorna gátló hatás kizárására a méréseket megismételtük HEK-293 sejteken expresszáltatott hERG csatornákon is. Ezek a sejtek ugyanis nem expresszálják a PKC útvonal fehérjéit.

Megállapítottuk, hogy mind a chelerythrine, mind a GF109203X koncentrációfüggő módon gátolta a hERG áramot. Eredményeink arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott PKC gátlószerek közvetlen hERG csatorna gátló hatással bírnak. Feltevésünket alátámasztja a hatás kialakulási sebessége is, nevezetesen az I_{hERG} gátló hatás mindkét szer jelenlétében néhány perc alatt kialakult. Irodalmi adatok szerint a PKC útvonal aktivációja vagy gátlása ugyanis ennek az időnek többszörösét igényli. A GF109203X direkt hERG

csatorna hatása ugyan korábbról ismert, a chelerythrine hERG csatornára kifejtett közvetlen gátló hatását viszont munkacsoportunk írta le elsőként. A GF109203X alkalmazásával kapott eredményeink gyakorlatilag megegyeznek a Thomas és munkatársai által 2004-ben publikált adatokkal. A szer félhatásos koncentrációját mi 0,76 μM -nak, míg a tanulmány 1 μM -nak mérte. Kísérleteink során 1 μM GF109203X 69,4 %-os I_{Kr} gátlást okozott, a tanulmány 69,2 %-ról ír. A nagymérvű hasonlóság mellett különbségek is adódtak. Thomas és munkatársai az I_{hERG} kapuzási kinetikájában nem számoltak be szignifikáns változásról. Ezzel ellentétben mi azt tapasztaltuk, hogy 0,1 μM GF109203X az I_{hERG} feszültségfüggését 12,2 mV-tal balra tolta. A mért különbségek oka jelenleg nem tisztázott, a fajok közti különbségek mellett az eltérő metodika is szerepet játszhatott.

A PKC gátlószerekkel végzett kísérleteink arra utalnak, hogy ezek a gátlószerek nem igazán alkalmasak PKC I_{Kr} -t moduláló hatásának felderítésére. Ennek ellenére kísérleteink eredményei alapján az alábbi megállapítást tehetjük a PKC útvonallal kapcsolatban: 0,1 μM koncentrációban a GF109203X már jelentősen blokkolja a PKC enzimet, de ebben a koncentrációban nem csökkentette kutya kamrai szívműködéseken az I_{Kr} amplitúdóját. A PKC útvonal PMA segítségével történő aktiválása sem változtatta meg az I_{Kr} amplitúdóját. Méréseink eredményéből arra következtethetünk, hogy kutyák kamrai szívműködéseiben a késői káliumáram gyors komponensének szabályozásában a PKC útvonal valószínűleg nem játszik szerepet.

A megjelent közlemények, melyek a PKC szerepét taglalják az I_{Ks} szabályozásában, egymásnak ellentmondóak és jelentős fajok közti különbségekről tanúskodnak. A PKC aktivációja növelte például a tengerimalac szívműködéseken az I_{Ks} -t, egér vagy patkány csatornafehérjét expresszáló sejteken viszont az csökken az áram, ha PKC útvonalukat aktiváljuk. Saját méréseink során az I_{Kr} -hez hasonló eredményeket kaptunk: sem a chelerythrine,

sem a GF109203X nem befolyásolta jelentősen az I_{Ks} farokáram amplitúdóját. Kísérleteink során egyik gátlószer sem volt képes kivédeni az izoproterenol I_{Ks} -t növelő hatását. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy kutyák kamrai szívizomsejtjeiben a késői káliumáram lassú komponensének szabályozásában a PKC útvonal valószínűleg nem játszik szerepet.

ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: A késői káliumáram lassú komponenséről (I_{Ks}) számos emlősfaj szívizomsejtjein kimutatták, hogy β -adrenerg stimuláció hatására nő az áram amplitúdója, azonban ezen áram gyors komponensére (I_{Kr}) vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak. Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy miként befolyásolja a késői káliumáram komponenseit a β -adrenerg stimuláció, illetve a jelátviteli útvonalak — protein kináz A, protein kináz C — aktiválása illetve gátlása.

Anyagok és módszerek: Kísérleteinket kutya kamrai szívizomsejteken és HEK-293 sejtekkel expresszáltatott hERG csatornákon végeztük. A membránáramokat patch-clamp technikával mértük, egész sejt konfigurációban, 37°C hőmérsékleten.

Eredmények: Megállapítottuk, hogy az izoproterenol 30-50%-kal növelte az I_{Kr} amplitúdóját, hasonlóan a forskolin alkalmazásához, vagy intracellulárisan alkalmazott cAMP és analógjainak (cAMP, 8-Br-cAMP, 6-Bnz-cAMP) a hatásához. A PKA útvonal Rp-8-Br-cAMP-vel történt gátlása nyugalmi körülmények között nem befolyásolta az I_{Kr} amplitúdóját, de a β_1 -adrenerg receptor gátló CGP-20712A illetve a PKA gátló Rp-8-Br-cAMP teljes mértékben kivédte az izoproterenol I_{Kr} növelő hatását.

Méréseink során az izoproterenol közel háromszorosára növelte az I_{Ks} amplitúdóját. A PKA útvonal gátlása jelentősen csökkentette az áramot, azonban nem védte ki az izoproterenol aktiváló hatását.

A PKC útvonal vizsgálata során megállapítottuk, hogy mind a chelerythrine, mind a GF109203X szignifikánsan csökkentették az I_{Kr} amplitúdóját. Expresszáltatott hERG csatornán végzett méréseink arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott PKC gátlók közvetlen hERG csatorna gátló hatással bírnak és sem a PKC útvonal gátlása, sem az útvonal aktiválása nem befolyásolja jelentősen a késői káliumáram gyors komponensét. A chelerythrine hERG csatornára kifejtett közvetlen gátló hatását munkacsoportunk írta le elsőként.

Összefoglalás: Megállapítottuk, hogy a β_1 -adrenerg stimuláció a PKA útvonal aktiválásán keresztül képes növelni kutya kamrai szívműködés késői káliumáramának gyors és lassú komponensét. Az I_{Kr} és I_{Ks} szabályozásában a PKC útvonal valószínűleg nem játszik szerepet, illetve az alkalmazott PKC gátlók közvetlen ioncsatorna gátló hatásuk miatt csak bizonyos körülmények között alkalmasak az ionáramok vizsgálatára.

Iktatószám: DEENKÉTK /146/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

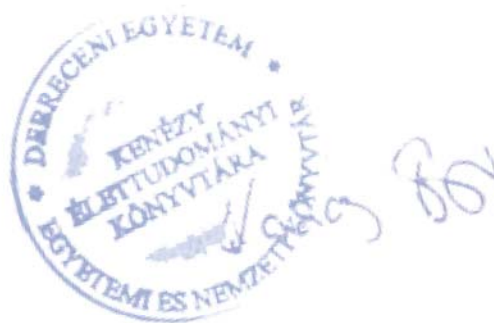
Jelölt: Harmati Gábor

Neptun kód: H64KQ7

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Harmati, G.**, Bányász, T., Bárándi, L., Szentandrassy, N., Horváth, B., Szabó, G., Szentmiklósi, J.A., Szénási, G., Nánási, P.P., Magyar, J.: Effects of beta-adrenoceptor stimulation on delayed rectifier K(+) currents in canine ventricular cardiomyocytes.. *Br. J. Pharmacol.* 162 (4), 890-896, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01092.x>
IF:5.204 (2009)
2. **Harmati, G.**, Papp, F., Szentandrassy, N., Bárándi, L., Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Panyi, G., Krasznai, Z., Nánási, P.P.: Effects of the PKC inhibitors chelerythrine and bisindolylmaleimide I (GF 109203X) on delayed rectifier K(+) currents. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 383 (2), 141-148, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0584-8>
IF:2.631 (2009)



További Közlemények

3. Szentandrassy, N., **Harmati, G.**, Bárándi, L., Simkó, J., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Szebeni, A., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of rosiglitazone on the configuration of action potentials and ion currents in canine ventricular cells.
Br. J. Pharmacol. 163 (3), 499-509, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01215.x>
IF:5.204 (2009)
4. Szentmiklósi, J.A., Cseppentő, Á., **Harmati, G.**, Nánási, P.P.: Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: Site- and event- selective adenosinergic drugs..
Curr. Med. Chem. 18 (8), 1164-87, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-009-0082-7>
IF:4.708 (2009)
5. Virág, L., Jost, N., Papp, R., Koncz, I., Kristóf, A., Kohajda, Z., **Harmati, G.**, Carbonell-Pascual, B., Ferrero jr, J.M., Papp, G.J., Nánási, P.P., Varró, A.: Analysis of the contribution of Ito to repolarization in canine ventricular myocardium..
Br. J. Pharmacol. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01331.x>
IF:5.204 (2009)
6. Bárándi, L., Virág, L., Jost, N., Horváth, Z., Koncz, I., Papp, R., **Harmati, G.**, Horváth, B., Szentandrassy, N., Bányász, T., Magyar, J., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations.
Basic Res. Cardiol. 105 (3), 315-323, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-009-0082-7>
IF:5.973 (2009)
7. Bárándi, L., **Harmati, G.**, Horváth, B., Szentandrassy, N., Magyar, J., Varró, A., Nánási, P.P., Bányász, T.: Drug-induced changes in action potential duration are proportional to action potential duration in rat ventricular myocardium.
Gen. Physiol. Biophys. 29 (3), 309-313, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2010_03_309
IF:0.741 (2009)
8. Simkó, J., Szentandrassy, N., **Harmati, G.**, Bárándi, L., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Nánási, P.P.: Effects of ropinirole on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 382 (3), 213-220, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0538-1>

IF:2.631 (2009)

9. Bányász, T., Horváth, B., Virág, L., Bárándi, L., Szentandrassy, N., **Harmati, G.**, Magyar, J., Marangoni, S., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Reverse rate dependency is an intrinsic property of canine cardiac preparations.

Cardiovasc. Res. 84 (2), 237-244, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp213>

IF:5.801

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.05.26

