

MTA-Doktori Értekezés Tézisei

**INTRACELLULÁRIS Ca^{2+} HOMEOSZTÁZIS-
VÁLTOZÁSOK HATÁSAINAK ELEMZÉSE
IZOLÁLT SZÍVPREPARÁTUMOKON**

Tóth András



Szegedi Tudományegyetem

ÁOK

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA	3
ELŐSZÓ HELYETT.....	4
1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A szívizomsejtek intracelluláris kalcium (Ca^{2+}_i) homeosztázisa	6
2.2. A Ca^{2+}_i változások és az akciós potenciál (AP) repolarizáció.....	9
2.3. A Ca^{2+}_i háztartás kóros változásai és a szívritmus zavarok	10
2.4. A szív Na^+/Ca^{2+} kicserélője (NCX)	11
2.5. Az értekezés elsődleges célkitűzéseinek irodalmi háttere	12
3. CÉLKITŰZÉSEK – VÁLASZRA VÁRÓ KÉRDÉSEK.....	15
4. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK	16
4.1. Etikai engedélyek.....	16
4.2. Preparátumok.....	16
4.3. Optikai mérési protokollok	16
4.4. Akciós potenciál mérések	17
4.5. Árammérési protokollok.....	18
4.6. Kontrakció (sejtrövidülés) mérése	19
4.7. További mérési technikák.....	20
4.8. Szívbetegség modellek	21
4.9. Anyagok.....	22
4.10. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis.....	22
5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	24
5.1. Ca^{2+}_i változások hatása a repolarizáló K^+ áramokra.....	24
5.1.1. <i>Van-e fiziológiásan aktív SK2 csatorna egészséges szívizomban?</i>	24
5.1.2. <i>A befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) Ca^{2+}_i függése</i>	24
5.2. Részleges NCX gátlás következményei egészséges szívizomban.....	25
5.2.1. <i>Izolált kutya és patkány szívizomsejtek.....</i>	25
5.2.2. <i>Van-e különbség a SEA0400 és az ORM-10103 hatásai között?</i>	26
5.3. Az NCX gátlás antiaritmiás hatásának analízise kísérletes szívbetegségekben	26
5.3.1. <i>Fokozott késői Na^+ áram (I_{NaL}) esetén (LQT3 modell).....</i>	26
5.3.2. <i>Szimulált iszkémiában</i>	27
5.3.3. <i>NCX, NHE és NCX+NHE gátlás antiaritmiás hatásainak összehasonlítása izolált regionális I/R szívmodellben</i>	29
6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	30
7. KUTATÁSAINK JELENTŐSÉGE, TÁVLATAI.....	31
8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	32
10. SCIENTOMETRIAI PARAMÉTEREK.....	33
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	34

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

AF: pitvarfibrilláció	ANOVA: varianciaanalízis
AP(D): akciós potenciál (időtartama)	ATP: adenosin-trifoszfát
AV: atrioventrikuláris	BVR: beat-to-beat variabilitás
Ca^{2+}_i [Ca^{2+}]: intracelluláris Ca^{2+} (koncentráció)	$[Ca^{2+}]_{ID}$: diasztolés intracelluláris $[Ca^{2+}]$
$[Ca^{2+}]_{mito}$: mitochondriális $[Ca^{2+}]$	$[Ca^{2+}]_o$: külső $[Ca^{2+}]$
$[Ca^{2+}]_{sm}$: szubmembrán $[Ca^{2+}]$	$[Ca^{2+}]_{SR}$: szarkoplazmás retikulum $[Ca^{2+}]$
CaM: calmodulin	CaMKII: calmodulin kináz II
CaT: Ca^{2+}_i tranziens;	CF: koronária áramlás
CICR: Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadítás	CRC: kontrakciós-relaxációs ciklus
DAD: késői utópotenciál	DHPR: dihidropiridin receptor
DP: balkamrai nyomásmaximum	EAD: korai utópotenciál
ECC: excitáció-kontrakció csatolás	EKG: elektrokardiogram
EGTA: etilénglikol-tetraecetsav	E_m : membránpotenciál
E_{NCX} : NCX ekvilíbrio potenciál	ES: extraszisztolés
H^+_i [H^+]: intracelluláris H^+ (koncentráció)	HF: szívelégtelenség
HR: szívfrekvencia	HT: hipertrofia
IC_{50} : 50% gátláshoz tartozó koncentráció	$I_{Ca,L}$: L-típusú Ca^{2+} áram
I_f : a pacemaker sejtek „funny” árama	I_{Kach} : Ach-függő K^+ áram
I_{K1} : befelé egyenirányító K^+ áram	$I_{K(Ca)}$: Ca^{2+} -függő K^+ áram
I_{KATP} : ATP-függő K^+ áram	I_{Kr} : a késői K^+ áram gyors komponense
I_{Ks} : a késői K^+ áram lassú komponense	I_{Kur} : ultragyors K^+ áram
I_{K-AS} : apamin-érzékeny K^+ áram	I_{ti} : tranziens befelé irányuló K^+ áram
I_{to1} : tranziens kifelé irányuló K^+ áram 1	I_{to2} : tranziens kifelé irányuló K^+ áram 2
$I_{Na,L}$: késői Na^+ áram	I_{NCX} : NCX áram
fwd_{NCX} : forward NCX áram (outward Ca^{2+} flux)	rev_{NCX} : reverz NCX áram (inward Ca^{2+} flux)
I/R: iszkémia-reperfúzió	KHB: Krebs-Henseleit bikarbonát
KO: knockout	Kir: befelé egyenirányító K^+ csatorna
LAD: baloldali arteria descendens	LTC(C): L-típusú kalcium (csatorna)
LQT: hosszú QT szindróma	LVEDP: balkamrai végdiasztolés nyomás
LVSP: balkamrai szisztolés nyomás	MI: miokardiális infarktus
NADH: nikotinsav-adenin dinukleotid	Na^+_i ($[Na^+]_i$): intracelluláris Na^+ (koncentráció)
fwd_{NCX} : kifelé irányuló NCX (Ca^{2+} transzport)	rev_{NCX} : befelé irányuló NCX (Ca^{2+} transzport)
NCX(1): Na^+ - Ca^{2+} kicserélő (1 izoform)	NHE(1): Na^+/H^+ kicserélő (1 izoform)
NKA: Na^+/K^+ ATP-áz	Na_v : feszültségfüggő Na^+ csatorna
PKA: protein kináz A	PKC: proteinkináz C
PLB: foszfolambán	PLM: foszfolemmán
PMCA: szarkolemma Ca^{2+} ATP-áz	QT _C : korrigált QT intervallum
RyR2: rianodin receptor	SA: pitvarcsomó
SERCA: szarkoplazmás retikulum Ca^{2+} ATP-áz	SK: alacsony konduktanciájú (csatorna)
S.E.M.: az átlag sztenderd hibája	SL: szarkolemma, sejtmembrán
SR: szarkoplazmás retikulum	SR: szinusz-ritmus (aritmia kísérletek)
VF: kamrafibrilláció	VT: kamrai tachycardia

EL SZÓ HELYETT

A miokardium intracelluláris Ca^{2+} homeosztázisával foglalkozni egyrészt rendkívül könnyű, másrészt rendkívül nehéz. Rendkívül könnyű, mert ma már könyvtárnyi adat: kísérleti eredmények, „in silico” matematikai modellek, valamint elméleti megfontolásokból származó információ áll rendelkezésre. De pontosan ugyanezen okokból rendkívül nehéz is; bármit is gondol ki egy kutató, amit újnak, még ismeretlennek hisz, valamilyen szint és érvényesség válasz biztosan megtalálható valahol ebben a könyvtárnyi irodalomban. Ezenkívül ez a témakör azért is nehéz, mert az *elérhető információ érvényessége, validitása* – számos okból – sokszor jóval bizonytalanabb, mint ahogy a természettudományokban általában megszoktuk.

Köszönhetem az elsősorban az *intracelluláris szabad kalcium ion (Ca^{2+}_i)* elképesztően összetett szerepének – az említett ssejteken általában is, de még sokkal inkább a szívizomsejteken, melyek *fiziológiai működésében* a Ca^{2+}_i sokszorosán kitüntetett szerepet játszik – egyrészt a Ca^{2+} -függő sejt-folyamatok nagy száma, másrészt azok kiemelkedő – sokszor létfontosságú – jelentősége miatt. A teljesség igénye nélkül néhány alapvető funkciója: kulcsszerepet játszik a szívizom excitáció-kontrakció csatlakozásában; aktiválja a kontrakciós folyamatot és meghatározza annak mértékét; második messenger-ként közreműködik a szignáltranszdukciós folyamatokban; szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását, stb. Számátalan – pl. az akciós potenciál (AP), a mitokondriális terminális oxidáció, vagy az apoptózis indukciója során aktiválódó – enzim és iontranszporter működése is markánsan Ca^{2+}_i -függő.

A Ca^{2+}_i lokális, vagy generalizált változásai szinte *minden fontos sejt-folyamatban megjelennek*, legtöbbször *alapvető információt* hordoznak és *jelentős szabályozó* szerepet töltenek be. Egyetlen sejtben a párhuzamosan zajló, *egyidejűleg szorosan integrált, ugyanakkor több szinten érő differenciált* élettani folyamatok csak rész-folyamatok sokaságára bontva, azokat térben és időben maximálisan elkülönítve mehetnek végbe; ez a tény – finoman szólva – nem könnyíti meg a kutató dolgát, aki ezeket a folyamatokat próbálja megismerni, megérteni, elemezni, modellezni, és végső soron – amennyire lehet – befolyásolni. Akkor is, amikor a szívizomsejteken minden jól működik, de még sokkal inkább akkor, ha valami elromlik – és nagyon rövid idő alatt súlyos, életveszélyes állapot alakulhat ki.

Bár paradoxonnak tűnik, fentiek figyelembevételével talán mégsem az: a könyvtárnyi adat ellenére, alapvetően – sokszor eleminek tűnő – ismeretek hiányoznak ahhoz, hogy ezt a komplex, számos szinten szorosan kapcsolódó és kölcsönható – dinamikus – rendszert csak részben is felderítettnek tekinthessük és működési mechanizmusáiban kell hatásfokkal gondolkodni tudjunk.

1. BEVEZETÉS

A statisztikai adatok szerint Európában a halálozások ~ 50%-a szív-, és érrendszeri betegségek következménye. Ez a szám Magyarországon is döbbenetesen nagy. Hogy mennyire, azt igen jól mutatják a tumor-okozta halálozásokhoz viszonyított arányok: a koronária betegség (ide tartozik a miokardiális infarktus (MI), krónikus iszkémiás szívbetegség (CIHD) és a hirtelen szívhalál (SCD), de nincs benne a mind gyakoribb szívelégtelenség (HF)) – a halálozások több, mint 20%-áért, az agyvérzés (stroke) több, mint 10%-áért felel; ezzel szemben a rettegett gyomorrák mindössze 2-3%-áért, a vastag- és végbélrák 2-3%-áért, a tüdőrák 4-5%-áért tehető felelőssé.

1. táblázat Halálozások halálloki csoportok szerint (Magyarország, 2013) (Forrás: KSH)

Halálok	Férfi	Nő	Összesen	%
Fertőző és élősví- okozta betegségek	396	508	904	0.7
Daganatok	18 060	15 214	33 274	26.2
A keringési rendszer betegségei	27 600	35 379	62 979	49.7
Az emésztőrendszer betegségei	3 741	2 649	6 390	5.0
Külső okok (pl. baleset)	3 981	2 143	6 124	4.8
Szándékos önártalom	1 588	505	2 093	1.7
Egyéb (tüdő, máj, stb.) betegségek	6 528	8 486	15 014	11.8
Összesen	61 894	64 884	126 778	100.0

A szív eredetű halálozások jelentős része végzetes aritmiák kialakulásához köthető – a szívelégtelenségben és iszkémiás szívbetegségekben szenvedő betegek közel fele ezek következtében hal meg; a súlyos agyi katasztrófák egyik leggyakoribb oka a pitvarfibrilláció. Az akut és krónikus szívbetegségek legtöbbszörében a szívizomsejtek Ca^{2+} háztartása tartósan károsul; sok esetben ez a károsodás az elsődleges, legkritikusabb tényező a betegség kialakulásában és/vagy progressziójában.

Az elmúlt évtizedekben az orvostudomány sok területén jelentős fejlődés történt, de a fejlődés sajnos kevésbé gyors a szívbetegségek vonatkozásában. *A nagyon fontos, de részleges sikerek ellenére* az iszkémiás elváltozások és a szívelégtelenség progressziója jelenleg alig-alig befolyásolható, korai szűrésekre, megelőzésekre pedig nem rendelkezünk kellően hatékony stratégiákkal. A jelenleg elérhető farmakológiai eszközök, gyógyszerek hatékonysága nem kielégítő, a rendelkezésre álló modern invazív technikák és készülékek rendkívül drágák és hosszabb távon vélhetően nem jelentenek optimális és végleges terápiás megoldást. Az áttöréshez, ahhoz, hogy a szívbetegségek terápiáját kielégítőnek mondhassuk, szignifikáns további fejlődésre van szükség, ami egyrészt magában foglalja *újabb terápiás célpontok azonosítását*, másrészt ezekre az új ismeretekre alapozva a mainál jóval hatékonyabb megelőzési/gyógyítási protokollok kifejlesztését.

E kiemelkedő jelentőségű cél elérésének egyik legfontosabb, legkritikusabb feltétele a szívbetegségek patomechanizmusainak átfogóbb és mélyebb megismerése. Ennek az erőfeszítésnek része a sokéves kísérletes munka, melyen jelen értekezés alapul.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szívizomsejtek intracelluláris kalcium (Ca^{2+}) homeosztázisa

A Ca^{2+} ciklus *transzportfolyamatai*. A szív fiziológiás kontrakciójának alapvető feltétele a $[\text{Ca}^{2+}]$ jelentős emelkedése. Az AP depolarizációs és plató fázisai alatt a külső térben (T-tubulusokból), elsősorban az LTC csatornákon keresztül, Ca^{2+} lép be a sejtbe, amihez az AP korai fázisában némi rev-NCX aktivitás (Ca^{2+} felvétel) is járul. Emlékeztetőül a belépő Ca^{2+} speciális sejt-kompartimentbe, az SL és SR közötti 15-30 nm széles „restricted space”-be kerül, ahol markáns $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$ emelkedést generál. Ez a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$ emelkedés kulcsszerepet játszik a kontrakció elindításában (trigger Ca^{2+}), mivel hatására az SR-ből, a RyR-okon keresztül, sokkal nagyobb másodlagos Ca^{2+} felszabadulás jön létre (CICR). A kialakult Ca^{2+} transziens (CaT) aktiválja a miofilamentumokat. A pitvarsejtek és Purkinje rostok ultrastruktúrája két lényeges vonatkozásban eltér a kamrai sejtektől – (1) a T-tubulus rendszer fejletlenebb; (2) az SR rendszer egyes elemei a sejt belsejében találhatóak – ezért az ECC kinetikája is eltér: a miofilamentumok *aszinkron módon aktiválódnak*, az aktiváció fokozatosan terjed a sejtek belsejébe. A miofilamentum-aktiválódás mértéke közel lineárisan függ a troponin C-hez kötődő Ca^{2+} mennyiségétől.

A szív fiziológiás relaxációjának alapvető feltétele a Ca^{2+} disszociációja a troponin C-ről, amihez szükséges a kontrakció alatt beáramlott/felszabadult Ca^{2+} eltávolítása a citoszolból. Steady state-ben a sejtben eltávolított, illetve az SR-be visszapumpált Ca^{2+} mennyisége *meg kell, hogy egyezzen* az aktiváció során beáramló/felszabadult Ca^{2+} mennyiségével. Az Ca^{2+} -ot a sejtben eltávolító, illetve az SR-be visszapumpáló legfontosabb transzportmechanizmusok a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő (NCX) forward módja, illetve az SR Ca^{2+} -ATPáz pumpája (SERCA2a); az utóbbi kellő mértékű aktivitása kritikus az SR Ca^{2+} tartalmának megőrzésében, ami viszont alapfeltétele a normál nagyságú CaT kialakulásának. A Ca^{2+} eltávolítás egy további mechanizmusa az SL primer Ca^{2+} pumpája (PMCA), amely hozzájárulhat a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ID}}$ finom beállításához, illetve fontos szerepet játszik Ca^{2+} jelutak szabályozásában. A fiziológiás Ca^{2+} ciklus szempontjából ugyancsak kevésbé jelentős negyedik Ca^{2+} eltávolító mechanizmus a Ca^{2+} felvétele a mitokondriumokba, azok Ca^{2+} uniporterén keresztül. Az eltávolító mechanizmusok között *versengés* van a Ca^{2+} -ért, a pillanatnyi fluxusok dinamikusan változnak. A szív steady-state működéséhez létfontosságú SL, illetve SR Ca^{2+} transzport fluxusok finom egyensúlyának tartós sérülése a sejt Ca^{2+} túltelődéséhez (aritmia készség, sejtkárosodás, apoptózis), vagy Ca^{2+} vesztéséhez, a pumpafunkció károsodásához (szívelégtelenség) vezethet.

A Ca^{2+} mozgások szabályozásának *alapelvei*. A kontrakciós-relaxációs ciklus alatti intra-/transzcelluláris Ca^{2+} ionfluxusok precízen szabályozottak. A homeosztatisz szabályozás két fő komponense (1) a trigger Ca^{2+} beáramlás „lokális” feed-back kontrollja, és (2) az SR Ca^{2+} -tartalmának direkt, feed-back szabályozása. Mindkét mechanizmus az SL és az SR Ca^{2+} fluxusainak dinamikus kölcsönhatásán alapul.

(1) A trigger Ca^{2+} mennyisége f leg az aktivált LTC csatornák számától és nyitott állapotuk valószínűségétől függ. Előbbi a transzmembrán potenciálváltozások határozzák meg, utóbbi érzékeny a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$ változásaira. Ha a Ca^{2+} szint csökken, a csökkenő SERCA2 aktivitás miatt az SR Ca^{2+} tartalma is csökken, ezért a CaT amplitúdója és a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$ is jóval kisebb lesz. A kisebb CaT miatt csökken a $f_{\text{wd}}I_{\text{NCX}}$ által kipumpált Ca^{2+} mennyisége, viszont a csökkent $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$ kevésbé gátolja az LTC csatornákat, ami azok nyitvatartási valószínűségének markáns növekedésében jelenik meg. Mivel végső soron mindkét folyamat Ca^{2+} akkumulációhoz vezet, a sejtek Ca^{2+} tartalma n , mindaddig, amíg ismét el nem éri az egyensúlyi állapotot.

(2) Az SR Ca^{2+} tartalmát a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a Ca^{2+} transzporterek (RyR2, SERCA) aktivitása és az intraluminális Ca^{2+} -kötő fehérjék össz mennyisége határozza meg; a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ emelkedése mind a CaT amplitúdóját, mind idtartamát növeli. A $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ szintet beállító, optimalizáló/stabilizáló autoregulációs feed-back mechanizmus az SL Ca^{2+} fluxusok CaT-függésén alapul. Ha a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ csökken, a CaT a normálnál kisebb lesz, ezért az NCX által eltávolított Ca^{2+} mennyisége csökken. Az alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$ miatt az LTC csatornák nyitvatartási időtartama n , a Ca^{2+} beáramlás is n . A két hatás együttesen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéshez, ez pedig az SR fokozott töltéséhez vezet. A korrekció mindaddig tart, amíg a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ normalizálódik és a Ca^{2+} fluxusok újra egyensúlyba kerülnek. A $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ tartós emelése kizárólag indirekt módon, tartós $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésen keresztül jöhet létre, amiben a CaT időtartama és kinetikája és szisztolés/diasztolés Ca^{2+} koncentrációk is alapvető jelentőségűek. Mivel a SERCA transzporthatásfoka a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésével meredeken n , a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérsékelt növekedése is jelentős $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ emelkedéshez vezet. Ha a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés tartós, az SR túltelődhet. Ez a fiziológiásan minimális számú, SR-ből spontán felszabaduló, lokális Ca^{2+} pulzusok (sparkok) valószínűségének drasztikus növekedéséhez, végső esetben generalizált, aszinkron Ca^{2+} hullámok kialakulásához vezet.

A Ca^{2+} homeosztázis terhelés-adaptációja. Adott kamratelérés esetén a kontrakciós erő t a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{id}}$, és a CaT nagysága határozza meg. A szív inotrópiájának fiziológiás adaptációját *külső*, *autonóm* szignálok vezérlik, ezek hatékonyságához szükségtelen a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ jelentős változása. A kontrakció „beat-to-beat” adaptációja elsősorban a CaT finomhangolásával történik, a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{id}}$, és az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} pulzus feed-forward modulációjával. Fokozott fizikai terhelésnél a magas pulzusszám miatt a *nettó* Ca^{2+} beáramlás *megnövekszik*, ami a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ és a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{id}}$ *egyidejű* emelkedéséhez vezet. N a CaT amplitúdója és a kontrakciós erő *is*. A Ca^{2+} eltávolítás is fokozódik. Végül új egyensúlyi állapot alakul ki, melynek jellemzői a megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{id}}$, fokozott Ca^{2+} felszabadulás az SR-ből, nagyobb CaT és a *megnövekedett* kontrakciós erő.

Ca^{2+} kompartmentek a szívben. A Ca^{2+} mozgások és Ca^{2+} -függő folyamatok térben és időben elkülönülve, többszintű interakció keretében zajlanak. A belső membránok módosítják a Ca^{2+} hullám terjedését és el segítik a Ca^{2+} kompartmentalizációját. A legfontosabb Ca^{2+} kompartmentek: a citoszol, az SR, a mitokondrium és a sejtmag. Egyre több adat igazolja, hogy ezeknél jóval kisebb, membránnal nem vagy csak részben határolt térfogatok is eltérően viselkednek – azaz a sejtekben strukturálisan

talán kevésbé de funkcionálisan jól elkülönül terekkel (*domének, mikrodomének*) is számolni kell. Ilyen domén a *szubmembrán* tér, illetve a T-tubulus és a diád, de számos speciális funkcióval rendelkező domént azonosítottak (pl. Ca^{2+} jelutakkal kapcsolatban, vagy az SR és a mitokondriumok között). A (mikro)domének mérete változó; esetenként (*egyetlen ionszatórna és közvetlen környezete*) szemléletesebb lehet nanodoménekről beszélni, hiszen térfogatuk minimális, 100 - 500 nm³.

A Ca^{2+} (és más ion) mozgások szabályozása szempontjából a szarkolemma belülről határoló 10 - 25 nm vastag plazmamembrán, melynek ionösszetétele jelentősen eltér a citoszol átlagos összetételétől, kitüntetett szereppel rendelkezik. Mivel a membrán transzporterei ezt a teret „látják” és ezzel a térrel állnak közvetlen kapcsolatban, a mindenkori transzportaktivitás szabályozásában fontos paraméterek (iongradiensek, membránpotenciál) aktuális értéke a lokális viszonyok függvénye és alig függ a teljes sejtre jellemző átlagos értékektől (pl. szisztolés alatt a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sm}}$ aktuális értéke sokszorosa a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktuális értékének. Ugyanakkor a szubmembrán tér *is rendkívül heterogén*: számtalan kisebb-nagyobb, funkcionális szempontból erősen különböző szereppel rendelkező mikro(nano)domén alkotja. Végül, bár „szubmembrán” térrel elsősorban a szarkolemma vonatkozásában beszélnek, értelemszerűen hasonló „sm” teretek léteznek a sejten belüli, különféle transzportereket tartalmazó, membránnal határolt struktúrák (SR, mitokondriumok, mag, stb.) esetében is.

A Ca^{2+} transzportfolyamatok $[\text{Na}^+]_i$ - és $[\text{H}^+]_i$ -függése. A Ca^{2+} fluxusokra a sejt Na^+ és H^+ tartalma jelentős modulátor hatást fejt ki, ennek oka az ion kölcsönhatása egy transzporterrel vagy koncentrációváltásának hatása a transzport hajtóerejére.

$[\text{Na}^+]_i$ függés: A szívben nincs szoros $[\text{Na}^+]_i$ szabályozás. Fiziológiai körülmények között a nettó fluxusátlag zéró. A felvétel főbb komponensei: a Na^+ csatornák, a Na^+ Ca^{2+} szimporterek, és az acidózisban a NHE. Az eltávolítás elsődleges effektorja az NKA pumpa, de körös körülmények között megnevezhető a Na^+ Ca^{2+} szimporterek szerepe is. A CICR-t a Ca^{2+} és Na^+ transzporttal az NCX aktivitása köti össze. A szív ciklus során a Na^+ beáramlás alatt a „fuzzy” térben kialakuló transziens Na^+ emelkedés modulálja az I_{NCX} irányát; az E_{NCX} értékét negatív irányba tolja és a Na^+ Ca^{2+} szimporterek aktiválásával Ca^{2+} felvételt generál, ami a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ emelkedéséhez, és ezáltal nagyobb CaT kialakulásához vezet. A CICR (azaz a kontraktilitás) finomhangolása a Na^+ akkumulációval, illetve Na^+ hiánnyal jellemezhető nanodomének Na^+ tartalmának alig ismert finomszabályozásától függ.

$[\text{H}^+]_i$ függés: A pH_i csökkenése is gátolja a sejtfolyamatok sebességét (pl. a szívizom kontraktilitását) ezért a pH_i precízen szabályozott. Normál pH_i esetén minden protontranszporter aktivitása alacsony, ezért összhatásuk a Ca^{2+} transzportra minimális. Aktivitásuk (és így hatásuk is) szignifikánsan nem pH_i csökkenéssel járó állapotokban (pl. I/R). Az iszkémia-indukált $[\text{Ca}^{2+}]_i$ túlterhelés négy legfontosabb forrásából három ionmozgáshoz köthető – a Ca^{2+} túltelődéshez vezet. $[\text{Na}^+]_i$ emelkedés okai: megnevezhető beáramlás (NHE aktiválódás – kritikus szerepet játszik a fokozott H^+ eltávolítás) és csökkent eltávolítás (NKA inaktiválódás). A markáns

$[Ca^{2+}]_i$ emelkedést okozó SL depolarizációban kiemelkedő szerepe van a fokozott K^+ kiáramlásnak (K^+ csatornák) és csökkent K^+ felvételnek (NKA inaktiváció).

2.2. A Ca^{2+}_i változások és az akciós potenciál (AP) repolarizáció

A külső $[Ca^{2+}]$ hatása az akciós potenciál kinetikájára. Az AP morfológiája és a külső $[Ca^{2+}]$ között szoros kapcsolat áll fenn. Hemodializált páciensekben, akikben a szérum $[Ca^{2+}]$ változó, egyértelmű, inverz kapcsolat van a QT_c hossza és a szérum $[Ca^{2+}]$ között. Izolált sejtekből származó adatok szerint a külső $[Ca^{2+}]$ emelkedése rövidíti az APD-t és növeli az $I_{Ca,L}$ denzitását, csökkenése AP megnyúláshoz és $I_{Ca,L}$ csökkenéshez vezet. $I_{Ca,L}$ gátlás esetén az AP platója csökken és az AP rövidül, az $I_{Ca,L}$ aktiválása ellenkező irányú változásokat generál. Ezekben a változásokban fontos szerepe van egyes repolarizáló K^+ áramok markáns Ca^{2+}_i -függésének.

A $[Ca^{2+}]_i$ szerepe a Ca^{2+} -érzékeny K^+ áramok szabályozásában. A K^+ csatornák Ca^{2+} -függő szabályozása három eltérő, de nem független mechanizmussal történhet: 1) direkt Ca^{2+} hatással, 2) Ca^{2+} -CaM, illetve 3) Ca^{2+} -CaM-CaMKII mechanizmussal.

Közvetlen Ca^{2+} hatás: A Ca^{2+} közvetlenül hat a K^+ csatornaproteinekre és módosítja permeabilitását. Jellemző példája az I_{K1} ; a Ca^{2+} ionok feszültségfüggő gátló hatása gátolja a K^+ kiáramlást, ezért a csatorna befelé egyenirányító karakterisztikát mutat.

Kalmodulin-függő reguláció: A kalmodulin (CaM) két homológ doménjét flexibilis régió köti össze, amely Ca^{2+} felvételt követően erős kötés kialakulását biztosítja a CaM molekula és a célprotein között. Ezáltal a CaM kulcsszerepet játszik a Ca^{2+} jelátvitelben, mivel a célproteinek többsége nem képes direkt Ca^{2+} kötésre. Több szívbén is megtalálható ionszatorna (Na^+ , Ca^{2+} , valamint K^+ csatornákat is beleértve) modulációja azok CaM kötőhelyein, Ca^{2+} -CaM mechanizmussal történik. CaM-függő szabályozás felelős az SK csatornák, illetve a későbbi egyenirányító K^+ áram lassú komponensének (I_{Ks}) gyenge $[Ca^{2+}]_i$ -függő aktivációjáért is.

Indirekt reguláció a Ca^{2+} -CaM-CaMKII jelúton keresztül: A CaMKII szerin-treonin proteinkináz, mely Ca^{2+} emelkedés esetén számos proteint foszforilál. Szívizomban főleg a β izoform expresszálódik. Dodekamer struktúrát alkot, külső felszínén katalitikus doménnel. Ca^{2+} /CaM komplex hiányában a legtöbb (de nem az összes) CaMKII inaktív (autoinhibíció). Autofoszforiláció az enzim Ca^{2+} /CaM affinitásának ~ 1000-szeres emelkedését indukálja (CaM trapping) és nyújtja aktív állapotának időtartamát. A kialakult "autonóm" aktivitás a CaM disszociációját követően is megmarad, így az aktivált állapot időtartama hosszabb lehet az CaT időtartamánál. Aktivációjában az AP morfológiája fontos szerepet játszik. Megnyúlt APD, vagy magas szívfrekvencia túlaktiválhatja, ami az APD további megnyúlásához vezethet. Szívizomsejtekben aktivitását izoformjai eloszlása/lokalizációja, és környezetének foszfát aktivitása befolyásolja. A Na_v csatornán, és a Ca^{2+} -háztartás proteinjein ($Ca_v1.2$, RyR2, SERCA2) kívül K^+ csatornákat (pl. $K_v4.1-4.3$) is foszforilálhat.

A fontosabb jelentős Ca^{2+} -függést mutató K^+ áramok a befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}), a tranziens kifelé irányuló áram (I_{to}), illetve a szívizomban „rejtélyes” szerepet játszó alacsony konduktanciájú (SK) csatornák. A többi repolarizáló K^+ áram jóval gyengébb Ca^{2+} -függést mutat, melynek részletei sokszor még kevésbé tisztázottak.

2.3. A Ca^{2+}_i háztartás kóros változásai és a szívritmus zavarok

Sejtszinten a Ca^{2+} -függő aritmiák abnormális membránpotenciál-változásokban nyilvánulnak meg és Ca^{2+}_i overload következtében alakulnak ki. *Triggerelt aktivitás* esetén az aritmia fokális eredetű, kialakulását az *elvezetési excitáció* indukálja. Kórosan magas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (és $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$) esetén a sparkok gyakorisága ugrásszerűen nő és gyakran alakulnak ki fokozottan aritmogén Ca^{2+} hullámok. *Késői utópotenciál* (DAD) az AP diasztolés fázisában, magas szívfrekvenciák mellett alakul ki az SR-ből spontán, lokálisan felszabaduló Ca^{2+} hatására. Az NCX kettős szerepet játszik kialakulásában. Egyrészt, mivel az SR Ca^{2+} túlterhelése a módosult NCX aktivitás következménye. Másrészt, a spontán Ca^{2+} hullámok miatt létrejövő hirtelen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést az NCX forward aktivitása távolítja el (I_i). *Korai utópotenciál* (EAD) alakulhat ki az AP plató fázisa alatt az LTC csatornák egy részének reaktivációja, vagy tartós késői Na^+ áram ($I_{\text{Na,L}}$), illetve az AP terminális fázisában, bradycardia, vagy részleges K^+ csatorna blokádnál, az I_i fokozott, gyors aktivációja miatt.

Szervszinten a Ca^{2+} -függő aritmiákat az AP kialakulásában/terjedésében kialakuló mikro/makroheterogenitások magyarázzák. A Ca^{2+}_i overload súlyos következménye a réskapcsolatok záródása; a drámaian csökkenő intercelluláris konduktancia az AP terjedési sebesség jelentős lassulásához, az AP diszperzió markáns fokozódásához, valamint funkcionális AP-reentry kialakulásához vezet. A *vezetési aritmiák* alapvetően jellemzője az *aritmogén szubsztrát* kialakulása a sejtek „remodeling”-je, strukturális és/vagy elektrofiziológiai átalakulása következtében. A szubsztrátot a szomszédos szívizomrétegek inhomogén vezetési sebessége képezi, így az izomrétegek között elektromos potenciálkülönbségek alakulnak ki, ezáltal a cirkulárisan folyó áram képes ismételt excitációt létrehozni. A Ca^{2+} -függő K^+ csatornák kóros működése az abnormális Ca^{2+} -háztartás által indukált remodeling egyik fontos következménye.

A *pitvarfibrilláció* (AF) kialakulása összefügg a fokozott Ca^{2+} influx következtében kialakuló Ca^{2+}_i túltelődéssel. A *strukturális remodeling* kialakulásában Ca^{2+} -aktivált proteázok szerepelnek, az *elektromos remodeling* a Ca^{2+}_i túlterhelés csökkentését szolgáló, ioncsatornák (pl. LTCC) csökkent expressziójával jellemezhető *celluláris kompenzációs mechanizmus* aktivációjának következménye. Bár az SK csatornák szerepét illetően hiányoznak a cáfolhatatlan bizonyítékok, aktiválódásuknak többen alapvető szerepet tulajdonítanak az AF kialakulásában. A polimorf tachycardiával jellemezhető kamrai *Torsade de Pointes* (TdP) kialakulását elősegíti a repolarizációs rezerv csökkenése, ami a kamrai elektromos heterogenitások felerősödéséhez, fokozott triggerelt aktivitáshoz (EAD), illetve a három kamrai sejtípus (endo-, epi-, és midmiokardiális) repolarizációs kinetikájában kialakuló fokozott tér- és időbeli diszperzió következtében reentryt generálhat. A gyakran hirtelen szívhalálhoz vezet

kamrafibrilláció (VF) kialakulásában kritikus szerepet játszanak a strukturális változások, a folyamatosan változó depolarizációs hullámok, illetve azokat generáló „rotorok”, melyek fenntartásában szerepet játszanak a Purkinje rostok; egyrészt a kialakuló reentry körök részeként, másrészt a fokális aktivitás forrásaként.

Az iszkémia/reperfúzió indukált aritmogenezisben kitüntetett szerepet játszik az SL létfontosságú iontranszportereinek (NCX, NHE) kórosan fokozott aktivitása. Az *iszkémia korai fázisában* az ATP elérhetőség csökkenésével a SERCA2 gátlódik, a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedik. A RyR2-k nyitvatartási valószínűsége nő, lehetővé téve a $[Ca^{2+}]_i$ további, gyors emelkedését, ami tovább növeli a RyR2 nyitvatartási valószínűségét, még tovább fokozva a Ca^{2+} felszabadulást. Az iszkémia késői fázisában, a Ca^{2+} akkumuláció a $revI_{NCX}$ aktiválódás következtében megnövekedett Ca^{2+} felvétel miatt tovább fokozódik, amit a magas $[Na^+]_i$ és a membránde polarizáció még inkább felgyorsít.

A reperfúzió kezdeti fázisában a NHE markáns aktiválódása a $[Na^+]_i$ másodlagos, gyors emelkedéséhez, ez pedig az inward I_{NCX} további aktiválásán keresztül a $[Ca^{2+}]_i$ gyors növekedéséhez és extrém méretű Ca^{2+} -túlterhelés kialakulásához vezet. Ez a reperfúzió-indukált szövetkárosodások és drámaian magas aritmia hajlam elsődleges oka. A fokozott transzmembrán Ca^{2+} szívárgás, a megnövekedett és a Na^+ áram és a termelődő szabad oxigéngyökök akkumulációja tovább fokozza a károsodásokat. Iszkémiás szívbetegségekben triggerelt, illetve reentry eredetű aritmiák közel azonos számban fordulnak elő. A triggerelt aritmiák kialakulásában kiemelkedő szerepet játszik az NCX fokozott működése, a reentry aritmiák strukturális alapja viszont jóval összetettebb; az inhomogén NCX expresszió csak egy a sok kóros eltérésből, melyek *fokozott szöveti anizotrópiához* vezetnek.

2.4. A szív Na^+/Ca^{2+} kicserélője (NCX)

Az *NCX feladata* a transzmembrán Ca^{2+} fluxusok szabályozása. A transzport iránya reverzibilis, a mindenkori iongradiensek és a membránpotenciál függvénye. Ennek következtében, bár elsődleges feladata a Ca^{2+} eltávolítása (forward transzport), adott körülmények között fordított irányú, Ca^{2+} akkumuláló aktivitása (reverz transzport) hozzájárulhat a citoszol Ca^{2+} túltelődéséhez. Kóros körülmények között az inward I_{NCX} az AP rövid távú variabilitásának fokozásával, annak aritmogén instabilitásához is jelentősen hozzájárulhat. Fiziológiai körülmények között működését az NKA által létrehozott Na^+ gradiens vezérli, forward és reverz módok esetén a transzport nem elektroneutrális; sztöchiometriája: $3 Na^+ : 1 Ca^{2+}$ cserearány. A molekula citoszol felületén két regulációs és egy transzport Ca^{2+} kötőhely, extracelluláris oldalán egy transzport Ca^{2+} kötőhely található; két intracelluláris (egy-egy regulációs és transzport) és két extracelluláris, transzport Na^+ kötőhelyel rendelkezik. A Ca^{2+} és Na^+ verseng a kötőhelyekért. A kicserélő Ca^{2+} affinitása erősen aszimmetrikus: Ca^{2+} -re jóval magasabb, mint Ca^{2+} -ra. Legfontosabb szabályozási mechanizmusai az Na^+ -függő inaktiváció és a Ca^{2+} -függő aktiváció. Kevés Ca^{2+} nélkülözhetetlen a reverz, és a forward NCX transzporthoz is. Minimális $[Na^+]_i$ szükséges a forward transzporthoz, de magas $[Na^+]_i$ esetén az I_{NCX} inaktiválódik. Ez az inaktiváció magas

$[Ca^{2+}]_i$ mellett nem alakul ki. Magas $[Ca^{2+}]_i$ esetén az NCX Ca^{2+} -függő aktivációja szükséges a Ca^{2+} eltávolítás aktiválására. A szabályozási mechanizmusok alapvetően függenek az NCX molekula közelében érvényes lokális Ca^{2+} és Na^+ koncentrációktól. Az *NCX farmakológiája* sokáig kimerült nemspecifikus ionok (Co^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+}) és antiaritmiás szerek (amiodaron, bepridil) használatában, ami súlyosan hátráltatta a kicserélési fiziológiás és kóros módok tanulmányozását. A hátrányos állapotban a szelektív, de kizárólag patch clamp mérésekben használható XIP peptidok sem változtattak. Áttörést (1996) egy új molekula-csoport, a benziloxifenil származékok (KB-R7943, SEA0400, SN-6, YM-244769) kifejlesztése hozott, melyek, elsősorban a $0.3 \mu M$ alatt szelektív SEA0400, számos vizsgálatban kerültek felhasználásra. A csoport tagjai eltérő NCX izoform szelektivitást mutat; a KB-R7943 hatékonyabb az NCX3, mint NCX1 és NCX2 esetében. A SEA0400 legjobban az NCX1-et gátolja, az NCX2-t kevésbé, az NCX3-on alig hat. Az SN-6 az NCX1-en a leghatékonyabb, az YM-244769 legjobban az NCX3-at gátolja. A KB-R7943 gátlási határfoka aszimmetrikus (jóval nagyobb a $revI_{NCX-re}$), a SEA0400 gátlási határfoka közel azonos mindkét transzportirányban. Ezenfelül hatékonyságuk függ a Na^+ -inaktiváció mértékétől; kevésbé hatásosak fiziológiás (alacsony) $[Na^+]_i$ mellett, hatékonyságuk markánsan magas $[Na^+]_i$ -val jellemezhető kóros körülmények között. Ez kedvező farmakológiai profil például a $[Na^+]_i$ túlterheléssel járó I/R károsodások esetén. A közelmúltban váltak elérhetővé a SEA0400-nál is jobb szelektivitással rendelkező anyagok (ORION); egyiket (ORM-10103) több kísérlet sorozatunkban is használtuk.

2.5. Az értekezés elsődleges célkitűzéseinek irodalmi háttere

Az értekezésben ismertetett kísérletes vizsgálatok négy, mind elméleti, mind klinikai szempontból kiemelkedően fontos kérdést állítanak a mérések középpontjába. Mint az alábbiakból egyértelműen kitűnik, a rendelkezésre álló korábbi irodalmi adatok alapján ezeket a kérdéseket megbízhatóan nem lehetett megválaszolni.

A nem működő direkt kapcsolat – az SK csatornák rejtélye:

Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák számos sejttípusban expresszálódnak, és mivel közvetlen kapcsolatot biztosítanak a Ca^{2+} háztartás és membránpotenciál között, neuronokban és szívműködésben kiemelkedő szerepük van a K^+ konduktancia optimalizálásában. Szívben a korai vizsgálatok szerint nem mutathatók ki. Ugyanakkor Chiamvimonvat és mts. 2003-ban egérszívben molekuláris biológiai eszközökkel azonosítottak egy SK2 csatorna izoformot, melynek eloszlása regionális különbségeket mutat; főleg a pitvarban, de kamrában/nodális szövetben is expresszálódik. Szintén ki számoltak be egér pitvarból és kamrából izolált SK1 és SK3 csatornák klónozásáról. Ezenkívül elektrofiziológiai méréseket is végeztek, és markáns apamin-szenzitív Ca^{2+} -aktivált K^+ áram (I_{KS-AS}) jelenlétét igazolták egér és humán szívizomsejtekben. Genetikailag módosított egérmodellekben AV-diszfunkciót és az APD drasztikus megnyúlását találták, valamint pitvarfibrilláció is indukálható volt. Következéteik szerint az I_{KS-AS} markánsan befolyásolja a szív AP repolarizációs profilját és mivel ez az áram

a pitvarszövetben jóval nagyobb, mint a kamrában modulátorai képesek lehetnek a pitvari APD szelektív változtatására. Ennek az interpretációnak azonban mind más kísérleti adatok, mind releváns elméleti megfontolások (a repolarizációs rezerv APD stabilizáló hatása vonatkozásában) markánsan ellentmondanak.

A tranzienis kifelé irányuló áram (I_{K1}) Ca^{2+} -függő modulációja:

Az I_{K1} a Kir2 csatorna alcsalád tagjainak (Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3) áramintegrálja. Más K_V áramokkal ellentétben, feszültség-áram függvénye nagyobb inward, mint outward konduktanciát mutat. Az I_{K1} a plató fázis végén aktiválódik és a terminális repolarizáció alatt folyamatosan nő. Mivel nagysága nagymértékben befolyásolja a terminális repolarizáció sebességét, Ca^{2+} -függő modulációja a szívizom fokozott szimpatikus aktivitás-függő adaptációjának esszenciális komponense lehetne. Az I_{K1} Ca^{2+} -érzékenysége jók ismert, de az irányára és a modulációjára vonatkozó adatok ellentmondásosak. A $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés közvetlen hatása mérsékelt, feszültségfüggő gátlás, de mivel az I_{K1} -et indirekt, $[Ca^{2+}]_i$ -függő mechanizmusok is szabályozhatják (Ca^{2+} /CaMKII, PKC), az I_{K1} változás a kísérleti feltételek től függően lehet gátlás vagy aktiváció. A legtöbb vizsgálatban az I_{K1} $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hatására nem (birka Purkinje rostok, metabolikus stressz vizsgálatok), esetenként viszont (szívelégtelen patkányból izolált sejtek) inkább csökkenést kaptak. Hipoxiás szívizomsejtekben a $[Ca^{2+}]_i$ puffereelésével az I_{K1} növekedése megelvezhető. Az ellentmondásos adatok ellenére a Ca^{2+} -indukált I_{K1} növekedés okozta membránellenállás csökkenést, mivel részben kompenzálja az I_{K1} hatását és a nyugalmi potenciál stabilizálásával csökkenti az aritmogenezis valószínűségét, kardioprotektív mechanizmusnak tekintették.

Az NCX gátlás következményei egészséges miokardiumban

Az AP kinetikája és az I_{NCX} közötti többszintű kapcsolat, az NCX elektrogén jellege, illetve $[Na^+]$ és $[Ca^{2+}]$ függése szinte megijósolhatatlanná teszi az NCX gátlás hatását az AP alakjára és időtartamára. Az ion (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ és H^+) transzporterek között a szubmembrán térben fennálló kölcsönhatások következtében az NCX farmakológiai modulációja óhatatlanul az összes többi transzporter aktivitását is módosíthatja. Az akut NCX gátlás AP-ra gyakorolt hatásaival kapcsolatos kevés adat ellentmondásos. Általában AP rövidülést tapasztaltak; XIP alkalmazását követően, az aktuális $[Na^+]_i$ -től függően AP rövidülés és megnyúlás egyaránt létrejött de megnyúlás is előfordult. 5 mM $[Na^+]_i$ esetén az I_{NCX} depolarizáló, APD nyújtó hatású, ezért potenciálisan aritmogén; 10 mM $[Na^+]_i$ mellett a plató alatti nettó outward I_{NCX} repolarizáció gyorsító, APD rövidítő hatású. KB-R7943 az AP késői plató fázisát megnyújtotta, az APD₅₀ rövidült, az APD₉₀ megnőtt, egy másik vizsgálatban sem nodális sem kamrai szívszövetben nem okozott markáns változásokat. SEA0400 alkalmazását követően az ellentétes irányú, APD₅₀/APD₉₀ változások nem jöttek létre. Korábbi, saját kutyai kamrai szívizomsejteken végzett vizsgálatunk hasonló eredményekhez vezetett.

Az NCX gátlás hatása a **kontraktilitásra** szintén nem egyértelmű, de az elzetes várakozásokkal szemben jelentős pozitív inotróp hatást senki sem talált, esetenként a kontraktilis erő csökkent. Pl. a KB-R7943 patkányban nem befolyásolta sem a CaT

sem a steady-state kontrakciók paramétereit, az $[Ca^{2+}]_{SR}$ és a post-rest érzékenyítés mértéke sem változott; tengerimalacban viszont ezek a paraméterek szignifikánsan csökkentek. Saját vizsgálatainkban izolált patkány szívben a SEA0400 növelte a szisztolés nyomást, viszont a nyúlószív kontraktilitását nem befolyásolta. Egy másik, tengerimalacon végzett vizsgálatunkban a SEA0400 nem indukált mérhető változást sem a CaT-ben sem a bal kamrai szisztolés és diasztolés nyomásokban, továbbá nem befolyásolta a csúcsnyomás eléréséhez szükséges id t és a $[Ca^{2+}]_i$ nagyságát, viszont növelte a CaT lecsengési id állandóját. Sertés és eger szívizomsejteken, pufferelt vagy nem pufferelt Ca^{2+}_i mellett gátolta a forward transzportot, a $[Ca^{2+}]_{SR}$ n tt, a sejt rövidülése fokozódott. Összességében elmondható, hogy egészséges miokardiumban végzett NCX gátlás hatásaira vonatkozó irodalmi adatok rendkívül heterogének, ellentmondásosak, és a használt gátlószerek mérsékelt szelektivitása miatt nehezen értelmezhetőek. Az ellentmondások feloldását segíthetik azok a vizsgálatok, melyek igazolták, hogy fiziológiás $[Ca^{2+}]_o$ mellett az NCX expresszió modulációja (s t KO-ja) alig hat a kontrakció mértékére, mivel az NCX aktivitásváltozását párhuzamosan zajló elektrofiziológiai változások ($I_{Ca,L}$, APD) szinte teljesen kompenzálják.

Az NCX gátlás hatásai beteg szívben

Számos adat igazolja, hogy az NCX a szív aritmogenezisében is kritikus szerepet játszik. Az NCX funkció komplexitásából adódóan az NCX gátlás következményei összetettek. A $revI_{NCX}$ gátlás következtében csökken az AP korai fázisában belépő Ca^{2+} mennyisége. A $fwdI_{NCX}$ gátlása miatt a CaT lecsengése elhúzóódik, és a $[Ca^{2+}]_{iD}$ is változhat. Az eltávolítás során a SERCA2/NCX transzportarány n , így a $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedhet. Végül, mivel a spontán diasztolés Ca^{2+} felszabadulás által indukált I_{fi} lassan alakul ki, a membránpolarizáció nagysága is csökkenhet. Ezek a változások közvetlenül befolyásolják a szív aritmiahajlamát, és az aritmiaállapot súlyosságát és id tartamát. Az NCX gátlás eredménye az egyes hatások nagyságán, kinetikáján és interakcióján kívül a gátlószerek farmakológiai paramétereit is függ (nemspecifikus hatások) és nehezen megjósolható. Ezt jól mutatja egy akonitin-indukált triggerelt aritmiákra vonatkozó vizsgálat, mely tengerimalacon a KB-R7943 és a SEA0400 anti-/proaritmias hatékonyságát elemezte, és amelyben – vélhetően nemspecifikus hatásai miatt – kizárólag a KB-R7943 volt hatékony. A vonatkozó vizsgálatok egy részében az NCX gátlás gátolta az aritmia kialakulását és id tartamát, más esetekben viszont hatástalanak bizonyult. Saját eredményeink szerint SEA0400 alkalmazását követően az EAD-ok és DAD-ok amplitúdója kutya preparátumokban csökkent.

I/R modellekben az NCX gátlás általában (nem mindig) mérsékelt az aritmogén változásokat ($[Ca^{2+}]_{iD}$, Ca^{2+} oszcillációk) és megszüntette az I/R indukált aritmiákat (VF, VT); iszkémia- és reperfüzió-indukált aritmiák kivédésére azonban csak a KB-R7943 bizonyult alkalmasnak (nemspecifikus hatás?). A SEA0400 in vivo patkány modellekben gátolta a VF és VT kialakulását, kutya modellben viszont hatástalan volt. Hasonlóan ellentmondásos, speciestől, I/R modelltől (iszkémia súlyossága és hossza), beavatkozási időponttól és gátlószerek koncentrációjától függő eredményeket kaptak az NCX gátlás kontraktilitás-hatására vonatkozóan is.

3. CÉLKIT ZÉSEK – VÁLASZRA VÁRÓ KÉRDÉSEK

Elsődleges célkitűzésünk négy, elméleti és klinikai szempontból is fontos kérdéskör vizsgálatára volt a szív Ca^{2+}_i háztartására és akciós potenciáljára jellemző paraméterek elemzésével, szívizomsejteken, multicelluláris mintákban és intakt szívekben.

1. Milyen hatással van egyes, erős Ca^{2+} -függést mutató repolarizáló K^+ áramokra a $[Ca^{2+}]_i$ markáns változása; Ca^{2+}_i -függésük következtében emelkedik, vagy csökken a szív adaptációs képessége, illetve aritmiahajlama?

- Vannak-e egészséges szívizomban működő SK2 csatornák? Ha igen, változik-e az AP gátlásokat követően normális, illetve csökkent repolarizációs rezerv esetén?
- Milyen irányban és mértékben befolyásolja a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése a repolarizáció késői fázisában és a nyugalmi potenciál beállításában/stabilizációjában kritikus jelentőségű I_{K1} nagyságát. Lehet-e a függésnek aritmogén következménye?

2. Van-e fiziológiai körülmények között a szelektív NCX gátlásnak szignifikáns befolyásoló hatása a szív Ca^{2+}_i háztartására, illetve kontraktilitására?

- Van-e a szelektív NCX gátlásnak mérhető hatása egészséges nagy emlősök (kutya és humán) szív Ca^{2+}_i háztartására és kontraktilitására?
- Eltérnek-e ezek a kis emlősök (patkány) szívében azonos körülmények között mért változások? Ha igen, miért?
- Van-e eltérés a kevésbé szelektív NCX gátló SEA0400 és az újabb, szelektívebb ORM-10103 Ca^{2+}_i homeosztázisra gyakorolt hatásai között?

3. Jelenthet-e egyes szívbetegség modellekben a szelektív, részleges NCX gátlás perspektívikus terápiás stratégiát a Ca^{2+}_i háztartás zavarai által generált aritmiai kialakulása ellen?

- Részleges, szelektív NCX gátlással csökkenthető-e az $I_{Na,L}$ aktiválása következtében kialakuló $[Na^+]_i$ emelkedés aritmogén következményei a Ca^{2+}_i homeosztázisban és az AP paramétereiben?
- Szimulált I/R során szelektív NCX gátlás alkalmazásával csökkenthető-e a Ca^{2+}_i háztartás aritmogén eltolódásai és az AP paraméterek aritmogén változásai, illetve javíthatók-e a sejtek túlélési esélyei?

4. Izolált, perfundált szívében a két kicserélhető kombinált gátlásával fokozható-e az NCX/NHE gátlás reperfüziós aritmiaikkal szemben kifejtett antiaritmias hatása?

- Hogyan változnak a fontosabb hemodinamikai paraméterek a regionális I/R ciklus során kontroll, illetve NCX és/vagy NHE gátlóval kezelt szívekben?
- Alkalmazható-e a részleges NCX gátlás a reperfüziós fázisban kialakuló kamrai aritmiaik megelőzésére?
- Hogyan viszonyul egymáshoz a részleges, szelektív NHE, illetve NCX gátlás hatékonysága az egyes reperfüziós aritmia típusok vonatkozásában?
- Fokozható-e a részleges NHE és/vagy NCX gátlás antiaritmias hatékonysága a két gátlószer kombinált alkalmazásával?

4. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK

4.1. Etikai engedélyek

A projektek megfelelnek az EU, illetve az USA laboratóriumi állatok tartására és felhasználására vonatkozó irányelveinek (USA: NIH publication no 86–23, revised 1985). Minden protokollunk rendelkezik a Szegedi Tudományegyetem „Állatvéd Tudományetikai Bizottság” engedélyével (No. 54/1999 Oej, I-74-9/2009). A humán kísérleti protokollok mindenben megfeleltek a Helsinkai Deklaráció irányelveinek és rendelkeztek a Szegedi Tudományegyetem „Humán Orvosbiológiai Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága” engedélyével (No. 717. No. 63/1997).

4.2. Preparátumok

Izolált kamrai szívizomsejtek. Az optikai (CaT, NADH, stb.) méréseket nagyrészt, a patch clamp és „single-cell” AP méréseket minden esetben izolált szívizomsejteken végeztük, melyeket kutya és patkányszívbe I enzimatis módszerrel izoláltuk. A Sprague–Dawley patkányokból izolált szíveket, az aortacsonkon keresztül, 2mM CaCl₂-ot tartalmazó KBH oldattal perfundáltuk, majd a szuperfúziót átkapcsoltuk Ca²⁺-mentes oldatra, végül a perfúziós oldatot kollagenáz + hialuronidáz + CaCl₂ hozzáadásával kiegészítettük. Az enzimatis szeparációs eljárás végzetével a jobb kamrai szövetet kis darabokra vágtuk és trituráltuk. Kutya kamrai szívizomsejteket thiopentállal altatott feln tt keverék kutyák szívéb I szegmens-perfúziós módszerrel nyertünk. A bal kamra ék alakú szegmensét kivágtuk, majd Langendorff apparátusra er sítve az anterior coronaria descendens-en keresztül folyamatosan perfundáltuk. A sejtszeparálást 50-75 µM CaCl₂ jelenlétében, 0.5 g/l kollagenázzal (Sigma I típus) végeztük. A sejtek minimum 60%-a a küls Ca²⁺ szint helyreállítását követ en szabályos alakot vett fel, jól felismerhet harántcsíkolattal.

Izolált multicelluláris preparátumok. Az AP méréseket legtöbbször multicelluláris, els sorban kutya, de patkány és humán szívb I is izolált preparátumokon végeztük. A papilláris izmot és trabekulát a jobb kamrából operációs mikroszkóppal izoláltuk. Az izolálást követ en a preparátumot plexi kamrában rögzítettük, Tyrode vagy KHB oldattal perfundáltuk, platina elektródokkal, négyszögimpulzusokkal folyamatosan stimuláltuk és a KHB oldatban legalább 60 percig hagytuk ekvilibrálódni.

Izolált perfundált patkányszív. Sprague–Dawley patkányokat thiopentállal altattuk, és heparinnal el kezeltük. A szívet módosított Langendorff apparátuson rögzítettük, majd retrográd irányban, állandó nyomáson, módosított KHB oldattal perfundáltuk. A koronáriaáramlást (CF) ultrahangos Doppler áramlásmér vel mértük, a bal kamrai nyomást (LVP) a kamrába helyezett elasztikus ballonnal regisztráltuk. Fentiekén kívül regisztráltuk a perfúziós nyomást és 3 csatornás elektrokardiogramot (EKG).

4.3. Optikai mérési protokollok

CaT mérések izolált sejtekben és kamrai szövetmintákban. Az izolált sejteket Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel (Fluo 4-AM) töltöttük. A mérést Olympus IX 71

invertált fluoreszcens végeztük. A sejtszuspenzióból egy cseppet kis térfogatú sejt kamrába helyeztünk; letapadásukat követően Tyrode szuperfúzió mellett 1 Hz téringertést alkalmaztunk. Az optikai jeleket fotonszámológó modulokkal határoztuk meg. A festéket 480 nm hullámhosszon gerjesztettük, az emittált fluoreszcenciát 535 nm-en mértük. Az adatfeldolgozást az Isosys software-rel végeztük. A megmért fluoreszcencia adatokat korrigáltuk, majd simítottuk. A $[Ca^{2+}]_i$ változását általában normalizált formában (F/F_0) fejeztük ki. A kombinált optikai + patch clamp mérések során a Fluo 4-AM helyett a pipettaoldatban a Fluo 4 pentakálium sóját alkalmaztuk, és a pipettán keresztül ingereltünk. A régebbi mérésekben aránymérő fluoreszcencia módszert alkalmaztunk (Fura 2-AM). A sejteket 360 és 380 nm-en galvanométeres monokromátorral (Optoscan) gerjesztettük. A fluoreszcenciát 510 nm-en mértük. A $[Ca^{2+}]_i$ változások becslésére a korrekciót követően az I_{360}/I_{380} hányadost használtuk. Multicelluláris mintákon a CaT mérések a sejtérésekkkel analóg módon történtek.

Koffein tranziens meghatározása. A ~ 100 μm csúcsátmérőjű mikropipetta csúcsát mikromanipulátor segítségével a kiválasztott sejt közelébe (< 100 μm) juttattuk. A koffeines Tyrode oldatot mikropipettával közvetlenül a sejt felszínére bocsátottuk. A kontroll koffein pulzust 2 perc után megismételtük, majd a perfúziót átkapcsoltuk az NCX gátló tartalmú Tyrode-ra és megismételtük a koffein pulzuspárt. Amennyiben a tranzienspár amplitúdója között 10%-nál nagyobb eltérés volt, a mérést elvetettük. A koffein görbéket korrigáltuk, átlagoltuk, végül amplitúdóra normalizáltuk.

NADH mérések. Az aerob–anaerob átmenet során az intramitochondriális NAD^+ tartalom részben redukálódik, ami optikai úton követhető. A NADH-t 360 nm-en gerjesztettük, a natív szöveti fluoreszcenciát 450 nm-en detektáltuk. Az iszkémia mélységét a korrigált fluoreszcencia növekedését a kísérlet végén alkalmazott NaCN indukált, korrigált maximális növekedés arányában kifejezve jellemeztük.

Szívizomsejtek túlélési arányának meghatározása. Natív, periódikusan stimulált szívizomsejteken szimulált I/R protokollt alkalmaztunk. Véletlenszerűen kiválasztott látótérben reprezentatív, kör alakú, túlnyomórészt szabályosan kontraháló sejteket tartalmazó régiókat (ROI) jelöltünk ki, amelyekre 1 fényképezőgéppel állóképeket készítettünk. Az élő/elpusztult sejtek megkülönböztetését morfológiai paraméterek (alak, harántcsíkoltatás) alapján végeztük: **A:** szabályos alakú sejtek, intakt határokkal és jól azonosítható harántcsíkoltatással; **B:** elpusztult vagy kontraktúrában lévő, sérült sejtek, nem látható harántcsíkoltatással. A túlélő és elpusztult, vagy kontraktúrában lévő sejtek számát és arányát a protokoll során periódikusan meghatároztuk.

4.4. Akciós potenciál mérések

Multicelluláris preparátumokban. Az AP-eket jobb kamrai papilláris izmok, vagy bal pitvari trabekulák felszíni sejttrétegéből mértük, konvencionális mikroelektrodó technikával. 10–20 MΩ ellenállású, hegyes mikroelektrodókat biológiai erőtől hoztatunk csatlakoztattuk, melynek feszültségkimenetét 40 kHz-en mintavételeztük. Az APD₉₀ meghatározása vagy házi készítésű, vagy Evokedwave v1.49 software-rel történt. Egy preparátumot akkor tekintettük megfelelőnek, ha az AP amplitúdója 100 mV-nál

nagyobb volt és a kontroll APD₉₀ értékek kutya/patkány preparátumokban a 200–220, illetve 50–80 ms tartományba estek. Az out-of-range preparátumot kizártuk. A teljes kísérleti protokollt egyetlen szúrásból teljesítettük, ha ez nem sikerült, egy új sejtből regisztrálva kíséreltük meg a protokoll folytatását. Az adatfeldolgozás optimalizálása céljából a mérésekben kettős mintavételezést alkalmaztunk; az AP kezdeti, gyors fázisában 50 ms-ig 40 kHz, ezt követően 1 kHz frekvencián.

Izolált sejteken. Izolált szívizomsejteken az AP-t a konvencionális mikroelektrodtechnika alkalmazásával, nagy ellenállású, hegyes mikroelektrodokkal határoztuk meg. A potenciálváltozásokat Axoclamp 900A erősítővel mértük, az AP fontosabb paramétereit (amplitúdó, APD₂₅, APD₉₀, trianguláció, platópotenciál), és a nyugalmi potenciált a regisztrált görbékkel Clampfit 10.0 software-rel off-line határoztuk meg.

4.5. Árammérési protokollok

Árammérések „whole cell” patch clamp technikával. A kísérleti környezet azonos volt az optikai mérésekével (szövetkama, invertált mikroszkóp). A mikropipettákat boroszilikát kapillárisokból mikroprocesszor-vezérelt pipettahúzóval készítettük. Az elektrod ellenállása 1.5–2.5 MΩ volt. A soros ellenállást 80%-ig kompenzáltuk. Az áramokat Axopatch 1-D erősítővel mértük, A-D konverterrel 5–20 kHz mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, majd off-line analízis céljára tároltuk. Az off-line analízist software kontroll (pClamp 6.0 - 10.0) mellett végeztük.

A **Ca²⁺ áram** mérésére a [Ca²⁺]_i dinamikus változásainak vizsgálatára is alkalmas perforált patch clamp módszert alkalmaztuk. A pipettaoldatot a mérést megelőzően 200 µg/ml amphotericin B-vel egészítettük ki, mely sejtmembránba jutását követően az ellenállás 15–20 MΩ körül stabilizálódott.

Az **apamin-szenzitív áram** meghatározására a pipettaoldatot [Ca²⁺]-járt ([Ca²⁺]_{pip}) a WinMaxC software-ben számolt CaCl₂ + BAPTA keverékkel 900 nM-ra állítottuk. Az áramot apaminkezelés előtt és után is meghatároztuk. A külső oldatban I_{Na}, I_{Ca,L}, és I_{NCX} gátlása céljából Na⁺- és Ca²⁺-mentes volt. Az I_{SK-AS} nemspecifikus gátlásának elkerülése érdekében ioncsatorna gátlót nem használtunk. Az SK-AS áramot a Ca²⁺ áramhoz hasonlóan, perforált patch clamp módszerrel is meghatároztuk, továbbá a [Ca²⁺]_i egyidejű meghatározása érdekében a sejteket Fluo 4-AM-mel is feltöltöttük.

A **befelé egyenirányító K⁺ áramot** egészséges patch clamp módszerrel mértük. A pipettaoldatot a megfelelő EGTA/BAPTA + CaCl₂ kombinációval puffereltük, vagy a CaT zavartalan kialakulása érdekében nem puffereltük. Ez utóbbi esetben a pipettaoldatot készítéséhez Ca²⁺-mentes vizet használtunk. A [Ca²⁺]_{pip}-et a WinMaxC software-rel határoztuk meg. A magas Ca²⁺ tartalmú oldatban az aktuális [Ca²⁺]_{pip} értékét Ca²⁺-érzékeny elektróddal, 5 Hz mintavételi frekvencián ellenőriztük.

A **készen Na⁺ áram** meghatározása során a sejteket a I_{NKA} és az I_{Ca,L} gátlása céljából 20 µM ouabaint, illetve 1 µM nízoldipint tartalmazó K⁺-mentes Cs-Tyrode oldattal perfundáltuk. A pipettaoldatot [Ca²⁺]-járt (WinMaxC) 160 nM-ra állítottuk.

Az NCX áram meghatározásával kapcsolatos protokollok

I_{NCX} mérése RAMP protokollal. Egészsejtes patch clamp technikát alkalmaztuk. A sejtet K^+ -mentes oldattal perfundáltuk, amely a Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , és NKA áramok gátlása céljából 20 μM ouabaint, 1 μM nizoldipint és 50 μM lidokaint tartalmazott. A $[Ca^{2+}]_{pip}$ -et a $CaCl_2$ és EGTA/BAPTA koncentrációk változtatásával a WinMaxC-vel eltér $[Ca^{2+}]_{pip}$ értékekre (55, 140, 500 és 1000 nM) állítottuk be. Az NCX áramot ramp pulzusokkal (-40 +60 -100 -40 mV) határoztuk meg. A kifelé/befelé irányuló NCX áramokat a ramp leszálló szárán, +40/-80 mV értékeknél olvastuk le, kontroll, majd $NiCl_2$ tartalmú oldatban. Az I_{NCX} -et a Ni^{2+} -érzékeny különbségi árammal jellemeztük. Ha az NCX gátlás nagyságát is meg kívántuk határozni, a kontroll mérést követően az áramokat SEA0400 vagy ORM10103, végül 10 mM $NiCl_2$ jelenlétében újra megmértük. A gátlás mértékét a gátlószer-indukált és gátlószer + Ni^{2+} indukált áramcsökkenések hányadosával jellemeztük.

A SEA0400-/ORM-10103 érzékeny áram meghatározása. A normál körülmények között, illetve I_{NaL} aktiváció követően mért SEA0400-/ORM10103-érzékeny áramok mérésekor a Na^+ , Ca^{2+} és NKA áramokat nem gátoltuk. Parancspotenciálként tipikus kamrai AP-t használtunk. A SEA0400-/ORM10103-függő áramokat különbségi áramként határoztuk meg. Az NCX által szállított töltésmennyiséget is kiszámoltuk.

Az I_{NaL} és $revI_{NCX}$ egyidejű mérése. A pipettaoldat 15 mM NaCl-ot tartalmazott. A Ca^{2+} -aktivált Cl^- ($I_{Cl(Ca)}$) áramot 100 μM nifluminsavval gátoltuk. A I_{NaL} és $revI_{NCX}$ meghatározására -80 -20 +40 mV feszültségeket alkalmaztunk. A kezeletlen csoportban a teljes áramot mértük, ezután veratridin, majd $NiCl_2$ alkalmazását követően a méréseket megismételtük. A SEA0400 csoportban a sejteket SEA0400-zal el kezeltük. Az I_{NCX} -et mindkét csoportban a maximum (kontroll) - minimum (Ni^{2+} kezelt) áramokhoz viszonyítva, relatív értékben adjuk meg.

Az I_{CaL} és $fwdI_{NCX}$ egyidejű mérése. A méréseket Cs-Tyrode oldatban végeztük. A pipettaoldat 5 mM NaCl-ot tartalmazott a $revI_{NCX}$ minimalizálására. A pipettaoldat $[Ca^{2+}]$ -ját nem puffereltük. Az I_{CaL} -et -80 0 mV feszültségugrással aktiváltuk. A farokáramot -80 mV-on határoztuk meg. A kezeletlen csoportban mért áramot összehasonlítottuk a forskolin-stimulált csoportban mért árammal. Az ORM10103 csoportban ORM10103 el kezelést követően alkalmaztuk a forskolin stimulációt.

4.6. Kontrakció (sejtrövidülés) mérése

A sejtrövidülést video éldetektor rendszerrel mértük. A mérés alapelve az izotóniás kontrakció következtében elmozduló sejthatárok dinamikus követése a video képen kijelölt két rasztervonalon mért fényintenzitás-értékekből a sejthatárokat jellemző fekete-fehér, illetve fehér-fekete átmenetek pozíciójának meghatározásával. A harántcsíkoltatból adódó mérési hibák minimalizálása céljából a baloldali ablakban az első, a jobboldaliban az utolsó átmenet pozíciója kerül rögzítésre. A kontrakció-indukált sejthossz-változást relatív skálán, a diasztolés hosszra normálva adjuk meg.

4.7. További mérési technikák

Immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia. Izolált szívizomsejteket acetonnal fixáltunk. Immunfestés el tt a mintákat kalciummentes foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban rehidráltuk, majd 1% albumin tartalmú PBST oldatban rögzítettük. Az indirekt immunfluoreszcens festést 1:50 hígítású nyúl poliklonális anti-SK2 primer antitesttel, illetve 1:1000 hígítású Alexa Fluor 448 jelölt konjugált kecske anti-nyúl IgG szekunder antitesttel végeztük. A kontroll mintákat csak másodlagos antitesttel inkubáltuk. Mikroszkópos vizsgálatok céljára a sejteket Aqua Poly/Mount-ban rögzítettük. Az immunfestett fluoreszcens minták képeit normál paraméterbeállítás mellett, konfokális mikroszkóppal rögzítettük.

Proteinminták és Western blot analízis. Kutya és patkány kamraszövetből, illetve szívizomsejtekből készített egészsejtes lízátumot használtunk. A mintákat Lysis puffer + proteázinhibitor koktélaban Polytron-nal homogenizáltuk és centrifugáltuk. A proteinkoncentrációt a felülúszót leválasztva, BSA standard mellett, Löwry módszerrel mértük. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist akrilamid/bis-akrilamid gélben végeztük. A frakcionált proteineket transzfer pufferben, polivinilidén-difluorid membránra vittük föl. A nonspecifikus kötődés elkerülésére a blotokat rögzítettük és a célantigéneket primer antitesttel, nyúl poliklonális anti-SK2, illetve egér monoklonális -szarkomer-aktinnal jelöltük. A primer antitest kötődését tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl/anti-egér szekunder antitesttel ellen rítjük, majd javított kemilumineszcencia esszével tettük láthatóvá. Az optikai denzitásokat Image J és Excel software-ek segítségével analizáltuk.

Ca²⁺ fluxusok meghatározása SR membrán vezikulumokban. Kutya bal kamrából nehéz SR vezikulumokat és RyR2 csatornákat izoláltunk, majd a vezikulumokat Ca²⁺-mal feltöltöttük. A Ca²⁺ kiáramlás sebességét extravezikuláris [Ca²⁺] mérésel becsültük abszorpciómérésre konfigurált fluorométerrel. Az abszorbanciaváltozást (A₇₁₀-A₇₉₀) a leolvasott transzmittancia értékekből számoltuk ki. A vezikulumokat szuszpendáltuk – a végső protein koncentráció ~ 260 mg/mL volt – majd Ca²⁺-mal, aktívan feltöltöttük. A felvételt ATP hozzáadásával indítottuk el. A SEA0400 SR-Ca²⁺ felszabadulásra gyakorolt hatását két különböző módszerrel vizsgáltuk:

(1) „No inhibition” protokoll. Az ATP-ADP konverzió befejezését követően újabb Ca²⁺ dózist adtunk, ami az extravezikuláris [Ca²⁺] 20 mM-ra emelésével aktiválta a Ca²⁺ felszabadulást. A Ca²⁺ kiáramlás sebességét a SEA0400 alkalmazása előtt és után ismételtelen meghatároztuk és összehasonlítottuk.

(2) „No activation” protokoll: Alkalmazása során a kívülről bevitt Ca²⁺ mennyisége jóval kevesebb, az extravezikuláris [Ca²⁺] 2 mM-ra emeléséhez elegendő volt, így a bazális Ca²⁺ kiáramlás minimalizálódott. Ezt követően alkalmaztuk a SEA0400-at, hogy kiderüljön, fokozza-e az NCX gátlás a Ca²⁺ felszabadulást.

A vezikulumok Ca²⁺ tartalmát Ca²⁺ ionofor alkalmazásával határoztuk meg. Az extravezikuláris [Ca²⁺] kalibrálására hasonló eljárást alkalmaztunk, ATP hozzáadása

nélkül. A kalibráció a $[Ca^{2+}]$ lépcsőzetes emelését követően leolvasott A_{710} - A_{790} értékeken alapult. A szabad $[Ca^{2+}]$ -kat az abszolút stabilitási konstansok és a Fabiato & Fabiato által publikált számítógép-program segítségével számoltuk ki.

A SEA0400 a Ca^{2+} felvétel kezdeti sebességére gyakorolt hatását könnyű SR vezikulumokon, a fentihez hasonló módon vizsgáltuk, de a vezikulumokat először a SEA0400 adott koncentrációjával inkubáltuk. A Ca^{2+} felvételt ATP hozzáadásával indítottuk, ezután adtuk hozzá a Ca^{2+} -t. A Ca^{2+} felvétel sebességét a leolvasott intenzitás-változások lineáris regresszióval számolt meredekségéből határoztuk meg.

4.8. Szívbetegség modellek

LQT3 aritmia modell. szívműködésben és szövetpreparátumokban LQT3-ra jellemző változásokat (Ca^{2+} túltelítés, spontán diasztolés Ca^{2+} felszabadulás, APD megnyúlás) generáltunk az $I_{Na,L}$ aktiválásával, és vizsgáltuk az NCX gátlás hatásait ezekre. A $I_{Na,L}$ -indukált AP diszperzió növekedést is meghatároztuk Purkinje + kamraszövet preparátumokban és elemeztük az NCX gátlás hatását. A méréseket 33 kísérleti csoporton 11 protokoll használatával végeztük.

Szimulált iszkémia/reperfúzió modell. 4 kísérlet sorozatot végeztünk: (1) sejtülélesi mérések; (2) NADH mérések; (3) Ca^{2+} tranzienst mérések; illetve (4) „single cell” AP mérések. Az NCX maximális, de még szelektív gátlása érdekében $10 \mu M$ ORM-10103 dózist használtunk. Ebben a koncentrációban alkalmazva a gátlószert további ioncsatornákon érzékelhető hatást (kivéve minimális I_{Kr} gátlást) nem mutat.

NADH mérések: Mivel a NADH önmagában is fluoreszcens, a kísérleteket natív, festékkel fel nem töltött sejteken végeztük. Két kísérleti csoportot alakítottunk ki. Az időkontroll csoportban a sejteket oxigénnel telített Tyrode oldattal perfundáltuk. A második sejtcsoportot alávetettük az iszkémia/reperfúzió protokollnak.

Ca^{2+} tranzienst mérések. A méréseket Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens festékkel (Fluo 4-AM) feltöltött sejteken végeztük, öt kísérleti csoportban. Az időkontroll sejteket végig normoxiás oldattal szuperfundáltuk. A kezeletlen sejteken alkalmaztuk az I/R protokollt. Az ORM-10103 sejteket a kontroll periódus végén ORM-10103-mal kezeltük. A negyedik és ötödik csoportok a második, illetve harmadik csoporttal megegyeztek, azzal a különbséggel, hogy ezeket a sejteket a $revNCX$ aktivitás fokozása érdekében strophantidint tartalmazó oldattal szuperfundáltuk.

AP mérések: Három kísérleti csoportot képeztünk. A protokollok azonosak voltak a CaT mérések első három csoportjának protokolljaival (időkontroll, kezeletlen, ORM-10103 kezelt), de a méréseket natív, festékkel fel nem töltött sejteken végeztük.

Sejtülélesi kísérletek: Két kísérleti csoportot alakítottunk ki. Az I/R protokollok azonosak voltak az AP mérésekben alkalmazott protokollokkal (natív, kezeletlen és ORM-10103 kezelt sejtek). Mivel a normoxiás sejtülélesi legalább 1 óráig csaknem 100% volt, időkontroll (TC) mérésekre nem került sor.

Regionális iszkémia/reperfúzió modell. Regionális iszkémia kialakítása céljából a baloldali anterior descendens koronária artéria (LAD) köré hurkot képeztünk. A bal kamrába vízzel töltött latex ballont vezetünk (végdiasztolés nyomás 4-8 mmHg). A hatóanyagok, illetve hordozó perfúzióját 5 perccel a LAD okklúziója el tt indítottuk és a protokoll alatt végig fenntartottuk. A szíveket 6 randomizált kísérleti csoportba osztottuk: a szíveket a kontroll (CON) csoportban kizárólag a hordozót (DMSO), három csoportban egyetlen gátlószert, cariporidot (CAR); SEA0400-at (SEA) vagy ORM-10103-at (ORM), két csoportban az NHE és NCX gátlószerek kombinációját (SEA+CAR), illetve (ORM+CAR) tartalmazó oldattal perfundáltuk. Az I/R-indukált aritmiákat a LAD hurok megszorításával, majd felengedésével indukáltuk. A sikeres leszorítást a koronáriaáramlás szignifikáns csökkenése igazolta. Azokat a szíveket, amelyek áramlása > 65% csökkenést mutatott, vagy amelyekben az iszkémia alatt alakultak ki aritmiák, kizártuk. A sikeres reperfúziót azonnali áramlásnövekedés igazolta. A regisztrált LVP és ECG görbék off-line analízisével meghatároztuk a sinus-ritmussal (SR), halmozott extraszisztolával (ES), kamrai tachycardiával (VT), és kamrafibrillációval (VF) jellemezhető periódusok időtartamát és gyakoriságát. A fibrilláció kialakulását az egyedi QRS komplexek hiánya igazolta.

4.9. Anyagok

A vegyszereket, néhány kivétellel a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk. Minden végső oldatot a kísérlet napján frissen készítettünk. Az apamint 50 mM-os ecetsavban, a BaCl₂-ot desztillált vízben, az AVE-0118-at, a HMR-1556-ot és a dofetilidet DMSO-ban oldottuk. Az inaktív és aktív CaMKII gátlókat (KN-92 és KN-93), illetve a SEA0400-at, cariporidot, ORM-10103-at, és a Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékeket (Fura 2-AM és Fluo 4-AM) szintén DMSO-ban oldottuk. Az apamint -20 °C-on, a DMSO-ban oldott hatóanyagok törzsoldatait 4 °C-on tároltuk. A DMSO koncentráció a törzsoldatban, illetve a hígított végső oldatokban 5% és 0.01% volt. 0.01% koncentrációban a DMSO szívizomsejtekre gyakorolt hatását általában elhanyagolhatónak tekintik.

4.10. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

Az optikai (fluoreszcens) jelek korrekciója és normalizálása. A Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festékkel feltöltött szívizomsejteken mért fluoreszcenciaintenzitásokból a nemspecifikus artefaktorokat (háttérfluoreszcencia, bleaching, leakage) az adatfeldolgozás során el kell távolítani. A háttérfluoreszcencia mindenkori mértékét a sejt látótérből kimosogatásával lehet megbízhatóan megbecsülni. A festékvesztés (leakage) és a lassú fakulás (bleaching) együttes hatása időkontroll kísérletekben közelítően megbecsülhető. Mivel a szívizomsejtek mérete (térfogata) rendkívül nagy variabilitást mutat, festéktartalmuk azonos [Ca²⁺]_i esetén is jelentősen különbözik, ami megnyilvánul a mért optikai jelek nagyságában is. A fluoreszcenciaintenzitások festéktartalom eltérései miatt kialakuló túl nagy standard deviációjának elkerülése céljából a mért nyers fluoreszcencia értékeket a kontroll periódusra normáltuk.

Rövid távú APD és CaT variabilitások meghatározása. Az APD_{90} , APD_{25} és CaT amplitúdó rövid távú „beat-to-beat” variabilitását a steady-state intervallumból kiválasztott 50 egymást követő AP, vagy (az átlagos CaT amplitúdóval normalizált) CaT kvantitatív elemzésével határoztuk meg az alábbiak szerint:

$$BVR_{ADP90} = (APD_{90;i+1} - APD_{90;i}) / (n_{\text{ütés}} \times 2)$$

$$BVR_{ADP25} = (APD_{25;i+1} - APD_{25;i}) / (n_{\text{ütés}} \times 2)$$

$$BVR_{CaT} = (CaT_{\text{amplitúdó};i+1} - CaT_{\text{amplitúdó};i}) / (n_{\text{ütés}} \times 2) \times \text{átlagos CaT}_{TC \text{ amplitúdó}}$$

A Langendorff kísérletek kiértékelése. A fontosabb hemodinamikai paramétereket (CF, HR, LVSP, LVEDP, DP, $\pm dP/dt_{\text{max}}$) közvetlenül mértük, vagy a regisztrált nyomásgörbékbe 1 számoltuk, az ekvibrációs periódus, az el-kezelés, az iszkémiás és reperfúziós periódusok végén. A reperfúziós fázisra az értékeket aritmiamentes szívbe 1, vagy aritmiás periódusok közötti SR során határoztuk meg. A görbék analízisével azonosított aritmiák súlyosságát az aritmia típusa (ES, VF, VT), valamint az aritmiás periódusok gyakorisága és átlagos időtartama alapján döntöttük el. Mivel sok szívben a VF tartós, az ES és VT periódusok összehasonlított időtartama és gyakorisága függ a VF-mentes periódusok hosszától. Ezért az ES és VT periódusok időtartamát normalizáltuk a VF-mentes periódusok időtartamára (relatív gyakoriság és időtartam), továbbá, ha a VF összehasonlított időtartam kicsi volt, a VF periódusok névleges összehasonlított időtartamához 5 percenként növekvő, 1 és 7 közötti pontszámot rendeltünk.

Statisztikai analízis. A számításokat a Statistica program 9.0, vagy 7.0 verziójával végeztük. A meghatározott, a mérési artefaktokra szükség szerint korrigált adatokat *számítási átlag* \pm SEM formában adjuk meg. Két kísérleti csoport összehasonlítására a Student-féle páros/páratlan t-tesztet használtuk. Kettőnél több kísérleti csoport összehasonlítása esetén Bonferroni, vagy Tukey *post hoc* teszttel kiegészített, egy vagy több szempontú, a csoportok közötti varianciák homogenitásától függően parametrikus vagy nemparametrikus (Kruskal-Wallis) variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk. A kísérleti csoportokat szignifikánsan különböznek $p < 0.05$ esetben tekintettük. Amennyiben az eltérések egyértelműek voltak, de a kísérleti adatok túl nagy szórást mutattak, a szignifikancia határ közelében ($p < 0.1$) értékeket is jelöltük.

5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Ca^{2+}_i változások hatása a repolarizáló K^+ áramokra

5.1.1. Van-e fiziológiasan aktív SK2 csatorna egészséges szívizomban?

Kísérleti eredmények. Molekuláris biológiai mérésekkel igazoltuk, hogy az SK2 csatornaprotein expresszálódik kutya és patkány kamrai szívizomban, ugyanakkor közel fiziológias körülmények között SK csatorna aktivitás sem kutya, sem patkány kamrai/pitvari, sem pedig humán kamrai multicelluláris preparátumokban nem volt kimutatható, mivel a szelektív SK csatornagátló apamin sem különböző ingerlési frekvenciák esetén, sem gyöngített repolarizációs rezerv mellett nem befolyásolta az AP morfológiáját. Hasonlóan, izolált kamrai szívizomsejteken aktív SK-AS áram még igen magas (~900 nM) $[Ca^{2+}]_i$ mellett sem volt kimutatható.

Következtetések. Adataink megkérd jelezzik az SK csatornák aktív fiziológias szerepével és jelentőségével kapcsolatos irodalmi vélekedéseket. Méréseink szerint az SK csatornák szerepe kutya és patkány miokardium fiziológias repolarizációjában elhanyagolható. Eredményeink azonban nem zárják ki, hogy a fiziológias körülmények között „néma” SK csatornák – hasonlóan több más (pl. a K_{ATP}) csatornához – kóros állapotokban (Ca^{2+}_i túltelítés, szívelégtelenség, iszkémia/reperfüzió, pitvarfibrilláció) mégis aktiválódnak. Ha pedig – amint egyes újabb vizsgálati eredmények igazolni látszanak – az I_{SK} valóban szerepet játszik a kórosan átalakult, fibrilláló humán pitvar repolarizációjában, az eredmények támogatják azt az elképzelést, amely szerint az I_{SK} farmakológiai modulációja – mivel kamrai szívizomsejteken vélhetően nincs hatása – eredményesen alkalmazható pitvarfibrillációban. Eredményeink egy lehetséges alternatív értelmezése szerint a szívizomban található SK csatornák szerkezete – mivel nem mutatnak apamin érzékenységet – jelentősen eltérhet más szövetekben (pl. simaizom) található SK csatornák szerkezetétől.

5.1.2. A befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) Ca^{2+}_i függése

Kísérleti eredmények. Kutya kamrai szívizomsejteken igazoltuk, hogy a Ba^{2+} -függő árammal jellemzett, igen magas (~ 900 nM) $[Ca^{2+}]_{pip}$ mellett meghatározott I_{K1} jóval nagyobb a hasonló körülmények között alacsonyabb (~ 160 nM) $[Ca^{2+}]_{pip}$ mellett meghatározott I_{K1} -nél, még puffereletlen $[Ca^{2+}]_i$, azaz fiziológias CaT jelenléte esetén is. Igazoltuk továbbá, hogy a $[Ca^{2+}]_i$ -indukált I_{K1} emelkedés elsődleges oka a CaMKII aktiválódása. Multicelluláris preparátumokban a $[Ca^{2+}]_o$ 2 mM-ra emelését követően a CaT amplitúdója a $[Ca^{2+}]_{id}$ mérhető emelkedése nélkül jelentősen csökken, az APD₉₀ markánsan csökken; az I_{K1} gátlás APD₉₀ nyújtó hatása, az AP triangulációja, valamint az áram hozzájárulása a repolarizációs rezervhez lényegesen nagyobb magas $[Ca^{2+}]_o$ mellett. Hasonló, de kevésbé markáns változásokat figyeltünk meg humán papilláris izmokban;

Következtetések. Eredményeink igazolják a hipotézist, mely szerint kutya (vagy humán) szívben nem-adrenerg $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést követ en az I_{K1} megn , ami a miokardium aritmia-toleranciájának növekedéséhez vezethet. Patológias állapotokban a $[Ca^{2+}]_i$ tútel és által indukált I_{K1} növekedés – ami els dlegesen CaMKII aktiváción keresztül jön létre – a repolarizációs fázis rövidüléséhez és a repolarizációs rezerv kapacitásának növekedéséhez vezet, így a miokardium egyik *fiziológias* adaptációs mechanizmusa lehet. Minthogy a $[Ca^{2+}]_i$ tútel és ismerten el segíti az aritmogenezist, ez a hatás egy általánosabb, *endogén negatív feed-back mechanizmus* része lehet, amely limitálja a $[Ca^{2+}]_i$ tútel és proaritmiás hatásait.

5.2. Részleges NCX gátlás következményei egészséges szívizomban

5.2.1. Izolált kutya és patkány szívizomsejtek

Kísérleti eredmények. Igazoltuk, hogy kutya kamrai szívizomsejtekben az NCX gátlását (SEA0400 vagy ORM-10103) követ en a CaT morfológiája és így a sejtrövidülés mértéke, valamint az AP morfológiája sem változik; a koffein-indukált CaT lecsengési id tartama n , de jóval kisebb mértékben, mint $NiCl_2$ hatására. A SEA0400 forward és reverz NCX áramokra gyakorolt, alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett közel azonos mérték . igen jelent s gátlási hatékonysága meredeken csökken a $[Ca^{2+}]_i$ emelését követ en. Az I_{NCX} gátlása (SEA0400) nem befolyásolja az SR RyR2 csatornáinak Ca^{2+} leadását, illetve a Ca^{2+} visszavételét az SR lumenbe, sem pedig a kontraktilis proteinek Ca^{2+} -érzékenységét. Fenti eredményekkel ellentétben patkány kamrai szívizomsejtekben az NCX gátlást követ en a CaT amplitúdója, illetve a sejtrövidülés szignifikánsan, de mérsékelten n , viszont a $[Ca^{2+}]_{iD}$ növekedése, a diasztolés sejthossz csökkenés, valamint a CaT lecsengési id állandójának változása inszignifikáns. Az NCX gátlás feszültség-clamp protokoll mellett is növeli a CaT nagyságát és a sejtrövidülés mértékét, ugyanakkor csökkenti az $I_{Ca,L}$ amplitúdóját, és az inaktivációjához szükséges id tartamot.

Következtetések. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a jelent s mérték NCX gátlás ellenére, kutya (és humán) szív l származó szívizomsejtek, illetve multicelluláris preparátumok Ca^{2+} tranzienének, kontraktilitásának, illetve akciós potenciáljának fontosabb paramétereit sem a SEA0400 sem a szelektívebb ORM-10103 nem befolyásolja, viszont ezek a paraméterek patkányban mérsékelten (de szignifikánsan) változnak, tehát a gátlásra kapott válasz species-függ . Az eltérések legf bb oka a speciesek Ca^{2+} háztartása és akciós potenciálja közötti kvantitatív eltérésekben kereshet . Ezért szükséges folyamatosan hangsúlyozni, hogy az NCX gátlás következményeire vonatkozó, patkányokból és/vagy egerekb l származó adatok/következtetések humán viszonyokra rendkívül korlátozottan alkalmazhatók. Eredményeink más fontos következtetésekhez is vezettek. Egyrészt, egyértelm en kijelenthet , hogy az NCX szelektív gátlása komplex, többszint változásokat indukál a sejtek Ca^{2+} ciklusában; ezek háttérmechanizmusainak részletei feltárára várnak. Másrészt, eredményeink, bár indirekt módon, támogatják azt a hipotézist, mely szerint – mivel a gátlás hatására párhuzamosan csökken Ca^{2+} ki-, és

beáramlással egyidejűleg kialakuló CaT amplitúdónövekedés nem jár a $[Ca^{2+}]_{iD}$ hasonló mértékű, aritmogén emelkedésével – az NCX farmakológiai gátlása, mint egy komplex kezelés egyik eleme, potenciálisan nagy jelentőséggel bírhat egyes szívbetegségek (krónikus szívelégtelenség) jövőbeli terápiájában.

5.2.2. Van-e különbség a SEA0400 és az ORM-10103 hatásai között?

Kísérleti eredmények. Az általunk vizsgált körülmények között a két gátlószer hatásai megegyeztek. A SEA0400 0.3 μM koncentrációban az ORM-10103-hoz hasonlóan lényegében szelektívnek tekinthető. Az 1 μM koncentrációban mért mérsékelt $I_{Ca,L}$ gátló hatása ellenére sem a CaT és/vagy kontraktilitás, sem az AP paramétereiben nem kaptunk mérhető eltérést az ORM-10103 alkalmazását követően mért értékekhez képest. Az egyetlen különbség az ORM magasabb szelektivitása következtében elérhető nagyobb gátlási hatásokban nyilvánul meg, ami többek között a transzportált töltésmennyiségek eltéréseiben is megmutatkozik.

Következtetések. Eredményeink egyik igen fontos hozadéka, hogy visszamenőleg validálhatók számos korábbi, SEA0400 alkalmazásával nyert kísérleti eredmények és következtetések. Ugyanakkor hangsúlyozni kell, hogy a két NCX gátlószer hatásai között megfigyelt hasonlóság egyik alapvető oka az, hogy gátlási profiljuk, és a reverz/forward I_{NCX} -re gyakorolt gátlási hatékonyságaik aránya szempontjából is igen közel állnak egymáshoz.

5.3. Az NCX gátlás antiaritmiás hatásának analízise kísérletes szívbetegségekben

5.3.1. Fokozott készenléti iNa^+ áram ($I_{Na,L}$) esetén (LQT3 modell)

Kísérleti eredmények. Kutya kamrai szívműködésében az $I_{Na,L}$ aktiválása növeli az APD-t, a CaT amplitúdóját és félrelaxációs időtartamát, illetve a sejt rövidülést; ugyanakkor ezek a paraméterek – az I_{NCX} markáns gátlása ellenére – sem SEA0400, sem ORM-10103 alkalmazását követően nem változnak, egyetlen eltéréssel: ORM-10103 hatására – a hatékonyabb gátlás következtében – a CaT relaxációja lassul. Strophantidin provokáció esetén a CaT amplitúdója és drasztikusan emelkedik az aritmogén, diasztolés, lokális Ca^{2+} felszabadulások (sparkok) száma; ORM-10103 hatására ezek szinte teljesen eltűnnek. A SEA0400 alkalmazása nem befolyásolja az $I_{Na,L}$ nagyságát, de kivédi a magas $[Na^+]_i$ indukált másodlagos I_{NCX} növekedést. A $revI_{NCX}$ amplitúdója mind veratridin, mind ATX-II jelenlétében markánsan nő, de SEA0400 elkezelt kivédi az $I_{Na,L}$ indukált $revI_{NCX}$ növekedést is. Bár az $I_{Na,L}$ aktivációját követően az (outward) $revI_{NCX}$, és az (inward) fwI_{NCX} (illetve a különkülön transzportált töltésmennyiség) markánsan nő, a nettó töltéstranszport gyakorlatilag változatlan marad. Kontroll körülmények között a SEA0400 és az ORM-10103 hatása a két NCX áramkomponens paramétereire közel azonos, ugyanakkor az $I_{Na,L}$ aktiválását követően a SEA-, illetve ORM-10103 érzékeny áramok amplitúdója és kinetikája is jelentősen eltér, továbbá a nettó transzportált töltésmennyiség markánsan különbözik. Az NCX gátlás önmagában minimálisan

befolyásolja a ($f_{wd}I_{NCX}$ -re jellemző) farokáram nagyságát, viszont jelentősen csökkenti a forskolin-indukált $f_{wd}I_{NCX}$ növekedést. A szelektív NCX gátlás – a Ca^{2+} -homeosztázis fontos paramétereire gyakorolt jelentős védő hatással szemben – sem elöl, sem utókezelésként alkalmazva nem csökkentette az $I_{Na,L}$ aktiváció APD-nyújtó hatásának mértékét, illetve nem gátolta AP diszperziót növelő hatását sem.

Következtetések. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a $revI_{NCX}$ közvetlen, kétirányú kapcsolatot biztosít az $I_{Na,L}$ és a Ca^{2+}_i háztartás között, mivel a $[Na^+]_i$ emelkedés indukált, $revI_{NCX}$ -mediált $[Ca^{2+}]_i$ túlterhelés, a kísérleti felállástól függően, eredményesen csökkenthető/megfordítható az I_{NCX} szelektív, részleges gátlásával. Az abnormális $revI_{NCX}$ -mediált aktivitás (*trigger oldallal*) gátlásával a mérési adatok meggyőzően igazolják az I_{NCX} blokádnál antiaritmiás hatékonyságát Ca^{2+}_i túlterhelés során. Ebből következően a szelektív NCX gátlás ígéretes stratégia lehet a szív Ca^{2+}_i túlterhelés indukált, $revI_{NCX}$ -mediált aritmiáival szemben.

A fenti, pozitív eredményekkel szemben nem sikerült kimutatnunk az I_{NCX} gátlás hatékony antiaritmiás hatását az $I_{Na,L}$ indukált APD-megnyúlásra és AP diszperzió fokozódására (*szubsztrát oldallal*), még azokban a speciális esetekben sem, amikor ezeket farmakológiai eszközökkel megnöveltük. Végül pedig az tény, hogy Ca^{2+}_i túlterhelés esetén nagyfokú $f_{wd}I_{NCX}$ gátló hatást is megfigyeltünk, egyrészt részleges magyarázatot adhat a szelektív NCX gátlás AP paraméterekre vonatkozóan megfigyelt hatástalanságára, másrészt még jobban alátámasztja a $revI_{NCX}$ gátlás kitüntetett szerepét az NCX gátlás antiaritmiás hatékonyságában.

5.3.2. Szimulált iszkémiában

Kísérleti eredmények. A túlélési kísérletekben a szívizomsejtek 20 perces mérsékelt iszkémia alatt (low-flow iszkémia modell) nem szenvednek irreverzibilis károsodást, az elpusztult sejtek száma elhanyagolható; ugyanakkor a 15 perces reperfúziós fázis végére a kezeletlen szívizomsejtek 71%-a súlyosan károsul (kontraktúra alakul ki), ezzel szemben az ORM-10103 kezelt sejtek mindössze 47%-a kerül kontraktúrába.

Normoxiás körülmények között az NCX gátlás hatására a sem a CaT amplitúdója, sem lecsengési kinetikája nem mutat mérhető változást. *Strophanthin-el* kezeletlen sejtekben (low-flow modell) a CaT amplitúdója az időkontrollhoz képest csak az iszkémia kezdeti fázisában mutat eltérést, meredeksége viszont az iszkémia alatt folyamatosan csökken, de a reperfúzió során helyreáll. Az NCX gátlás hatására a CaT amplitúdója fokozatosan, reperfúzió során jelentősen csökken; meredekségének iszkémia alatti változásait a kezelés nem befolyásolja, de – a kezeletlen sejtekkel ellentétben – reperfúzió alatt jelentősen tovább csökken. Kezeletlen sejtekben az iszkémia hatására a $[Ca^{2+}]_{ID}$ jelentősen emelkedik a CaT relaxációja lassul, de a reperfúzió végére mindkét paraméter helyreáll. NCX gátlás hatására a későbbi iszkémiás és a reperfúziós fázisokban a relaxáció jelentősen csökken, viszont a kezelés a $[Ca^{2+}]_{ID}$ emelkedést nagyrészt kivédi, sőt, a $[Ca^{2+}]_{ID}$ a későbbi iszkémiás és reperfúziós fázisokban a kontrollhoz képest is csökken. A CaT variabilitásában lényeges I/R indukált változás ezekben a sejtekben nem jön létre; a CaT variabilitása

NCX gátlás hatására sem mutat mérhető változást. *Strophanthin-el* kezelt sejtekben (no-flow modell) a CaT amplitúdója az I/R ciklus során nem változik, merevedése fokozatosan csökken. Az I/R ciklus során a relaxációs idő mérhetően nem változik, viszont az iszkémia során kialakuló $[Ca^{2+}]_{ID}$ emelkedés jóval nagyobb, mint *strophanthin-el* kezeletlen sejtekben és a reperfúziós periódus során végig magas marad. A CaT rövid távú variabilitása az iszkémia alatt jelentősen nő, a reperfúzió alatt drasztikusan még tovább emelkedik. Az NCX gátlás a CaT merevedésének I/R alatti csökkenését nem befolyásolja, viszont a relaxációs idő a reperfúzió alatt jelentősen csökken. ORM-10103 hatására a markáns I/R indukált $[Ca^{2+}]_{ID}$ emelkedés és CaT variabilitás-fokozódás elmarad.

Normoxiában az NCX gátlás hatására sem az AP amplitúdója, sem a nyugalmi potenciál nem változik, de az APD kismértékben rövidül. Iszkémia hatására az AP amplitúdója és platópotenciálja csökken, a nyugalmi potenciál depolarizálódik; reperfúzió során ezek a paraméterek jórészt helyreállnak. NCX gátlás az iszkémia-indukált változások nagyságát és helyreállítását nem befolyásolja. Iszkémia alatt az APD₂₅ csökken, reperfúzió alatt helyreáll; ORM-10103 kezelt sejtekben jóval nagyobb iszkémia-indukált APD₂₅ csökkenés jön létre, ami a reperfúzió alatt sem normalizálódik. Az APD₉₀ értékekben hasonló, de még nagyobb iszkémia-indukált rövidülés alakul ki, de a két csoport között az I/R ciklus során nem látható eltérés. Iszkémia hatására az AP trianguláció jelentősen csökken mind a kezeletlen, mind az ORM-10103 kezelt csoportban, de a csoportok közötti különbség nem szignifikáns. Az APD variabilitások normoxia alatt mindkét csoportban hasonlóak; az I/R ciklus során az egyetlen jelentős változás a kezeletlen csoportban a reperfúzió alatti APD₉₀ variabilitás-fokozódás, ami ORM-10103 elkezélést követően nem alakul ki.

Következtetések. Bár az elvégzett egyszerű túlélési kísérletek a jelentős védő hatás mechanizmusára vonatkozóan nem adnak magyarázatot, azt egyértelműen igazolják, hogy szelektív NCX gátlás jelentősen csökkenti az izolált szívizomsejtek poszt-iszkémiás, reperfúzió-indukált károsodásait, és ezáltal markánsan csökkentheti a reperfúzió-indukált szövetkárosodások mértékét az akut miokardiális infarktus széli zónájában is, jelentősen javítva a szívizomsejtek túlélését.

Az elzárkózottakhoz hasonlóan, ezekben a kísérletekben is egyértelműen igazoltuk, hogy az NCX gátlás hatékonyan kivédi a $[Ca^{2+}]_i$ homeosztázis I/R-indukált aritmogén perturbációit, mivel markánsan csökkenti a $[Ca^{2+}]_i$ túlterhelést és megakadályozza a $[Ca^{2+}]_{ID}$ emelkedését. Ezenkívül az ORM-10103 kezelés helyreállítja a CaT reperfúzió-indukált stabilitás-csökkenését (amit a fokozott variabilitás mutat). Ez a jótékony, kardioprotektív hatás – ugyancsak az elzárkózottakhoz hasonlóan – elsősorban a $[Na^+]_i$ -aktivált, felgyorsult $_{rev}$ NCX transzportaktivitás gátlásának tulajdonítható. Eredményeink ugyancsak megerősítik az elzárkózottak megfigyelésünket, mely szerint az AP morfológiájának markáns változásával járó patomechanizmusokban (I/R) a szelektív NCX gátlás jótékony, antiaritmias hatékonyságát behatárolhatja/limitálhatja a gátlás az AP morfológiájában kialakuló, jelentősen aritmogén eltérésekkel szembeni hatástalansága.

5.3.3. NCX, NHE és NCX+NHE gátlás antiaritmias hatásainak összehasonlítása izolált regionális I/R szívmodellben

Kísérleti eredmények. A szív el kezelése a hordozó DMSO-val, egy NCX, vagy NHE gátlószerral, vagy ezek kombinációjával kontroll állapotban a mért hemodinamikai paraméterek egyikében sem hoz létre jelentős változást. Iszkémia több paraméterben (CF, LVSP, DP, \pm dP/dtmax) nagymértékű csökkenést okoz a kontrollhoz képest, más paraméterek (HR, LVEDP) nem változnak; a reperfüziós fázis során a koronáriaáramlás (CF) helyreáll, viszont a LVSP, DP és \pm dP/dtmax lényegesen kontroll szint alatt marad, a LVEDP pedig minden kísérleti csoportban jelentősen emelkedik. A kontroll és teszt csoportok között jelentős különbség egyik kísérleti fázisban sem mérhető. Részleges NCX gátlás hatására mérsékelten csökken a szabályos sinus ritmussal jellemezhető periódusok időtartama; SEA400 el kezelése gyakorlatilag nem befolyásolja, ORM-10103 el kezelése mérsékelten csökkenti a VF és VT periódusok időtartamát és kialakulási gyakoriságát. Mindkét gátlószert jelentősen csökkenti az ES epizódok gyakoriságát, még inkább átlagos időtartamát. Az NHE gátlás minden aritmiaparaméter tekintetében jóval hatékonyabb, mint az NCX gátlás; egyetlen fontos kivétel a halmozott ES-ek relatív időtartama. Különösen nagy volt az eltérés az NHE és NCX gátlás hatékonysága között, az elbővíjtés javára, a reentry típusú aritmiák vonatkozásában. Ha az NHE gátlószert egy NCX inhibitorral egyidejűleg alkalmazzuk, a SEA400 esetében nem javítja, az ORM-10103 esetében inkább rontja az NCX gátlás mérsékelt antiaritmias hatását. Különösen jól látható a negatív hatás az ES esetében, amikor az NCX gátlás kiemelkedően anti-ES hatása a kombinált csoportokban gyakorlatilag megszűnik.

Következtetések. Eredményeink igazolják, hogy a triggerelt aritmiák kialakulását, akár külön-külön, akár kombinációban, mindhárom gátlószert effektíven gátolja. Ugyanakkor a szelektív, részleges NCX gátlás – önmagában, vagy NHE gátlással együtt – jelenleg nem tekinthető optimális terápiás stratégiának a reperfüzió-indukált aritmiák teljes spektrumának kivédésére. Az alkalmazott NCX gátlók hatékonyan megelőzik az EAD-/DAD-indukált aritmiák kialakulását, ugyanakkor lényegében hatástalannak bizonyultak a reentry típusú aritmiákkal kialakulásával szemben. Önmagában alkalmazva, az NHE gátlás szélesebb spektrumú antiaritmias hatást mutatott, mivel markánsan csökkentette a reentry típusú aritmiák gyakoriságát és időtartamát is. Meglepő módon az NHE gátlás széles spektrumú antiaritmias hatása lényegében megszűnt, amikor azt egy NCX gátlószerral egyidejűleg alkalmazzuk.

Az NCX gátlás limitált antiaritmias hatékonyságának egyik alapvető oka az lehet, hogy az elérhető, viszonylag szelektív NCX gátlószerek – mivel mindkét transzportirányban közel azonos hatékonysággal, igen tartósan gátolják az NCX reverz és forward aktivitását – nem felelnek meg a követelményeknek. Ebből következően, a kombinált NCX + NHE gátlás tényleges terápiás potenciáljának megfelelő karakterizálása céljából első lépésként újabb, eltérő gátlási profilal rendelkező NCX gátlószerek, illetve ezekre alapozott vizsgálatok szükségesek.

6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1/a) Bár az SK2 csatornaprotein mind kutya, mind patkány szívizomban expresszálódik, multicelluláris preparátumokban, *fiziológiás körülmények között*, az AP *apaminra* még jelent sen gyöngfített repolarizációs rezerv mellett *sem érzékeny*. Kamrai szívizomsejtekben SK-AS áram magas $[Ca^{2+}]_i$ mellett sem mérhet .

1/b) Kutya kamrai szívizomsejtekben az I_{K1} szignifikánsan nagyobb magas $[Ca^{2+}]_i$, mint alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett, fiziológiás CaT esetén is. A CaMKII szelektív gátlása kivédi a $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés indukált I_{K1} növekedést. A $[Ca^{2+}]_o$ emelését követ en az I_{K1} gátlás APD₉₀ nyújtó hatása és az AP triangulációja szignifikánsan n . Hasonló irányú, de jóval mérsékeltőbb változások jönnek létre humán miokardiumban. A $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést követ en az I_{K1} relatív hozzájárulása a kamrai repolarizációs rezervhez ugyancsak jelent sen n .

2/a) Kutya kamrai szívizomsejtekben normoxiás körülmények között az NCX gátlás nem hoz létre szignifikáns változást sem az AP és a CaT morfológiájában, sem a sejt rövidülés mértékében. A gátlás a RyR2 csatornák Ca^{2+} leadását/felvételét, illetve a kontraktilis proteinek Ca^{2+} -érzékenységet sem módosítja. A $[Ca^{2+}]_i$ mérsékelt emelkedése viszont szignifikánsan csökkenti a gátlás hatékonyságát.

2/b) Patkány kamrai szívizomsejtekben normoxiás körülmények között NCX gátlás hatására a CaT amplitúdója és a sejt rövidülés mérsékelt en de szignifikánsan n , ezzel egyidej leg csökken az $I_{Ca,L}$ amplitúdója és az áram 50%-os inaktivációjához szükséges id tartam.

2/c) Az alkalmazott vizsgálati körülmények között a mérsékelt en szelektív SEA0400 és a jóval szelektívebb ORM-10103 hatásai gyakorlatilag megegyeznek. Ez az megfigyelés *visszamen leg validál* számos korábbi, a SEA0400 alkalmazásával nyert kísérleti eredményt és következtetést.

3/a) Kutya kamrai szívizomsejtekben az $I_{Na,L}$ aktivációját követ en a $revI_{NCX}$ és a $fwdI_{NCX}$ is n , de a nettó töltéstranszport alig változik; szelektív NCX gátlás nem befolyásolja az aktivált $I_{Na,L}$ nagyságát, az $I_{Na,L}$ -indukált APD₉₀ megnyúlás és AP diszperzió növekedés mértékét, a CaT morfológiáját, a sejt rövidülést, a $fwdI_{NCX}$ -et jellemz farkáram nagyságát, de hatékonyan kivédi a magas $[Na^+]_i$ indukált $revI_{NCX}$ fokozódást és szignifikánsan csökkenti a forskolin-indukált $fwdI_{NCX}$ növekedést.

3/b) Strophantidin provokáció esetén markánsan emelkedik a diasztolés Ca^{2+} sparkok száma, de szelektív NCX gátlással ez a növekedés szinte teljesen kivédhet .

4/a) Szimulált iszkémia/reperfúzió modellben, reperfúzió alatt, *strophantinnal nem kezelt* szívizomsejtekben (low-flow modell) NCX gátlás hatására a CaT amplitúdója és meredeksége, valamint az RT₅₀ szignifikánsan csökken; a gátlás az iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_{ID}$ emelkedés nagyságát szignifikánsan csökkenti. *Strophantinnal el kezelt* sejtekben (no-flow modell) az iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_{ID}$ emelkedés jóval nagyobb mérték ; a reperfúzió alatt a $[Ca^{2+}]_{ID}$ végig magas marad, továbbá a rövid távú CaT variabilitás is szignifikánsan n . Szelektív NCX gátlás hatására az I/R indukált drasztikus $[Ca^{2+}]_{ID}$ emelkedés nagyrészt elt nik és a jelent s variabilitás fokozódás is elmarad. Az I/R indukált nyugalmi potenciál, APD és rövidtávú APD variabilitás változásokat az NCX gátlás legtöbbször nem befolyásolja, esetenként csökkenti, de soha nem védi ki, vagy nem csökkenti jelent sen.

4/b) 20 perces mérsékelt iszkémia során (low-flow modell) a szívműködés nem szenvednek irreverzibilis károsodást, az elpusztult sejtek száma minimális; a 15 perces reperfüzió során viszont a kezeletlen sejtek 71%-a károsodik (kontraktúra). Ezzel szemben az ORM-10103 kezelt sejtek mindössze 47%-a szenved károsodást.

5/a) Regionális I/R protokoll alkalmazása esetén az izolált, perfundált patkányszív el kezelése NCX vagy NHE gátlóval, illetve ezek kombinációjával, nem okoz szignifikáns változást a mért hemodinamikai paraméterekben, továbbá a kísérlet egyik fázisában sem jön létre szignifikáns eltérés a *kontroll és teszt csoportok közt*.

5/b) Az NCX aktivitás gátlása csak kissé növeli a sinus-ritmussal jellemezhető periódusok időtartamát; nem befolyásolja, vagy csak mérsékelt csökkenti a VF és VT periódusok relatív időtartamát és kialakulásuk gyakoriságát; ugyanakkor a gátlás markánsan csökkenti az ES epizódok gyakoriságát, és átlagos időtartamát.

5/c) Az NHE gátlás szinte minden aritmia paraméter vonatkozásában hatékonyabb, mint a szelektív NCX gátlás; egyetlen kivétel a halmozott ES-ek relatív időtartama. Különösen nagy az eltérés a reentry jellegű aritmiák vonatkozásában.

5/d) Ha az NCX inhibitorral *egyidejűleg* NHE gátlószert is alkalmazunk, az nemhogy nem javítja, hanem sokszor rontja az NCX gátlás amúgy is igen mérsékelt antiaritmiai hatását.

KUTATÁSAINK JELENT SÉGE, TÁVLATAI

A Medline nem válaszol közvetlenül, de segít józannak maradnunk. Begépelve a kereső szót: *arrhythmia: 202 966; arrhythmia+heart: 128 919, calcium: 509 488; calcium+heart: 54 216* publikáció válik elérhetővé. Valamennyi publikáció összes szerzője állítja, hogy munkája rendkívül fontos. Én is. Hogy ez igaz-e, csak a jövő igazolhatja. *Addig is reménykedem: talán hozzájárultam egy csavarral a gépezethez.*

Egy kutató ne próbáljon jósolni – nem ért hozzá! Annál is inkább, mert bár sok-sok éve szívbetegségekkel foglalkozik, mégsem klinikus. Ami viszont kutatásaim során lesz róla bennem az, hogy a szív fantasztikusan megépített szerkezet. 80 év alatt ~ 10^8 dobbanás – szinte hiba nélkül. Igen sokat kell tenni, hogy elromoljon. Sajnos egyre gyakrabban sikerül.

Népességünk 50%-a szív és érrendszeri okokból hal meg – a kettő elválaszthatatlan. Az orvostudomány, bár a fejlődés kétségkívül óriási, folyamatosan lépéshátrányban van. A Ca^{2+} homeosztázis idő- és térbeli komplexitása, a párhuzamosan zajló folyamatok igen nagy száma és kritikus szerepe, a vizsgálati/terápiás módszerekkel szemben támasztott igények szükségesszerű maximalizmusa különösen nehezíti az NCX(Ca^{2+})_i-dependens szívbetegségek „egyszer és teljes – ... only a teaspoonful sugar and ...” jellegű gyógyítását.

A magam részéről jobban hiszek az okos megélésben. Nem én találtam ki, de én is vallom: egészséges életmód, racionális étkezés, mindennapos mozgás és – minden másnál inkább – az első számú önellenség a stressz minél teljesebb kiiktatása. Természetesen kellenek további eszközök is: a génhibák korrekciója, beépíthető eszközök, a szív és végül, de nem utolsó sorban: új és új típusú gyógyszerek és gyógyszerkombinációk. *Talán még NCX modulátorok is.*

7. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Szepesi J, Acsai K, Sebok Z, Prorok J, Pollesello P, Levijoki J, Papp JG, Varro A, Toth A Comparison of the efficiency of Na⁺/Ca²⁺ exchanger or Na⁺/H⁺ exchanger inhibition and their combination in reducing coronary reperfusion-induced arrhythmias *Journal of Physiology and Pharmacology* 66:(2) pp. 215-226. (2015)
2. Nagy N, Kormos A, Kohajda Z, Szebeni A, Szepesi J, Pollesello P, Levijoki J, Acsai K, Virag L, Nanasi PP, Papp JG, Varro A, Toth A Selective Na/Ca exchanger inhibition prevents Ca overload induced triggered arrhythmias. *British Journal of Pharmacology* 171:(24) pp. 5665-5681. (2014)
3. Kormos A, Nagy N, Acsai K, Vaczi K, Agoston S, Pollesello P, Levijoki J, Szentandrassy N, Papp JG, Varro A, Toth A Efficacy of selective NCX inhibition by ORM-10103 during simulated ischemia/reperfusion. *European Journal of Pharmacology* 740: pp. 539-551. (2014)
4. Nagy N, Acsai K, Kormos A, Sebok Zs, Farkas A, Jost N, Nánási PP, Papp JGy, Varró A, Tóth A [Ca²⁺]_i-induced augmentation of the inward rectifier potassium current (IK1) in canine and human ventricular myocardium. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 465:(11) pp. 1621-1635. (2013)
5. Nagy N, Marton Z, Kiss L, Varro A, Nanasi PP, Toth A Role of Ca²⁺-Sensitive K⁺ Currents in Controlling Ventricular Repolarization: Possible Implications for Future Antiarrhythmic Drug Therapy. *Current Medicinal Chemistry* 18:(24) pp. 3622-3639. (2011)
6. Toth A, Kiss L, Varro A, Nanasi PP Potential therapeutic effects of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition in cardiac diseases *Current Medicinal Chemistry* 16:(25) pp. 3294-3321. (2009)
7. Nagy N, Szűcs V, Horváth Z, Seprényi Gy, Farkas AS, Acsai K, Prorok J, Bitai M, Kun A, Pataricza J, Papp JGy, Nánási PP, Varró A, Tóth A Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47:(5) pp. 656-663. (2009)
8. Birinyi P, Toth A, Jona I, Acsai K, Almassy J, Nagy N, Prorok J, Gherasim I, Papp Z, Hertelendi Z, Szentandrassy N, Banyasz T, Fulop F, Papp JGy, Varro A, Nanasi PP, Magyar J The Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca²⁺ transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes *Cardiovascular Research* 78:(3) pp. 476-484. (2008)
9. Acsai K, Kun A, Farkas AS, Fülöp F, Nagy N, Balázs M, Szentandrassy N, Nánási PP, Papp JGy, Varró A, Tóth A Effect of partial blockade of the Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾-exchanger on Ca⁽²⁺⁾ handling in isolated rat ventricular myocytes *European Journal of Pharmacology* 576:(1-3) pp. 1-6. (2007)

8. SCIENTOMETRIAI PARAMÉTEREK

Tóth András tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2015.12.11.)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	40	---	---	---
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	---	37	441	606
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelv	---	1	9	9
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelv	---	2	0	0
rövid közlemény	---	0	0	0
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelv	---	0	0	0
magyar nyelv	---	0	0	0
Fels oktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkeszt ként	1	---	---	---
idegen nyelv	---	0	---	---
magyar nyelv	---	0	---	---
Fels oktatási tankönyv	---	1	---	---
III. Könyvrészlet	3	---	---	---
idegen nyelv	---	2	10	10
magyar nyelv	---	0	0	0
Fels oktatási tankönyvrészlet	---	1	0	0
IV. Konferenciaközlemény³	3	---	6	6
Oktatási közlemények összesen (II.-III.)		2	0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)⁴	47	---	466	631

V. További tudományos m vek	0	---	---	---
További tudományos m vek, ide érve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	0	0	0
Szerkeszt ségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Jelentés, guideline	---	0	0	0

VI. Idézett absztraktok⁵	5	---	7	7
--	---	-----	---	---

Összesített impakt faktor⁶	108,6	---	---	---
Idézettség száma^{1, 4}	---	---	473	638
Hirsch index¹	15	---	---	---

VII. Sokszer s vagy csoportos (multicentrikus) közlemény	0	---	---	---
a) Szerz ⁴	---	0	0	0
b) Kollaborációs közrem kód ⁴	---	0	0	0

Speciális tudánymetriai adatok	Adat
Els szerz s folyóiratcikkek száma	5
Utolsó szerz s folyóiratcikkek száma	9
Els és utolsó szerz ség folyóiratcikkek impakt faktor összege	44,1
Az utolsó tudományos fokozat/cím (PhD) elnyerése utáni (1999 -) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	32
impakt faktor összege	93,0
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	2
Az utolsó 10 év (2005-2015) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	24
impakt faktor összeg	75,4
idézések száma	372
A legmagasabb idézettség közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	76 (11,91%)
WOS/Scopus azonosítóval idézettség	556
Sokszerz s és/vagy csoportos közlemények impakt faktor összege	0
idézettsége	0
Folyóiratcikkek, 15-29 szerz vel	3

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom gimnáziumi tanárainknak, akik szakmai tudása és emberi hozzáállása indított el ezen a pályán. Különösen osztályfőnökömnek és magyar tanáromnak Gartner Évának, illetve matematika és fizika tanárainknak, Herczeg Jánosnak és Hubert Györgynének, kiktől nemcsak a tantárgyukkal kapcsolatos átfogó tudást, de életszemléletet, problémamegoldó gondolkodást és munkámmal szembeni igényességet is tanultam. Köszönöm rajtuk kívül valamennyi kiváló egyetemi tanáromnak, hogy a magas szintű ismeretek átadásán kívül hozzásegítettek az igényes tudományos gondolkodás és kísérletes munka alapjainak elsajátításához.

Hálás köszönettel tartozom Prof. Kovách Arisztidnek, első munkahelyi vezetőmnek, hogy fizikus létemre lehetővé tette bekapcsolódásomat az orvostudományi kutatások sűrűjébe, megszerettette velem az élettant és folyamatosan segített tudományos előrehaladásomban. Köszönettel tartozom Dóra Eörs, Ligeti László és Koller Ákos professzoroknak, Dr. Nádasy Györgynek, Dr. Gilányi Magdolnának, Dr. Ikrényi Kornéliának, Dr. Ivanics Tamásnak, Dr. Ruttner Zoltánnak, Dr. Bátkai Sándornak, Németh Gyulának, és minden budapesti kollegámnak, akik segítették tudományos vagy oktatói tevékenységemet.

Őszintén hálás vagyok Paul Johnson professzor úrnak, aki arizonai tanulmányutam alatt volt vezetőm és mentorom, aki ismeretlenül szavazott bizalmat nekem, és akitől talán a legtöbbet tanultam a tudományos kísérletes munka, publikációs tevékenység és kooperációs kapcsolatok minden vonatkozásában. Hálásan köszönöm maastrichti kooperációs partnereim, Robert S. Reneman, Dick Slaaf és Ger van der Vusse professzorok rendkívül hasznos és előremutató tanácsait, illetve külföldi utazásaim és kongresszusi részvételeim támogatását.

Különösen hálás vagyok Prof. Varró Andrásnak, kutatásvezetőmnek és jelenlegi munkahelyem igazgatójának mindazért, amit értem tett. A lehetőségért, hogy egy nehéz pillanatban maximálisan mellém állt és támogatott tudományos pályám újraindításában, hogy lehetővé tette önálló laboratórium kialakítását, munkacsoport szervezését, és minden lehetséges módon segítette tudományos tevékenységemet. Őszintén hálás vagyok Papp Gyula akadémikus úrnak sokoldalú támogatásáért és biztatásáért. Köszönettel tartozom Dr. Jost Norbertnek, Dr. Virág Lászlónak, Leprán István, Végh Ágnes, Hegyi Péter professzoroknak, Sebők Zsuzsannának, Molnárné Zsuzsának, Girst Gábornak és valamennyi szegedi munkatársamnak támogatásukért, ami nagymértékben hozzájárult itt végzett

kutatómunkám kiemelkedő eredményességéhez. Köszönöm Prof. Bari Ferenc dékán úrnak, hogy bevont Intézetének oktatási tevékenységébe.

Hálásan köszönöm Dr. Kékesi Violetta docens asszonynak folyamatos támogatását és felbecsülhetetlen segítségét a disszertáció összeállításában és véglegesítésében. Köszönöm Gábor Tímea biológus munkatársamnak az értekezés befejezéséhez nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom volt PhD hallgatóimnak, Dr. Nagy Norbertnek, Dr. Acsai Károlynak, Dr. Prorok Jánosnak, Dr. Kormos Anitának, Szepesi Juditnak, továbbá minden előző és jelenlegi TDK hallgatómnak, akik szakmai elkötelezettsége és szorgalma nélkülözhetetlen volt a dolgozatba foglalt eredmények eléréséhez.

Köszönettel tartozom Prof. Nánási Péternek, Dr. Bányász Tamásnak, Dr. Szentandrásy Norbertnek és valamennyi debreceni partneremnek a sikeres kooperációkért és gyakorlati segítségükért.

Hálás vagyok feleségemnek Mártának, türelméért, lemondásáért és feltétlen támogatásáért, amivel sokat segített tudományos pályafutásom nehéz időszakaiban. Köszönettel tartozom szüleimnek, akiktől emberi tisztességet és őszinte szeretetet tanultam, testvéremnek és lányomnak, akik mindig, minden körülmények között támogattak és akik folyamatos biztatása nélkül még rögzőbb lett volna számomra a kutatói pálya.