

AZ ANTIARITMIÁS ÉS PROARITMIÁS HATÁSOK MECHANIZMUSÁNAK CELLULÁRIS SZINTŰ VIZSGÁLATA EMLŐSSZÍVEKBEN

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

JOST NORBERT LÁSZLÓ



**Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
és
MTA-SZTE Keringésfarmakológiai Kutatócsoport**

Szeged

2019

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	I
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	IV
PREAMBULUM	1
BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
A téma indokoltsága és a szakmai indíttatásom	3
AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖREINEK IRODALMI HÁTTEREI	9
1. és 2. témakör: <i>Különböző antiaritmiás szerek celluláris hatásainak valamint a repolarizáló K^+-áramok és a repolarizációs rezerv vizsgálata emlősszíveken</i>	9
A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és azt meghatározó ionáramok	9
A „régí” antiaritmiás gyógyszerek proaritmiás mellékhatásainak felfedezése, és a modern, elsősorban <i>multichannel</i> jellegű, ún. „amiodaron-szerű” gyógyszerek iránti igénynek a megfogalmazása	11
A szívizom repolarizációjában részt vevő különböző káliumcsatornák kölcsönhatásainak vizsgálata emlős kamraizmon - a repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége	13
3. témakör: <i>A pitvarfibrillációs remodelling celluláris hatásmechanizmusainak vizsgálata emlősszíveken</i>	15
4. témakör: <i>Az NCX gátlás lehetséges antiaritmiás hatásmechanizmusának vizsgálata emlősszíveken</i>	22
CÉLKITŰZÉSEK	27
MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK	28
Vizsgált speciesek és etikai engedélyek	28
<i>Kísérletes állatok</i>	28
<i>Emberi preparátumok</i>	28
Szívizomsejtek izolálása	29
<i>Kísérletes állatok szívizomsejtjeinek izolálása</i>	29
Kutya kamrai és pitvari sejtek izolálása	29
Nyúl és tengerimalac kamrai sejtek izolálása	31
Emberi kamrai és pitvari szívizomsejtek izolálása	31
Izolált multicelluláris preparátumok	32
Elektrofiziológiai vizsgálati módszerek	32
<i>Árammérési protokollok izolált szívpreparátumokon</i>	32
Mérések „whole cell” patch-clamp technikával	32
Single-channel mérések	37
<i>Akciós potenciál mérések</i>	38
Akciós potenciálmérések multicelluláris preparátumokon	38
Lassú válasz akciós potenciálok mérése	39
Izolált sejtés akciós potenciál mérés <i>current-clamp</i> módban:	39
<i>EKG mérés izolált perfundált (Langendorff) tengerimalac szíven</i>	39

<i>Egyéb nem elektrofiziológiai mérési technikák</i>	40
mRNS szintek meghatározása qPCR technikával	40
Immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia	41
Proteinminták és Western blot analízis	41
Anyagok	42
Adatfeldolgozás és statisztikai analízis	43
EREDMÉNYEK.....	44
1. témakör. Különböző antiaritmiás szerek celluláris hatásainak vizsgálata emlősszíveken.....	44
<i>Különböző I/A antiaritmiás szerek vizsgálata nyúl kamrai szívműködéseken</i>	44
<i>A dronedaron (SR-33589) elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata kutya kamrai szívműködés preparátumokon</i>	46
<i>A tedisamil (KC-8857) elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata emlősszívekből izolált kamrai szívműködéseken</i>	55
<i>Az amiodaronszerű GYKI-16638 vizsgálata emberi szívműködés preparátumokon</i>	60
2. témakör. A szívműködés repolarizációjában részt vevő különböző K^+ -csatornák közvetlen hatásának vizsgálata. A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége emlős kamrákban	63
<i>A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége a kamrai aritmogenezisben</i>	63
<i>Az R-L3 vegyület optikai enantiomerjei eltérő módon modulálják az I_{Ks} áramot nyúl és tengerimalac kamrai szívműködésben</i>	73
<i>A dilatatív cardiomiopátia módosítja a $Kir2.x$ ioncsatornákat kódoló gének expressziós szintjét</i>	76
<i>Az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggő szerepének a vizsgálata kutya kamrai akciós potenciálban</i>	81
3. témakör. A pitvarfibrillációs remodelling celluláris hatásmechanizmusainak vizsgálata emlősszíveken.....	85
<i>A G-protein által szabályozott acetilkolin-szenzitív káliumáram ($I_{K,ACh}$) konstitutíven aktív permanens pitvarfibrilláló betegekben</i>	85
<i>Repolarizáló káliumáramok tulajdonságainak vizsgálata szinuszritmusú és pitvarfibrilláló kutyákból izolált pitvari szívműködéseken</i>	92
4. témakör. Az NCX gátlás lehetséges antiaritmiás hatásmechanizmusának vizsgálata emlősszíveken.....	97
<i>Az ORM-10103 és GYKB-6635, új kísérletes szelektív NCX ioncsatorna gátló-vegyületek hatásainak vizsgálata emlősszíveken (kutya és tengerimalac szívpreparátumokon)</i>	97
<i>Az NCX áram gátlása SEA-0400 vegyülettel szinuszritmusos és permanens pitvarfibrilláló betegekben</i>	108
MEGBESZÉLÉS	114
1. témakör. Különböző antiaritmiás szerek celluláris hatásainak vizsgálata emlősszíveken.....	114
<i>Különböző I/A antiaritmiás szerek vizsgálata nyúl kamrai szívműködéseken</i>	114
<i>A dronedaron (SR-33589) elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata kutya kamrai szívműködés preparátumokon</i>	116
<i>A tedisamil (KC-8857) elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata emlősszívekből izolált kamrai szívműködéseken</i>	119
<i>Az amiodaronszerű GYKI-16638 vizsgálata emberi szívműködés preparátumokon</i>	121

2. témakör. A szívizom repolarizációjában részt vevő különböző K^+ -csatornák kölcsönhatásának vizsgálata. A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége emlős kamraizmon	123
<i>A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége a kamrai aritmogenezisben</i>	<i>123</i>
<i>Az R-L3 vegyület optikai enantiomerjei eltérő módon modulálják az I_{Ks} áramot nyúl kamrai szívizomzatban.....</i>	<i>127</i>
<i>A dilatatív cardiomiopátia módosítja a $Kir2.x$ ioncsatornákat kódoló gének expressziós szintjét.....</i>	<i>129</i>
<i>Az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggő szerepének a vizsgálata kutya kamrai akciós potenciálban</i>	<i>131</i>
3. témakör. A pitvarfibrillációs remodelling celluláris hatásmechanizmusainak vizsgálata emlősszíveken.....	133
<i>A G-protein által szabályozott acetilkolin-szenzitív káliumáram (I_{KACH}) konstitutíven aktív permanens pitvarfibrilláló betegeken.....</i>	<i>133</i>
<i>Repolarizáló káliumáramok tulajdonságainak vizsgálata szinuszritmusú és pitvarfibrilláló kutyákból izolált pitvari szívizomsejteken</i>	<i>135</i>
4. témakör. Az NCX gátlás lehetséges antiaritmias hatásmechanizmusának vizsgálata emlősszíveken.....	139
<i>Az ORM-10103 és GYKB-6635, új kísérletes szelektív NCX ioncsatorna gátlószer vegyületek hatásainak vizsgálata emlősszíveken (kutya és tengerimalac szívpreparátumokon)</i>	<i>139</i>
<i>Az NCX áram gátlása SEA-0400 vegyülettel szinusz ritmusos és permanens pitvarfibrilláló betegeken</i>	<i>145</i>
ÚJ EREDETI TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	150
ZÁRÓGONDOLATOK, AVAGY MIT ÉRTEM EL TÖBB MINT 20 ÉV KARDIOVASZKULÁRIS KUTATÓMUNKA ALATT (AZ 5 LEGFONTOSABB TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEM BEMUTATÁSA).....	154
IRODALOMJEGYZÉK	157
PUBLIKÁCIÓK, SZABADALMAK, SCIENTIOMETRIAI ADATOK.....	170
Az értekezés alapját képező eredeti, összefoglaló (review) közlemények és könyvek illetve könyvfejezetek.....	170
<i>Eredeti közlemények:</i>	<i>170</i>
<i>Összefoglaló (review) közlemények és könyvek illetve könyvfejezetek.....</i>	<i>171</i>
Az értekezés témájához kapcsolódó (de nem bemutatott) eredeti és összefoglaló (review) közlemények.....	172
Az értekezés témájához nem kapcsolódó eredeti és összefoglaló (review) közlemények, könyvfejezetek illetve monográfia szerkesztések.....	173
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	178

Rövidítések jegyzéke

ACh: acetilkolin

AF: pitvarfibrilláció

AMI: akut miokardiális infarktus

ANOVA: variancia analízis

AP: akciós potenciál

APA: akciós potenciál amplitúdó

APD: akciós potenciál időtartama (hossza)

APD₅₀₋₉₀: akciós potenciál időtartam 50, illetve 90 %-os repolarizációnál

ASR: pitvari strukturális remodelling

ATR: pitvari tachyaritmia indukált remodelling

ATP: adenosin-trifoszfát

ATP: ATPáz (Ca²⁺-homeosztázis fejezetnél)

AV: atrioventricularis

Ca²⁺_i ([Ca²⁺]_i): intracelluláris Ca²⁺-koncentráció

cAF: krónikus/permanens pitvarfibrilláció

CICR: kalcium indukálta kalcium felszabadulás jelenség (*Ca²⁺-induced Ca²⁺-release*)

CL: ciklushossz

DAD: késői utódepolarizációs potenciál

DCM: dilatatív cardiomiopátia

DOF: dofetilid

EAD: korai utó depolarizációs potenciál

EGTA: etilén-glikol-tetraecetsav

EKG: 12 elvezetési elektrokardiogram

ERP: effektív refrakter periódus

ES: extrasystole

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase háztartási gén

hERG: „*human ether-a-go-go-related gene*”, I_{Kr} csatorna alkotó gén

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

HMR: HMR-1556

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase háztartási gén

HP: holding potenciál

EC₅₀: 50% gátláshoz tartozó koncentráció

I_{Ca,L}: L-típusú Ca²⁺ áram

I_{K,ACh}: acetilkolin-függő befelé egyenirányító K⁺ áram

I_{K1}: befelé egyenirányító K⁺ áram

I_{KATP}: ATP-függő K⁺ áram

I_{Kr} : késői egyenirányító K^+ áram lassú komponense
 I_{Ks} : a késői egyenirányító K^+ áram gyors komponense
 I_{Kur} : késői egyenirányító K^+ áram ultragyors komponense
 $I_{Na/K}$: nátrium-kálium pumpaáram
 I_{to} : tranziens kifelé irányuló K^+ áram
 I_{Na} : korai gyors Na^+ áram
 I_{NaL} : késői („late”) Na^+ áram
 I_{NCX} : nátrium-kalcium cseremechanizmus (NCX) áram
I/R: iszkémia-reperfúzió
 K_{ir} : befelé egyenirányító K^+ csatorna
LQT: hosszú QT szindróma
MDP: maximális diastoles potenciál
NCX: Na^+ - Ca^{2+} kicserélő mechanizmus
N.S.: nem szignifikáns
PKA: protein kináz A
PKC: protein kináz C
PLN: foszfolamban
QT és QT_C : QT, illetve korrigált QT intervallum
mRNS: messenger ribonukleinsav
PV: pulmonális véna
RP: nyugalmi membránpotenciál
 R_s : soros ellenállás
RT: repolarizációs tartalék
RyR: ryanodin receptor
SCD: hirtelen szívhalál
SERCA: szarkoplazmatikus retikulum
SEM: az átlag standard hibája
 SR_e : szarkoplazmatikus retikulum (NCX kísérletek esetében)
SR: szinusz ritmus (AF aritmia kísérleteknél)
TdP: *Torsades de Pointes* aritmia
VEB: kamrai ektópiás ütés
VF: kamrafibrilláció
 V_{max} : depolarizáció maximális sebessége
VT: kamrai tachycardia

Preambulum

A civilizáció és a tudomány fejlődésével jelentős változások történtek az emberiség életében. A 20. század elején induló tudományos robbanás megváltoztatta addigi világunkat. A matematikai ismeretek fejlődése elindította a természettudományok évszázadát. A 20. századot a fizika valóságos forradalmat okozó, látványos eredményeket felmutató évtizedei indították, amelyet az ötvenes évektől a talán kevésbé látványos, de a mindennapi életünket annál inkább meghatározó kémia évtizedei követték, majd a hetvenes, nyolcvanas évek indították el a biológia évtizedeit, és azon belül is az újabb látványos csodákat elérő orvosi biológiai ismeretek forradalmát.

Természetesen az emberiség szempontjából a legfontosabbnak az epidemiológiai kutatások területén történt ismereteket szoktuk tekinteni, amelyek az emberiséget több évszázadon át pusztító nagy járványok sikeres leküzdését jelentették, és amelyeknek eredményeképpen legalábbis a világ fejlettebb és fejlődő részén gyakorlatilag eltűntek a korábban folyamatosan megjelenő és a lakosságot sokszor megtizedelő fertőző betegségek.

Sajnos a fertőző betegségek okozta járványok helyét olyan krónikus, nem fertőző betegségek megjelenése vették át, amelyek jelenleg is a mortalitási és morbiditási statisztikák élén vannak. Az összhalálozások/megbetegedések jelentős részéért (gyakorlatilag legalább az egyharmadáért) a kardiovaszkuláris betegségek a felelősek, és azok között is a lista élén az olyan magas incidenciát mutató betegségek szerepelnek, mint az iszkémiás szívbetegségek, akut miokardiális infarktus, hipertónia, stroke, pitvarfibrilláció, szívelégtelenség, illetve végül, de nem utolsósorban a különböző aritmiák talaján kialakuló hirtelen szívhalál (SCD). Utóbbi kezelésében a számtalan gyógyszeres kudarc eredményeképpen sajnos egyre inkább visszaszorulóban vannak a konzervatív kardiológia gyógyszeres kezelési megoldásai, és egyre nagyobb teret kaptak a nonfarmakológiai invazív és sebészeti megoldások. Azon belül is kiemelendők az olyan sebészeti beavatkozásokra épülő technikák, mint az elektrofiziológiai katéteres eljárások és a különböző beültethető készülékeken alapuló terápiák (pacemaker és ICD), illetve ezek kombinációja.

Jelenleg a gyógyszeres kezelés fentiek mellett maximum kiegészítő terápia. Ez két szempontból sem ideális helyzet. Egyrészt ezek a kezelések rendkívül költségesek, másrészt a jelentős infrastrukturális háttérigény (gyakorlatilag csak központi kórházakban vagy

klinikákon léteznek ilyen beavatkozásokat is végző kardiológiai osztályok) miatt korlátozott a hozzáférhetőség is az ilyen komplex sebészeti-kardiológiai kezelésekhez.

Természetesen jelentős igény van, új hatékony kardiális gyógyszerek kifejlesztésére. Ezen belül is igen nagy szükség van új antiaritmiás gyógyszerek kifejlesztésére és a mindennapi terápiába történő bevonásra. A CAST (1990) és SWORD (1995) nemzetközi vizsgálatok kudarca óta, gyakorlatilag egyetlen igazán hatékony új gyógyszer törzskönyvezésére és klinikai bevezetésére nem került sor kamrai szívritmuszavarok kezelése vagy megelőzése céljából. Kiterjedt nemzetközi kutatások zajlanak szerte a fejlett világban, amelyek célja hatékony antiaritmiás szerek kifejlesztése. Az alap és alkalmazott innovatív kutatási programok helyszínei között egyaránt megtalálhatók az akadémiai és egyetemi szintű kutatóhelyek, a gyógyszeripar fejlesztőlaboratóriumai, de természetesen ezek szoros ko-operációja is.

A Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézete már a múlt század hetvenes éveitől kezdődően egy sikeres nemzetközileg is elismert akadémiai műhely a kardiovaszkuláris élet és kórtani, illetve farmakológiai kutatások terén. Szekeres László, Papp Gyula, majd Varró András professzorok közel 50 éves vezetése alatt számos siker kapcsolódik az intézet nevéhez a kardioaktív szerek kutatása terén. Számos egyéb hatékony vegyület mellett a levosimendan és dronedaron fejlesztése, vizsgálata és nemzetközi sikere is ezen intézet nevéhez kapcsolódik.

Én 1995-ben közvetlenül az egyetem elvégzése után fizikusként kapcsolódtam be az intézet kutatásaiba. Itt szereztem meg az egyetemi PhD fokozatomat, majd itt folytattam 2000 óta posztdoktorális kutatásaimat, amelynek eredményeit négy bár első olvasatban látszólag eltérőnek tűnő, de valójában nagyon is fókuszált és összefüggő témakörbe csoportosítva kívánom bemutatni jelen MTA doktori értekezésemben. Vizsgálatokat végeztem a szív aritmia-készségének felderítése céljából a pitvari és kamrai szívizomzatban. Kimutattam, hogy a szív jelentős védekezési mechanizmussal rendelkezik (repolarizációs tartalék), amely ha sérül a szív fokozottan aritmogénné válik. Részt vettem több olyan vegyület kifejlesztésében/vizsgálatában, amelyek közül például a dronedaron ma már hivatalosan is a pitvarfibrilláció kezelésére törzskönyvezett antiaritmiás gyógyszer. És végül, de nem utolsó sorban tagja voltam azoknak a szegedi és drezdai kutatócsoportoknak is, amelyek igazolták és kimutatták, hogy az acetilkolin-szenzitív káliumáram és a nátrium-kalcium cseremechanizmus megváltoznak ritmuszavaros állapotokban, ezért e két áram gátlása új, ígéretes antiaritmiás gyógyszer-támadáspontok lehetnek a szupraventrikuláris és kamrai aritmiák kezelésére.

Bevezetés, irodalmi áttekintés

A téma indokoltsága és a szakmai indíttatásom

Napjainkban nemcsak Magyarországon, de világszerte is a szív és érrendszeri megbetegedések a vezető halálokok között szerepelnek a rosszindulatú daganatos betegségek mellett. A magyar statisztikai adatok alapján a kardiovaszkuláris megbetegedéseken belül a leggyakrabban előforduló kórképek a szív iszkémiás betegségei, a heveny szívizom elhalás és nem utolsósorban a különböző aritmiák talaján kialakuló hirtelen szívhalálok.

A szívritmuszavarok felismerése és kezelése régóta foglalkoztatja az orvosokat és egészségügyben dolgozó kollegákat. Első dokumentált leírását már legalább több mint 2000 éve ismerjük, ugyanis ezt olvashatjuk *Huang Ti Nei Ching Su Wen leírásában ie. 240 körül*: „*When the pulse strikes out in long beats and smoothly for a long time and then the beats of the pulse become smaller and hard on their own account, then a quick death will occur and no cure can be effected*” (Wen, 2002). Nyilván ez a kínai orvos által jegyzett esemény tekinthető a világon az első dokumentált halálos szívritmuszavar észlelésnek, mégpedig vélhetően egy hirtelen szívhalállal végződő kamrai attack leírása. Azóta sok mindent tudunk, és elmondható, hogy a szívritmuszavarok tekinthetők a világon, de sajnos Magyarországon is az egyik legelterjedtebb betegségnek, amelyek vezetnek a morbiditási és azon belül is a mortalitási statisztikákat is. Ami még inkább időszerűvé teszi a témával történő foglalkozást, hogy talán csak a cerebrovaszkuláris betegségek (például stroke vagy agyvérzés) kivételével nincs még egy olyan akár halállal is járó betegség, amely akár az aktív dolgozó korú (40-60 éves) populációt is érinti ilyen széles tömegben. Tehát amellett, hogy komoly személyes és családi tragédiák állnak a háttérben, egy rendkívül fontos gazdasági és társadalmi problémát is jelentenek a szívritmuszavarok okozta morbiditási és mortalitási események.

Mindez azt jelenti, hogy a szívritmuszavar (aritmia) komoly népegészségügyi probléma. A kardiális morbiditás és mortalitás szempontjából a szívritmuszavar leggyakoribb formái a pitvarfibrilláció és a kamrai tachycardia/kamrafibrilláció. A szívritmuszavar a normál szívműködés során az elektromos impulzusban bekövetkező változások összességére vonatkozik. A szívritmuszavar a szívműködésben történt olyan változás, amely eltér a normális szinusz ritmustól (SR). Oka lehet az ingerképzés zavara, ingerületvezetési zavar vagy mindkettő. Az aritmia nem egyenlő az irreguláris szívműködéssel. Az aritmiák által okozott tünetek igen sokfélék, az alig érzékelhetőtől az

életveszélyes állapotig terjednek. Fizikai terhelés, felfokozott érzelmi állapot, de egyes gyógyszerek is emelhetik vagy csökkenthetik a szívverések számát anélkül, hogy az kóros lenne. A normális szívfrekvencia 60-80 ütés percenként, és minden egyes szívdobbanással adott mennyiségű vér lökődik ki a keringésbe. Szívritmuszavarok számos, eltérő okokkal és tünetekkel rendelkező formában jelentkezhetnek. Eredetük alapján pitvari vagy kamrai aritmiáról, a szívfrekvenciára gyakorolt hatásuk alapján tachycardiáról vagy bradycardiáról beszélhetünk.

A szívritmuszavarok kezelése korábban elsősorban a konzervatív klinikai eszköztár segítségével történt. A 20. században számos új kardiovaszkuláris gyógyszert fejlesztettek ki, és azon belül is az antiaritmiás kezelés palettája rendkívül változatos volt. Az antiaritmiás gyógyszereket az ismert a 4 osztályba soroló Vaughan Williams szerinti klasszifikáció alapján csoportosították (Vaughan Williams, 1975). Bár a Vaughan Williams szerinti felosztás talán már kissé elavultnak tekinthető, ma is használt annak ellenére, hogy az antiaritmiás szerek valójában komplex hatásmechanizmusuk miatt nehezen sorolhatók be az eredeti klasszifikáció alapját képező hatások külön-külön csoportjaiba. Az aritmiák gyógyszeres kezelése még mindig számos problémát vet fel, ugyanis az antiaritmiás szerek hatékonyságának vizsgálatai során kimutatták a szerek mellékhatásainak tulajdonított mortalitás növekedést. A CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial, 1989) vizsgálatban a túlélőkben a szívinfarktust követő aszimptomatikus vagy enyhe szimptomatikus kamrai aritmiában nézték az enkainid, flekainid vagy moricizin hatását a hirtelen szívhalál kialakulásának rizikójára. Az átlagosan 10 hónapos utánkövetési idő alatt a gyógyszeresen kezelt betegek között magasabb volt az aritmia miatt bekövetkezett halál, mint a placebóval kezelt betegekben. A vizsgálatban megállapították, hogy sem az enkainid, sem a flekainid nem alkalmazható a szívinfarktust követő aszimptomatikus vagy enyhe szimptomatikus kamrai aritmiák kezelésére, bár kezdetben ezek a szerek hatékonynak bizonyultak a kamrai aritmiák kivédésében (The CAST Investigators, 1989). A SWORD (Survival With Oral D-sotalol, 1996) vizsgálat célja a magas rizikójú betegekben megállapítani, hogy a klinikailag jelentős β -blokkoló hatással nem rendelkező, tiszta K^+ csatorna gátló *d*-sotalol képes-e csökkenteni a mortalitást. A vizsgált betegekben a *d*-sotalol alkalmazása növelte a mortalitást, ami a szer proaritmiás hatásának tulajdonítható (Waldo, 1996; Pratt, 1998).

A CAST és SWORD negatív hatásainak eredményeképpen alig maradt olyan gyógyszerkészítmény, amelyet a kardiológusok különösképpen a kamrai ritmuszavarok megelőzésére vagy kivédésére meg tudtak tartani. Párhuzamosan hatalmasat fejlődtek a nonfarmakológiai invazív és sebészeti megoldások, és azon belül is az olyan sebészeti

beavatkozásokra épülő technikák, amelyek a különböző beültethető készülékeken alapuló terápiákat részesítik előnyben. Mivel e kezelések rendkívül költségesek, és jelentős infrastrukturális háttérigényűek (gyakorlatilag csak központi kórházakban, klinikákon léteznek ilyen beavatkozásokat is végző kardiológiai osztályok) folyamatosan megmaradt a gyógyszeres terápia iránti igény, amelyet sajnos a gyógyszeripar nemigen tudott teljesíteni. Gyakorlatilag kimondható, hogy a CAST és SWORD vizsgálatok okozta űrt, azóta sem sikerült betölteni, hiszen 1996 óta egyetlen igazi áttörést hozó új antiaritmiás készítményt sem sikerült kifejleszteni, törzskönyvezni és széleskörűen bevezetni a klinikai gyakorlatba. Egyedül talán csak a dofetilidid és részben a dronedaron azok a készítmények, amelyek újonnan kerültek a Vaughan Williams palettára, de egyik készítmény sem jelent forradalmi újítást a korábban létező és sajnos a proaritmia miatt kiesett gyógyszerkészítmények pótlására. Óhatatlanul felmerül a kérdés, hogy „Miért?” - vagyis miért nem sikerült egy negyed évszázad alatt sem áttörést elérni, amikor az orvosbiológiai kutatások más területén azért jelentős eredményeket értünk el a különböző betegségek mechanizmusainak megismerésében, és ennek következtében a terápiában is. Ráadásul különféle statisztikák mutatják ki, hogy jelentős mértékű szellemi és anyagi forrást mozgósítottak/mozgósítanak meg világszerte a kardiológiai és azon belül az aritmia-kutatásban is.

A fentieket a következőképpen foglalhatjuk össze. A kardiológiában történt előre lépések ellenére korábban a gyógyszeres kezelés inkább empirikus úton történt, ugyanis nem voltak teljesen ismertek sem az aritmiák kialakulásának élettani és kórélettani okai, sem a gyógyszerek pontos hatásmechanizmusa, amellyel megelőzik, elnyomják, vagy bizonyos esetekben kiválthatják magát az aritmiát (proaritmiás mellékhatás). Az alacsonyabb proaritmiás mellékhatással rendelkező, hatékony antiaritmiás szerek kifejlesztése érdekében fontos a szerek hatásmechanizmusának alaposabb megértése mind szervi, szöveti, celluláris és szubcelluláris szinten. És ez az a terület, ahol jelentős szerepet vállalhat egy alap és alkalmazott kutatást végző akadémiai jellegű kutatócsapat is.

A szív elektromos működését a testfelszíni elektrokardiogram (EKG) segítségével követhetjük mind normál egészségeseken mind betegeken. A testfelszíni elektrokardiogram valójában a szívet alkotó szívizomsejtek akciós potenciáljainak (AP) az algebrai összege. A klinikus kardiológus ennek megfelelően elsősorban az EKG felvételek regisztrálása révén gyűjt információkat a beteg állapotáról, míg mi elméleti kutatók a szívizomsejtek akciós potenciáljának, illetve az azt meghatározó transzmembrán ionáramok regisztrálása révén vizsgáljuk *in vitro* (vagyis szervi, szöveti, sejt, vagy újabban a molekuláris biológia fejlődése következtében már akár a szubcelluláris fehérje vagy génszinten is), elsősorban

különböző állatkísérletes modellekben. Utóbbiak lehetnek egészséges vagy akár valamilyen betegségmodellek is. Azt hogy ezek az eredmények miképpen transzponálhatóak át a teljes szervezetre (például az testfelszíni elektrokardiogramra, EKG) a *Bevezetés* rész következő alfejezeteiben ismertetem. Az utóbbi 20 évben egyre több humán elektrofiziológiai információ is származik egészséges vagy beteg szívek mintáiból származó kísérletes munkák eredményeképpen. Jelen értekezés is nemcsak állatkísérletes, hanem jelentős egészséges humán kamrai és pitvari kísérletes munka eredményeit is ismerteti.

A Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézete több évtizede nemzetközileg is elismert akadémiai kutatóműhely a kardiovaszkuláris szerek fejlesztése terén. Története az 1970-es évekkel kezdődött, amikor Szekeres László és Papp Gyula professzorok Pécsről Szegedre költöztek, és átvették a Szegedi Orvostudományi Egyetem Gyógyszertani Intézetének vezetését. Az alapított iskolában azóta is töretlenül folyik az antiaritmiás szerek kutatása, és számos nemzetközileg is elismert siker koronázta a munkásságukat. Az egyik elismert siker az Orion Gyógyszergyár fejlesztésével, de a szegedi csapat hathatós munkája révén piacra került új szívelégtelenség gyógyítására kifejlesztett gyógyszer, a levosimendan. A másik gyógyszer, amelynek a preklinikai vizsgálatában jelentős kísérletes munkát hajtott végre az időközben Varró András professzor vezette intézet, a dronedaron, amelyről szó esik majd jelen doktori értekezésben is.

1995-ben PhD hallgatóként kapcsolódtam be az intézet kutatásaiba a Papp Gyula és Varró András professzorok által vezetett Szívelektrofiziológiai Munkacsoportba. Kutatásaim fő célja az emberi kamrai szívizomzat repolarizációt meghatározó káliumáramok vizsgálata köré fókuszálódottak elsősorban. Jelentős eredményeket értünk el a kamrai késői egyenirányító káliumáram humán kamrai szívizomsejtekben történő jellemzése területén, amely kutatások részét képezték a 2000-ben „*Summa cum laude*” minősítéssel megvédett „*Pharmacological modulation of the rapid and slow components of the delayed rectifier potassium current in various mammalian cardiac cells*” című PhD értekezésemnek. A munka célja a kamrai repolarizáció celluláris szintű vizsgálata volt, hogy megértsük a klasszikus III-as osztályú antiaritmiás mechanizmus lényegét. A vezérelv új amiodaron-szerű vegyület(ek)nek a kifejlesztése volt, mert az amiodaron az egyetlen olyan antiaritmiás gyógyszerünk, amely valóban hatékony az aritmiák kivédése terén, és gyakorlatilag mentes a kamrai proaritmiás mellékhatásoktól, habár egyéb extrakardiális mellékhatásai nem jelentéktelenek. Számos új antiaritmiás vegyületet sikerült akár saját ötletek alapján (GYKI-16638), akár gyógyszergyárral kooperációban (dronedaron, tedisamil) kifejlesztenünk és megvizsgálnunk. A gyógyszervizsgálati munka során

folyamatosan beleütköztünk abba a problémába, hogy még mindig nem értjük kellően az aritmiák kialakulásának celluláris szintű mechanizmusát.

Az említett célkitűzések elérése végett, kiterjedt vizsgálatssorozatot indítottunk a kamrai és pitvari repolarizációt meghatározó elsősorban káliumáramok, majd később a nátrium-kalcium cseremechanizmus tanulmányozása céljából különböző emlősszívekből származó kamrai és pitvari mintákon. A végcél kettős volt.

Az egyik célpont az volt, hogy megismerjük a kamrai repolarizációt meghatározó transzmembrán ionáramok tulajdonságait, és azon belül annak felderítése, hogy miképpen változnak, ha egyáltalán megváltoznak az áramok tulajdonságai beteg állapotban, és ez miképpen befolyásolhatja a szív aritmogenézisét. Ismert volt a vizsgálatssorozat előtt, hogy a repolarizációt több káliumáram is szabályozza, ezért célul tűztük ki, hogy felderítsük, hogy miért van arra szükség, hogy a repolarizációt több kálium-ionáram is szabályozza, hogy miként hatnak egymásra, melyik áramnak lehet jelentősebb szerepe az aritmogenézisben, és ezáltal melyik áram lehet a kiemelt gyógyszer-támadáspont. Ez segíthet megérteni, hogy miért bizonyultak proaritmiás hatásúaknak az amúgy rendkívül hatékony I és III-as osztályú antiaritmiás készítményeink, és értelemszerűen így lehetőség nyílna olyan hatóanyag-támadáspontokat azonosítani, amelyekre építve már hatékony proaritmiamentes gyógyszereket fejleszthetnénk ki.

A vizsgálat további eredményt kecsegtető célkitűzése (amely jelen értekezésnek nem témája) a humánszerű species beazonosítása volt, legalábbis a kamrai repolarizációt meghatározó káliumáramok tekintetében. Erre azért van szükség, mert ismert, hogy a kísérletes orvosi biológiai kutatásokban széleskörűen alkalmazott állatmodellek (elsősorban kis testű rágcsálómodellek, mint például az egér, patkány vagy tengerimalac) használata az aritmia kutatásban nem szerencsés, mert elektrofiziológiai profiljuk, mint például a sokkal magasabb fiziológiás szívfrekvencia, jelentősen eltér az emberétől. A bizonyos tekintetben érthető okok miatt egyre szigorodó állatvédelmi jogszabályok pedig jelentősen behatárolják, hogy kutatásainkat milyen speciesekben végezhetjük. Mindezek szükségessé teszik, hogy sikerüljön beazonosítani, hogy melyik species a legalkalmasabb új hatékony antiaritmiás szerek *in vitro* és *in vivo* jellegű tesztelésére, amelyek elősegítik a humán klinikai-farmakológiai vizsgálatok elindítására szükséges legtokéletesebb preklinikai dossziék elkészítését.

Külön vizsgálatssorozatot indítottunk a pitvarfibrilláció celluláris mechanizmusának a felderítésére. A vizsgálatok arra irányultak, hogy megállapítsuk milyen változások történnek a pitvari izomzatban, amelyek szerepet játszhatnak a betegség progrediens

kialakulásában, és ezáltal melyek lehetnek a pitvarszelektív gyógyszer-támadáspontok kamrai proaritmiamentes gyógyszerek kifejlesztése céljából.

A CAST és SWORD vizsgálatokban elsősorban a depolarizációt, illetve a repolarizációt meghatározó ionáramokat módosító gyógyszereink buktak meg. Ezek a készítmények az akciós potenciált meghatározó felfelé szálló (vagyis depolarizáló), illetve a végén lefelé szálló (repolarizáló) ágának a megváltoztatása révén képesek a szívfrekvenciát lelassítani, és ezáltal például a kamrai illetve pitvari tachycardiát kivédeni. Az akciós potenciált számos más ionáram is meghatározza, azon belül is kiemelt szerepet játszik a másodlagos depolarizációt, illetve a platót meghatározó L-típusú kalcium ionáram (I_{CaL}) és az ahhoz társult egyéb kalciumion-mozgások, mint például a nátrium-kalcium cseremechanizmus (NCX). Korábbi elméleti alapon megfogalmazott munkahipotézis volt, az hogy az NCX áram szelektív gátlása hatékony gyógyszer-támadáspont lehet az elsősorban késői utodepolarizáció által triggerelt aritmiákban, de ennek ellenőrzése hatékony és szelektív NCX gátlók hiányában nem volt lehetséges.

Mindezt összefoglalva a jelen MTA doktori értekezésben bemutatam a PhD fokozatom megszerzése utáni tudományos kísérletes tevékenységemet. Az értekezésben az eredményeimet az előzőekben ismertetett elvek alapján a következő **összesen négy látszólag talán eltérőnek tűnő, de valójában nagyon is fókuszált és összefüggő témakörbe** csoportosítva kívánom bemutatni:

- 1. témakör.** Különböző antiaritmiás szerek celluláris hatásainak vizsgálata emlősszíveken.
- 2. témakör.** A szívizom repolarizációjában részt vevő különböző K^+ -csatornák kölcsönhatásának vizsgálata. A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége emlős kamraizmon.
- 3. témakör.** A pitvarfibrilláció okozta remodelling celluláris hatásmechanizmusainak vizsgálata emlősszíveken.
- 4. témakör.** Az NCX gátlás lehetséges antiaritmiás hatásmechanizmusának vizsgálata emlősszíveken.

Az értekezés témaköreinek irodalmi hátterei

1. és 2. témakör: Különböző antiaritmiás szerek celluláris hatásainak valamint a repolarizáló K^+ -áramok és a repolarizációs rezerv vizsgálata emlősszíveken

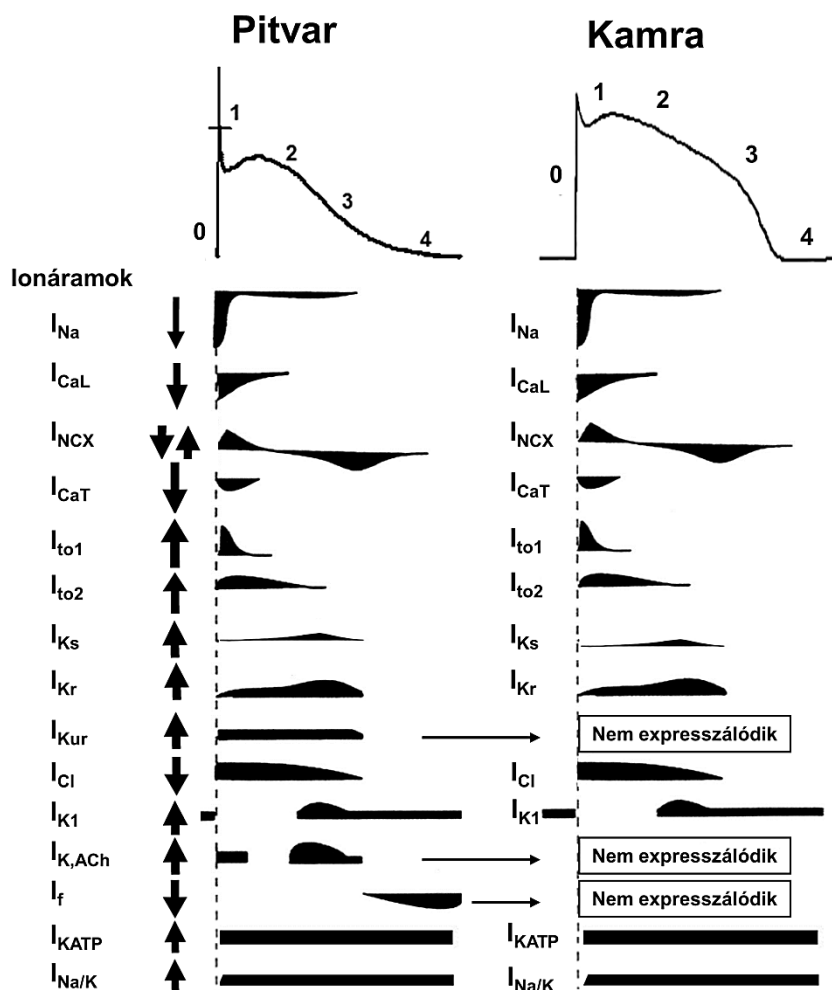
A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és azt meghatározó ionáramok

Az emberi szervezetben található sejtek plazmamembránja az egymástól eltérő ionösszetételű intra-, és extracelluláris teret választja el. Az ingerelhető sejtek akciós potenciálja nem más, mint a sejtmembránon folyó térben és időben változó ionáramok következtében létrejövő feszültségváltozások. A szív ritmikus működését a szinuszcsozóban kialakuló, és innen a pitvari izomsejteken, az ingerületvezető rendszeren, majd a kamrai munkaizomzaton tovaterjedő akciós potenciálok hozzák létre. Az akciós potenciálok következtében az intracelluláris kalciumkoncentráció átmenetileg megnő, ami a szívizomsejtek összehúzódását eredményezi. Magát az akciós potenciált az emlősök szívizomsejtjeiben a plazmamembrán idő- és feszültségfüggő ioncsatornáinak konduktancia változásai hozzák létre. A szívizomsejtek akciós potenciálját öt fázisra osztjuk (**1. ábra**).

Az első fázis neve a nulladik fázis (**0-fázis**), amelyet AP felszálló szárának is neveznek a hirtelen nagymértékű membránpotenciál-változás idő-feszültség grafikonon ábrázolódó jellegzetes alakja miatt. Az akciós potenciál nulladik fázisában idő- és feszültségfüggő gyors Na^+ csatornák aktiválódnak, sokszorosára növelve az addig alacsony Na^+ konduktanciát. A Na^+ ionokra jelentős elektrokémiai hajtóerő hat, ezáltal a csatorna nyitása is nagyon jelentős áramot eredményez, így a membránpotenciál aktuális értéke a Na^+ egyensúlyi potenciálja (kb. +55 mV) felé mozdul, tehát a membrán depolarizálódik. A gyors Na^+ csatornák hamar inaktiválódnak, de a refrakteritás miatt újra ingerelhető állapotba majd csak a repolarizáció után kerülnek. A gyors Na^+ csatornák által okozott depolarizáció következtében egyes áramokért felelős ioncsatornák aktiválódnak, míg mások inaktiválódnak. A nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős K^+ -áram (befelé egyenirányító K^+ áram, I_{K1}) lecsökken a befelé történő egyenirányítás miatt, ez megakadályozza repolarizáló hatású K^+ áram létrejöttét a nulladik fázis alatt. A depolarizáció hatására ugyanakkor egy korai tranziens kifelé irányuló K^+ -áram (*“transient outward potassium current”, I_{to}*) is aktiválódik. Az I_{to} felelős az akciós potenciál **első fázisában** tapasztalt gyors, átmeneti repolarizációért („notch” kialakulása).

Az akciós potenciál **második fázisáért** (az ún. plató fázisért) a főként Ca^{2+} ionokat szállító lassú befelé irányuló áram a felelős. A plató fázis alatt nem történik jelentősebb

mértékű repolarizáció az I_{to} inaktiválódása és a K^+ (I_{K1}) csatornák befelé történő egyenirányítása miatt.



1. ábra. A pitvari (bal oldali mező) és kamrai (jobb oldali mező) szívműsejtek akciós potenciáljának fázisai és az ezeknek megfelelő ionáramok. Az AP mellett feltüntetett arab számok az AP egyes fázisait jelölik. Az akciós potenciál alatt a membránpotenciál-változást előidéző transzmembrán ioncsatorna-áramok vannak vázlatosan feltüntetve. A lefelé irányuló nyilak az extracelluláris térből a szívműsejtbe történő kationmozgást (*inward áram*), míg a felfelé mutató nyilak a szívműsejtől az extracelluláris térbe történő kationmozgást (*outward áram*) jelölik. Az ionáramok rövidítései: I_{Na} = befelé irányuló gyors Na^+ -áram; I_{CaL} = befelé irányuló L-típusú Ca^{2+} -áram; I_{NCX} = nátrium-kalcium cseremechanizmus (NCX) áram; I_{CaT} = T-típusú Ca^{2+} -áram; I_{K1} = befelé egyenirányító K^+ -áram; $I_{K,ACh}$ = acetilkolinfüggő K^+ áram; I_{to1} = tranziens kifelé irányuló K^+ -áram; I_{to2} = Ca^{2+} -aktiválta K^+ -áram; I_{Kur} = késői egyenirányító kifelé irányuló K^+ -áram ultragyors komponense; I_{Ks} = késői egyenirányító, kifelé irányuló K^+ -áram lassú komponense; I_{Kr} = késői egyenirányító, kifelé irányuló K^+ -áram gyors komponense; I_{Cl} = klorid áram; $I_{K,ACh}$ = acetilkolin-függő befelé egyenirányító K^+ áram, I_f = befelé irányuló pacemaker- Na^+ -áram; I_{KATP} = ATP-függő K^+ áram. $I_{Na/K}$ = nátrium-kálium pumpaáram.

Az AP **harmadik fázisában** kezdődik meg a repolarizációs folyamat, mely az AP negyedik fázisára visszaállítja a membránpotenciál nyugalmi értékét. A repolarizációt számos áram együtt hozza létre. A kezdeti szakaszt az I_{CaL} áram inaktivációja határozza meg leginkább. Később egyre nagyobb szerep jut a késői egyenirányító („*delayed rectifier*”) K^+ -

áram (I_{Kr} és I_{Ks}) gyors és lassú komponenseinek, majd a repolarizációt, és a sejtek membránpotenciáljának helyreállítását is a befelé egyenirányító káliumáram, az I_{K1} áram teszi teljessé. Ezen kívül meg kell említeni két fontos pitvarszelektív repolarizáló áramot is. Az egyik a késői egyenirányító káliumáram ultragyors komponense, az I_{Kur} , és egy ligandvezérelt áram, a G-protein stimuláció hatására nyíló acetilkolin szenzitív befelé egyenirányító káliumáram, az $I_{KA,Ch}$.

Az AP **negyedik fázisa** (elektromos diastole) során az extranodalis (automáciával nem rendelkező) miociták, így a kamrai sejtek membránpotenciálja is a nyugalmi értéken marad egészen az újabb AP kezdetéig. A 4. fázist meghatározó nagy K^+ konduktancia (amely az I_{K1} áramot eredményezi) felelős azért, hogy a kamrai miociták nyugalmi membránpotenciálja a K^+ ionok egyensúlyi potenciáljához közeli érték (*kb.* -90 mV).

A „régí” antiaritmiás gyógyszerek proaritmiás mellékhatásainak felfedezése, és a modern, elsősorban *multichannel* jellegű, *ún.* „amiodaron-szerű” gyógyszerek iránti igénynek a megfogalmazása

A Cardiac Arrhythmia Suppression Trial vizsgálatok (CAST I-II) bebizonyították, hogy a Vaughan Williams I/C hatástípusú Na^+ -csatornagátló antiaritmiás gyógyszerek (flekainid, enkainid, moricizin) az iszkémiás eredetű kamrafibrilláció (VF) fellépését megkönnyítő *ún.* profibrilláns hatás révén –a post-infarktusos kamrai extrasystolia látványos szuppressziója ellenére– növelik a teljes és hirtelen halálozást (Lazzara 1996; Singh 1999). Aggályokat ébresztettek az I/A típusú kinidinnel végzett randomizált klinikai vizsgálatok eredményeiből származtatott meta-analitikus adatok is, és felvetették annak a gyanúját, hogy bizonyos betegcsoportokban ennek a klasszikus antiaritmiás gyógyszernek is erős proaritmiás hatása van, ami mortalitás-növekedésben nyilvánulhat meg (Fazekas, 1999a; Varró, 2009). Az a felismerés, hogy a szupraventrikuláris és kamrai tachyaritmiák túlnyomó többsége az impulzus körforgásán (reentry) alapszik és az ingerületvezetést lassító Na^+ -csatornagátlók nem ritkán inkább elősegítik a reentry-aktivációt (Fazekas, 1994), paradigma-váltáshoz vezetett, ami elsősorban abban nyilvánult meg, hogy a gyógyszerfejlesztésben résztvevő kutatók és a klinikusok érdeklődése egy másik alapvető antiaritmiás+antifibrilláns terápiás princípium, a repolarizáció gyógyszeres megnyújtása felé fordult (Singh, 1994; Wang, 1994; Bril, 1996; Lazzara 1996; Fazekas, 1996 és 1999b; Katrissis 1997; Salata, 1997; Conolly, 1999; Torp-Pedersen, 1999). Singh és Vaughan Williams 1970-ben egy új farmakoterapiás irányzat elektrofiziológiai alapjait fektették le, amikor kimutatták, hogy a *d,l*-sotalol (MJ 1999) és a krónikus amiodaron-előkezelés erőteljesen megnyújtja a szívimsejtek akciós

potenciáljának időtartamát (APD) és effektív refrakter periódusát (ERP); az újfajta elektrofiziológiai effektust III-as típusú antiaritmiás hatásnak nevezték el (Singh, 1970a; Conolly, 1994, Singh, 1999). Ezen kutatási és terápiás irányzat erősödése jegyében több olyan új, „tisztá” („*pure drug*”) K^+ -csatorna-blokkoló molekulát fejlesztettek ki, amelyek többségéről (dofetilid, *d*-sotalol, almokalant, sematilid, E-4031) kiderült, hogy a repolarizációban döntő szerepet betöltő késői egyenirányító K^+ -áram gyors komponensének (I_{Kr}) szelektív gátlószere (Gough, 1989; Jurkiewicz, 1993; Darpö, 1996; Katrasis, 1997; Salata, 1997; Torp-Pedersen, 1999).

A károsodott bal-kamrafunkciójú post-infarktusos betegeken *d*-sotalollal végzett prospektív, randomizált, kettős-vak SWORD (Survival With ORal D-sotalol) vizsgálat mindazonáltal azt bizonyította, hogy az I_{Kr} szelektív gyógyszeres blokkja is jelentős proaritmia-kockázattal és mortalitás-növekedéssel szövődik (Waldo, 1996; Pratt, 1998). Az APD-t és ERP-t megnyújtó gyógyszerjelöltek kutatása természetesen a SWORD után is folytatódott, az új cél azonban már nem „tisztá” I_{Kr} -ionáramgátlók, hanem olyan „*multichannel*” („*dirty drug*”), vagy ún. „amiodaron-szerű” antiaritmikumok kifejlesztése volt, amelyekben a repolarizációt megnyújtó (III-as osztályú) hatás egyéb, előnyösnek vélt farmakológiai tulajdonsággal (kombinált III+I/B, II és/vagy IV osztályú aktivitás) ötvözve jelentkezik (Brill, 1996; Nattel, 1999).

Ezt követően a kilencvenes éve második felében azok az új K^+ -csatornagátlók kerültek az érdeklődés homlokterébe, amelyek nemcsak az I_{Kr} -t gátolják, hanem ugyanezen kationáram lassan aktiválódó összetevőjét (I_{Ks}) is blokkolják. A kombinált $I_{Kr}+I_{Ks}$ gátlástól ugyanis a Sanguinetti-Jurkiewicz hipotézis (Jurkiewicz, 1993) alapján több szerző az ún. fordítottan frekvencia-függő („*reverse use-dependent*”) APD-megnyúlás. és az arra visszavezethető kamrai proaritmiás aktivitás gyengülését vagy elmaradását remélte (Salata, 1997; Dorian, 1999; Singh, 1999; Viswanathan, 1999). Ennek a következő a magyarázata. A hirtelen bekövetkező szívfrekvencia növekedés (például korai extrasystole) vagy a tartós, egyensúlyi („*steady-state*”) tachycardia által indukált APD rövidülés (APD restitúció, *illetve* APD-adaptáció) létrehozásában résztvevő elektrofiziológiai mechanizmusok nem kellő mélységű ismeretéből az is következik, hogy nincsenek pontos, mindenki által elfogadott eredményeink a fordítottan frekvenciafüggő (*reverse rate-dependent*) repolarizáció megnyúlás hátterében álló ioncsatornaszintű eseményekre vonatkozóan sem. Sanguinetti és Jurkiewicz tengerimalac kísérleteken alapuló hipotézise nyomán évekig feltételezték, hogy a szelektív I_{Kr} -blokkolók (dofetilid, E-4031, almokalant) repolarizációt megnyújtó hatása azért csökken vagy szűnik meg a magas szívfrekvencia tartományban, mert a késői

egyenirányító K^+ -áram ezen állatfajban lassan aktiválódó és deaktiválódó összetevője (az I_{Ks}) a rövid diastoles intervallumok miatt tartósan nyitva marad, felerősödik („ I_{Ks} - akkumuláció”), ami másodlagos APD rövidüléshez vezet. Ennek megfelelően azt a hipotézist vetették fel, hogy az I_{Ks} szelektív gátlása mentes volna az I_{Kr} gátlókra jellemző fordított frekvenciafüggő hatástól (Jurkiewicz, 1993).

A Sanguinetti-Jurkiewicz hipotézis felvetéseit követve több vegyület vizsgálatát tűztük ki célul. Ezek között voltak olyan új originális innovatív gyógyszerjelölt molekulák, mint az amiodaron kongéner vegyület az SR-33589 (dronedaron), az amiodaronszerű tulajdonságokkal felruházott kombinált III+I/B osztályú GYKI-16638, valamint a *multichannel* gátló molekulaként kifejlesztett KC-8857 (tedisamil). Ezen kívül a Sanguinetti és Jurkiewicz hipotézis tanulságait is figyelembe véve, a proaritmiás mellékhatások celluláris mechanizmusának megismerése céljából összehasonlításként, megvizsgáltuk néhány régóta ismert és széleskörűen használt antiaritmiás gyógyszer hatását (az I/A osztályú szerként ismert prokainamid, kinidin és disopyramid) a transzmembrán ionáramokra.

A szívizom repolarizációjában részt vevő különböző káliumcsatornák kölcsönhatásainak vizsgálata emlős kamraizmon - a repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége

Mint már az előző alfejezetben is volt róla szó, a szívritmuszavarok gyógyszeres kezelésének egyik lehetséges és kiemelkedően fontos módja az akciós potenciál időtartamának (APD), illetve effektív refrakter periódusának a megnyújtása, amit a Vaughan Williams féle klasszifikációban III osztályú antiaritmiás hatásnak nevezzünk (Singh, 1970a). Számos nem szívre ható gyógyszer repolarizáció megnyúlást idéz elő a kamrai szívizomban és a Purkinje rostokban egyaránt azáltal, hogy egy vagy több káliumáramot blokkol (Antzelevitch, 1996; Drici, 2000a; Gintant, 2001). Ma már köztudott, hogy az akciós potenciál időtartamának megnyúlása bizonyos helyzetekben proaritmiás szövődményhez (*Torsades de Pointes* típusú kamrai tachycardia) vezethet, melynek következtében növekszik a gyógyszer okozta össz mortalitás. A kamrai repolarizáció a sejtbe befelé haladó, mint például a gyors Na áram (I_{Na}) és L-típusú kalciumáram (I_{Ca}) és a sejtből kifelé haladó ionáramok, mint például a tranziens kifelé irányuló kálium áram (I_{to}), a késői egyenirányító káliumáram gyors (I_{Kr}) és lassú komponense (I_{Ks}) valamint a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) finom egyensúlyaként jön létre. A klinikai tapasztalatok azt mutatták, hogy fiziológiás körülmények között a káliumcsatornák egyetlen típusának sérülése vagy gyógyszeres gátlása kifejezett, potenciálisan veszélyes APD megnyúlást várhatóan nem

eredményez, mivel a többi káliumáram megfelelő repolarizációs plusz kapacitást képes biztosítani. Ezt a jelenséget nevezte el Roden professzor „repolarizációs tartaléknak” („*repolarization reserve*”) (Roden, 1998 és 2005), amelyről először egy klinikai jellegű hosszú QT szindrómás közleményhez írott szerkesztőségi levélben („*editorial*”) a következőképpen fogalmaz:

„Nagyobb probléma megjósolni a *Torsades de Pointes* aritmiák megjelenését alacsony gyógyszer plazmakoncentrációk esetében. Ezért javasoljuk bevezetni a *repolarizációs rezerv* fogalmát. Ennek szellemében azt feltételezhetjük, hogy az egészséges kamrai szívizomszövetben egy gyors és biztonságos repolarizációs rendszer létezik, amely nem teszi lehetővé a reentry aritmiás körök, illetve az aritmogén korai utódepolarizációk (EAD) kialakulását. Valójában a gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) késői egyenirányító káliumáramok normális működése a fő biztosítéka a stabil és biztonságos repolarizációnak, és így a szívizomnak erős repolarizációs tartaléka van. Meghatározott *Torsades de Pointes* aritmiát előidéző kockázati tényezők csökkentik ezt a repolarizációs tartalékot, és így valószínűsíthető, hogy olyan további behatások, mint például a genetikai károsodás, az I_{Kr} gátló gyógyszerek alkalmazása már elégségesé válnak ahhoz, hogy egy adott betegben a *Torsades de Pointes* aritmia kialakulhasson” (Roden, 1998).

Annak ellenére, hogy a fentiekben említett koncepció, illetve definíció minden kísérletes bizonyíték nélkül pusztán elméleti spekuláció eredményeként született, igen gyorsan komoly visszhangot váltott ki. Ezt a megjelenését követő évben már 16 és a mai napig érkezett összesen több mint 400 idézet is bizonyítja. A repolarizációs rezerv első megfogalmazását követő években nyilvánvalóvá vált, hogy segítségével értelmezhetővé válnak azok a váratlan proaritmiás komplikációk is, amelyek egyébként nem jártak együtt a repolarizáció és/vagy a QT intervallum számottevő megnyúlásával.

Munkacsoportunk egy teljesen más megközelítésben jutott el a repolarizációs tartalék fogalmához, amelynek az lett az eredménye, hogy az I_{Ks} transzmembrán káliumáram élettani szerepének tisztázása során **kísérletes bizonyítékokkal** elsőként igazoltuk a repolarizációs rezerv jelentőségét a túlzott mértékű repolarizáció megnyúlás következtében kialakuló aritmiás kockázat megnövekedésében (Varró, 2000).

Nem sokkal azt megelőzően, hogy az előzőleg már említett módon a repolarizációs rezerv megfogalmazásra került volna, laboratóriumunkban már rendelkezünk azokkal az új specifikusnak tekinthető I_{Ks} gátló vegyületekkel (chromanol 293B, L-735,821 és HMR-1556), amelyekkel lehetővé vált, hogy vizsgáljuk az I_{Ks} áramnak a szívizom repolarizációjában betöltött szerepét. Ezeknek a kísérleteknek az eredeti célja egy a

Sanguinetti és Jurkiewicz által széleskörűen ismert és elfogadott hipotézis (Jurkiewicz, 1993) experimentális bizonyítása volt. Mint az előző alfejezetben már röviden taglaltam, ezen hipotézis szerint az I_{Ks} farmakológiai úton történő gátlása - a korábban a gyors késői egyenirányító (hERG) káliumcsatorna (I_{Kr}) gátló sotalol és dofetilid hatásával ellentétben - vélhetően nem fordított (*reverse*) use dependens módon nyújtja meg a szívizom repolarizációját. A Sanguinetti-Jurkiewicz hipotézis szerint, amelyet korábbi tengerimalac miocitákon végzett patch-clamp kísérletek eredményei alapoztak meg az akciós potenciálok során kinyílt (aktiváció) I_{Ks} transzmembrán ioncsatornák – a repolarizáció során lassan zárulnak be (deaktiváció). Ez azt jelentené, hogy magas szívfrekvenciáknál az I_{Ks} csatornák egy része nyitott állapotban maradna, és rajtuk keresztül jelentős mértékű repolarizáló K^+ -áram folyna keresztül, és így nagymértékben hozzájárulna a tachycardia során tapasztalható repolarizáció rövidüléséhez (Sanguinetti, 1990; Jurkiewicz, 1993). Ezzel összhangban az I_{Kr} gátló szerekkel ellentétben az I_{Ks} csatornák gátlása elsősorban gyors szívfrekvenciáknál, azaz tachycardiában lenne kifejezett, amely terápiásan igen előnyös ERP megnyújtó antiaritmiás hatást eredményezne csekély proaritmiás kockázat mellett. Mindezeket figyelembe véve számos elméleti farmakológus, és gyógyszergyár az I_{Ks} gátló antiaritmiás gyógyszerek fejlesztésébe kezdett (Schreieck, 1997; Bosch, 1998; Shimizu, 1998). A korszellemnek megfelelően, mi is foglalkozni kezdtünk az I_{Ks} gátló szerek celluláris hatásmódjának a vizsgálatával.

Jelen munkánk célja az volt, hogy a celluláris elektrofiziológia eszköztárát felhasználva, megvizsgáljuk az egyes káliumáramok egymás közötti kölcsönhatását, és kísérletesen igazoljuk a repolarizációs tartalék lehetséges szerepét a kamrai szívizom repolarizációja során. Kísérleteinkben megvizsgáltuk az I_{Ks} és I_{K1} áramok szelektív gátlásának hatásait kutya, illetve egészséges emberi kamrai APD-re miután a repolarizációs tartalékot szelektív I_{Kr} gátlással, illetve a szimpatikus stimuláció fokozással előzetesen legyengítettük. A hipotézist tovább ellenőrizve megvizsgáltuk mi történik, hogyan változik meg az I_{K1} áram dilatatív cardiomiopátiában, illetve megvizsgáltuk az I_{Ks} áram fokozásának (aktiválásának) a lehetséges szerepét az akciós potenciál repolarizációjára.

3. témakör: A pitvarfibrillációs remodelling celluláris hatásmechanizmusainak vizsgálata emlősszíveken

A pitvarfibrilláció (AF) a leggyakoribb, hirtelen/aritmogén szívhalált csak ritkán okozó, klinikai lefolyását tekintve azonban korántsem „*benignus*” szívritmuszavar, amely a jelenlegi becslések szerint az Európai Unióban $\approx 4,5$, az USA-ban $\approx 2,5$ millió embert sújt.

Az epidemiológusok prognózisa, hogy a gazdaságilag fejlett és hozzájuk felzárkózó országokban a lakosság várható élettartamának növekedése, a ritmuszavar kialakulását leggyakrabban előidéző hypertensio óriási prevalenciája (50-70%) és az AF-et provokáló és/vagy arra hajlamosító „népbetegségek” (elsősorban az obezitás/túlsúly, cukorbetegség, kardiometabolikus szindróma, szisztolés/diasztolés szívelégtelenség, alvási apnoe/hypopnoe-szindróma) nagymérvű elterjedése következtében ez a szám 2050-re valószínűleg megkettőződik.

AF-ben a fiziológias körülmények között koordinált pitvari tevékenység helyett teljesen rendezetlen, kaotikus, óriási frekvenciájú (cca. 600-800/min) gyors excitáció jellemezi a pitvarok elektromos működését, amelyek lényegében véve vonaglanak, érdemi mechanikai tevékenységre (összehúzódásra és ellazulásra) képtelenek. A pitvarfibrilláció egy progrediens betegség, amelynek típusai több fázisban alakulnak ki:

- | | |
|----------------------------------|--|
| - Első alkalommal felismert | |
| - Visszatérő (rekurrens) | - két vagy több alkalommal fellépő |
| - Paroxizmális pitvarfibrilláció | - a szívritmuszavar 48 órán, de legkésőbb 7 napon belül spontán megszűnik |
| - Perzisztens pitvarfibrilláció | - 7 napnál tovább fennáll |
| - Hosszan perzisztáló | - több mint egy éve fennálló. |
| - Permanens pitvarfibrilláció | - krónikus pitvarfibrilláció |
| - Élethossziglan fennáll | - orvos és beteg is elfogadja, és többé nem törekednek a szabályos ritmus helyreállítására |

Paroxysmalis AF-ban a rendszertelenül és nemritkán (10-40%) panaszmentes formában jelentkező epizódok/attakok 7 napon belül spontánul megszűnnek, de ha az AF perzisztenssé válik, gyógyszeres terápia vagy elektromos cardioversio szükséges a szinusz ritmus (SR) helyreállítására. Az SR visszaállítását célzó gyógyszeres, elektromos vagy „hibrid” gyógyszer (például prokainamid vagy ibutilid injektálása után végzett elektrosokk) beavatkozás nem mindig sikeres, és köztudott, hogy annál kisebb a valószínűsége, hogy a betegek SR-ban maradnak, minél hosszabb ideje fennáll(t) a cardioversio előtt az AF. Ha a SR ezen beavatkozások ellenére sem áll helyre vagy kísérlet sem történik helyreállítására (mert például a beteg nem egyezik bele az altatás alatt végezhető elektrokardioverzióba), a ritmuszavar állandósul, s ilyenkor a permanens jelzővel illetjük (Nattel, 2002).

Kísérletes körülmények között rövidebb-hosszabb ideig fenntartott gyors pitvari elektrostimulációval AF idézhető elő, amely önfenntartó folyamatként elősegíti (elsősorban nagyobb szívvel bíró fajokban) saját fennmaradását. Ezt a jelenséget nevezték el *Allessie és*

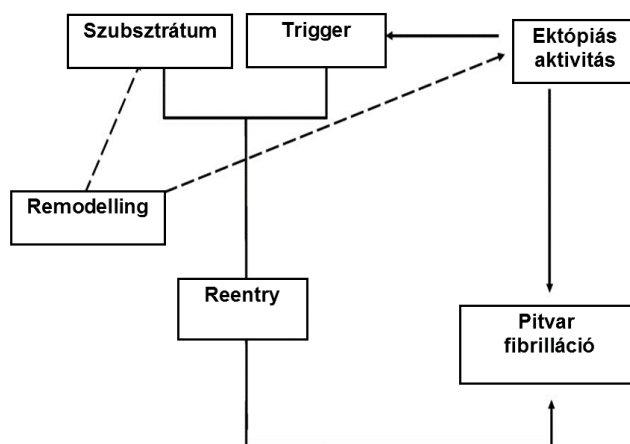
mtsai, ma már klasszikusnak nevezhetően az „*atrial fibrillation begets atrial fibrillation*”, azaz „a pitvarfibrilláció pitvarfibrillációt szül” kifejezéssel (Wijffels, 1995).

AF-ben nem csupán a pitvarok szabályos elektrofiziológia aktivitása szűnik meg, hanem a kontraktilis funkció is. Összehúzódás híján a pitvarokban pangó vér (*stasis*), a prothrombotikus anyagok keletkezésének növekedése és az endogén antikoagulánsok csökkent termelődése következtében vérrögök (thrombusok) képződnek, amelyek nemritkán súlyos neurológiai (maradvány) tünetekkel járó ischaemiás szélütést (cerebrovascularis thromboemboliát, stroke-ot) okoznak. Az AF fennállására a betegek 20%-ában csupán az agyi érkatasztrófa bekövetkezte után derül fény. Ez a tény azért is szomorú, mert a cardiogen thromboembolia a ritmuszavar idejekorán diagnosztizálásával és antithrombotikus kezeléssel a betegek jelentős részében megelőzhető lenne. Az utóbbi esztendők klinikai vizsgálatainak egyik fő tanulsága, hogy a stroke-veszély gyakorlatilag ugyanolyan nagy paroxysmalis és perzisztens AF-ben, mint permanensben.

Az AF kórélettanának megismerése rendkívül sokat fejlődött az elmúlt 20 évben, melynek során bekerült a köztudatba az atrialis remodelling, azaz a pitvari átépülés fogalma (Nattel, 1999b). Minden, az AF során előálló pitvari strukturális/szerkezeti, funkcionális/elektrofiziológiai és szignáltranszdukciós/biokémiai elváltozást összefoglalóan pitvari remodellingnek nevezünk. A pitvari remodellingnek számos (részben a kiváltó alapbetegségtől függő) formája/típusa van, mindemellett közös jellemzőjük, hogy elősegítik az AF kiújulását, perzisztenciáját, tartós (*long-standing*) perpetuációját vagy állandósulását. Lényegében véve, az AF is azokon a kamraizomzatban/szívizomsejtekben is megfigyelhető, mindenkitől ismert szívritmuszavar-keltő/fenntartó mechanizmusokon alapul, melyeket az **2. ábra** szemléltet. Pitvarfibrillációt egyaránt okozhat gyors pitvari ektópiás tevékenység, soliter vagy repetitív extrasystolia vagy ún. reentry-aktivitás.

Az AF-et kiváltó, többnyire funkcionális (*multiple wavelet*)-reentry iniciálásában és a ritmuszavar tartós fennmaradásában is, a repetitív pitvari ektópiás aktivitásnak/extrasystoliának kulcsfontosságú szerepe van. Minél hosszabb ideje áll fenn az AF, annál kifejezettebb az atrio-endomyocardialis és neurális (Lu, 2008; Sheng, 2011) remodelling, s több éve tartó permanens AF-ben az „átépülés” már oly mértékben progrediált, hogy a pitvarüregek kitágulnak, a pitvarizomfal pedig kötőszövet-szaporulat miatt egyre merevebb lesz (fibromyocardialis átalakulás). *Chen és mtsai* nemcsak spontán kóros automáciára vagy triggerelt aktivitásra képes szívizomsejteket találtak kutyák pulmonális vénák (PV)-szájadékaiban (a PV-ostiumokban) és a visszerekbe betüremkedő

szívizomnyelvekben, hanem olyasféle reentry-mechanizmust is, aminőt AF-ben szenvedő betegek PV-régióiban is kimutattak (Chen, 2001).



2. ábra. A pitvarfibrilláció kialakulásában és fennmaradásában szerepet játszó főbb tényezők.

Mindent összevéve, a venoatrialis AF-et elindító extrasystolek (ES-k) patofiziológiai hátterében három aritmogén mechanizmus állhat: i) kóros automatizáció; ii) reentry; iii) triggerelt aktivitás. Utóbbi lehet a PV-szájadékokból kiinduló spontán ES (fokális AF), amelyet ún. késői (DAD = *delayed afterdepolarization*) és/vagy korai (EAD = *early afterdepolarization*) utódepolarizáció indukál.

A kialakult/már meglévő pitvari remodelling további komplex (e helyütt nem részletezett) elektrofiziológiai és patobiokémiai mechanizmusokon keresztül elősegíti az AF további fennmaradását megalapozó ektópiás és/vagy reentry aktivitást. Számos kórfolyamat/betegség létezik, amely megváltoztatja a pitvarsejtek és a pitvari myocardium elektroanatómiai és elektrofiziológiai tulajdonságait, igaz jelen értekezésnek ezen kórformák számbavétele nem célja. Általában véve, állatkísérletes és klinikai vizsgálatok alapján a pitvari remodelling két alapformáját különböztetjük meg. Az egyik a pitvari tachycardiától/tachyaritmiától indukált típus, amely elsősorban elektromos remodelling (ATR = *atrial tachycardia-induced remodeling*), és amelyet klinikai körülmények között tachyaritmiák (AF, pitvarlebegés, paroxysmalis szupraventrikuláris tachycardiák) váltanak ki; a másik a pangásos szívelégtelenséghez vagy a kamraizomzat kötőszövet szaporulattal (fibrosissal) és telődésgátlással járó megbetegedéseire (mint amilyen például a hipertensio) társuló pitvari strukturális remodelling (ASR=*atrial structural remodeling*). A két „remodelling-forma” éles disztinkciója magától értődően nagyon nehéz, hiszen az itt és később felvázolt (elektro)patofiziológiai folyamatok kart karba öltve járnak.

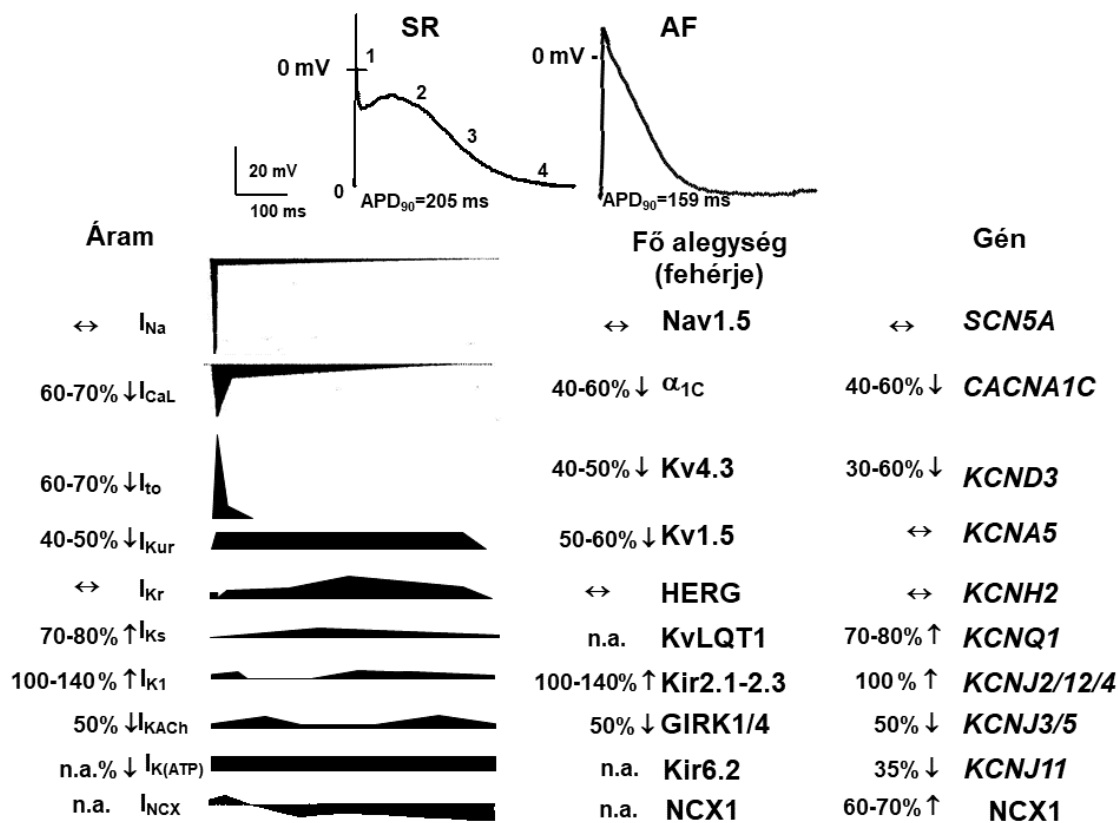
Az a megfigyelés, hogy már a néhány hétig *folyamatosan* fennálló AF is képes gyökeresen megváltoztatni a pitvar elektrofiziológiai tulajdonságait és facilitálja a tachyaritmia fennmaradását és/vagy állandósulását, az *Allessie* vezette maastrichti munkacsoport „mérőldkőnek” tekinthető elektropatológiai/elektrofiziológiai felfedezése volt (Wijffels, 1995). Már céloztunk arra, hogy az ATR-rel indukált AF elsősorban elektromos remodellinget idéz elő (Nattel, 1999b). Jelenlegi ismereteink birtokában egyelőre nem tudjuk, hogy az *ún. long-standing* perzisztens és a permanens AF okozta „remodelling-formák” között milyen (mikro)elektrofiziológiai és hisztopatológiai hasonlóságok és különbségek vannak, de az nyilvánvaló, hogy az elektroanatómiai átépülés (sejtszintű és szubcelluláris) jellemzőit nagymértékben befolyásolja a szív-ér rendszeri alapbetegség (Burstein, 2007).

Fontos megértenünk ennek a komplex pitvari remodelling folyamatnak a lefolyását, amelynek első eleme az *ún. elektromos remodelling*, amelynek az alapja az, hogy pitvarfibrillációban a gyors frekvencia következtében értelemszerűen megváltozik a pitvarok elektrofiziológiai aktivitása, például lerövidül az APD és ERP, valamint számos ionáram tulajdonsága megváltozik (**3. ábra**). Elsősorban arra kell gondolnunk, hogy a betegség következtében megváltoznak az adott ionáramok tulajdonságai.

Ismert, hogy a kamrai szívbetegségeknél (például cardiomiopátiák, vagy szívelégtelenség) számos áram vagy felerősödik, vagy legyengül (*up-* illetve *downregulálódik*), vagy ami szintén gyakori, megváltozhatnak az áramok kinetikai tulajdonságai vagy akár gyógyszerérzékenységük. Számos irodalmi adat ismert arról, hogy krónikus/permanens pitvarfibrillációban (cAF) jelentősen lecsökken (mintegy 60-70%-al) az L-típusú kalciumáram denzitása (I_{CaL}) ami megváltoztatja a szívizomzat Ca^{2+} -homeosztázisát (Sun, 1998; Skasa, 2001). A csökkenés kimutatható egyaránt funkcionális áram (Van Wagoner, 1999; Christ, 2004) és molekuláris (mRNS és fehérje expressziók) szinten (Brundel, 1999; Lai, 1999; Schotten, 2003a; Christ, 2004; **3. ábra**). Az ATR a Ca^{2+} -homeosztázis károsítása révén mindenkor rontja a pitvarok systoles/kontrakciós és diastoles/relaxációs funkcióját (Sun, 1998). A pitvarüregtágulat tovább növeli a reentry körök keletkezésének valószínűségét (nagyobb a rendelkezésre álló endomyocardialis „szívizomterület”, több szimultán funkcionális reentry keletkezésének adottak a feltételei) és az újraingerlődés perpetuációját.

A L-típusú kalcium áram megváltozásán kívül perzisztens AF-ben akár 100%-an megemelkedik a befelé egyenirányító káliumáram amplitúdója (I_{K1}) is. Mindkét áram remodellingje esetében a változásokat igazolták a natív áram, illetve a csatornákat alkotó

vagy kódoló fehérje és mRNS szintekben is (Bosch, 1999; Brundel, 1999; Dobrev, 2001; Gaborit, 2005).



3. ábra. A pitvari akciós potenciált létrehozó kationáramok emberi pitvarsejtekben szinuszritmusban (SR) és pitvarfibrillációban (AF); ez az ún. „ioncsatorna-remodelling”. Az áramok intenzitásának százalékban kifejezett változása az ábra bal oldalán, az ioncsatornákat alkotó fő fehérje-alegységeké középen, a kódoló géneké az ábra jobb oldalán látható. A piktogramok az áramerősség akciós potenciál alatti időbeli változását szemléltetik (a méretarány hozzávetőleges figyelembevételével). n.a. = nincs irodalmi adat.

Nem zárható ki, hogy a betegség következtében egy adott áram teljesen megváltozzon, például csak adott kóros körülmények között váljék aktívvá. Ez elsősorban a különböző ligandfüggő áramoknál feltételezhető, mert ilyenkor sokkal inkább elképzelhető, hogy a betegség megváltoztatja azt a nemritkán bonyolult komplex mechanizmust, amelynek révén a ligand szabályozza az áramot. Ilyen áram lehet például a csak a pitvarban aktív G-protein által szabályozott acetilkolin szenzitív befelé egyenirányító káliumáram, az $I_{K,ACh}$ is (Heidbüchel, 1990). A paraszimpatikus/vagus-izgalom kapcsán felszabaduló acetilkolin (ACh) serkenti a pitvarok muszkarinerg receptorait (M-receptorok) és aktiválja az $I_{K,ACh}$ -áramot (Yamada, 1998). Eddig az volt az uralkodó álláspont, hogy az $I_{K,ACh}$ -áram a ligand (ti. az ACh) kötődése és stimulációja nélkül inaktív/zárt. Másfelől, régóta tudjuk, hogy az efferens vagus-idegvégződésekből a pitvar különböző régióiban eltérő mennyiségben felszabaduló ACh hatására a fiziológiásan is meglévő repolarizációs

egyenlőtlenséghez inhomogén pitvari APD és ERP társul, amely tovább növeli a pitvari repolarizáció diszperzióját (Liu, 1997). *Philippe Coumel* (1935-2004), a nemrégiben elhunyt briliáns párizsi kardiológus munkatársaival már 1978-ban leírta az utóbb róla elnevezett vagalis paroxysmalis AF-et, amely rendszerint 30-50 éves, makroanatómiailag ép szívű férfiakban, éjszaka/alvás közben vagy étkezés után, pihenés alatt jelentkezik (Coumel, 1978). A Coumel-AF-nek az is klinikai jellegzetessége, hogy a rohamot általában kifejezett sinus-bradycardia és/vagy valamilyen „vagomimetikus” esemény/manőver (például köhögés, nyelés, bőfögés, az alvás vagotoniás időszaka; a carotistájék kompressziója, Valsalva-kísérlet) előzi meg/váltja ki (Yeh, 2007). Ha a Coumel-AF fellépett, az „átvezetett” kamrafrekvencia általában nem nagy („bradyaritmiás AF”). Magától értődően, logikusnak látszott a kérdésfeltevés, vajon az AF fellépését és/vagy fennmaradását modulálja-e az $I_{K,ACH}$ -áram funkcióváltozása/”remodellingje”?

Az $I_{K,ACH}$ -áram vizsgálata az Ursula Ravens professzor asszony által vezetett Drezdai Egyetem Farmakológiai és Toxikológiai Intézete munkatársainak központi kutatási témája volt. Ennek következtében 2000 óta számos publikáció jelent meg az AF remodelling témakörben a drezdai munkacsoport kutatóitól. *Dobrev és mtsai* 2001-ben kimutatták, hogy a cAF-ben az I_{K1} -áram „upregulációjával” párhuzamosan az $I_{K,ACH}$ működését determináló GIRK4 fehérje expressziója csökken, ezért korábban kizárólag az I_{K1} upregulációjával és az I_{CaL} downregulációjával magyarázták az elektromos remodellingben megfigyelhető APD rövidülést (Dobrev, 2001). Az $I_{K,ACH}$ csökkenést akkor úgy értelmezték, hogy ez a pitvari sejtek védekező, adaptációs mechanizmusának eredménye, amelynek következtében a csökkent $I_{K,ACH}$ így valamennyire ellensúlyozhatja az APD megrövidülést (Dobrev 2001 és 2003). Ennek a kísérletsorozatnak a magyarázatát azonban a szerzők sem találták feltétlenül kielégítően egyértelműnek, és felvetik egy alternatív megoldás lehetőségét.

A drezdai munkatársak és mások is igazolták, hogy cAF-ben az I_{K1} áram funkcionálisan upregulált (Dobrev, 2001), és ezzel párhuzamosan az áramot meghatározó Kir2.1 izoform fehérje és mRNS szintje is megemelkedett (Dobrev, 2002; Girmatsion, 2009). Mindez azt jelenti, hogy ez a megemelkedett háttér I_{K1} áram mindenképpen jelentős APD megrövidítő hatással rendelkezik. Természetesen felmerül egy alternatív magyarázat is. A háttér alapáram megnövekedéséhez ugyanis hozzájárulhat egy megváltozott $I_{K,ACH}$, illetve az ATP-függő befelé egyenirányító K^+ -áram is (I_{KATP}). Ezt a két áramot klasszikus *voltage-clamp* módszerekkel vizsgálva ugyanis nem lehet szétválasztani a Kir2.x csatornák által alkotott I_{K1} áramtól. Ezekben a dolgozatokban annak idején pont azért úgy beszéltek erről az áramról, háttér-alpáram („*basal current*”) és nem, mint I_{K1} áram. A dolgozat

diskussziójában maguk a szerzők is kiemelték, hogy tisztán elméleti alapon a cAF indukálta háttér áram megemelkedését nem lehet feltétlenül csupán az I_{K1} betegség indukálta *upregulációjával* megmagyarázni, hanem az is lehetséges, hogy az cAF következtében megváltozhatnak az M-receptorok aktivitása, amelynek következtében az $I_{K,ACh}$ csatornák akár vagus izgalom nélkül is spontán aktivitást mutatnak (Dobrev, 2001 és 2002). Egy korábbi tanulmány már kimutatta, hogy egy hetes tachypacelt kutya modellben izolált pitvari sejtekben jelent volt egy konstitutíven aktív $I_{K,ACh}$ -szerű áram (Cha, 2004; Ehrlich 2004).

Jelen vizsgálatsorozat egyik célja a permanens pitvarfibrilláció indukálta „ionszintézis” remodelling jellemzése. Vizsgálataink két irányba indultak. Az első cél az volt, hogy megállapítsuk mi a G-protein által szabályozott acetilkolin-szenzitív káliumáram ($I_{K,ACh}$) szerepe a pitvari elektromos remodellingben krónikus hosszan tartó AF-ben szenvedő betegektől származó miocitákban. A másik cél egy kísérletes permanens pitvarfibrillációs modell kiépítése valamint *in vivo* és *in vitro* elektrofiziológiai elemzése lehetőleg egy olyan az emberéhez hasonló elektrofiziológiai profillal rendelkező nagytű emlősben, mint amilyen a kutya.

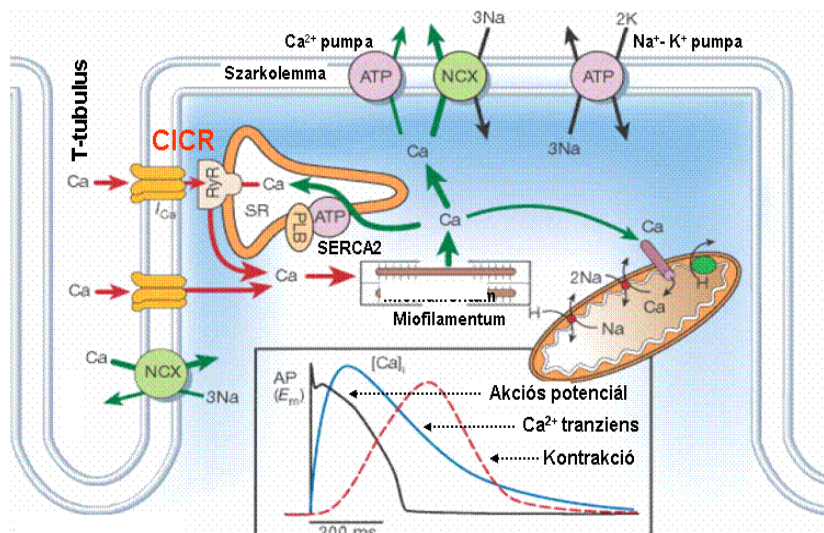
4. témakör: Az NCX gátlás lehetséges antiaritmiás hatásmechanizmusának vizsgálata emlősszöveteken

Az élet fenntartásához nélkülözhetetlen szívperctér fogat biztosításának alapvető feltétele a szívizomzat megfelelő mechanikai aktivitása, valamint az összehúzó és elernyedés precíz időbeli/térbeli szervezése. A szívizom szinkronizált összehúzóását a szívsejteken végig terjedő elektromos depolarizáció (akciós potenciál, AP) iniciálja. A szív *kellően gyors kontrakcióját* a szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának lökésszerű emelkedése (Ca^{2+} tranziens), a szívkamrák megfelelő telődése szempontjából ugyancsak kiemelkedő fontosságú, *kellően gyors relaxációját* a systole alatt megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ ugyancsak gyors, diastoles szintre történő csökkenése biztosítja.

Amennyiben a szívkontrakció és/vagy -relaxáció komplex, precízen szabályozott mechanizmusai tartósan sérülnek, súlyos, életveszélyes állapot alakulhat ki, amely külső, terápiás beavatkozás hiányában általában halálhoz vezet.

A kontrakció-relaxáció (mechanikai) ciklus-szabályozása tehát szorosan kapcsolódik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) dinamikus szabályozásához (Ca^{2+} homeosztázis), melynek legfontosabb komponenseit és lépéseit az **4. ábra** foglalja össze. A depolarizáció során a szívizomsejtekbe az extracelluláris térből -elsősorban az L-típusú Ca^{2+} -csatornákon keresztül- Ca^{2+} áramlik be (Bers, 2002a). Ez a (trigger) Ca^{2+} az

intracelluláris tér speciális, Ca^{2+} raktározó kompartmentjéből, a szarkoplazmatikus retikulumból (SR_e), annak Ca^{2+} csatornáinak (ryanodin receptor, RyR) megnyitásával további, sokkal jelentősebb mértékű Ca^{2+} felszabadulást indukál (CICR: Ca^{2+} induced Ca^{2+} -release).



4. ábra. A kamrai szívizomsejtek Ca^{2+} -homeosztázisának sémája és fontosabb transzportfolyamatai. A piros nyilak a kontrakciót kiváltó Ca^{2+} -mozgásokat, míg a zöld nyilak a relaxációt megalapozó, a szabad Ca^{2+} citoszólból történő eltávolításáért felelős mechanizmusokat jelzik. A fiókábra az akciós potenciál (AP), az intracelluláris Ca^{2+} -szint (Ca^{2+} -tranzienst) változása és a kontrakció létrejöttének időbeliségét mutatja. (ATP = ATPáz; NCX = $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus; PLN = foszfolamban; RyR = ryanodin-szenzitív Ca^{2+} -csatorna; SR = szarkoplazmatikus retikulum (Bers, 2002a alapján módosítva).

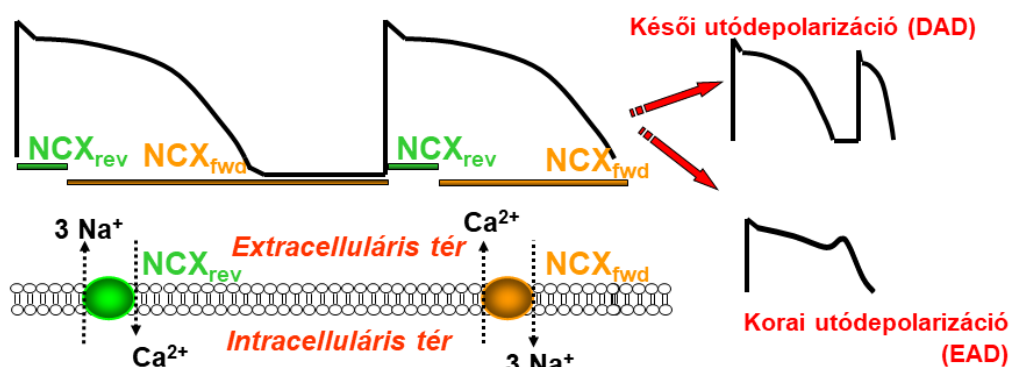
A külső és belső eredetű $[\text{Ca}^{2+}]_i$ összessége képezi az intracelluláris Ca^{2+} tranziens. A megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a regulációs troponin fehérjéhez kötődve lehetővé teszi a miozin és aktin molekulák relatív elmozdulását, amely makroszkopikus szinten összehúzódásban nyilvánul meg (Bers 2002a és 2002b). A megfelelő sebességű relaxáció elengedhetetlen feltétele a citoplazma systole alatt megemelkedett Ca^{2+} -szintjének gyors renormalizálása. Ennek két kritikus szereplője a plazmamembrán $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélője (NCX1) és az SR_e Ca^{2+} pumpája (SERCA2). Míg az előbbi kipumpálja a „felesleges” (trigger) kalciumot a sejtől (Ca^{2+} -extrúzió), az utóbbi visszajuttatja az intracelluláris raktárba, az SR_e -be, az onnan kiáramlott Ca^{2+} mennyiséget (Bers, 2002a és 2002c).

A szívizomsejtek további Ca^{2+} -transzporterei, a szarkolemma Ca^{2+} -pumpája (PMCA), és az energiatermelő mitokondriumok Ca^{2+} -transzportereinek szerepe az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában normális szív működés esetén elhanyagolható (Choi, 1999). A szív egyensúlybeli „beat-to-beat steady state” működése szempontjából kritikus jelentőségű, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatornán keresztül bejutó és az

NCX által eltávolított, illetve az SRe-ből felszabaduló, a SERCA2 által ugyanoda visszapumpált kalcium mennyisége minden egyes szív ciklus során pontosan megegyezzen (Eisner, 2000).

Emlősökben három NCX variáns található, melyek mindegyikét külön gén kódolja. Az NCX1 sok sejt típusban megtalálható, legnagyobb mértékben azonban szívizomban, agyban és vesében fordul elő. Az NCX2 elsősorban agyszövetben, az NCX3 pedig a vázizomban és az agyban expresszálódik (Tóth, 2009). Maga az NCX1 molekula kilenc transzmembrán szegmensből és egy nagy intracelluláris hurokból áll, mely a teljes fehérje több mint 50%-át alkotja (Bers, 2002d). Itt integrálódnak a transzporter aktivitását szabályozó fontos mechanizmusok.

A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus passzív folyamat, energetikai háttérét a Na^+/K^+ pumpa biztosítja. A transzport iránya reverzibilis, azaz az NCX-nek két alapvető transzport módja van, Ca^{2+} eltávolító (*forward*: Ca^{2+} leadás, Na^+ felvétel), illetve Na^+ eltávolító (*reverse*: Ca^{2+} felvétel, Na^+ leadás) jellemző (5. ábra).



5. ábra. Az NCX áram két transzport módjának sematikus ábrázolása egy szív akciós potenciál alatt. Az NCX áram reverz módja (zöld színnel jelölve) csak az AP kezdeti fázisában aktív, és 3 Na^+ ion cserél ki a sejtől 1 Ca^{2+} -iont behozva sejtbe, és így *outward* áramot eredményez. Az NCX áram *forward* módja (narancs színnel jelölve), pedig fordított irányú, vagyis 3 befelé haladó Na^+ -iont cserél ki egy kifelé haladó Ca^{2+} -ionra, amely így egy nettó *inward* áramot eredményez. Ca^{2+} -túltöltődés esetén ez korai (EAD) de főleg késői (DAD) utódepolarizációhoz vezethet.

A transzport nem elektroneutrális ($1 \text{ Ca}^{2+} \leftrightarrow 3 \text{ Na}^+$), a Ca^{2+} -ionok eltávolítása pozitív töltésbeáramlással, azaz depolarizációval jár, melyet normál, *steady state* körülmények között a Na^+/K^+ pumpa által generált ellenkező irányú töltésáramlás ($3 \text{ Na}^+ \leftrightarrow 2 \text{ K}^+$) kompenzál. Az NCX áram pillanatnyi irányát a membránpotenciál (E_m) és az NCX egyensúlyi potenciálja (E_{NCX}) pillanatnyi értékeinek különbsége határozza meg. Ha ez negatív, Ca^{2+} -leadás, befelé irányuló áram és depolarizáció, ha pedig pozitív, Ca^{2+} -felvétel, kifelé irányuló áram és repolarizáció jön létre (Bers, 2002c). Normál körülmények között ez a potenciálkülönbség csak a szív ciklus rövid kezdeti fázisában pozitív (*reverse transport*: Ca^{2+} -felvétel), a szív ciklus további fázisai (plató és repolarizációs fázisok, diastole) alatt

negatív (*forward transport*, Ca^{2+} -leadás). A transzport fluxussebességét számos fiziológias tényező modulálja.

A legalapvetőbb szabályozó mechanizmus a Ca^{2+} -*dependens aktiváció*, amely az $[Ca^{2+}]_i$ tartós, nagymértékű emelkedése esetén lehetővé teszi annak fokozott eltávolítását. Ezzel szemben nagyon magas $[Na^+]_i$ gátolja az NCX működését (Na^+ -*függő inaktiváció*) (Bers, 2002c, 5. ábra). A transzport pH érzékeny, a $[pH]_i$ csökkenése (acidózis) erősen gátolja. Számos további celluláris NCX1 modulátor mechanizmus ismert, például PKA, PKC, foszfolemman (mely az NCX1-en kívül a Na^+/K^+ pumpát is az ellentétes irányban modulálja), sorcin, *stb.*, és bizonyítékok vannak egy NCX1 regulációs makromolekuláris komplex létezésére is (Bers, 2002c).

Aritmiás szív működést számos külső és belső faktor hozhat létre vagy tarthat fenn. Néhány aritmiatípus közvetlenül kapcsolódik a Ca^{2+} -homeosztázis zavaraihoz, így az NCX1 kóros működéséhez is (triggerelt aritmiák). Más esetekben (például a pitvarfibrillációt létrehozó ún. „aritmogén szubsztrát” kialakulásához vezető „celluláris remodelling” folyamatok inicializálásában) az intracelluláris Ca^{2+} -*túltelítődés* (Ca^{2+} -*overload*) inkább patológiás szignálnak tekinthető. Sejtszinten Ca^{2+} -függő aritmiák leginkább Ca^{2+} -túltelítődés következtében jönnek létre, mely abnormális membránpotenciálok -korai, illetve késői utódepolarizációs potenciálok (EAD, DAD)- kialakulásában is megnyilvánul. Ezek halmozott kialakulása jelentősen csökkenti a szívkontrakció erejét és gyakran vezet halálos kamrafibrillációkhoz (hirtelen halál szindróma) (Ter Keurs, 2007).

Összefoglalva az előzőeket a következő fontos elemeket kell kiemelnünk. *Forward* módban az NCX cseremechanizmus három befelé haladó Na^+ -iont cserél ki egy kifelé haladó Ca^{2+} -ionra, és így egy nettó *inward* áramot eredményez, amely különösen megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -szint esetében korai vagy főleg késői utódepolarizációkat eredményez (EAD és DAD). Közismert, hogy az EAD és DAD típusú utódepolarizációknak fontos szerepet tulajdonítanak az aritmogenezisben (Yang, 1996; Volders, 2000; Pogwizd, 2002), különösen abban az esetben, ha a kálium konduktancia csökkent, mint például szívelégtelen állapotokban (Pogwizd, 2001).

Ennek megfelelően a különböző tachyaritmiás állapotok (kamra- de különösen pitvarfibrilláció) kialakulásában és fenntartásában is alapvető komponens az NCX1 fokozott működése következtében kialakuló intracelluláris Ca^{2+} -túltelítődés, mely proteázok aktiválásán keresztül hozzájárul a strukturális és elektromos remodellinghez, a pitvarfibrillációra jellemző „aritmogén szubsztrát” gyors kialakulásához. Szervszinten a Ca^{2+} -függő aritmiák (*Torsades de Pointes*, kamrai tachycardiák) elsősorban az AP terjedése

során fellépő szöveti irregularitások, mikro- és/vagy makroheterogenitások (strukturális/funkcionális reentry) következtében keletkeznek, melyet az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis fokális regulációs zavara idéz elő. Így az NCX1 *forward* módjának farmakológiai gátlása új terápiás lehetőséget jelenthet a pitvarfibrilláció ill. Ca^{2+} -dependens kamrai aritmiák kezelésében (Pogwizd, 2002 és 2003). Hatékony és szelektív NCX gátlószerek hiányában ennek a hipotézisnek az ellenőrzése és igazolása nem volt lehetséges. Az eddig ismert néhány szelektívnek vélt NCX gátlók, mint például a KB-R7943 vagy SEA-0400, sajnos nem voltak megfelelő vegyületek, mert különösen magasabb koncentrációkban mindkét szer nemcsak az NCX áramot, hanem az L-típusú kalcium csatornát is gátolják (Birinyi, 2005; Acsai, 2007; Antoons, 2012). Így különböző iszkémia-reperfúzió indukálta Ca^{2+} -tútelítődés aritmia kísérletekben bizonyult védő hatásukat nem lehet kizárólagosan az NCX gátló hatás eredményeként interpretálni (Watano, 1999; Elias, 2001; Magee, 2003; Antoons, 2012).

Mindez azt jelenti, hogy továbbra is empirikus maradt a Pogwizd hipotézisnek az igazolása, hogy vajon a szelektív NCX gátlás hatékony lehet a Ca^{2+} -tútelítődés talaján keletkező EAD és DAD típusú triggerelt aritmiák kezelésére.

Nemzetközi és hazai partnerekkel végzett kooperációs kutatási projektben sikeresen megvizsgáltunk néhány szelektívnek gondolt hatékony NCX gátlót (ORM-10103 és GYKB vegyületek) *in vitro* és *in vivo* jellegű kutya és tengerimalac kísérletekben. Ezenkívül szintén nemzetközi ko-operációban megvizsgáltuk az NCX áram szerepét sinus-ritmusos, illetve permanens pitvarfibrilláló betegek szívéből származó humán pitvari szívizomsejtekben.

Célkitűzések

Elsődleges célkitűzésem **négy, elméleti és klinikai szempontból egyaránt fontos kérdéskör** vizsgálata volt:

1. *In vitro* elektrofiziológiai módszerekkel (standard mikroelektróda és patch-clamp technikák) tisztázni számos új vagy régi fejlesztésű antiaritmiás hatású gyógyszer és gyógyszerjelölt vegyület celluláris mechanizmusát különböző (kutya, tengerimalac, nyúl és egészséges emberi) emlősszíveken.
2. *In vitro* kísérletes elektrofiziológiai módszerekkel megvizsgálni a szív repolarizációját meghatározó káliumáramok közötti kölcsönhatásokat, és azon belül is a K^+ -áramok szerepét a szív repolarizációs adaptációs mechanizmusában (repolarizációs tartalék) emlősszíveken.
3. *In vitro* és *in vivo* elektrofiziológiai módszerekkel megvizsgálni a hosszan tartó permanens pitvarfibrilláció (cAF) patofiziológiai hatásait (például az cAF okozta remodelling hatásait), valamint a pitvarfibrilláció kivédésének új kamrai proaritmiamentes farmakológiai lehetőségeit emlősszíveken.
4. *In vitro* és *in vivo* jellegű elektrofiziológiai módszerekkel megvizsgálni a nátrium-kalcium cseremechanizmus (NCX) antiaritmiás támadáspontként történő gyógyszeres befolyásolhatóságának lehetőségeit emlősszíveken.

Ennél fogva MTA doktori értekezésem *Eredményeit* és azoknak *Megbeszélését* ebben a négy témakörbe csoportosítva mutatom be a következőkben:

1. **témakör.** Különböző antiaritmiás szerek celluláris hatásainak vizsgálata emlősszíveken
2. **témakör.** A szívizom repolarizációjában részt vevő különböző K^+ -csatornák kölcsönhatásának vizsgálata. A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége emlős kamraizmon
3. **témakör.** A pitvarfibrillációs remodelling celluláris hatásmechanizmusainak vizsgálata emlősszíveken
4. **témakör.** Az NCX gátlás lehetséges antiaritmiás hatásmechanizmusának vizsgálata emlősszíveken

Módszerek és anyagok

Vizsgált speciesek és etikai engedélyek

A vizsgálatokat kísérletes állatok (kutya, nyúl, tengerimalac) és emberi szívekből származó pitvari és kamrai preparátumokon végeztük.

Kísérletes állatok

Kezeletlen felnőtt 8-20 kg súlyú keverék kutyákat, 1.5-2 kg súlyú új-zélandi házinnyulakat, illetve 300-500 g súlyú tengerimalacokat használtunk. A kísérleti eljárások megfeleltek az Európai Közösség (2010/63/EU direktíva), illetve az USA laboratóriumi állatok tartására és felhasználására vonatkozó irányelveinek (USA: NIH publication no 86–23, revised 1985). Kísérleti protokolljaink rendelkeztek a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérletes Bizottsága (SZTE MÁB) (54/1999 OEj, I-74-66/2005 és I-74-6/2012 sz.), valamint a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (XIII./01031/000/2008 és XIII/1211/2012 sz.) engedélyeivel. Az állatokat a kísérlet előtt 400 NE/kg heparin iv. injekcióval kezeltük. Ezután a tarkóútással elkábított (nyúl vagy tengerimalac esetében), illetve 30 mg/ttkg nátrium pentobarbitállal vagy thiopentállal túlaltatott (kutya esetében) állatok szívét bal oldali thoracotomián át eltávolítottuk, és 4 °C hőmérsékletű fiziológiás tápoldatban átöblítettük.

Emberi preparátumok

Az emberi szívekből származó preparátumokat aortabillentyű beültetéshez használt egészséges emberi donorszívek nyesedékéből illetve szinuszritmusos vagy permanens pitvarfibrilláló koronária bypass műtéten átesett betegek szívéből származó jobb pitvari fülcsedarabkákból származtak. A szív kivétele előtt a szervdonor furosemid, dobutamin és plazma kivételével nem részesült más gyógyszerkezelésben. A kísérleti eljárások megfeleltek az Orvos Világszövetség (WMA) Helsinki Nyilatkozatának előírásaival (Cardiovascular Research 35:2-4, 1997; LAM 24:133-136, 2014), és rendelkeztek a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Orvosetikai Bizottsága (51-57/1997 OEj sz.), a Szegedi Tudományegyetem Orvosetikai Bizottsága (20/2004 sz.), a Drezdai Műszaki Egyetem Carl Gustav Carus Orvosi Kar Orvosetikai Bizottsága (EK790779 sz.), illetve az

Egészségügyi Tudományos Tanács-TUKEB (4991-0/2010-1018EKU-339/PI/010 sz.) megfelelő etikai engedélyeivel. A pitvari fülcsé nyesedékek felhasználásához rendelkezünk a betegek írásos engedélyével. A transzplantációs műtéthez szükséges billentyűk eltávolítása után megmaradt szívizomnyesedékeket, illetve a koronária bypass műtét során elnyert pitvari fülcsé nyesedékeket hideg (4-6 °C) kardioplégias oldatban tároltuk egészen az elektrofiziológiai vizsgálatok (preparáció illetve szívizomsejt izolálás) megkezdéséig.

Szívizomsejtek izolálása

Kísérletes állatok szívizomsejtjeinek izolálása

Kutya kamrai és pitvari sejtek izolálása

Kutya kamrai sejtek izolálása Langendorff perfúziós eljárással

Kamrai szívizomsejteket enzimatisz izolációs eljárással nyertünk. Az emésztéshez egy kellően nagy bal kamrai szegmenst használtunk, amely rendelkezett olyan artériás rendszerrel (például bal kamrai deszcendens ág vagy coronaria circumflexa), amelyet egy intravénás branül segítségével kanuláltunk, és egy 60 cm H₂O nyomáson beállított Langendorff berendezés segítségével meleg oxigéndús CaCl₂-t tartalmazó izolációs oldattal mostunk át, amíg a koronáriákból sikeresen kimostuk a vért. Ezután a következő oldatokkal perfundáltattuk a szövetet: i) Ca²⁺-mentes oldat kb. 10 percig; ii) mintegy 15 perc Ca²⁺-mentes oldat plusz kollagenáz (Sigma I típus vagy Worthington 2 típus, 0.66 mg/ml); iii) ezután hozzáadtunk még proteázt (Sigma, XIV típus, 0.12 mg/ml) és további 15-30 percig emésztettük a szövetet retrográd perfundálással. Az oldatokat folyamatosan melegítettük (37 °C-on) és oxigénnel buborékolattuk. Az enzimatisz perfúziót akkor állítottuk le, amikor egyértelmű jelelt láttuk a szövet emésztésének, amelynek a szövet képlékennyé válása volt a jele. Ezután az emésztett szövetet olló segítségével, kisebb néhány köbmilliméteres darabokra vágtuk, és kis méretű Berzelius poharakba helyeztük, amelybe 37 °C-ra melegített KB oldatot vagy az előbb említett Ca²⁺-mentes oldatot helyeztünk, amelyhez további 1.25 mM CaCl₂ és 0.1% BSA-t (szérum albumin Sigma V frakció) adtunk hozzá. A szövetet ezúttal is O₂-vel buborékolattuk. A mintegy 15 perces pihentetés után a szövetből a sejteket gyenge rázással, vagy triturálással bontottuk ki. A sejteket tartalmazó szuszpenziót ezután háromszor átszűrtük, illetve tisztítottuk, úgy, hogy mintegy 5-10 perc ülepités után leszívtuk a felülúszó folyadékot, és friss KB vagy Tyrode oldattal pótoljuk. A harmadik átszűrés után a KB oldatban helyezett sejteket 4 °C-n, a Tyrode oldatban helyezett sejteket pedig 12-14

°C tároljuk a kísérletek megkezdéséig. A két oldatban tárolt sejtek formájukban és tulajdonságaikban eléggé hasonlóak voltak.

A sejtek izolálásához a következő összetételű oldatokat használtuk (mM/l-ban):

- a) Ca²⁺ tartalmú izolációs oldat: NaCl 135, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, HEPES 10, NaHCO₃ 4.4, glukóz 10, taurin 20 és CaCl₂ 1.25 (pH 7.2 NaOH-al beállítva);
- b) Ca²⁺-mentes izolációs oldat: NaCl 135, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, HEPES 10, NaHCO₃ 4.4, glukóz 10 és taurin 20 (pH 7.2 NaOH-al beállítva);
- c) KB oldat: KOH 90, L-glutaminsav 70, taurin 15, KCl 30, KH₂PO₄ 10, MgCl₂ 0.5, HEPES 10, glukóz 11, és EGTA 0.5 (pH 7.3 KOH-al beállítva);
- d) Tyrode oldat: NaCl 144, KCl 4.0, NaH₂PO₄ 0.4, MgSO₄ 0.53, HEPES 5, glukóz 5.5, CaCl₂ 1.8 (pH 7.4 NaOH-val beállítva).

Kutya pitvari sejtek izolálása.

Kutya pitvari sejteket kétféle eljárással nyertünk.

i) Kutya pitvari sejtek emésztése az ún. „darabka” (chunk) izolációs eljárással

A jobb fülcsét 4 °C-os, 10 ml/L heparint (25000 NE) tartalmazó Ca²⁺ mentes izolációs oldatba tettük, majd apró darabokra vágtuk. Ezután a szövetdarabokat 37 °C-on a következő oldatokban kevertettük folyamatos O₂ buborékoltatás mellett: i) Ca²⁺-mentes izolációs oldat, amelyhez hozzáadtunk 10 ml/L Heparint (25000 NE) 2x5 percig; ii) Ca²⁺-mentes oldatba, amely 1.24 mg/ml kollagenázt (Worthington I. típus) és 0.4 mg/ml proteázt (Sigma XIV. típus.) adtunk hozzá (10 percig); iii) ez után az oldathoz 20 µM CaCl₂-t adunk és az emésztést további 30 percig folytattuk. A felülúszó eltávolítása után a szövetdarabokat tovább kevertettük Ca²⁺-mentes oldatba, amely 1.24 mg/ml kollagenázt (Worthington I. típus) és 20 µM Ca²⁺-ot tartalmaz. A szuszpenzióban a sejtek megjelenése után folyamatosan, 5-10 percenként mintát vettünk, 250 rpm-rel 2 percig centrifugáltuk és a sejteket tartalmazó pelletre 100 µM Ca²⁺ tartalmú normál Tyrode oldatot tettünk. A pitvari miocitákat szobahőn tároltuk.

ii) Kutya pitvari sejtek emésztése Langendorff szegmens perfúziós enzimátikus eljárással

A jobb pitvar perfúzióját a jobb arteria coronaria-ba vezetett branülön keresztül végeztük 60 cm magas Langendorff perfúziós berendezésen. A jobb pitvart a következő oldatokkal perfundáltuk: 1mM Ca²⁺ és 1 ml heparint tartalmazó izolációs oldattal (5 percig),

Ca^{2+} mentes izolációs oldattal (10 percig), Ca^{2+} mentes izolációs oldattal (40 percig), melyhez kollagenázt (Sigma I. típus, 0,54 mg/ml), 0.1% BSA-t (szérum albumin Sigma V frakció), a 15-ik percben proteázt (Sigma XIV. típus, 0.05 mg/ml) adtunk. Ezt követően a jobb pitvart levettük a berendezésről, apró darabokra vágtuk, és 1 mM Ca^{2+} , 1% BSA tartalmú oldatba helyeztük (15 percig pihentettük 37°C-on). A szövetdarabokat szuszpendáltuk és megkaptuk az izolált pitvari szívizomsejteket. Az egész izolációs eljárás alatt az oldatokat 100% O_2 -vel buborékolattuk, a hőmérsékletet pedig 37 °C-on tartottuk. A sejteket 10 percig ülepítettük, majd ezt követően eltávolítottuk a felülúszót és friss oldatot adtunk hozzá. Ezt a folyamatot 3 alkalommal megismételtük. A sejteket mérésig szobahőmérsékleten tároltuk.

Az izoláció során alkalmazott oldat (mM/l): NaCl 135, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, HEPES 10, glukóz 10, taurin 20, Na-piruvát 5; pH 7.2 (NaOH-val beállítva).

Nyúl és tengerimalac kamrai sejtek izolálása

Kamrai szívizomsejteket Na-heparinnal (400 NE/ttkg iv.) előkezelt nyulak és tengerimalacok szívéből kollagenáz enzimesszel izoláltunk. Az állatok kimetszett szívét hideg (4 °C) tápoldatba helyeztük, majd Langendorff-készülékben a koszorúereken keresztül 37 °C-os oxigenizált tápoldattal áramoltattuk át. A vér kimosása után (3-5 min) Ca^{2+} -mentes perfúziót alkalmaztunk (3-4 min), s a szív megállása után a tápoldathoz 0,33 mg/ml (90 E/ml) kollagenázt (Sigma I. típus) és 0.02 mg/ml proteázt (Sigma Pronase XIV. típus) adtunk 0.1% zsírsavmentes albumin jelenlétében. A perfúzió (15 ml/min) 15-ik percében a tápoldat Ca^{2+} -tartalmát 200 mM-al növeltük.

A 30-35 perces perfúzió befejezése után a szívet, melynek állománya az emésztés hatására képlékennyé vált, 10 percre olyan enzimmentes tápoldatba helyeztük, amelynek a Ca^{2+} -koncentrációját 1.8 mM-ra, albumin-tartalmát pedig 1%-ra emeltük. Ezután a szívet kis darabokra aprítottuk és óvatosan rázogattuk, hogy a szívizomsejteket az extracelluláris mátrixból kinyerjük. A szövetből így rázással majd szűréssel szétválasztott sejteket 10-14 °C-os Tyrode oldatban tároltuk.

Emberi kamrai és pitvari szívizomsejtek izolálása

Humán kamrai és pitvari szívizomsejteket hasonló eljárással nyertünk, mint amelyet a kutya kamrai és pitvari miociták izolálásánál alkalmaztunk, és amelyet az előző fejezetben ismertettem.

Izolált multicelluláris preparátumok

Az akciós potenciál-méréseket általában multicelluláris preparátumon végeztük, melyet emberi, kutya, nyúl és tengerimalac kamrából izoláltuk. Az emberi és állati szívpreparátumokat az előzőekben ismertetett módon szereztük be. Papilláris izmokat, trabekulákat és Purkinje rostokat a sejtizolálással párhuzamosan, a jobb kamrából, operációs mikroszkóp alatt izoláltunk. A preparátumot 40 ml térfogatú üvegkád kamrában 37 °C-os, oxigénnel telített Tyrode vagy Krebs–Henseleit oldattal perfundáltuk, illetve platina elektródokkal, kétszeres diastoles feszültségküszöb amplitúdójú négyszögimpulzusokkal folyamatosan stimuláltuk (Hugo Sachs Elektronik, model 215/II), és a Krebs–Henseleit oldatban legalább 60 percig hagytuk ekvilibrálódni.

Elektrofiziológiai vizsgálati módszerek

Árammérési protokollok izolált szívpreparátumokon

Mérések „whole cell” patch-clamp technikával

A sejteket egy inverziós mikroszkóp (Nikon TMS és Olympus IX51 típusúak) asztalához rögzített szervfürdőbe helyeztük, amit a legtöbbször normál fiziológiás hőmérsékletű (36-37 °C) Tyrode oldattal (NaCl 144, KCl 4.0, NaH₂PO₄ 0.4, MgSO₄ 0.53, HEPES 5, glukóz 5.5, CaCl₂ 1.8 (pH 7.4 NaOH-val beállítva) áramoltattunk át. Az ettől eltérő eseteket külön bemutatjuk. A mikropipettákat boroszilikátüveg kapillárisokból (Clark Electromedical) mikroprocesszor-vezérelt horizontális pipettahúzóval (Mecanex és Sutter Instruments) készítettük. A patch-clamp mikropipettákat különböző, az intracelluláris teret modellező oldatokkal töltöttük fel annak függvényében, hogy éppen milyen áramokat vizsgáltunk. Ezeknek részletes bemutatása az adott áram vizsgálati módszereit bemutató alfejezetnél később ismertetem. A pipetta feltöltését követően a mikroelektrod ellenállása 1.5–2.5 MΩ volt. Azon kísérletek eredményeit, ahol a soros ellenállás a mérés folyamán jelentősen megemelkedett, kihagytuk az értékelésből.

Az áramokat Axopatch 1D és Axopatch 200B (Molecular Devices) patch-clamp erősítőkkal mértük, egészsejtes (*whole-cell*) patch-clamp konfigurációban. A *gigaseal* kialakításához finom szívást alkalmaztunk, majd a pipetta alatti membránfoltot további szívással vagy rövid elektromos impulzusok alkalmazásával nyitottuk ki. A soros ellenállást jellemzően 50-80%-ig kompenzáltuk. A membránáramokat 5-20 kHz mintavételi frekvenciával számítógépesen vezérelt Digidata 1200-1400 típusú analóg-digitális

konverterekkel digitalizáltuk, majd *off-line* analízis céljára számítógépesen tároltuk. Az így tárolt áramméréseket szoftver segítségével (Axon pClamp 6.0-10.0 szoftvercsalád) értékeltük.

A következő protokollokat használtuk egy adott áram méréséhez:

Kálium áramok vizsgálata.

A következő típusú káliumáramokat vizsgáltuk: késői egyenirányító káliumáram gyors és lassú komponense (I_{Kr} és I_{Ks}), befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}), tranziens kifelé haladó káliumáram (I_{to}) és ATP szenzitív káliumáram (I_{KATP}). Az extracelluláris oldat ez esetben mindig fiziológiás hőmérsékleten perfundált normál HEPES pufferelt Tyrode oldat volt, amelynek összetétele (mM/l): (NaCl 144, KCl 4.0, NaH_2PO_4 0.4, MgSO_4 0.53, HEPES 5, glukóz 5.5, CaCl_2 1.8 (pH 7.4 NaOH-val beállítva). A pipetta oldat összetétele a legtöbb vizsgálat esetében a következő volt (mM/l): K-aszpartát: 100, KCl 45, K_2ATP 3, MgCl_2 1, EGTA 10, HEPES 5 (pH: 7.2, KOH-dal beállítva), amelynek következtében a mikropipetták ellenállása mintegy 2.0-2.5 M Ω volt.

Mivel az értekezésben bemutatott vizsgálatok több mint 20 éves időtartam alatt készültek, az alkalmazott pipetta oldatok összetételében voltak kisebb nem jelentős eltérések, amelyeket az értekezést megalapozó dolgozatokban részletesen bemutattunk. Az eltérések kizárólag a hozzáadott ATP, a K^+ vagy EGTA koncentrációban vannak, és ezeket az eltéréseket jellemzően a különböző specíesek részben eltérő káliumáramainak tulajdonságai indokolták.

A sejtek kapacitását egy 10 mV-os hiperpolarizáló pulzus segítségével mértük, miközben a sejteket -90 mV *holding potenciálon* (az a potenciálérték, amelyen a sejtet két egymást követő feszültséglépcső után tartjuk) tartottuk. A kísérletek során az L-típusú kalcium áramot (I_{CaL}) az extracelluláris oldathoz adott 250 μM CdCl_2 vagy 1 μM nisoldipin (Bayer AG, Leverkusen, Németország) blokkolta, a nátrium áramot (I_{Na}) pedig többnyire rövid -40 mV-os prepulzussal inaktiváltuk.

Az áramok jellemzéséhez többnyire megmértük az adott áramok amplitúdóit, illetve feszültségfüggő kinetikai paramétereit, amelyhez az áram-feszültség (I-V), fűrészfogszerű (*ún. ramp* protokoll), nyugalmi (*ún. steady state*) inaktiváció, inaktivációból történő visszatérés (*ún. recovery from inactivation*), illetve az „*envelope of tail test*” protokollokat alkalmaztuk. Ehhez klasszikus frekvenciafüggő négyszögjel, illetve bizonyos esetekben

akciós potenciálszerű impulzusokat használtunk. A protokollok ismertetése az Eredmények fejezetben a kísérletek bemutatásánál lesz egyenként részletezve.

Az I_{Kr} és I_{Ks} áramok szétválasztása:

Vizsgálatainkban a két áramkomponenst farmakológiai módon választottuk szét. Ehhez olyan blokkolókat használtunk, amelyekről korábbi vizsgálatok egyértelműen kimutatták, hogy szelektivitásuk az alkalmazott koncentrációkban megbízható. Ezért vizsgálataink során, amikor az I_{Kr} áramot mértük, akkor a kontroll oldat az L-735,821 (100 nM, Merck-Sharpe & Dohme, USA), chromanol 293B (10-30 μ M, Aventis Pharma) vagy HMR-1556 (0.5-1 μ M, Aventis Pharma) szelektív I_{Ks} blokkolókat tartalmazta. Ezzel ellentétesen, amikor az I_{Ks} áramot vizsgáltuk, akkor a kontroll oldat E-4031 (1-5 μ M, Gyógyszerkutató Intézet) vagy dofetilid (0.5-1 μ M, Sequoia Research Products) szelektív I_{Kr} blokkolót tartalmazott. Ez a kísérletes felállás lehetővé tette számunkra, hogy mindig a tiszta, ún. natív I_{Kr} vagy I_{Ks} áramot regisztrálhassuk anélkül, hogy más áramnak a rátevődő ("szennyeződő") hatása negatívan befolyásolná az eredményeket.

A Ca^{2+} áram ($I_{Ca,L}$) meghatározása

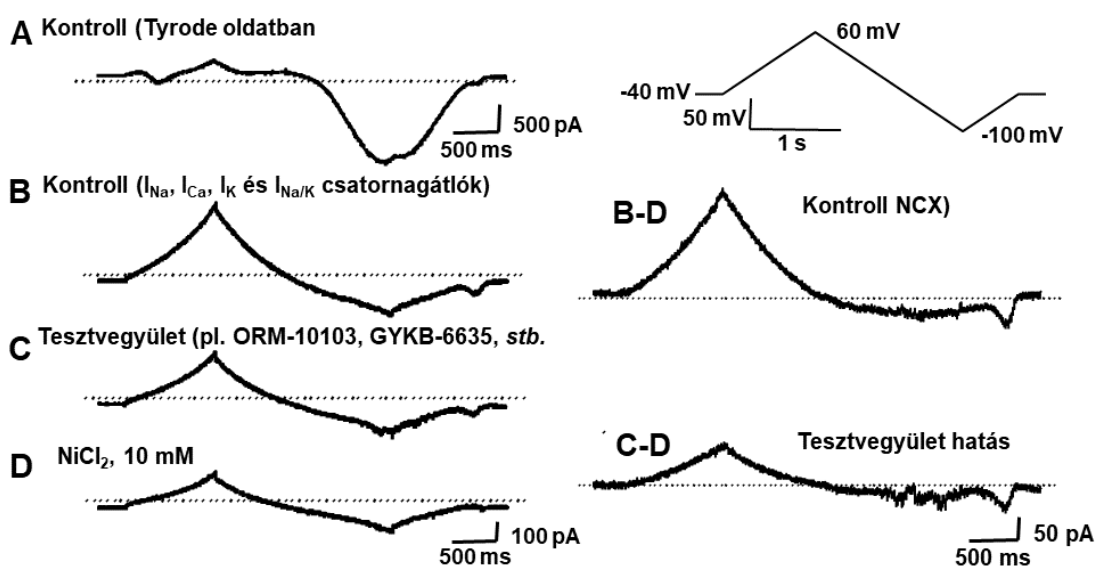
Az $I_{Ca,L}$ mérésére két módszert alkalmaztunk. Mindkét módszer széleskörűen alkalmazott az irodalomban. A két módszer lényege elvben ugyanaz, mégpedig az, hogy az $I_{Ca,L}$ mérésekor valamilyen módszerrel gátolnunk kell a kálium áramokat az extracelluláris és intracelluláris oldatban. Ennek megfelelően az extracelluláris oldat normál Tyrode oldat volt, amelyhez 3 mM 4-aminopiridint (4-AP) adtunk hozzá.

Kétfajta intracelluláris oldatot alkalmaztunk. Az első megközelítést használtuk a tedisamil vegyület $I_{Ca,L}$ áramra ható vizsgálat esetében. Az intracelluláris oldat tartalmazott káliumionokat, és egy ismert K^+ áramgátlót a tetraethylammonium-kloridot (TEACl). A pipetta oldat összetétele a következő volt (mM/l): KCl 110, KOH 40, K_2ATP 3, TEACl 20, GTP 0.25, HEPES 10, EGTA 10 (pH 7.2 KOH-al beállítva).

A második közelítésben az intracelluláris oldat teljesen K^+ -mentes volt, helyette CsCl-ot használtunk, amelyről ismert, hogy hatékony K^+ -áram gátlómolekula. A recept összetétele a következő volt (mM/l): CsOH 110, CsCl 20, TEACl 10, MgATP 5, EGTA 5, HEPES 10 és GTP 0.1, pH 7.2 aszparagin savval beállítva). Ezt a pipettaoldatot használtuk a dronedaron, az ORM-10103 és a GYKB-6635 vegyületek kalcium-áramra vonatkozó hatásainak vizsgálatakor.

A nátrium-kalcium csereáram (I_{NCX}) vizsgálata*NCX mérések depolarizáló ramp pulzus protokollokkal (Hobai protokoll)*

Az NCX áramot az irodalom alapján több protokoll segítségével szokták meghatározni. Kutatócsoportunk egy Hobai és mtsai (1997) által bemutatott eljárást követte, amelynek segítségével jól számszerűsíthetőek adott szerek NCX áramot moduláló hatása. Az áramot speciális K^+ -mentes extra és intracelluláris oldatokat használtunk, (összetételüket lásd alább), hogy gátoljuk a Na^+ , Ca^{2+} , K^+ és Na^+/K^+ pumpaáramokat.



6. ábra. Az NCX áram meghatározása a Hobai és mtsai (1997) módszerrel. **A. mező.** A piktogramban jelzett pulzusprotokoll segítségével történő áram regisztrálása normál kontroll Tyrode oldatban. **B. mező.** Kontroll áramgörbe felvétele úgy, hogy a speciális K^+ -mentes extracelluláris tápoldatban gátoljuk a Na^+ (lidokain-nal), Ca^{2+} (nisoldipin-nel), I_{Kr} (dofetilid-el), I_{Ks} (HMR-1556-al) és $I_{Na/K}$ (ouabain-nal) áramokat. **C. mező.** A tesztvegyületek (például ORM-10103, GYKB-6635, illetve SEA-400 vegyületek) hatásának monitorozása kb. 6-10 percen át. **D. mező.** A kísérlet terminálása. Áramfelvétel 10 mM $NiCl_2$ jelenlétében. **A jobb oldali mezők** mutatják be a vegyületek hatásának a megállapítását. A „B-D” görbe különbségárama felel meg az NCX árammérés kontroll értékének, amíg a „C-D” görbe különbségárama pedig a szerhatást jelenti.

A kifelé/befelé irányuló NCX áramokat először kontroll oldatban, majd 10 mM $NiCl_2$ tartalmú oldatban a *ramp* leszálló szárán, +40/-80 mV értékeknél határoztuk meg. Az NCX áramot az így kiszámított Ni^{2+} -érzékeny különbségi árammal jellemeztük. Ha egy adott tesztvegyület I_{NCX} áramra vonatkozó hatása volt a vizsgálat célja, akkor azt úgy határoztuk meg, hogy a kontroll mérések követően az áramot először a tesztvegyület jelenlétében (például SEA-0400, ORM-10103 illetve GYKB-6635), majd 10 mM $NiCl_2$ jelenlétében ismét megmértük. A gátlás mértékét a gátlószer után, illetve a gátlószer+ $NiCl_2$ után regisztrált áramok különbségével jellemeztük. Néhány tesztkísérletben ellenőriztük a tesztvegyület hatásának hiányát a Ni^{2+} -inszenzitív áramkomponensre.

A használt oldatok összetétele (mM/l):

K⁺-mentes extracelluláris oldat: NaCl 135, CsCl 10, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, BaCl₂ 0.2, NaH₂PO₄ 0.33, TEACl 10, HEPES 10, glukóz 10, ouabain 20 μ M, nisoldipin 1 μ M, és lidokain 50 μ M, (pH 7.4 NaOH-al beállítva)

Pipetta oldat: CsOH 140, aszparagin sav 75, TEACl 20, MgATP 5, HEPES 10, NaCl 20, EGTA 20 és CaCl₂ 10 (pH 7.2 CsOH-al beállítva).

NCX mérések a reverz NCX aktiváció alapján (Hilgemann protokoll)

A SEA-0400 vegyületnek a humán pitvari sejteken regisztrált NCX-áramra történő hatásának meghatározására nemcsak a *ramp* protokollal Ni^{2+} -szenzitív áramként történő módszert alkalmaztuk (Hobai, 1997), hanem egy Hilgemann (1992a és 1992b) által publikált protokoll segítségével is megvizsgáltuk. Az NCX áramot egészsejtes konfigurációban regisztráljuk úgy, hogy egy speciális Na-mentes oldatot alkalmazunk extracelluláris oldatként, amelyhez a Hobai (1997) módszerhez hasonlóan ezúttal is Na⁺- és Ca²⁺- csatorna (50 μ M lidokain és 1 μ M nisoldipin), illetve Na⁺/K⁺ pumpaáram (20 μ M ouabain) gátlókat adunk. A pipetta oldat összetétele is egyéni volt. Az NCX áram mérését -40 mV holding potenciálról kezdeményeztük, majd a reverz NCX (*outward* tartományban) áramot 20 másodpercig tartó 1 mM extracelluláris Ca²⁺-tartalmazó oldattal aktiváltuk. Ezután 3 percig Ca²⁺-mentes oldattal perfundáltuk a sejteket a következő reverz NCX áram aktivációig. Ekkor a sejteket 3 percig változó koncentrációban adagolt SEA-0400 vegyülettel perfundáltuk, majd a kísérlet végén egyszerre adagoltuk az 1 mM Ca²⁺ oldathoz maximális koncentrációban alkalmazott SEA-0400 vegyületet vagy 10 mM NiCl₂-ot.

A használt oldatok összetétele (mM/l):

K⁺-mentes extracelluláris oldat: LiCl 135, CsCl 10, NaH₂PO₄ 0.33, MgCl₂ 1, BaCl₂ 0.2, TEA-Cl 10, glukóz 10, HEPES 10, EGTA 0.5 (pH = 7.4).

Pipetta oldat: NaOH 100, CsOH 20, CaCl₂ 13, MgCl₂ 1.1, TEA-Cl 20, EGTA 50, MgATP 4, HEPES 50 (pH=7.0). Az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt 105 nM értékre állítottuk be (WEBMAXCLITE v1.15 szoftver segítségével).

A Na⁺/K⁺ pumpaáram ($I_{\text{Na/K}}$) meghatározása

A Na⁺/K⁺ pumpaáramot egy speciális protokoll segítségével vizsgáltuk. Az extracelluláris oldat összetétele (mM/l): NaCl 135, CsCl 2, KCl 5, MgCl₂ 1, CdCl₂ 0.2, BaCl₂

2, HEPES 5, glukóz 10, pH 7.4 (NaOH-al beállítva). Az $I_{Na/K}$ áram mértékét úgy határoztuk meg, hogy megmértük -30 mV feszültségen a nyugalmi (*steady-state*) különbség-áram értékét azután, hogy az extracelluláris oldatot olyan oldatra cseréltük, amely már nem tartalmazott 5 mM K^+ -ot. Egy adott szer hatását, pedig úgy határoztuk meg, hogy az adott szer jelenlétében megmértük ugyanezt a *steady state* áramkülönbséget, vagyis kivontuk a tesztvegyület (például ORM-10103) és az 5 mM K^+ jelenlétében felvett áramgörbéből a kísérlet végén a káliummentes körülmények között vizsgált tesztvegyület jelenlétében regisztrált áramgörbét. A két különbségáram összehasonlítása alapján kaptuk meg egy adott szernek az $I_{Na/K}$ áramra vonatkozó hatását.

Single-channel mérések

A befelé egyenirányító és a G-fehérje vezérelt acetilkolin szenzitív káliumáramok (I_{K1} és $I_{K,ACh}$) vizsgálata „*single-channel*” árammérési protokollok „*cell-attached*” patch-clamp kísérletekben. Az egy-csatornás „*single-channel*” áramokat az ún. sejt-rögzített (*cell-attached*) konfigurációban határoztuk meg. Az áramokat szoftvervezérelt (ISO-2 saját fejlesztésű patch-clamp szoftver) Axopatch 200B patch-clamp erősítővel vizsgáltuk. Az extracelluláris oldat összetétele a következő volt (mM/l): NaCl 120, KCl 20, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 2, glukóz 10, HEPES 10, pH 7.4 (NaOH-al beállítva).

A mikropipettákat boroszilikátüveg kapillárisokból (Science Products) mikroprocesszor-vezérelt horizontális pipettahúzóval (Sutter Instruments) készítettük, amelyeket a zajcsökkentés céljából Sylgard (Dow Corning) hőre polimerizálódó anyaggal vontunk be, így a pipetták ellenállása mintegy 3-8 M Ω volt amikor a következő összetételű oldattal töltöttük meg (mM/l): KCl 140, HEPES 10, pH 7.2 (KOH-al beállítva) Az $I_{K,ACh}$ áramot a pipettaoldathoz adott 10 μ M carbachollal aktiváltuk. Az I_{K1} és $I_{K,ACh}$ áramok tulajdonságait -120 mV tesztpotenciálon vizsgáltuk. Az áramot minden feszültségen 20 ms hosszú feszültség impulzusokkal aktiváltuk. Az ún. nyitási valószínűséget („*open probability*”) a 20 ms hosszú áramgörbék alatt regisztrált összes áramnyitásból számoltuk. Az 1 másodpercre eső átlagos nyitásszámot használtuk a statisztikai értékeléshez. Az I_{K1} és $I_{K,ACh}$ áramok egycsatornás vezetőképesség értékeit az adott áram-feszültség (I-V karakterisztika) függvényekre illesztett lineáris regressziók paramétereinek értékelésével határoztuk meg.

Akciós potenciál mérések

Akciós potenciálmérések multicelluláris preparátumokon

A kísérletekhez a kutya, nyúl, tengerimalac szívekből, *illetve* az egészséges emberi szívizomnyesedékekből a jobb kamrai papilláris izmot vagy Purkinje rostot preparáltuk ki, majd 37 °C-os, 95% O₂ és 5% CO₂ gázeleggyel oxigenizált Locke-oldattal (NaCl, 115; KCl, 4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; NaHCO₃, 20; glukóz, 11) átáramoltatott szervfürdőben rögzítettük. A preparátumokat 2 ms időtartamú, kétszeres küszöbpotenciálú, 1000 ms (papilláris és trabekula izom esetében) vagy 500 ms ciklushosszú (Purkinje rostokban) négyszögimpulzusokkal bipoláris platina elektródok segítségével ingereltük (Hugo Sachs Elektronik Stimulator, Type 215/II, March-Hugstetten, Németország). A kísérleteket 60 perces inkubáció előzte meg. A transzmembrán akciós potenciálokat 5-20 MΩ ellenállású, 3 M/l KCl-dal feltöltött, konvencionális üvegkapilláris mikroelektrodán keresztül nagy ellenállású erősítőbe vezettük (Biologic Amplifier VF 102, Claix, Franciaország), majd oszcilloszkóp (Tetronix 2230) segítségével monitoroztuk. Az elektromos jelet analóg-digitális konverziót (ADA3300 Data Acquisition Board, Real Time Devices Inc, State College, USA) követően IBM kompatibilis számítógépbe tápláltuk. A preparátumot akkor tekintettük megfelelőnek (közel fiziológiás állapotúnak), ha az AP amplitúdója 100 mV-nál nagyobb volt és a kontroll APD₉₀ értékek emberi preparátumoknál 250-300 ms, kutya preparátumokban a 200–220 ms, nyúl és tengerimalac preparátumokban pedig mintegy 170-200 ms tartományba estek. Az *out-of-range* preparátumot kizártuk. A maximális diastoles potenciált, az akciós potenciál amplitúdóját és 90%-os repolarizációjának megfelelő időtartamát (APA és APD₉₀) az intézetben kifejlesztett értékelő program (Hugo Sachs Elektronik, Action Potential Evaluation System) segítségével mértük. A vizsgált szereknek az akciós potenciálra és annak paramétereire kifejtett hatását 40 perces inkubációs idő után mértük meg. Amennyire lehetett, a mérés során a teljes kísérleti protokollt egyetlen szúrásból teljesítettük, ha ez nem sikerült, egy új sejtből regisztrálva kíséreltük meg a mérés folytatását. Amennyiben az új sejtben az APD₉₀ időtartama az előzőtől 5%-nál nagyobb mértékben eltért, a kísérletet elvetettük. Az *on-line* adatfeldolgozás optimalizálása céljából a mérésekben kettős mintavételezést alkalmaztunk; az AP kezdeti, gyors fázisában (50 ms-ig) 40 kHz, az ezt követő lassabb fázisban 1 kHz frekvencián. További jelszűrést nem alkalmaztunk.

Lassú válasz akciós potenciálok mérése

A kísérletekhez (ORM-10103 vizsgálata a lassú akciós potenciálokra) tengerimalac szívekből papilláris izmot preparáltunk ki. A kísérletes felállás hasonló volt, mint az előbb ismertetett kamrai szövetből elvezetett normál akciós potenciálmérések módszereit bemutató fejezetben.

A lassú válasz akciós potenciálok kiváltásához módosított Krebs-Henseleit oldatot alkalmaztunk, amely KCl tartalmát 25 mM-ra emeltük, valamint 100 μ M BaCl₂-al (I_{K1} gátlás), és 1 μ M forskolinnal (I_{CaL} facilitáció) egészítettük ki. Kizárási kritériumként 5-20 V/s közötti maximális depolarizációs sebességet és minimum 60 mV nagyságú akciós potenciál amplitúdót jelöltünk meg. Azon kísérletek, amelyek nem feleltek meg a fent jelölt kritériumoknak a kísérleti értékelésből kizárásra kerültek.

Izolált sejtes akciós potenciál mérés *current-clamp* módban:

Izolált szívizomsejtek akciós potenciálját, szintén a konvencionális mikroelektród technika alkalmazásával, 3 M-os KCl oldattal töltött, nagy ellenállású, hegyes mikroelektródok segítségével határoztuk meg. A potenciálváltozásokat Axoclamp 900A erősítővel (Axon Instruments) mértük, a regisztrált görbékből *off-line* Clampfit 10.0 software-rel (Molecular Devices) határoztuk meg az AP legfontosabb paramétereit (amplitúdó, APD₂₅, APD₉₀, trianguláció, plató potenciál), valamint a nyugalmi potenciált.

EKG mérés izolált perfundált (Langendorff) tengerimalac szíven

A kísérletekben minkét nemhez tartozó tengerimalacokat használtunk, melyek testtömege 300-500g volt. Az állatok eutanáziáját nátrium pentobarbitál (30mg/ttskg) *ip.* beadásával, túlaltatással végeztük. A vérrög képződés megelőzésére vénásan adott nátrium-heparin (300IU/ttskg) készítményt alkalmaztunk. A mellkas felnyitás után a szívet gyorsan kivágtuk, a bal aorta ívet kanüláltuk majd állandó nyomáson (80 mmHg), 37°C-os fiziológiás Krebs-Henseleit oldattal Langendorff módszerrel retrográd perfundáltuk. Az oldat összetétele a következő volt: (mM/L): NaHCO₃ 25; KCl 4.3; NaCl 118.5; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; Glükóz 10; CaCl₂ 1.8. A pH-t karbogén gáz (95%O₂+5%CO₂) buborékolatással 7.4-re állítottuk. Az EKG jeleket saját készítésű elektróda kosárral vezettük el. A kamrai nyomást a bal pitvaron keresztül behelyezett latex ballon segítségével mértük. A perfúziós áramlást ultrahangos flow-méterrel követtük. Az előbbi adatokat folyamatos regisztrálásához az ingyenes WinWCP szoftver (Whole Cell Electrophysiology

Analysis Program, John Dempster, University of Strathclyde, UK) több csatornás konfigurációját használtuk.

Az aritmiák kiváltásához ouabaint használtunk (4mg/L, Sigma-Aldrich), mely egy szívglikozid, és a Na^+/K^+ -ATPáz pumpa defoszforilációját gátolja. A szívglikozidokat eredetileg szívelégtelenségben a kontrakciós erő fokozására használják a klinikumban, viszont mi azt használtuk ki, hogy magas koncentrációban (5 μM) a nyugalmi membránpotenciál növelésével DAD triggerelt aritmiákat okoz. Az elterjedt aritmia modell mechanizmusa, hogy a Na^+/K^+ pumpaáram gátlása miatt az intracelluláris Na^+ növekedni kezd, ami az NCX Ca^{2+} beviteli módját serkenti, ezáltal Ca^{2+} túltelítődést okoz, ami később abnormális Ca^{2+} felszabaduláshoz, késői utódepolarizációkhoz (DAD) és legvégül súlyos kamrai aritmiákhoz vezet.

A szíveket a ouabain beadása előtt 10 perccel két csoportban előkezeltük: i) a kísérleti szerrel (például GYKB-6635) vagy annak ii) oldószerével (DMSO). A kísérleti szer hatásosságát azért feltételeztük, mert egészsejtes patch-clamp előkísérletek alapján a GYKB-6635 jelentősen gátolja az NCX ion áramot. Az ouabain perfúziót követően a megjelenő aritmiák típusát és megjelenési idejét figyeltük. Így megkülönböztettünk kamrai extra beütéseket (VEB), kamrai tahycardiát (VT) és kamrafibrillációt (VF). Az aritmia típusok meghatározásához a Lambeth féle egyezmény útmutatóját használtuk (Curtis, 2013; Walker, 1988). Minden kísérletet új preparátumon végeztünk.

Egyéb nem elektrofiziológiai mérési technikák

mRNS szintek meghatározása qPCR technikával

A Kir2.x és a SAP97 alegységeket kódoló mRNS-ek expressziós szintjét valós idejű kvantitatív PCR (*real time* qPCR) technikával határoztuk meg. A szívizom biopsziákból RNS-t vontunk ki az RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen) használatával. Az RNS koncentrációt a Nanodrop ND 1000 spektrofotométerrel határoztuk meg. A reverz transzkripciót a Reverse Transcriptase Kit (Stratagene) használatával végeztük el 2 μg RNS-ből kiindulva. Az RNS minták mindegyikét gDNS kontaminációra teszteltük egy PCR-en alapuló eljárással. A génspecifikus primereket a Primer Express szoftverrel (Applied Biosystems) terveztük. A valós idejű PCR reakciókhoz a Brilliant II SYBRGreen Master Mix Kit-et (Stratagene) használtuk, a reakciókat a Rotor Gene 3000 platformon futtattuk. A génexpressziós szinteket a Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) vagy

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) háztartási gének expressziós szintjére normalizáltuk. A csoportok közötti összehasonlítást (kontroll vs DCM) a Pfaffl módszer szerint végeztük el (Pfaffl, 2001; Zvara, 2005).

Immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 10 µm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk a bal kamrai biopsziákból. A metszeteket 0.5% kollagenázzal kezeltük, majd 2% kalcium mentes PBS-ben oldott szérum albuminnal blokkoltuk. A blokkolást követően a metszeteket az a nyúl anti-Kir2.x (Alomone, 1:100 hígítás) és egér anti-SAP97 (Lifásán, 1:300 hígítás) elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten. Az inkubációt mosás követte, majd a metszeteket Alexa-488-cal jelölt anti-nyúl IgG (Molecular Probes, 1:400) és Cy3 konjugált anti-egér IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:400) másodlagos antitestek jelenlétében szobahőmérsékleten inkubáltuk egy órán át. A sejtmagokat 1 µg/ml PBS-ben oldott Hoechst 33258-cal festettük Piecha és mtsai (1999) alapján. A mikroszkópos vizsgálatok céljára a metszeteket Fluorescent Mounting Medium-ban (Dako Corp.) tárgylemezen rögzítettük, a fluoreszcens immunjelet a Fluoview FV1000 konfokális mikroszkóppal (Olympus) detektáltuk.

Proteinminták és Western blot analízis

A fehérjék kinyeréséhez a szövetmintákat kisebb darabokra vágva Lysis puffer (50 mM Tris-HCl, 1% nonidet P- 40, 0.5% deoxikolat, 150 mM NaCl, 10 g/l PMSF, 5 µM leupeptin, 5 µM aprotinin, 5 µg/l Na-vanadát) + proteázinhibitor koktélnak (Sigma-Aldrich) Polytron-nal homogenizáltuk, majd 4 °C hőmérsékleten centrifugáltuk (10,000 g, 15 min). A proteinkoncentrációt a felülúszót leválasztva, BSA standard mellett, Lowry módszerrel mértük. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist 8% akrilamid/bis-akrilamid gélben végeztük. A frakcionált proteineket transzfer pufferben (25 mM Tris-HCl, 150 mM glicin, 20% metanol, pH=8.3), polivinilidén-difluoride (EMD Millipore) membránra vittük át, majd a nemspecifikus jelölés elkerülése céljából a membránokat blokkoltuk. A membránon rögzített antigéneket egy teljes éjszakán át 4 °C-on specifikus antitestekkel jelöltük a következők szerint: anti-Kir2.1, anti-Kir2.2, anti-Kir2.3 (1:100 hígítás, Alomone), anti-Kir2.4 (1:100 hígítás, SantaCruz), anti-SAP97 (1:300 hígítás, LifeSpan. A membránokat ezután torma peroxidázzal konjugált másodlagos antitestek jelenlétében inkubáltuk (DakoCorporation, AgilentTechnologies vagy Sigma-Aldrich), az immunjelet

kemilumineszcens módszerrel (ECL Western Blotting Detection System, Amersham Pharmacia Biotech) detektáltuk. A gélre felvitt fehérjemennyiség kontrollálása érdekében az antitest komplexeket 100 mmol/L 2-merkaptotanol és 62.5 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6 oldatával eltávolítottuk a membránról, majd a GAPDH és/vagy α -actin fehérjét detektáluk (anti- α -actin, 1:500 hígítás, Dako Corporation, és anti-GAPDH, 1:5000, Sigma-Aldrich) a fentiek szerint. A kemilumineszcens jelet röntgenfilmen rögzítettük, a jelek optikai denzitását az ImageJ és Excel programokkal analizáltuk.

Anyagok

A különböző extracelluláris (fiziológiás) tápoldatokhoz (Tyrode, Locke, Krebs-Henseleit) és intracelluláris (pipettaoldatokhoz) oldatokhoz szükséges legtöbb vegyszert és kémiai reagenst a Molar Kft (Budapest) és Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) finomvegyszereket gyártó cégektől vásároltuk. Az ettől eltérő eseteket alább külön említem. Minden végső oldatot a kísérlet napján frissen készítettünk. A vizsgálati anyagokat többnyire 500-1000 szoros koncentrációjú törzsoldatokban tároltuk, és a kísérlet előtt adagoltuk a vizsgálatban kívánt koncentrációban a tápoldatban feloldva. A legtöbb vegyületet vízben, etanolban, vagy dimetilszulfoxidban (DMSO) oldottuk fel. A 0.01% koncentrációban rutinszerűen használt etanol, illetve DMSO szívműködésre gyakorolt hatását általában elhanyagolhatónak tekintik.

A következő vegyületeket használtuk fel az értekezésben alább bemutatott kísérletek során:

- adrenalin: nem szelektív adrenerg agonista (Sigma-Aldrich)
- amiodaron: III típusú antiaritmiás gyógyszer (Sanofi Pharma, Franciaország)
- carbachol: szelektív kolinerg agonista paraszimpatomimetikum (Sigma-Aldrich)
- chromanol 293B: alacsony μ M-os koncentrációban szelektív I_{Ks} gátlószer; magas 100 μ M-os koncentrációban I_{to} gátlószer (Aventis Pharma, Németország)
- disopyramid: I/A osztályú antiaritmiás gyógyszer (Sigma-Aldrich)
- dronedaron: *multichannel* gátló kísérletes antiaritmiás szer (Sanofi Pharma, Franciaország)
- dofetilid: szelektív I_{Kr} gátló III osztályú antiaritmiás szer (Sequoia Research Products, UK)
- E-4031: szelektív I_{Kr} gátlószer (Gyógyszerkutató Intézet, Budapest)
- GYKB-6635: szelektív NCX gátlószer (saját szintézis)
- GYKI-16638: III és I/B osztályú *multichannel* gátló kísérletes antiaritmiás szer
(Gyógyszerkutató Intézet, Budapest)

- HMR-1556: szelektív I_{Ks} gátlószer (Aventis Pharma, Németország)
- kinidin: I/A osztályú antiaritmiás gyógyszer (Sigma-Aldrich)
- L-364,373 (R-L3) enantiomerek, ZS_1270B és ZS_1271B, I_{Ks} áram modulátorok, saját szintézis
- L-735,821: szelektív I_{Ks} gátlószer (Merck-Sharpe & Dohme, USA)
- nisoldipin: szelektív I_{CaL} gátlószer (Bayer AG, Németország)
- ORM-10103: szelektív NCX gátlószer (Orion Pharma, Finnország)
- ouabain: $I_{Na/K}$ gátlószer (Sigma-Aldrich)
- prokainamid: I/A osztályú antiaritmiás gyógyszer (Sigma-Aldrich)
- SEA-0400: szelektív NCX gátlószer (saját szintézis)
- strophanthin-G: $I_{Na/K}$ gátlószer (BDH Chemicals Ltd, UK)
- tedisamil: *multichannel* gátló kísérletes antiaritmiás szer (Solvay Pharma, Németország)
- tertiapin Q: szelektív $I_{KA,Ch}$ áram gátlószer (Tocris Bioscience, UK)

Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

Adatfeldolgozás: Az egyes módszerek használatával kapcsolatos fontosabb adatfeldolgozási lépéseket a módszerek vagy protokollok részletes leírásánál ismertetjük.

Statisztikai számítások: A statisztikai számításokat Origin, Excell vagy Statistica 7.0-9.0 verziók) programokkal végeztük. A kísérletek során meghatározott (mért vagy számított), a mérési artefaktokra szükség szerint korrigált adatokat általában számtani átlag $\pm$ SEM formában adjuk meg. Két egyszerű kísérleti csoport adatainak összehasonlítására a Student-féle páros vagy páratlan *t*-tesztet használtuk. Kettőnél több kísérleti csoport összehasonlítása esetén, az adott körülményektől függően, Bonferroni, vagy Tukey *post hoc* teszttel kiegészített egy, vagy több szempontú, illetve, a csoportok közötti varianciák homogenitásától függően, parametrikus, vagy nemparametrikus (Kruskal-Wallis féle) variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk. A kísérleti csoportokat statisztikusan szignifikánsan különbözőnek $p < 0.05$ esetben tekintettük.

Eredmények

1. témakör. Különböző antiaritmiás szerek celluláris hatásainak vizsgálata emlősszíveken

Különböző I/A antiaritmiás szerek vizsgálata nyúl kamrai szívműködéseken

Vizsgálataink célja az volt, hogy megvizsgáljuk három ismert, és még a CAST/SWORD vizsgálatok előtti időszak klinikai gyakorlatában széleskörűen alkalmazott I/A osztályú antiaritmiás szer (kinidin, disopyramid és prokainamid) elektrofiziológiai hatásait a legfontosabb repolarizáló transzmembrán ionáramokra, enzimatikusan izolált nyúlsejtekben.

A szereket a klinikai gyakorlatban alkalmazott terápiás vérszint közeli koncentrációkban alkalmaztuk. Ennek megfelelően a következő koncentrációkat vizsgáltuk: prokainamid: 50 μM ; kinidin: 10 μM és disopyramid: 10 μM .

A következő ionáramokat vizsgáltuk: tranziens kifelé haladó kálium (I_{to}), befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}), késői egyenirányító káliumáram (I_K) és ATP szenzitív káliumáram (I_{KATP}). A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben korábban részletesen ismertettem. Ezen kísérletsorozatban az L-típusú kalcium áramot (I_{CaL}) az extracelluláris tápoldathoz adott 250 μM CdCl_2 -al gátoltuk. A kísérletek elkészültének idejében (1996-1997) ez volt a standard eljárás. A dihydropiridin származékok (nifedipin vagy nisoldipin) használata a kalcium áram gátlására egészejtes voltage-clamp kísérletekben csak 1998-1999 után vált rutinszerűvé, miután kimutatták, hogy a kétértékű ionok (Ba^{2+} és Cd^{2+}) jelentősen megváltoztatják káliumáramok kinetikai paramétereit és tulajdonságait, ami azt jelenti, hogy Cd^{2+} jelenlétében nem megfelelő a késői egyenirányító káliumáram két komponensének a vizsgálata sem (Hirano, 1986; Daleau, 1997; Jost, 1998). Ezért jelen vizsgálatosorozatban mi sem vizsgáltuk külön az I_{Kr} és I_{Ks} áramokat, hanem az akkori nemzetközi gyakorlatnak megfelelően az I_K áramot csak vegyes késői egyenirányító káliumáramként mértük nyúl kamrai miocitákban.

Amint az **1., 2., 3. és 4. táblázatok** mutatják a három szer meglehetősen azonos hatással rendelkezett a vizsgált áramokra. Mindhárom vegyület a terápiás közeli koncentrációban gátolta az a késői repolarizációért felelős I_K (**1. táblázat**), és az iszkémiás állapotokban mintegy védőáramként aktiválódó ligandfüggő I_{KATP} (**2. táblázat**) áramokat. Az eltérések csak a százalékban kifejezett gátlóhatásban találhatók. Egyik vegyület sem

változtatta meg a kamrai szívizomsejtek membránpotenciál helyreállításban fontos szerepet játszó I_{K1} áramot (**3. táblázat**).

1. táblázat. A kinidin, disopyramid és prokainamid gátló hatása a késői egyenirányító káliumáramra (I_K).

Antiaritmiás szer	Kontroll (pA/pF)	Vegyület (pA/pF)	Csökkenés (%)
Kinidin (10 μ M, n=9)	1.34 $\pm$ 0.38	0.24 $\pm$ 0.08	87.2 $\pm$ 3.4*
Disopyramid (10 μ M, n=11)	1.34 $\pm$ 0.34	0.25 $\pm$ 0.35	81.4 $\pm$ 1.6*
Prokainamid (50 μ M, n=12)	0.92 $\pm$ 0.09	0.386 $\pm$ 0.04	63.2 $\pm$ 3.2*

I_K „tail current” áramértékeket -40 mV tartó membránpotenciálnál mérve (+50 mV teszt potenciálról) mutatjuk be; átlag $\pm$ SEM, *p<0.05 teszt vs kontroll.

2. táblázat. A kinidin, disopyramid és prokainamid gátló hatása az ATP-függő káliumáramra (I_{KATP})

Antiaritmiás szer	Kontroll (pA)	Pinacidil (pA)	Vegyület (pA/pF)	Csökkenés (%)
Kinidin (10 μ M, n=5)	0.019 $\pm$ 0.010	5.36 $\pm$ 1.08	2.34 $\pm$ 6.99	56.38 $\pm$ 7.49*
Disopyramid (10 μ M, n=5)	0.082 $\pm$ 0.003	2.75 $\pm$ 0.57	1.95 $\pm$ 0.47	31.83 $\pm$ 4.38*
Prokainamid (50 μ M, n=4)	0.052 $\pm$ 0.001	2.34 $\pm$ 0.60	1.09 $\pm$ 0.29	53.46 $\pm$ 1.52*

I_{KATP} áramot pinacidil segítségével aktiváltuk. Az I_{KATP} áramértékeket 0 mV teszt-potenciálra mérve mutatjuk be; átlag $\pm$ SEM, *p<0.05 teszt vs kontroll.

3. táblázat. A kinidin, disopyramid és prokainamid hatása a befelé egyenirányító káliumáramra (I_{K1})

Antiaritmiás szer	Kontroll (pA/pF)	Vegyület (pA/pF)	Csökkenés (%)
Kinidin (10 μ M, n=10)	9.5 $\pm$ 1.20	9.28 $\pm$ 1.45	1.91.8
Disopyramid (10 μ M, n=9)	13.6 $\pm$ 0.28	12.5 $\pm$ 0.22	5.0 $\pm$ 3.4
Prokainamid (50 μ M, n=9)	12.04 $\pm$ 0.16	10.8 $\pm$ 0.17	9.7 $\pm$ 8.1

Az I_{K1} áramértékeket -100 mV membránpotenciálnál mérve, átlag $\pm$ SEM mutatjuk be; p=N.S.

Egyedüli eltérést csak a korai (fázis 1) repolarizációt meghatározó I_{to} -áram mérésekben tapasztaltunk. Az alkalmazott koncentrációkban a kinidin (10 μ M) és a

disopyramid (10 μ M) szignifikánsan csökkentette, amíg a prokainamid (50 μ M) viszont egyáltalán nem változtatta meg az I_{to} áram amplitúdóját. A disopyramid és a kinidin ezen felül jelentősen felgyorsította az I_{to} áram inaktivációs kinetikáját is (4. táblázat).

4. táblázat. A kinidin, disopyramid és prokainamid gátló hatása a tranziens kifelé haladó káliumáramra (I_{to})

Antiaritmiás szer	Vizsgált paraméter (50 mV)	Kontroll	Vegyület	Csökkenés (%)
Kinidin (10 μ M, n=12)	Áram amplitúdója (pA/pF)	13.72 $\pm$ 1.73	8.69 $\pm$ 1.28	35.5 $\pm$ 4.10*
	Inaktiváció időállandója (ms)	8.4 $\pm$ 0.7	3.3 $\pm$ 0.6	60.7 $\pm$ 0.9*
Disopyramid (10 μ M, n=8)	Áram amplitúdója (pA/pF)	14.74 $\pm$ 1.22	11.84 $\pm$ 0.48	20.8 $\pm$ 2.9*
	Inaktiváció időállandója (ms)	6.3 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.3	38.1 $\pm$ 1.12*
Prokainamid (50 μ M, n=13)	Áram amplitúdója (pA/pF)	11.94 $\pm$ 1.41	10.88 $\pm$ 1.15	9.1 $\pm$ 3.6
	Inaktiváció időállandója (ms)	9.7 $\pm$ 0.6	8.7 $\pm$ 0.8	10.1 $\pm$ 1.0

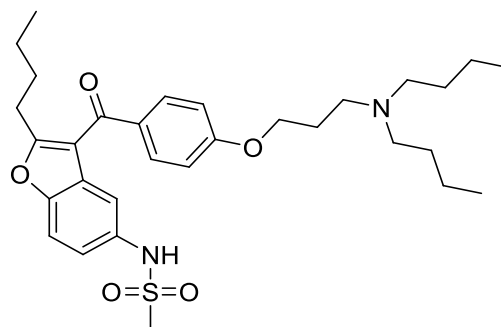
Az I_{to} áramértékeket +50 mV membránpotenciálnál mérve mutatjuk be, átlag $\pm$ SEM; *p<0.05 teszt vs kontroll.

A dronedaron (SR-33589) elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata kutya kamrai szívizom preparátumokon

A dronedaron fejlesztése szintén a CAST/SWORD vizsgálatok kudarcos eredménye után kezdődött. A kiinduló pontot azt adta, hogy a széles palettájú Vaughan Williams listán gyakorlatilag egyetlen olyan antiaritmiás szer, az amiodaron maradt, amely hatékonyan kivédi a ritmuszavarokat és mentes mindenféle proaritmiás mellékhatástól (Singh, 1970b; Hondeghem, 1990; Singh, 1994). Az amiodaron antiaritmiás hatását feltehetőleg a *multichannel* („dirty drug”), tulajdonsága okozza. Ez a gondolat indította el az úgynevezett „amiodaron-szerű” antiaritmikumok kifejlesztésének sorozatát, amelyekben a repolarizációt megnyújtó (III-as osztályú) hatás egyéb, előnyösnek vélt farmakológiai tulajdonsággal (kombinált III+I/B, II és/vagy IV osztályú aktivitás) ötvözve jelentkezik (Brill, 1996; Nattel, 1999a; Singh, 1999).

Minderre azért volt szükség, mert az amiodaron sajnos jelentős extra-kardiális mellékhatásokkal rendelkezik, amelyek súlyosan korlátozzák a szer hosszú idejű, több évig tartó krónikus alkalmazását (Harris, 1983). Az amiodaron tüdőfibrózist okozhat, illetve a jó molekula miatt hipertireozist (Kennedy, 1990; Newman, 1998). A fenti két állítás magában hordozta a fejlesztés irányát, vagyis célszerű készíteni egy jómentes amiodaront. Ez volt a kiinduló pont a dronedaron kifejlesztésénél (Manning, 1995; Sun 1999). A kísérletes munka a Sanofi-Aventis Gyógyszergyár (Franciaország) innovatív gyógyszerfejlesztési

részlegének munkatársaival készült nemzetközi ko-operációban. A dronedaron (SR-33589) mentes a jódmolekulától, és a dofetilidhez (klasszikus III-as osztályú szer) hasonlóan tartalmaz egy methaneszulfonamid molekulát (7. ábra).



7. ábra. A dronedaron vegyület kémiai szerkezete ($C_{31}H_{44}N_2O_5S$) és IUPAC neve: N-[2-butyl-3-[4-[3-(dibutylamino)propoxy]benzoyl]-1-benzofuran-5-yl]methanesulfonamide.

A jódmentes félszintetikus amiodaron-származékokat, mint amilyen a dronedaron azzal a céllal fejlesztették ki, hogy a multichannel „anyavegyülethez” hasonló hatásereőségű, de a nagy jódtartalom okozta extrakardiális/toxikus mellékhatásokról mentes antiaritmiás gyógyszert hozzanak létre (Fazekas, 2008; Hohnloser, 2009; Hilleman, 2010). A jódatomok eltávolításától a szervtoxicitás megszűnését remélték, a methaneszulfonamid csoport hozzáadásával pedig a gyógyszermolekula lipofiliáját mérsékelték. A dronedaron eliminációs féléletideje cca. 24-31 óra, ezért 4-6 nap alatt kiürül a szervezetből. Biológiai hasznosulása az extenzív hepatikus first-pass metabolizmus miatt 15% (Zareba, 2006).

A vizsgálatsorozatunk előtti előkísérletek minden esetre ígéretesek voltak, mert több addigi multicelluláris myocardium-készítményeken és izolált miocitákon végzett kísérletek eredményei arra utaltak, hogy a „multichannel” gátló (valójában mind a négy Vaughan-Williams osztályhatással rendelkező) dronedaron akut és krónikus elektrofarmakológiai tulajdonságai hasonlóak és egyenértékűek lesznek az amiodaronéval, annak extrakardiális/szervtoxikus hatásai nélkül (Sun, 1999).

Az általunk végzett vizsgálatsorozat egy nagyon gondosan és pontosan megtervezett összehasonlító krónikus dronedaron-amiodaron vizsgálat. A vizsgálatba három csoport (csoportonként 6-10 kutyát) kutyát vontunk be. Az első csoport a kontroll kutyák, a második csoportba tartozó kutyák 4 hétig *per os* $2 \times 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{nap}^{-1}$ dronedaronnal (kapszulában adva, naponta kétszer, reggel és este) lettek kezelve, a harmadik csoportba tartozó kutyákat pedig $1 \times 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{nap}^{-1}$ amiodaron (naponta egy kapszula egyszer, reggel) vegyülettel kezeltük. A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben részletesen bemutattam. Az eredmények ismertetése:

A krónikusan alkalmazott dronedaron és amiodaron hatásainak vizsgálata

12 elvezetési EKG felvételek készültek a 4 hetes kezelések előtt és után. Az eredményeket a **5. táblázat** mutatja be.

5. táblázat. Krónikus (4 hetes) dronedaron és amiodaron kezelés hatása a legfontosabb EKG paraméterekre éber kutya kísérletekben

Kezelés	CL (ms)	PQ (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)
Kontroll n = 10	513.3±17.8	123.4±3.7	51.0±1.5	195.6±3.3	273.6±3.5
Dronedaron 2x25 mg·kg ⁻¹ ·nap ⁻¹ p.o. 4 hét kezelés után n = 10	616.8±36.5*	142.6±6.5*	52.8±1.5	208.5±4.8*	267.9±6.9
Kontroll n = 6	543.1±31.4	114.0±6.9	51.0±3.7	189.0±5.5	257.6±7.9
Amiodaron 50 mg·kg ⁻¹ ·nap ⁻¹ p.o. 4 hét kezelés után n=6	655.3±72.4	137.0±10.6*	60.7±1.1*	235.0±1.1*	294.3±10.2*

CL=ciklushossz; *p<0.05.

A táblázat eredményeit a következőképpen lehet összefoglalni. Az amiodaron kezelés szignifikánsan meghosszabbította a legfontosabb EKG paramétereket (PQ, QRS, QT és QTc intervallumok), amíg a 4 hetes dronedaron kezelés hatására csak a PQ és QT intervallumokban mért adatoknál regisztráltunk szignifikáns megnyúlást, amíg a QRS és QTc intervallumok nem változtak meg számottevő mértékben.

Közvetlenül a 4 hetes EKG regisztrálás után a kutyákat feláldoztuk és *in vitro* elektrofiziológiai méréseket végeztünk. A krónikus akciós potenciálmérések eredményeit a **6. táblázat** foglalja össze. Az eredmények azt mutatják, hogy 1 Hz frekvencián mérve nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket a krónikus dronedaron kezelés előtt és után, sem a papilláris izomban, sem a Purkinje rostokban regisztrált AP paraméterek között. Az egyetlen kisebb méretű eltérés (enyhe csökkenés) csak az MDP (maximális diastoles potenciál) értékben volt kimutatható.

A krónikus amiodaron kezelés papilláris izomzatban ezzel ellentétben a szerről ismert és elvárt tulajdonságoknak megfelelően, jelentős APD₉₀ megnyúlást, illetve APA és V_{max} csökkenést okozott. Purkinje rostokban az amiodaron kezelés nem befolyásolta az AP paramétereket, kivéve az egy MDP értékekben regisztrált enyhe mértékű pozitív eltolódást.

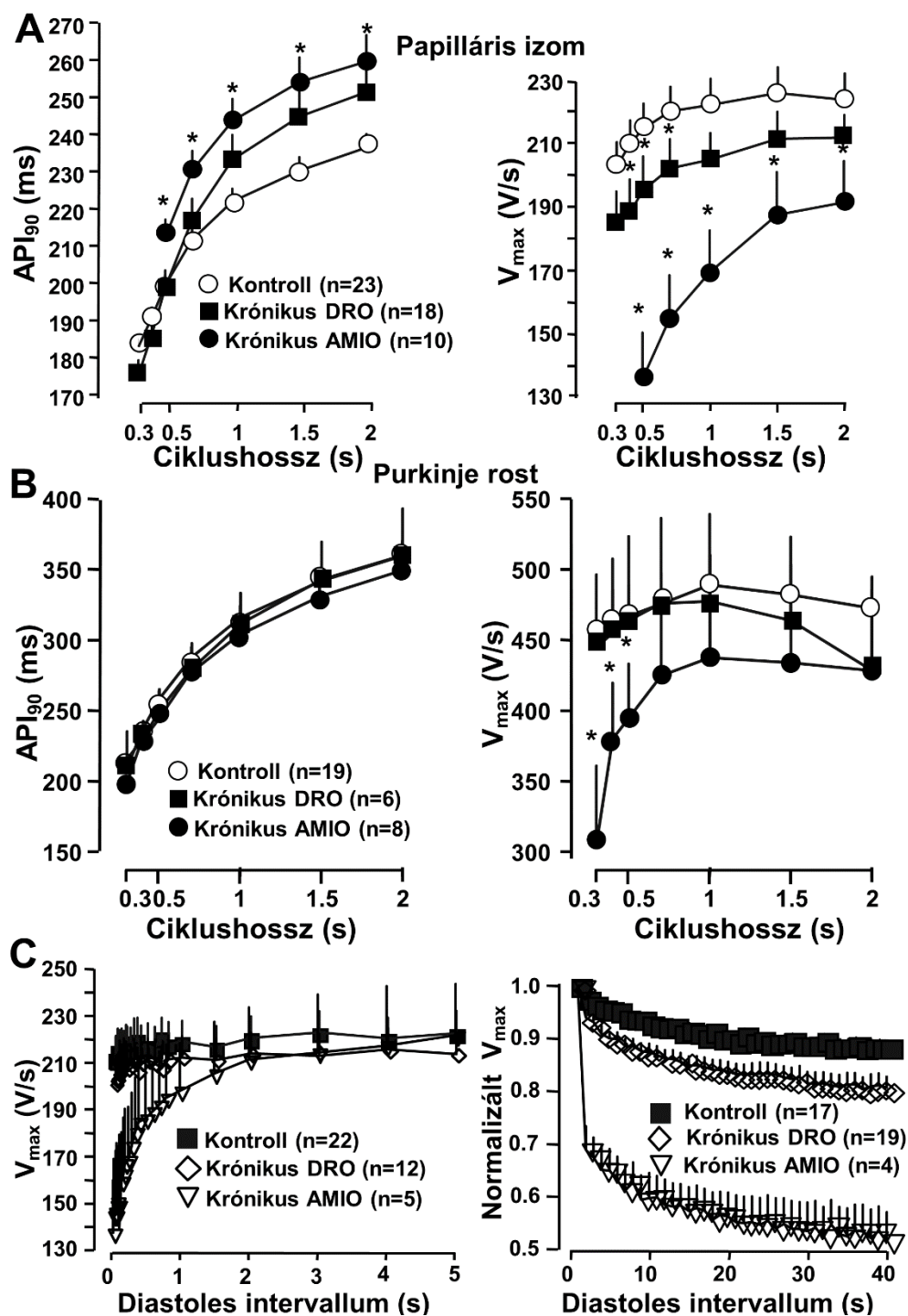
6. táblázat. Krónikus (4 hetes) dronedaron és amiodaron kezelés hatása az akciós potenciál paraméterekre jobb kamrai kutya papilláris izomban és Purkinje rostokon

Kezelés	n	MDP (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)	V _{max} (V·s ⁻¹)
Papilláris izom						
Kontroll	23	-85.1±0.7	108.3±0.7	201.4±3.5	234.6±3.3	223.3±8.5
Krónikus dronedaron	18	-84.1±0.6	105.3±1.3	198.6±5.1	240.0±5.9	210.2±9.5
Krónikus amiodaron	15	-82.1±0.8	101.5±1.4*	209.1±4.2	251.7±8.2*	171.9±8.2*
Purkinje rost						
Kontroll	19	-87.8±0.6	121.0±0.9	244.4±10.3	325.4±9.0	487.1±21.3
Krónikus dronedaron	9	-84.6±0.9*	116.9±2.3	233.4±20.2	344.4±28.8	435.8±38.9
Krónikus amiodaron	8	-83.5±1.1*	116.1±2.3	188.0±18.0	323.9±12.0	437.9±43.7

Stimuláló frekvencia = 1 Hz; MDP=maximális diastoles potenciál; APA=akciós potenciál amplitúdó; APD₅₀ és APD₉₀ = akciós potenciál időtartam (50% and 90% repolarizációnál mérve); V_{max}=depolarizáció maximális sebessége; *p< 0.05.

A krónikus dronedaron és amiodaron frekvenciafüggő hatásainak az APD₉₀ és V_{max} paraméterekre vonatkozó eredményeit a **8. ábra** foglalja össze. Papilláris izomban a krónikusan adagolt dronedaron nem változtatta meg szignifikánsan az APD₉₀ értékeket gyors frekvenciáknál (300-1000 ms ciklushossz közötti értékeknél), amíg lassúbb frekvenciáknál (CL=1500-2000 ms) a dronedaron hatására az APD₉₀ valamelyest hosszabb volt, mint a kontroll csoportban (**8A. ábra, bal oldali panel**). Ezzel ellentétben a krónikus amiodaron kezelés minden ciklushossz tartományban megnyújtotta az APD₉₀ értékeket a kontroll csoporthoz képest. Papilláris izomban a dronedaron kezelés a kontroll csoporttal összehasonlítva, ha gyenge, de mégis szignifikáns mértékű V_{max} csökkenést okozott 1000 ms ciklushossz alatti gyors frekvenciákon.

Az amiodaron kezelés viszont markánsan szignifikáns V_{max} csökkenést okozott különösen a gyorsabb frekvenciákon (ciklushossz <1000 ms) (**8A. ábra, jobb oldali panel**). Purkinje rostokban sem a dronedaron, sem az amiodaron nem okozott frekvenciafüggő APD₉₀ változást (**8B. ábra, bal oldali panel**). A Purkinje rost V_{max} értékek különösen az 1000 ms-nál magasabb ciklushossz tartományban szignifikánsan csökkentek voltak az amiodaronos csoportokban. A dronedaron kezelés nem okozott frekvenciafüggő változást a V_{max} értékekben (**8B. ábra, jobb oldali panel**).



8. ábra. A krónikusan alkalmazott dronedaron és amiodaron kezelés frekvenciafüggő hatásai az akciós potenciál időtartamra (APD₉₀) és depolarizáció maximális időtartamára (V_{max}) kutya jobb kamrai papilláris izmon (**A. panel**), illetve Purkinje rostokon (**B. panel**). **C. panel.** A krónikusan alkalmazott dronedaron és amiodaron kezelés hatásai a V_{max} gátlás *offset* (bal oldali mező) és *onset* (jobb oldali mező) kinetikáira kutya jobb kamrai papilláris izmon. Az ábrán a jobb áttekinthetőség kedvéért nem jelöltük be a szignifikancia jeleket. * $p < 0.05$ a kontroll értékekkel összehasonlítva. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva.

A V_{max} gátlás *use dependens* hatásainak tanulmányozását kiegészítettük az *offset* és *onset* kinetikák vizsgálatával is. Az “*offset*” (*recovery*) kinetikát 1 Hz (1000 ms) frekvencián

vizsgáltuk meg, mégpedig úgy, hogy minden 20. ütés után fokozatosan emelkedő időtartammal egy extra-stimulussal ingereltük a preparátumot. A diastoles intervallumot az akciós potenciál 90 %-os időtartama és az extra stimulus által kiváltott akciós potenciál felszálló ága közötti időként határoztuk meg. Amint a **8C. ábra (bal oldali panel)** is mutatja papilláris izomban a kontroll és krónikusan dronedaronnal kezelt kutyákban a $V_{\max}$ szinte teljesen helyreállt 30-50 ms diasztolés időtartam alatt. Ezzel ellentétben a krónikus amiodaronnal kezelt kutyák szívéből származó papilláris izomban a $V_{\max}$ helyreállítási (*recovery* kinetikája jelentősen késleltetett volt, vagyis a korai extraszisztolék esetében alacsonyabb volt, mint a késői diastole alatt (**8C. ábra, bal oldali panel**).

A $V_{\max}$ „onset” kinetikákat egy 1 perces stimulációmentes időtartam után alkalmazott 400 ms ciklushosszú 40 ütéses stimulus sorozat alkalmazása segítségével vizsgáltuk. A **8C. ábra (jobb oldali panel)** bemutatja, hogy a dronedaronnal kezelt és a kontroll kutyákból származó mintákban csak csekély mértékű $V_{\max}$ csökkenést tapasztaltunk a stimulus sorozat hatására. A csökkenő görbét egy-exponenciális függvénnyel lehetett jól megilleszteni, amelynek az időállandói 8.9 ± 0.5 ms (dronedaron, $n=19$) vs 10.9 ± 0.7 ms (kontroll, $n=17$) voltak.

Ezzel ellentétben az amiodaronnal kezelt kutyák szívéből izolált papilláris izmokban jelentősen megváltozott a $V_{\max}$ a stimulus sorozat hatására. Amint a **8C. ábra (jobb oldali panel)** is bemutatja, a csökkenő görbét ezúttal olyan két-exponenciális függvényekkel lehetett a legjobban megilleszteni, amelyeknek az időállandói 17.0 ± 3.9 ms, illetve 1.56 ± 0.13 ms ($n=4$) voltak.

Az akutan alkalmazott dronedaron és amiodaron hatásainak vizsgálata

A **7. táblázat** foglalja össze az akutan alkalmazott dronedaron és amiodaron hatásait a jobb kamrai papilláris izom és Purkinje rost akciós potenciál paraméterekre. 1000 ms ciklushosszon regisztrálva a dronedaronnak és amiodaronnak hasonló hatása volt papilláris izmon, vagyis mindkét szer ($10 \mu\text{M}$ koncentrációban alkalmazva) enyhén megnyújtotta az APD_{50} és APD_{90} értékeket, amíg a többi paraméter (MDP és APA) változatlan maradt. Mind a dronedaron, mind az amiodaron mérsékelten, de statisztikailag szignifikáns mértékben frekvenciafüggő módon („*use dependens*”) csökkentette a $V_{\max}$ értékeket (nem mutatom külön ábrán vagy táblázatban). Ezt a hatást vélhetően a két szer ismert I/B osztályú antiaritmiás hatása okozza.

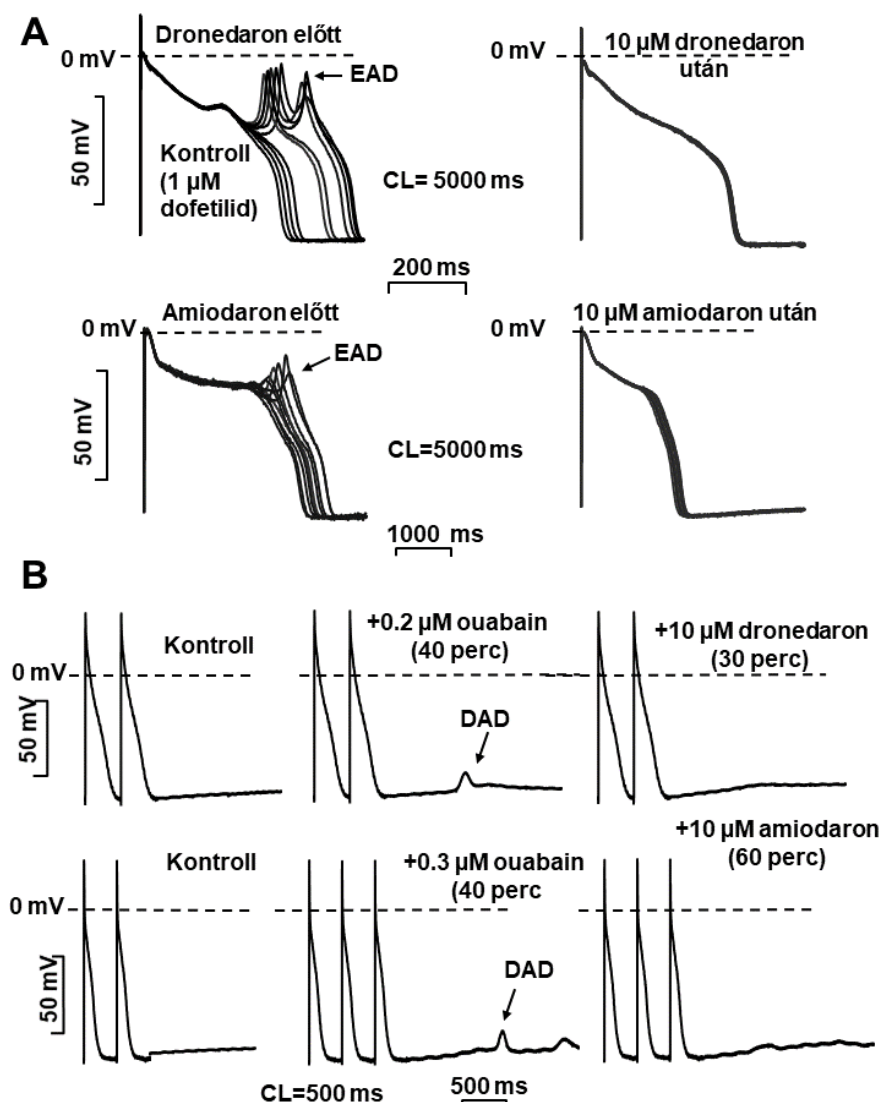
7. táblázat. Akut dronedaron és amiodaron kezelés hatása az akciós potenciál paraméterekre jobb kamrai kutya papilláris izomban és Purkinje rostokon

Szer	n	MDP (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)	V _{max} (V·s ⁻¹)
<u>Kamrai papilláris izom</u>						
Kontroll	13	-85.7±0.8	109.1±0.7	207.1±5.2	239.6±5.3	226.2±13.0
Dronedaron, 10 µM		-84.3±0.7	108.5±0.9	216.4±5.1*	248.6±5.3*	222.6±10.9
<u>-----</u>						
Kontroll	10	-82.4±0.9	106.4±0.8	184.5±4.5	213.2±4.2	230.3±7.8
Amiodaron, 10 µM		-84.3±0.7	108.2±1.0	197.3±4.9*	229.0±5.0*	219.8±12.3
<u>Purkinje rost</u>						
Kontroll	7	-86.3±1.7	119.6±2.1	239.6±12.6	309.6±11.8	470.6±35.8
Dronedaron, 10 µM		-85.3±1.6	116.3±1.5	188.1±15.0*	287.1±10.8*	445.0±54.8
<u>-----</u>						
Kontroll	6	-87.7±1.7	119.2±1.7	225.5±17.4	307.0±16.5	421.0±15.3
Amiodaron, 10 µM		-83.8±1.1	113.5±3.7	182.2±11.7*	279.7±11.9*	370.0±27.1*

Stimuláló frekvencia = 1 Hz; MDP = maximális diastoles potenciál; APA = akciós potenciál amplitúdó; APD₅₀ és APD₉₀ = akciós potenciál időtartam (50% and 90% repolarizációnál mérve); V_{max}=depolarizáció maximális sebessége, *p<0.05.

Ahhoz, hogy megállapítsuk a szerek celluláris antiaritmiás hatásait, megvizsgáltuk mindkét szernek a hatásait a triggerelt aritmiákra, a korai és utódepolarizációkra (EAD és DAD). EAD-ot 20-40 perces 1 µM dofetilid előkezeléssel és bradycardiával (a frekvenciát 1 Hz-ről fokozatosan 0.08 Hz-re csökkentettük) idéztünk elő. Néhány előkísérletben ellenőriztük az EAD perzisztenciát, vagyis megjelenése után még további 2 órán monitoroztuk stabilitását. Az eredményeink azt mutatták, hogy 10-10 µM dronedaron, illetve amiodaron jelenlétében szignifikánsan lecsökkent az EAD etapok incidenciája (dronedaron esetében 77.8±3.8 %-ról 11.7±2.8 %-ra, n=6, p < 0.05; amiodaron esetében 58.6±4.5 %-ról 8.0±3.2 %-ra, n=5, p<0.05) (**9A. ábra**).

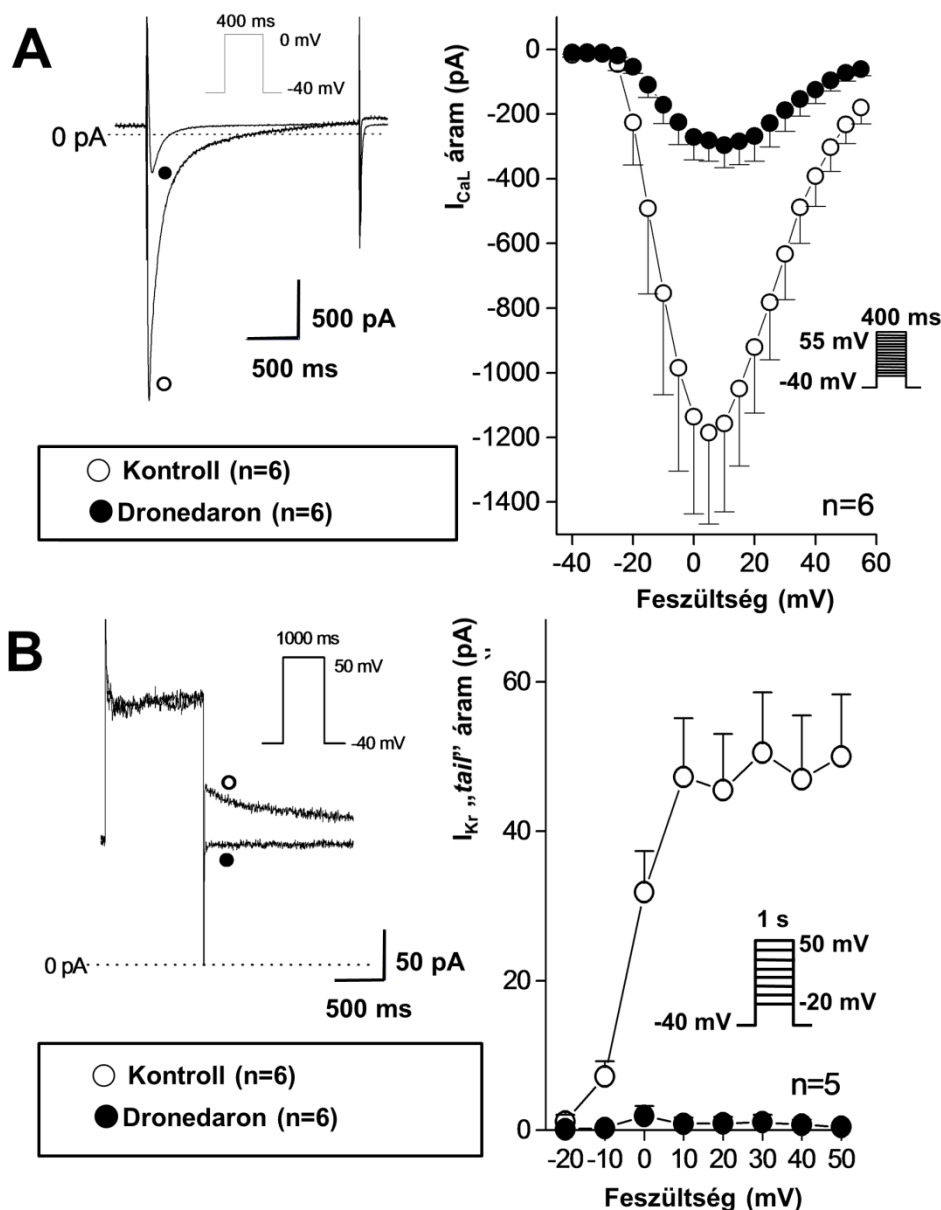
Késői utódepolarizációt az ouabain-al (Na/K pumpagátlószer) provokáltunk. A szívizommintákat (bal kamrai Purkinje rostok) 2 Hz-es frekvencián 40-60 percig tartó 0.2-0.3 µM ouabain-al előkezeltük, majd a stimuláció hirtelen megszakítása, rendszerint mintegy 4.7 mV-13.7 mV közötti amplitúdóval rendelkező DAD-okat idézett elő. 30-40 percig tartó 10-10 µM dronedaron illetve amiodaron alkalmazás jelentősen csökkentette az ouabain indukálta DAD utópotenciálok amplitúdóját (dronedaron esetében 10.2±0.4 mV-ról 1.8±0.6 mV-ra, n=5; p<0.05, illetve amiodaron esetében 11.1±0.7 mV-ról 2.4±0.5 mV-ra, n=5, p < 0.05; **9B. ábra**).



9. ábra. Az akut alkalmazott dronedaron és amiodaron hatásai a korai (EAD, A. panel) és késői utódepolarizációkra (DAD, B. panel) kutya bal kamrai Purkinje rostokban. **A. panel.** Az EAD-okat 1 µM dofetilid 5000 ms ciklushosszon (CL) történő alkalmazásával idéztük elő. **B. panel.** A DAD-okat 0.2-0.3 µM ouabain 500 ms ciklushosszon történő alkalmazásával idéztük elő.

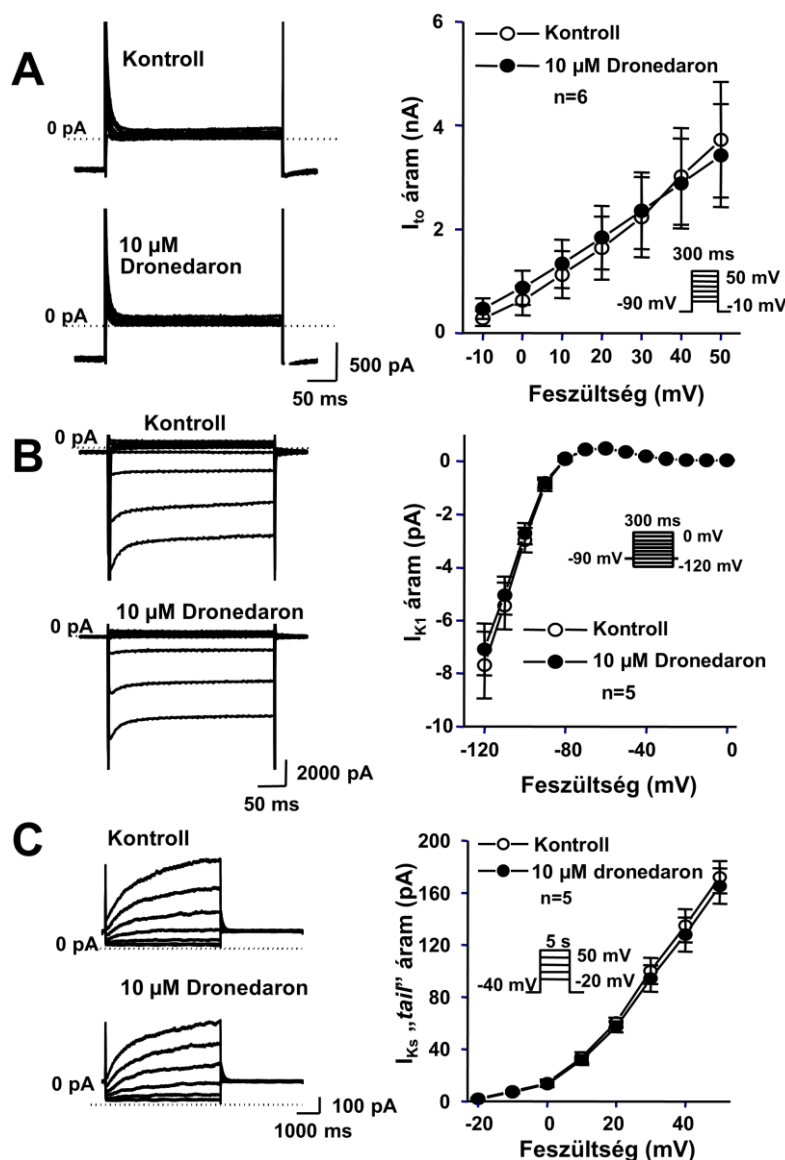
Az eddigi EKG és akciós potenciál mérések a dronedaron alkalmazás okozta PQ távolság megnyúlását, illetve a repolarizáció gátlását igazolták. Ezért, hogy megállapítsuk a dronedaron celluláris elektrofiziológiai profilját, megvizsgáltuk a szer akut alkalmazott hatásait a különböző transzmembrán ionáramokra, enzimatikusan izolált kutya balkamrai szívizomsejtekben. A dronedaron 10 µM koncentrációban gátolta az L-típusú kalcium áram amplitúdóját (**10A. ábra**). 0 mV membránpotenciálnál mérve a dronedaron 76 %-ban csökkentette az I_{CaL} áram amplitúdóját. Az áram kontroll körülmények között 1137.7 ± 299.1 pA volt, amely 270.5 ± 70.5 pA-ra csökkent ($n=6$, $p<0.05$) a szer gátló hatása eredményeként. Megvizsgáltuk a dronedaron lehetséges hatásait a négy legfontosabb repolarizáló káliumáramra. A szer egyedül a késői egyenirányító káliumáram (I_{Kr}) amplitúdóját

csökkentette statisztikailag szignifikáns módon. Amint a **10B. ábrán** is látható, a dronedaron 10 μM koncentrációban gyakorlatilag 100%-ban gátolta az I_{K_r} áramot valamennyi vizsgált membránpotenciálon (-20 mV és +50 mV között).



10. ábra. Dronedaron (10 μM) hatása az L-típusú kalcium áramra (I_{CaL} , **A. panel**) és a késői egyenirányító káliumáramam gyors komponensére (I_{K_r} , **B. panel**) kutya balkamrai szívizomsejtekben. A bal oldali mezők eredeti áram regisztrátumokat mutatnak be kontroll körülmények és a szerrel történő perfúzió után, amíg a megfelelő jobb oldali diagramok az I_{CaL} , illetve I_{K_r} áramra vonatkozó átlag áram-feszültség (I-V) karakterisztikákat mutatják be. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva.

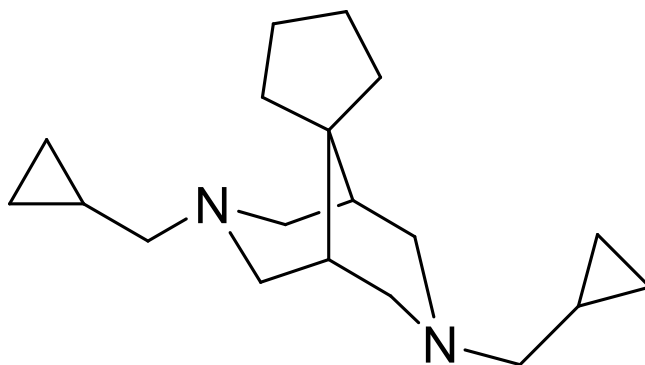
Az dronedaron a többi repolarizáló káliumáramot viszont nem befolyásolta. A **11. ábrán** látható, hogy a szer 10 μM koncentrációban sem változtatta meg a tranziens kifelé haladó (I_{to}), befelé egyenirányító (I_{K1}) és a lassú kinetikájú késői egyenirányító káliumáramok (I_{Ks}) amplitúdóit.



11. ábra. Dronedaron (10 μM) hatásának hiánya a tranzien্স kifelé haladó K⁺-áramra (I_{to}, **A. panel**), a befelé egyenirányító K⁺-áramra (I_{K1}, **B. panel**) és a késői egyenirányító K⁺-áram lassú komponensére (I_{Ks}, **C. panel**) kutya balkamrai szívizomsejtekben. A bal oldali mezők eredeti áram regisztrátumokat mutatnak be, amíg a jobb oldali diagramok a megfelelő áramokra vonatkozó áram-feszültség (I-V) karakterisztikákat mutatják be. Az értékek átlag±SEM-ként megadva.

A tedisamil (KC-8857) elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata emlősszívvekből izolált kamrai szívizomsejteken

A tedisamil fejlesztése szintén beleillik abba a fejlesztési irányba, amely a CAST/SWORD vizsgálatok kudarcos eredménye után kezdődött. A kiinduló pont ezúttal is az volt, hogy bár a klasszikus „single-channel” gátlószerek gyógyszerre fejlesztésének gondolatát korábban ígéretesnek gondolták, ezt az eredmények megcáfolták. Ezután kezdődött el a „multichannel” gátló vegyületeknek antiaritmiás szerként történő fejlesztése. A tedisamil (korábban KC-8857 néven is ismert vegyület, **12. ábra**) egy a Solvay Pharma által eredetileg antiiszkémiás szernek tervezett hatóanyag (Grohs, 1989).



12. ábra. A tedisamil vegyület kémiai szerkezete ($C_{19}H_{32}N_2 \cdot HCl$) és IUPAC neve: [3,7-bis(cyclopropylmethyl)-9,9-tetramethylene-3,7-diazabicyclo-(3.3.1)nonane dihydrochloride].

Számos klinikai vizsgálat igazolta antiiszkémiás hatását (Fox, 2000). Később több kísérletes tanulmány igazolta, hogy a tedisamil megnyújtja az APD, illetve a QT intervallumot (Oexle, 1987; Beatch, 1991), és mint ilyennek vélhetően III-as típusú antiaritmiás/antifibrilláns hatása van (Adaikan, 1992; Friedrichs, 1996 és 1998; Fischbach, 1999 és 2001; Flores, 2001). Igazolták, hogy több káliumáram hatékony blokkolója (például I_{to} , I_{KATP} , I_K) (Dukes, 1989 és 1990; Beatch, 1990; Tsuchihashi, 1991), illetve gátolja a depolarizáció maximális sebességet (V_{max} ; Beatch, 1990).

Mivel ezek a tanulmányok nem voltak elég gondosan tervezettek (például több eltérő speciesen készültek), illetve eredményeik számos ponton ellentmondásosak is voltak, azt terveztük, hogy megvizsgáljuk egy egységesen tervezett kísérletsorozatban a tedisamil celluláris szintű elektrofiziológiai tulajdonságait, úgy hogy ellenőrizzük a vegyület hatásait olyan más korábban nem vizsgált transzmembrán ionáramokra is, mint például az I_{Ks} .

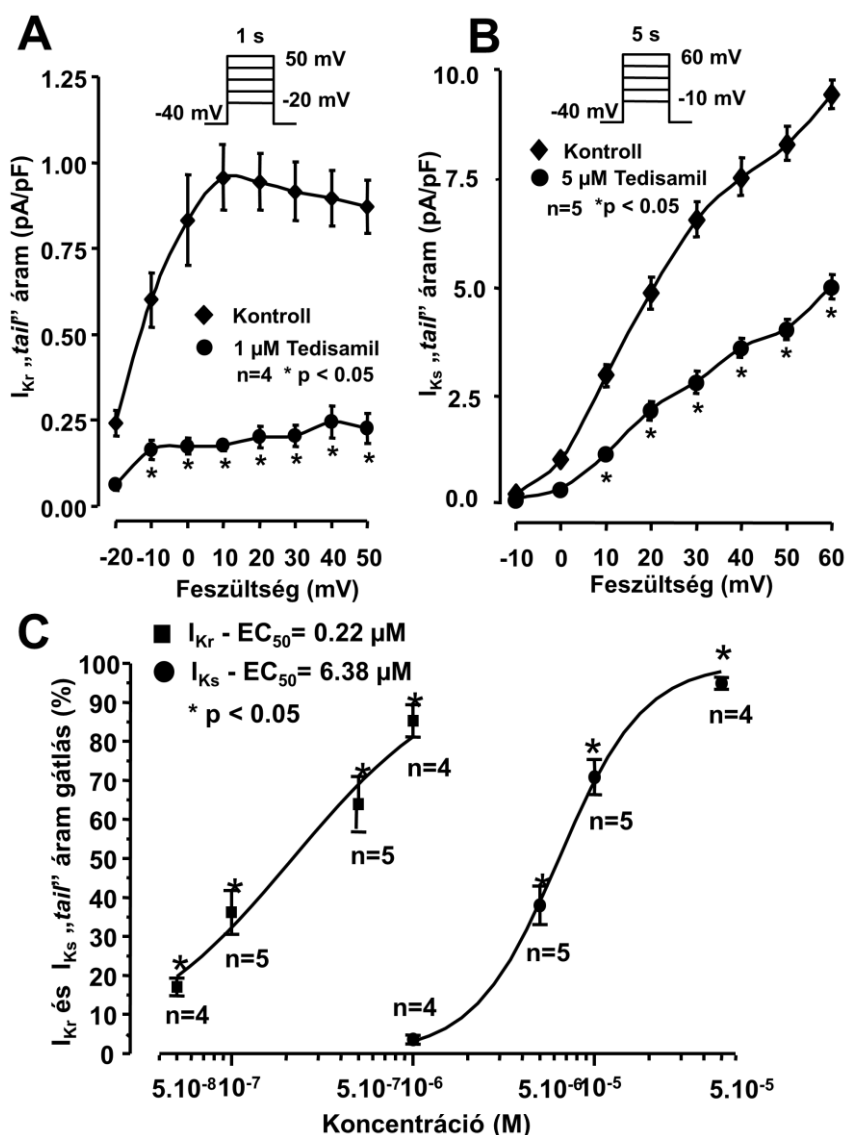
A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a *Módszerek és anyagok* fejezetben részletesen bemutattam. Az eredmények ismertetése:

A tedisamil hatásának vizsgálata a transzmembrán ionáramokra

Mivel az előzetes vizsgálatok alapján a tedisamil vélhetően III-as osztályú antiaritmiás szerként viselkedik, elsősorban a szer kamrai repolarizációra kifejtett hatására voltunk kíváncsiak. Ezért megvizsgáltuk a tedisamil hatását a repolarizációt meghatározó főbb transzmembrán káliumáramokra (I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} és I_{Ks} , valamint I_{KATP}), illetve az „inward” kalcium és nátrium áramokra.

A tedisamil jelentősen gátolta a két fontos repolarizáló késői káliumáramok gyors és lassú komponenseit (I_{Kr} és I_{Ks} áramok) tengerimalac szívekből enzimatikusan izolált kamrai miocitákban. A **13A. ábra** bemutatja, hogy a tedisamil 1 μM koncentrációban majdnem

teljesen gátolta az I_{Kr} -t. 30 mV tesztpotenciálnál mérve az I_{Kr} *tail* áram kontroll körülmények között 0.88 ± 0.17 pA/pF volt, amely a tedisamil hatására 0.23 ± 0.07 pA/pF értékre csökkent ($n=5$, $p < 0.05$).



13. ábra. 1 μ M, illetve 5 μ M tedisamil hatása a késői egyenirányító káliumáram gyors (I_{Kr} , **A. panel**) és lassú komponenseire (I_{Ks} , **B. panel**) bal kamrai tengerimalac szívműködésében. A diagramok az I_{Kr} , illetve I_{Ks} áramra vonatkozó átlag áram-feszültség (I-V) karakterisztikákat mutatják be. **C. panel.** A tedisamil vegyületnek az I_{Kr} és I_{Ks} áramokra vonatkozó dózis-hatás görbéi. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva; * $p < 0.05$.

A szer I_{Ks} áramot gátló hatása valamivel alacsonyabb mértékű volt, ugyanis csak 5 μ M tedisamil gátolta az I_{Ks} áramot jelentősebb mértékben (**13B. ábra**). 50 mV teszt membránpotenciálnál mérve, az I_{Ks} tail áram kontroll körülmények között 8.1 ± 0.3 pA/pF volt, amely 4.23 ± 0.07 pA/pF értékre csökkent a szer adása után ($n=5$, * $p < 0.05$). A tedisamil nem befolyásolta az I_{Kr} , és az I_{Ks} áram aktivációs illetve deaktivációs kinetikáit (nem mutatom). Megvizsgáltuk a tedisamil koncentráció-függő gátló hatását, amelynek

segítségével sikerült ábrázolnunk a szer dózis-hatás görbéit. A dózis hatás görbék alapján kiszámoltuk a tedisamil I_{Kr} és I_{Ks} áramokat gátló EC_{50} hatás értékeket. A két érték: $0.22 \mu M$ az I_{Kr} áram, illetve $6.38 \mu M$ az I_{Ks} áramra vonatkozó érték (**13C. ábra**).

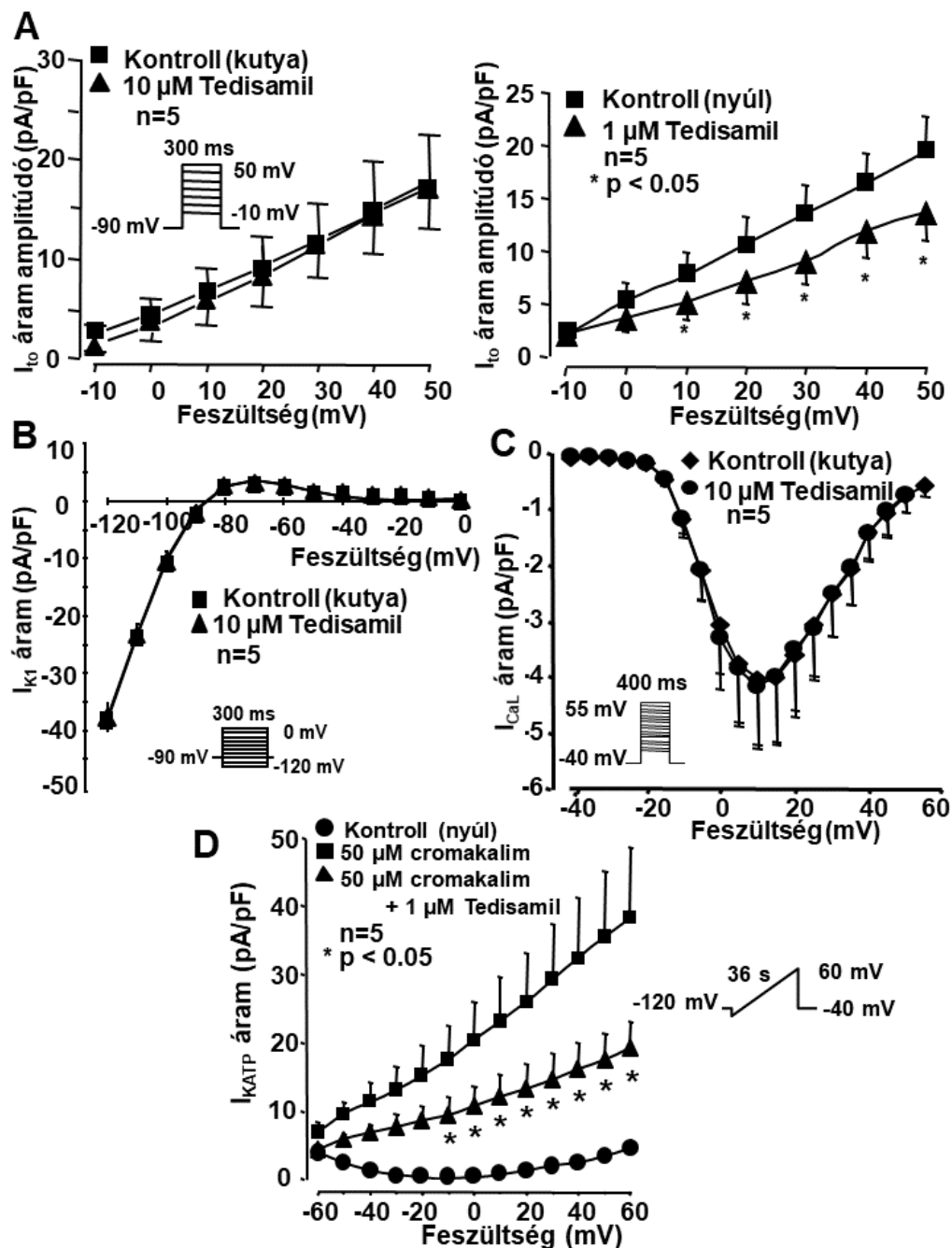
Ezután megvizsgáltuk a tedisamil gátló hatását a tranziens kifelé haladó káliumáramra (I_{to}). Mivel tengerimalac miocitákban nem létezik az I_{to} áram, ezeket a vizsgálatokat kutya kamrai szívmiocytessejteken végeztük (**14A. ábra**). Az eredményeink azt mutatták, hogy a tedisamil a magasnak tartott $10 \mu M$ koncentrációban sem csökkentette az I_{to} áram amplitúdóját a kutya kamrai miocitákban (**14A. ábra, bal oldali panel**, 50 mV -nál mérve az áram kontroll körülmények között $17.8 \pm 4.9 \text{ pA/pF}$ volt, a szer alkalmazása után pedig $17.3 \pm 4.2 \text{ pA/pF}$, $n=5$, $p=N.S.$).

Ez némileg váratlan eredménynek bizonyult, ugyanis a korábbi vizsgálatok alapján a tedisamilt hatékony I_{to} áram gátlónak jelentették (Dukes, 1989 és 1990). Mivel azok a vizsgálatok patkány szívmiocytessejtekben készültek (amelynek I_{to} áram összetétele eltér a kutyaétól) mi is megismételtük ezt a kísérletet úgy, hogy ezúttal nyúl kamrai miocitákban ellenőriztük a szer hatását. Mint a **14A. ábra, jobb oldali panel** is mutatja, a szer már relatív alacsony $1 \mu M$ koncentrációban jelentősen mintegy 40%-ban gátolta az I_{to} áram amplitúdóját (50 mV -nál mérve az áram kontroll körülmények között $20.3 \pm 3.9 \text{ pA/pF}$ volt, amely a szer alkalmazása után pedig $13.9 \pm 2.8 \text{ pA/pF}$ értékre csökkent, $n=5$, $*p<0.05$). A tedisamil ugyanakkor közvetlen áramgátló hatása mellett felgyorsította az I_{to} áram inaktivációs kinetikáját is. Eredményeink alapján az I_{to} áram inaktivációs kinetikájának az időállandója (τ) kontroll körülmények között $8.3 \pm 0.6 \text{ ms}$ volt, amely a tedisamil hatására $3.5 \pm 0.5 \text{ ms}$ ($n=5$, $*p<0.05$) értékre csökkent.

A **14B-14C. ábrák** bemutatják, hogy a tedisamil a magasnak tartott $10 \mu M$ koncentrációban izolált balkamrai kutya szívmiocytessejtekben mérve nem gátolta sem a befelé egyenirányító káliumáramot (I_{K1} áram -100 mV -nál mérve kontroll körülmények között $10.4 \pm 0.5 \text{ pA/pF}$, illetve a szer adása után $9.8 \pm 1.2 \text{ pA/pF}$, $n=5$, $p=N.S.$), sem az L-típusú kalciumáramot (I_{CaL} áram 10 mV -nál mérve kontrollban $3.9 \pm 1.2 \text{ pA/pF}$, illetve $4.1 \pm 1.4 \text{ pA/pF}$ a szerhatás eredményeképpen, $n=5$, $p=N.S.$).

A **14D. ábra** bemutatja, hogy a tedisamil gátolta az iszkémiás körülmények között aktiválódó ATP-függő káliumáramot (I_{KATP}) nyúl kamrai szívmiocytessejtekben. Az I_{KATP} áramot az ismert K_{ATP} agonista cromakalim (Spinelli, 1990) segítségével aktiváltuk. Amint az ábrán is látható, a cromakalim jelentős I_{KATP} áramot aktivált: 60 mV tesztpotenciálnál mérve az áram amplitúdója kontroll körülmények között $5.3 \pm 0.6 \text{ pA/pF}$ volt, amely $50 \mu M$ cromakalim hatására mintegy $38.2 \pm 11.8 \text{ pA/pF}$ értékre nőtt ($n=5$). Ezt az áramot $1 \mu M$

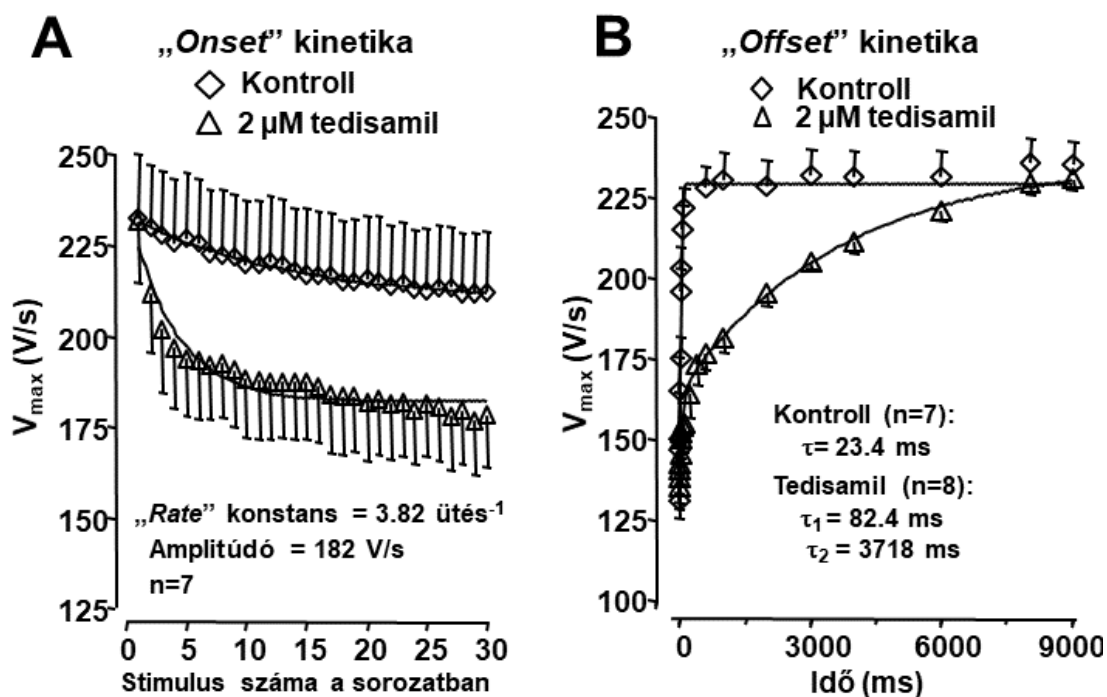
tedisamil hozzáadása jelentősen, mintegy 55%-al csökkentette (az áram értéke a tedisamil alkalmazása után 18.4 ± 4.7 pA/pF értékre csökkent, $n=5$, $*p<0.05$).



14. ábra. A tedisamil (különböző koncentrációkban alkalmazva) hatása a tranziens kifelé haladó K^+ -áramra (I_{to} , **A. panel**, kutya, illetve nyúl kamrai miocitákban), a befelé egyenirányító K^+ -áramra (I_{K1} , **B. panel**, kutya kamrai miocitákban), az L-típusú Ca^{2+} -áramra (I_{CaL} , **C. panel**, kutya kamrai miocitákban) és az ATP szenzitív K^+ -áramra (I_{KATP} , **D. panel**, nyúl kamrai miocitákban). A diagramok az adott áramra vonatkozó átlag áram-feszültség (I - V) karakterisztikákat mutatják be. Az I_{KATP} áramot cromakalimmal aktiváltuk. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva; $*p<0.05$.

Végezetül megvizsgáltuk a tedisamil hatását a nátrium csatorna „onset” és „offset” kinetikáira is, egy a dronedaron vizsgálatnál már korábban is ismertetett protokoll segítségével. A tedisamil (2 μ M koncentrációban) *use dependens* (frekvenciafüggő) módon

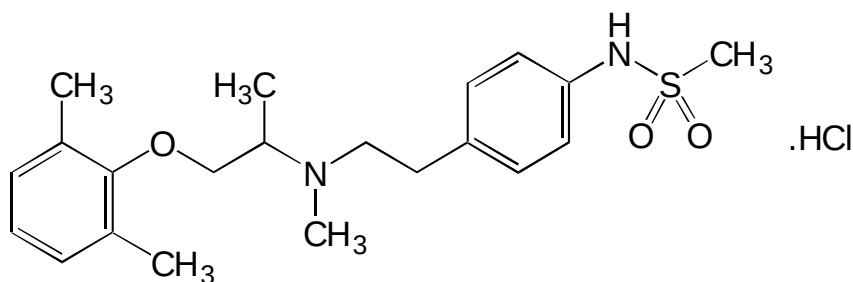
csökkentette a $V_{\max}$ -értékét. A számolt onset sebességi állandó („rate constant”) értéke 3.82 ütés^{-1} volt (**15A. ábra**). A $V_{\max}$ helyreállítási kinetikája kontroll körülmények között gyors és egy-exponenciális volt (amelynek időállandója $\tau=23.4 \text{ ms}$). $2 \text{ }\mu\text{M}$ tedisamil eredményeképpen az előző gyors komponens mellett (amely a szabad nátrium csatorna inaktivációból való visszatérését jelzi), megjelent egy lassú komponens is ($\tau=3718 \text{ ms}$), amely a tedisamil leválási kinetikáját („offset” kinetika) jelenti (**15B. ábra**).



15. ábra. A tedisamil ($2 \text{ }\mu\text{M}$) hatásai a $V_{\max}$ gátlás offset (bal oldali mező) és onset (jobb oldali mező) kinetikáira kutya jobb kamrai papilláris izmon. Az illesztések időállandóit az ábrán szerepeltetjük. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva, $n=7-8$.

Az amiodaronszerű GYKI-16638 vizsgálata emberi szívizom preparátumokon

A GYKI-16638 fejlesztése háttérében a már korábban is említett alapelv áll, hogy olyan amiodaron-szerű „multichannel” gátló („dirty drug”) vegyületet fejlesszünk ki, amelyben a repolarizációt megnyújtó (III-as osztályú) hatás egyéb, előnyösnek vélt farmakológiai tulajdonsággal (kombinált III+ I/B, II és/vagy IV osztályú aktivitás) ötvözve jelentkezik. Jelen esetben a budapesti Gyógyszerkutató Intézet gyógyszerkémikusaival együtt ko-operációban készült projekt célja egy **kombinált III+I/B** kevert hatású szernek a tervezése, szintézise és elektrofiziológiai vizsgálata volt. Mivel a vegyület struktúrája eltér az amiodaronétól, nem tekinthető amiodaron kongéner vegyületnek. A **16. ábra** bemutatja a GYKI-16638 nevű vegyület képletét.

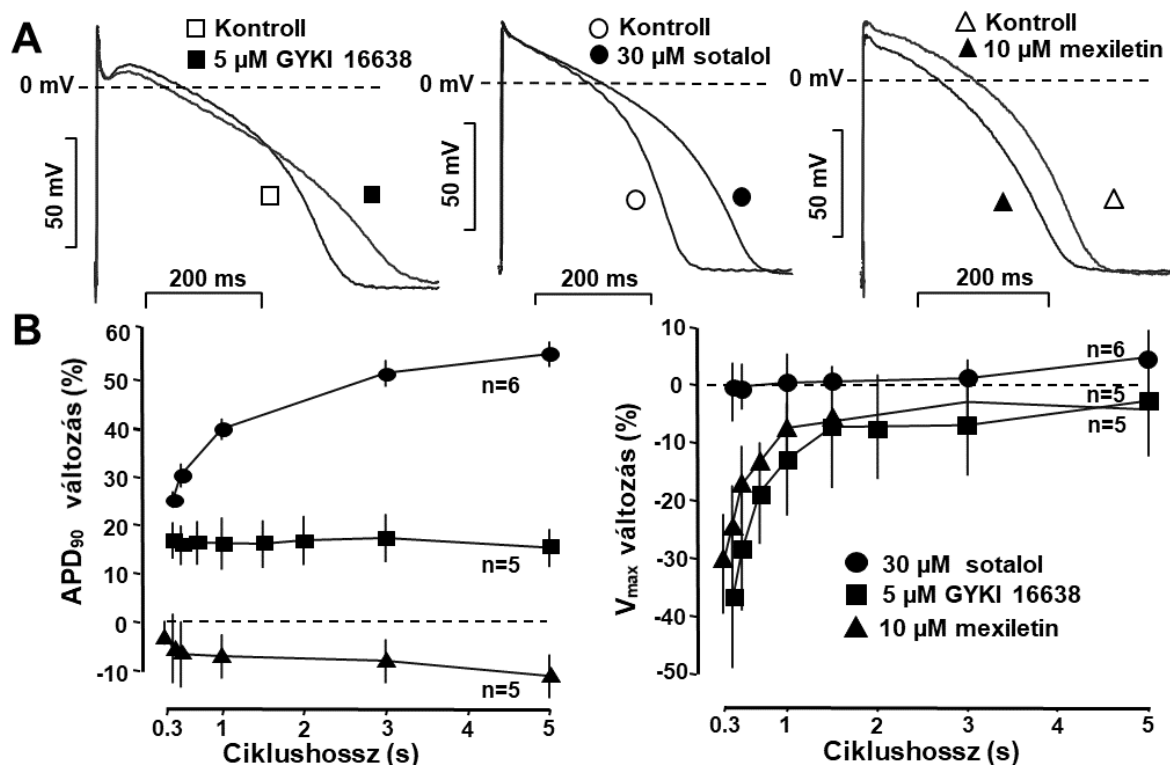


16. ábra. A GYKI-16638 vegyület kémiai szerkezete ($C_{21}H_{30}N_2O_5S$) és IUPAC neve: [3N-[4-[2-N-methyl-N-[1-methyl-2-(2,6-dimethylphenoxy)ethylamino]-ethyl]-phenyl]-methanesulfonamide-hydrochloride.

Kísérleteink célja a GYKI-16638 vegyület elektrofiziológiai hatásainak a vizsgálata volt. A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a *Módszerek és anyagok* fejezetben részletesen bemutatam. Az eredmények ismertetése:

Mivel a GYKI-16638 tervezésekor a kiinduló szempont az volt, hogy a vegyület rendelkezzen III+I/B kevert hatással, ellenőriznünk kell, hogy a vegyület valóban egyaránt rendelkezik a repolarizáció megnyújtó (d-sotalol szerű) III-as osztályú, illetve a gyors nátriumcsatorna (illetve V_{max}) gátló I/B (vagyis mexiletin szerű) hatással is. Kísérleteinkben egészséges humán donorszívekből származó jobb kamrai izmon megmértük a GYKI-16638 vegyületnek az akciós potenciál legfontosabb paramétereire kifejtett hatását, illetve az eredményeket összehasonlítottuk a hasonló körülmények között külön-külön vizsgált sotalol és mexiletin nevű antiaritmiás szerekkel történő mérések eredményeivel.

A GYKI-16638 vegyületet $5\ \mu M$ koncentrációban alkalmaztuk, és az eredményeket összehasonlítottuk $30\ \mu M$ sotalol, illetve $10\ \mu M$ mexiletin hatásainak az eredményeivel. Az $1\ Hz$ frekvencián mért eredményeket a **17A. ábra**, illetve **8. táblázat** foglalja össze. Jól látható, hogy $5\ \mu M$ GYKI-16638 jelentősen megnyújtotta a repolarizációt jellemző APD_{90} értéket, viszont nem változtatta meg sem az APD_{50} , sem a többi vizsgált AP paraméterek értékét. A sotalol ($30\ \mu M$) megnyújtotta, a mexiletin ($10\ \mu M$) viszont rövidítette az APD_{50} és APD_{90} értékeket (**17A. ábra** és **8. táblázat**). Megvizsgáltuk és a **17B. ábrán** bemutatjuk mindhárom szernek az APD_{90} , illetve V_{max} paraméterekre ható 300-5000 ms ciklushosszakon regisztrált frekvenciafüggő hatásait is. Amint a **17B. ábrán (bal oldali panel)** is láthatjuk, a sotalol (amely egy tiszta I_{Kr} gátló hatással rendelkező III-as osztályú szer) az ismert módon fordított frekvenciafüggő módon nyújtotta meg az akciós potenciál időtartamot (APD_{90}). Ez azt jelenti, hogy bradycardiában (hosszabb ciklushosszaknál, mint például 5000 ms) a repolarizáció megnyújtó hatása sokkal kifejezettebb volt, mint magasabb frekvenciákon (rövidebb ciklushosszaknál, például 300 ms).



17. ábra. A. panel. A GYKI-16638 (5 μM), a sotalol (30 μM) és mexiletin (10 μM) hatása az akciós potenciálra egészséges humán jobbkamrai izmon. A stimuláló frekvencia 1 Hz volt. **B. panel.** A GYKI-16638 (5 μM), a sotalol (30 μM) és mexiletin (10 μM) frekvenciafüggő hatásai az akciós potenciál időtartamra (APD₉₀) és depolarizáció maximális sebességére (V_{max}) humán jobbkamrai izmon. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva.

Ezzel ellentétben az I/B típusú antiaritmia szer, mexiletin rövidítette az APD₉₀ időtartamot. Az APD₉₀ csökkenés magas frekvenciákon csekély volt (statisztikailag sem szignifikáns mértékű), amíg alacsonyabb frekvenciákon (hosszú ciklushosszaknál) viszont statisztikailag is szignifikáns mértékű volt.

8. táblázat. A sotalol, mexiletin és GYKI-16638 hatása az akciós potenciál paraméterekre humán jobb kamrai izom 1 Hz stimulációs frekvencián

Szer	n	RP (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)	V _{max} (V/s)
Kontroll	6	-89.7 $\pm$ 0.9	119.2 $\pm$ 2.0	233.0 $\pm$ 17.4	301.8 $\pm$ 19.7	230.8 $\pm$ 21.3
Sotalol, 30 μM	6	-88.8 $\pm$ 1.5	119.2 $\pm$ 2.4	281.0 $\pm$ 21.0*	387.0 $\pm$ 27.6*	250.0 $\pm$ 21.1
Kontroll	6	-87.7 $\pm$ 1.0	113.8 $\pm$ 1.9	205.0 $\pm$ 19.2	271.3 $\pm$ 24.3	296.2 $\pm$ 33.3
Mexiletin, 10 μM	6	-87.7 $\pm$ 0.9	110.8 $\pm$ 2.7	186.6 $\pm$ 18.2*	254.2 $\pm$ 22.7*	288.3 $\pm$ 28.9
Kontroll	9	-87.3 $\pm$ 1.0	114.4 $\pm$ 2.2	248.6 $\pm$ 22.0	338.9 $\pm$ 28.6	289.4 $\pm$ 11.2
GYKI-16638, 5 μM	9	-87.1 $\pm$ 1.2	111.6 $\pm$ 2.4	242.6 $\pm$ 20.9	385.4 $\pm$ 24.0*	268.2 $\pm$ 17.3

Stimuláló frekvencia = 1 Hz; RP = nyugalmi potenciál; APA = akciós potenciál amplitúdó; APD₅₀ és APD₉₀ = akciós potenciál időtartam (50% and 90% repolarizációnál mérve); V_{max} = depolarizáció maximális sebessége; *p<0.05.

A GYKI-16638 APD_{90} megnyújtó hatása jelentős, de kevésbé markáns volt, mint amelyet a sotalol okozott. Amit viszont ki kell emelnünk, az az, hogy ez az APD_{90} megnyújtó hatás nem bizonyult frekvenciafüggőnek, vagyis a gyógyszer indukálta megnyújtás hasonló mértékű volt a teljes vizsgált frekvenciatartományban (**17B. ábra. bal oldali panel**). Megvizsgáltuk a három szernek a V_{max} paraméterre vonatkozó hatásait is. Amint a **17B. ábrán (jobb oldali panel)** láthatjuk, a sotalol mintegy igazolva más specieseken ismert hatásait, nem változtatta meg a V_{max} paramétert egyetlen frekvencián sem. Ezzel ellentétben a mexiletin (10 μ M), illetve a GYKI-16638 (5 μ M) *use dependens* frekvenciafüggő módon gátolta a depolarizáció maximális sebességét. Ez azt jelenti, hogy minél magasabb a frekvencia, annál markánsabb a vegyület V_{max} gátló hatása is. A két szer V_{max} gátló hatása igen hasonló volt, és azt is ki kell emelni, hogy ez a hatás csak a normál szívfrekvenciánál magasabb (1000 ms ciklushossz alatti) értékeknél jelent meg. Ez a „*use-dependens*” hatás vélhetően annak az eredménye, hogy a mexiletin és a GYKI-16638 vegyületek lassítják a nátrium csatornák inaktivációból történő visszatérési („*recovery from inactivation*”) kinetikáját. Amíg a sotalol hatására a V_{max} értéke mintegy 30-40 ms alatt visszatér a kontroll értékekhez közeli állapotba, a mexiletin, illetve a GYKI-16638 esetében a V_{max} *recovery* kinetikája szignifikánsan lelassult. A mexiletin esetében a visszatérési kinetikai állandó 310 ± 71 ms (amplitúdó 96.9 ± 12.7 V/s, $n=6$), amíg a GYKI-16638 esetében ugyanez az érték 298 ± 70 ms volt (amplitúdó 74.9 ± 13.7 V/s, $n=8$).

2. témakör. A szívizom repolarizációjában részt vevő különböző K^+ -csatornák kölcsönhatásának vizsgálata. A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége emlős kamraizmon

A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége a kamrai aritmogenezisben

Mint már az előző alfejezetekben is többször taglaltam, a szívritmuszavarok gyógyszeres kezelésének egyik lehetséges és kiemelkedően fontos módja az akciós potenciál időtartamának (APD), illetve effektív refrakter periódusának a megnyújtása, amit a Vaughan Williams féle klasszifikációban III-as típusú antiaritmias hatásnak nevezzünk (Singh, 1970a). Ma már köztudott, hogy az akciós potenciál időtartamának megnyúlása bizonyos helyzetekben proaritmias szövődményhez (*Torsades de Pointes* típusú kamrai tachycardia) vezethet, melynek következtében növekszik a gyógyszer okozta össz mortalitás (Surawicz, 1989; Hondeghem, 1990; El-Sherif, 1992; Hohnloser, 1994).

A kamrai repolarizáció az extracelluláris térből sejtbe befelé haladó (mint például az I_{Na} és I_{Ca} -áramok), illetve a sejtből kifelé haladó számos ionáram (mint például az I_{to} , I_{Kr} I_{Ks} és I_{K1}) finom egyensúlyaként jön létre. Fiziológiai körülmények között a káliumcsatornák egyetlen típusának sérülése vagy gyógyszeres gátlása kifejezett, potenciálisan veszélyes APD megnyúlást várhatóan nem eredményez, mivel a többi káliumáram megfelelő repolarizációs kapacitást képes biztosítani. Ezt a jelenséget nevezte el Roden professzor „repolarizációs tartaléknak” („*repolarization reserve*”) (Roden, 1998 és 2005).

Korábbi kutatásaink eredményei szerint az I_{Ks} áram szelektív gátlása csak minimális repolarizáció megnyúlást eredményez kutya kamrai szívműködés során. Amikor azonban a repolarizációs tartalékot E-4031 és veratrin alkalmazásával előzetesen legyengítettük, az I_{Ks} blokkolása már markáns repolarizáció megnyúlást eredményezett (Varró, 2000). Jelen munkánk célja az volt, hogy a celluláris elektrofiziológia eszköztárát felhasználva, vizsgálatokkal meghatározzuk a különböző káliumáramok egymás közötti kölcsönhatását, és kísérletesen igazoljuk a repolarizációs tartalék lehetséges szerepét a kamrai szívműködés repolarizációja során.

Vizsgálatainkat több speciesen is elindítottuk, de értelemszerűen az egészséges humán donor szívműködés mintákból, illetve a repolarizációt meghatározó legfontosabb áramok szempontjából igen jó modellnek számító kutya szívekből származó kísérleti eredmények a legjelentősebbek. A kísérletes felállást (oldatok és alkalmazott protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben részletesen bemutatam. Az eredmények ismertetése:

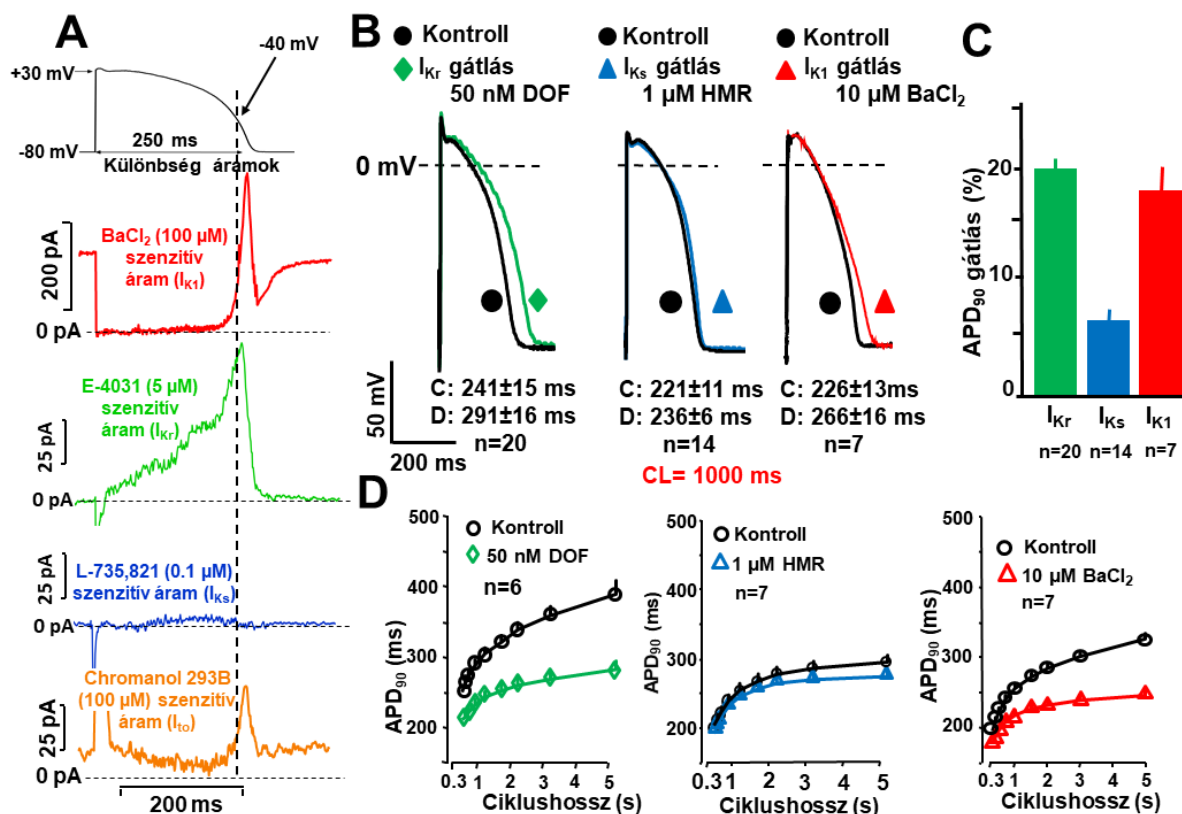
A repolarizációs tartalék kísérletes bizonyítása kutya és emberi kamrai szívműködésben

A fő repolarizáló K^+ -áramok vizsgálata kutya kamrai szívműködésben

Tankönyvi adatok alapján a repolarizáció (az AP 3. fázisa, **1. ábra**) szakaszát elsősorban K^+ -áramok határozzák meg. A legfontosabb repolarizáló K^+ -áramnak a késői egyenirányító K^+ -áram gyors komponensét (I_{Kr}) tartják (Sanguinetti, 1990). Jelen vizsgálatig úgy tartották, hogy a késői egyenirányító K^+ -áram lassú komponense (I_{Ks}) is fontos repolarizáló K^+ -áram (Bosch, 1998; Schreieck, 1997). Szintén tankönyvi ismeretek alapján a tranziens kifelé haladó K^+ -áram elsősorban a korai fázis 1 repolarizációért (Corabeuf, 1982), a befelé egyenirányító K^+ -áram (I_{K1}) pedig a szívműködés membránpotenciáljának helyreállításáért felelősek (Shimoni, 1992, Anumonwo, 2010).

Korábbi vizsgálataink alapján egyre jobban megismerve ezen áramok kinetikai paramétereit, felvetődött az a gondolat, hogy utóbbi két áram is jelentősebb szerepet játszhat

a késői repolarizációban is, mint azt korábban feltételezték. Ezért megvizsgáltuk mind a négy K^+ -áram tulajdonságait akciós-potenciálszerű testpulsusok alatt kutya kamrai szívmiocytesekben. A **18A. ábra** bemutatja az I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks} és I_{to} áramoknak megfelelő akciós potenciál alatti időfüggő áramgörbéket.



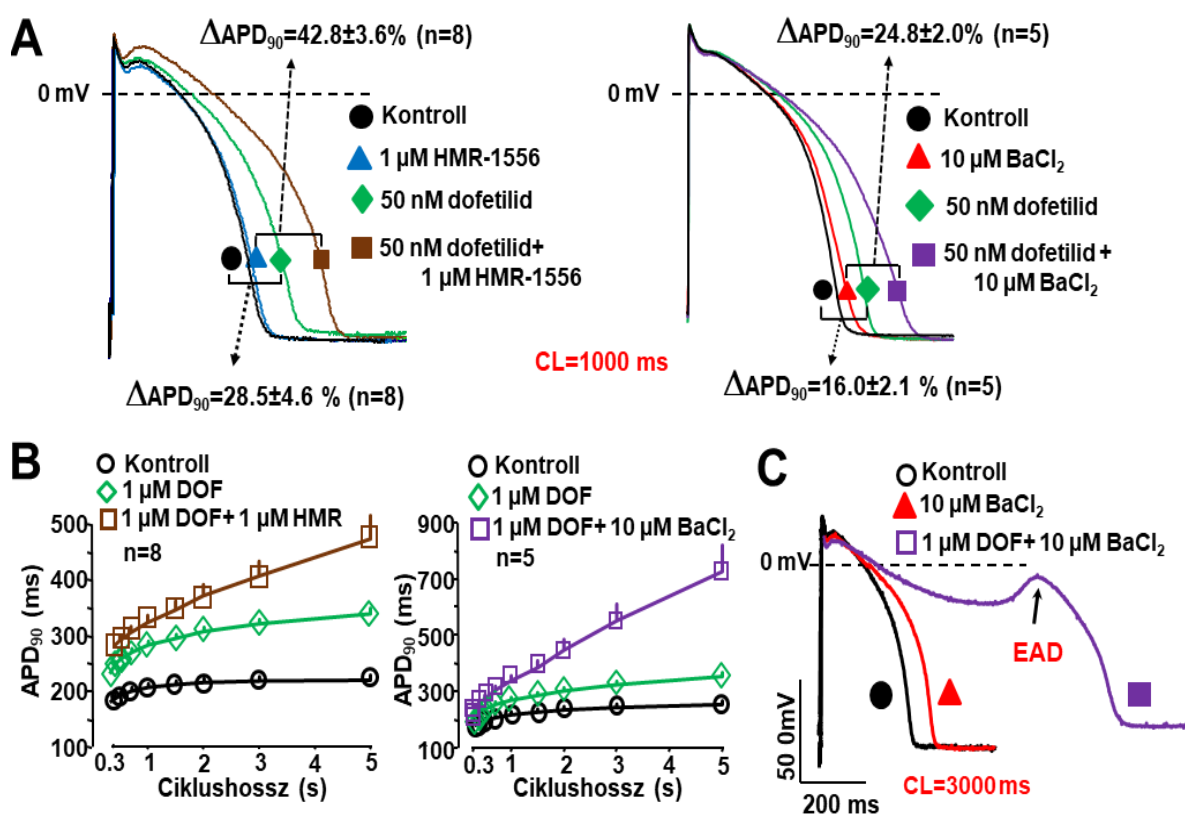
18. ábra. Az I_{K1} (BaCl₂-szenzitív áram), I_{Kr} (E-4031 szenzitív áram), I_{Ks} (L-735,821 szenzitív áram) és I_{to} (100 μ M chromanol 293B-szenzitív áram) áramok amplitúdójának az összehasonlítása normál méretű (250 ms) akciós potenciál szerű impulzusok alatt kutya jobb kamrai miocitákban (**A. panel**). I_{Kr} (50 nM dofetilid, zöld színnel jelölve), I_{Ks} (1 μ M HMR-1556, kék szín) és I_{K1} (10 μ M BaCl₂, piros szín) szelektív gátlás hatásai az akciós potenciál időtartamára kutya jobb kamrai papillaris izmon normál (CL=1000 ms) körülmények között (**B. és C. panelek**), illetve 300-5000 ms ciklushosszakon (**D. panel**). A hibasávok (SEM) gyakran kisebbek, mint a jelölő szimbólumok. CL=ciklushossz; DOF=dofetilid; HMR=HMR-1556. Az **A. panele**n a szaggatott függőleges vonal az akciós potenciál -40 mV membránpotenciál értékét jelzi.

Jól látható, hogy valóban az E-4031-szenzitív áramként definiált I_{Kr} (zöld görbe) a legjelentősebb áram az AP -40 mV-os membránpotenciálhoz kapcsolható repolarizációs időtartományban. Az L-735,821 szenzitív áramként azonosított I_{Ks} áram (kék színű áram) a teljes AP időtartam alatt alacsony, amplitúdója gyakorlatilag végig kevesebb mint 10 pA. A BaCl₂-szenzitív áramként azonosított I_{K1} áram valóban az AP alsó negatív tartományban a legerősebb, de amint a **18A. ábrán** is látható (piros színű áramgörbe), az áram már korábban a fázis 3 repolarizáció alatt is jelentős mértékű töltést vezet. És végül a magas koncentrációjú, 100 μ M chromanol 293B-szenzitív áramként meghatározott I_{to} -áram (**18A.**

ábra, narancs színű áramgörbe) is jelentős mennyiségű káliumtöltést transzportál az AP repolarizációs tartományában.

Az I_{Ks} gátlás hatása normál, illetve gyengített repolarizációs tartalék (kombinált I_{Kr} és I_{Ks} blokkolás) esetében kutya kamrai akciós potenciál időtartamára (APD)

A HMR-1556 vegyületet az I_{Ks} áram hatásos és szelektív gátlószereként tartják számon. Kísérleteinkben 1 μM HMR-1556-t használtunk, mert irodalmi adatok szerint ebben a koncentrációban az I_{Ks} áram hatékony és szelektív gátlószere (Gögelein, 2000). Az **18B.**, **18C.** és **18D. ábrák** mutatják, hogy 1 μM HMR-1556 önmagában alkalmazva csak minimális mértékben nyújtotta az APD_{90} -t (<7%) kutya jobb kamrai papilláris izmon, normál frekvencián (CL=1000 ms, **18B. ábra**, középső mező és **18C. ábra**, kék színű oszlop), illetve 300-5000 ms-ig terjedő ciklushosszakon (**18D. ábra**, középső mező). Hasonló körülmények között vizsgálva a szelektív I_{Kr} gátló dofetilid (50 nM) jelentős fordított frekvenciafüggő APD_{90} megnyújtást eredményezett (**18B. és 18D. ábrák**, bal oldali mezők és **18C. ábra**, zöld színű oszlop).



19. ábra. A kombinált $I_{Kr}+I_{Ks}$ (50 nM dofetilid + 1 μM HMR-1553) és $I_{Kr}+I_{K1}$ (50 nM dofetilid + 10 μM BaCl₂) gátlások hatásai az akciós potenciál időtartamára kutya jobb kamrai papilláris izmon 1000 ms (**A. panel**), illetve 300-5000 ms ciklushosszakon (**B. panel**). A kombinált $I_{Kr}+I_{K1}$ gátlás gyakran (3 a 7 kísérletből) korai utódepolarizációt (EAD) váltott ki (**C. panel**). A hibásávok (SEM) gyakran kisebbek, mint a jelölő szimbólumok. CL=ciklushossz; DOF=dofetilid; HMR=HMR-1556; EAD=korai utódepolarizáció.

Amikor azonban az I_{Ks} gátlószer HMR-1556-t ugyanabban a koncentrációban (1 μ M), olyan preparátumokon alkalmaztuk, melyekben a repolarizációs tartalékot az I_{Kr} áram szelektív gátlása révén (50 nM μ M dofetilid) már előzetesen gyengítettük, igen kifejezett és szignifikáns további APD megnyúlást tapasztaltunk 1 Hz-en ($28.5 \pm 4.6\%$, $p < 0.05$, $n=8$, **19A. ábra, bal oldali mező**), illetve a teljes frekvenciatartományban is (**19C. ábra, bal oldali mező**). Mindez a két szer erős additív hatására utal.

Az I_{K1} gátlás hatása normál, illetve gyengített repolarizációs tartalék (kombinált I_{Kr} és I_{K1} blokkolás) esetében kutya kamrai akciós potenciál időtartamára

Irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy a $BaCl_2$ szívizom sejtekben alacsony koncentrációban alkalmazva jelentősen és szelektíven gátolja az I_{K1} áramot (Liu, 2001). 10 μ M $BaCl_2$ önmagában alkalmazva (**18B-18D. ábrák**) fordított frekvenciafüggő módon növelte az akciós potenciál időtartamát. Például 1000 ms ciklushossznál mérve az I_{K1} gátlás önmagában $17.9 \pm 2.1\%$, -al nyújtotta meg az APD_{90} -t (**18B. ábra jobb oldali mező**, illetve **18C. ábra piros színű oszlop**, $n=7$), $*p < 0.05$).

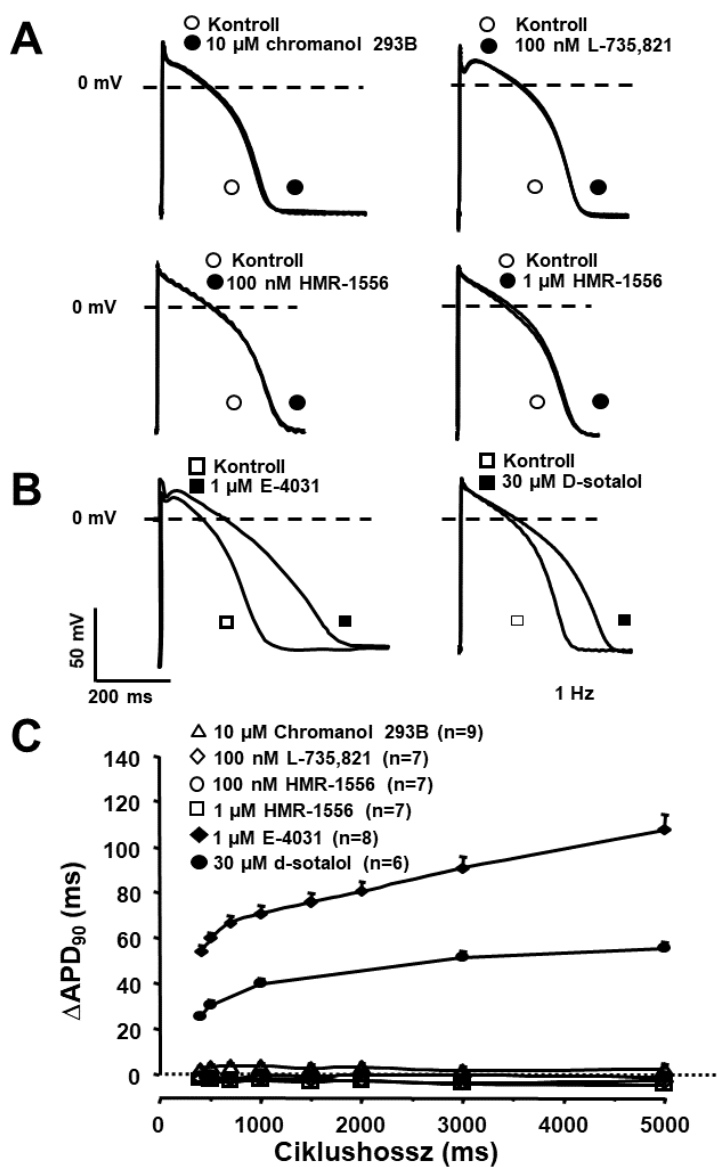
Azokon a preparátumokon, amelyeken a repolarizációs tartalék előzetesen gyengített volt (dofetilid indukálta teljes I_{Kr} blokk) a $BaCl_2$ (10 μ M) is sokkal nagyobb mértékű további fordított frekvenciafüggő APD megnyúlást eredményezett (**19A. és 19B ábrák, jobb oldali panelek**). Ez a kifejezetten nagymértékű APD megnyúlás, hosszabb ciklushossz esetén gyakran (7 kísérletből 3 esetében) korai utódepolarizációt (EAD) is eredményezett (**19C. ábra**).

Az I_{Kr} és I_{Ks} áramoknak a repolarizációs tartalékban játszott szerepének vizsgálata a humán akciós potenciál időtartamban

Az egészséges humán donor szívekből származó preparátumokon végzett a kamrai repolarizáció és repolarizációs tartalék témakörében végzett kísérletek hasonló protokollok alapján készültek, mint az előbb már ismertetett kutyakísérletek. Először normál fiziológiás körülmények között vizsgáljuk az I_{Kr} és I_{Ks} gátlás hatásait, majd utána gyengített repolarizációs körülmények között.

Kísérleteinkben a következő három szelektív I_{Ks} gátló vegyület hatását ellenőriztük a humán kamrai izom APD-re: chromanol 293B (10 μ M alacsony koncentrációban; Sun, 2001), L-735,821 (100 nM; Salata, 1996), illetve a HMR-1556 (100 nM és 1 μ M; Gögelein, 2000) (**20. ábra**).

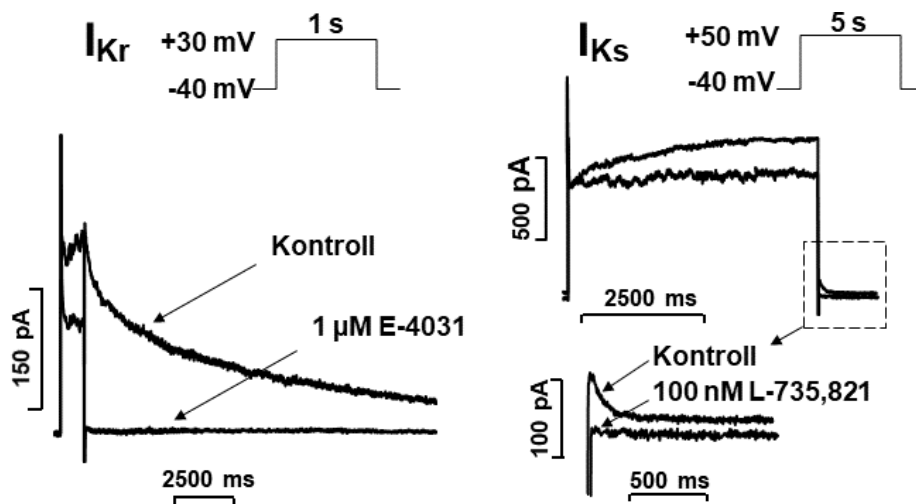
Mint a **20A. és 20C. ábrákon** látható az I_{Ks} gátló vegyületek önmagukban alkalmazva csak minimális mértékben, mintegy maximum 10-12 ms-al (<7%) nyújtották az APD-t humán jobb kamrai izmon mind az 1 Hz alaphfrekvencián, mind a teljes 300-tól 5000 ms-ig terjedő ciklushosszok esetén is vizsgálva. Ezzel ellentétben az I_{Kr} gátló vegyületek d-sotalol (30 μ M), illetve E-4031 (1 μ M), markáns fordított frekvenciafüggő APD megnyújtó hatással rendelkeztek (**20B. és 20C. ábrák**) minden vizsgált ciklushosszon.



20. ábra. A és B panelek. Az I_{Ks} gátlás (10 μ M chromanol 293B, 100 nM L-735,821, 100 nM és 1 μ M HMR-1556), I_{Kr} gátlás (1 μ M E-4031 és 30 μ M d-sotalol), hatása az akciós potenciál időtartamára humán jobbkamrai papilláris izmon. **C. panel** Az I_{Kr} és I_{Ks} gátlás frekvenciafüggő hatása az akciós potenciál időtartamára humán jobbkamrai papilláris izmon. A hibásávok (SEM) gyakran kisebbek, mint a jelölő szimbólumok.

Megvizsgáltuk egy I_{Kr} gátló vegyület (1 μ M E-4031) és egy I_{Ks} gátló vegyület (100 nM L-735,821) hatását az I_{Kr} illetve I_{Ks} áramokra izolált kamrai szívműsejtekben. Az I_{Kr} és I_{Ks} áramokat „tail” áramként vizsgáltuk, úgy, hogy 1s (I_{Kr} esetében), illetve 5s (I_{Ks} esetében)

hosszú depolarizáló tesztpulzusokat alkalmaztunk +30 mV-ra (I_{Kr} áram mérésnél), illetve +50 mV-ra (I_{Ks} áram mérésnél), majd a sejtet -40 mV értékre repolarizáltuk. Az így regisztrált deaktiválódó „tail” áramot I_{Kr} illetve I_{Ks} áramoknak azonosítottuk. Amint a **21. ábrán** látható az E-4031 vegyület az hatékonyan gátolta az I_{Kr} , az L-735,821 vegyület pedig az I_{Ks} áramot.



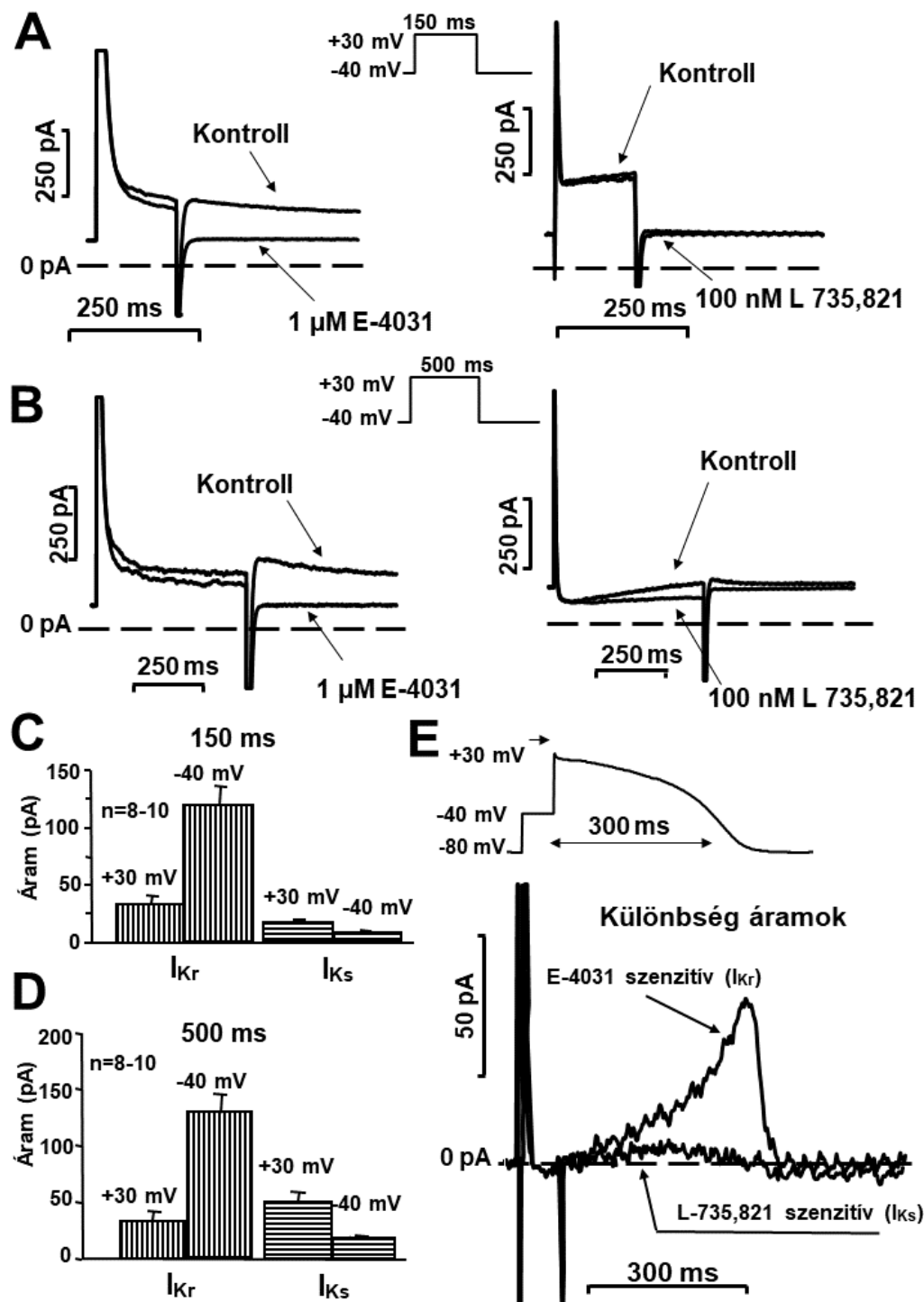
21. ábra. Eredeti I_{Kr} (E-4031 szenzitív áram) és I_{Ks} (L-735,821 szenzitív) áramregisztrátumok humán bal kamrai szívizomsejtekben. Az alkalmazott feszültség-protokollokat az ábrán piktogrammal jeleztük.

A következő kísérleteink célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy mekkora I_{Kr} , illetve I_{Ks} áram aktiválódik egy standard humán akciós potenciál okozta depolarizáció hatására. Ezért összehasonlítottuk az I_{Kr} és I_{Ks} áramok amplitúdóit, amelyek egy 150 ms hosszú 30 mV-ra depolarizáló négyszögjel impulzus után, illetve amelyek -40 mV-ra tartó potenciál (HP) történő, visszatérés után (hozzá tartozó „tail” áramok amplitúdói) aktiválódnak.

A 30 mV depolarizáló teszt potenciál bár valamivel pozitívabb, ennek ellenére viszonylag jól modellezi egy szívizomsejt akciós potenciáljának a plató fázisát, amíg a tesztpulzus tartó potenciálja (HP= -40 mV) megfelel az akciós potenciál repolarizációjának az értékével.

Ezen protokollok segítségével megmértük az I_{Kr} és I_{Ks} áramokat kontroll körülmények, illetve E-4031 (1 μ M) vagy L-735,821 alkalmazása után (**22. ábra**). Amint a **22A. bal oldali panel, illetve 22C. ábrák** mutatják, a regisztrált értékek segítségével számolt E-4031 különbség áram (vagyis I_{Kr} áram) a 150 ms hosszú pulzus végén (vagyis +30 mV értéken) 32.9 ± 6.7 pA ($n=8$) volt, és körülbelül mintegy 27%-a a „tail” áram értékének (119.9 ± 16.6 pA, $n=8$), amelyet akkor mértünk amikor a sejtet -40 mV értékre repolarizáltuk.

Hasonló körülmények között mérve az L-735,821 szenzitív áram (I_{Ks} áram, **22A. jobb oldali panel, illetve 22C. ábrák**) a 30 mV teszt-pulzusnál mért érték (17.8 ± 2.94 pA, $n=10$) nagyobb volt, mint a -40 mV-nál regisztrált „tail” áram 6.7 ± 1.93 pA, $n=10$), amely legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint az I_{Kr} tail áram érték.



22. ábra. Az I_{Kr} (E-4031 szenzitív áram) és I_{Ks} (L-735,821 szenzitív) áramok amplitúdójának az összehasonlítása rövid (150 ms, **A és C panelek**), illetve hosszú (500 ms, **B és D panelek**) időtartamú négyszögjel, illetve normál méretű akciós potenciál szerű impulzusok (**E panel**) alatt humán bal kamrai szívizomsejtekben. Az alkalmazott feszültség-protokollokat az ábrán piktogrammal jeleztük.

Ezután megismételtük ezt a kísérletsorozatot, de úgy, hogy a +30 mV-ra depolarizáló tesztpulzus hossza 500 ms volt. Az E-4031 szenzitív I_{Kr} áramértékek mind +30 mV, mind -40 mV membránpotenciál értékeken hasonlóak voltak, mint amelyeket a rövid 150 ms hosszú pulzus után mértünk (+30 mV-nál mérve 33.6 ± 6.1 pA illetve -40 mV-nél mérve 128.1 ± 17.4 pA, $n=8$; **22B. bal oldali panel, illetve 22D. ábrák**). Ennek az az oka, hogy az I_{Kr} a gyors aktivációs kinetikája következtében sokkal gyorsabban aktiválódik, minthogy az elérje a 150 ms, vagy akár 500 ms depolarizáló tesztpulzus végét.

Ezzel ellentétben az L-735,821 szenzitív I_{Ks} áram lassú kinetikával aktiválódik (aktivációs időállandója $\tau \approx 800-1000$ ms; Virág, 2001). Ennek következtében az 500 ms tesztpulzus után mért I_{Ks} áramértékek szignifikánsan megemelkedtek (+30 mV-nál mérve 49.6 ± 7.24 pA, amíg -40 mV-nál mérve 6.4 ± 3.0 pA volt), amikor a tesztpulzus hosszát 150 ms-ról 500 ms-ra nyújtottuk (**22B. jobb oldali panel, illetve 22D. ábrák**).

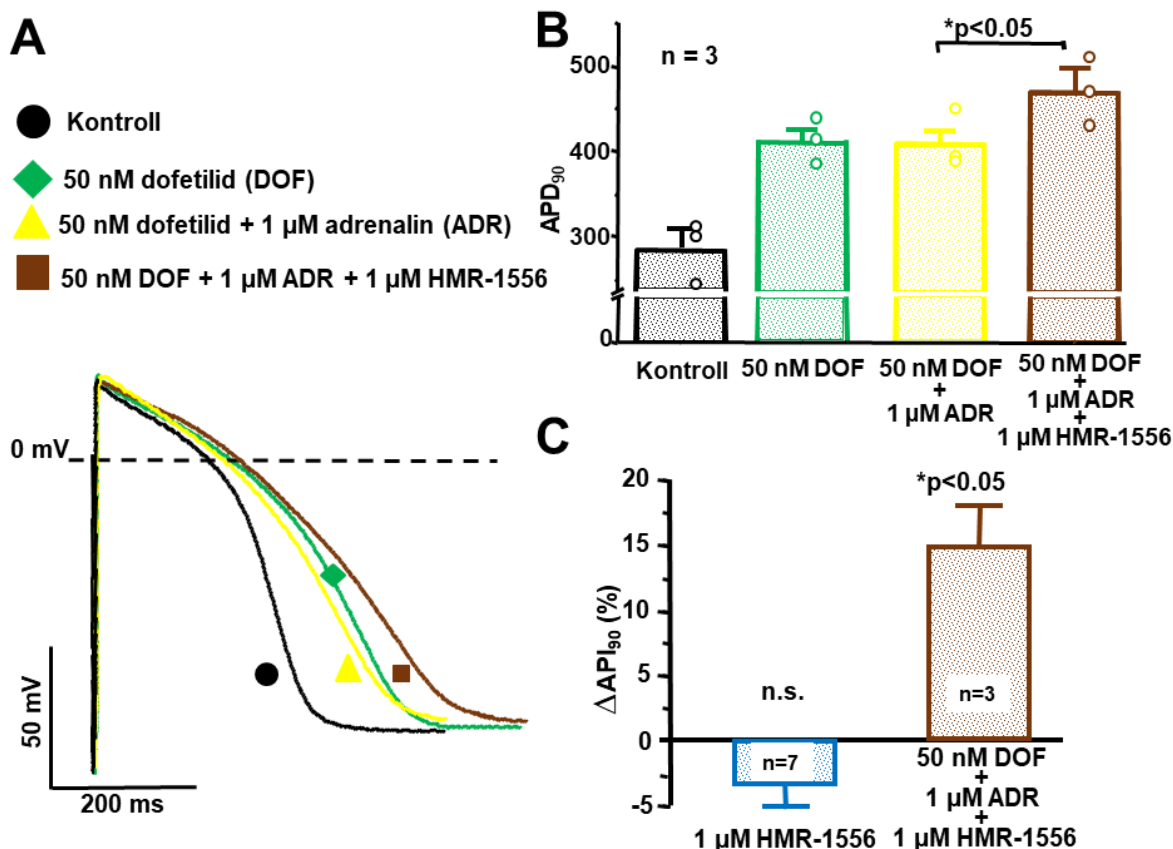
Végezetül, megismételtük ezen kísérleteket, mégpedig úgy, hogy egy tipikus 1 Hz frekvencián regisztrált jobb kamrai humán akciós potenciál görbét digitalizáltunk, és azt alkalmaztuk depolarizáló tesztpulzusnak. Az akciós potenciálszerű pulzus -85 mV diastoles nyugalmi potenciálról indul, mintegy 115 mV amplitúdóval rendelkezik és az APD_{90} körülbelül 300 ms hosszú volt, amely megfelel egy normál humán 400 ms hosszú QT intervallumnak a 70 ütés per perces szívfrekvencián (**22E. ábra** pulzusprotokoll).

Az akciós potenciálszerű pulzusprotokollal regisztrált I_{Kr} áram (E-4031 szenzitív különbségáram) a tesztpulzus plató alatti tartományban a gyors inaktiváció következtében relatíve alacsony volt (ez hasonló a 20A. ábra bal oldali panelen bemutatott kísérlethez, amikor +30 mV membránpotenciálnál mért értékek is alacsonyak a -40 mV-nál regisztrált „tail” áramhoz viszonyítva), majd az I_{Kr} áram amplitúdója fokozatosan emelkedett, ahogy az alkalmazott tesztpulzus jelalakja egyre negatívabbá vált. Ezzel ellentétben az I_{Ks} áram (L-735.821 szenzitív különbségáram) végig alacsony (<10 pA) maradt az aktiváló tesztpulzus alatt. Ez az érték jól korellál a **22A (jobb oldali panel)** bemutatott kísérlettel, amelyen az I_{Ks} áram mind 30 mV, mint -40 mV membránpotenciál értékeknél alacsony maradt. Ugyanakkor ezen eredmények összhangban vannak azzal az észrevétellel is, hogy I_{Ks} gátló chromanol 293B, L-735,821, illetve HMR-1556 vegyületek csak csekély mértékben, míg az I_{Kr} gátló E-4031, illetve d-sotalol molekulák jelentősen megnyújtották az APD_{90} paramétert (**20. ábra**).

Felvetődött azonban az a kérdés, hogy mi lehet akkor mégis az I_{Ks} szerepe a repolarizációban. Kísérleteink alapján arra gondoltunk, hogy fokozottabb szimpatikus

izgalom esetében, ha pozitívabb a plató feszültség és lényegesen hosszabb a repolarizációs időtartam és akkor már vélhetően több I_{Ks} -csatornának lesz lehetősége aktiválódni, amelyek gátlása már megnyújthatja a repolarizációt.

Ezért kísérleteinkben ellenőriztük 1 μ M HMR-1556 hatásait 1 μ M adrenalin és 50 nM dofetilid jelenlétében (23. ábra). Amint az 23. ábrán is látható amennyiben a preparátumot már előkezeltük dofetiliddel és adrenalinval az I_{Ks} gátlás ezúttal jelentősen megnyújtotta (14.7 ± 3.2 %, $*p < 0.05$, $n = 3$) az APD₉₀ értéket.



23. ábra. Az I_{Ks} gátlás hatása az akciós potenciál időtartamára humán jobbkamrai papilláris izmon adrenalinval fokozott szimpatikus aktivitás jelenlétében és I_{Kr} gátlással gyengített repolarizációs tartalék esetében. **A. panel.** Eredeti akciós potenciál regisztrátumok kontroll (fekete kör) körülmények között, illetve 50 nM dofetilid (zöld rombusz), 50 nM dofetilid + 1 μ M adrenalin (sárga háromszög) és 50 nM dofetilid + 1 μ M adrenalin + 1 μ M HMR-1556 (barna négyzet) után. **B. panel.** Az előző felállásban történő APD kísérletek eredményeinek 3 sejten történő átlaga. **C. panel.** 1 μ M HMR-1556 hatásainak összehasonlítása kontroll ($n=7$) körülmények, illetve I_{Kr} gátlással és adrenalinval gyengített repolarizációs tartalék ($n=3$) esetében. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva. A B panelen a körök az egyedi kísérlet értékeket jelzik; $*p < 0.05$.

Ez az észrevétel élesen ellentétben áll azzal az megfigyeléssel, hogy az I_{Ks} gátlás **normál körülményekben** csak jelentéktelen APD₉₀ megnyújtó hatással rendelkezett (20A. és 23C. ábra kék oszlop). Mindez azt igazolja, hogy az I_{Ks} áramnak jelentősen megnő a

repolarizációra kifejtett hatása amennyiben a szimpatikus izgalom megemelkedik, illetve a **repolarizációs tartalék beszűkül.**

Az R-L3 vegyület optikai enantiomerjei eltérő módon modulálják az I_{Ks} áramot nyúl és tengerimalac kamrai szívízomzatban

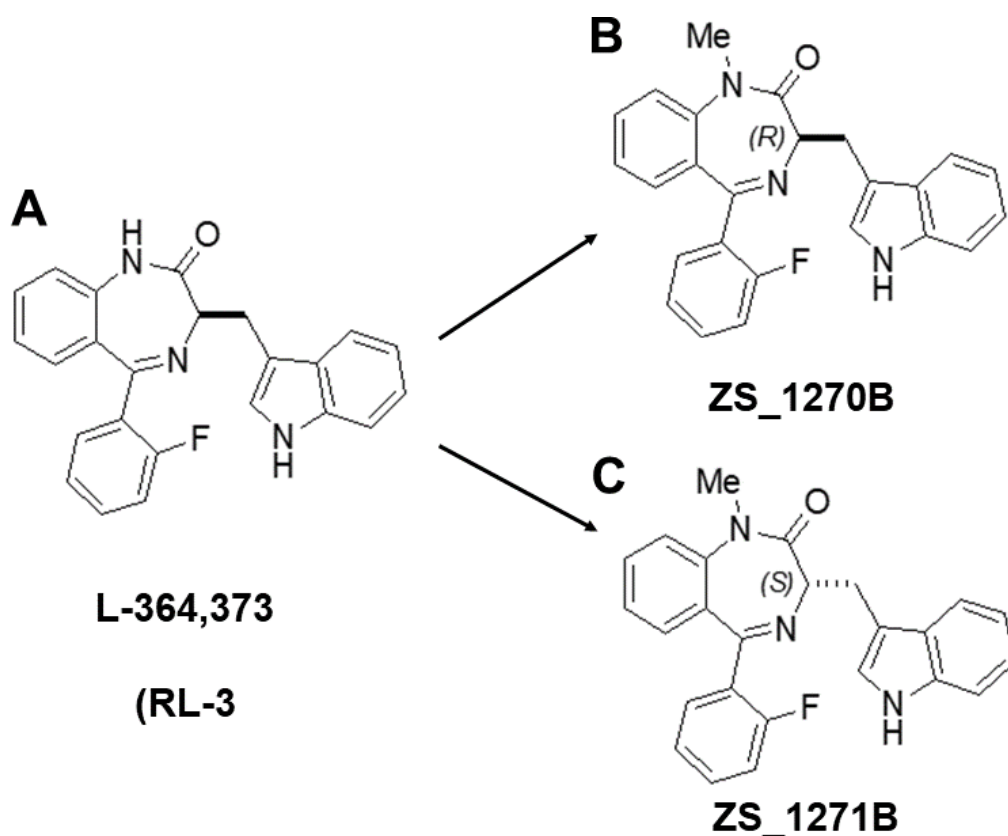
Az I_{Ks} aktivátor fejlesztésének, és antiaritmiás szerként történő hasznosításának ötlete valójában szintén a már említett Sanguinetti és Jurkiewicz által megfogalmazott hipotézisnek (Jurkiewicz, 1993) és a repolarizációs rezerv fogalomnak egyik logikus következménye. Mint az előző fejezetben is taglaltuk, a Roden által megfogalmazott és definiált repolarizációs tartalék (RT) (Roden, 1998 és 2005) fogalom szerint, egyetlen K^+ -áram gátlása által okozott repolarizáció (APD_{90} vagy QT intervallum) megnyúlás még biztonságos, ugyanis a többi K^+ -áram működése megvédi a repolarizáció túlzott már kóros és potenciálisan proaritmiás (például torzadogén) megnyúlását. Kimutattuk, hogy a repolarizációs tartalékban (RT) az I_{Ks} áram kulcs szerepet játszhat, ugyanis a lassú aktivációs kinetikájának köszönhetően kifejezetten a repolarizáció megnyúlás esetén erősödik meg, így mintegy az AP visszarövidítő jellegű védőhatást fejt ki, és éppen az I_{Ks} lehet a legfontosabb tényező az előbb említett potenciálisan torzadogén megnyúlás kivédésében. Az RT és Sanguinetti-Jurkiewicz hipotézisek (mely szerinte az I_{Ks} áram modulálása feltehetően nem reverz frekvenciafüggő) kombinációja logikusan felveti annak a lehetőségét, hogy az I_{Ks} áramot tulajdonképpen nem gátolni kellene, hanem ellenkezőleg inkább felerősíteni, vagyis aktiválni kell. Az aktivált I_{Ks} áram ugyanis úgy erősíti fel az RT-t, hogy ezzel párhuzamosan nem nyújtja meg jelentősen az AP időtartamot, vagyis az ERP rövidítése nélkül képes lenne megelőzni a korai utódepolarizációs potenciálok képződését. 1998-ban jelent meg az első tanulmány egy hatékony benzodiazepin származék I_{Ks} aktivátor molekuláról, amelynek neve L-364,373 (vagy RL-3) (Salata, 1998). Kimutatták, hogy a vegyület mikromoláris koncentráció tartományban hatékonyan aktiválja az I_{Ks} -áramot tengerimalac (Salata, 1998) és nyúl szív (Xu, 2002) szívízomsejtekben, illetve KCNQ1 csatornával expresszált *Xenopus* oocyta sejtekben (Seeböhm, 2003).

Magunk is megvizsgáltuk az RL-3 kódjelű vegyületet, de nem sikerült visszaigazolnunk az előbb említett Salata és *mtsai* által tengerimalac miocitákban bemutatott eredményeket (Salata, 1998), ugyanis kutya szívekből izolált kamrai szívízomsejtekben vizsgálva kissé meglepetés szerűen azt tapasztaltuk, hogy az RL-3 vegyület magasabb koncentrációkban inkább már gátolja, nemhogy aktiválná az I_{Ks} áramot (Magyar, 2006). Egy későbbi tanulmányban, Nissen és *mtsai* (2009) által publikált eredmények felvetették, hogy

mi lehet ennek a látszólagos ellentmondásnak a magyarázata. Ők azt tapasztalták, hogy a racém R-L3 vegyület két optikai enantiomerje ellenkező hatással modulálja az I_{K_S} -áramot, konkrétan csak a jobbra forgató *d*-enantiomer működik I_{K_S} aktiváló szerként, amíg a balra forgató *l*-enantiomer az I_{K_S} -áramot gátló tulajdonsággal rendelkezik (Nissen, 2009).

Ez az észrevétel volt a kiindulópontja vizsgálatainknak, amelynek célja ennél fogva az volt, hogy megvizsgáljuk az R-L3 vegyület optikai enantiomerjeinek hatását, nyúl és tengerimalac szívpreparátumokon a patch-clamp és standard mikroelektroda technikák alkalmazásával. A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben részletesen bemutattam. Az eredmények ismertetése:

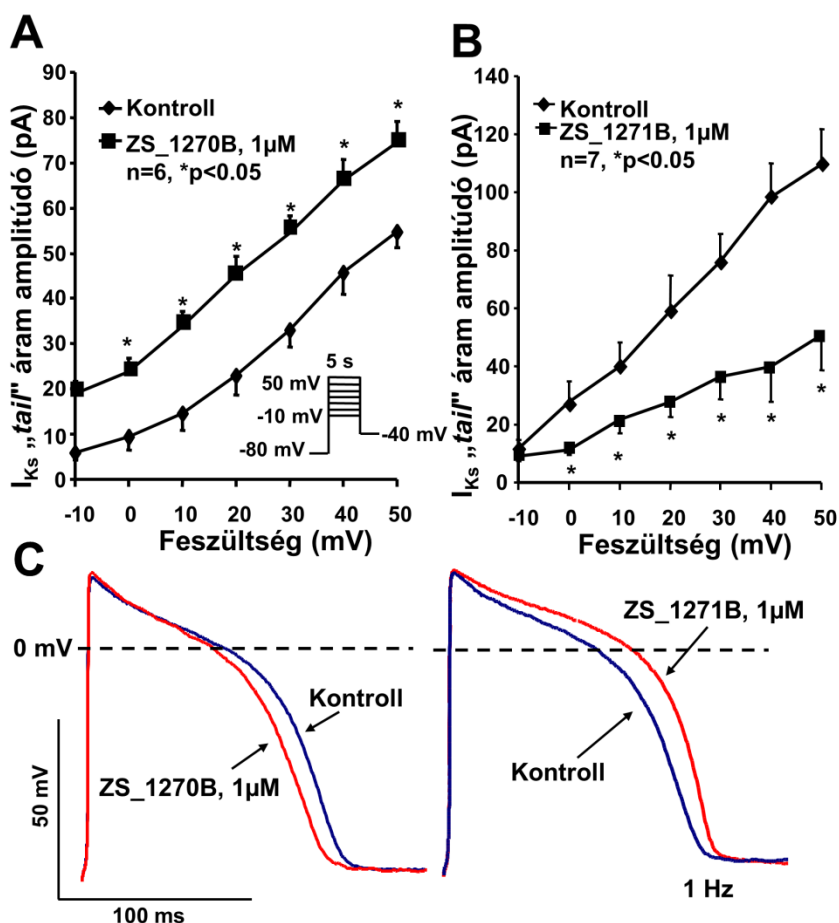
A kémiai partner segítségével szintetizáltuk a racém R-L3 (**24A. ábra** vegyület két optikai enantiomerjét, a ZS_1270B (jobbra forgató, **24B. ábra**) és a ZS_1271B (balra forgató, **24C. ábra**) enantiomer vegyületeket.



24. ábra. A. panel. Az L-364,373 vegyület kémiai szerkezete ($C_{25}H_{20}FN_3O$) és IUPAC neve: 5-(2-Fluorophenyl)-1,3-dihydro-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one. **B. panel.** A jobbra forgató vegyület ZS_1270B kémiai szerkezete ($C_{25}H_{20}FN_3O$) és IUPAC neve: (*R*)-5-(2-Fluorophenyl)-1,3-dihydro-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one). **C. panel.** A balra forgató vegyület ZS_1271B kémiai szerkezete ($C_{25}H_{20}FN_3O$) és IUPAC neve: (*S*)-5-(2-Fluorophenyl)-1,3-dihydro-3-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1-methyl-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one).

Az R-L3 optikai enantiomer vegyületeinek hatása az I_{Ks} -áramra nyúl kamrai szívizomsejteken

Ezután külön-külön megvizsgáltuk a két vegyület hatásait az I_{Ks} áramra, és a következő eredményeket kaptuk. Amint a **25. ábrán** láthatjuk, nyúl kamrai szívizomsejtekben a jobbra forgató ZS_1270B (1 μ M) mintegy 26%-ban növelte az I_{Ks} áram amplitúdóját (40 mV-on mérve, I_{Ks} áram amplitúdója 45.9 ± 4.9 pA értékről 66.1 ± 4.54 pA-ra emelkedett, $n=6$, **25A. ábra**), míg a balra forgató enantiomer ZS_1271B azonos koncentrációban (1 μ M) mintegy 47%-ban gátolta az I_{Ks} áramot (40 mV-on mérve, I_{Ks} áram amplitúdója 97.1 ± 9.7 pA-ról 45.86 ± 11.6 pA-ra csökkent, $n=6$, **25B. ábra**).



25. ábra. A ZS_1270B (1 μ M, **A. panel**), illetve a ZS_1271B (1 μ M, **B. panel**) hatása a késői egyenirányító káliumáram lassú komponensére (I_{Ks}) nyúl kamrai szívizomsejteken. A diagramok az átlagolt I_{Ks} áram-feszültség (I-V) karakterisztikákat mutatják be. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva, $*p<0.05$. **C. panel.** A ZS_1270B (1 μ M) és a ZS_1271B (1 μ M) hatása az akciós potenciál időtartamára tengerimalac jobbkamrai izmon. A stimuláló frekvencia 1 Hz volt.

Az R-L3 optikai enantiomer vegyületeinek hatása az akciós potenciálra tengerimalac kamrai preparátumokon

Ezek az eredmények igazolták, hogy helyes volt az alaphipotézis (Nissen, 2009), vagyis az R-L3 optikai enantiomerjei valóban ellentétes I_{Ks} -áramot moduláló hatással

rendelkeznek, és mint ilyenek alkalmasak arra, hogy segítségükkel megvizsgáljuk az I_{Ks} aktiválás és gátlás kamrai akciós potenciál repolarizációra vonatkozó hatásait. A vizsgálatokat tengerimalac papilláris izmon végeztük el. Amint a **25C. ábra** is bemutatja, a jobbra forgató aktivátor enantiomer vegyület ZS_1270B (1 μ M) jelentősen rövidítette az APD_{90} paramétert ($12.2 \pm 0.9\%$, $n=4$, $*p<0.05$, **25C. ábra bal oldali panel**), amíg az I_{Ks} gátló balra forgató enantiomer vegyület ZS_1271B (1 μ M) pedig megnyújtotta az APD_{90} paramétert ($14.2 \pm 1.3\%$, $n=4$, $*p<0.05$, **25C. ábra jobb oldali panel**). A **9. táblázat** összefoglalja a két vizsgált vegyületnek a többi AP paraméterre vonatkozó eredményeit:

9. táblázat. Az R-L3 optikai enantiomer vegyületek (ZS_1271B és ZS_1270B), hatása az akciós potenciál paraméterekre jobb kamrai tengerimalac papilláris izomban.

Paraméter	RP (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)	V _{max} (V/s)
Kontroll (n=4)	-84.2 ± 0.6	106.2 ± 2.2	149.0 ± 6.2	182.1 ± 10.1	238.0 ± 9.2
1 μM ZS_1271B (n=4)	-84.3 ± 0.5	107.7 ± 2.4	$159.2 \pm 6.2^*$	$209.2 \pm 8.0^*$	$233.9 \pm 9.4^*$
Paraméter	RP (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)	V _{max} (V/s)
Kontroll (n=4)	-85.2 ± 0.3	109.4 ± 0.3	149.4 ± 5.1	184.7 ± 8.1	231.0 ± 6.2
1 μM ZS_1270B (n=4)	-84.6 ± 1.6	108.6 ± 1.7	$141.0 \pm 15.4^*$	$165.7 \pm 11.3^*$	229.9 ± 8.4

Stimuláló frekvencia = 1 Hz; RP=nyugalmi potenciál; APA = akciós potenciál amplitúdó; APD₅₀ és APD₉₀ = akciós potenciál időtartam (50% and 90% repolarizációnál mérve); V_{max} = depolarizáció maximális sebessége; az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva, $*p<0.05$.

A dilatatív cardiomiopátia módosítja a Kir2.x ioncsatornákat kódoló gének expressziós szintjét

A dilatatív cardiomiopátia (DCM) egy súlyos miokardiális megbetegedés, amelyet elsősorban a bal kamrai megnagyobbodás (dilatáció) és szisztolés diszfunkció jellemez, és igen gyakran pangásos szívelégtelenséghez, súlyos aritmiákhoz és korai szívhalálhoz vezet (Jefferies, 2010; Csanády, 1991). Kimutatták, hogy DCM-es betegekből származó szívizom mintákban az APD hosszabb lesz, mint az egészséges szívekben, csökken a nyugalmi potenciál (RP) értéke, és gyengül a vezetőképesség (Koumi, 1995). Természetesnek tűnik ennél fogva, hogy egy ilyen komplex betegség számos gén expressziós szintjét érinti. Eddig elsősorban a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) érintettségét mutatták ki DCM szívekben

(Koumi, 1995). Ismert, hogy az I_{K1} elsősorban a RP fenntartásában játszik szerepet (Shimoni, 1992, Anumonwo, 2010), és mint ilyen, ha a DCM következtében az áram tulajdonságai megváltoznak, nyilván szerepet játszhatnak a DCM indukálta aritmogenezisben is (Csanády, 1991; Hibino, 2010). Minden esetre eddig a DCM okozta I_{K1} áram változások mechanizmusának molekuláris alapjai még nem kellően tisztázottak.

Az I_{K1} áramot a Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 és Kir2.4 pórusformáló, *ún.* α -alegységekből álló heteromer felépítésű ioncsatornák hozzák létre (Marban, 2002; Rook, 2007). A Kir2.x ioncsatorna alegységeket a KCNJ család génjei, KCNJ2 (Kir2.1), KCNJ12 (Kir2.2), KCNJ4 (Kir2.3) és KCNJ14 (Kir2.4) gének kódolják. Ismert, hogy a Kir2.x alegységek expressziós szintje az egyes kardiális kompartmentekben eltérő, így ezek heterogén eloszlása vélhetően felelős lehet az I_{K1} -áramnak egyes régiókra jellemző eltérő *inward* (befelé vezető) vagy *outward* (kifelé vezető) tulajdonságaiért is (Warren, 2003).

Kimutatták azt is, hogy egy adott transzmembrán ionáram élettani szerepét jelentősen megváltoztathatják a különféle szabályozó szerepet betöltő, például az ioncsatornák membrántranszportját befolyásoló (*trafficking*) *ún.* β -alegységek is. Az I_{K1} /Kir2.x csatornák esetében ilyen szabályozó egységek lehet a membrán-asszociált *guanilát kináz* (MAGUK) fehérje családhoz tartozó SAP97 fehérje (szinapszishoz asszociált protein 97; Leonoudakis, 2001). Több irodalmi adat is utal arra, hogy a SAP97 alegység részét képezi annak a makromolekuláris komplexnek, amely a Kir2.x alegységek membrántranszportjáért is felelős (Leonoudakis, 2004). Fentiek alapján vizsgálataink célja az volt, hogy patch-clamp technika segítségével tanulmányozzuk az I_{K1} áram szerepét egészséges és DCM-es betegek szívéből származó mintákon, illetve, párhuzamosan ugyanezek a mintákon (egészséges és DCM emberi preparátumokon) molekuláris biológiai technikák segítségével (mRNS mérés qPCR technikával, illetve fehérje analízis Western-blot és immunhisztokémiai technikákkal) feltérképezzük a Kir2.x α -alegységek és SAP97 β -alegységek közötti ko-lokalizációs kapcsolatrendszerét. A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben részletesen bemutatam. Az eredmények ismertetése:

Az I_{K1} áram vizsgálata egészséges humán és DCM-es betegek szívéből származó szívizomsejteken

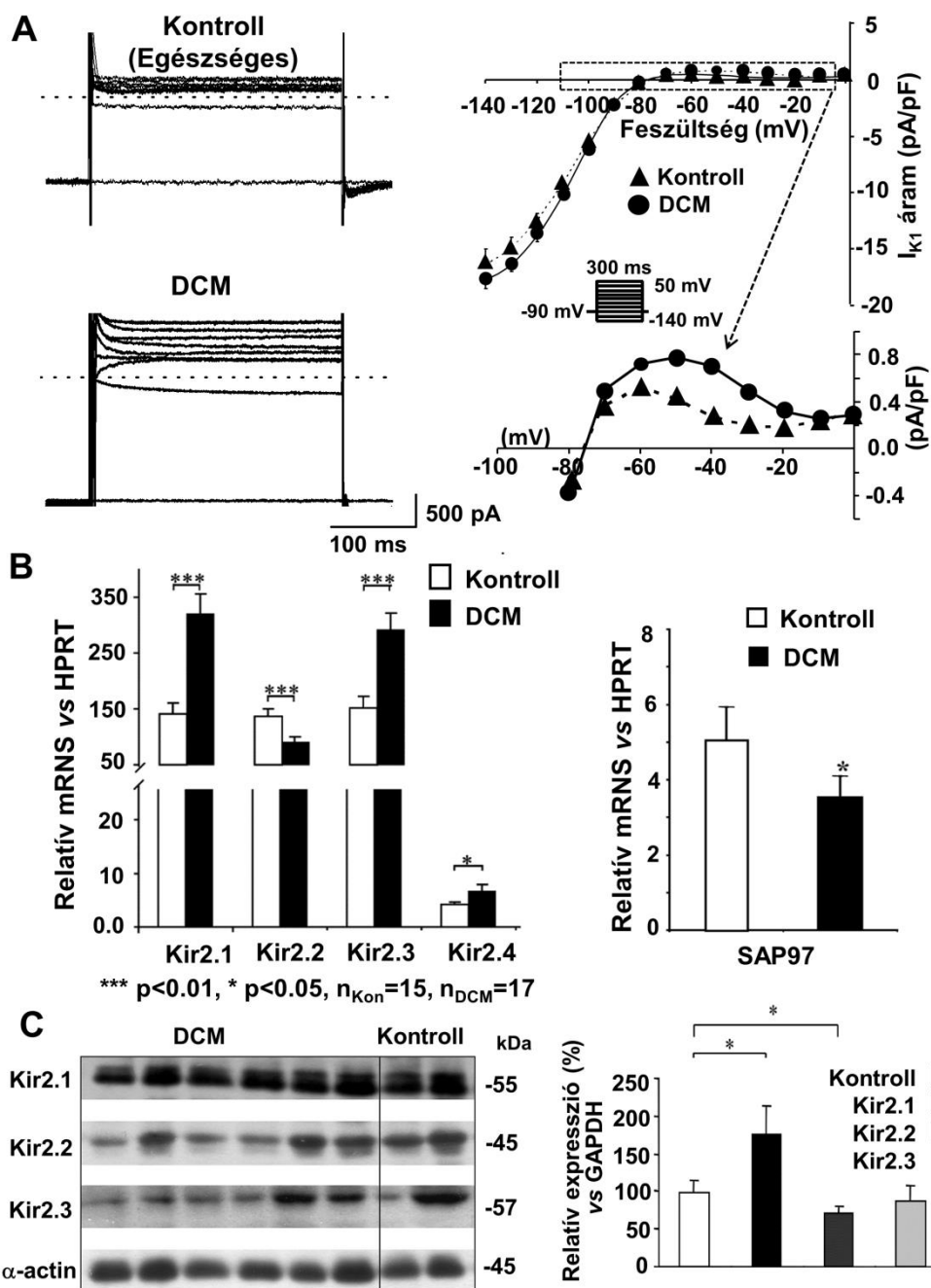
Az I_{K1} áramot a korábbiakban már többször bemutatott protokollok segítségével tanulmányoztuk. A **26A. ábra (bal oldali panelek)** bemutat egy-egy eredeti I_{K1} felvételt egészséges, illetve DCM-es szívizomsejteken. Jól látható, hogy az I_{K1} áram, mint *inward*, de főleg az *outward* tartományban nagyobb amplitúdóval rendelkezik, vagyis az áram a DCM

mintákban felülszabályozódik („*upregulálódik*”). Ez a különbség jól követhető a **26A. ábra jobb oldali** panelen bemutatott I_{K1} -áram I-V (áram-feszültség) karakterisztikát bemutató diagramon, amelyen jól látható, hogy az *upreguláció* elsősorban a -100 mV és 0 mV közötti tartományban kifejezett. Ezt a tartományt a jobb áttekinthetőség kedvéért a **26A. ábra jobb oldali panel** alsó mezőjében kinagyítottam. A nagyításon jól követhető, hogy az akciós potenciál késői repolarizációt meghatározó -20 mV és -60 mV közötti feszültségtartományban a DCM-es sejtekben regisztrált I_{K1} áram jelentősen nagyobb, mint a kontrollmérésnek tekinthető egészséges szívekből származó preparátumokból származó regisztrátumokon. Ezek a felvételek megerősítették azokat az irodalmi adatok alapján már sejthető eredményt, hogy az I_{K1} áram tulajdonságai megváltoznak a betegség következtében (remodelling történik), és nyilvánvaló, hogy ennek a háttérben az alkotó egységekben kell, hogy valamilyen eltérés legyen.

A Kir2.x pórusformáló csatornák és a SAP97 kiegészítő alegység mRNS és fehérje szintjeinek vizsgálata

Következő kísérleteink célja az volt, hogy felderítsük, mely alegységek expressziós szintje változik meg a betegség következtében. A qPCR technika segítségével megvizsgáltuk az I_{K1} áram α -alegységeinek tekinthető Kir2.x család mRNS szintjeit. A **26B. ábra bal oldali panelje** bemutatja a Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 és Kir2.4 alegységek mRNS szintjeit egészséges humán donor (kontroll) és DCM betegekből származó szívizom preparátumokon.

Az mRNS értékeket HPRT, illetve GAPDH (nem mutatom) mRNS értékekhez viszonyítva normalizáltuk. A két módszerrel számolt eredmények hasonlóak voltak, mindkét módszer azonos eltéréseket mutatott ki a kontroll és a DCM mintákból származó Kir2.x csatornákra vonatkozó mRNS értékek között. Amint a **26B. ábra** mutatja a Kir2.1, Kir2.3 és Kir2.4 csatornák mRNS szintje szignifikáns módon magasabb volt a DCM mintákban, mint az egészséges mintákban. A Kir2.2 transzkripció szintje viszont jelentősen *downregulálódott* a DCM mintákban. Ez az eredmény azért mindenképpen igazolja a patch-clamp mérések eredményeit, amelyek szerint az I_{K1} *upregulálódik* a betegség következtében. Ezután ellenőriztük a kiegészítő β -alegységnek tekinthető SAP97 fehérje mRNS szintjeit kontroll és DCM mintákban. Amint a **26B. ábra jobb oldali panelje** bemutatja, látható, hogy a DCM mintákban a SAP97 expressziós szintje mintegy 30%-al alacsonyabb volt, mint a kontroll mintákban.



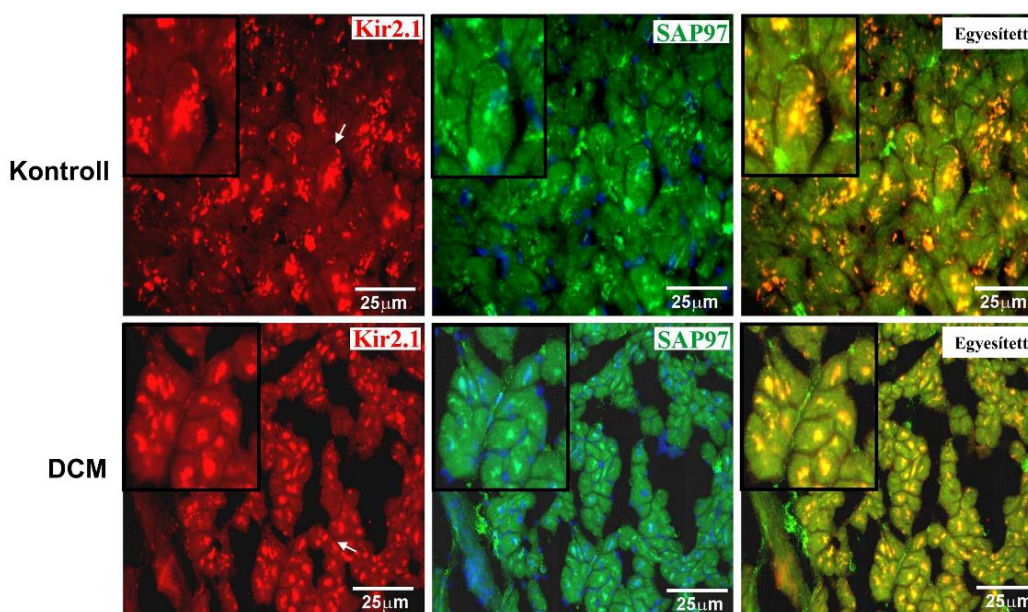
26. ábra. A. panel. Eredeti befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) áramfelvételek dilatatív cardiomiopátiás beteg donor (DCM) és egészséges donor humán szívekből izolált sejtekben (bal oldali mezők), illetve az ebből származó I_{K1} steady-state áram-feszültség (I-V) karakterisztikák (jobb oldali mezők). Piktogram mutatja be az alkalmazott feszültségprotokollt. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva, $n=31-4$ (kontroll, illetve DCM). **B. panel.** Kir2.x izoformák (bal oldali mező) és SAP97 (jobb oldali mező) HPRT-hez viszonyított relatív mRNS értékek qRT-PCR technikával meghatározva. *** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n_{\text{Kontroll}}=15$, $n_{\text{DCM}}=17$. **C. panel.** Eredeti Kir2.1-Kir2.3 membránfehérje Western blot regisztrátumok kettő egészséges donor, illetve 6 DCM betegekből származó kamrai mintákban (bal oldali mező). Az immunoblot felvételeket denziometria módszerrel történő szemikvantitatív módszerrel történő GAPDH-hoz viszonyított relatív Kir2.x fehérje expressziós szintek (jobb oldali mező). * $p < 0.05$, $n_{\text{Kontroll}}=10$, $n_{\text{DCM}}=10$.

Western-blot technikával megvizsgáltuk a Kir2.1-Kir2-3 család fehérje szintjeit kontroll és DCM mintákból. Amint a **26C. ábrán** látható (bal oldalon az eredeti gélek, jobb

oldalon a szemikvantitatív denziometriai módszerrel számított fehérje expressziós értékek) a fehérje mérések eredményei többé-kevésbé jól korrelálnak az mRNS mérések adataival. A Kir2.1 izoform fehérje szintje magasabb, amíg a Kir2.2 fehérje szintje pedig alacsonyabb volt a DCM csoportban a kontrollhoz viszonyítva. A Kir2.3 szintje nem volt eltérő a két csoportban.

A Kir2.x pórusformáló csatornák és a SAP97 ko-lokalizálnak az egészséges humán és DCM-es betegek szívizom mintáiban

Végezetül immunhisztokémiai módszerrel konfokális mikroszkópiával vizsgálva ellenőriztük a Kir2.x csatornák lehetséges ko-lokalizációját a SAP97 fehérjével. A **27. ábra** mutatja be a kísérletek eredményeit. A Kir2.1 izoformák és SAP97 fehérje festések eredménye ezúttal is jól korrelált a qPCR és Western-blot vizsgálatok eredményeivel, ugyanis amint az ábrán is látható, a Kir2.1 jelölése sokkal intenzívebb (**bal oldali panelek, vörös festés**), a SAP97 jelölése pedig gyengébb (**középső panelek, zöld festés**) immunjelet adott a DCM mintákban, mint a kontroll metszeteken. A Kir2.2 immunfluoreszcens mintázata viszont gyengébb volt a DCM mintákban, mint a kontrollban (nem mutatom külön ábrán), ami szintén visszaigazolja a Western-blot és mRNS vizsgálatok eredményét.



27. ábra. Immunfluoreszcens felvételek a Kir2.1 és SAP97 ko-lokalizációról egészséges donor és DCM betegek donor szívekből izolált szívizomsejtekben. A Kir2.1 csatorna izoform ko-lokalizál a SAP97 kiegészítő fehérjével a sejtek belső tartományában.

Az egyesített immunfluoreszcens képek egyértelmű ko-lokalizációt mutatnak a Kir2.1 és SAP97 alegységek között (**27. ábra, jobb szélső panelek, sárgajel**). A kontroll sejtekben a ko-lokalizáció talán kevésbé intenzív, de a DCM sejtekben egyértelműen

beazonosíthatóak a mindkét alegységet egyaránt tartalmazó, ezért sárga színben feltűnő régiók. A Kir2.2 és SAP97 fehérjék hasonlóan erőteljes ko-lokalizációt mutattak kontroll és beteg mintában is, bár az is észrevehető volt, hogy a DCM-es mintákban a ko-lokalizáció mértéke alacsonyabb volt, vélhetően a DCM-ben csökkenő tendenciát mutató Kir2.2 expresszió miatt (külön ábrán nem mutatom).

Az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggő szerepének a vizsgálata kutya kamrai akciós potenciálban

A bevezető fejezetben bemutatam az akciós potenciál és a meghatározó ionáramok kapcsolatrendszerét (**1. ábra**). Az AP 3. fázisa a repolarizációs fázisnak felel meg, amely fázis alatt számos feszültség és időfüggő transzmembrán ionáram működik. Az, hogy az adott áramnak mi lehet a repolarizációban játszott szerepe, minden esetben szigorúan függ az illető áram kinetikai paramétereinek tulajdonságaitól, amelyeket az akciós potenciál adott ponthoz tartozó membránpotenciál értéke és a szívfrekvencia is nagymértékben befolyásol, illetve vezérel. Ennek megfelelően az akciós potenciál időtartama (APD) jelentős mértékben frekvenciafüggő. Több irodalmi adat is utal arra, hogy számos transzmembrán ionáram, köztük a késői egyenirányító káliumáram gyors komponense is (I_{Kr}), jelentős mértékben hozzájárul az APD frekvenciafüggő tulajdonságaihoz (Jurkiewicz, 1993; Sanguinetti, 1997), igaz még nem kellően tisztázott ezen mechanizmusok celluláris szintű oka. Például ismert, hogy az I_{Kr} áram magas frekvencián történő akkumulációja APD rövidülést okozhat, amit az I_{Kr} áram lassú deaktivációs kinetikája okoz (Gintant, 1996). Sőt korábbi adatok tengerimalacban azt is kimutatták, hogy amennyiben rövidebb a repolarizációs fázis, akkor az I_{Kr} áram megnövekszik, amely viszont válaszként további AP repolarizáció rövidülést okozhat (Rochetti, 2001). Az I_{Kr} áram pozitívabb feszültségeknél tapasztalt és közismert *inward* rektifikációját szintén a csatorna kinetikai tulajdonságokkal magyarázták, mégpedig azzal, hogy a csatornának vélhetően gyorsabb az inaktivációs, illetve az inaktivációból történő visszatérési („*recovery from inactivation*”) kinetikájának időfüggése, mint a csatorna aktivációs, illetve deaktivációs kinetikája (Shibasaki, 1987; Spector 1996, Yang, 1997). Mindez azt jelenti, hogy az I_{Kr} áram gyorsan aktiválódik, de még gyorsabban inaktiválódik közvetlenül az akciós potenciál felszálló ágában. Amikor a repolarizáció bekövetkezik, az I_{Kr} csatornák jelentős része visszatér az inaktivációból, amelynek következtében az I_{Kr} megnő (lásd **18A.** illetve **22E. ábrákon** az E-4031-szenzitív I_{Kr} áram akciós potenciál alatti lefutását kutya -zöld áramgörbe-, illetve humán kamrai szívizomsejteken).

Bár vélhetően más a molekuláris mechanizmusa, de az I_{K1} áram is jelentős rektifikáló sajátossággal rendelkezik. Az I_{K1} csatornáról ismert, hogy kevésbé negatívabb potenciáloknál (például a plató alatt) gyorsan megköt magnézium, illetve poliamin molekulákat, amelyek elzárják, így gyorsan inaktiválják az I_{K1} áramot vezető csatornákat (Matsuda, 1987; Lopatin, 1994). Az I_{K1} esetében pedig a plató fázis alatti gyors magnézium és poliamin okozta gátlás a repolarizáció záró szakaszában szintén gyorsan megszűnik, amelynek eredményeképpen az I_{K1} áram ott gyorsan megnő (lásd **18A. ábrán** a BaCl_2 -szenzitív áramot – piros görbe). Fentiek fontos észrevételek, mert könnyen lehet, hogy ezen tulajdonságok okozzák az ismert I_{Kr} illetve I_{K1} gátlás következtében tapasztalt fordított frekvenciafüggő APD megnyúlást is. Utóbbi pedig azért fontos, mert ismert, hogy a fordított frekvenciafüggés a fő oka a repolarizációt megnyújtó III-as osztályú antiaritmiás szerek ismert *Torsades de Pointes* aritmiát is okozó proaritmiás mellékhatásoknak (El-Sherif, 1992). Természetesen az I_{Kr} és I_{K1} , illetve esetlegesen más áramok (nemcsak K^+ -áramok) fordított frekvenciafüggő kinetikája értelemszerűen befolyásolja a szív repolarizációs tartalékának tulajdonságait is.

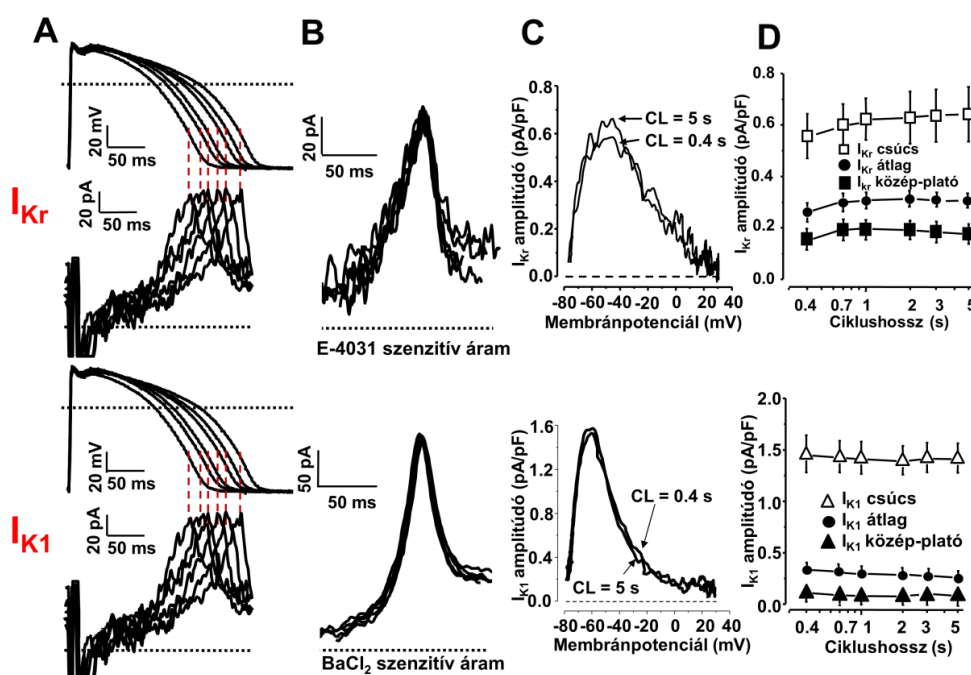
A tengerimalac I_{Kr} adatokon alapuló észrevételek (Rochetti, 2001) viszont nehezen extrapolálhatóak az emberre, vagy más humánszerűbb speciesre, mint amilyen például a kutya, vagy a nyúl, mert ismert, hogy az tengerimalac I_{Kr} áram kinetikai paraméterei jelentősen eltérnek az emberben, illetve kutyában létező I_{Kr} áram tulajdonságaitól (Sanguinetti, 1990; Chin, 1993; Gintant, 1996 és 2000; Heath, 1996; Li, 1996; Jost, 1998). Kísérleteink célja ennél fogva az volt, hogy megvizsgáljuk a patch-clamp technika egészsejtes konfigurációjában az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggő tulajdonságait és paramétereit kutya kamrai preparátumokból izolált szívizomsejtekben.

A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben részletesen bemutattam. Az eredmények ismertetése:

Az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggő vizsgálata akciós potenciál-szerű pulzusok alatt kutya szívizomsejtekben

A kísérleteink célja az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggő APD függvényében történő változásainak követése volt. Ennek megfelelően akciós potenciál-clamp szerű mérőmódban vizsgáltuk meg az I_{Kr} és I_{K1} áramokat. Ezen célból korábbi kísérletekben különböző ciklushosszokon (0.4, 0.7, 1, 2, 3 és 5 s) regisztráltunk és elmentettünk kutya kamrai szívizomsejtekben akciós potenciálokat. A regisztrált és elmentett akciós potenciálokat

digitalizáltuk, és vezérlő testpulsusként alkalmaztuk szívizomsejtekben. Természetesen az akciós potenciálok hosszabbak voltak, amikor a ciklushossz növekedett (alacsonyabb frekvencia). A **28A. ábra (felső panel)** bemutatja az alkalmazott AP jelforma sorozatot, és a hozzájuk tartozó E-4031 szenzitív (I_{Kr}) áramgörbéket. Annak ellenére, hogy értelemszerűen egy hosszabb vezérlő testpulsus AP jelforma esetében az eredményező I_{Kr} különbségáram is később jelentkezett, az áram amplitúdója és kinetikája gyakorlatilag nem volt különböző. A **28B. ábra (felső panel)** bemutatja az egymásra tolt valamennyi APD testpulsushossznál regisztrált I_{Kr} különbségáram görbéket és láthatjuk, hogy az áramok gyakorlatilag fedik egymást, vagyis azonos a nagyságuk és időbeli változásuk (kinetikájuk) is.



28. ábra. A. panel. Különböző frekvenciákon regisztrált akciós potenciálok által indukált 1 μ M E-4031-szenzitív (I_{Kr} , felső mező)), illetve 10 μ M BaCl₂-szenzitív (I_{K1} , alsó mező) áramok kutya kamrai szívizomsejtekben. Az előidéző akciós potenciálokat korábbi kísérletsorozatban regisztráltuk 0.4, 0.7, 1, 2, 3, és 5 s ciklushosszaknál. **B. panel.** Az A. panelnél szereplő I_{Kr} (felső mező) és I_{K1} (alsó mező) felvételeket egymásra helyezve mutatja be. **C. panel.** A legrövidebb (0.4s), ill. leghosszabb (5s) AP testpulszus alatt regisztrált I_{Kr} és I_{K1} áramok I-V karakterisztikái. **D. panel.** I_{Kr} (felső mező) és I_{K1} (alsó mező) csúcs-, átlag- és közép-plató áramértékek az ingerlős testpulsus ciklushosszána függvényében. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva.

A **28C. ábra (felső panel)** bemutatja az I_{Kr} áram I-V áram-feszültség karakterisztikáját, amelyet úgy kaptunk, hogy a megfelelő isochronalis membránpotenciál függvényében ábrázoltuk az adott pillanatra kifejlődő áramértéket. Amint az ábra is bemutatja, jól látható, hogy az áram karakterisztikája azonos volt, függetlenül attól, hogy gyors (CL=0.4) vagy lassú (CL=5s) frekvencián regisztrált AP testpulszust alkalmaztunk. A **28D. ábra (felső panel)** 5 sejten regisztrált I_{Kr} méréseink átlagértékeit mutatja be. Az ábra

alapján az is megállapítható, hogy sem a csúcsáram érték (befejezett repolarizációnál regisztrálva), sem az *ún.* közép-plató érték (AP időtartam félértéknél regisztrált I_{Kr} áramérték), sem az *ún.* átlag I_{Kr} áram érték (I_{Kr} alatti terület és az APD által képzett arány) nem mutatott az alkalmazott vezérlő teszt-pulzus-hossz szerinti függést. Gyakorlatilag elmondható, hogy hasonló eredményeket kaptunk, amikor a Ba^{2+} -szenzitív áramként definiált I_{K1} áramot tanulmányoztuk hasonló felállásban 7 kutya szívműködésében (28A-28D. ábrák alsó panelek). Természetesen ki kell emelnünk, hogy az I_{Kr} és I_{K1} áramok nagysága jelentősen eltért (I_{Kr} : 0.6 ± 0.08 vs I_{K1} : 1.4 ± 0.17 pA/pF, 1 Hz-nél mérve, $p < 0.05$), valamint azt is, hogy jellemzően eltérő feszültség értékeknél regisztráltuk az előbb említett csúcsáram értékeket (I_{Kr} : -48.3 ± 2.1 vs I_{K1} : -64.1 ± 0.7 mV, 1 Hz-nél mérve, $p < 0.05$).

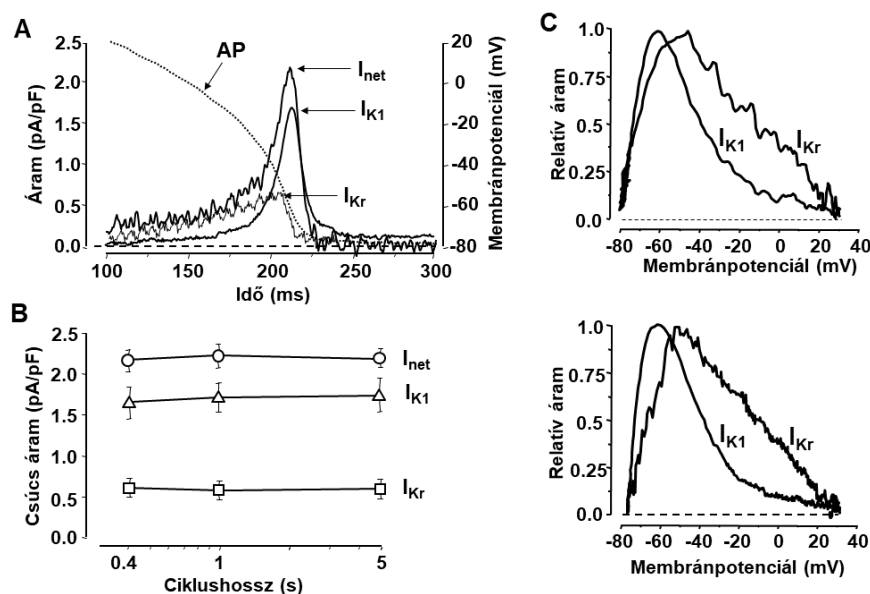
Az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggő vizsgálata akciós potenciál-clamp konfigurációban kutya szívműködésében

Az eddigi kísérletekben az I_{K1} áram biztonságos szelektív kiválasztása céljából alacsony koncentrációjú (10 μ M) $BaCl_2$ -ot alkalmaztunk. Ismert, hogy ebben a koncentrációban a $BaCl_2$ maximum mintegy 70% mértékig gátolja az I_{K1} áramot -60 mV repolarizáló membránpotenciálon (Shieh, 1998). Ahhoz, hogy közvetlenül összehasonlíthassuk az I_{Kr} és I_{K1} áramoknak a hatásait a kutya kamrai repolarizációra, ezúttal magasabb 50 μ M-os koncentrációban alkalmaztuk a $BaCl_2$ -ot. Ebben a koncentrációban a szer már mintegy 90%-ig gátolja az I_{K1} áramot. Ezekben a kísérletekben valódi *akciós potenciál-clamp* módban tanulmányoztuk az I_{Kr} és I_{K1} áramokat. Ez úgy történt, hogy a kísérlet elején áram-zár („*current-clamp*”) módban regisztráltunk egy adott sejtre vonatkozó akciós potenciált, azt azonnal digitalizáltuk, majd a kísérlet folytatásaként ezúttal már feszültség-zár („*voltage-clamp*”) üzemmódban az előbb digitalizált AP jelet, az eredeti frekvencián alkalmazva mintegy vezérlő teszt-pulzusként visszatápláljuk ugyanarra a sejtre. Ebben a megközelítésben lehetőség nyílt a valódi nettó áramnak (I_{net}) a meghatározására a következő képlet segítségével:

$$I_{net} = -C_m * dV/dt,$$

ahol a C_m a membrán kapacitása, illetve a dV/dt pedig az akciós potenciál első időbeli deriváltja. Három jelentős észrevételt tettünk. Amint a 29A. ábra is bemutatja, első észrevételünk az volt, hogy az I_{Kr} áram mintegy 7 ms-al korábban, az I_{K1} áram pedig 1 ms-al később érte el maximumát, mint az I_{net} áram. Ha figyelembe vesszük ezt a 8 ms-es időablakot, valamint a hozzávetőleges -2 mV/s repolarizációs arányt, amikor az I_{net} elérte a maximumát, akkor mintegy -16 mV membránpotenciál különbség van azon pontok között,

amikor az I_{Kr} és I_{K1} áramok külön-külön elérik saját maximumukat. Ez a becült érték igen jól korrelál azokkal a számolt értékekkel, amelyeket az előző kísérletekben határoztunk meg, amikor idegen akciós potenciál testpulsus jelformákat alkalmaztunk (**28. ábrán** bemutatott kísérletek). Második észrevételünk az volt, hogy ebben a kísérletsorozatban sem bizonyultak frekvencia-függőnek az I_{Kr} és I_{K1} áramok amplitúdói (**29B. ábra**). A harmadik észrevétel pedig az, hogy az I_{Kr} és I_{K1} áramok külön-külön mintegy 25% (I_{Kr}), illetve 75%-os (I_{K1}) arányban járulnak hozzá a teljes I_{net} áramhoz.



29. ábra. **A. panel.** I_{Kr} , I_{K1} és I_{Net} áramfelvételek kutya kamrai szívizomsejtekben valódi akciós potenciál-clamp módban. Az I_{Kr} ezúttal is E-4031-szenzitív, az I_{K1} pedig $BaCl_2$ -szenzitív áram, az I_{Net} áramot az akciós potenciálból számoltuk ki a megadott képlet ($I_{net} = -C_m \cdot dV/dt$) segítségével. **B. panel.** I_{Kr} , I_{K1} és I_{Net} áramok frekvenciafüggő változásai (0.4, 1, and 5 s ciklushosszokon mérve). Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva. **C. panel.** Egymásra tolt I_{Kr} és I_{K1} I-V karakterisztikák 1 Hz frekvencián standard *voltage-clamp* módszerrel (felső mező), illetve valódi akciós potenciál-clamp módszerrel (alsó mező) regisztrálva. Az áramokat a saját maximális értékéhez normalizáltuk.

3. témakör. A pitvarfibrillációs remodelling celluláris hatásmechanizmusainak vizsgálata emlősszíveken

A G-protein által szabályozott acetilkolin-szenzitív káliumáram ($I_{K,ACh}$) konstitutíven aktív permanens pitvarfibrilláló betegekben

A pitvarfibrilláció (AF) a leggyakrabban előforduló krónikus/visszatérő ritmuszavar a klinikai gyakorlatban. Az AF egyik fontos jellemzője, hogy egy progrediens betegség, amelynek alapvetően három formáját szoktuk megkülönböztetni:

- Paroxizmális pitvarfibrilláció
- Perzisztens pitvarfibrilláció
- Permanens pitvarfibrilláció
- legkésőbb 7 napon belül spontán megszűnik
- 7 napnál tovább fennáll.
- krónikus valószínűleg életfogytig tartó AF

Az Allessie vezette munkacsoport által elnevezett „atrial fibrillation begets atrial fibrillation”, azaz „a pitvarfibrilláció pitvarfibrillációt szül” jelenség (Wijffels, 1995) azt jelenti, hogy az AF progrediens voltának kialakulásért maga a betegség felelős. A betegség következtében már az AF korai paroxizmális formájában elindulnak olyan változások, amelyek néhány nap alatt megváltoztat(hat)ják az AF típusát, amely ezáltal perzisztenssé válik. Rendkívül fontos megértenünk ennek a folyamatnak a lefolyását, amelynek első eleme az ún., elektromos remodelling, amelyet az okoz, hogy AF-ben a gyors frekvencia következtében értelemszerűen megváltozik a pitvarok elektrofiziológiai aktivitása (APD és ERP lerövidülése), valamint számos ionáram tulajdonsága (Allessie, 2002; Dobrev, 2003).

A krónikus/permanens pitvarfibrilláció (cAF) celluláris szintű vizsgálata a különböző kamrai szintű megbetegedésekkel ellentétben meglepő módon, elsősorban humán mintákon és nem állatkísérletes betegmodellekben történt. Ennek az oka az, hogy a világon ma már szinte mindenütt rutinszerűen végzett koronária bypass-műtétek során folyamatosan hozzá lehet jutni akár jobb, akár bal pitvari nyesedékekhez, amelyek tökéletesen alkalmasak a pitvari miociták celluláris szintű (akciós potenciál és pitvari áramok) vizsgálatára egyaránt szinusz ritmusos vagy pitvarfibrilláló betegekből.

Az $I_{K,ACH}$ -áram vizsgálata az Ursula Ravens professzor asszony által vezetett Drezdai Egyetem Farmakológiai és Toxikológiai Intézete munkatársainak központi kutatási témája volt. Ennek következtében 2000 óta számos publikáció jelent meg az AF témakörben a drezdai munkacsoport kutatóitól. Dobrev és mtsai 2001 és 2002-ben kimutatták, hogy az I_{K1} -áramot meghatározó Kir.2.1 csatorna „upregulációjával” párhuzamosan az $I_{K,ACH}$ működését meghatározó GIRK4 fehérje expressziója csökken, ezért korábban **elsősorban az I_{K1} erősödésével és az I_{CaL} downregulációjával magyarázták** az elektromos remodellingben megfigyelhető APD rövidülést (Dobrev, 2001 és 2002). Az $I_{K,ACH}$ csökkenést akkor úgy értelmezték, hogy ez a pitvari sejtek védekező, adaptációs mechanizmusának eredménye, amelynek következtében a csökkent $I_{K,ACH}$ valamennyire ellensúlyozhatja az APD megrövidülést (Dobrev 2001; 2002 és 2003). Ennek a kísérletsorozatnak a magyarázata azonban nem egyértelmű.

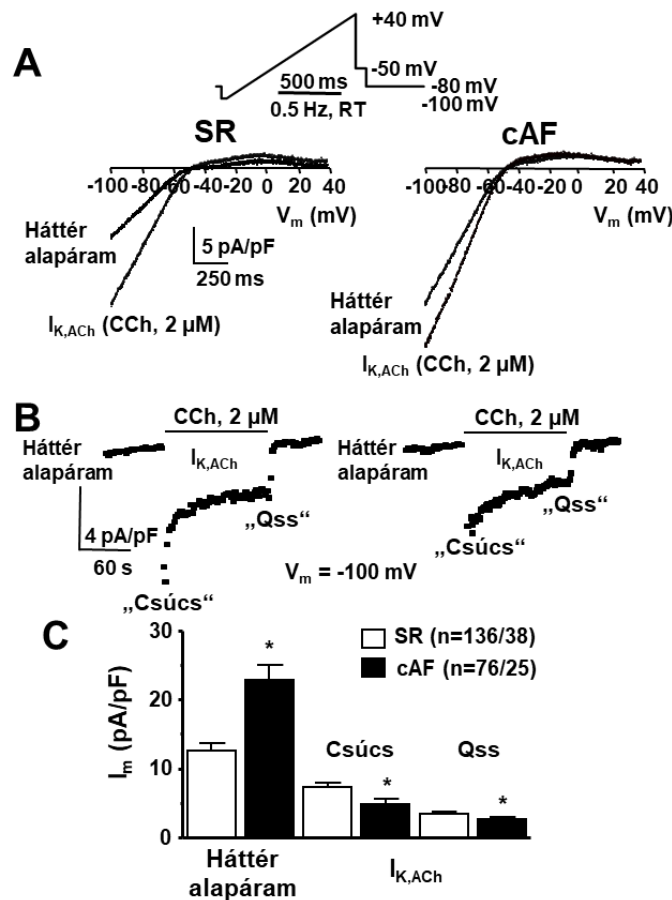
2002-ben Marie Curie ösztöndíjasként kerültem a Ravens professzor asszony által vezetett intézetbe, ahol magam is bekapcsolódtam a szinusz ritmusban (SR) és krónikus/permanens pitvarfibrilláló betegekből (cAF) származó humán pitvari sejtekben működő áramok (I_{K1} vs $I_{K,ACH}$) és tanulmányozásába.

A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben részletesen bemutattam. Az eredmények ismertetése:

A háttér-alapáram és az $I_{K,ACh}$ áram vizsgálata SR és cAF betegekből származó pitvari sejtekben

A transzmembrán ionáramokat a patch-clamp technika segítségével vizsgáltuk SR és cAF betegekből származó izolált pitvari sejtekben, amelyeknek kapacitása jellemzően eltért. Az SR betegekből származó pitvari miociták kapacitása 80.3 ± 4.7 pF ($n=136$), a cAF betegekből származó szívizomsejtek kapacitása nagyobb volt (89.6 ± 4.1 pF, $n=76$, $p<0.05$).

Amint a **30. ábra** is bemutatja, kolinerg agonista hiányában a háttér-alapáram jelentősen magasabb volt a cAF pitvari sejtekben, mint kontroll SR sejtekben.

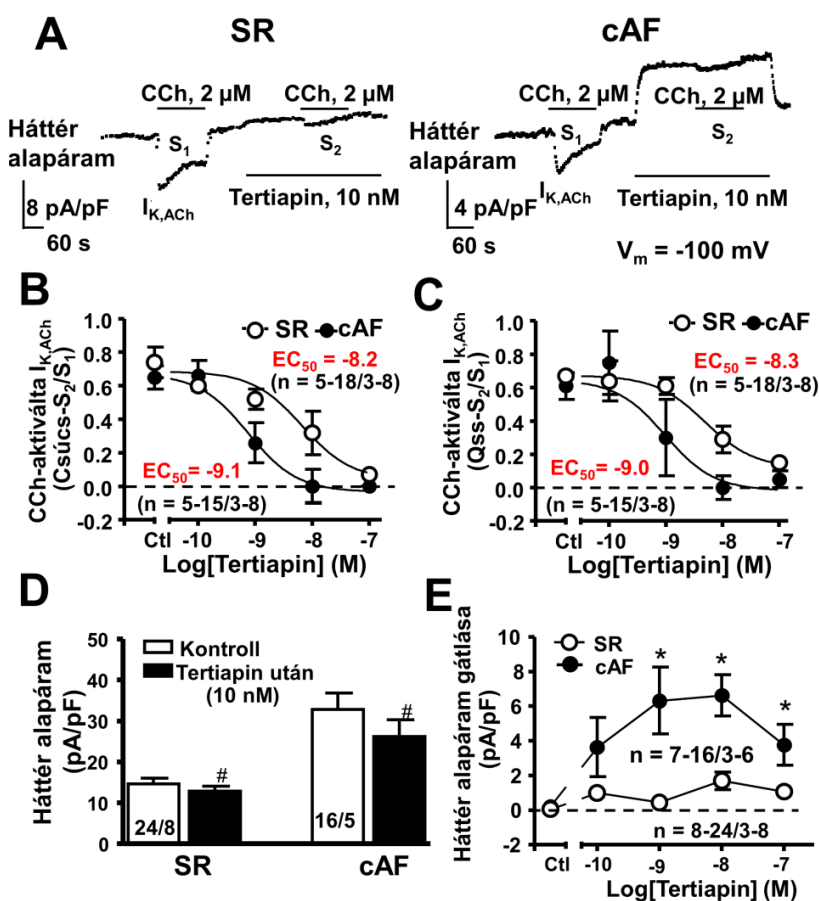


30. ábra. Befelé egyenirányító áramok SR és cAF páciensek szíveiből származó pitvari miocitákban. **A. panel.** Eredeti áramfelvételek kontroll körülmények között, illetve 2 mM carbachol (CCh) alkalmazása után. Az $I_{K,ACh}$ áramot CCh-szenzitív áramként definiáltuk. A piktogram az alkalmazott feszültségpulzust jelzi. **B. panel.** Az $I_{K,ACh}$ áram időbeli változása -100 mV membránpotenciálón regisztrálva. $I_{K,ACh}$ áramot két egymást követő CCh-al történő aktiválási szakaszt (S1, S2 4 perces időtartamban) követően mértük SR és cAF sejtekben. Amint az ábrán is látható a CCh mindig jelentős csúcsot („Csúcs”) produkáló áramot eredményezett, amely utána meglehetősen gyorsan visszacsökkent (gyors deszenzitizáció) egy steady-state („Qss”) értékre. **C. panel.** A diagram bemutatja a -100 mV-on regisztrált átlag háttér alapáramot, illetve az $I_{K,ACh}$ áramot SR és cAF sejtekben. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva. * $p<0.05$. Az n számok a sejszám/páciens értéket jelentik.

-100 mV membránpotenciálnál mérve az áram nagysága cAF sejtekben: 22.9 ± 2.1 pA/pF, $n=76/25$ (miocita/páciens) vs SR sejtekben: 2.7 ± 1.0 pA/pF, $n=136/38$; $p<0.05$).

A szelektív $I_{K,ACH}$ áram gátlószer tertiapin hatásai az alap-háttér és $I_{K,ACH}$ áramokra

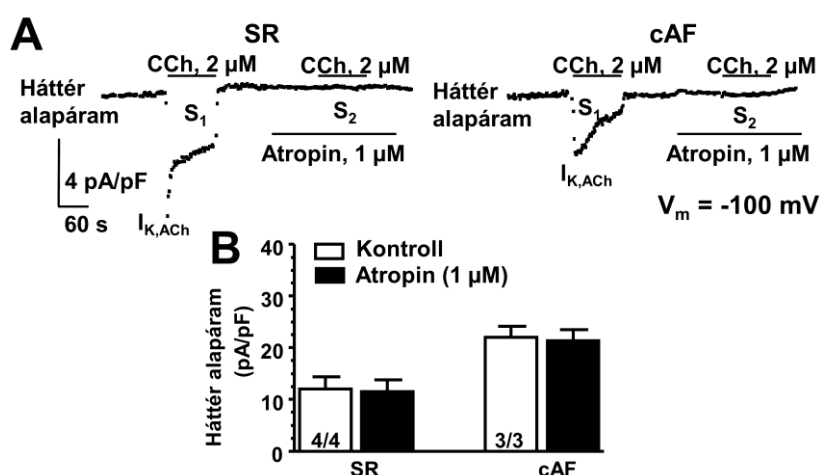
Kísérleteinkben a tertiapin nevű $I_{K,ACH}$ -áram blokkolót használtuk, amelyről ismert, hogy szelektíven és hatékonyan ($EC_{50} \approx 8-30$ nM) gátolja az $I_{K,ACH}$ áramot (Drici, 2000b; Kitamura, 2000). Kísérleteinkben ezúttal is carbachollal aktiváltuk az $I_{K,ACH}$ áramot. A **30. és 31. ábrákon** látható, hogy a CCh hatására azonnal megnőtt a háttér-áram, majd hirtelen csökkeni kezdett, ami valójában a carbachol hatás deszenzitizációjának hatása. Hogy kizárjuk azt, hogy a CCh alkalmazás által indukált deszenzitizáció okozta árambéli csökkenést értékeljük tertiapin gátlóhatásként („*fals pozitív*” eredmény), a carbacholt az $I_{K,ACH}$ áram aktiválása céljából (egy 4 perces mosás intervallum beiktatásával) kétszer is hozzáadtuk a kontroll oldathoz. (**31A. ábra**), mielőtt elkezdtük a kísérletben a tertiapin hatásának a vizsgálatát.



31. ábra. A szelektív $I_{K,ACH}$ áramgátló tertiapin hatása a CCh-aktiválta $I_{K,ACH}$ áramra. **A. panel.** 10 nM tertiapin hatása az S2 szakasz alatt alkalmazva (az S1 szakasz belső kontrollként szolgált) SR és cAF sejtekben. **B. és C. panel.** A tertiapin koncentráció-függő hatása az S_2/S_1 arányként meghatározott „csúcs- $I_{K,ACH}$ áramra” (bal oldali mező), illetve „ $Q_{ss}-I_{K,ACH}$ áramra” $I_{K,ACH}$ áramra vonatkoztatva (jobb oldali mező). **D. és E. panel.** A tertiapin koncentráció-függő hatása az alap-háttér áramra SR és cAF sejtekben -100 mV membrán-potenciálón regisztrálva. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva. Az n számok a sejt-szám/páciens értéket jelentik. * $p < 0.05$ vs megfelelő értékek. # $p < 0.05$ vs tertiapin előtti kontroll értékek.

Amint a **31A. ábrán** láthatjuk a második deszenzitizációs szakasz végén regisztrált kvázi *steady-state* állapot (S2 állapot), mindig alacsonyabb volt, mint az első szakasz végén regisztrált S1 állapot, amely azt jelzi, hogy a kimosás után a háttér-alapáram csak részlegesen tudott visszatérni a deszenzitizációs állapotból. A tertiapint mindig az S2 pontban adtuk hozzá az oldathoz. A tertiapint 0.1-100 nM közötti koncentrációkban vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy a szer koncentráció-függő módon csökkentette az S2/S1 arányként kifejezett carbachol aktiválta $I_{K,ACh}$ áramot. Amint az **31A- 31B. ábrákon** látható a tertiapin gátlóhatása kifejezettebb volt a cAF, mint SR sejtekben ($-\log EC_{50}$: 9.1 nM cAF sejtekben vs 8.2 nM SR sejtekben; $p < 0.05$). A tertiapin koncentráció-függő módon gátolta a háttér-alapáramot is cAF sejtekben, amely 10 nM tertiapin koncentrációnál alkalmazva egy -6.7 ± 1.2 pA/pF ($n=16/5$) nagyságú áramot eredményezett (**31D-31E. ábrák**). Ha a cAF sejtekben kivonjuk a tertiapin szenzitív komponenst az alap-háttéráram még mindig magasabb marad, amely vélhetően a cAF indukálta *upregulált* I_{K1} áramot jelzi. Amint a **31D. ábra** mutatja az SR sejtekben is tapasztaltunk egy gyenge mértékű tertiapin okozta háttér-alapáram csökkenést (-1.7 ± 0.5 pA/pF, $n=24/8$), de ez jelen volt, akkor is amikor néhány kontroll kísérletben tertiapin nélküli kontroll oldattal kezeltük az SR és cAF sejteket (SR sejtekben -1.5 ± 0.6 pA/pF, $n=5/4$ vs -1.6 ± 1.2 pA/pF, $n=4/3$ cAF sejtekben). Ezek a kísérletek azt jelentik, hogy a cAF betegekből származó szívizomsejtekben jelen van egy jelentős konstitutíven aktív $I_{K,ACh}$ áram, amely viszont nem létezik kontroll SR sejtekben.

A **32. ábrán** bemutatom a nemszelektív M-receptor gátló atropin ($1 \mu M$) hatását mindkét csoportból származó pitvari sejteken.



32. ábra. A nem szelektív M-receptor antagonista atropin hatása a háttér-alapáramra és a CCh-aktiválta $I_{K,ACh}$ áramra SR és cAF sejtekben. **A. panel.** Az S2 szakasz alatt alkalmazott atropin ($1 \mu M$) gátolta a CCh-aktiválta $I_{K,ACh}$ áramot. **B. panel.** Az atropin nem befolyásolta a -100 mV értéknél regisztrált háttér-alapáramot egyik sejt típusban sem. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva. Az n számok a sejt szám/páciens értéket jelentik.

Ez a kísérlet igazolja, azt, hogy a cAF sejtekben észlelt megemelkedett háttér-alapáramot nem a muszkarin receptorok valamilyen spontán aktivitása okozza. A **32. ábrán** látható, hogy az atropin mind a cAF, mind az SR csoportban teljes mértékben gátolta a CCh aktiválta $I_{K,ACh}$ áramot, viszont nem módosította egyik csoportban sem a háttér-alapáramot, amely azt jelenti, hogy a tertapiin szenzitív konstitutívan aktív $I_{K,ACh}$ áram független az M-receptoroktól.

Az I_{K1} és $I_{K,ACh}$ áramok egy csatornás („single-channel”) aktivitása SR és cAF betegekből

Az előbb bemutatott egész-sejtes konfigurációban végzett patch-clamp kísérletek is egyértelműen jelezték egy konstitutívan aktív $I_{K,ACh}$ áram jelenlétét, amely összefüggésben van a krónikus pitvarfibrillációval. Az egészsejtes konfiguráció nem eléggé érzékeny módszer arra, hogy szétválasszunk két olyan áramot, mint az I_{K1} , illetve az $I_{K,ACh}$, mert ismert, hogy a két áram azonos feszültségtartományban aktív, és hasonló kinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek. Erre a célra egyedül az egy-csatornás, ún. „single-channel” konfiguráció alkalmas, mert ismert, hogy az I_{K1} , illetve az $I_{K,ACh}$ áramok „single-channel” paraméterei (például a vezetőképesség és a csatorna-nyitási, illetve zárási valószínűségek, stb.) már irodalmi adatok alapján is jelentősen eltérnek egymástól (Heidbüchel, 1990). Ezért megvizsgáltuk az I_{K1} és $I_{K,ACh}$ egységáramokat „single-channel” konfigurációra jellemző kísérletes protokollokkal mindkét csoportból származó pitvari szívizomsejtekben.

Amint a **33. ábrán** is látszik a konstitutívan aktív $I_{K,ACh}$ áram jelenléte egyértelmű volt a cAF pitvari sejtekben, de csak ritkán detektálható SR miocitákban. A csatornanyitási valószínűsége a cAF sejtekben $5.4 \pm 0.8\%$, $n=19/9$ volt vs $0.1 \pm 0.01\%$, $n=16/9$; $*p<0.05$ az SR sejtekben (**33A-33C. ábrák, 10. táblázat**).

10. táblázat. Az I_{K1} és $I_{K,ACh}$ áramok egy csatornás („single-channel”) paraméterek tulajdonságai SR és cAF betegcsoportokban.

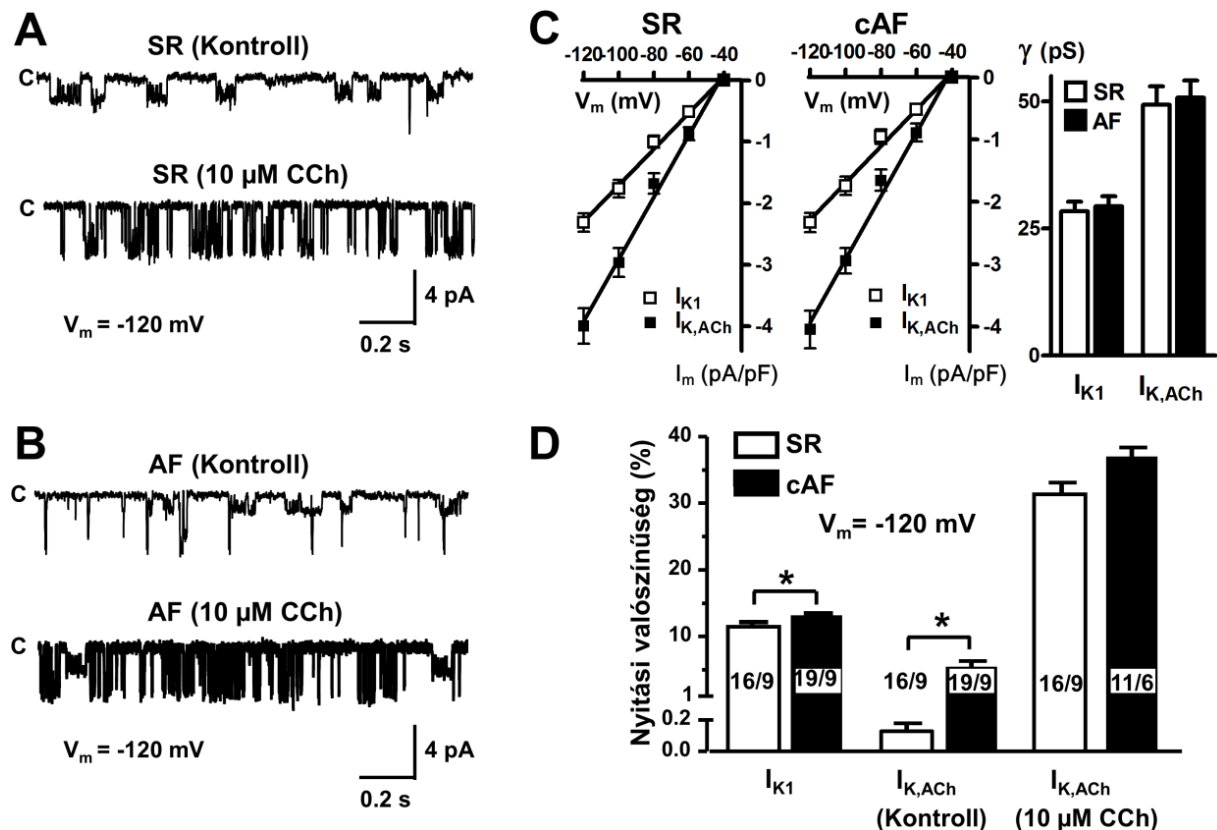
Áram	Ritmus státus	n	Amplitúdó (pA)	τ_0 (ms)	Megnyílások száma (1 s áramgörbén)	P_0 (%)
I_{K1}	SR	16/9	2.5 ± 0.07	7.8 ± 0.3	35.2 ± 4.4	11.4 ± 0.7
	cAF	19/9	2.4 ± 0.07	7.6 ± 0.2	44.5 ± 3.1	$13.4 \pm 0.4^*$
$I_{K,ACh}$	SR	16/9	3.9 ± 0.11	1.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.13 ± 0.05
	cAF	19/9	3.8 ± 0.10	2.4 ± 0.2	$10.2 \pm 1.1^*$	$5.4 \pm 0.7^*$

τ_0 = nyitott csatorna eloszlás időállandója; P_0 = csatornanyitási valószínűség; Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva; n= sejt szám/beteg szám; $*p<0.05$.

A kísérleti eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az I_{K1} áram „single-channel” csatornanyitási valószínűsége szintén magasabb volt a cAF betegcsoportban, mint az SR

betegcsoportban (cAF-ben $13.4 \pm 0.4\%$, $n=19/9$ vs SR-ben $11.4 \pm 0.7\%$, $n=16/9$; $p < 0.05$), amíg a többi *single-channel* paraméter viszont azonos volt a két csoportban (10. táblázat).

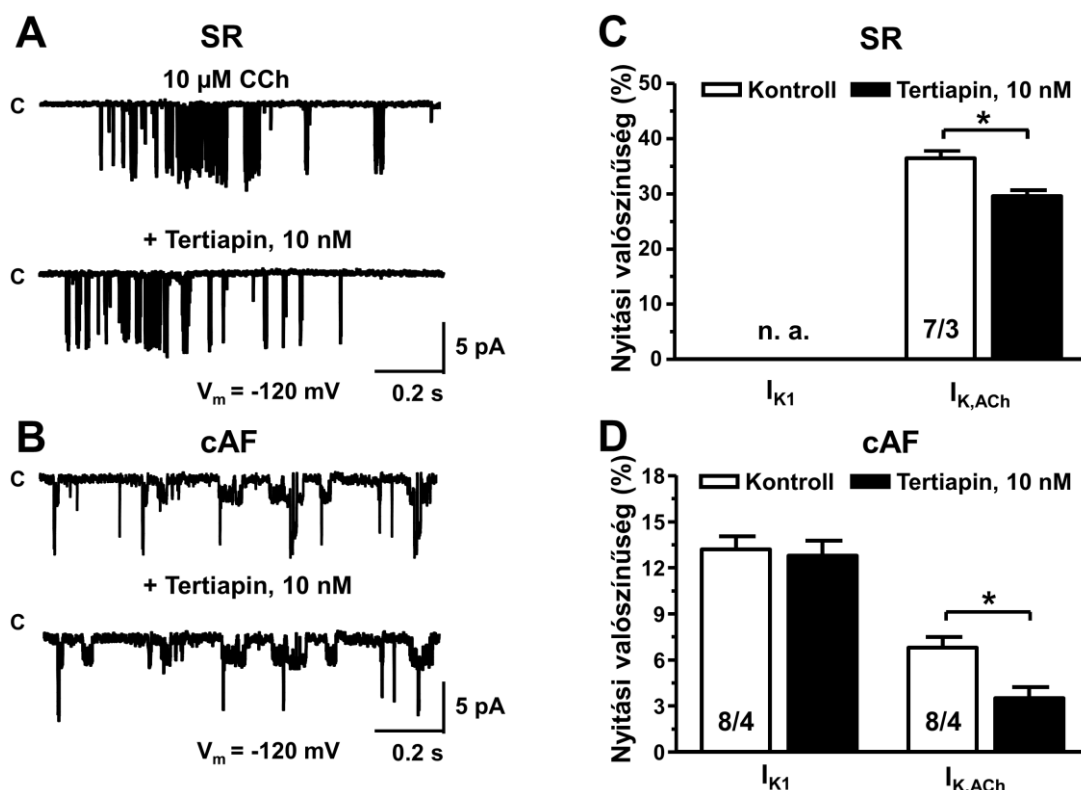
10 μM CCh hozzáadása a pipetta oldathoz jelentősen megváltoztatta a regisztrátumok jellegét, ugyanis amint a 33A és 33B. ábrákon látható, mind az SR, mind a cAF csoportban gyakorlatilag erőteljes „burst”-szerű *single-channel* megnyílásokat okozott. A konstitutíven aktív *single-channel* $I_{K,ACH}$ áram amplitúdója és nyitási valószínűsége nem volt eltérő a CCh-aktiválta *single-channel* $I_{K,ACH}$ áram paramétereitől.



33. ábra. I_{K1} és $I_{K,ACH}$ áramok „single-channel” aktivitásának tulajdonságai SR és cAF páciensek szívéből izolált pitvari miocitákban. Az $I_{K,ACH}$ áramot a pipetta oldathoz adott 10 nM CCh-val aktiváltuk. **A és B panel.** Eredeti I_{K1} , CCh-aktiválta $I_{K,ACH}$ és konstitutíven aktivált $I_{K,ACH}$ egységáram felvételek „cell-attached” konfigurációban. A cAF páciensből származó miocitákban egyaránt látható az I_{K1} és a konstitutív $I_{K,ACH}$ áram jelenléte. **C. panel.** Az I_{K1} és $I_{K,ACH}$ *single-channel* áramok I-V karakterisztikái, illetve vezetőképességek illesztései SR és cAF sejtekben. A V_m membránpotenciál a nyugalmi potenciáltól történő eltérést jelenti. A γ pedig a vezetőképességet jelenteti pS-ben mérve. **D. panel.** Az I_{K1} , CCh-aktiválta $I_{K,ACH}$ és konstitutíven aktiválta $I_{K,ACH}$ egységáramok nyitási valószínűsége -120 mV V_m értéken mérve. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva. Az n számok a sejt szám/páciens értéket jelentik. * $p < 0.05$ vs kontroll (SR) értékek.

Amikor a külső oldat tertiapint (10 nM) tartalmazott az SR sejtekben csökkent a CCh-aktiválta $I_{K,ACH}$ áram nyitási valószínűsége (34A. és 34C. ábrák). Ez az észrevétel jól egyezik korábbi nyúl pitvari sejtekben publikált eredményekkel (Kitamura, 2000). cAF sejtekben is csökkent a konstitutív $I_{K,ACH}$ áram nyitási valószínűsége (34B. és 34D. ábrák), amely észrevétel viszont megegyezik a korábban 31D. ábrán szereplő kísérleti

eredménnyel, amely azt mutatta be, hogy a tertiapin úgy csökkentette a háttér alapáram mértékét, hogy közben nem változtatta meg az I_{K1} áramot.



34. ábra. A tertiapin hatása az I_{K1} és $I_{K,ACh}$ áramok „single-channel” aktivitására SR és cAF páciensek szívéből izolált pitvari miocitákban. SR-ben az $I_{K,ACh}$ áramot a pipetta oldathoz adott 10 nM carbachollal aktiváltuk. **A és C panel.** A külső oldatban alkalmazott tertiapin (10 nM) hatása a CCh-aktiválta $I_{K,ACh}$ nyitási valószínűsége -120 mV-n regisztrálva. **B és D panel.** Az I_{K1} és a konstitutíven aktiválta $I_{K,ACh}$ single-channel áramok nyitási valószínűsége a tertiapin (10 nM) adagolása előtt és után -120 mV-on mérve. Az n számok a sejtszám/páciens értéket jelentik. * $p < 0.05$ vs kontroll (SR) értékek.

Repolarizáló káliumáramok tulajdonságainak vizsgálata szinuszritmusú és pitvarfibrilláló kutyákból izolált pitvari szívizomsejteken

Az előző fejezetben bemutatott kísérletek egyik lehetséges következménye az volt, hogy a gyors pitvari tachycardia (ATR) talaján kialakuló pitvarfibrilláció következtében bekövetkezett elektromos remodelling során jelentősen megváltozik számos transzmembrán ionáram tulajdonsága, konduktanciája. Mindez azt jelenti, hogy ATR indukálta változások potenciális antiaritmias gyógyszer-célpontok („drug target”) lehetnek. Ahhoz viszont, hogy új, az ATR megelőzésére és/vagy megszüntetésére alkalmas antiaritmias gyógyszereket fejlesszünk ki, szükség van olyan állatkísérletes modellekre, amelyek alkalmasak az új gyógyszerjelöltek ATR-re kifejtett hatásának preklinikai elemzésére. Meglepő módon, bár jelentős ismeretekkel rendelkezünk a humán pitvari ionáramok tulajdonságairól, és széleskörűen léteznek a kamrai áramokat tanulmányozó állatkísérletes modellek (patkány,

tengerimalac, nyúl, kutya vagy kecske), ennek ellenére alig ismerjük ezekben a speciesekben a pitvari áramokat. Több olyan AF modell létezik, amely alkalmas az ATR-re kifejtett (gyógyszer)hatás(ok) vizsgálatára, jellemzésére. Ezek lényege, hogy lehetőleg nagy testű kísérleti állatok (kutya, kecske) szívét viszonylag hosszú ideig nagy frekvenciával mesterségesen ingereljük.

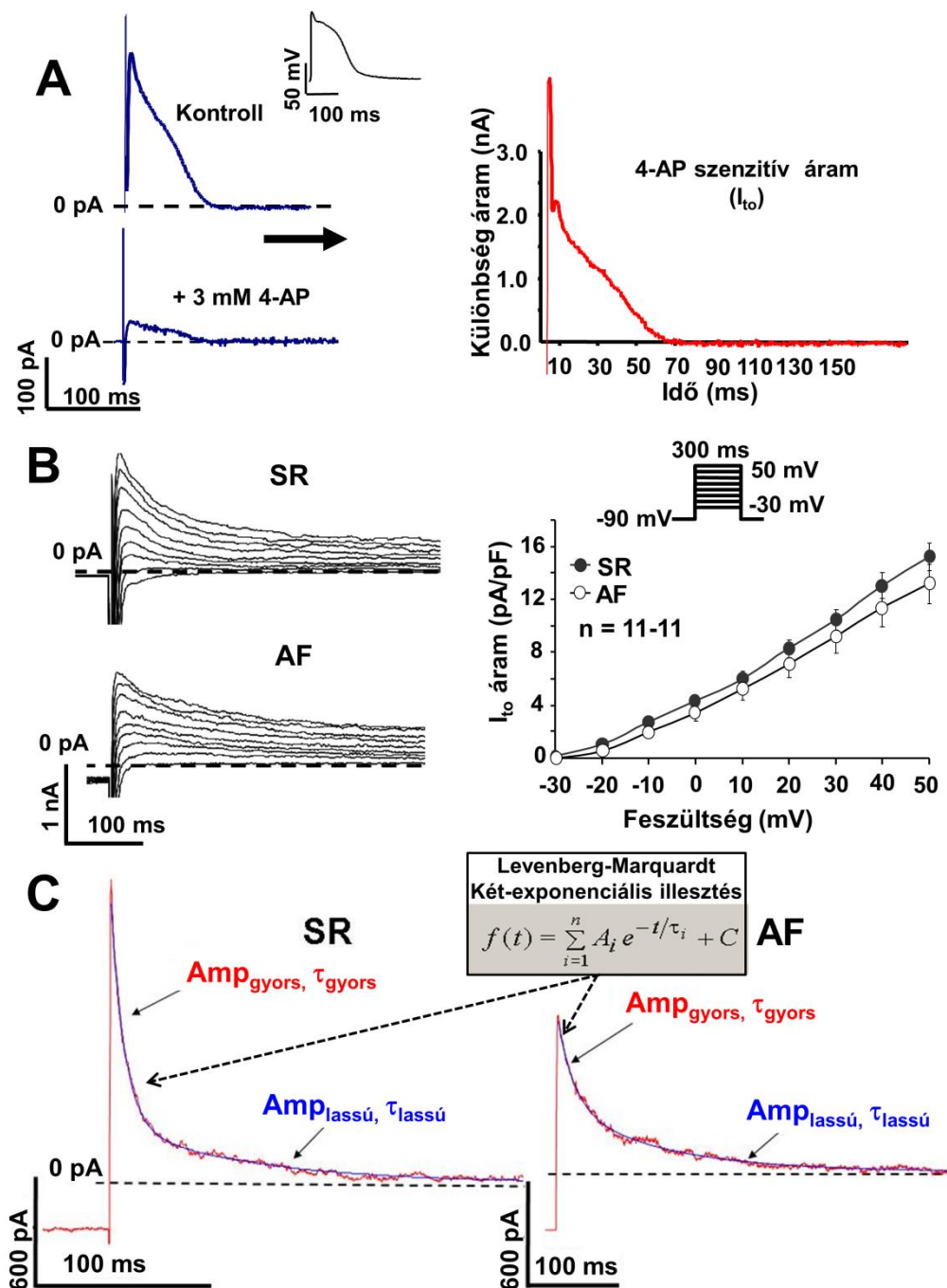
Mindezek alapján további kísérleteink célja a pitvari repolarizációban és AF-ben előálló elektromos átépülésben (remodelling) szerepet játszó kálium ionáramok (I_{to} - tranziens kifelé haladó kálium, I_{K1} - befelé egyenirányító kálium és $I_{K,ACh}$ - acetilkolin szenzitív káliumáram) tanulmányozása volt. Méréseinket SR-ben lévő és gyors pitvari ingerléssel kiváltott AF-ben szenvedő kutyákból izolált pitvari szívizomsejteken végeztük.

A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben részletesen bemutatam. Az eredmények ismertetése:

Tranziens kifelé haladó káliumáram (I_{to})

Az I_{to} áramot két protokoll segítségével is megvizsgáltuk. Először egy az áram kinetikai paramétereit jobban modellező, ún. akciós potenciál-szerű protokollal mértük. Az I_{to} áramot magas koncentrációjú 4-aminopyridin (3 mM 4-AP) gátlószereivel azonosítottuk (Corabeuf, 1982). Így az I_{to} áramot a kontroll körülmények (**35A. ábra, bal felső mező**) és a gátlószer után (**35A. ábra bal alsó mező**) regisztrált áramgörbék különbségeként (**35A. ábra jobb oldali mező**) határoztuk meg. A kontroll és az anyag hatása utáni mérés különbségéből megkaptuk a 4-aminopiridin-érzékeny áramként definiált I_{to} -áramot.

Ezután megvizsgáltuk az I_{to} áramot pitvarfibrilláló (AF) kutyákból izolált pitvarsejtekben is (**35B. ábra**). Megállapítottuk, hogy az I_{to} áram nagysága, ha kis mértékben is, de csökkent (*downregulálódott*). Ez a különbség azonban nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Megvizsgáltuk az I_{to} áram inaktivációját SR és AF sejtekben egyaránt. A pitvari sejtekben az I_{to} áram kinetikája kétkomponensű (egy gyors és egy lassabb időállandójú), exponenciális függvényekkel volt a legtökéletesebben illeszthető (**35C. ábra**). A kutya kamrai miocitákban mért I_{to} áram inaktivációs kinetikájához hasonlóan, a kutya pitvari SR szívizomsejtekben is jelen van egy rendkívül gyors (időállandója, $\tau_{gyors} \approx 10-12$ ms), valamint egy lassú kinetikájú (időállandója, $\tau_{lassú} \approx 120-150$ ms) I_{to} -komponens, amely jelentősen lassúbb volt, mint amit korábban kutyából izolált kamrai miocitákon mértünk (+20 mV-on mérve, mintegy 20-30 ms; Virág 2011).



35. ábra. **A panel.** 3 mM 4-aminopiridin (4-AP) érzékeny tranziens kifelé haladó K^+ -áram (I_{to}) azonosítása akciós potenciál-szerű feszültség-impulzus alkalmazásával kutyából izolált jobb pitvari szívműködősejteken. **B panel.** Bal oldali mező: Eredeti I_{to} áram regisztrátumok szinuszritmusban (SR) lévő és pitvarfibrilláló (AF) kutyákból izolált pitvari szívműködősejteken. Az áramot 0.33 Hz pulzusfrekvencia mellett négyszögjel formájú, 300 ms időtartamú, -30 mV-től 50 mV-ig terjedő depolarizáló feszültségimpulzusokkal aktiváltuk. Jobb oldali mező: I_{to} áram-feszültség ($I-V$) karakterisztika SR-os és AF-es kutyákból izolált pitvarsejteken ($n=11-11$, $p=N.S.$). **C panel.** I_{to} áram inaktivációs kinetikája izolált SR és AF kutya pitvari szívműködősejteken kettős exponenciális Levenberg-Marquardt-féle egyenlettel illesztve. Az alkalmazott feszültség-protokollokat az ábrán piktogrammal jeleztük.

Kísérleteinkben az AF-sejteken is két exponenciális kinetikájú volt az I_{to} áram inaktivációja (35C. ábra), viszont mind a gyors, mint a lassú kinetikájú komponens

inaktivációs időállandója (τ_{gyors} és $\tau_{\text{lassú}}$) szignifikáns mértékben lassúbb volt, mint az SR kutyákban. Az illesztések eredményeit az **11. táblázat** foglalja össze.

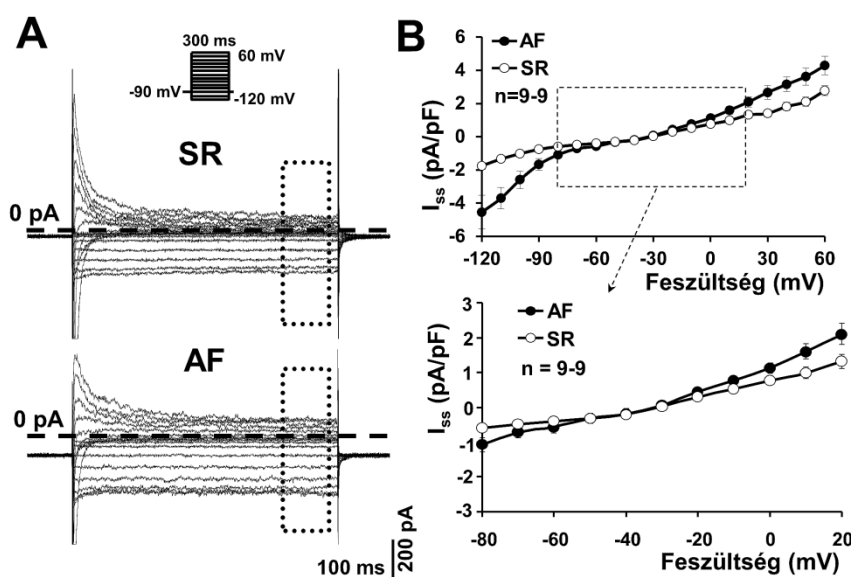
11. táblázat. Az I_{to} áram gyors és lassú komponensének inaktivációs állandói (τ) és a hozzátartozó amplitúdók (Amp) 20 mV-os feszültségnél mérve izolált „SR- és AF-kutya” pitvari miocitákban

Paraméter	τ_{gyors} (ms)	$\tau_{\text{lassú}}$ (ms)	Amp _{gyors} (pA/pF)	Amp _{lassú} (pA/pF)
SR (n=10)	11.70±0.76	121.9±8.82	5.80±0.61	2.32±0.38
AF (n=11)	17.83±2.97*	179.2±25.42*	4.22±0.7	2.71±0.35

Az értékek átlag±SEM-ként megadva. * $p < 0.05$ (SR és AF sejtekben regisztrált I_{to} áramok inaktivációs kinetikák időállandói között ellenőrizve)

A befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})

A befelé egyenirányító káliumáramot (I_{K1}) ezúttal is a korábbi fejezetekben már bemutatott és mikroelektrofiziológiai vizsgálatokban rutinszerűen megszokott módon vizsgáltuk (**36. ábra**).



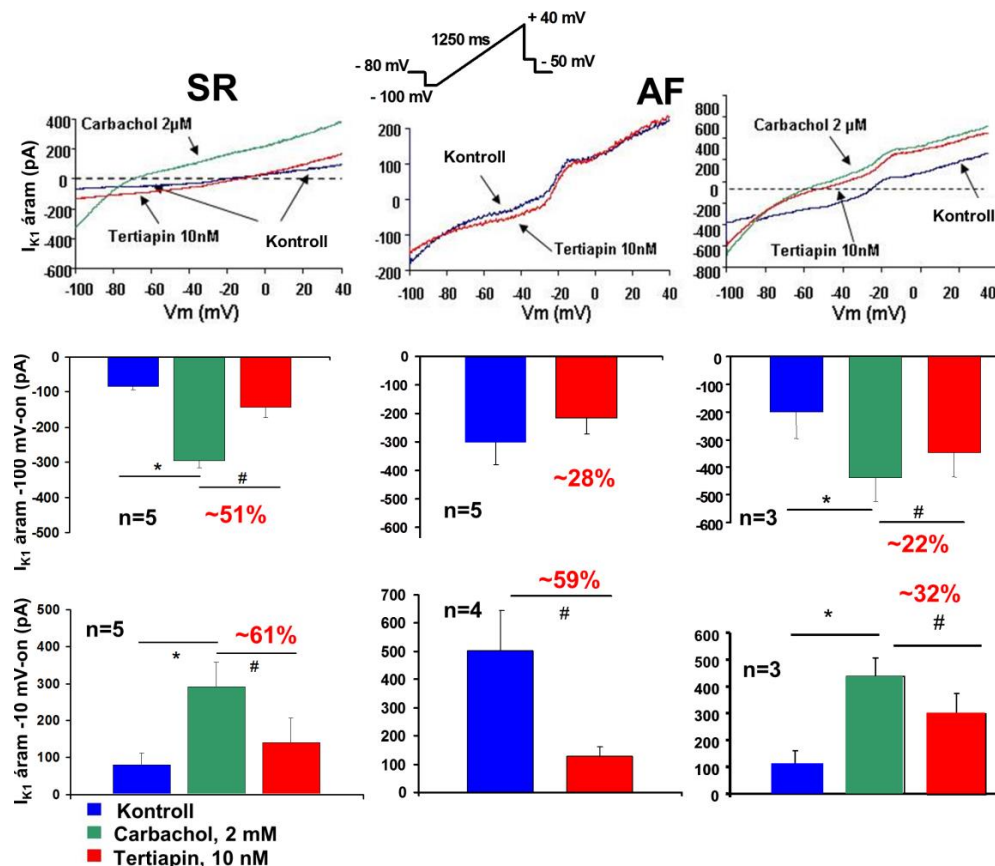
36. ábra. **A panel.** Eredeti I_{K1} áram regisztrátumok szinuszritmusos (SR) és pitvarfibrilláló (AF) kutyákból izolált pitvari szívizomsejteken. **B panel.** I_{K1} áram-feszültség (I-V) karakterisztika SR- és AF kutya pitvari sejteken (n = 9-9; p = N.S).

Az I_{K1} áramot -90 mV holding potenciálról 0.33 Hz pulzusfrekvencia mellett 300 ms időtartamú depolarizáló négyszögimpulzusokkal aktiváltuk, és a pulzus végén nem inaktíválódó áramként (I_{ss} , ún. „steady-state” áram) határoztuk meg (**36A. ábra**, szaggatott vonalakkal jelzett terület). A **36A** ábrán bemutatott eredeti regisztrátum felvételeken (bal oldali mezők), de a kísérleteket összesítő I-V, áram-feszültség karakterisztikákon (**36B.**

ábra) is jól látható, hogy a pitvari I_{K1} áram „AF kutyamodellünkben” felerősödött (*upregulálódik*), de ez a növekedés a pitvari akciós potenciált meghatározó feszültségtartományban (-80 mV és 20 mV között) még nem bizonyult statisztikailag is szignifikáns mértékűnek.

Az acetilkolin-függő káliumáram ($I_{K,ACh}$)

Az $I_{K,ACh}$ káliumáram fiziológiai körülmények között csak a bolygóideg stimulációja alatt aktív. Ezért az áramot a kolinerg agonista carbachol (CCh, 2 μ M) segítségével aktiváltuk (37. ábra).



37. ábra, Az $I_{K,ACh}$ áram SR-ban lévő és pitvarfibrilláló (PF) kutyából izolált pitvarsejtekben. -100 mV-ról 40 mV-ra depolarizáló „ramp” protokollt alkalmaztunk. Az $I_{K,ACh}$ áramot a kolinerg agonista carbachollal (2 μ M) aktiváltuk és tertiapinnal (10 nM) blokkoltuk. Az oszlopdiagramok a -100 mV-on (*inward* tartomány, középső sor), illetve -10 mV-on (*outward* tartomány, alsó sor) mért $I_{K,ACh}$ áramok amplitúdóját demonstrálják. Felül mutatjuk be az alkalmazott ramp protokollt.

Az áramot „ramp” feszültségprotokoll segítségével tanulmányoztuk. SR sejtekben kolinerg aktiváció nélkül mind befelé (*inward*), mind kifelé haladó (*outward*) irányban viszonylag alacsony amplitúdójú áramot mértünk (37. ábra, bal oldali mezők, kék színű áramgörbék és oszlopok). Amennyiben a tápoldathoz hozzáadtunk 2 μ M CCh-t, az áram nagysága mind *inward*, mint az *outward* irányban jelentősen megnőtt (37. ábra, bal oldali

mezők, zöld színű áramgörbék és oszlopok). Az így aktiválódott áramot a szelektív $I_{K,ACH}$ gátló 10 nM tertiapin (Kitamura, 2000) jelentős mértékben gátolta (**37. ábra, bal oldali mezők, piros színű áramgörbék és oszlopok**). „AF-sejtekben” minden előzetes aktiváció nélkül jelentős, konstitutívan aktív $I_{K,ACH}$ áramot mértünk, amelyet a tertiapin jelentősen gátolt (**37. ábra, középső mezők**). Ha az „AF-sejteket” carbachollal kezeltük, a konstitutív $I_{K,ACH}$ ionáramon kívül egy másik, szintén tertiapin-szenzitív, de ligandfüggő $I_{K,ACH}$ ionáram jelent meg (**37. ábra, jobb oldali mezők**). Ezzel igazoltuk, hogy kutyából izolált AF pitvari miocitákban is létezik a korábban humán permanens AF-ben szenvedő betegekben észlelt megfigyelés, mely szerint cAF-ben aktiválódik egy ligandfüggetlen konstitutív $I_{K,ACH}$ áram is, amely feltehetőleg jelentős mértékben hozzájárul a humán pitvari elektrofiziológiai remodellinghez (Dobrev, 2005).

4. témakör. Az NCX gátlás lehetséges antiaritmias hatásmechanizmusának vizsgálata emlősszíveken

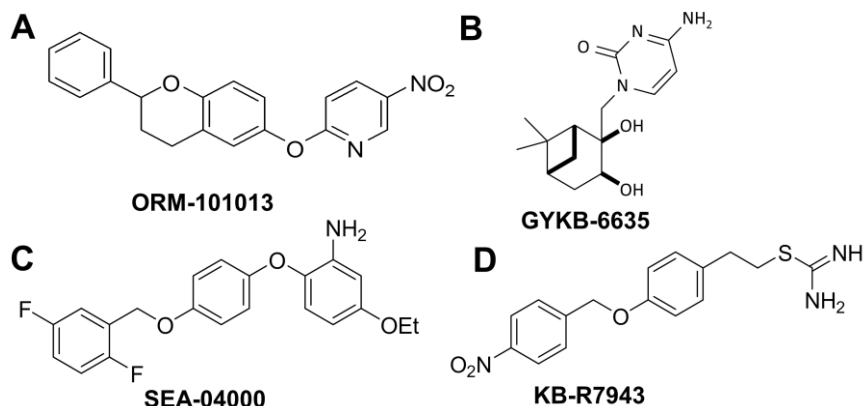
Az ORM-10103 és GYKB-6635, új kísérletes szelektív NCX ioncsatorna gátló-vegyületek hatásainak vizsgálata emlősszíveken (kutya és tengerimalac szívpreparátumokon)

Mint a Bevezetés fejezet 4. témakört bemutató alfejezetben ismertettem, a vizsgálatok célja az volt, hogy ellenőrizzük a Pogwizd és Bers által elméleti megfontolások alapján megfogalmazott hipotézis helyességét, amely szerint a szelektív NCX áram gátlók hatékony szerek lehetnének a Ca^{2+} -tútelítődés talaján kialakuló DAD triggerelt aritmiák kivédésében (Pogwizd, 2001 és 2003). Bár Pogwizd és *mtsai* már 2001-2003 között publikálták a hipotézist ismertető közleményeit, eddig hatékony és szelektív NCX gátlószerek hiányában ennek a feltevésnek az ellenőrzése és igazolása nem volt lehetséges. Az eddig ismert néhány szelektívnek vélt NCX gátlókkal, mint például az SN-6, KB-R7943 vagy SEA-0400, bár több tanulmány is készült, sajnos nem voltak a célnak megfelelő vegyületek, mert magasabb koncentrációkban nemcsak az NCX áramot, hanem jellemzően az I_{CaL} -áramot is gátolják (Birinyi, 2005; Acsai, 2007; Antoons, 2012). Így a különböző iszkémia-reperfúzió (I/R) indukálta Ca^{2+} -tútelítődés aritmia-kísérletekben bizonyult védő hatásukat nem lehet egyértelműen csak az NCX gátló hatás eredményeként interpretálni (Watano, 1999; Elias, 2001; Magee, 2003; Antoons, 2012). Mindez azt jelenti, hogy továbbra is empirikus maradt a Pogwizd hipotézisnek az igazolása, hogy vajon a szelektív NCX gátlás hatékony lehet a Ca^{2+} -tútelítődés talaján keletkező EAD és DAD típusú triggerelt aritmiák kezelésére.

Két újonnan szintetizált szelektív NCX csatornagátlónak tervezett vegyület (ORM-10103 és GYKB-6635 molekulák, **38A-38B. ábrák**) vizsgálatában vettünk részt. Mindkét kísérletes molekula szerkezetében eltér az eddigi vegyületek (KB-R7943, illetve SEA-0400, **38C-38D. ábrák**) szerkezetétől.

Az ORM-10103 vegyületet (**38A. ábra**) az Orion Gyógyszergyár fejlesztőivel együtt nemzetközi ko-operáció keretében vizsgáltuk meg. A gyár munkatársai az általuk végzett előkísérletek alapján a vegyületet igen szelektív és hatékony NCX-gátlószernek feltételezték. A kísérletek során megvizsgáltuk az ORM-10103 NCX áram gátló képességét, szelektivitását és antiaritmiás hatékonyságát a triggerelt aritmiákra.

Hazai ko-operációban (SZTE, GYTK Gyógyszerkémiai Intézet) is elindítottunk egy közös NCX gátlószert fejlesztési projektet. A projekt során egy molekulakönyvtár segítségével mintegy 140 karbociklusos nukleozid analóg vegyületet szintetizáltunk és vizsgáltuk meg. Így azonosítottunk be néhány *lead* vegyületet, amelyek közül a legígéretesebb GYKB-6635 molekulát (**38B. ábra**) választottuk ki további részletesebb vizsgálatok céljából. A kísérletek során az ORM-10103 molekulához hasonlóan, megvizsgáltuk a GYKB-6635 vegyület NCX áramot blokkoló hatékonyságát, szelektivitását és antiaritmiás tulajdonságát.

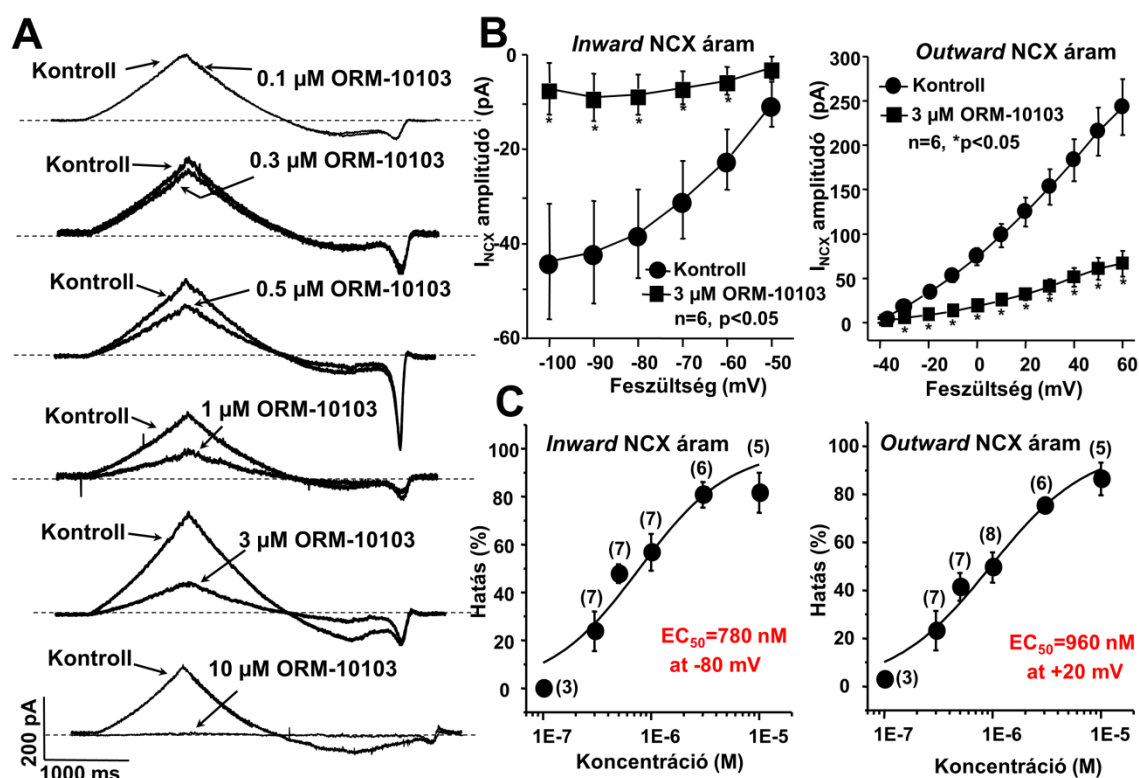


38. ábra. A. panel. Az ORM-10103 vegyület kémiai szerkezete ($C_{20}H_{16}N_2O_4$) és IUPAC neve: 5-nitro-2-(2-phenylchroman-6-yloxy)pyridine, illetve 2-[(3,4-dihydro-2-phenyl-2H-1-benzopyran-6-yl)oxy]-5-nitro-pyridine. **B. panel.** A GYKB-6635 vegyület kémiai szerkezete ($C_{14}H_{21}N_3O_3$) és IUPAC neve: [(4-amino-1-[(1R,2S,3S,5R)-2,3-dihydroxy-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]heptan-2-yl)methyl] pyrimidin-2(1H)-one). **C. panel:** A SEA-04000 vegyület kémiai szerkezete ($C_{21}H_{19}F_2NO_3$) és IUPAC neve: 2-[4-[(2,5-difluorophenyl) methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline. **D. panel.** A KB-R7943 vegyület kémiai szerkezete ($C_{17}H_{21}N_3O_6S_2$) és IUPAC neve: 2-(2-(4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl) ethyl)isothiourea mesylate.

A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott protokollok) a *Módszerek és anyagok* fejezetben részletesen bemutattam. Az eredmények ismertetése:

Az ORM-10103 és GYKB-6635 vegyületek NCX áram gátlóhatásnak vizsgálata kutya kamrai szívműködésben.

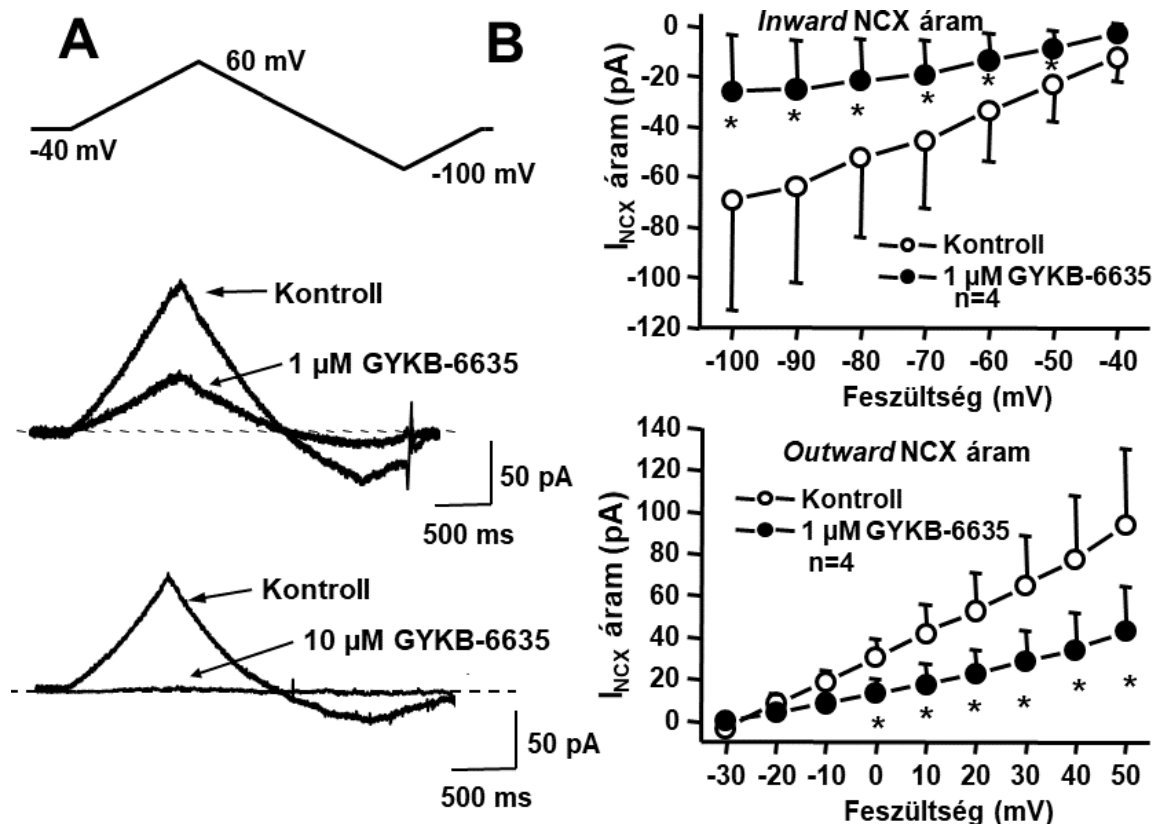
Az NCX áramot egy speciális megközelítésben, a Hobai és *mtsai*, (1997) által bemutatott módszerrel mértük, amelyet a Módszerek fejezetben szereplő **6. ábra** kapcsán már részletesen ismertettem. A **39A-39B. ábrákon** bemutatott kísérletek igazolják, hogy az ORM-10103 vegyület koncentrációfüggő módon, hatékonyan gátolja az NCX áramot mind *reverz* (-100 mV és -50 mV membránpotenciálok között), mind *forward* (-40 mV és +60 mV közötti membránpotenciál tartományban aktivált) módban. 500 nM feletti koncentrációkban mindkét irányban statisztikailag szignifikáns volt a gátló hatás. A **39.C. ábra** bemutatja az ORM-10103 vegyület NCX áram dózis-hatás görbéit, amely alapján a számolt EC_{50} értékek, 780 nM az *inward* áram, illetve 960 nM, az *outward* áram esetében.



39. ábra. A. panel. Az ORM-10103 koncentráció-függő hatása az NCX áram regisztrátumokra. B. panel. ORM-10103 (3 μM) hatása a *reverz* (bal oldali mező) és *forward* (jobb oldali mező) NCX áramokra balkamrai kutya sejtekben. A diagramok a *reverz* I_{NCX} , illetve *forward* I_{NCX} áramokra vonatkozó átlag áram-feszültség (I-V) karakterisztikákat mutatják be. C panel. Az ORM-10103 vegyületnek a *reverz* (bal oldali mező) és *forward* (jobb oldali mező) NCX áramokra vonatkozó dózis-hatás görbéi. *p<0.05, az értékek átlag±SEM-ként megadva.

A **40. ábra** bemutatja, hogy a GYKB-6635 vegyület is hatékony NCX áram gátló szer. Amint az ábrán is látható, 1 μM GYKB-6635 statisztikailag szignifikáns mértékben gátolja az NCX áramot mind *reverz* (+20 mV-nál mérve, kontrollban 52.5 ± 18.5 pA értékről 22.4 ± 11.9 pA értékre csökkent a szer adása után, amely mintegy 57%-os gátlóhatásnak felel

meg, $n=4$, $p<0.05$), mind *forward* módban (-80 mV-nál mérve, kontrollban -52.7 ± 21 pA értékről -21.8 ± 12.3 pA értékre csökkent a szer adása után, amely 58%-os gátlóhatást jelent, $n=4$, $p<0.05$).

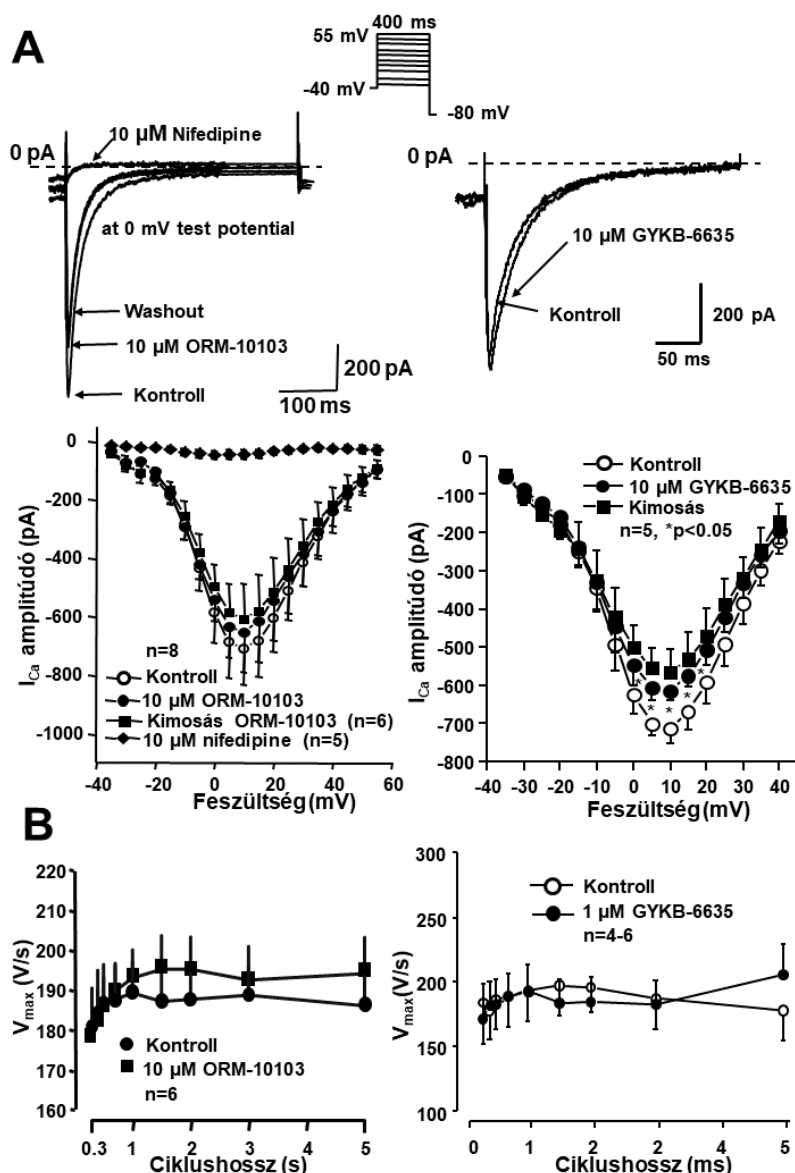


40. ábra. A. panel. A GYKB-6635 koncentrációfüggő hatása az NCX áram regisztrátumokra. **B. panel.** GYKB-6635 ($1 \mu\text{M}$) hatása a *reverz* (bal oldali mező) és *forward* (jobb oldali mező) NCX áramokra balkamrai kutya sejtekben. A diagramok a *reverz* I_{NCX} , illetve *forward* I_{NCX} áramokra vonatkozó átlag áram-feszültség (I-V) karakterisztikákat mutatják be. * $p<0.05$, az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva.

Ezúttal nem számoltuk ki a GYKB-6635 vegyület koncentrációfüggő dózis-hatás görbe segítségével meghatározott EC_{50} értékét, de mivel a $10 \mu\text{M}$ GYKB-6635 gyakorlatilag 100 %-an gátolta a *reverz* és *forward* NCX áramot, ez azt jelenti, hogy a szer körülbelül hasonló gátlóhatással rendelkezik mind az ORM-10103 vegyület, vagyis becsült EC_{50} értéke szintén az 800-1000 nanomolos tartományban lehet.

Az ORM-10103 és GYKB-6635 NCX gátlószer vegyületek szelektivitás vizsgálata

A **41. ábra** bemutatja az ORM-10103 és GYKB-6635 vegyületek hatásának hiányát az L-típusú Ca^{2+} áramra és a gyors Na^{+} áramra. Utóbbit ezúttal is az AP depolarizációs fázisának maximális sebességként (V_{max}) határoztunk meg. Jól látható, hogy a relatív magas koncentráció értékeknél is vizsgálva, a vegyületek nem gátolták sem az I_{CaL} áramot, sem a V_{max} paramétert.



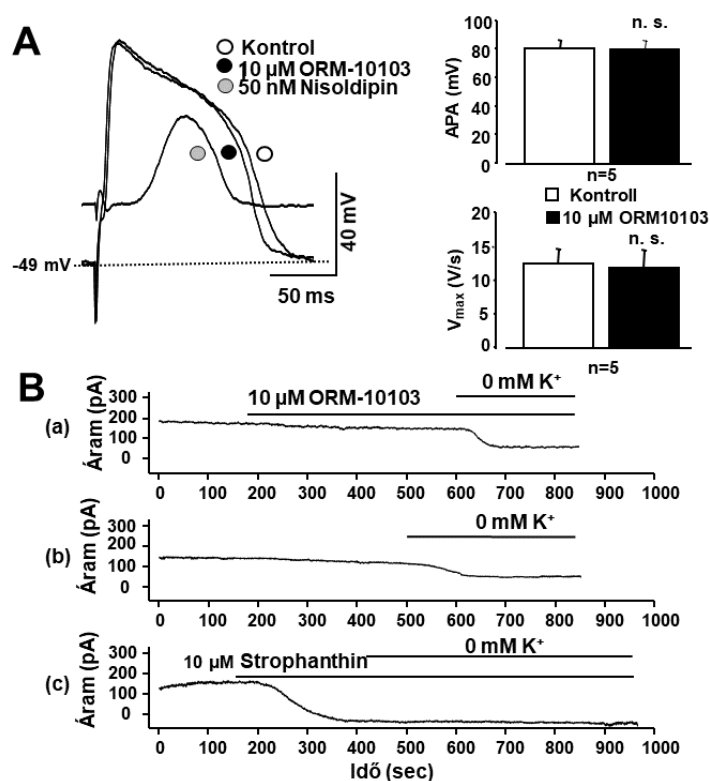
41. ábra. A és B. panel. Az ORM-10103 (10 μ M, bal oldali mezők) és GYKB-6635 (1, illetve 10 μ M, jobb oldali mezők) hatásának hiánya L-típusú kalcium áramra (**A. panel**, I_{CaL}) és a gyors nátrium áramra (**B. panel**) balkamrai kutya sejtekben. A gyors nátrium áramot a depolarizáció maximális sebességként tanulmányoztuk (V_{max}). Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva.

Az ORM-10103 vegyület szelektivitás ellenőrzését kiterjesztettük, ezért megvizsgáltuk a szer lehetséges hatásait a Na^+/K^+ pumpa áramra és a lassú akciós potenciálokra is. Utóbbit vizsgálata azért volt szükséges, hogy kizárjuk azt, hogy a **41. ábrán** tapasztalt enyhe Ca^{2+} áram csökkenés nem egy valódi csatornagátlás eredménye.

Amint a **42A. ábra** bemutatja az ORM-10103 10 μ M koncentrációban nem változtatta meg a lassú akciós potenciáloknak sem az amplitúdóját (kontrollban: 81.2 ± 5.7 mV, ORM-10103 vegyület alkalmazása után: 81.6 ± 6.1 mV, $n=5$, $p=N.S.$) sem a depolarizáció meredekségét dV/dt_{max} (kontrollban: 12.4 ± 2.3 V/s, ORM-10103 vegyület alkalmazása után: 11.8 ± 2.6 V/s, $n=5$, $p=N.S.$). Mindez megerősíti, hogy az ORM-10103

vegyület valóban nem befolyásolja az L-típusú kalcium áramot, vagyis kijelenthető, hogy a **41. ábrán** bemutatott látszólagos enyhe Ca^{2+} csatornagátló hatást egyértelműen a kalcium-csatornákra jellemző spontán csökkenésnek, az ún. *run-down* mechanizmusnak tulajdoníthatjuk (Belles, 1988).

A Na^+/K^+ pumpa áramot ($I_{\text{Na/K}}$) a Módszereknél bemutatott protokoll segítségével vizsgáltuk. Az $I_{\text{Na/K}}$ áram nagysága kontroll körülmények között 100.7 ± 14.6 pA volt, amely 5-7 perces ORM-10103 inkubáció hatására csökkent mintegy 14%-al (ORM-10103 vegyület után az áram nagysága 86.7 ± 11.7 pA, $n=6$, $p < 0.05$, **42B. ábra, felső mező**).

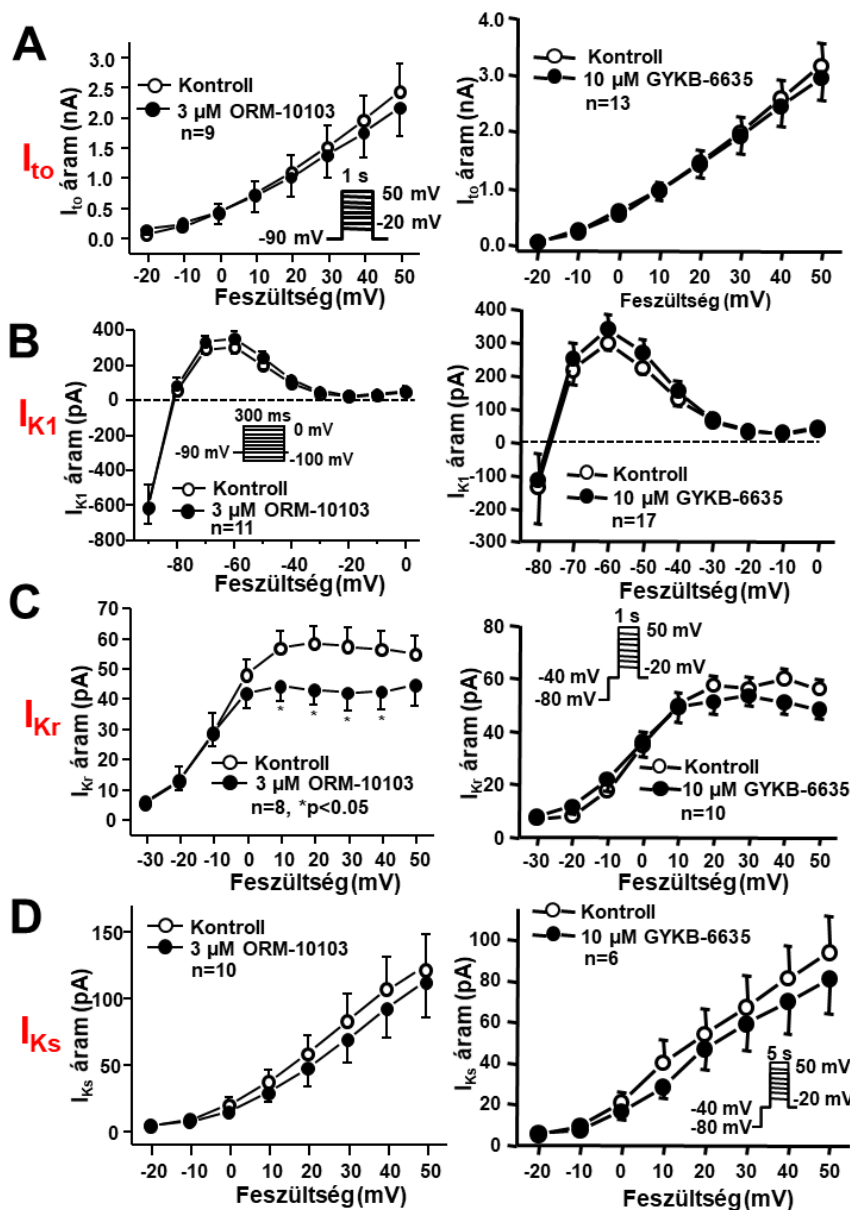


42. ábra. A. panel. Az ORM-10103 (10 μM) hatása a lassú akciós potenciálra tengerimalac jobb kamrai papilláris izmon. A bal oldali mező eredeti AP regisztrátumokat mutat be kontroll körülmények között, illetve ORM-10103 és nisoldipin alkalmazása után. A jobb oldali diagramok pedig bemutatják a 10 μM ORM-10103 hatását az átlagolt akciós potenciál amplitúdó és V_{max} értékre. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva. **B. panel.** Az ORM-10103 (10 μM) hatásának hiánya a Na^+/K^+ pumpa ($I_{\text{Na/K}}$) áramra kutya kamrai miocitákban. Az (a) görbe bemutatja, hogy 10 μM ORM-10103 alapvetően nem befolyásolja az $I_{\text{Na/K}}$ áramot, mindazonáltal egy az áramgörbe végén egy csekély mértékű csökkenés látható volt. A (b) áramgörbén látható, hogy egy időfüggő kontroll kísérletben ORM-10103 hozzáadása nélkül is egy az (a) görbén regisztrálthoz hasonló csekély mértékű csökkenés volt regisztrálható. (c **regisztrátum**) Hasonló körülmények között egy ismert $I_{\text{Na/K}}$ csatorna blokkoló szer, a strophanthin (10 μM) teljesen gátolta az $I_{\text{Na/K}}$ pumpa áramot.

Ezután megismételtük ugyanezt a kísérletet úgy, hogy a végén nem adagoltuk a tápoldathoz az ORM-10103 vegyületet. Amint a **42B. ábra** (középső mező) is mutatja, jól látható, hogy a *steady-state* áram, ugyanolyan mértékű csökkenést mutatott be, mint amikor a tápoldat tartalmazott ORM-10103 vegyületet (kontroll körülmények között 119.7 ± 25.6 pA

vs 92.6 ± 27.6 pA „alkontroll vegyület”, csökkenés 22.7 %, $n=3$, $p<0.05$). Ezután a következő kísérletsorozatban a sejteket strophanthin-nal kezeltük, amely egy ismert Na^+/K^+ pumpagátló vegyület. Amint a **42B. ábrán** az alsó mező is bemutatja, látható, hogy a strophanthin hatékonyan blokkolta a *steady state* $I_{\text{Na/K}}$ áramot. Mindez azt jelenti, hogy az ORM-10103 vegyület nem módosítja az $I_{\text{Na/K}}$ áramot.

A **43. ábra** a két NCX gátló vegyületnek a különböző repolarizáló káliumáramokra vonatkozó hatásait mutatja be.

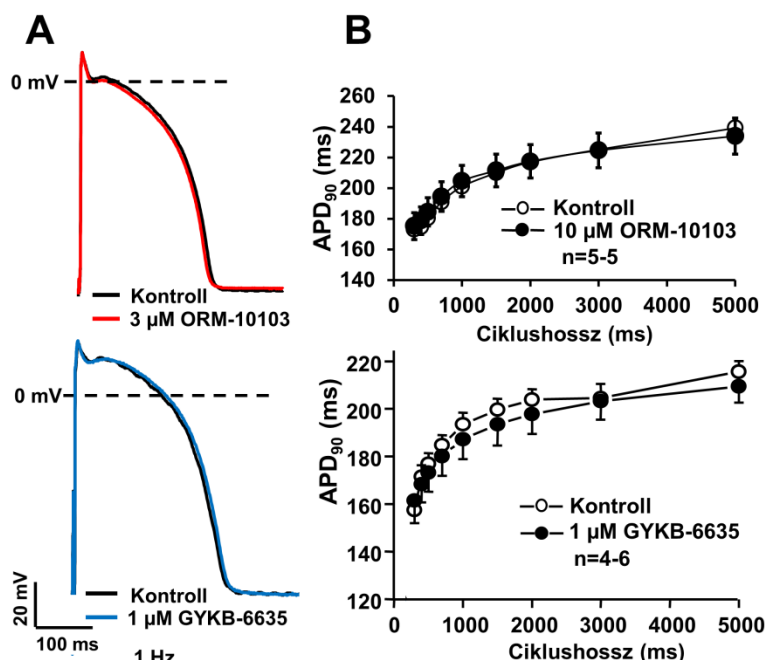


43. ábra. Az ORM-10103 (3 μM , bal oldali mezők) és GYKB-6635 (10 μM , jobb oldali mezők) hatásának hiánya a tranziens kifelé haladó K^+ -áramra (I_{to} , **A. panel**), befelé egyenirányító K^+ -áramra (I_{K1} , **B. panel**) és a késői egyenirányító K^+ -áram lassú komponensére (I_{Ks} , **D. panel**) kutya balkamrai szívizomsejtekben. A **C. panel** a két szernek a késői egyenirányító káliumáram gyors komponensére (I_{Kr}) vonatkozó hatásait mutatja be. A GYKB-6635 vegyület a jelzett 10 μM koncentrációban nem befolyásolta az I_{Kr} áram amplitúdóját, amíg az ORM-10103 vegyület viszont a vizsgált 3 μM koncentrációban, ha kis-mértékű, de statisztikailag szignifikáns bizonyuló mértékben gátolta az I_{Kr} áram nagyságát. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva; * $p<0.05$.

Jól látható, hogy mindkét vegyület jó szelektivitási paraméterekkel rendelkezik, mert a magasnak tekinthető 3 μM (ORM-10103), illetve 10 μM (GYKB-6635) koncentrációknál mérve egyik vegyület sem gátolta a tranziens kifelé haladó (I_{to} , **43A. ábra**), befelé egyenirányító (I_{K1} , **43B. ábra**) és az késői egyenirányító káliumáram lassú komponensét (I_{Ks} , **43D. ábra**). A GYKB-6635 vegyület nem befolyásolja a késői egyenirányító káliumáram gyors komponensét (I_{Kr}) sem, viszont az ORM-10103 vegyület kis mértékben (< 25%), de statisztikailag szignifikáns mértékben gátolta az I_{Kr} repolarizáló áramot (20 mV-on mérve az I_{Kr} tail áram kontrollban: 58.6 ± 5.6 pA, amíg ORM-10103 vegyület alkalmazása után 43.1 ± 5.1 pA, $n=8$, $*p<0.05$) (**43.C ábra**).

Az NCX áram ORM-10103 és GYKB-6635 vegyületekkel történt szelektív gátlásának hatása a kutya kamrai akciós potenciál időtartamra (APD_{90})

Az előző kísérletek igazolták, hogy az ORM-10103 és a GYKB-6635 vegyületek hatékony és szelektív NCX áram gátlószerek, amelyek így alkalmasak arra, hogy tanulmányozzuk az NCX gátlás hatását a kamrai akciós potenciálra. A következő kísérletekben megvizsgáltuk 3 μM ORM-10103, illetve 1 μM GYKB-6635 hatását kutya jobb kamrai papilláris izmon.



44. ábra. A. panel. Az ORM-10103 (3 μM) és GYKB-6635 (1 μM) hatásának az akciós potenciál időtartamára kutya jobbkamrai izmon. A stimuláló frekvencia 1 Hz volt. **B. panel.** Az ORM-10103 (3 μM) és GYKB-6635 (1 μM) frekvenciafüggő hatásai az akciós potenciál időtartamra (APD_{90}). Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva.

Amint a **44. ábra** és a **12. táblázat** is bemutatják, hogy a szelektív NCX gátlás 1 Hz frekvencián nem változtatta meg a kutya kamrai AP jelformát és a legfontosabb paramétereit

beleértve a depolarizáció maximális sebességét ($V_{\max}$), AP amplitúdót (APA), illetve APD_{50} és APD_{90} repolarizáció értékeket. Ezután megvizsgáltuk a két szernek a frekvenciafüggő hatásait a kamrai repolarizációra, de amint a **44B. ábrán** is látható, egyik vegyület sem nyújtotta meg a kamrai APD_{90} értéket statisztikailag szignifikáns mértékben a 300 -5000 ms ciklushossz tartományon tanulmányozva.

12. táblázat. ORM-10103 (n=6) és GYKB-6635 (n=7) hatása kutya jobb kamrai munkaizomból regisztrált akciós potenciálok paramétereire.

Csoport	RP (mV)	APA (mV)	$V_{\max}$ (V/s)	APD_{50} (ms)	APD_{90} (ms)
Kontroll	-84.0±0.6	104.3±0.7	187.5±8.7	195.3±3.9	228.7 ± 4.5
ORM 10103, 3 μ M	-83.3±0.8	102.8±1.3	187.5±7.6	195.3±5.9	230.0 ± 7.2
Kontroll	-86.8±1.4	107.1±2.1	189.7±20.6	173.2±4.7	207.4±3.5
GYKB-6635, 1 μ M	-85.7±1.8	106.7±2.5	186.9±17.4	166.1±8.4	198.4 ± 7.4

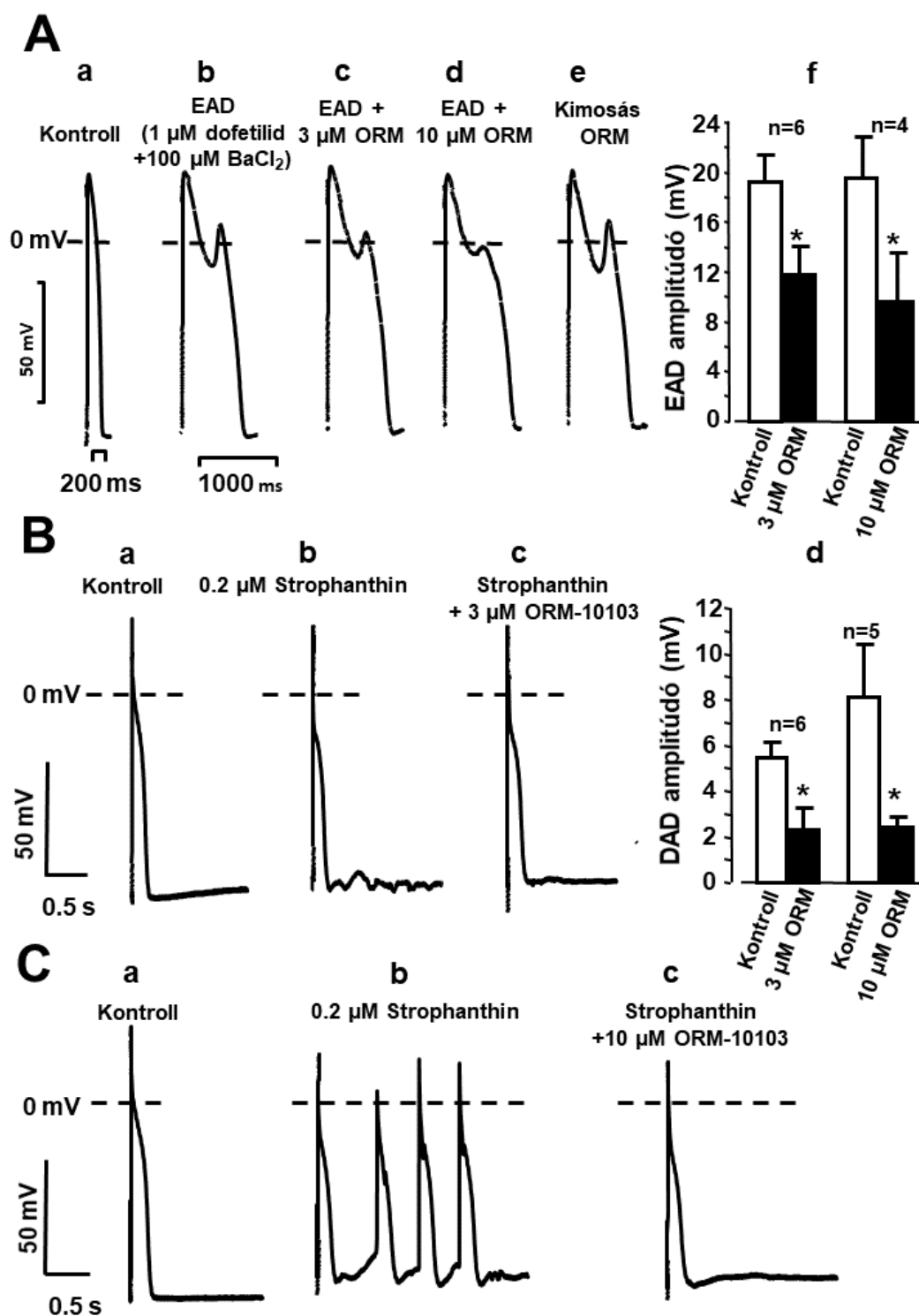
RP= nyugalmi potenciál, APA= akciós potenciál amplitúdó, $V_{\max}$ = a depolarizáció maximális sebessége, APD_{90} és APD_{50} = az akciós potenciál időtartama a repolarizáció 50 és 90%-os szintjénél. Az értékek átlag±SEM-ként megadva.

Az ORM-10103 és GYKB-6635 NCX gátlószerek antiaritmiás hatásának vizsgálata triggerelt aritmiákra

Az ORM-10103 hatása a korai és késői utódepolarizációkra (EAD és DAD) kutya jobbkamrai preparátumokon

Korai utódepolarizációt úgy hoztunk létre, hogy lassú frekvencián (1500-3000 ms ciklushosszakon) stimulálva, kombinált I_{K1} + I_{K1} gátlással (1 μ M dofetilid és 100 μ M $BaCl_2$ alkalmazásával) megnyújtottuk a repolarizációt (**45A. ábra, a és b mezők**).

Az ORM-10103 koncentrációfüggő módon (3 és 10 μ M koncentrációban adagolva) hatékonyan csökkentette az EAD amplitúdóját (**45A. ábra, c és d mezők**). 3 μ M ORM-10103 19.3±2.2 mV értékről 11.7±2.4 mV-ra csökkentette az EAD amplitúdóját (n=6, *p<0.05, **45A. ábra, c és f mezők**), amíg 10 μ M-ban alkalmazva a vegyületet, az EAD csökkentő hatás még markánsabb volt (EAD amplitúdója 19.4±3.3 mV-ról 9.5±4.0 mV-ra csökkent (n=4, *p<0.05, **45A. ábra, d és f mezők**). Ez a hatás reverzibilisnek bizonyult, ugyanis az ORM-10103 vegyület kimosása után az EAD újra visszatért (**45A. ábra, e mező**).



45. ábra. A. panel. Az ORM-10103 koncentrációfüggő hatásai a korai utódepolarizációkra (EAD) kutya jobbkamrai papilláris izmon. Az EAD-okat 1 μM dofetilid+100 μM BaCl₂ 3000 ms ciklushosszon történő alkalmazásával idéztük elő. 3 és 10 μM ORM-10103 statisztikailag szignifikáns módon (jobb oldali mező) reverzibilis módon csökkentette az EAD amplitúdóit. **B. panel.** Az ORM-10103 koncentrációfüggő hatásai késői utódepolarizációkra (DAD) kutya jobbkamrai Purkinje rostokban. A DAD-okat 0.2 μM ouabain 500 ms ciklushosszon történő alkalmazásával idéztük elő. 3 és 10 μM ORM-10103 statisztikailag szignifikáns módon (jobb oldali mező) csökkentette az DAD amplitúdóit. **C. panel.** Kettő kísérletben a strophanthine extrasisztolés sorozatot indukált a stimulus sorozat után, amelyeket azonban a 10 μM ORM-10103 alkalmazása sikeresen kivédett. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva, * $p < 0.05$.

Késői utódepolarizációt (DAD-ot) Purkinje rostokban hoztunk létre úgy, hogy a preparátumokat a 40 percen át a Na^+/K^+ pumpagátló strophanthinnal ($0.2 \mu\text{M}$) perfundáltuk. A kísérletekben 40 darab 400 ms-os ciklushosszú pulzusokból álló stimuláló sorozatot alkalmaztunk. A stimulus sorozatot egy 20 másodperc hosszú stimulációmentes időszak követte, amelynek következtében megjelentek a DAD-ok (**45B. ábra, a és b mezők**). Az ORM-10103 a DAD-okat is koncentrációfüggő módon csökkentette. $3 \mu\text{M}$ ORM-10103 $5.5 \pm 0.6 \text{ mV}$ értékről $2.4 \pm 0.8 \text{ mV}$ -ra csökkentette a DAD-ok amplitúdóját ($n=6$, $*p<0.05$, **45B. ábra, c és d mezők**), amíg a $10 \mu\text{M}$ ORM-10103 ezúttal is hatékonyabb volt, ugyanis $8.1 \pm 2.3 \text{ mV}$ -ról $2.5 \pm 0.3 \text{ mV}$ -ra csökkentette a DAD-okat ($n=5$, $*p<0.05$, **45B. ábra, d mező**). Kettő kísérletben a strophanthin extraszisztolé sorozatot (**45C. ábra, b mező**) indukált a stimulus sorozat után, amelyeket azonban a $10 \mu\text{M}$ ORM-10103 alkalmazása sikeresen kivédett (**45C. ábra, c mező**).

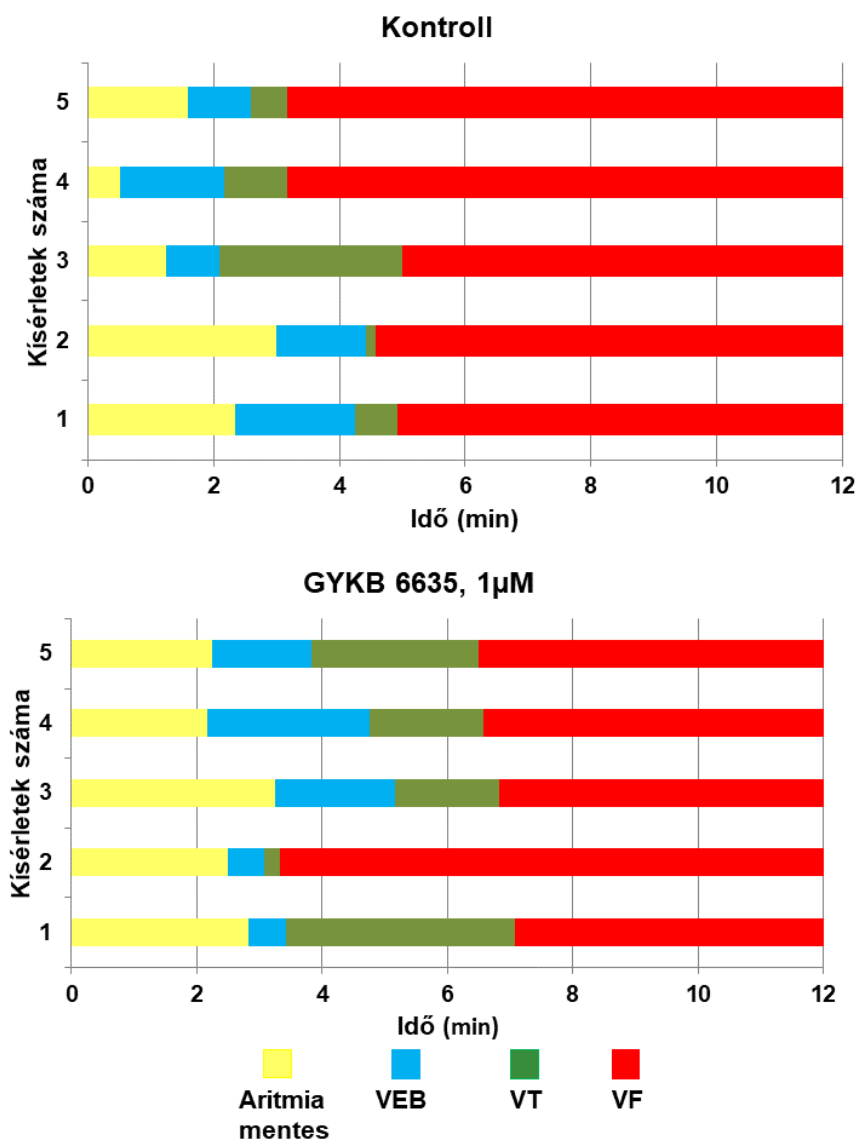
A GYKB-6635 hatása az ouabain indukálta aritmiákra izolált tengerimalac szívekben

A ouabain ($5 \mu\text{M}$) sikeresen indukált szívritmuszavarokat Langendorff perfundált tengerimalac szívekben. A ouabain hatására a következő aritmiatípusok jelentek meg: extraszisztolé (VEB), bigeminia, salvo, kamrai tachycardia (VT) és kamrafibrilláció (VF). A kontroll csoportban az első ritmuszavarok (többnyire VEB és bigeminia) a második percben jelentek meg (**46. ábra**). A következő percekben alakult ki a kamrai tachycardia, amelyet kamrafibrilláció követett, általában 4-5 perccel az ouabain infúzió megkezdése után. A GYKB-6635 előkezelés ($1 \mu\text{M}$), a kontroll csoporttal összehasonlítva, jelentősen késleltette a kamrafibrilláció megjelenésének idejét. A kontroll csoportban jellemzően 4.17 ± 0.41 perc után alakult ki a VF ($n=5$), amely a GYKB-6635 vegyülettel előkezelt csoportban 6.07 ± 0.69 percre nőtt ($n=5$, $*p<0.05$), ami legalább 18%-s késleltetésnek felel meg. A többi aritmiafajta (VEB és VT) esetében az hatás nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (**13. táblázat és 46. ábra**).

13. táblázat. A GYKB-6635 ($1 \mu\text{M}$) hatása az ouabain ($5 \mu\text{M}$) indukálta aritmiákra Langendorff szerint perfundált tengerimalac szívekben.

Csoport	n	VEB (perc)	VT (perc)	VF (perc)
Kontroll	5	1.73 ± 0.43	3.10 ± 0.51	4.17 ± 0.41
GYKB-6635, $1 \mu\text{M}$	5	2.60 ± 0.20	4.05 ± 0.39	$6.07 \pm 0.69^*$

n = állatok száma a csoportban; VEB= kamrai extraszisztolé és bigeminia; VT= kamrai tachycardia; VF= kamrafibrilláció; $* p<0.05$. Átlag $\pm$ SEM.



46. ábra. A GYKB-6635 (1 μ M) hatása az ouabain (5 μ M) indukálta aritmiákra Langendorff perfundált tengerimalac szívekben. A diagram az aritmia kialakulásához szükséges idő függvényében (EKG regisztrátumokon leolvasott) mutatja be a különböző aritmiatípusokat mint például: kamrai ektópiás ütések (VEB, extraszisztolék vagy bigeminia, kék sávok), kamrai tachycardia (VT, zöld sávok) és kamrafibrilláció (VF, piros sávok).

Az NCX áram gátlása SEA-0400 vegyülettel szinuszritmusos és permanens pitvarfibrilláló betegekben

Ez a téma jellegénél fogva természetesen kapcsolódik a **3. témakörben** (Pitvarfibrilláció okozta remodelling celluláris szintű vizsgálata) megfogalmazott kísérletes célkitűzésekhez is. A **3. témakörnél** ismertetett fejezetekben részletesen tárgyaltam, hogy permanens/krónikus pitvarfibrilláció (cAF) az ún. pitvari remodellingnek nevezett jelenség jelentősen módosítja a cAF betegek pitvari szívműködésének elektromos aktivitását. Ennek következtében változik az akciós potenciál jelalakja (rövidebb és csapottabb, úgymond triangulizált lesz), és számos az AP-t meghatározó transzmembrán ionáram tulajdonsága is

(lásd **3. ábra**). A szív kalcium homeosztázisa szempontjából két kulcselemet kell kiemelni. Az egyik a jelentős L-típusú kalciumcsatorna *downreguláció*, amely mind a natív áram, mind a csatorna fehérje és mRNS transzkripció szintjén megjelenik (Brundel, 1999; Lai, 1999; Schotten, 2003a; Christ, 2004), és amely változás a fő okozója a jelentős AP plató fázis depléciónak is. A másik fontos elem, amelyre szintén számos irodalmi adat utal, az, hogy az NCX áram expressziója permanens pitvarfibrillációban vélhetően *upregulálódik*, igaz hogy ezt a változást egyelőre csak molekuláris biológiai vizsgálatok igazolták fehérje és mRNS szinten (Schotten, 2003a; El Armouche, 2006; Voigt, 2012). Még nem ismerünk olyan vizsgálatot, amelyben a natív NCX áramot funkcionalitás szintjén is tanulmányozták volna permanens pitvarfibrilláló betegekből származó preparátumokban.

Amint már többször taglaltuk a Pogwizd és Bers hipotézis alapján, magas tachycardia esetében a Ca^{2+} -túltelítődés következtében az NCX áram *upregulálódik*, és ez a nettó megemelkedett depolarizáló áram elsősorban késői utódepolarizációk (DAD) aritmogén forrása lehet (Pogwizd, 2001 és 2003). Mindez azt jelenti, hogy a pitvarfibrilláció elsősorban klasszikus, DAD által triggerelt aritmiafajta, persze mint a korábbi fejezetben már említettem más triggermechanizmusok (PV-ből induló fokális aritmia, EAD és spontán fázis 4 depolarizáció) által indukált formái is ismertek.

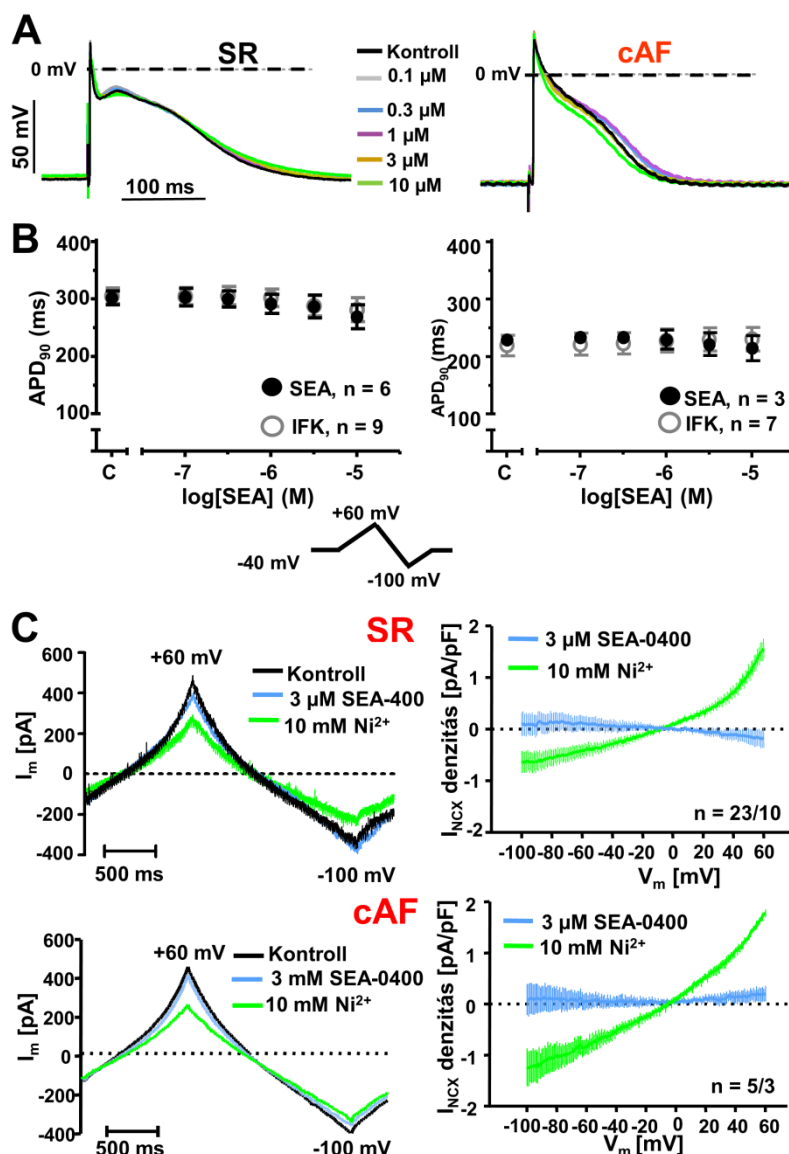
Fentiek alapján az NCX áram szerepének a tanulmányozása cAF-ben fontos vizsgálati célkitűzés. A vizsgálatokat Kovács Péter Pál PhD hallgatóm részvételével szintén az Ursula Ravens professzor asszony vezette drezdai munkacsoporttal végeztük kooperációban. Az NCX áram szeparálására, és a humán pitvari akciós potenciálokra történő hatásának vizsgálatára technikai okok miatt ezúttal a viszonylagosan szelektív SEA-0400 (**38C. ábra**) vegyületet használtuk.

A kísérletes felállást (oldatok, és alkalmazott speciális NCX áramot tanulmányozó Hobai és Hilgemann protokollok) a **Módszerek és anyagok** fejezetben részletesen bemutattam. Az eredmények ismertetése:

A SEA-0400 hatása a pitvari akciós potenciálra kontroll szinuszritmusos (SR) és krónikus pitvarfibrillációban szenvedő (cAF) betegeken

A **47. ábra** mutatja be a SEA-0400 vegyület hatásait bemutató kísérleteket, amelyek szinuszritmusos, illetve cAF-ben szenvedő betegek szívmináiból származnak. A **47A. ábra** bemutatja a tipikus SR („*spike és dome*”), illetve cAF (triangulizált) pitvari akciós potenciál jelformákat. A 0.1 és 10 μM közötti koncentrációkban alkalmazott SEA-0400 vegyület nem

okozott semmilyen szignifikáns változást, sem a vegyület előtti kontroll, sem az oldószeres időfüggő kontroll csoport (IFK) eredményeivel összehasonlítva (47A-47B. ábrák).



47. ábra. A. panel. A SEA-0400 (0.1-10 μM) koncentrációfüggő hatása az akciós potenciál időtartamra (APD₉₀) szinuszritmusos (SR, bal oldali mezők), illetve krónikus pitvarfibrilláló (cAF, jobb oldali mezők) betegek szívéből humán jobb kamrai pitvari trabekula izmon. **B. panel.** SEA-0400 dózis-hatás görbék az oldószer hatást vizsgáló időfüggő kontrollokkal (IFK) összehasonlítva. **C. panel.** A SEA-0400 (kék színű görbék) hatásának hiánya a *reverz* és *forward* NCX áramra SR (felső mezők) és cAF (alsó mezők) pitvari miocitákban a Hobai protokollal vizsgálva. A bal oldali mezők eredeti NCX regisztrátumokat mutatnak be, amíg a jobb oldalon átlag $\pm$ SEM értékek vannak feltüntetve áram-feszültség (I-V) karakterisztikákon. A 10 mM NiCl₂ mind a *reverz*, mind a *forward* NCX áramot gátolta (kék áramgörbék). Az n számok a sejtszám/páciens értéket jelentik.

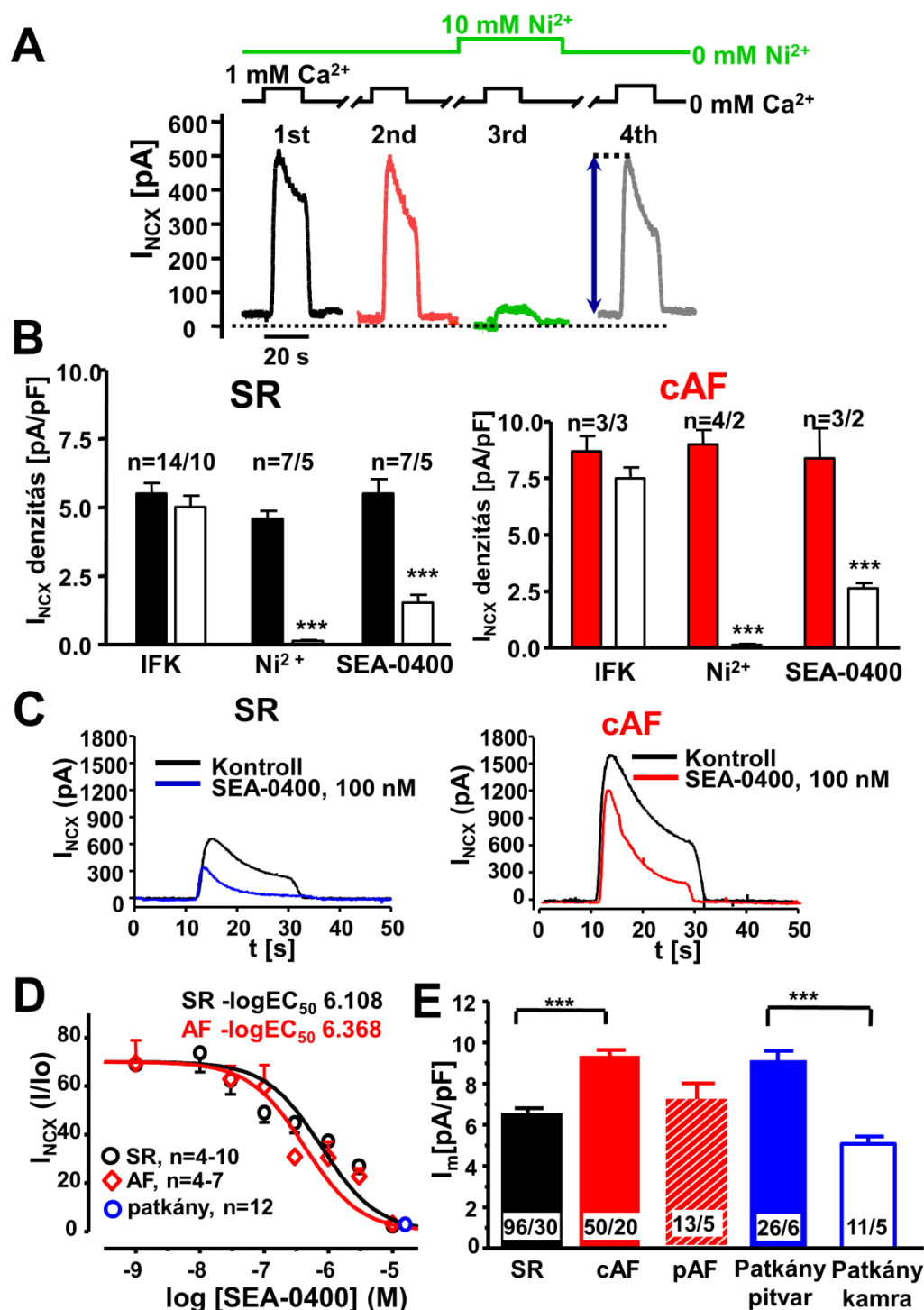
Mivel elméletileg lehetséges, hogy az előbb tapasztalt SEA-0400 hatás hiánya a vegyületek multicelluláris preparátumokban ismert, és nem ritkán tapasztalható diffúziós problémák következménye is lehet, megvizsgáltuk a SEA-0400 szer hatásait közvetlenül az NCX áramra izolált sejtekben is. Először a Hobai és *mtsai* által kidolgozott protokoll

segítségével a patch-clamp technika perforált-patch konfigurációjában mértük meg a *forward* és *reverz* NCX áramot SR és cAF pitvari sejtekben (Hobai, 1997). A **47C. ábrán (bal oldali mezők)** látható, hogy a *ramp* protokoll segítségével jelentős *inward* és *outward* irányú áramot regisztrálhattunk mindkét sejttypusban, és az is látható, hogy a SEA-0400 3 μM -ban alkalmazva sem SR-ben, sem cAF-ben nem változtatta meg az NCX áramot egyik irányban regisztrálva sem, amíg a 10 mM NiCl_2 jelentősen gátolta az áram amplitúdóját. A jobb oldali mezők pedig bemutatják az átlag SEA-0400 és Ni^{2+} -szenzitív áram értékeket. Ezt az eredményt meglepőnek és váratlannak találtuk, és úgy értelmeztük, hogy ezzel a technikával vizsgálva (Hobai protokoll perforált patch-technikával regisztrálva) a SEA-0400 amúgy ismert és dokumentált gátlóhatása, valamilyen nem kellően tisztázott farmakológiai oknál fogva nem érvényesül humán pitvari miociták NCX áramára. Ez azért is különös, mert egy kiegészítő vizsgálatsorozatban hasonló körülmények között erőteljes SEA-0400 szenzitív NCX áramot regisztráltunk patkány kamrai sejtekben (nem mutatom).

Ezután egy másik megközelítést alkalmaztunk az NCX áram mérésére, amelyet a Hilgemann és mtsai publikáltak először (1992a és 1992b). A módszer lényege, hogy az NCX áramot úgy aktiváljuk, hogy gyorsan megváltoztatjuk az extra és intracelluláris oldatok ion koncentrációját. Szakított („*ruptured patch*”) patch-konfigurációban a membránpotenciált -60 mV-nál rögzítettük. Ennek hatására egy jelentős amplitúdójú reverzibilis *outward* áramot lehetett regisztrálni, amikor az extracelluláris oldat $[\text{Ca}^{2+}]_o$ tartalmát gyorsan 0 mM-ról 1 mM-ra, majd vissza 1 mM-ról 0 mM-ra cseréljük ki (**48A. ábra**). Ezzel a protokollal az NCX áram *reverz* módját aktiváltuk. Tapasztalataink alapján ez a protokoll rutinszerűen működött humán pitvari miocitákban is, és jelentős Ni^{2+} -szenzitív áramot sikerült regisztrálnunk.

Amint az **48B-48C. ábrákon** láthatjuk ezzel a módszerrel vizsgálva a cAF sejtekben regisztrált átlag NCX áram amplitúdója nagyobb volt, mint az SR sejtekben mért NCX áram, és alapvetően nem változott az időfüggő kontroll kísérletekben (IFK mérések). Viszont amint az **48C. ábrán** láthatjuk az NCX kontroll áramot (fekete görbe) ezúttal nemcsak a 10 mM NiCl_2 , hanem a 100 nM SEA-0400 vegyület (kék áramgörbe) is gátolta.

A SEA-0400 NCX gátló hatása koncentráció-függőnek bizonyult (**48D. ábra**), és azt tapasztaltuk, hogy a számított $-\log\text{EC}_{50}$ értékek hasonlóak voltak az SR (6.770 μM) és cAF sejtekben (6.864 μM). Egy külön kísérletsorozatban megállapítottuk, hogy ugyanebben a kísérletes felállásban 10 μM SEA-0400 teljes mértékben gátolta patkány kamrai sejtekben is az NCX áramot.



48. ábra. A NiCl_2 és SEA-0400 hatásai az NCX áramra a Hilgemann protokollal meghatározva. **A. panel.** Az NCX áramot az extracelluláris Ca^{2+} -szintnek 0 mM -ról 1 mM -ra történő 20 másodpercig tartó gyors cseréjével aktiváltuk. A harmadik Ca^{2+} -csere az extracelluláris oldathoz adott 10 mM NiCl_2 jelenlétében történt. Az NCX áram amplitúdóját csúcsáramként határoztuk meg (nyíl jelzi az ábrán). **B. és C. panel.** Az NCX áram gátlása 10 mM NiCl_2 , illetve $10\text{ }\mu\text{M}$ SEA-0400 vegyületek segítségével SR és cAF sejtekben. Mindkét esetben időfüggő (IFK) kontroll méréseket is végeztünk. **D. panel.** A SEA-0400 koncentrációfüggő hatása az NCX áramra. A diagramok a SEA-0400 dózis-hatás görbéit mutatják be SR és cAF sejtekben. Pozitív kontroll kísérletekben igazoltuk a SEA-0400 hatását patkány kamrai miocitákban is. **E. panel.** Az NCX áram amplitúdói SR, cAF és paroxizmális AF betegek szívéből, illetve patkány pitvari és kamrai izolált szívizomsejtekben. Az értékek átlag $\pm$ SEM-ként megadva. Az n számok a sejszám/páciens értéket jelentik.

Az eredményeket összegezve (**48E. ábra**) megállapíthatjuk, hogy a cAF betegekben regisztrált Ni^{2+} -szenzitív NCX áram amplitúdója mintegy 40%-al nagyobb, mint az SR páciensek miocitáiból regisztrált NCX áram. Néhány kísérletben a Hilgemann protokoll segítségével sikerült megmérnünk az NCX áramot paroxizmális pitvarfibrilláló betegekből származó pitvari szívizomsejtekben is. Az eredményeink alapján azt tapasztaltuk, hogy a paroxizmális AF betegekből származó sejtekben az áram amplitúdója hasonló volt, mint az SR páciensekből származó sejtekben regisztrált NCX áramé. Végezetül megvizsgáltuk patkány pitvari és kamrai miociták NCX áramait is, és azt tapasztaltuk, hogy az ezekben regisztrált NCX áram szignifikánsan nagyobb volt, mint a patkány kamrai szívizomsejtekben mért áram (**48E. ábra**).

Megbeszélés

1. témakör. Különböző antiaritmiás szerek celluláris hatásainak vizsgálata emlősszíveken

Különböző I/A antiaritmiás szerek vizsgálata nyúl kamrai szívműködéseken

Mint a Bevezetés és irodalmi áttekintés fejezetben kiemeltém a CAST és SWORD vizsgálatok rávilágítottak arra a tényre, hogy bár az I/C és III-as osztályú szereink (például enkainid, flekainid, d-sotalol) erős antiaritmiás hatással rendelkeznek (sikeresen kivédik a kamrai extrasystolek gyakoriságát akut miokardiális infarktuson átesett betegeknél) sajnos a hirtelen szívhalál gyakorisága mégis magasabb volt az antiaritmiás gyógyszert szedő csoportokban mint a kontroll csoport esetében (The CAST Investigators, 1989; Waldo, 1996). Ennek az oka az antiaritmiás gyógyszer kamrai proaritmiás mellékhatása, amely konkrétan azt jelentette, hogy a nátrium (I/C osztály), illetve kálium csatorna (III osztály) gátló szereink paradox módon effektív antiaritmiás hatásuk mellett sajnos maguk is újabb ritmuszavarok forrása lehetnek. A vizsgálatok kudarcai miatt kezdték tanulmányozni a Vaughan Williams szerinti klasszifikáció többi osztályainak antiaritmiás szereit, azon célból, hogy jobban megértsük a proaritmiás mellékhatások celluláris mechanizmusát, másrészt, hogy ezen információk elősegítsék új proaritmia-mentes antiaritmiás hatások beazonosítását. Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk három ismert, és a CAST/SWORD vizsgálatok előtti klinikai gyakorlatban széleskörűen alkalmazott I/A antiaritmiás szernek, a kinidin (10 μM), a disopyramid (10 μM) és prokainamid (50 μM) elektrofiziológiai hatásait a legfontosabb repolarizáló K^+ -áramokra (I_{to} , I_{K1} , I_{K} és I_{KATP}), izolált kamrai nyúlsejtekben. Az alkalmazott koncentrációk megfelelnek a szerek ismert szabad plazma szint közeli koncentrációknak (Marcus, 1998).

Eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze:

- 1. A disopyramid és a kinidin jelentősen csökkentette, amíg a prokainamid nem változtatta meg az I_{to} áram amplitúdóját (4. táblázat). A disopyramid és a kinidin ezen felül jelentősen felgyorsította az I_{to} áram inaktivációs kinetikáját is.***

Ezek az eredmények megerősítik a mások által már korábban is közölt adatokat, mely szerint mind a disopyramid (Corabeuf, 1988; Virág, 1998), mind a kinidin (Imaizumi, 1987; Salata, 1988) jelentősen gátolja az I_{to} áramot, elsősorban valamilyen rágszáló modellben (például nyúl vagy patkány). A prokainamidot korábban még nem vizsgálták natív I_{to} áramon. Az irodalmat áttekintve csak azt az eredményt találhatjuk, amelyben kimutatták, hogy a prokainamid nem gátolja *Xenopus* oocyta sejtekben expresszált Kv1.4 csatornát

(Rolf, 2000). Ez az eredmény végül is alátámasztja a mi eredményünket is, ugyanis ismert, hogy nyúlshíven az I_{to} áramot elsősorban a lassú kinetikájú Kv1.4 csatorna alkotja (Wickenden, 1999; Wang, 1999). Kimutatták, hogy a nyúlshívben létező I_{to} áram tulajdonsága eltér a kutya-, illetve a patkányszívekben vizsgáltaktól, ahol az I_{to} áramnak elsősorban a Kv4.3 (kutya, Dixon, 1996; Akar, 2004), illetve Kv4.2 (patkány, Dixon, 1994; Yeola, 1997) csatornák a fő alkotóegységei. Ez az észrevétel azt sugalmazza, hogy a prokainamid kevésbé hatékony szer lehet a pitvari aritmiák (például pitvarfibrilláció vagy pitvari flutter) kivédésére vagy kezelésére, mint egyéb I és III osztályú szerek. Geelen és *mtsai* ki is mutatták, hogy a prokainamid kevésbé volt hatékony posztoperatív pitvarfibrillációban mint például az I/C osztályú propafenon (Geelen, 1999). Természetesen el kell ismernünk, hogy a prokainamid továbbra is egy javasolt, és sikeresen alkalmazott antiaritmiás szer a klinikai gyakorlatban a szupraventrikuláris aritmiák kezelésére (Marcus, 1998).

2. *Egyik gyógyszer sem változtatta meg az I_{K1} áramot (3. táblázat).*

Ez az eredmény valamelyest meglepő, és ellentmondásosnak tűnt a vizsgálatok elkészültének idején (1996-98-ban). Számos korábbi vizsgálat eredményeként (Corabeuf, 1982; Salata, 1988; Duan, 1993) ugyanis szinte tankönyvi adattá vált, hogy az I/A szerek hatékonyan gátolják az I_{K1} káliumáramot (Stanton, 1995). A látszólagos diszkrepanciára az egyik lehetséges válasz a következő lehet. Ismert, hogy a patch-clamp technikával regisztrált I_{K1} áram mérésekor egy adott kísérlet alatt sokszor jelentős a patch-clamp pipetta és a sejtek közötti tapadás („*gigaohm seal*”) gyengülése. Ennek következtében jelentősen megnő a soros ellenállás (R_s), aminek következtében a mérések során tipikus jelenség lehet az I_{K1} áram „látszólagos” csökkenése, amelyet egyes kutatók tévedésből a szer okozta gátlásnak („*fals pozitív*” eredmény) tulajdonít(hat)nak. Mi a méréseinkben kiemelt figyelmet fordítottunk a soros ellenállás emelkedésre, és azoknak a kísérleteknek az eredményeit, amelynek során az R_s emelkedés számottevő volt (például $R_s > 10$ MOhm), kizártuk és nem számoltuk be az átlagokba. Eredményeink alapján viszont határozott biztonsággal jelentjük ki, hogy a vizsgált három szer nem változtatja meg az I_{K1} áram tulajdonságait.

3. *Mindhárom gyógyszer jelentősen csökkentette az I_K (1. táblázat) és I_{KATP} (2. táblázat) áramokat.*

Ezek az eredmények megegyeznek korábbi vizsgálatok eredményeivel (Roden, 1988; Coyle, 1992; Carmeliet, 1993), vagyis kijelenthetjük, hogy bár mindhárom szer ismert tipikus I/A osztályú szer, mégis rendelkeznek repolarizáció megnyújtó K^+ -áram gátló

hatással is. Ez azt jelenti, hogy bár ismert, hogy ezen szerek repolarizáció megnyújtó (III osztály jellegű) hatása jellemzően erős antiaritmiás hatással bír, sajnos fokozhatják is ezen szerek proaritmiás hatását (El-Sherif, 1992). Az irodalmat áttekintve megállapíthatjuk, hogy jellemzően mindhárom szer többnyire biztonsággal alkalmazható szívritmuszavarok kezelésére, mert ritkán tapasztalható használatuk esetében proaritmiás mellékhatás (Stanton, 1989). Ennek ellenére több olyan vizsgálatot is találhatunk, ahol mind a kinidin (Moosvi, 1990), mind a prokainamid (Moosvi, 1990), mind a disopyramid (Wald, 1981; Minardo, 1988; Choudhury, 1999) gyógyszerekkel történő kezelés, egyértelműen dokumentált súlyos proaritmiás mellékhatással (*Torsades de Pointes* aritmia, illetve kamrafibrilláció) rendelkezett.

Az I_{KATP} áram szerepe sajnos még nem kellően tisztázott az kamrai akciós potenciál kialakításában. Ismert, hogy az I_{KATP} áram agonistái hozzájárulnak a kamrai repolarizáció és ERP csökkenéséhez, és mint ilyen aritmogén hatásúak lehetnek, ezért gátlói antiaritmiás tulajdonsággal kellene, hogy rendelkezzenek. Ugyanakkor azt is kimutatták, hogy az APD rövidítése akut iszkémiában kardioprotektív hatással rendelkezik (Cole, 1991). Mindez összefoglalva azt jelenti, hogy a vizsgált három szer I_{KATP} gátló hatása szerepének a tisztázása egyelőre ellentmondásos, és további, vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy ezt kellőképpen megérthessük.

Eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy bár a disopyramid, a kinidin és a prokainamid valamennyien a Vaughan Williams klasszifikáció szerinti I/A osztályba sorolt antiaritmiás szerek, a transzmembrán ionáramokra kifejtett celluláris szintű hatásuk eltérő, amely legalábbis részben magyarázatul szolgálhat a szerek klinikai gyakorlatában is tapasztalt eltérő antiaritmiás és proaritmiás jellegű hatásokra.

A dronedaron (SR-33589) elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata kutya kamrai szívízom preparátumokon

A dronedaron (7. ábra) fejlesztése szintén a CAST/SWORD vizsgálatok kudarcoszerű eredménye után kezdődött. A kiinduló pontot az adta, hogy a széles palettájú Vaughan Williams listán gyakorlatilag egyetlen olyan antiaritmiás szer, az amiodaron maradt, amely hatékonyan kivédi a ritmuszavarokat és valóban mentes a súlyos proaritmiás mellékhatásoktól (Hondegheem, 1990; Singh, 1994). Ez az észrevétel indította el az úgynevezett „*amiodaron-szerű*” antiaritmikumok kifejlesztésének sorozatát. Minderre azért volt szükség, mert az amiodaron viszont jelentős extrakardiális mellékhatással rendelkezik,

amely sajnos súlyosan korlátozza a szer krónikus, akár több éven tartó alkalmazását (Harris, 1983). Az amiodaron jellemzően tüdőfibrozist, illetve a jód molekula miatt hipertireozist (Kennedy, 1990; Newman, 1998) okozhat.

A fenti két állítás magában hordozta a fejlesztés irányát, vagyis azt, hogy készítsünk egy jódmentes amiodaront. Ez volt kiinduló pont a dronedaron kifejlesztésénél. A kísérletes munka nemzetközi ko-operációban készült a Sanofi-Aventis Gyógyszergyár innovatív gyógyszerfejlesztési részlegének munkatársaival. A dronedaron (SR-33589) mentes a jódmolekulától, és a dofetilidhez (klasszikus III osztályú szer) hasonlóan tartalmaz egy methaneszulfonamid molekulát. A jódatomok eltávolításától a szervtoxicitás megszűnését remélték, a methaneszulfonamid csoport hozzáadásával pedig a gyógyszermolekula lipofiliáját mérsékelték (Fazekas, 2008; Hilleman, 2009). Kísérleteink során az amiodaronnal összehasonlítva megvizsgáltuk a jódmentes amiodaron kongéner vegyület dronedaron vegyület akut és krónikus hatását *in vivo* és *in vitro* körülményekben éber kutya modellben, illetve kutya Purkinje rostokban, papilláris izomban és izolált kamrai szívizomsejtekben.

Eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze:

1. ***A dronedaron -az amiodarontól eltérően- krónikusan alkalmazva nem nyújtotta meg jelentősen a kutya kamrai akciós potenciált (5. és 6. táblázat, 8. ábra). Az akut dronedaron kezelés viszont már az amiodaronhoz hasonló módon mérsékeltén rövidítette a Purkinje rostok, illetve mérsékeltén nyújtotta a papilláris izom repolarizációját (7. táblázat). Az akutan alkalmazott dronedaron csekély mértékben csökkentette a gyors Na^+ -áramként definiálható $V_{\max}$ értéket.***

A jelen vizsgálatban közölt akut és krónikus amiodaron eredmények visszaigazolták más csoportok korábbi eredményeit (Mason, 1984; Kato, 1988; Anderson, 1989; Sicouri, 1997). A dronedaron vegyülettel végzett krónikus eredmények is visszaigazolták más csoportok eredményeit, mely szerint a krónikus dronedaron nem változtatja meg a jelentősen a kamrai repolarizációt jellemző QTc paramétert (Barthelemy 1998a és 1998b; Finance, 1998). Eredményeink viszont jelentősen eltértek egy korábbi kutatócsoport eredményeitől, akik azt közölték, hogy a krónikus dronedaron markánsabb repolarizáció megnyújtó hatással rendelkezik, mint maga az amiodaron (Sun, 1999). A kísérletes eredményeik alapján ezért, konkrétan azt a hipotézist vetették fel, hogy tulajdonképpen nincs is szükség a jód molekula jelenlétére az amiodaronra jellemző elektrofiziológiai hatások elérésére (Sun, 1999). Ez a feltevés azért is volt fontos, mert közismerten a jód molekula jelenlétét tartják a felelősnek a krónikus amiodaron kezelésre jellemző

extrakardiális mellékhatásokért, mint amilyen például a hipertireozis (Newman, 1998) is. Mindenesetre ki kell emelnünk, hogy a saját és Sun által (1999) közölt adatok közötti diszkrepancia ellenére (amelyre nem tudtunk kielégítő magyarázatot adni), a mi *in vitro* (APD) és *in vivo* (QTc) adataink támogatják és kiegészítik egymást, illetve jelentősen megerősítik az előbb már idézett többi csoport *in vivo* EKG méréseken alapuló adatait is, amelyeket szintén kutyában közöltek (Barthelemy 1998a és 1998b; Finance, 1998).

Az a tény, hogy a krónikusan alkalmazott dronedaron nem nyújtotta meg az APD/QTc paramétereket fontos és érdekes eredmény. Meg kell említenünk természetesen, hogy amint a **8A. ábrán** is látszik, 1000 ms-nál hosszabb ciklushosszaknál (1 Hz-nél lassúbb frekvenciák) a dronedaron valamelyest megnyújtotta az APD intervallumot, de ez a megnyúlás eltűnt a fiziológiás, vagy 1 Hz-nél magasabb frekvenciáknál. Ez az észrevétel összhangban van az éber kutya EKG mérésekkel is, ahol szintén nem tapasztaltunk QTc megnyúlást, különösen nem a spontán kutya ciklushossz értékénél, amely mintegy 600-650 ms volt (**5. táblázat**).

2. Az akutan alkalmazott dronedaron jelentősen gátolta az I_{Ca} és I_{Kr} áramokat (10. ábra), de nem változtatta meg a többi repolarizáló áramot (I_{to} , I_{K1} és I_{Ks} áramok) (11. ábra).

Ki kell emelnünk, hogy ha ezen jelentős I_{Kr} gátló hatás eredményeket figyelembe vesszük, akkor akár jelentősebb APD₉₀ megnyúló hatás is várható lett volna. Nem is tudunk pontos választ adni, hogy miért is okozott a dronedaron ilyen mérsékelt APD megnyújtó hatást, legfeljebb csak feltételezzük, hogy a dronedaron az amiodaronhoz hasonlóan viselkedik (Varró, 1985; Nishimura, 1989; Kodama, 1993; Varró, 1996). Ezért a dronedaron mérsékelt V_{max} (I_{Na} gátló) és markáns kalciumáram gátló (I_{Ca}) hatása (azaz az „inward” áramokra kifejtett hatása), kiegyenlítheti az I_{Kr} gátlás (azaz az „outward” áramokra kifejtett hatása) okozta APD megnyújtást.

3. Az akut dronedaron alkalmazás jelentősen csökkentette mindkét triggerelt aritmogén automácia típust (EAD és DAD) (9. ábra).

A dronedaron okozta nátrium csatorna gátló hatás is gyengébb volt, mint amelyet amiodaron alkalmazása esetén regisztráltunk (**7. táblázat**), de ennek kedvező hatásai is lehetnek, például az, hogy csekélyebb „CAST típusú” (azaz nátrium csatorna gátló) proaritmiás hatással rendelkezik. Másrészt a dronedaron az amiodaronhoz hasonlóan, de a klasszikus tiszta I_{Kr} gátló d-sotaloltól eltérően (Hohnloser, 1994), szintén csökkenteni képes a papilláris izmok és Purkinje rostok közötti repolarizáció diszperziót, amely ezáltal csökkentheti az aritmogén kockázatot. Ki kell emelnünk azt is, hogy a dronedaron

indukálta EAD és DAD csökkentő hatásokat is elsősorban a szer I_{Na} és I_{Ca} gátló tulajdonságaival magyarázzuk.

Kísérleteink alapján azt a következtetést vonjuk le, hogy az akutan alkalmazott dronedaron hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint az amiodaron, ami magyarázhatja a gyógyszer *in vivo* hatásait. Ugyanakkor a szer, az amiodarontól eltérően, krónikusan alkalmazva nem okozott jelentős elektrofiziológiai változásokat, konkrétan fogalmazva nem rendelkezik a krónikus amiodaron kezelésre jellemző ismert markáns antiaritmiás hatással. Eredményeink azt sugalmazzák, hogy a jód molekula hiánya okozza a krónikusan alkalmazott dronedaron és amiodaron hatások közötti eltéréseket.

A tedisamil (KC-8857) elektrofiziológiai hatásainak vizsgálata emlősszívekből izolált kamrai szívizomsejteken

A tedisamil (**12. ábra**) a vizsgálat elkészítésének idejében (1999-2001) egy ígéretes kísérletes antiaritmiás gyógyszerjelölt szernek bizonyult (Friedrichs, 1996; Fischbach, 2001). Számos korábbi vizsgálat megerősítette, hogy a szer megnyújtja a kamrai akciós potenciál időtartamát (APD) és a QT intervallumot (Oexle 1987; Beatch 1991; Adaikan, 1992), amely hatás háttérében a szernek különböző transzmembrán ionáramokra (I_{Na} , I_{to} , I_{KATP}) kifejtett hatása állhat (Dukes, 1989 és 1990; Faivre, 1992; Németh, 1997). Ez a tanulmány volt viszont az első olyan kísérlet-sorozat, amelyben szisztematikusan megvizsgálták, hogy mi lehet a tedisamil repolarizáció megnyújtó hatásának a celluláris szintű mechanizmusa. Ezért megvizsgáltuk a tedisamil hatását a legfontosabb transzmembrán ionáramokra (I_{Na} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to} , I_{KATP} , I_{K1} és I_{Ca} áramok).

Eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze:

- 1. A tedisamil nyúl szív kamrai miocitákban jelentősen csökkentette az I_{to} áram amplitúdóját. Az I_{to} áram amplitúdójának csökkenése mellett jelentősen felgyorsította az I_{to} -áram inaktivációs kinetikáját is (14A. ábra, jobb oldali mező). Ezzel szemben a tedisamil kutya kamrai miocitákban még a magasnak tekinthető 10 μM koncentrációban sem gátolta az I_{to} áramot (14A. ábra, bal oldali mező).***

Az I_{to} áram egy jelentős repolarizáló áram a pitvari szövetben (lásd **35. ábra**), ezért a I_{to} csatorna gátlása elméletben szerepet játszhat egy adott szer pitvarfibrilláció elleni antiaritmiás hatásában. Az I_{to} áram pitvari szívizomsejtekben elsősorban a fázis 1 repolarizációban („notch” kialakulása, **1. ábra**) játszik szerepet, de sajátos inaktivációs kinetikája miatt (rendelkezik egy 100-200 ms közötti lassú időállandójú inaktivációs

kinetikával is, **11. táblázat**), természetesen jelentős szerepet játszhat a késői fázis 3 repolarizációban is. Az I_{to} áram jelentős species variabilitást mutat, ugyanis jelen van patkányban, kutyában, nyúlban és természetesen emberben is (Giles, 1988; Ravens, 1997; Virág 1998), de például hiányzik a tengerimalac kamrai szövetben (Josephson, 1984). Az a tény, hogy a tedisamil nem gátolta a kutya I_{to} áramot váratlan és meglepő eredmény volt, mert korábbi patkány (Beatch, 1991; 1989 és 1990;) és humán (Ravens, 1997; Wettwer, 1998) kísérletek adatai alapján a köztudatban a tedisamil hatékony I_{to} gátlószernek volt számon tartva. A látszólagos diszkrepanciára az szolgálhat magyarázatul, hogy a kutyában az I_{to} áram elsősorban Kv4.3 csatornából áll (Dixon, 1996; Akar, 2004), amíg a patkányban Kv4.2 csatorna a fő I_{to} áram alkotó alegység (Dixon, 1994; Yeola, 1997). A helyzetet tovább bonyolítja, hogy a tedisamil hatékonyan gátolja a humán I_{to} áramot (Ravens, 1997, Wettwer, 1998), és ismert, hogy a humán kamrai szövetben viszont a kutyához hasonlóan szintén a Kv4.3 a I_{to} áram fő alkotóalegysége (Akar, 2004). Erre csak az szolgálhat magyarázatul, hogy a tedisamilt ezekben a tanulmányokban szívelégtelen explantált emberi szívekből származó szívműködősejtekben vizsgálták meg, ahol viszont ismert, hogy az I_{to} áram tulajdonsága megváltozhat, például jelentősen downregulálódik a Kv4.3 alegység expressziója mind mRNS, mind fehérje szinten (Kääh, 1998). Nyúlszíven viszont főleg a Kv1.4 csatorna az I_{to} áram legfontosabb alkotó α -alegysége (Wickenden, 1999; Wang, 1999), ezért az eredményezett áramnak jelentősen más lehet a gyógyszerérzékenysége is, ami magyarázatul szolgálhat, hogy kísérleteinkben miért gátolta jelentősen a tedisamil már 1 μ M koncentrációban is az I_{to} áramot (**14A. ábra, jobb oldali panel**).

2. ***A tedisamil jelentősen gátolta a késői egyenirányító káliumáram mindkét komponensét az I_{Kr} és I_{Ks} áramot is (13. ábra).***

Ezek az eredmények magyarázatul szolgálhatnak a szer erős III-as osztályú antiaritmiás/antifibrilláns hatására (Fischbach 1999, 2001), és úgy véljük természetesen, hogy ezen belül is elsősorban az I_{Kr} gátló tulajdonsága rendelkezik a legjelentősebb hatással. Ezzel párhuzamosan a tedisamil nem befolyásolta a befelé egyenirányító kálium áramot és a kalcium áramot (**14B-14C. ábrák**).

3. ***A tedisamil jelentősen gátolta a cromakalimmal aktivált I_{KATP} áramot (14D. ábra).***

Természetesen most is ki kell emelni, mint ahogy korábban az I/A osztályú antiaritmiás szerek celluláris hatásait bemutató fejezetnél már említettem, hogy még nem kellően tisztázott az I_{KATP} áramnak a szerepe a kamrai akciós potenciál kialakításában,

ezért az sem tisztázott, hogy a szernek a gátló vagy az aktiváló sajátossága rendelkezik pozitív hatással a kamrai aritmiák kivédésében (Cole, 1991).

4. Végezetül kimutattuk, hogy a tedisamil hatékonyan gátolja a nátrium áramot, amelyet az AP depolarizáció maximális sebességként (V_{max}) vizsgáltunk (15. ábra).

A tedisamil lassú offset kinetikával gátolja a gyors nátrium áramot (15B. ábra). A gátlóhatás alapján megállapítható, hogy a tedisamil kinetikai hatása valahol a lassú kinidin, illetve a gyors lidokain hatások közzé tehető (Sheets, 1988). A tedisamil Na^+ -csatorna gátló hatása természetesen csökkentheti a repolarizáció diszperzióját és az EAD-ok kialakulásának incidenciáját, amely így akár kiegyenlítheti vagy mérsékelheti a szer I_{Kr} gátló hatásából származó lehetséges torzadogén proaritmias hatását is.

Eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a tedisamil komplex I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kur} , I_{to} , I_{KATP} sőt I_{Na} gátló hatással rendelkező vegyület. Ezen komplex „multichannel” gátló hatásnak eredményeképpen a vegyület kombinált III+IA/B szerű antiaritmias hatással rendelkezik. Nem mutattuk, de az irodalomból ismert, hogy a tedisamil az fentiekén kívül rendelkezik még a pitvarspecifikus I_{Kur} áram gátló (Riera, 2008) és PKA aktiválta klorid-csatorna gátló hatással (Faivre, 1998) is. Mindezeket figyelembe véve feltételezhetjük, hogy a tedisamil különösen a pitvari aritmiák kezelésére kifejlesztett gyógyszerjelöltként lehet eredményes.

Az amiodaronszerű GYKI-16638 vizsgálata emberi szívizom preparátumokon

Kísérleteink célja a GYKI-16638 vegyület (16. ábra) elektrofiziológiai hatásainak a vizsgálata volt egészséges humán kamrai preparátumokon. Mivel a GYKI-16638 tervezésekor a kiinduló szempont az volt, hogy a vegyület rendelkezzen III+I/B kevert hatással, ezért összehasonlítottuk a GYKI-16638 kísérletes vegyület elektrofiziológiai hatásait a sotalol és mexiletin antiaritmias gyógyszerekével.

Eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze:

1. A GYKI-16638 a sotaloltól eltérően frekvenciafüggetlen módon nyújtotta meg a kamrai repolarizációt egészséges humán donorszívekből származó kamrai preparátumokon (17A. ábra). Ezzel párhuzamosan a GYKI-16638 a mexiletinhez hasonlóan csak a normálisnál magasabb frekvenciákon (vagyis „use dependens” módon) gátolta a nátrium áramnak megfelelő V_{max} paramétert (17B. ábra).

A vegyület tervezésekor az egyik cél az volt, hogy a szer hasonlítson a sotalol és a mexiletin vegyületek struktúrájához, de térjen el a multichannel gátló amiodaron

szerkezetétől. A sotalolról ismert, hogy tiszta III-as osztályú antiaritmiás szer (Singh, 1970b), amely reverz frekvenciafüggő módon nyújtja meg az APD-t de nem változtatja meg a $V_{\max}$ paramétert (Strauss, 1970). Ezzel szemben a mexiletin klasszikus I/B osztályú antiaritmikum (Campbell, 1983a), amely nem, vagy csak mérsékelten változtatja meg az APD-t, viszont gyors visszatérési kinetikával gátolja a $V_{\max}$ paramétert (Campbell, 1983b). Korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy a III+IB kombinált (sotalol+mexiletin kombinált alkalmazása) gátlóhatás mérsékelte a sotalolra jellemző fordított frekvenciafüggő megnyúlást, és kivédte az EAD-ok kialakulásának incidenciáját (Varró, 1990).

2. A GYKI-16638 amiodaron-szerű hatással rendelkezik.

Mint a fejezet elején már részleteztük az amiodaron komplex *multichannel*-gátló antiaritmiás hatással rendelkezik. Számos multicentrikus klinikai vizsgálat igazolja, hogy az amiodaron hatékony antiaritmiás hatású szer, és alkalmazása javítja a mortalitási adatokat is (The CASCADE investigators, 1993). Mindezek mellett, azt is igazolták, hogy amiodaron kezelés proaritmiamentes, amelynek eredményeképpen a legtöbb szívritmuszavaros kórképben ma is az amiodaron az elsőnek javasolt és választott antiaritmiás gyógyszer (Lazzara, 1989). Bár hivatalosan a Vaughan Williams klasszifikáció szerint az amiodaron III-as osztályú antiaritmiás szer (Papp, 1996) igazolták, hogy egyéb hatások mellett (például IV-es osztályú kalcium csatorna gátló hatás; Varró, 1996), tipikus I/B osztályú hatással is rendelkezik (Varró, 1985). Az előbb említett benignus antiaritmiás hatásokat ennek a kivételes komplex celluláris elektrofiziológiai tulajdonságoknak tulajdonítják (Fazekas 2008). Az amiodaron gyors *offset* kinetikájú $V_{\max}$ gátló tulajdonsággal rendelkezik (Mason, 1984; Varró, 1985; Papp, 1996). Ugyanakkor a krónikus amiodaron kezelés frekvencia-független repolarizáció megnyújtó hatásának bizonyult (Papp, 1996), valamint csökkentette az I_{Kr} áramot nyúlón (Varró, 1996). Fontos kiemelni, hogy mind az akut, mind a krónikus amiodaron alkalmazás gátolta a korai utópotenciálok kialakulását kutya Purkinje rostokban (Papp, 1996) és M sejtekben is (Sicouri, 1997). Ez utóbbi hatást a lassan inaktiválódó úgynevezett „window” nátrium áram (újabban „late” vagyis késői nátrium áramnak neveznek, I_{NaL}) gátló hatásával magyarázták, amely vélhetően képes mérsékelni a tiszta I_{Kr} gátlókra jellemző hatás torzadogén aktivitását (Attwel, 1979).

Fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy a GYKI-16638 vegyület hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint az amiodaron, de szerkezete eltér attól, és mint ilyen

valóban egy új ígéretes „amiodaron-szerű” kísérletes szer, amely az eddigi preklinikai jellegű vizsgálatok alapján egy javaslandó új antiaritmiás gyógyszerjelölt.

2. témakör. A szívizom repolarizációjában részt vevő különböző K^+ -csatornák kölcsönhatásának vizsgálata. A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége emlős kamraizmon

A repolarizációs tartalék fogalma és jelentősége a kamrai aritmogenezisben

Kísérleteink célja az volt, hogy további vizsgálatokkal meghatározzuk a repolarizációs tartalék lehetséges szerepét és az egyes káliumáramok egymás közötti kölcsönhatását kamrai szívizom repolarizációja során. Kísérleteinkben megvizsgáltuk az I_{Ks} , I_{K1} és I_{to} áramok szelektív gátlásának hatásait kutya, illetve egészséges emberi kamrai APD-re miután a repolarizációs tartalékot szelektív I_{Kr} gátlással, illetve a szimpatikus stimuláció fokozással előzetesen legyengítettük.

Eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze:

- 1. A munkánk legfontosabb megállapítása az, hogy a kamrai repolarizációban nemcsak a jelen vizsgálat előtt is fő repolarizáló káliumáramnak tartott I_{Kr} , hanem az I_{K1} és az I_{to} áramok is jelentős szerepet játszhatnak. Az I_{Ks} a korábbi elképzelésekkel ellentétesen csak kismértékben aktiválódik a normál fiziológiás akciós potenciál feszültségtartományban. Kimutattuk azt is, hogy az I_{Ks} és I_{K1} gátlása előzetes I_{Kr} blokkolás jelenlétében jelentősen megnöveli a fordított frekvenciafüggő repolarizáció megnyúlást (18., 19. és 23. ábrák).***

Tankönyvi adatok alapján a repolarizáció (az AP 3. fázisa, **1. ábra**) szakaszát elsősorban K^+ -áramok határozzák meg. A legfontosabb repolarizáló K^+ -áramnak a késői egyenirányító K^+ -áram gyors komponensét (I_{Kr}) tartják (Sanguinetti, 1990). Jelen vizsgálatig úgy tartották, hogy a késői egyenirányító K^+ -áram lassú komponense (I_{Ks}) is fontos repolarizáló K^+ -áram (Bosch, 1998; Schreieck, 1997, Gerlach, 2001). Szintén tankönyvi ismeretek alapján a tranziens kifelé haladó K^+ -áram elsősorban a korai fázis 1 repolarizációért (Corabeuf, 1982), a befelé egyenirányító K^+ -áram (I_{K1}) pedig a szívizomsejtek membránpotenciáljának helyreállításáért felelősek (Shimoni, 1992; Lopatin, 1994; Anumonwo, 2010). Jól látható, hogy valóban az E-4031-szenzitív áramként definiált I_{Kr} (zöld görbe) a legjelentősebb áram az AP -40 mV-os membránpotenciálhoz (szaggatott vonal jelzi a **18A. ábrán**) kapcsolható repolarizációs időtartományban. Az L-735,821 szenzitív áramként azonosított I_{Ks} áram (kék színű áram)

a teljes AP időtartam alatt alacsony, amplitúdója gyakorlatilag végig kevesebb, mint 10 pA.

A BaCl₂-szenzitív áramként azonosított I_{K1} áram valóban az AP alsó negatív tartományban a legerősebb, de amint a **18A. ábrán** is látható (piros színű áramgörbe) az áram már korábban a fázis 3 repolarizáció alatt is jelentős mértékű. És végül a magas koncentrációjú (100 μM) chromanol 293B-szenzitív áramként meghatározott I_{to}-áram (narancs színű áramgörbe) is jelentős mennyiségű K⁺-töltést transzportál az AP repolarizációs tartományában. Mindez azt jelenti, hogy a repolarizációt nemcsak az I_{Kr}, hanem mindenképpen az I_{K1} és I_{to} csatornák is szabályozzák.

Az I_{Ks} áramnak viszont más lehet a szerepe. Ennek tisztázására vizsgáltuk meg, hogy miként változtatja meg az I_{Ks} áram szelektív gátlása a kamrai akciós potenciált. Kísérleteinkben 10 μM chromanol 293B, 100 nM L-735821 vagy 1 μM HMR-1556-ot használtunk az I_{Ks} szelektív gátlására. A jelen kísérleteinkben nyert eredményeink jól összeegyeztethetők korábbi megfigyeléseinkkel, amelyeket kutya kamrai sejtekben végeztünk (Varró, 2000). Ezek szerint az I_{Ks} gátlók (10 μM alacsony koncentrációjú chromanol 293B vagy HMR-1556) önmagukban alkalmazva csak kismértékben növelik meg az APD-t kutya és emberi kamrai papilláris izmon (**18. ábra és 20A. ábrák**), amikor azonban előzetes dofetilid (**19A. ábra**), illetve dofetilid+adrenalin előzetes alkalmazása miatt az APD már megnyúlt állapotban volt, az I_{Ks} gátlószer HMR-1556 jelentős további APD megnyúlást eredményezett (**23. ábra**). A jelenséget az I_{Ks} áram kinetikai tulajdonságaival magyarázhatjuk. A hosszú APD-nek megfelelően, a lassú aktivációs kinetikával rendelkező I_{Ks} áramnak (τ az aktivációs időállandó kutyában mintegy 1000 ms, illetve emberben mintegy 800 ms; Varró, 2000; Virág, 2001) több ideje van aktiválódni, ezért képes jelentősebb mértékben hozzájárulni a repolarizációhoz. Megfigyeléseink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az I_{Ks} áram egy negatív visszacsatoló („*feedback*”) védekező mechanizmusként az APD túlzott megnyúlásának fontos limitáló tényezője lehet, amikor az akciós potenciál egyéb mechanizmusok miatt túlzott mértékben megnyúlik. Az eddigiek alapján érthető, hogy az I_{Ks}-áram a repolarizációs rezerv fontos szereplője („*key player*”), hiszen akkor válik jelentőssé a szerepe, ha normális körülményektől eltérő változások következnek be.

A **1. ábrán** feltüntetett többi K⁺-áram is fontos része a repolarizációs rezervnek, hiszen ezeknek mérsékelt gátlása szintén nem jár feltétlenül számottevő repolarizáció megnyúlással, de egy másik típusú repolarizáló ioncsatorna további gátlása a repolarizáció megnyújtó hatását fokozni fogja. Így kutya kamrai preparátumokban

igazoltuk, hogy bár az I_{K1} gátlás statisztikailag szignifikáns mértékben fordított frekvenciafüggő módon nyújtotta meg az APD-t (**18. ábra**), de ez a megnyúlás önmagában sosem volt olyan mértékű, hogy EAD-ot okozzon. Viszont amikor az I_{K1} gátlószer $BaCl_2$ -ot olyan preparátumon alkalmaztuk, amelyen a repolarizációs tartalékot előzetesen dofetiliddel gyengítettük, a kombinált gátlóhatás már olyan mértékű reverz frekvenciafüggő megnyúlást okozott (**19B. ábra**), hogy több esetben is korai utódepolarizációt is regisztráltunk (**19C. ábra**). Mint a **18A. ábrán** látható, szintén kutya kamrai szívizomsejteken kimutattuk, hogy az akciós potenciál időtartama alatt az I_{to} áram is rendelkezik egy repolarizáló komponenssel is. Bár a jelen értekezésnek nem tárgya, de munkacsoportunk megvizsgálta az I_{to} szerepét is kutya kamrai szívizomban (Virág, 2011). Kimutattuk, hogy az I_{to} áram gátlása eredményeképpen az APD megnyúlik, de ezúttal sem oly mértékű, hogy önmagában aritmiákat okozzon. Azonban amikor az I_{to} gátlószer olyan preparátumon alkalmaztuk, ahol a repolarizációs tartalékot előzetesen I_{Kr} gátlással legyengítettük, az additív I_{to} gátlás már oly mértékben megnyújtotta az APD-t, hogy többször is EAD-ot regisztráltunk (Virág, 2011).

Más szóval a kombinált káliumcsatorna gátlás nem lineáris, hanem additív jellegű. Általánosságban állítható, hogy a szívizom repolarizációja egy erőteljesen túlbiztosított folyamat megfelelő tartalékokkal. Ezt a tartalékot nevezte Roden repolarizációs rezervnek (1998, 2005), amelynek csökkenése anélkül vezethet a proaritmiás kockázat növekedéséhez, hogy ennek könnyen észlelhető szívelektrofiziológiai (például QT/QTc intervallum megnyúlás az EKG felvételen) megnyilvánulásai lennének.

Fentieket így összegezzük: ***Jelen munkánk során kiterjesztettük korábbi megfigyelésünket, és megállapítottuk, hogy bármely káliumcsatorna kombináció egyidejű gátlása nagymértékben csökkentheti a kamrai szívizom repolarizációs képességét.*** Ezen és más későbbi kísérletes eredmények ismeretében 2006-ban Roden már egyértelműen fogalmazhatta meg azt, hogy mit is értünk a repolarizációs rezerv fogalmán (Roden, 2006):

„A repolarizációs rezerv koncepciója azt az egységes szemléletet foglalja magában, amely alapján elemezni lehet az aritmogén tényezőket és ezek klinikailag is értelmezhető mechanizmusait. Feltételezhetően a normális/egészséges szív többszörösen biztosított, egymást kiegészítő módon hozza létre a repolarizációját. Ennek következtében egyetlen, a repolarizációt elősegítő tényező kiesése, vagy sérülése nem szükségszerűen eredményez markáns hosszú QT fenotípust akár gyógyszeres, akár a kongenitális eredetre gondolhatunk”.

Vos és mtsai kifejlesztettek egy kísérletes *Torsades de Pointes* (TdP) aritmia modellt kutyákon, amelyben a teljes krónikus AV blokk előidézése után azt találták, hogy az I_{Ks} és az I_{Kr} áramok expressziója csökken, mintegy alulszabályozódik („downregulation”) (Vos, 1995; Volders, 1999). Ezeknél az állatoknál hosszú QTc és monomorf APD megnyúlás jelentkezett és megnőtt a TdP típusú kamrai aritmia kialakulásának az esélye a Vaughan Williams féle III-as osztályba tartozó antiaritmiás gyógyszer alkalmazását követően (Verduyn, 1997). Az is köztudott, hogy a különböző káliumcsatornák szívelégtelenségben is *downregulálódnak*, ami APD megnyúlást eredményez és növeli a proaritmiás kockázatot (Kääh, 1996).

2. *A jelen kísérleteknek fontos terápiás és gyakorlati vonatkozása is lehet. Ezen eredményekre alapozva nyilvánvalónak tűnik, hogy azokban az esetekben, amelyekben a repolarizációs tartalék csökkent, a K^+ -csatornák további, de egyébként kismértékű funkció-kiesése túlzott repolarizációs megnyúláshoz, és bizonyos körülmények között TdP kamrai aritmia kifejlődéséhez vezethet.*

Kimutatták, hogy az örökletes hosszú QT szindróma néhány formájában, mint például az LQT1 és LQT2 (Roden, 1996), a funkcionális káliumcsatorna fehérjék hiánya vagy denzitásuk esetleges csökkenése ellenére sem észlelhető minden esetben kifejezett vagy egyáltalán manifesztálódó QTc megnyúlás (Priori, 1998; Swan, 1998). Ezek a betegek azonban nagyon fogékonyak lehetnek azokra a gyógyszerekre, melyek tovább gyengítik a különböző káliumcsatornák funkcióját, ezért esetükben egy más betegnél még ártalmatlannak bizonyuló káliumcsatorna gátlással is rendelkező akár nem kardioaktív gyógyszer (például számos neuroleptikum, vízhajtó, antibiotikum, stb.) túlzott mértékű váratlan APD megnyúlás jelentkezhet, mely gyakran TdP típusú kamrai tachycardiához vezethet. Ez a megfigyelés jelentős mértékben támogatja a „repolarizációs tartalék” elméletét, mely szerint a különböző káliumcsatornák képesek helyettesíteni egymást, hogy biztosítsák a repolarizáció folyamatát (Roden, 1998, 2005).

Ezért, a kórházi felvételben részesülő megfelelő betegekben a III-as osztályú antiaritmiás szerre adott választ gondosan tesztelni kellene, és csak azon betegek számára lenne engedélyezhető a tartós otthoni gyógyszeres kezelés, akiknek ezekre a szerekre adott QTc megnyújtó válasza a még elfogadható tartományba esik.

3. *Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy talán át kellene értékelni a gyógyszerek QTc megnyújtást okozó hatásával kapcsolatos gyógyszerbiztonsági koncepcióinkat.*

A legtöbb rutin jellegű biztonság-farmakológiai vizsgálatot transzgenikus ioncsatorna (hERG sejtvonalak) rendszereken, vagy olyan *in vitro* és *in vivo* tesztekben, normál

fiziológiás preparátumokon végzik, amelyekben a repolarizációs tartalék érintetlen. Egyes tesztekben a szívfrekvencia is gyors, s így a fordított frekvencia-függés miatt az APD megnyúlás nem jelentkezik. Ilyen körülmények között a lehetséges proaritmias veszély alulbecsült mind a szívre, mind a nem szívre ható gyógyszerek esetében, mert a gyógyszerek fiziológiás körülmények között nem feltétlenül okoznak szignifikáns APD megnyúlást, ellentétben azokkal a betegekkel, akiknél a repolarizációs tartalék sérült, s így a túlzott APD megnyúlás és következményes *TdP* típusú aritmia kockázata jelentősen nagyobb. Ezért a preklinikai gyógyszerbiztonsági szűrésnek ki kellene terjednie olyan preparátumok vizsgálatára is, melyekben a repolarizációs tartalék gyengített. Az egyik ilyen javasolt modell az, amelyben a különböző szereknek nemcsak közvetlenül a *hERG* áramra, hanem a QT rövid távú variabilitásra kifejtett hatását is vizsgálni lehet. Ez a módszer alkalmas modellnek tűnik a különböző szerek repolarizációs tartalékot gyengítő hatásának vizsgálatára (Thomsen, 2004; Varró, 2006 és 2011; Lengyel, 2007).

Mindent összevetve a következő következtetéseket lehet levonni. Kutya, illetve emberi kamrai szívizmon egyféle típusú kálium csatorna gátlása önmagában extrém APD megnyúlást nem eredményez. Ez valószínűleg annak a következménye, hogy a különböző kálium csatornák képesek helyettesíteni és/vagy kiegészíteni egymás működését. A kutya és humán kamrai szívizomsejtek repolarizációja túlbiztosított, vagyis erős „repolarizációs tartalékkal” rendelkeznek. Amikor ez a repolarizációs tartalék valamilyen oknál fogva sérül (gyógyszerhatás, szívbetegség okozta remodelling, fokozott szimpatikus aktivitás, genetikai rendellenesség, stb.) az egyébként csekély vagy mérsékelt additív kálium csatorna gátlás is okozhat erőteljes és potenciálisan proaritmias kamrai akciós potenciál megnyúlást. Ezért az olyan gyógyszerek alkalmazása, amelyek egyszerre több kálium csatornát is gátolnak, feltehetően veszélyesebb lehet, mint egyetlen adott specifikus kálium csatornát gátló szer használata. A gyógyszerek lehetséges QT intervallum növelő hatásának vizsgálatára vonatkozó tesztek érdekesnek tűnik átértékelni, és a különböző tesztek nemcsak érintetlen, hanem gyengített repolarizációs tartalékú preparátumokon is el kellene végezni.

Az R-L3 vegyület optikai enantiomerjei eltérő módon modulálják az I_{Ks} áramot nyúl kamrai szívizomzatban

A vizsgálatok célja egy I_{Ks} aktivátor vegyületnek a fejlesztése és beazonosítása és antiaritmias szerként történő hasznosítása, amelynek ötlete szintén a már említett Sanguinetti és Jurkiewicz által megfogalmazott hipotézisnek (Jurkiewicz, 1993) és a repolarizációs

rezerv fogalomnak (Roden, 1998) egyik logikus következménye. Előzetes kísérletes eredmények következtében felmerült az a gondolat, hogy egy RL-3 nevű vegyület két optikai enantiomerje ellenkező hatással modulálhatja az I_{Ks} áramot konkrétan a jobbra forgató *d*-enantiomer aktiválja, amíg az *l*-enantiomer inkább gátolja az I_{Ks} -áramot (Nissen 2009). Ezért a kémiai partnerünk segítségével két vegyületet szintetizáltunk, az ZS_1270B (jobbra forgató) és a ZS_1271B (balra forgató) vegyületeket (**24. ábra**) amelyek enantiomerjei a racém R-L3 vegyületnek, és megvizsgáltuk a hatásukat az I_{Ks} áramra és kamrai akciós potenciálra nyúl és tengerimalac kamrai preparátumokon.

Eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze:

1. Az RL-3 racém vegyület két optikai enantiomerje valóban ellentétes hatással modulálja az I_{Ks} -áramot.

A jobbra forgató ZS_1270B vegyület 1 μ M koncentrációban alkalmazva az I_{Ks} áram hatékony aktivátora, míg a balra forgató enantiomer ZS_1271B pedig hasonló koncentrációban gátolja az I_{Ks} áramot (**25A-25B. ábrák**). Az az észrevétel, hogy egy racém vegyület két optikai enantiomerje eltérő módon képes modulálni egy csatorna receptort (vagyis az egyik enantiomer aktivátora, a másik enantiomer pedig gátolja ugyanannak a csatornának) meglehetősen szokatlan, bár nem ismeretlen jelenség. Például ismert, hogy a dihydropyridin származék 202-791 [isopropyl 4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-3-pyridinecarboxylate] sztereo-izomérjei eltérő módon hatottak a nyúl aorta gyűrűk kontrakciójára. A jobbra forgató izomér gátolta, amíg a balra forgató enantiomer pedig fokozta az aorta gyűrűk kontrakciós képességeit (Hof, 1985). De más hasonló példákat is találhattunk az irodalomban (Gonzales, 1983; Zittoun, 1991; Caillet, 2012).

2. A jobbra forgató és I_{Ks} -áram aktiváló enantiomer vegyület (ZS_1270B) rövidítette, amíg a balra forgató és I_{Ks} -áram gátló enantiomer vegyület (ZS_1271B) pedig megnyújtotta a tengerimalac akciós potenciál időtartamot (25C. ábra, 9. táblázat).

Kiemelendő, hogy a két enantiomer vegyület hasonló koncentrációban (1 μ M) hatékony. Ez az észrevétel magyarázatul szolgálhat miért tapasztaltuk, hogy a racém RL-3 vegyület korábbi vizsgálatokban nem változtatta meg (Magyar, 2006), konkrétan a várakozások ellenére nem aktiválta az I_{Ks} áram nagyságát, ugyanis az ellentétes hatású enantiomer vegyületek közömbösítették egymás hatását.

Fentieket úgy foglalhatjuk össze, hogy a jobbra forgató és I_{Ks} -áram aktiváló enantiomer vegyület (ZS_1270B) alkalmas farmakológiai szer annak az ellenőrzésére, hogy

az I_{Ks} aktivátorok valóban antiaritmiás szerek lehetnek olyan ritmuszavarokban, amelyek a megnyúlt akciós potenciálok talaján erednek (például EAD triggerelt aritmiák).

A dilatatív cardiomiopátia módosítja a Kir2.x ioncsatornákat kódoló gének expressziós szintjét

A dilatatív cardiomiopátia (DCM) egy súlyos miokardiális megbetegedés, amely súlyos aritmiákhoz és korai szívhalálhoz vezet. Mi elektrofiziológiai szemszögből vizsgáltuk meg a DCM-es betegeket. Korábban ismert volt, hogy a DCM-es betegekből származó szívizom mintákban az akciós potenciál időtartam (APD) hosszabb lesz mint az egészséges szívekben, csökken a nyugalmi potenciál és gyengül a vezetőképesség (Koumi, 1995). Természetesnek tűnik ennél fogva, hogy egy ilyen komplex betegség számos gén expressziós szintjét modulálja („remodelling”). Eddig elsősorban a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) érintettségét mutatták ki DCM szívekben (Koumi, 1995). Ismert, hogy az I_{K1} elsősorban a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában játszik szerepet (Kurachi, 1985; Shimoni, 1992; Lopatin, 1994; Anumonwo, 2010), és mint ilyen, ha a DCM következtében az áram tulajdonságai megváltoznak, olyannyira szerepet játszhatnak a DCM indukálta aritmogenezisben (Dhamoon, 2005; Willis, 2015), hogy az I_{K1} gátlása antiaritmiás hatással is rendelkezik (Warren, 2003). Vizsgálataink célja az volt, hogy patch-clamp technika segítségével tanulmányozzuk az I_{K1} áram szerepét egészséges és DCM-es betegek szívéből származó mintákon, illetve, hogy molekuláris biológiai technikák segítségével (mRNS mérés qPCR technikával, illetve fehérje analízis Western-blot, illetve immunhisztokémiai technikákkal) feltérképezzük a Kir2.x α -alegységek és SAP97 β -alegységek közötti lokalizációs kapcsolatrendszer szintén egészséges, illetve DCM-es betegek szívéből származó mintákon.

Eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze:

- 1. Az I_{K1} áram DCM-es betegekből származó szívekből izolált miocitákban mind inward, mind outward tartományban nagyobb amplitúdóval rendelkezik mint az egészséges kontroll szívekből származó emberek szívéből izolált szívizomsejtekben, vagyis az áram jelentősen felülszabályozódik („upregulálódik”) (26. ábra).***

Az upreguláció kifejezetten jelentős az AP jelforma szempontjából kiemelten fontos - 80 mV és 0 mV közötti membránpotenciál tartományban (26A. ábra jobb és bal oldali paneljei). Az I_{K1} áram felerősödése együtt járt a Kir2.1, Kir2.3 és a Kir2.4 alegység csatornák felerősödésével, mind mRNS (26B. ábra) mind fehérje szinten (26C. ábra). Ezek az eredményeink egyezést mutatnak korábbi tanulmányok eredményeivel, amelyek

kimutatták, hogy DCM-ben a natív I_{K1} , illetve a Kir2.1 izoformák (*upregulálódnak* (Koumi, 1995). Nekünk sikerült kimutatnunk, hogy nemcsak a Kir2.1, hanem a Kir2.3 és Kir2.4 izoformák expressziója is statisztikailag szignifikáns mértékben magasabbak, mint a kontroll szívekből származó értékek. Irodalmi adatok alapján az I_{K1} áramot a Kir2.x család tagjai, a Kir2.1-Kir2.4 csatornák heteromer kapcsolódása alkotja (Dhamoon, 2004; Anumonwo, 2010).

Irodalmi adatok alapján kijelenthető, hogy emberben a Kir2.1 csatorna a I_{K1} -áramot alkotó legjelentősebb, a Kir2.3 izoforma pedig szintén jelentős mértékben expresszált (Dhamoon, 2004; Gaborit, 2007) alkotóegysége. A Kir2.2 szerepéről és I_{K1} áramhoz kapcsolt mértékéről ellentmondásos adatokat találunk. Gaborit és *mtsai* dolgozatának a mellékletében az szerepel, hogy a Kir2.2 mRNS expressziója vélhetően a Kir2.1 és Kir2.3 izoformákkal azonos mértékű (Gaborit, 2007). Ezzel ellentétesen Dhamoon és *mtsai* egyik dolgozatában azt találhatjuk, hogy tengerimalac valamint birka pitvari és kamrai szövetben csak a Kir2.1 és Kir2.3 izoformák jelenléte volt kimutatható, amíg a Kir2.2 mRNS, és fehérje expressziója „nem volt kimutatható – *not detectable*”) (Dhamoon, 2004). Mindezek alapján arra következtetünk, hogy DCM-ben az I_{K1} áram felerősödését elsősorban a domináns Kir2.1 és Kir2.3 izoformák *upregulációja* határozza meg, míg vélhetően a Kir2.2 *downregulációja* csak kevésbé befolyásolhatja azt. Egészében véve azt mondhatjuk, hogy a mRNS és fehérje eredményeink kellő mértékben alátámasztják az I_{K1} funkcionális áram méréseink eredményét, vagyis vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy a DCM-es betegekben tapasztalt I_{K1} áram *upregulációját* az alkotó Kir2.1 és Kir2.3 heteromer vagy homomer izoformák felerősödése okozza.

2. Immunfluoreszcencia kísérleteink igazolják, hogy egyértelmű ko-lokalizáció mutatható ki a Kir2.1 és SAP97, illetve a Kir2.2 és SAP97 és alegységek között (27. ábra).

A kontroll sejtekben a ko-lokalizáció talán kevésbé intenzív, de a DCM sejtekben egyértelműen azonosítható a mindkét alegységet egyszerre tartalmazó régiók (27. ábra) jelenléte. A SAP97 (szinapszishoz asszociált protein 97) egy membrán-asszociált *guanilát kináz* (MAGUK) fehérje, amely egyértelműen expresszált a szívben (Godreau, 2002), és amelyről kimutatták, hogy jelentősen modulálja a Kv szupercsaládhoz (feszültségfüggő K-csatornák) tartozó csatornákat. A SAP97 fehérjéről eddig ismert, hogy hozzákapcsolódik a Kv4.2/4.3 komplexhez és így szabályozhatja az I_{to} áramot (El-Haou 2009), vagy a Kv1.5 csatornához is, amely a fő alkotó alegysége a pitvari I_{Kur} áramnak (Murata 2001; Godreau, 2002; Abi-Char, 2008). Az idézett dolgozatokban

kimutatták, hogy: i) a SAP97 jelenléte szükséges hogy a Kv1.5 csatorna hozzákapcsolódjon („anchoring”) a membránhoz és, hogy így vezesse a K^+ -töltéseket; ii) a SAP97 túlexpressziója („overexpression”) felerősítette, csendesítése pedig lecsökkentette az I_{to} áram nagyságát (El-Haou, 2009). Ezeket az eredményeket figyelembe véve felmerült a kérdés, hogy a SAP97 vajon hozzákapcsolódhat-e a szívizomzatban létező Kir2.x típusú csatornához is. Hasonló eredményeket eddig csak patkányból izolált cerebellum- és szívizomsejtekben mutattak ki (Leonoudakis, 2001; Vikstrom, 2009; Vaidyanathan 2010). Például kimutatták, hogy a SAP97 csendesítése a Kir2.1 áram denzitását lecsökkentette patkány sejt kultúrában (Vaidyanathan 2010), valamint azt, hogy a SAP97 meghatározhatja a Kir2.3 szöveten belüli eloszlását (Vikstrom 2009). Viszont nem találunk irodalmi adatot a SAP97 és Kir2.x csatornák kapcsolatáról sem emberben, sem olyan emlősben, amelynek az elektrofiziológiai profilja közelebb van az emberéhez. Ezért a jelen tanulmányban szereplő humán Kir2.x és SAP97 ko-lokalizációs adatok új lehetséges magyarázatul szolgálhatnak a DCM betegség okozta molekuláris szintű eltérésekért.

Fentiek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az asszociált Kir2.x és SAP97 alegységek megváltoznak a betegség alatt, ezért felvethető az a hipotézis, hogy a ko-lokalizált Kir2.x és SAP97 csatornák gyógyszer-támadáspontok lehetnek a cardiomiopátia kezelésében.

Az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggő szerepének a vizsgálata kutya kamrai akciós potenciálban

A jelen vizsgálat célja az I_{Kr} és I_{K1} áramok ciklushossz-függő szerepének a vizsgálata kutya kamrai repolarizációban. Ismert, hogy mindkét áram jelentős *inward* irányú rektifikációs tulajdonságokkal rendelkezik (Lopatin, 1994; Spector, 1997), emiatt az áramokat nehézkes tanulmányozni klasszikus *voltage-clamp* módszerekkel, ahol négyszögjel pulzusként alkalmazzuk a vezérlő potenciálokat a szívizomsejtekre. Jelen tanulmányban ezért valódi akciós potenciálokat alkalmaztunk vezérlő pulzusként, és farmakológiai ágenseket használtunk az áramok szétválasztása céljából.

A következő eredményeket kaptuk:

1. ***Az I_{Kr} és I_{K1} áramok amplitúdói egyértelműen nem mutattak ciklushossz-függő tulajdonságokat, amikor megváltoztattuk az akciós potenciál paramétereit (28. ábra).***

Az I_{Kr} és I_{K1} áramok nem változtak meg sem az akciós potenciál hosszúság, sem a repolarizáció ciklushosszáinak függvényében.

Ezek az eredmények jelentősen eltérnek a korábban tengerimalacon bemutatott eredményektől (Rochetti, 2001), ugyanakkor megerősítik a Gintant által kutya kamrai sejtekben bemutatott eredményeket (Gintant, 2000). Más szóval kijelenthetjük, hogy az I_{Kr} áram egy relatíve széles frekvencia-tartományban nem mutat frekvenciafüggést, igaz ezt a frekvencia-függetlenséget csak normális, illetve hosszú ciklushosszaknál sikerült igazolnunk. 400 ms alatti ciklushosszaknál az I_{Kr} áram jelentősen lecsökken kutya kamrai sejtekben, aminek következtében elektromos alternáns viselkedésformát vesz fel (Hua, 2004). Az I_{K1} áram esetében hasonló tulajdonságokat találtunk. Az I_{K1} áram is 400 ms-nál hosszabb ciklushosszakon változatlan, viszont 400 ms alatt jelentősen megváltozik. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az akciós potenciálok ciklushossz-függő tulajdonságait eltérő mechanizmusok okozzák alacsony, illetve magas frekvenciák esetében.

2. Az I_{Kr} és I_{K1} áramok összefüggő módon játszanak szerepet az akciós potenciál repolarizációjában.

Az I_{Kr} és I_{K1} áram feszültségfüggését a **29C. ábrán** szereplő kísérletek mutatták be a legszemléletesebb módon. Ezen az ábrán úgy mutattuk be az I_{Kr} és I_{K1} áramok feszültségfüggését, hogy egymásra toltuk az I_{Kr} és I_{K1} áramok áram-feszültség (I-V) karakterisztikáit, miközben az áramértékeket az adott áram maximum értékéhez normalizáltuk. Láthatjuk, hogy az I_{Kr} áram fokozatosan emelkedik, és a közép-plató fázisban közvetít jelentősebb áramot, miközben az I_{K1} áram csak később fejlődik ki. Mivel az I_{Kr} korábban, vagyis már negatívabb feszültségeknél (**29C. ábra mindkét panelje**) eléri maximumát mint az I_{K1} áram, valószínűsíthető hogy az I_{Kr} áram ezen megemelkedése közvetve az I_{K1} áram inicializálása révén felgyorsítja a repolarizációt is.

Valójában az a tény, hogy az I_{Kr} és I_{K1} áramok egy jól meghatározható feszültség értéken érik el a csúcserőértéküket - az I_{Kr} áram esetében mintegy -48.3 ± 2.1 mV-on vs -64.1 ± 0.7 mV az I_{K1} áram esetében- azt sugalmazza, hogy az áramok emelkedését inkább a membránfeszültség és nem az időbeli változásuk szabályozza. Ez az eredmény magyarázhatja, hogy a repolarizáció terminálása miért bizonyult ciklushossz függetlennek. Ahogy az I_{Kr} és I_{K1} áramok csúcserőértéke felelős a repolarizáció befejezéséért, az akciós potenciál időtartamát a platófázis alatt működő áramok szabályozzák. Amint a **28D. ábrák** bemutatják megállapítottuk, hogy a közép-plató és átlag I_{Kr} és I_{K1} értékek nem függenek a ciklushossz változástól. Ez arra enged

következtetni, hogy nem feltételezhető az, hogy az I_{Kr} és I_{K1} áramok képesek lennének ciklushossz-függő változásokat okozni normál és alacsony szívfrekvenciákon.

Végkövetkeztetésül megállapíthatjuk, hogy kutya szívműködésében az akciós potenciál jelképe nem befolyásolja a repolarizációs fázist leginkább meghatározó I_{Kr} és I_{K1} áramok nagyságát az akciós potenciál időtartama alatt. Mindez azt jelenti, hogy az AP ciklushossz függő változásai nem befolyásolják az I_{Kr} és I_{K1} áram ciklushossz-függő tulajdonságait.

3. témakör. A pitvarfibrillációs remodelling celluláris hatásmechanizmusainak vizsgálata emlősszíveken

A G-protein által szabályozott acetilkolin-szenzitív káliumáram ($I_{K,ACh}$) konstitutíven aktív permanens pitvarfibrilláló betegekben

A kísérletek célja az volt, hogy megvizsgáljuk és összehasonlítsuk a háttér befelé egyenirányító, valamint a G-protein által szabályozott acetilkolin-szenzitív (I_{K1} és $I_{K,ACh}$) káliumáramok szerepét koronária bypass műtétekre menő szinuszritmusos és krónikus pitvarfibrilláló (cAF) betegek pitvari szívműködésében.

A következő eredményeket kaptuk:

1. *Igazoltuk, hogy a megemelkedett (upregulált) I_{K1} csatorna expresszió mellett a csatornák megemelkedett „single-channel” nyitási valószínűsége is hozzájárul a cAF-ben tapasztalt magasabb háttéráramhoz. Fentiek mellett, a következő szilárd bizonyítékokat szolgáltatott egy M-receptor agonista független, ún. „konstitutíven aktív” $I_{K,ACh}$ csatornák jelenlétére: i) a szelektív $I_{K,ACh}$ gátlószer tertiapin cAF betegben az SR betegektől eltérően lecsökkentette a háttéráramot (31. ábra); ii) az M-receptor antagonistá atropin gátlásának hiánya igazolja a konstitutíven aktív $I_{K,ACh}$ csatornák agonista függetlenségét (32. ábra); iii) single-channel patch-clamp kísérletek csak a cAF betegekben igazolták a konstitutíven aktív $I_{K,ACh}$ áram jelenlétét (33. ábra és 10. táblázat); iv) tertiapin jelenlétében a konstitutíven aktív $I_{K,ACh}$ csatornák nyitási valószínűsége alacsonyabb volt (34. ábra).*

Mindezt összefoglalva kijelenthetjük, hogy a cAF-ben tapasztalt magasabb háttér káliumáramot (30. ábra) az upregulálódott I_{K1} és a konstitutíven aktív $I_{K,ACh}$ csatornák együtt okozzák, valamint azt is, hogy ez a megemelkedett háttéráram hozzájárulhat az AP remodellinghez és ennek következtében a szívritmuszavarok kialakulásához.

Kísérletes adataink megerősítik számos korábbi tanulmány eredményeit, amelyek szintén azt mutatták ki, hogy cAF-es betegekben, illetve tachypaceléssel előidézett AF kutyamodellben magasabb a háttér I_{K1} áram amplitúdója, mint az SR betegekben (Van Vagoner, 1997; Bosch, 1999; Dobrev, 2001 és 2002; Workman, 2001; Gaborit, 2005) vagy kontroll kutyákban (Ehrlich, 2004; Cha, 2005). Mivel a molekuláris biológiai vizsgálatok azt igazolták, hogy cAF-ben az I_{K1} áramot felépítő Kir2.1 csatornák mRNS és fehérje szintjei is *upregulálódnak*, logikusan azt feltételezték, hogy a cAF csak I_{K1} áramot változtatja meg (Dobrev, 2001 és 2002). Mivel az I_{K1} és az $I_{K,ACH}$ csatornák feszültségfüggő kinetikai paraméterei hasonló feszültségtartományban aktiválódnak és inaktiválódnak, csak *single-channel* paraméterek jellemzésével lehet szelektíven tanulmányozni őket (Heidbüchel, 1990). *Single-channel* kísérleteink igazolták, hogy az I_{K1} csatornák nyitási valószínűsége magasabb cAF-ben mint SR-ben (**33. ábra**). Ennek a mechanizmusa viszont nem kellően tisztázott még és további vizsgálatok szükségesek, hogy megértsük kísérleteink eredményeit.

Mi is igazoltuk, hogy az M-receptor mediált $I_{K,ACH}$ csatornák aktivációja alacsonyabb a cAF betegekben, mint SR-ben. Sőt ezen eredményeket igazolják a megfelelő mRNS és fehérje szintek vizsgálata is (Dobrev, 2001). Viszont *single-channel* vizsgálataink egyértelműen igazolják, hogy a cAF betegek szívéből izolált pitvari miocitákban konstitutíven aktív az $I_{K,ACH}$ csatornák (**33. ábra**). Hasonló tertiapin szenzitív háttéráramot leírtak tachypacelt kutya AF modellben (Drici, 2000; Kitamura 2000; Ehrlich, 2004), így azt kell következtetnünk, hogy a konstitutíven aktív $I_{K,ACH}$ csatornák kifejlődése cAF betegekben a pitvari remodelling eredménye.

2. A konstitutíven aktív $I_{K,ACH}$ csatornák molekuláris jellemzői egyelőre ismeretlenek.

Azt tudjuk, hogy a *single-channel* szinten a konstitutíven aktív $I_{K,ACH}$ csatornák aktivitása a megemelkedett csatorna-nyílásokból származó töltéstöbbletből származik. A tertiapin koncentráció-függően gátolta a carbachol (CCh) aktiválta $I_{K,ACH}$ áramot (**31. és 34. ábrák**). Csak spekulálni tudunk, hogy a konstitutíven aktív $I_{K,ACH}$ csatornák kialakítása háttérében a GIRK csatornák cAF-ben történő megváltozása szolgálhat magyarázatot, de ez további vizsgálatokat feltételez. Néhány tanulmány igazolta, hogy az $I_{K,ACH}$ csatornák foszforiláció-defoszforiláció szignalizációs mechanizmusa megváltozik cAF-ben, de még így is számos megválaszolatlan kérdés van, hogy ez miként történik (Voigt, 2007; 2008 és 2010).

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a pitvarfibrillációban (AF) tapasztalt jelentős akciós potenciálváltozás (*elektromos remodelling*) hátterében az acetilkolin-szenzitív káliumáram ($I_{K,ACH}$) működésének jelentős átrendeződése is szerepet játszik. Kimutattuk, hogy permanens AF-ben az $I_{K,ACH}$ áram előzetes ligandstimuláció nélkül is folyamatosan („*konstitutívan*”) aktív, így pitvarfibrillációban jelentős repolarizáló áramot szállít. Ez a konstitutívan aktív $I_{K,ACH}$ repolarizáló áram viszont hozzájárul az AF-re jellemző APD rövidüléséhez, és következésképpen a szívritmuszavar kialakulásához és fennmaradásához. Mindez azt jelenti, hogy a csak pitvarban létező $I_{K,ACH}$ áram blokkolása fontos gyógyszerátadási pont („*drug target*”) lehet AF-ban, konkrétan olyan AF ellenes gyógyszerek kifejlesztésére alkalmazható, amelyek kamrai proaritmia-mentesek lehetnek.

Repolarizáló káliumáramok tulajdonságainak vizsgálata szinuszritmusú és pitvarfibrilláló kutyákból izolált pitvari szívműködéseken

Kísérleteink célja a pitvari repolarizációban és AF-ben előálló elektromos átépülésben (remodelling) szerepet játszó kálium-ionáramok (I_{to} - tranziens kifelé haladó kálium, I_{K1} - befelé egyenirányító kálium és $I_{K,ACH}$ - acetilkolin szenzitív káliumáram) tanulmányozása volt. Méréseinket SR-ben lévő és gyors pitvari ingerléssel kiváltott AF-ben szenvedő kutyákból izolált pitvari szívműködéseken végeztük.

A következő eredményeket kaptuk:

- 1. Az AF-ben szenvedő kutyákból izolált cardiomiocitákban az I_{to} kis mértékben gyengült (downregulálódott), és az áram inaktivációja is lelassult az SR-os állatok cardiomiocitáihoz hasonlóan (35. ábra és 11. táblázat).***

Kísérletes eredményeink egyértelműen igazolják egy jelentős (mintegy 14-15 pA/pF) amplitúdójú tranziens kifelé haladó káliumáram jelenlétét SR kutya pitvari szívműködéseiben. Ennek az áramnak a jelenléte okozza a pitvarsejtek akciós potenciáljára nagyon jellemző *spike and dome*-konfigurációt is (lásd **3. ábra**; SR pitvari sejt akciós potenciál). Meglepő módon a kísérletesen előidézett AF-től sújtott kutyák szívéből izolált miocitákban hasonló méretű I_{to} áramot mértünk, mint az SR sejtekben. Ez a megfigyelés jelentősen eltér az AF-ben szenvedő páciensek pitvari szívműködés-mintáiban mért eredményektől: emberben az I_{to} natív áramnak mind a sűrűsége, mind az áramot alkotó fehérje és a kódoló mRNS szintjei jelentősen mérséklődnek („*downregulálódnak*”). Ezen különbség (ember vs kutya) okát nem tudjuk. Egy korábbi, a mienkéhez hasonló kutyamodellben, 6 hétig folyamatosan fenntartott gyors szívingerléssel kiváltott „AF-es állatokból” izolált szívműködéseken kimutatták az I_{to} áramot meghatározó Kv4.3 mRNS

szintek *downregulációját* (Yue, 1999). Az említett vizsgálatban nem mértek közvetlenül natív I_{to} áramot, és mint tudjuk, az I_{to} áram több pórusformáló α -alegység (Kv4.2, Kv4.3 és Kv1.4) és kiegészítő β -alegység (KChIP₂, miRP1, *stb.*) koexpressziójából áll össze (Jost, 2009). Természetesen az a lehetőség sem kizárt, hogy az általunk alkalmazott 4-6 hétig fenntartott gyors szívingerlés (400/min) még korántsem elégséges az I_{to} áram *humán krónikus vagy permanens AF*-ben észlelhető *downregulációjának* reprodukciójához, vagy az eltérés oka egyszerűen specieskülönbség.

Az I_{to} áram inaktivációs kinetikáját kétexponenciális függvénnyel illesztettük. Méréseink eredménye alapján az I_{to} áram kinetikája egy gyors ($\tau \approx 10-12$ ms) és egy lassúbb ($\tau \approx 122-150$ ms) komponensből tevődik össze. Ez jelentősen eltér a kamrai szívműködésben kimutatott kinetikai értékektől, ahol a gyors kinetika állandója hasonló a pitvaréhoz ($\tau \approx 4-5$ ms), de a lassú összetevő majd egy nagyságrenddel gyorsabb ($\tau \approx 20-25$ ms), mint a pitvari érték (Virág, 2011). Ebből a megfigyelésből arra a következtetésre juthatunk, hogy pitvaron az I_{to} áram nemcsak a korai 1. fázis repolarizációt determinálja, hanem a mintegy 100-150 ms hosszú lassú komponens(e) révén szerepet játszhat a pitvarsejtek későbbi repolarizációjában. A pitvarfibrilláló kutyák I_{to} -ja szintén kétexponenciális függvénnyel illeszthető. Mindkét komponens időállandója valamelyest lassúbb lett, ami részlegesen hozzájárulhat a pitvari akciós potenciál remodellinghez.

2. Az I_{K1} az „AF- sejtekben” intenzívebbnek bizonyult, mint SR-ben (36. ábra).

A befelé egyenirányító káliumáram legfontosabb szerepe a késői repolarizáció utáni fázisban a membránpotenciál helyreállítása (Kurachi, 1985; Lopatin, 1994; Anumonwo, 2010), de újabb tanulmányok, többek között az értekezésben (18-19. ábrák) is ismertetett vizsgálatok kimutatták, hogy közvetlen szerepe lehet az AP 3. fázisának alakításában, azaz a késői repolarizációban is. Eredményeink alapján az I_{K1} áram egyaránt jelen van az SR-ben és kísérletesen indukált „AF-es kutyák” pitvari miocitáiban. Utóbbiban (ti. AF-ben) az I_{K1} áram enyhén erősödik („*upregulálódik*”), ami hasonló a humán krónikus „AF-sejtekben” mért adatokkal (Dobrev 2001 és 2002), amelyek arról tanúskodnak, hogy az I_{K1} áram denzitása, és az áram karakterisztikumait meghatározó fehérje és mRNS szintek egyaránt erősödnek („*upregulálódnak*”). Természetesen érdemes megjegyezni, hogy kísérleteinkben az I_{K1} áram sűrűségének növekedése a pitvari AP-t meghatározó feszültségtartományban (-80 mV és 20 mV között) nem különbözik statisztikailag szignifikáns mértékben az „SR-es és AF-es” kutyákból izolált pitvari miocitákban (36. ábra, alsó panelek).

3. A pitvarspecifikus $I_{K,ACh}$ ionáram aktiválásához egy kolinerg agonista szer (carbachol; CCh) alkalmazására volt szükség (37. ábra). 2 μM CCh hatására az „SR-sejtekben” a befelé és kifelé haladó $I_{K,ACh}$ egyaránt megnőtt. Az „SR-sejtekben” aktivált outward áramot a tertiapin, az $I_{K,ACh}$ szelektív gátlószere, jelentősen lecsökkentette (37. ábra, bal oldali mezők). Az AF-sejtekben, minden előzetes aktiváció nélkül, jelentős, konstitutívan aktív $I_{K,ACh}$ áramot mértünk, amelyet a tertiapin szintén nagymértékben gátolt (37. ábra, középső mezők). Ha az „AF-sejteket” carbachollal kezeltük, a konstitutív $I_{K,ACh}$ ionáramon kívül szignifikáns ligandfüggő de szintén tertiapin szenzitív $I_{K,ACh}$ ionáram jelent meg (37. ábra, jobb oldali mezők).

Pitvari szívizomsejtekben létezik egy speciális háttér egyenirányító káliumáram, amely nem expresszálódik a kamrasejtekben. Ez az acetilkolin szenzitív káliumáram, az $I_{K,ACh}$ (Heidbüchel, 1990). A N. vagus (paraszimpatikus)-izgalom kapcsán felszabaduló acetilkolin (ACh) stimulálja a muszkarin-receptorokat és azok aktiválják az $I_{K,ACh}$ áramot (Yamada, 1998). Eddigi ismereteink szerint az $I_{K,ACh}$ áram a ligand stimulációja nélkül inaktív. Köztudott, hogy az extrinsic és intrinsic vegetatív (autonóm, szimpatikus/paraszimpatikus) idegrendszer döntő mértékben hozzájárul az AF kialakulásához és/vagy fennmaradásához. Tudjuk, hogy a bolygóideg-izgalom hatására a pitvari APD és ERP lerövidül, és az ACh egyenlőtlen felszabadulása miatt (is) növekszik a pitvari repolarizáció diszperziója/inhomogenitása (Liu, 1997). A paraszimpatikus izgalom aritmogén „táptalaja” a reentry-rotorok keletkezésének és a AF fellépésének (Kneller, 2002; Nattel, 2002), amely gyakran előfordul a klinikai gyakorlatban az ún. vagotóniás/Coumel-típusú AF-ben (Coumel, 1978; Yeh, 2007). Természetesen felvetődő kérdés, hogy a vagus-izgalomtól (alvás, posztprandiális állapot, stb.) indukált AF kialakulásában az $I_{K,ACh}$ áram intenzitásának változása, „remodellingje” is szerepet játszik. Dobrev és mtsai kimutatták, hogy az I_{K1} áram „upregulációjával” párhuzamosan az $I_{K,ACh}$ áramot meghatározó GIRK4 fehérje expressziója csökken, ezért korábban csak az I_{K1} „upregulációjával” és I_{CaL} erősségének csökkenésével magyarázták a pitvari tachyaritmia indukált remodellinget (ATR) (Dobrev, 2001). Később ugyanezen a munkacsoporttal együtt kimutattam, hogy az ATR során nem csupán az I_{CaL} áram expressziója csökken, hanem, egyelőre részleteiben még nem teljesen tisztázott foszforilációs szignalizációs mechanizmus kapcsán (Voigt, 2007; 2008 és 2010) permanens AF-ben az $I_{K,ACh}$ csatornák, előzetes ligand-stimuláció nélkül, mintegy „konstitutívan” nyitva maradnak (30-34. ábrák). Ez egy meglepő eredmény volt, mert ez volt az első olyan vizsgálat, amely igazolta, hogy az $I_{K,ACh}$ csatornák előzetes ligand-

stimuláció nélkül is képesek aktív áram-átvitelre speciális aritmia-formá(k)ban (például permanens AF-ben).

Ez a konstitutívan aktív $I_{K,ACH}$ áram tehát hozzájárul az AF-re jellemző rövid és háromszögesített („*trianguláris*”) APD-morfológiához (lásd **3. ábra**; AF pitvari szívizomsejt akciós potenciál), és vélhetően szerepet játszik a pitvari reentry típusú aritmogenezisben. A pitvarspecifikus (csak a pitvarizomzatban jelenlévő) $I_{K,ACH}$ gátlás (például tertiapinnal) nem okoz kamrai repolarizáció megnyúlást, így valószínű, hogy nem várható olyan proaritmiás mellékhatás (*Torsades de Pointes* kamrai tachycardia), mint amelyet a klasszikus I_{Kr} -gátlók (például a dofetilid) okoznak (Lengyel, 2007).

Ennek megfelelően többször felvetődött a hipotézis, hogy ezen konstitutívan aktív $I_{K,ACH}$ áramnak a szelektív inhibitorai ideális pitvarspecifikus antiaritmiás hatású gyógyszerek lehetnének, amelyek alkalmasak a paraszimpatikus izgalomtól iniciált AF gyógyszeres terápiájára (Voigt, 2008). A hipotézist igazolandó számos gyógyszerjelöltet próbáltak ki különféle állatkísérletes modellekben, és az előzetes eredmények biztatóak (Hashimoto, 2006; 2008). Jelen kísérleteinkben igazoltuk a konstitutív $I_{K,ACH}$ áram jelenlétét (amint ez a **37. ábra középső mezőiben** látható). A „AF-szívizomsejtekben” a kolinerg agonista carbachol jelenléte nélkül is identifikálható egy tertiapin-szenzitív áramkomponens (*piros görbe és oszlopok*), mind az *inward* (-100 mV-on), mind az *outward* tartományban (-10 mV-on). Ez bizonyítja, hogy az $I_{K,ACH}$ áram ligandfüggetlen (acetilkolin híján is működő) típusa is „konstitutívan” jelen van a „AF-es” kutyákból izolált pitvarizomsejtekben.

Hozzá kell tenni, hogy ez az áram nagyon alacsony denzitású, különösen *outward* irányban, ezért megkérdőjelezhető, hogy ez a konstitutív $I_{K,ACH}$ áram elég „erős-e” ahhoz, hogy önmagában előidézzé az AF-re jellemző elektromos remodellinget (a markáns pitvari ERP és APD rövidülést). Jelen kísérleteink alapján megengedhetőnek látszik egy új hipotézis körvonalazása. A paraszimpatikus (alap)tónus magától értődően normális körülmények között is mindig jelen van. A vagus-rostoktól/ACh-tól stimulált $I_{K,ACH}$ áram tehát folyamatosan és mindig jelen van a pitvari szívizomsejtekben, amelyhez hozzáadódhat a konstitutívan aktivált $I_{K,ACH}$ áram. Utóbbi „atípusos” ionáramnak szerepe lehet az AF állandósulásában a permanens típus kialakulásában. A **37. ábra jobb oldali mezőiben** bemutatott kísérletek valóban azt igazolják, hogy amennyiben a pitvari remodellingel rendelkező AF-es kutyákból izolált miocitákat előzetesen carbachollal aktiváltuk, az így létrehozott áram (amely a konstitutív és carbachollal indukált $I_{K,ACH}$ áramot egyaránt tartalmazza, különösen *outward* irányban már elegendően nagy (**37 ábra,**

jobb oldali mezők alsó panel), hogy a tertiapin blokkolása is szignifikánsan nagyobb áramkomponens jelenlétét igazolja. Ez az áram, már kellően erős lehet, hogy hozzájáruljon az AF-re jellemző trianguláris és rövid APD-hez.

E hipotézist igazolandó, a közelmúltban *Juhász és mtsai* kimutatták, hogy a tertiapin képes volt kivédeni a gyors pitvari szívingerléssel kiváltott pitvari elektromos remodelling talaján kialakuló kísérletes AF-et kutyákban (Juhász, 2018). További humán vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy az $I_{K,ACh}$ gátlása klinikai körülmények között is hasznosítható lesz-e az AF megelőzésében, megszüntetésében és/vagy állandósulásának profilaxisában.

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a pitvari I_{to} áram a lassú inaktivációs kinetika miatt a pitvari szívműködésben jelentősebb mértékben hozzájárulhat a késői repolarizációhoz, mint amelyet a kamrai szívműködésben kimutattak. Az I_{to} áram kutyamodellünkben a human adatokkal ellentétben, csak kis mértékben *downregulálódott* AF-ben, viszont inaktivációs kinetikája szignifikánsan lassult. A konstitutív $I_{K,ACh}$ megjelenése bizonyítja, hogy AF kutyamodellünkben a pitvari elektromos remodelling kialakult. A ligandfüggő és konstitutívan aktív $I_{K,ACh}$ áramok együttesen feltehetően fontos szerepet játszanak (legalábbis kutyában) az AF-re jellemző háromszög alakú, a fizioiogiásnál is rövidebb akcióspotenciál-jelforma kialakításában. A ligand és ligandfüggetlen (konstitutívan aktív) $I_{K,ACh}$ áram szelektív gátlása sikeresen kivédte a burst ingerléssel kiváltott pitvarfibrillációs ritmuszavarokat.

4. témakör. Az NCX gátlás lehetséges antiaritmias hatásmechanizmusának vizsgálata emlősszíveken

Az ORM-10103 és GYKB-6635, új kísérletes szelektív NCX ioncsatorna gátlószer vegyületek hatásainak vizsgálata emlősszíveken (kutya és tengerimalac szívpreparátumokon)

A vizsgálatok elsődleges célja az volt, hogy ellenőrizzük a Bers és Pogwizd által elméleti megfontolások alapján megfogalmazott hipotézist, amely szerint a szelektív NCX áram gátlók hatékony szerek lehetnének az a Ca^{2+} -túltelítődés talaján kialakuló, elsősorban DAD indukálta triggerelt aritmia kivédésében (Pogwizd, 2001 és 2003). Sajnos hatékony és szelektív NCX gátlószer hiányában ennek a hipotézisnek az ellenőrzése és igazolása korábban nem volt lehetséges. A korábban vizsgált szelektívnek vélt NCX gátlókkal (SN-6, KB-R7943 vagy SEA-0400), bár sok tanulmány készült, sajnos részleges szelektivitásuk

miatt nem bizonyultak megfelelő eszköznek. Valamennyi vegyületről bebizonyosodott, hogy éppen az NCX áramot is gátló koncentráció tartományban az L-típusú kalcium csatornát is gátolják (Iwamoto, 2004; Birinyi, 2005; Acsai, 2007; Antoons, 2012). Így a különböző iszkémia-reperfúzió (I/R) indukálta Ca^{2+} -tútelítődéses aritmia-kísérletekben bizonyult védő hatásukat nem lehet egyértelműen csak az NCX gátló hatás eredményeként interpretálni (Watano, 1999; Elias, 2001; Magee, 2003; Antoons, 2012).

Kísérletes munkánk kezdetén ezért elsősorban arra volt szükség, hogy azonosítsunk olyan vegyületeket, amelyek hatékonyan és szelektíven gátolják az NCX áramot lehetőleg mindkét működési irányban. A kétezres évek elején egy nemzetközi ko-operáció keretében lehetőségünk volt megvizsgálni az Orion Gyógyszergyár (Espoo, Finnország) több olyan vegyületét, amelyet a gyógyszergyár kutatói azzal a céllal terveztek és szintetizáltak, hogy hatékony és remélhetőleg szelektív NCX gátlók legyenek. Az ORM-10103 volt az egyik első vegyület, amelyet kiterjedt *in vitro* farmakológiai vizsgálatsorozatnak vetettünk alá. A vegyület szerkezete (**38A. ábra**) jelentősen különbözik a SEA-0400 és KB-R7943 vegyületek szerkezetétől (**38C-38D. ábrák**).

Hazai ko-operációban (SZTE, GYTK Gyógyszerkémiai Intézet) is elindítottunk egy közös NCX gátlószer projektet. A projekt során számos előkísérlet folyamán beazonosítottuk a GYKB-6635 kódjelű vegyületet, amelynek szerkezete (**38B. ábra** egyaránt különbözik az ORM-10103, valamint a SEA-0400 és KB-R7943 vegyületektől), és amelyet az ORM 10103 vegyülethez hasonlóan, szintén *in vitro* és *in situ* farmakológiai vizsgálatokban elemeztünk.

A következő eredményeket kaptuk:

1. ***Kutya kamrai szívműködésben vizsgálva az ORM-10103 és GYKB-6635 vegyületek koncentráció-függő módon gátolják az NCX áramot mind forward mind rezerv módban (39A-39B. és 40. ábrák).***

Mind a két vegyület ugyanabban a koncentráció-tartományban gátolta az NCX áram *forward* és *reverz* módját. Az ORM-10103 vegyület dózis-hatásgörbére illesztett Hill függvénnel meghatározott EC_{50} értéke a mikromolos tartományban (**39C. ábra**) volt, amíg a GYKB-6635 vegyület esetében a becsült EC_{50} érték szintén mikromolos koncentráció (**40. ábra**) értéket mutatott. Mindkét vegyület NCX gátló hatása kielégítően szelektívnek is bizonyult, ugyanis elmondható, hogy magas, többszörös EC_{50} koncentrációkban alkalmazva ($3\ \mu\text{M}$ ORM-10103 és $10\ \mu\text{M}$ GYKB-6635) egyik vegyület sem változtatta meg az L-típusú kalciumáramot (**41A. ábra**), a befelé haladó gyors nátrium áramot (**41B. ábra**, amelyet ezúttal is a szokásos módon V_{max} -ként definiáltunk),

valamint három fontos repolarizáló káliumáramot (I_{K1} , I_{to} , és I_{Ks} áramok, **43A-43B. és 43D. ábrák**). A GYKB-6635 vegyület nem befolyásolta, viszont az ORM-10103 kismértékben (mintegy 25%), de statisztikailag szignifikáns mértékben gátolta az I_{Kr} repolarizáló áramot (**43C. ábra**). Az ORM-10103 vegyület fentiekén kívül nem változtatta meg sem a Na^+/K^+ pumpa ($I_{Na/K}$, **42B. ábra**) áramot, sem a lassú akciós potenciálokat (**42A. ábra**). Utóbbi így megerősíti azt az észrevételt is, hogy a vegyület valóban nem módosítja az I_{CaL} áramot.

Vagyis összegezve elmondhatjuk, hogy valóban sikerült azonosítani két olyan vegyületet, amely hatékonyan gátolja az NCX áram mindkét módját. Mivel az NCX gátló hatásuk szelektív volt, ez a két vegyület valóban alkalmasnak bizonyult, hogy farmakológiai ágensként használva megvizsgálhassuk az NCX áram szerepét a szív elektrofiziológiai hatásaira. Jelen vizsgálatokig két másik olyan vegyületet ismertünk (SEA-0400 és KB-R7943), amelyeket szelektív NCX gátlóként publikáltak. Mindkét vegyület szubmikromoláris tartományban gátolja az NCX áramot. Kimutatták, hogy a KB-R7943 gátolta a kísérletesen előidézett ritmuszavarokat (Watano, 1999; Elias, 2001), amíg a SEA-0400 szignifikánsan kivédte a farmakológiai módon indukált EAD és DAD triggerelt aritmiákat (Nagy, 2004). Viszont több olyan tanulmány is idézhető, amely igazolja, hogy mind a KB-R7943, mind a SEA-0400 EC_{50} közeli koncentrációban gátolja az L-típusú kalcium áramot (és ezzel közvetve megváltoztatja az NCX áramot is szabályozó Ca^{2+} -homeosztázist), ami mindenképpen megkérdőjelezi, hogy valóban csak a specifikus NCX gátló hatással magyarázható antiaritmiás tulajdonságuk (Birinyi, 2005; Acsai, 2007).

2. A szelektív NCX gátlás (1 Hz-n mérve) nem változtatta meg a kamrai akciós potenciál jelformát (44A. ábra**) és meghatározó paramétereit beleértve a depolarizáció maximális sebességét (V_{max}), AP amplitúdót (APA) valamint a kamrai platót és repolarizációt jellemző APD_{25} , APD_{50} és APD_{90} értékeket (**12. táblázat**).**

Külön megvizsgáltuk a kamrai repolarizáció frekvenciafüggését, de ezúttal sem mértünk statisztikailag szignifikáns eltérő értékeket (**44B. ábra**). Ez az eredmény némileg meglepő volt, mert elméleti megfontolások alapján azt gondoljuk, hogy a NCX *forward* módját is beindító/vezérlő hosszú akciós potenciál platófázisa alatt jelentős Ca^{2+} -ion eltávolítás is történik. Mindez azt is jelenti, hogy egy NCX gátlás esetében lecsökken a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmus, és ennek következtében nettó értékben megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} -szint, ami viszont pozitív inotróp hatású. A pozitív inotrópia a csökkent *inward* NCX árammal együtt viszont rövidebb akciós potenciál időtartamot

kellene, hogy okozzon. Ennek ellenére a GYKB-6635 és ORM-10103 vegyületekkel történő NCX gátlás nem okozott sem 1 Hz-en, sem a teljes frekvenciatartományban APD₅₀, illetve APD₉₀ megnyújtó hatást.

Egy későbbi utótanulmányban, egy másik szintén az Orion Gyógyszergyár által szintetizált és már a szubmikromoláris tartományban hatékonynak és szelektívnek bizonyuló NCX gátló vegyülettel, az ORM-10962 molekulával (EC₅₀≈50-70 nM), újra megvizsgáltuk ezt a kérdést (Kohajda, 2016). Kutya kamrai szívizompreparátumban végzett kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az ORM-10962 vegyület okozta NCX-gátlás normál fiziológiai körülmények között szintén nem változtatta meg az APD₉₀ paramétert. Ezért megnéztük mi történik, ha az úgy változnak meg a külső körülmények, hogy vagy a *reverz* NCX, vagy a *forward* NCX kerül túlsúlyba (Kohajda, 2016). Azt tapasztaltuk, hogy amennyiben a *reverz* mód erősödik meg (például csökkent extracelluláris Na⁺-koncentráció esetében), akkor az NCX gátlás következtében a Ca²⁺-tranziensek lecsökkentek (negatív inotrópia), és ez esetben már az akciós potenciál időtartama is enyhén megnyúlt. Amikor az NCX *forward* módját erősítettük meg (a cAMP fokozó forskolin segítségével), akkor az NCX gátlás pozitív inotróp hatásává vált enyhe fokú plató és APD csökkenés kísérletében (Kohajda, 2016).

Ezen kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy normális körülmények között az NCX gátlás alapvetően nem változtatja meg az akciós potenciál jelformát. Viszont olyan patológiás körülmények között, amelyek valamilyen mechanizmus révén felerősítik vagy a *forward* vagy *reverz* típusú NCX áramot, akkor az NCX gátlás már pozitív vagy negatív inotrópnak és potenciálisan antiaritmiásnak is bizonyulhat. Ezt a hipotézist igazolja utólag a **45B. ábrán** szereplő kísérletünk is, amikor a szelektív NCX gátlás teljesen kivédte a strophantin indukálta DAD-okat.

3. *A szelektív NCX gátlás hatékonyan kivédte a triggerelt aritmiákat (45-46. ábrák és 13. táblázat).*

Utóbbit eltérő módon vizsgáltuk a két szelektív gátló alkalmazásával. Az ORM-10103 hatékonyan kivédte kutya kamrai preparátumokon a farmakológiai módon előidézett korai (EAD, **45A. ábra**) vagy késői utódepolarizációs potenciálokat (DAD, **45B. ábra**), valamint a strophantin-nal provokált spontán depolarizáció által beindított kamrai extraszisztolés sorozatokat (**45C. ábra**). A GYKB-6635 vegyület pedig rendkívül hatékonyan kivédte az ouabain indukálta, vagyis szintén a DAD által triggerelt aritmiákat izolált tengerimalac szívekben (**46. ábra és 13. táblázat**).

Mivel mind az ORM-10103, mind a GYKB-6635 vegyületekről kimutattuk, hogy hatékony, de ugyanakkor szelektív NCX gátló vegyületek, azért alkalmassá váltak arra, hogy akár *in vitro* vagy *in vivo* aritmia vizsgálatokban is megvizsgáljuk hatékonyságukat. Azt a hipotézist, hogy az NCX gátlók alkalmasak lehetnek antiaritmiás szerként történő alkalmazásra Bers és Pogwizd fogalmazták meg tisztán elméleti megfontolások alapján. A Pogwizd hipotézis alapja a következő: *forward* módban az NCX cseremechanizmus 3 befelé haladó Na^+ -iont cserél ki egy kifelé haladó Ca^{2+} -ionra, és így egy nettó *inward* áramot eredményez (5. ábra), amely különösen megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint esetében elsősorban késői de bizonyos esetekben vélhetően korai utódepolarizációkat indukálhat (DAD és EAD). Hipotézisük szerint mindezt azt jelenti, hogy a *forward* NCX gátlásának antiaritmiás hatásának kellene lenni (Pogwizd, 2001 és 2003).

Közismert, hogy az EAD és DAD típusú utódepolarizációknak fontos szerepet tulajdonítanak az aritmogenézisben), különösen szívelégtelen állapotokban, amikor a kálium konduktancia csökkent és az NCX áram *upregulálódott*, mintegy elősegítve Ca^{2+} -tútelítődés talaján kialakuló DAD vagy EAD triggerelt aritmiák kialakulását (Yang, 1996; Volders, 2000; Pogwizd, 2001; 2002 és 2003).

Fentiek ellenére, az, hogy az NCX-gátlásnak mi lehet a terápiás vonzata, meglehetősen komplex kérdés. Az előbb említett Pogwizd hipotézis alapján természetesen egyaránt kamrában és pitvarban is mindenképpen hasznosíthatónak tűnik az NCX áram gátlása az EAD, de különösen a DAD triggerelt aritmiák kivédésére. Az NCX gátlás valószínűleg mindenképpen mérsékelni képes a Ca^{2+} -tútelítődés okozta károsító hatásokat, amelyek nem csak az előbb említett szívelégtelen állapotban, hanem pitvarfibrillációban vagy pitvari flutterben jöhetnek létre, amikor a pitvari remodelling hatására egyes K^+ -csatornák *downregulálódnak* (Van Wagoner, 1997; Yue, 1999), és az NCX áram ezzel ellentétesen *upregulálódik*. Természetesen meg kell említenünk azt is, hogy a *forward* NCX gátlás pozitív inotróp hatása javíthatja a miokardiális funkciót, és mint ilyen már önmagában is jótékony hatással rendelkezik.

Az akciós potenciál időtartamának az elején, amikor hirtelen megemelkedik az intracelluláris Na^+ szint, ugyanakkor az intracelluláris Ca^{2+} -szint még mindig alacsony értékű (nyugalmi szint közelében van), akkor az NCX mechanizmus fordított, *ún. reverz* módban működik (5. ábra), ami ezúttal egy nettó repolarizáló áramot vezet (Clark, 1996; Egger, 1999; Tóth, 2009). Fontos megjegyezni, hogy a *reverz* NCX áram is részt vehet az aritmogenézisben, mégpedig elsősorban az iszkémia/reperfúzió indukálta Ca^{2+} -tútelítődés talaján keletkezett ritmuszavarokban (Eigel, 2001; Baczkó, 2003 és 2004).

Ennek következtében felvetődött, hogy az NCX reverz módjának a gátlása szintén jótékony hatású lehet (Baczkó, 2003; Oravec, 2018).

Az a tény, hogy a GYKB-6635 vegyület hatékonyan kivédte az ouabain indukálta, vagyis vélhetően DAD triggerelt aritmiákat izolált tengerimalac szívekben, már önmagában is érdekes és új eredmény (**46. ábra és 13. táblázat**), ugyanis a korábban vizsgált NCX gátló vegyületeket (SEA-0400, KB-R7943, vagy akár ORM-10103) nem vizsgálták meg teljes szíven. Ez volt az első vizsgálat, amely kimutatta, hogy egy NCX gátló vegyület hatékonyan kivédi a farmakológiai módon indukált szívritmuszavarokat egy EKG paramétereket is regisztráló (ektópiás ütések, kamrai tachycardiát és kamrafibrillációt) *in situ* aritmiamodellben. Az előző pontnál már említettem, hogy egy időrendi sorrendben később folytatott kísérletsorozatban megvizsgáltunk egy másik hatékony és szelektív NCX gátló molekulát, az ORM-10962 vegyületet. Ellenőriztük az ORM-10962 hatását is *in vivo* altatott tengerimalac modellben is, és azt tapasztaltuk, hogy az ORM-10962 előkezelés szintén hatékonyan kivédte az ouabain indukálta ritmuszavarokat (Kohajda, 2016).

Megjegyzés: Az NCX vizsgálat projekt megbeszélését a következő kiegészítéssel szeretném ellátni. Az ORM-10103 vegyület vizsgálata **1998-2000** között történt az Orion Gyógyszergyár szerződéses megbízása alapján. **Mindez azt jelenti, hogy kísérleteink során még a Pogwizd és Bers által elméleti megfontolások alapján megfogalmazott hipotézis publikálása előtt igazoltuk** (Pogwizd, 2001 és 2003), **hogy az ORM-10103 hatékony és igen szelektív NCX gátlószer, és hogy az NCX gátlása hatékonyan kivédi a korai és utódepolarizációk által triggerelt aritmiákat** (lásd 39., 41., 42., 43. és 45. ábrák). A kísérletes anyagból **2000-ben** dolgozatot állítottunk össze, amelyet a British Journal of Pharmacology folyóiratban szerettünk volna publikálni. Sajnos a dolgozat publikálását az Orion Gyógyszergyár számunkra nem túl világos üzleti indokokra hivatkozva 2000-ben nem engedélyezte. Ezután megismételtük a kísérletsorozatot a SEA-0400 vegyülettel, de ezeket a kísérleteket már csak 2004-ben tudtuk befejezni és először publikálni (Nagy, 2004), amikor már megjelent a Pogwizd és Bers által (2001 és 2003) megfogalmazott elméleti hipotézis. Így abban a dolgozatban is, és az összes azt követő további NCX gátlószerrel ismertető munkánkban már úgy interpretáltuk eredményeinket, hogy igazoltuk a Pogwizd hipotézist. Az Orion Gyógyszergyár végül 2013-ban járult hozzá az ORM-10103 vegyület tulajdonságait bemutató első dolgozatunk publikálására.

Az NCX áram gátlása SEA-0400 vegyülettel szinusz ritmusos és permanens pitvarfibrilláló betegekben

Ez a kutatási téma valójában vegyesen a **3. és 4. témakörhöz** is kapcsolódik, ugyanis a vizsgálatok célja az volt, hogy tanulmányozzuk az NCX áram szerepét permanens pitvarfibrillációban. A **3. témakörnél** ismertetett fejezetekben részletesen tárgyaltam, hogy a permanens/krónikus pitvarfibrilláció (cAF), a pitvari remodellingnek nevezett jelenség következtében, jelentősen módosítja a cAF betegek pitvari szívműködésének elektromos aktivitását, amelyhez hozzátartozik az akciós potenciál jellege (rövidebb és triangulizált lesz), illetve számos AP-t meghatározó transzmembrán ionáram tulajdonságának a megváltozása is (lásd **3. ábra**; Dobrev, 2003). Amennyiben a pitvarfibrilláció makacsul visszatérővé (rekurrensé) válik, a szívnek adaptálódnia kell a magas pitvari frekvencia okozta változásokhoz. Ez indítja el az első adaptációs remodelling formát, az elektromos remodellinget. A pitvari tachycardia a kalcium háztartás megváltozása révén zavarja meg legjobban a stabil normális pitvari elektrofiziológiai működést. A magas frekvencia jelentősen lecsökkenti a pitvari effektív refrakter periódust, emiatt nincs elegendő idő, hogy az akciós potenciál plató és késői repolarizációs időtartama működő *forward* NCX áram eltávolítsa a citoszólban a kalcium indukálta kalcium felszabadulás jelenség (CICR) által felgyűlt jelentős mennyiségű intracelluláris kalciumot. A pitvarok megpróbálnak adaptálódni a megváltozott helyzethez, és kísérletes bizonyítékok állnak rendelkezésre, hogy gyakorlatilag már néhány órás vagy napos perzisztens AF hatására mintegy 60-70%-al lecsökken (*downregulálódik*) az L-típusú kalcium áram (I_{CaL} , Sun 1998; Christ, 2005), és felerősödik (*upregulálódik*) az NCX áram (Schotten, 2003a; El Armouche, 2006; Voigt, 2012) nagysága. Így próbálja a szervezet mérsékelni/helyrehozni a magas pitvari frekvencia által indukált Ca^{2+} -túltelítődés okozta károsodásokat. Ez a mechanizmus indítja majd be a pitvari remodelling következő fázisát, amelyet kontraktilis remodellingnek nevezünk, amely során megváltozik (lecsökken) a pitvari szívműködés kontraktilis pumpafunkciója is (Sun, 1998). A gyakorlati tapasztalat az, hogy ha beindul a kalcium homeosztázis remodellingje is, akkor az előbb említett adaptációs védekező mechanizmus nem tudja kivédeni a tachycardiát, aminek az eredménye az, hogy a hosszan pitvari tachycardia talaján megjelenik és állandósul a pitvarfibrilláció is (Allessie, 2002; Schotten, 2003b). Az előző fejezetben részletesen ismertetett Pogwizd hipotézis alapján, ennek a hátterében a CICR talaján megjelenő nettó *inward* áram miatt keletkezett késői depolarizációs utópotenciálok által triggerelt aritmiákat feltételezhetjük, mint gerjesztő mechanizmust (Pogwizd, 2001 és 2003). Más szóval a visszatérő rekurrens, de később az ennek a talaján kialakuló perzisztens

pitvarfibrilláció is elsősorban egy DAD alapú ritmuszavar, vagyis fenntartásában mindenképpen szerepet játszhat a sérült Ca^{2+} -homeosztázist szabályozó és remodellált (*upregulálódott*) NCX áram.

Fentiek alapján az NCX áram szerepének a tanulmányozása cAF-ben fontos vizsgálati célkitűzés. A vizsgálatokat Kovács Péter Pál PhD hallgatóm részvételével szintén az Ursula Ravens professzor asszony vezette drezdai munkacsoporttal végeztük kooperációban. Az NCX áram gátlására, és a humán pitvari akciós potenciálokra történő hatásának vizsgálatára ezúttal a viszonylag szelektív SEA-0400 (**38C. ábra**) vegyületet használtuk. *Amikor ez a kísérletsorozat készült (2010-2013) nem rendelkezünk a korábbi fejezetben ismertetett egyik Orion vegyületnek (ORM-10103 vagy ORM-10962) sem az ebben a projektben történő felhasználásának az engedélyével, ezért alkalmaztuk vizsgálatainkban a SEA-0400 vegyületet NCX-gátlószerként.*

A következő eredményeket kaptuk:

1. ***A SEA-0400 vegyület nem változtatta meg a pitvari trabekula izmokban regisztrált akciós potenciálok jelformáját (47A-47B. ábrák), a pitvari kontraktilitást, és a pitvari sejtekben ramp pulzusokkal (ún. Hobai és mtsai modell) regisztrált és Ni^{2+} -szenzitív áramként definiált forward és reverz NCX áramot (47C. ábra) sem SR, sem cAF betegekből származó pitvari mintákon.***

A SEA-0400 hatékonyságát igazolja, hogy hasonló kísérletes felállásban a vegyület lecsökkentette az NCX áramot patkány pitvari sejtekben. Mivel az NCX antiportert, a membránpotenciál és a Na^{+} és Ca^{2+} ionok koncentráció gradiense határozza meg, az NCX áram egy akciós potenciál alatti időlefutása meglehetősen bonyolult. Megértését néhány szimulációs modell segíti elő. Reverz módban az akciós potenciál korai repolarizációs szakaszában *outward* áramként működik, amely rövidíti, *forward* módban meg nettó *inward* áramként működik, amely viszont nyújtja az APD-t. Mindez azt jelentené, hogy az NCX gátlók ezzel ellentétes változásokat kellene okozzanak, vagyis korai fázisban megnyúlást, késői fázisban pedig rövidülést kellene regisztrálnunk. Ezért némileg meglepő eredményként tapasztaltuk a **47A-47B. ábrák**on látható eredményeket, amelyek azt mutatják be, hogy a SEA-0400 még az irodalmi adatok alapján magasnak mondható 10 μM -ban alkalmazva nem változtatta meg a pitvari akciós potenciál egyetlen paraméterét sem. Persze itt meg kell említenünk, hogy magas koncentrációkban a SEA-0400 vegyület elveszti szelektivitását és például jelentősen gátolja az I_{CaL} áramot (Birinyi, 2005).

Számos lehetséges magyarázatot lehetne találni, hogy miért nem tapasztaltunk semmilyen változást az AP paramétereken. A magyarázatok közül minden esetre kizárhatjuk azt, hogy kémiai inaktivitás vagy szívrégiók közötti eltérések okozták ezt a negatív eredményt, mivel előzetesen saját ellenőrző kontroll kísérletekben kimutattuk, hogy a SEA-0400 sikeresen rövidítette a patkány kamrai és pitvari APD-t. Ugyancsak irodalmi adatok bizonyították, hogy hasonló kísérletes felállásban (AP regisztrálás standard mikroelektroda technika segítségével multicelluláris preparátumokon) a SEA-0400 aktív vegyületként viselkedett kutya kamrai preparátumokon (Nagy, 2004). Mivel nem találtunk semmilyen technikai magyarázatot, felvetődött, hogy egy speciesbeli sajátosság szolgáltathat magyarázatot, vagyis lehetséges, hogy a pitvari szívizomzatban az NCX áram kevésbé fontos szerepet játszik, mint például patkányban. Természetesen figyelembe kell venni, hogy számos olyan irodalmi adatot ismerünk, amely egyértelműen dokumentálta az NCX áramnak a permanens pitvarfibrillációban játszott kórélettani szerepét, ezért ez a magyarázat nem tűnt különösebben plauzibilisnek (Schotten, 2003b; Voigt, 2012).

Ezért megvizsgáltuk a szer hatását közvetlenül az NCX áramra izolált sejteken az irodalomban széleskörűen használt, és elsőként Hobai és *mtsai* által publikált protokoll segítségével, amely szerint az NCX mindkét módját (*forward* és *reverz*) *ramp* feszültség protokollokkal aktiváltuk, és 10 mM Ni^{2+} -szenzitív áramként definiáltuk (Hobai, 1997). Ismereteink és irodalmi adatok alapján ez az első tanulmány, amely a natív NCX áramot tanulmányozza humán SR illetve cAF betegekből származó pitvari szívizomsejtekben. A standard feszültség *ramp* protokollal jelentős amplitúdójú Ni^{2+} -szenzitív áramot sikerült regisztrálnunk mindkét (SR és cAF) típusú humán pitvari sejtekben. Kiemelendő, hogy az NCX áram amplitúdója magasabb volt a cAF sejtekben, mint az SR sejtekben, vagyis a cAF hatására vélhetően az NCX áramot meghatározó csatornák *upregulálódnak*.

Meglepő módon a SEA-0400 az izolált sejteken végzett NCX árammérésekben is hatástalannak bizonyult, ugyanis nem változtatta meg sem az NCX áram nagyságát, sem a kinetikai tulajdonságait (**47C. ábra**). Ezúttal is, hogy kizárjuk a téves kísérlet (*artefaktum*) lehetőségét, ellenőrző kontroll kísérletekben sikerült kimutatnunk, hogy hasonló kísérletes felállásban (Ni^{2+} szenzitív NCX árammérés Hobai féle *ramp* protokollok segítségével) a SEA-0400 hatékonyan gátolta az NCX áramot patkány pitvari és kamrai szívizomsejtekben.

2. Egy másik kísérletes felállásban (ún. Hilgemann protokoll) a SEA-0400 koncentráció-függő módon gátolta az NCX áramot (48A-48B. és 48D. ábrák).

A kísérletek igazolták, hogy az NCX áram amplitúdója magasabb volt a cAF betegekből származó mintákban, mint az „SR sejtekben” (**48C-48E. ábrák**). Hogy igazoljuk a vegyület hatékonyságát, a Hilgemann protokoll (Hilgemann, 1992a és 1992b) segítségével is megvizsgáltuk a SEA-0400 vegyületet patkány pitvari és kamrai miocitákban is, és azt tapasztaltuk, hogy a SEA-0400 mindkét sejttypusban gátolta az NCX áramot. Ugyanakkor azt is tapasztaltuk, hogy az NCX áram amplitúdója magasabb volt pitvari sejtekben, mint a kamrai miocitákban (**48E. ábra**). Ezen kísérletsorozatot azért kezdeményeztük, mert a Hobai protokollokkal végzett eredménytelen kísérletsorozat után, az irodalmat is áttekintve felmerült az a gondolat, hogy a SEA-0400 vegyület NCX-gátló hatása függ az intracelluláris nátrium koncentrációtól, vagyis $[Na^+]_i$ -szenzitív. Ezért az idézett irodalmi adatok alapján tervezett kísérletes protokoll segítségével magas $[Na^+]_i$ és zéró mM $[Na^+]_e$, illetve zéró mM $[Ca^{2+}]_e$ körülmények mellett vizsgáltuk meg az NCX áram tulajdonságait.

Ezen speciális körülmények között magas amplitúdójú Ni^{2+} -szenzitív áramot lehetett regisztrálni akkor, amikor az extracelluláris oldatot gyorsan kicseréltük egy 1 mM $[Ca^{2+}]_e$ -ot is tartalmazó tápoldatra. Az értékeléshez csak a csúcsáramot tanulmányoztuk, az időfüggő kifejlődő tranziens áramot nem értékeltük. Az eredeti Hilgemann tanulmányhoz (1992a; 1992b) hasonlóan, az így regisztrált csúcsáramot *reverz* NCX áramként azonosítottuk. Amint az **48C-48E. ábrák**on láthatjuk az NCX áram amplitúdója magasabb volt a cAF sejtekben, mint az SR sejtekben, ami azt jelenti, hogy a Hilgemann protokoll kísérletes körülményei között is sikerült igazolni a korábbi molekuláris biológiai vizsgálatok adatait, amelyek kimutatták, hogy az NCX áramot meghatározó NCX1 gén mRNS és fehérje expressziója *upregulált* cAF-ben (Schotten, 2003a; El Armouche, 2006; Voigt, 2012).

Jelen vizsgálati körülmények között a SEA-0400 már koncentráció-függő módon gátolta a *reverz* NCX áramot (**48C-48D. ábrák**) mintegy igazolva, hogy ha speciális körülmények között is, de a SEA-0400 humán pitvari miocitákban is képes gátolni az NCX áramot. Az a tény, hogy nem membránpotenciál aktiválással, hanem csak a $[Na^+]_i$ koncentráció megemelésével (vagyis igencsak afiziológiás körülmények között) sikerült a SEA-0400 gátló hatását kimutatnunk azt jelenti, hogy a szer hatása erősen intracelluláris $[Na^+]_i$ függő. Ezt a spekulatív hipotézist megerősíti azon saját észrevételünk is, hogy a SEA-0400 a Hobai protokollal vizsgálva hatékonyan gátolta az NCX áramot patkány pitvari és kamrai szívizomsejtekben, egy olyan speciesben, amelyről ismert, hogy már fiziológiásan is eleve magasabb az intracelluláris Na-ion szint (≈ 17 mM; Levalle, 2014)

mint például kutyában vagy emberben (≈ 8 mM; Hoey 1994). Ezt a hipotézist egy a közelmúltban megjelent tanulmány is támogatja, amelyet NCX1.1 expresszált *Xenopus* oocyta rendszerben végeztek. Ebben a tanulmányban kimutatták, hogy a SEA-0400 dózis-hatás görbáját legalább fél logaritmus értékkel tolta el a magasabb érzékenység felé, amikor a $[Na^+]_i$ ion szintet 25 mM-ról 100 mM értékre emelték (Lee, 2014). Mindezt úgy összegezzük, hogy annak ellenére, hogy az NCX áram magasabb cAF betegekben, mint SR-ben, a SEA-0400 csak magas intracelluláris Na^+ -szint jelenlétében gátolja az NCX áramot.

3. **Az, hogy az NCX modulátorok lehetséges antiaritmiás szerek** a korábbi fejezetekben már kimutattam és részletesen tárgyaltam az ORM-10103 és GYKB-6635 vegyületek vizsgálata kapcsán, amikor külön kitértem, hogy az NCX gátlók minden olyan kamrai és pitvari ritmuszavarok kivédésére potenciálisan alkalmasak lehetnek, amelyek a DAD talaján keletkeznek, ezért itt nem diszkutálom tovább.

Eredményeinket úgy foglalhatjuk össze, hogy igazoltuk: *i)* az NCX áram egyértelműen expresszált az emberi pitvari szívizomzatban, és amplitúdója magasabb volt a cAF, mint a SR betegekben származó mintákban; *ii)* annak ellenére, hogy az NCX áram magasabb cAF betegekben, mint SR-ben, a SEA-0400 gátló hatása intracelluláris nátrium koncentráció-függő, vagyis konkrétan csak magas intracelluláris Na^+ -szint jelenlétében gátolja az NCX áramot.

Új eredeti tudományos eredmények összefoglalása és következtetések

Kardiovaszkuláris élet- és kóréletten jellegű vizsgálatok:

1. Elektrofiziológiai módszerekkel megvizsgáltuk az I_{Kr} és I_{Ks} áramnak a repolarizációban játszott szerepét különböző emlősszívekből (ember és kutya) származó kamrai preparátumokon. Megállapítottuk, hogy az I_{Kr} áram szelektív gátlása jelentősen és fordított frekvenciafüggő módon nyújtja meg valamennyi vizsgált speciesben az akciós potenciál időtartamát (APD) és ennek megfelelően az effektív refrakter periódust, amiből arra következtetünk, hogy az I_{Kr} a legfontosabb repolarizáló kamrai káliumáram. Ez a reverz frekvenciafüggő megnyújtó tulajdonság okozza az I_{Kr} gátlószerekre jellemző proaritmiás hatásokat, mint amilyen például a korai utódepolarizációs potenciál (EAD) szubsztrátumra épülő, életet veszélyeztető polimorf kamrai *Torsades de Pointes* típusú aritmia is. Az I_{Ks} ezzel szemben és a várakozásokkal ellentétben csak csekély mértékben nyújtotta meg az APD-t, ami azt jelenti, hogy az I_{Ks} csak kis mértékben járul hozzá közvetlenül a normál kamrai repolarizációhoz. Amennyiben az akciós potenciált (AP) előzetesen mesterségesen (farmakológiailag) megnyújtottuk, az I_{Ks} áram gátlása már jelentős repolarizáció megnyúlást eredményezett. Ebből arra következtetünk, hogy az I_{Ks} egy fontos tartalék áram szerepét játssza, ami segíthet megvédeni az akciós potenciált a káros, túlzott megnyúlástól.

2. Az előző vizsgálatot további repolarizáló áramokra is kiterjesztve (I_{K1} , I_{to}) megállapítottuk, hogy kutya, illetve emberi kamrai szívizmon egyféle típusú kálium csatorna szelektív gátlása önmagában extrém APD megnyúlást nem eredményez. Ha az I_{K1} vagy I_{Ks} áramot előzetesen, például szelektív I_{Kr} gátlással előidézett megnyújtott AP-on mértük, mindannyiszor extrém, sőt potenciálisan aritmogén korai utódepolarizáció (EAD) megnyúlást tapasztaltunk. Ez valószínűleg annak a következménye, hogy a különböző kálium csatornák képesek helyettesíteni és/vagy kiegészíteni egymás működését. A kutya és a humán kamrai szívizomsejtek repolarizációja túlbiztosított, vagyis erős „**repolarizációs tartalékkal**” rendelkeznek. Amikor ez a repolarizációs tartalék valamilyen oknál fogva sérül (gyógyszerhatás, szívbetegség okozta „*remodelling*”, fokozott szimpatikus aktivitás, genetikai rendellenesség, stb.) az egyébként csekély vagy mérsékelt kálium csatorna gátlás is okozhat már erőteljes és potenciálisan proaritmiás kamrai akciós potenciál megnyúlást. Az olyan gyógyszerek alkalmazása, amelyek egyszerre több kálium csatornát is gátolnak, feltehetően veszélyesebbek lehetnek, mint egyetlen adott specifikus kálium csatornát gátló szer használata. A gyógyszerek lehetséges QT intervallum növelő hatásának vizsgálatára

vonatkozó tesztek (például hERG vizsgálatok *high-throughput* rendszerekkel) érdekesnek tűnik átértékelni, és a különböző tesztek nemcsak érintetlen, hanem gyengített repolarizációs tartalékú preparátumokon is fontos lenne elvégezni.

3. Megállapítottuk, hogy a pitvarfibrillációban (AF) tapasztalt jelentős akciós potenciál változás („*elektromos remodelling*”) hátterében nemcsak a már korábbról ismert kalcium (I_{Ca}) és befelé egyenirányító káliumcsatornák (I_{K1}), hanem az acetilkolin szenzitív káliumáram ($I_{K,ACh}$) működésének jelentős átrendeződése is szerepet játszik. *In vitro* elektrofiziológiai módszerekkel („*single-channel*” patch-clamp) kimutattam, hogy AF-ben az $I_{K,ACh}$ áram előzetes ligandstimuláció nélkül is folyamatosan („*konstitutívan*”) aktív, így pitvarfibrillációban jelentős repolarizáló áramot szállít, amely hozzájárul az AF-re jellemző akciós potenciál időtartamnak a rövidüléséhez. Ez egyben azt is jelenti, hogy az $I_{K,ACh}$ áram modulálása (például gátlása) fontos gyógyszerátadási pont („*drug target*”) lehet AF-ben alkalmazható, proaritmia-mentes antiaritmias gyógyszerek kifejlesztéséhez.

4. Saját fejlesztésű tachypacelt AF kutyamodellben kimutattuk, hogy a pitvari I_{to} áram a lassú inaktivációs kinetika miatt a pitvari szívműködésben jelentősebb mértékben hozzájárulhat a késői repolarizációhoz, mint amelyet a kamrai szívműködésben kimutattak. A konstitutív $I_{K,ACh}$ megjelenése bizonyítja, hogy AF kutyamodellünkben a pitvari elektromos remodelling kialakult. A ligandfüggő és konstitutívan aktív $I_{K,ACh}$ áramok együttesen feltehetően fontos szerepet játszanak (legalábbis kutyában) az AF-re jellemző háromszög alakú, a fiziológiásnál is rövidebb akcióspotenciál-jelforma kialakításában. A ligand és ligandfüggetlen (konstitutíven aktív) $I_{K,ACh}$ áram szelektív gátlása sikeresen kivédte a burst ingerléssel kiváltott pitvarfibrillációs ritmuszavarokat.

5. Megállapítottam, hogy a kutya szívműködésében az akciós potenciál jelformája nem befolyásolja a repolarizációs fázist leginkább meghatározó I_{Kr} és I_{K1} áramok nagyságát az akciós potenciál időtartama alatt. Mindez azt jelenti, hogy az AP ciklushossz függő változásai nem befolyásolják az I_{Kr} és I_{K1} áram ciklushossz-függő tulajdonságait.

6. Igazoltuk, hogy az RL-3 racém vegyület két optikai enantiomerje valóban ellentétes hatással modulálja az I_{Ks} áramot. A jobbra forgató ZS_1270B vegyület az I_{Ks} áram hatékony aktivátora, míg a balra forgató enantiomer ZS_1271B pedig hatékonyan gátolja az I_{Ks} áramot. A két optikai enantiomer ráadásul hasonló koncentráció tartományban rendelkezik ezzel az ellentétes hatással. A jobbra forgató és I_{Ks} -áram aktiváló enantiomer vegyület (ZS_1270B) rövidítette, amíg a balra forgató és I_{Ks} -áram gátló enantiomer vegyület

(ZS_1271B) pedig megnyújtotta a tengerimalac akciós potenciál időtartamot. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a jobbra forgató és I_{Ks} -áram aktiváló enantiomer molekula (ZS_1270B) alkalmas tesztvegyület annak az ellenőrzésére, hogy az I_{Ks} aktivátorok valóban antiaritmiás szerek lehetnek olyan ritmuszavarokban, amelyek a megnyúlt akciós potenciálok talaján erednek (például EAD által triggerelt aritmiák).

7. Az I_{K1} áram DCM-es betegekből származó szívekből izolált miocitákban mind *inward*, mind *outward* tartományban nagyobb amplitúddal rendelkezik, mint az egészséges kontroll szívekből származó emberek szívéből izolált szívizomsejtekben, vagyis az áram jelentősen felülszabályozódik („*upregulálódik*”). Immunfluoreszcencia kísérleteink egyértelműen igazolják, hogy egyértelmű ko-lokalizáció mutatható ki a Kir2.1 és SAP97, illetve a Kir2.2 és SAP97 alegységek között. Fentiek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az asszociált Kir2.x és SAP97 alegységek megváltoznak a betegség alatt, ezért felvethető az a hipotézis, hogy a ko-lokalizált Kir2.x és SAP97 csatornák gyógyszerátadáspontok lehetnek a cardiomiopátia kezelésében.

Kardiovaszkuláris farmakológiai jellegű vizsgálatok:

8. Igazoltuk, hogy más speciesek (például kutya és patkány) pitvari és kamrai szívizomzatban hatékony NCX gátlószer, a SEA-0400 vegyület nem változtatta meg a szinuszritmusban és permanens pitvarfibrillációban szenvedő betegek szívéből származó humán pitvari trabekula izmokban regisztrált akciós potenciálok jelformáját, a pitvari kontraktilitást, és a pitvari sejtekben *ramp* pulzusokkal regisztrált és Ni^{2+} -szenzitív áramként definiált *forward* és *reverz* NCX áramot. Egy másik kísérletes felállásban a SEA-0400 koncentráció függő módon gátolta az NCX áramot, A kísérletek igazolták, hogy az NCX áram amplitúdója magasabb volt a cAF mint a SR betegekből származó mintákban. Ez a kísérletes megközelítés azt is igazolta, hogy annak ellenére, hogy az NCX áram magasabb cAF betegeken mint SR-ben, a SEA-0400 gátló hatása intracelluláris nátrium koncentráció függő, vagyis konkrétan csak magas intracelluláris Na^{+} -szint jelenlétében gátolja az NCX áramot.

9. *In vitro* elektrofiziológiai módszerekkel (standard mikroelektroda és patch-clamp technikák) megvizsgáltunk számos új potenciális antiaritmiás hatású tervezett molekulát. Megállapítottuk, hogy a GYKI-16638 és KC-8857 (tedisamil) kódjelű vegyületek különböző csatornákra kifejtett hatásuk révén kombinált multiccsatornagátló (I_{Na} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to}) antiaritmiás

hatásokkal rendelkeznek. Javasoltuk mindkét vegyületnek gyógyszerjelöltté történő továbbfejlesztését.

10. *In vitro* és *in vivo* elektrofiziológiai módszerekkel megvizsgáltuk egy új jódmertes amiodaronszerű gyógyszerjelöltnek, a dronedaronnak az akut és krónikus hatásait kutya modellen. Az amiodaron a klinikai gyakorlatban leginkább használt leghatékonyabb gyakorlatilag proaritmia-mentes antiaritmiás gyógyszer, viszont a jód jelenléte miatt számos extrakardiális mellékhatása miatt korlátozott az alkalmazhatósága. Megállapítottuk, hogy mind az akutan, mind a krónikusan alkalmazott dronedaron is rendelkezik az amiodaronra jellemző multicsatornagátló (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Ca} , I_{Na}) antiaritmiás hatásokkal, de mivel szerkezetéből hiányzik a jódatom, feltehetőleg nem rendelkezik majd az amiodaronra jellemző extrakardiális mellékhatásokkal, ezért feltétlen javasoltuk a fejlesztés további fázisaiban történő vizsgálatát.

11. *In vitro* elektrofiziológiai módszerekkel terápiás koncentrációban nyúlmodellben megvizsgáltam három régóta alkalmazott I/A osztályú antiaritmiás gyógyszer (disopyramid, kinidin és prokainamid) hatásait a különböző repolarizáló káliumáramokra. Megállapítottam, hogy bár valamennyien a Vaughan Williams féle klasszifikáció szerinti I/A csoportba tartoznak, mégis eltérő módon gátolják a különböző K^+ -áramokat. Ez magyarázatul szolgálhat a három szernek a klinikumban is ismert eltérő hatékonyságára.

12. Kutya kamrai preparátumokban igazoltuk, hogy két újonnan szintetizált szer, az ORM-10103 és GYKB-6635 vegyületek koncentráció-függő módon gátolják az NCX áramot mind *forward* mind *rezerv* módban. Mivel a két vegyület NCX-gátló hatása magasan szelektívnek is bizonyult, ezért mindkét szer alkalmas, hogy farmakológiai ágensként használva, megvizsgálhassuk az NCX áram szerepét a szív elektrofiziológiai hatásaira. A két vegyületet használva igazoltuk, hogy: *i*) a szelektív NCX gátlás alacsony, normál és magas frekvenciákon is megvizsgálva, nem változtatja meg a kamrai akciós potenciál jelformát és meghatározó paramétereit; *ii*) a szelektív NCX gátlás hatékonyan kivédte a farmakológiai módon kísérletesen indukált DAD és EAD alapú triggerelt aritmiákat kutya *in vitro*, illetve tengerimalac *in situ* modellben.

Zárógondolatok, avagy mit értem el több mint 20 év kardiovaszkuláris kutatómunka alatt (az 5 legfontosabb tudományos eredményem bemutatása)

Mint a Preambulumban is kifejtettem, MTA doktori értekezésem témája a Magyarországon, és a világ fejlettebb országaiban is egyaránt vezető halálokokként azonosított betegségcsoport leküzdése céljából elkészült mintegy 23 éves kardiovaszkuláris farmakológiai munkám összegzése. 1995-ben a SWORD tanulmány kudarcait ismertető évben kerültem a Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetébe. A SWORD és az, azt megelőző CAST I-II tanulmányok együttes kudarca miatt szorult vissza a konzervatív gyógyszeres terápiára épülő kardiológiai terápia alkalmazása. Az a tény, hogy két jelentős antiaritmiás hatás is (I és III-as osztályú szerek) is a „tiltott” zónába került szinte megbénította a szívritmuszavarokat addig elsősorban gyógyszerrel kezelő kardiológus szakorvosok munkáját. Ugyanakkor újult erővel indultak be az akadémiai és innovatív gyógyszerfejlesztő kutatóműhelyekben az új típusú antiaritmiás szerek kifejlesztése céljából végzett alap és alkalmazott kutatások. A kardiovaszkuláris antiaritmiás kutatások célpontja eltolódott a hatékony gyógyszerek azonosítása irányából a biztonságosan, az ún. „*safety pharmacology*” elvek alapján alkalmazható szerek irányába.

Ebbe a munkába kapcsolódtam be én is, amikor tagja lettem a Papp Gyula és Varró András professzor urak vezette kutatócsoportnak. Annak idején kevés információ állt a rendelkezésünkre, hogy egyáltalán merre is induljunk. A kutató fejlesztő munka tapogatódzva indult el, és először az volt a fontos, hogy megtudjuk, hogy mik okozzák az amúgy erős antiaritmiás hatással rendelkező nátrium és káliumcsatorna gátló szerek proaritmiás mellékhatásait. A kilencvenes évek végén, kétezres évek elején jelentek meg azok a tudományos közlemények, amelyek bemutatták, hogy milyen celluláris mechanizmusok állnak a hirtelen szívhalált (SCD) okozó olyan ritmuszavarok hátterében, mint a például a *Torsades de Pointes* aritmiák. Szintén a kétezres években kezdtük megérteni a különböző genetikai eredetű SCD-t okozó betegségeket, mint például a hosszú és rövid QT-, Brugada-, Andersen-Tawill *stb.* szindrómák. A jelentős alap és alkalmazott kutatási eredmények alapján végül a következő három új fejlesztési útvonal rajzolódott ki, mint lehetséges új antiaritmiás hatással rendelkező farmakológiai célpont:

- az I_{Ks} gátlók kifejlesztése, amelyet a Sanguinetti-Jurkiewicz hipotézis indított be.
- az amiodaron tagadhatatlan sikere miatt az amiodaron-szerű inkább *multichannel* gátló szerek (vagyis kevert nátrium-, kalcium- és káliumcsatorna gátló szerek).
- a kalcium homeosztázis zavarait csökkentő szerek, vagyis eleinte a Ca^{2+} -csatorna gátló, de később különösen a nátrium-kalcium cseremechanizmust (NCX) gátló szerek.

A mi kutatócsoportunk is mindhárom irányvonalban elindított és folytatott egyaránt alap és alkalmazott (konkrétan innovatív) kutatásokat. 1995-ben elkezdődött tudományos munkám során magam is részt vettem ebben a kutatómunkában, és a mintegy 180 oldalas MTA doktori értekezésemben ezeket mutattam be, mintegy „honnan indultam el 1995-ben, és hova érkeztem 2018-ban” formában. Zárógondolatként a következőképpen foglalhatnám össze eredményeimet:

1. Az I_{Ks} gátló molekulák megbuktak, nem alkalmasak arra, hogy proaritmia-mentes hatékony antiaritmiás szerként alkalmazzuk ezeket. A Sanguinetti-Jurkiewicz hipotézis bár megfogalmazásakor igen plauzibilis volt, sajnos tévesnek bizonyult. Számos I_{Ks} gátló molekulát vizsgáltunk meg (chromanol 293B, L-735,821 és HMR-1556), és megállapítottuk, hogy az I_{Ks} gátlás nem nyújtja meg az repolarizációt (QTc/APD₉₀), ezért nem alkalmazhatóak reverz frekvenciafüggetlen III-as típusú antiaritmiás szerként. Ezen vizsgálatok elvégzésekor azonosítottuk a repolarizációs tartalék fogalmát, és megvilágítottuk, hogy: i) milyen celluláris mechanizmusok biztosítják a kamrai repolarizációt; ii) milyen külső vagy belső tényezők illetve körülmények között gyengül meg vagy omlik össze a repolarizációs tartalék, amelynek eredményeképpen *Torsades de Pointes* aritmiák keletkeznek. Igazoltuk, hogy az I_{Ks} áram ennek a repolarizációs tartaléknak a legfontosabb eleme („key player”), és nemhogy gátolni, hanem inkább erősíteni (I_{Ks} aktivátorok) kell, hogy kivédjük az aritmiákat. Ezen munkákat több Scimago/D1 minősítésű vezető tudományos folyóiratokban publikáltuk (Circulation, J Physiol, Cardiovasc Res és Br J Pharmacol). A dolgozatokra, amelyek együttesen is több mint 450 független idézetet hoztak, három Editorial (szerkesztői méltatás) is érkezett. Elmondható, hogy a repolarizációs tartalék fogalmát ma úgy tanítják, hogy igaz, hogy Dan Roden vezette be, de a gyakorlatban a szegedi iskola bizonyította be létezését, különösen annak „safety pharmacology” jelentőségét. 2007-ben ezen munka elismeréseként részesültem a Sanofi-Aventis szakmai kutatási díjában.
2. Részt vettem az amiodaron kongéner vegyület, dronedaron vizsgálatában. A dronedaron jelentős sikert elérő (pitvarfibrilláció kezelésére javallott) gyógyszerként robbant be a CAST/SWORD időszak utáni elveknek is megfelelni akaró újonnan kifejlesztett innovatív antiaritmiás szerek palettájába. Tény, hogy a kezdeti biztató sikerek után több klinikai vizsgálat kimutatta néhány súlyos hiányosságát is, ezért klinikai alkalmazása az utóbbi 3 évben megjelent AHA és ESC Guideline-ok alapján visszaszorulni látszik. A dronedaron elektrofiziológiai profilját bemutató dolgozatunk szintén D1-es lapban (Br J Pharmacol) jelent meg, és már közel 100 független idézetet kapott.

3. Számos új antiaritmiás hatású gyógyszerjelölt vegyület fejlesztésében és preklinikai jellegű elektrofiziológiai vizsgálatában vettem részt, amelyek elsősorban szintén a *multichannel*-amiodaronszerű fejlesztési elvhez kapcsolódnak. Ezek közül kiemelendő az értekezésben is bemutatott tedisamil és GYKI-16638. Ezeket a vizsgálatokat Q1-es minősítésű tudományos folyóiratban megjelent dolgozatokban publikáltuk.
4. Új fejlesztésű szelektív és hatékony NCX gátló molekulák segítségével egyértelműen igazoltuk, a korábban Pogwizd és Bers (2001) által empirikus számítások alapján felvetett hipotézist, hogy az NCX gátlás rendelkezik azzal a képességgel, hogy bizonyos aritmiafajtákban csökkentse az aritmogén triggerként funkcionáló korai- és utódepolarizációs potenciálokat (EAD és DAD). Az ORM-10103 NCX gátlószer tulajdonságait bemutató D1 minősítésű lapban (Br J Pharmacol) megjelent dolgozatunk szintén Editorialban méltatták, és 5 év alatt 21 független idézetet kapott. Véleményünk szerint a következő 2 évtizedben minden esély megvan arra, hogy megjelenjenek az NCX gátlása alapján működő első kardioaktív (antiaritmiás) szerek.
5. Végezetül, mintegy a három előbb említett fejlesztési útvonalat szintetizáló független kutatási témaként meg kell, hogy említsem a pitvarfibrilláció (AF) témakörben végzett kutatási eredményeimet is. Drezdai kollaborációs munkatársaimmal együtt egyértelműen igazoltam, hogy a hosszan tartó permanens pitvarfibrilláció alatt minden egyéb stimuláció nélkül megnyílik és ún. konstitutíven aktívvá válik a G-protein aktiválta acetilkolin-szenzitív K^+ -áram ($I_{K,ACh}$). Kísérletesen igazoltuk, hogy a konstitutívan aktív $I_{K,ACh}$ részt vesz a pitvari remodelling okozta elváltozásokban, és ennek következtében az AF fennmaradásában, ami felvetette azt a gondolatot, hogy gátlása antiaritmiás gyógyszerátadáspont lehet. Később, egy külön munkában kísérletesen igazoltuk, hogy az $I_{K,ACh}$ gátlása hatékonyan kivédi a pitvarfibrillációt. A témából publikált Circulation dolgozatunk már közel 220 független idézetet kapott.

Tehát mintegy összefoglalásként azt mondhatom el, hogy az elmúlt 23 évben munkatársaimmal együtt aktív részese voltam az antiaritmiás gyógyszerek terén az alap és alkalmazott innovatív kutatási téma fő sodrának. Jelentős, nemzetközi szinten is jegyzett eredményeket sikerült elérnem és publikálnom. Munkám során négy sikeresen védett Egyetemi doktori (PhD) értekezés témavezetője voltam, illetve nyolc olyan hazai és nemzetközi tudományos projekt témavezetését láttam el, amelynek összköltségvetése 300 millió Ft felett volt.

Irodalomjegyzék

1. Abi-Char J, El-Haou S, Balse E, Neyroud N, Vranckx R, Coulombe A, Hatem SN (2008). The anchoring protein SAP97 retains Kv1.5 channels in the plasma membrane of cardiac myocytes. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 294:H1851-H1861.
2. Acsai K, Kun A, Farkas AS, Fülöp F, Nagy N, Balázs M et al. (2007). Effect of partial blockade of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger on Ca^{2+} handling in isolated rat ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 576:1-6.
3. Adaikan G, Beatch GN, Lee TL, Ratnam SS, Walker MJA (1992). Antiarrhythmic actions of tedisamil: studies in rats and primates. *Cardiovasc. Drug Ther* 6: 345-352.
4. Akar FG, Wu RC, Deschenes I, Armoundas AA, Piacentino V 3rd, Houser SR, Tomaselli G (2004). Phenotypic differences in transient outward K^+ -current of human and canine ventricular myocytes: insights into molecular composition of ventricular I_{to} . *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 286:H602-H609.
5. Allessie M, Ausma J, Schotten U (2002). Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54:230-246.
6. Anderson KP, Walker R, Dustman T, Lux RL, Ershler PR, Kates RE, Urie PM (1989). Rate-related electrophysiologic effects of long-term administration of amiodarone on canine ventricular myocardium *in vivo*. *Circulation* 79:948-958.
7. Antoons G, Willems R, Sipido KR (2012). Alternative strategies in arrhythmia therapy: evaluation of Na/Ca exchange as an antiarrhythmic target. *Pharmacol Ther* 134:26-42.
8. Antzelevitch C, Sun ZQ, Zhang ZQ, Yan GX (1996). Cellular and ionic mechanisms underlying erythromycin-induced long QT intervals and Torsades de Pointes. *J Am Coll Cardiol* 28:1836-1848.
9. Anumonwo JM, Lopatin AN (2010). Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 48:45-54.
10. Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M, Ojeda C (1979). The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 379:137-142.
11. Barthelemy, G, Faure F, Lignon S, Richaud JP, Boussac N, Cazaubon, C, Gautier P, Nisato D (1998a). Electrocardiographic, cardiovascular and sympatholytic action of dronedarone, a new antiarrhythmic agent, in conscious dogs. *J Mol Cell Cardiol* 30:A3, 2.
12. Barthelemy, G, Faure F, Lignon S, Richaud JP, Boussac N, Cazaubon, C, Gautier P, Nisato D (1998b). Hemodynamics, electrocardiographic and sympatholytic action of amiodarone in conscious dogs. *J Mol Cell Cardiol* 30:A3, 1.
13. Baczkó I, Giles WR, Light PE (2003). Resting membrane potential regulates $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange-mediated Ca^{2+} -overload during hypoxia-reoxygenation in rat ventricular myocytes. *J Physiol Lond* 550:889-898.
14. Baczkó I, Giles WR, Light PE (2004). Pharmacological activation of plasma-membrane KATP channels reduces reoxygenation-induced Ca^{2+} overload in cardiac myocytes via modulation of the diastolic membrane potential. *Br J Pharmacol* 141:1059-1067.
15. Beatch GN, Abraham S, MacLeod BA, Yoshida NR, Walker MJA (1991). Antiarrhythmic properties of tedisamil (KC-8857), a putative transient outward K^+ current blocker. *Br. J. Pharmacol* 102:13-18.
16. Beatch GN, MacLeod BA, Abraham S, Walker MJA (1990). The *in vivo* electrophysiological actions of the new potassium channel blockers, tedisamil and UK 68,798. *Proc West Pharmacol Soc* 33:5-8.
17. Belles B, Malécot CO, Hescheler J, Trautwein W (1988). "Run-down" of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflügers Arch* 411:353-360.
18. Bers DM (2002a). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(6868):198-205.
19. Bers DM (2002b). Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci* 7: d1697-d1711.
20. Bers DM, Weber CR (2002c). Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 976:500-512.

21. Bers DM (2002d). Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference? *J Mol Cell Cardiol* 34:369-373.
22. Birinyi P, Acsai K, Bányász T, Tóth A, Horváth B, Virág L, et al. (2005). Effects of SEA-0400 and KB-R7943 on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current and L-type Ca^{2+} current in canine ventricular cardiomyocytes. *N-S Arch Pharmacol* 372:63-70.
23. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V (1999). Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 44:121-131.
24. Bosch RF, Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR, Nattel S (1998). Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow component of the delayed rectifier K^+ current on repolarisation in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 38:441-450.
25. Bril A, Gout B, Bonhomme M, Landais L, Faivre JF, Linee P, Poyser RH, Ruffolo RR Jr (1996). Combined potassium and calcium channel blocking activities as a basis for antiarrhythmic efficacy with low proarrhythmic risk: experimental profile of BRL-32872. *J Pharmacol Exp Therap* 276:637-646.
26. Brundel BJ, van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Deelman LE, Tieleman R et al (1999). Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 42:443-454.
27. Burstein B, Qi XY, Yeh YH, Calderone A, Nattel S (2007). Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: a novel consideration in atrial remodeling. *Cardiovasc Res* 76:442-452.
28. Caillet C, Chauvelot-Moachon L, Montastruc JL, Bagheri H; French Association of Regional Pharmacovigilance Centers (2012). Safety profile of enantiomers vs. racemic mixtures: it's the same? *Br J Clin Pharmacol* 74:886-889.
29. Campbell TJ (1983a). Kinetics of onset of rate-dependent effects of Class I antiarrhythmic drugs are important in determining their effects on refractoriness in guinea-pig ventricle, and provide a theoretical basis for their subclassification. *Cardiovasc Res* 17:344-352.
30. Campbell TJ (1983b). Resting and rate-dependent depression of maximum rate of depolarisation ($V_{\max}$) in guinea pig ventricular action potentials by mexiletine, disopyramide, and encainide. *J Cardiovasc Pharmacol* 5:291-296.
31. Carmeliet E (1993). Use-dependent block of the delayed K^+ current in rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther Suppl* 3:599-604.
32. Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Chartier D, Leung TK, Nattel S (2005). Atrial tachycardia remodeling of pulmonary vein cardiomyocytes: comparison with left atrium and potential relation to arrhythmogenesis. *Circulation* 111:728-735.
33. Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, Nattel S (2004). Dissociation between ionic remodeling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation* 109:412-418.
34. Chen YJ, Chen SA, Chen YC, Yeh HI, Chan P, Chang MS, Lin CI (2001). Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation. *Circulation* 104:2849-2854.
35. Chinn K (1993). Two delayed rectifiers in guinea-pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 264:553-560.
36. Choudhury L, Grais IM, Passman RS (1999). Torsades de pointes due to drug interaction between disopyramide and clarithromycin. *Heart Dis* 1:206-207.
37. Choi HS, Eisner DA (1999). The effects of inhibition of the sarcolemmal Ca-ATPase on systolic calcium fluxes and intracellular calcium concentration in rat ventricular myocytes. *Pflügers Archiv* 437: 966-971.
38. Christ T, Boknik P, Wöhrle S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF et al (2004). Reduced L-type Ca^{2+} current density in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation* 110:2651-2657.
39. Clark RB, Bouchard RA, Giles WR (1996). Action potential duration modulates calcium influx, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange, and intracellular calcium release in rat ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 779:417-429.
40. Cole WC, McPherson CD, Sontag D (1991). ATP-regulated K^+ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* 69:571-581.

41. Conolly SJ (1999). Evidence-based analysis of amiodarone efficacy and safety. *Circulation* 100:2025-2034.
42. Coraboeuf E, Deroubaix E, Escande D, Coulombe A (1988). Comparative effects of three class I antiarrhythmic drugs on plateau and pacemaker currents of sheep cardiac Purkinje fibres. *Cardiovasc Res* 22:375-384.
43. Coraboeuf E, Carmeliet E (1982): Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Archiv*, 392:352-359.
44. Coumel P, Attuel P, Lavallée J, Flammang D, Leclercq JF, Slama R (1978). Syndrome d'arythmie auriculaire d'origine vagale. *Arch Mal Coeur* 6:643-656.
45. Coyle JD, Carnes CA, Schaal SF, Muir WW 3rd (1992). Electrophysiologic interactions of procainamide and N-acetylprocainamide in isolated canine cardiac Purkinje fibers. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:197-205.
46. Curtis MJ, Hancox JC, Farkas A, Wainwright CL, Stables CL, Saint DA et al (2013). The Lambeth Conventions (II): guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacol Therapeut* 139:213- 248.
47. Csanády M, Faragó M, Forster T, Hőgye M, Piros Gy (1991). Study of the course of inheritance of dilated familial cardiomyopathy. *Eur Heart J* 12:191.
48. Daleau P, Khalifa M, Turgeon J (1997). Effects of cadmium and nisoldipine on the delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 281:826-833.
49. Darpö B, Almgren O (1996): Almokalant - a selective Class III antiarrhythmic compound. *Cardiovasc Drug Rev* 14:60-83.
50. Dhamoon AS, Jalife J (2005). The inward rectifier current (I_{K1}) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2:316-324.
51. Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, et al (2004). Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K^+ current. *Circ Res* 94:1332-1339.
52. Dobrev D, Ravens U (2003). Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 98:137-148.
53. Dobrev D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schüler S, Ravens U (2002). Human inward rectifier potassium channels in chronic and postoperative atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54:397-404.
54. Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hála O, Doerfel C et al (2001). Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K1 current ($I_{K,ACH}$) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced $I_{K,ACH}$ and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 104:2551–2557.
55. Dorian P, Burns M, Mitchell J, Qi X, Newman D (1999). Azimilide effect on ventricular action potential duration is maintained at very high rates in humans. *Circulation* 100:I-794.
56. Drici MD, Barhanin J (2000). Cardiac K^+ channels and drug-acquired long QT syndrome. *Therapie* 55:185-193.
57. Drici MD, Diochot S, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000b). The bee venom peptide tertiapin underlines the role of $I_{K,ACH}$ in acetylcholine-induced atrioventricular blocks. *Br J Pharmacol* 131:569-577.
58. Duan D, Fermini B, Nattel S (1993). Potassium channel blocking properties of propafenone in rabbit atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 264:1113-1123.
59. Dukes ZD, Morad M (1989). Tedisamil inactivates transient outward K^+ current in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 257:H1746-H1749.
60. Dukes ZD, Cleeman L, Morad M (1990). Tedisamil blocks the transient and delayed K^+ currents in mammalian cardiac and glial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 254:560-569.
61. Egger M, Ruknudin A, Lipp P, Kofuji P, Lederer WJ, Schulze DH, Niggli E (1999). Functional expression of the human cardiac Na^+/Ca^{2+} exchanger in Sf9 cells: rapid and specific Ni^{2+} transport. *Cell Calcium* 25:9-17.
62. Eigel BN, Hadley RW (2001). Antisense inhibition of Na^+/Ca^{2+} exchange during anoxia/reoxygenation in ventricular myocytes. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 281:H2184-H2190.

63. Ehrlich JR, Cha TJ, Zhang L, Chartier D, Villeneuve L, Hébert TE, Nattel S (2004). Characterization of a hyperpolarization-activated time-dependent potassium current in canine cardiomyocytes from pulmonary vein myocardial sleeves and left atrium. *J Physiol* 557:583-589.
64. Eisner DA, Choi HS, Diaz ME, O'Neill SC, Trafford AW (2000). Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ Res* 87(12): 1087-1094.
65. El Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, Carrier L, Knaut M, Ravens U, Dobrev D (2006). Molecular determinants of altered Ca^{2+} handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation* 114:670-680.
66. El-Haou S, Balse E, Neyroud N, Dilanian G, Gavillet B, Abriel H, et al (2009). Kv4 potassium channels form a tripartite complex with the anchoring protein SAP97 and CaMKII in cardiac myocytes. *Circ Res* 104:758-769.
67. El-Sherif N (1992). The proarrhythmic mechanism of drugs that prolong repolarisation. Role of early afterdepolarisation. *New Trends in Arrhythmias* 8:617-626.
68. Elias CL, Lukas A, Shurraw S, Scott J, Omelchenko A, Gross GJ, Hnatowich M, Hryshko LV (2001). Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange by KB-R7943: transport mode selectivity and antiarrhythmic consequences. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 281:H1334-H1345.
69. Faivre JF, Rouanet S, Bril A (1998). Comparative effects of glibenclamide, tedisamil, dofetilide, E-4031, and BRL-32872 on protein kinase A-activated chloride current in guinea pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:551-557.
70. Fazekas T (2008). Amiodaron - dronedaron? *Cardiol Hung* 38(Suppl A):46-51.
71. Fazekas T, Solti F (1999a). A szerzett hosszú QT-szindróma és a *Torsades de Pointes* kamrai tachycardia. In: *Klinikai szív-elektrofiziológia és aritmológia*. Fazekas T, Papp Gy, Tenczer J (Szerk.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 17. Fejezet, pp 387-417.
72. Fazekas T, Vos MA, van der Zande J, Leunissen JDM, Liskai G, Wellens HJJ (1999b). Az interventricularis repolarizációs diszperzió-növekedés szerepe az ibutilid által előidézett monomorf és *Torsades de Pointes* kamrai tachycardia kialakulásában. *Cardiol Hung* 29:159-168.
73. Fazekas T, Carlsson L, Scherlag BJ, Mabo Ph, Poty H, Palmer M, et al (1996). Electrophysiologic and inotropic characterization of a novel Class III antiarrhythmic agent, GLG-V-13, in the mammalian heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 28:182-191.
74. Fazekas T, Scherlag BJ, Mabo Ph, Patterson E, Lazzara R (1994). Facilitation of reentry by lidocaine in canine myocardial infarction. *Am Heart J* 127:345-352.
75. Finance O, Planchenault J, Bethegenies S, Ricaud JP, Gautier P, Nisato D (1998). Electrophysiological and haemodynamic effects of a new amiodarone like agent following acute and chronic oral treatment in anaesthetised dogs. *J Mol Cell Cardiol* 30:A251.
76. Fischbach PS, Barrett TD, Goyal R, Tran BC, Syed ZA, Hennen JK, Lucchesi BR (2001). Conversion of atrial fibrillation by the experimental antiarrhythmic drug tedisamil in two canine models. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12:1138-1144.
77. Fischbach PS, Johnston PV, Friedrichs GS, Lucchesi BR (1999). Tedisamil in a chronic canine model of atrial flutter. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:212-218, 1999.
78. Flores NA (2001). Tedisamil (Solvay). *Curr Opin Investig Drugs* 2:97-103.
79. Fox KM, Henderson JR, Kaski JC, Sachse A, Kuester L, Wonnacott S (2000). Antianginal and antiischaemic efficacy of tedisamil, a potassium channel blocker. *Heart* 83:167-171.
80. Friedrichs GS, Abreu JN, Driscoll EM Jr, Borlak J, Lucchesi BR (1998). Antifibrillatory efficacy of long-term tedisamil administration in a postinfarcted canine model of ischemic ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:56-66.
81. Friedrichs GS, Abreu JN, Cousins GR, Chi L, Borlak J, Lucchesi BR (1996). Tedisamil attenuates ventricular fibrillation in a conscious canine model of sudden cardiac death. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1:313-324.
82. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 582:675-693.
83. Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G et al (2005). Human atrial ion channel and transporter subunit geneexpression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 112:471-481.

84. Geelen P, O'Hara GE, Roy N, Talajic M, Roy D, Plante S, Turgeon J (1999). Comparison of propafenone versus procainamide for the acute treatment of atrial fibrillation after cardiac surgery. *Am J Cardiol* 84:345-347.
85. Gerlach U, Brendel J, Lang HJ, Paulus EF, Weidmann K, Brüggemann A et al (2001). *J Med Chem* 44:3831-3837.
86. Giles WR, Imaizumi Y (1988). Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 405:123-145.
87. Gintant GA, Limberis JT, McDermott JS, Wegner CD, Cox BF (2001). The canine Purkinje fiber: an in vitro model system for acquired long QT syndrome and drug-induced arrhythmogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 37: 607-618.
88. Gintant GA (2000) Characterization and functional consequences of delayed rectifier current transient in ventricular repolarization. *Am J Physiol Heart-Circ Physiol* 278:H806-H817.
89. Gintant GA (1996). Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle. Does I_{Ks} play a role in the reverse rate dependence of class III agents? *Circ Res* 78:26-37.
90. Girmatsion Z, Biliczki P, Bonauer A, Wimmer-Greinecker G, Scherer M, Moritz A et al (2009). Changes in microRNA-1 expression and I_{K1} upregulation in human atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 6:1802-1809.
91. Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Rücker-Martin C, Goyenvalle C, Abdelshafy S et al (2002). Expression, regulation and role of the MAGUK protein SAP-97 in human atrial myocardium. *Cardiovasc Res* 56:433-442.
92. González E, Ledesma de Paolo MI, Celener D, Celener FP, Rosembeck G, Panzitta MT, Bustos Fernández L (1993). The effect of different lactic acid isomers in the colon of rats. *Acta Gastroenterol Latinoam* 23:203-210.
93. Gough WB, El-Sherif N (1989): The differential response of normal and ischaemic Purkinje fibres to clofilium, d-sotalol and bretylium. *Cardiovasc Res* 23:554-559.
94. Grohs JG, Fischer G, Raberger G (1989). Cardiac and hemodynamic effects of the selective bradycardic agent KC 8857 during exercise-induced myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol* 161:53-60.
95. Gögelein H, Brüggemann A, Gerlach U, Brendel J, Busch AE (2000). Inhibition of I_{Ks} channels by HMR 1556. *N-S Pharmacol* 362:480-488
96. Hua F, Gilmour RF (2004). Contribution of I_{Kr} to rate-dependent action potential dynamics in canine endocardium. *Circ Res* 94:810-819.
97. Harris L, McKenna WJ, Rowland E, Holt DW, Storey GCA, Krikler DM (1983). Side effects of long-term amiodarone therapy. *Circulation* 67:45-51.
98. Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N (2006). Tertiapin, a selective I_{KACH} blocker, terminates atrial fibrillation with selective atrial effective refractory period prolongation. *Pharmacol Res* 54:136-141.
99. Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N (2008). Characterization of *in vivo* and *in vitro* electrophysiological and antiarrhythmic effects of a novel I_{KACH} blocker, NIP-151: a comparison with an I_{Kr} -blocker dofetilide. *J Cardiovasc Pharmacol* 51:162-169.
100. Heath BM, Terrar DA (1996). The deactivation kinetics of the delayed rectifier components I_{Kr} and I_{Ks} in guinea pig ventricular myocytes. *Exp Physiol* 81:605-621.
101. Heidbüchel H, Vereecke J, Carmeliet E (1990). Three different potassium channels in human atrium: contribution to the basal potassium conductance. *Circ Res* 66:1277-1286.
102. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90:291-366.
103. Hilgemann DW, Matsuoka S, Nagel GA, Collins A (1992a). Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. *J Gen Physiol* 100:905-932.
104. Hilgemann DW, Collins A, Matsuoka S (1992b). Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J Gen Physiol* 100:933-961.
105. Hilleman DE, Mooss AN (2010). Role of dronedarone in atrial fibrillation: more questions than answers. *Pharmacotherapy* 30:867-871.

106. Hirano Y, Hiraoka M (1986). Changes in K^+ currents induced by Ba^{2+} in guinea pig ventricular muscles. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 251:H24-H33.
107. Hobai IA, Bates JA, Howarth FC, Levi, AJ (1997). Inhibition by external Cd^{2+} of Na/Ca exchange and L-type Ca channel in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 272:H2164-H2172.
108. Hoey A, Amos GJ, Ravens U (1994). Comparison of the action potential prolonging and positive inotropic activity of DPI 201-106 and BDF 9148 in human ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 26:985-994.
109. Hof RP, Rüegg UT, Hof A, Vogel A (1985). Stereoselectivity at the calcium channel: opposite action of the enantiomers of a 1,4-dihydropyridine. *J Cardiovasc Pharmacol* 7:689-693.
110. Hohnloser SH, Crijns HJgm, Van Eickels, et al for the ATHENA Investigators (2009). Effect of dronedarone on cardiovascular events in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 360:688-678.
111. Hohnloser SH, Woosley RL (1994). Sotalol. *N Engl J Med* 331:31-38.
112. Hondeghem LM, Snyders DJ (1990). Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation* 81:686-690.
113. Huang Ti Nei Ching Su Wên (2002). from The Yellow Emperor's Classic of Internal Medicine (Ed. Ilza Veith). pp 260, University of California Press, Berkeley, USA, ISBN 0-520-22936-3.
114. Imaizumi Y, Giles WR (1987). Quinidine-induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 253:H704-H708.
115. Iost N, Virág L, Opincariu M, Szécsi J, Varró A, Papp JGy (1998). Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 40:508-515.
116. Iwamoto T (2004). Forefront of Na^+/Ca^{2+} exchanger studies: molecular pharmacology of Na^+/Ca^{2+} exchange inhibitors. *J Pharmacol Sci* 96:27-32.
117. Jost N (2009). Transmembrane ionic currents underlying cardiac action potential in mammalian hearts. In: *Advances in cardiomyocyte research*. Ed. Péter P. Nánási. Transworld Research Network, Tivandrum, Kerala, India. p. 1-45.
118. Jefferies JL, Towbin JA (2010). Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 375:752-762.
119. Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM (1984). Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 54:157-162.
120. Juhász V, Hornyik T, Benák A, Nagy N, Husti Z, Papp R et al (2018). Comparison of the effects of $I_{K,ACh}$, I_{Kr} and I_{Na} block in conscious dogs with atrial fibrillation and on action potentials in remodeled atrial trabeculae. *Can J Physiol Pharmacol* 96:18-25.
121. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC (1993). Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methansulfonanilide Class III antiarrhythmic agent: specific block of rapidly activating delayed rectifier K^+ current by dofetilide. *Circ Res* 71:75-83.
122. Kääh S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ et al (1998). Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in $Kv4.3$ mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 98:1383-1393.
123. Kääh S, Nuss HB, Chiamvimonvart N, O'Rourke B, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF (1996). Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs
124. Katritsis D, Morgan J, Brachmann J, Bygrave A, O'Farrell D, Rowland E, Camm AJ (1997). Electrophysiological effects of E 4031, a drug with selective Class III properties, in man. *PACE* 20:930-937.
125. Kato R, Venkatesh N, Kamiya K, Yabek S, Kannan R, Singh BN (1988). Electrophysiologic effects of desethylamiodarone, an active metabolite of amiodarone: comparison with amiodarone during chronic administration in rabbits. *Am Heart J* 115:351-359.
126. Kennedy JI Jr (1990). Clinical aspects of amiodarone pulmonary toxicity. *Clin Chest Med* 11:119-129.
127. Kitamura H, Yokoyama M, Akita H, Matsushita K, Kurachi Y, Yamada M (2000). Tertiapin potently and selectively blocks muscarinic K channels in rabbit cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 293:196-205.
128. Kneller J, Zou R, Vigmond EJ, Wang Z, Leon LJ, Nattel S (2002). Cholinergic atrial fibrillation in a computer model of a two-dimensional sheet of canine atrial cells with realistic ionic properties. *Circ Res* 90:E73-E87.

129. Kodama I, Kamiya K, Toyama J (1997). Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res* 35:13-29.
130. Kohajda Z, Farkas-Morvay N, Jost N, Nagy N, Geramipour A, Horváth A, et al (2016). The effect of a novel highly selective inhibitor of the sodium/calcium exchanger (NCX) on cardiac arrhythmias in in vitro and in vivo experiments. *PLoS One* 11(11):e016604.
131. Koumi S, Backer CL, Arentzen CE (1995). Characterization of inwardly rectifying K⁺ channel in human cardiomyocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92:164-174.
132. Kurachi Y (1985). Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart. *J Physiol* 366:365-385.
133. Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS et al (1999). Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban. *J Am Coll Cardiol* 33:1231-1237.
134. Lazzara R (1996): From first class to third class: recent upheaval in antiarrhythmic therapy lessons from clinical trials. *Am J Cardiol* 78 (Suppl. 4A): 8-33.
135. Lazzara R (1989). Amiodarone and torsade de pointes. *Ann Intern Med* 111:549-555.
136. Lee C, Visen NS, Dhalla NS, Le HD, Isaac M, Choptiany P et al (2004). Inhibitory profile of SEA0400 [2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline] assessed on the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX1.1. *J Pharmacol Exp Ther* 311:748-757.
137. Lengyel C, Varró A, Tábori K, Papp JG, Baczkó I (2007). Combined pharmacological block of I_{Kr} and I_{Ks} increases short-term QT interval variability and provokes torsades de pointes. *Br J Pharmacol* 151:941-951.
138. Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA (2004). A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem* 279:19051-19063.
139. Leonoudakis D, Mailliard WS, Wingerd KL, Clegg DO, Vandenberg CA (2001). Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with Synapse-Associated Protein SAP97. *J Cell Sci* 114:987-998.
140. Lewalle A, Niederer SA, Smith NP (2014). Species-dependent adaptation of the cardiac Na⁺/K⁺ pump kinetics to the intracellular Na⁺-concentration. *J Physiol* 592:5355-5371.
141. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S (1996). Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 78:689-696.
142. Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggemann A et al (2001). Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K⁺ channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 532:115-126.
143. Liu L, Nattel S (1997). Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 273:H805-H816.
144. Lu Z, Scherlag BJ, Lin J, Niu G, Fung KM, Zhao L et al (2008). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: autonomic mechanism for atrial electrical remodeling induced by short-term rapid atrial pacing. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1:184-192.
145. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372:366-369.
146. Magee WP, Deshmukh G, Deninno MP, Sutt JC, Chapman JG, Tracey WR (2003). Differing cardioprotective efficacy of the Na⁺/Ca²⁺-exchanger inhibitors SEA-0400 and KB-R7943. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 84:H903-H910.
147. Magyar J, Horváth B, Bányász T, Szentandrassy N, Birinyi P, Varró A et al (2006). L-364,373 fails to activate the slow delayed rectifier K⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes. *N-S Arch Pharmacol* 373:85-90.
148. Manning A, Thisse V, Hodeige D, Richard J, Heyndrickx JP, Chatelain P (1995). SR-33589, a new amiodarone-like antiarrhythmic agent: electrophysiological effects in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 25:252-261.
149. Marban E (2002). Cardiac channelopathies. *Nature* 415:213-218.
150. Marcus FI, Opie LH (1998). Antiarrhythmias szerek. In Opie LH (szerk), *Gyógyszeres kezelés a kardiológiában*. Springer Hungarica Kiadó Kft, pp 362-426.

151. Mason JW, Hondeghem LM, Katzung BG (1984). Block of inactivated sodium channels and of depolarization-induced automaticity in guinea pig papillary muscle by amiodarone. *Circ Res* 55:278-285.
152. Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature* 325:156-158.
153. Minardo JD, Heger JJ, Miles WM, Zipes DP, Prystowsky EN (1988). Clinical characteristics of patients with ventricular fibrillation during antiarrhythmic drug therapy. *N Engl J Med* 319:257-262.
154. Mason JW, Hondeghem LM, Katzung BG (1984). Block of inactivated sodium channels and of depolarization-induced automaticity in guinea pig papillary muscle by amiodarone. *Circ Res* 55:278-285.
155. Moosvi AR, Goldstein S, VanderBrug Medendorp S, Landis JR, Wolfe RA, Leighton R et al (1990). Effect of empiric antiarrhythmic therapy in resuscitated out-of-hospital cardiac arrest victims with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 65:1192-1197.
156. Murata M, Buckett PD, Zhou J, Brunner M, Folco E, Koren G (2001). SAP97 interacts with Kv1.5 in heterologous expression systems. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 281:H2575-H2584.
157. Nagy ZA, Virág L, Tóth A, Biliczki P, Acsai K, Bányász T et al (2004). Selective inhibition of sodium-calcium exchanger by SEA-0400 decreases early and delayed afterdepolarization in canine heart. *Br J Pharmacol* 143:827-831.
158. Nattel S (2002). New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415:219–26.
159. Nattel S (1999a): The molecular and ionic specificity of antiarrhythmic drug actions. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10:272-282.
160. Nattel S (1999b). Atrial electrophysiological remodeling caused by rapid atrial activation: underlying mechanisms and clinical relevance to atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 42:298-308.
161. Németh M, Varró A, Virág L, Hála O, Thormahlen D, Papp JG (1997). Frequency-dependent cardiac electrophysiologic effects of tedisamil: comparison with quinidine and sotalol. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2:273-284.
162. Newman CM, Price A, Davies DW, Gray TA, Weetman AP (1998). Amiodarone and the thyroid: a practical guide to the management of thyroid dysfunction induced by amiodarone therapy. *Heart* 79:121-127.
163. Nishimura M, Follmer CH, Singer DH (1989). Amiodarone blocks calcium current in single guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 251:650-659.
164. Nissen JD, Diness JG, Diness TG, Hansen RS, Grunnet M, Jespersen T (2009). Pharmacologically induced long QT type 2 can be rescued by activation of I_{Ks} with benzodiazepine R-L3 in isolated guinea pig cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 54:169-177.
165. Oexle B, Weirich J, Antoni H (1987). Electrophysiology profile of KC 8857: a new bradycardic agent. *J Mol Cell Cardiol* 19: p. S65, Suppl. III.
166. Oravec K, Kormos A, Gruber A, Márton Z, Kohajda Z, Mirzaei L et al (2018). Inotropic effect of NCX inhibition depends on the relative activity of the reverse NCX assessed by a novel inhibitor ORM-10962 on canine ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 818:278-286.
167. Papp JG, Németh M, Krassói I I, Mester L, Hála O, Varró A (1996). Differential electrophysiologic effects of chronically administered amiodarone on canine Purkinje fibers versus ventricular muscle. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1:287-296.
168. Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
169. Piecha D, Muratoglu S, Mörgelin M, Hauser N, Studer D, Kiss I, Paulsson M, Deák F (1999). Matrilin-2, a large, oligomeric matrix protein, is expressed by a great variety of cells and forms fibrillar networks. *J. Biol Chem* 274:13353-13361.
170. Pogwizd SM (2003). Clinical potential of sodium–calcium exchanger inhibitors as antiarrhythmic agents. *Drugs* 63:439-452.
171. Pogwizd SM, Bers DM (2002). Calcium cycling in heart failure: the arrhythmia connection. *J. Cardiovasc. Electrophysiol* 13:88-91.
172. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM (2001). Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure. Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 88:1159-1167.

173. Pratt CM, Camm AJ, Cooper W et al for the SWORD Investigators (1998): Mortality in the Survival With ORal D-sotalol (SWORD) trial: why did patients die ? *Am J Cardiol* 81:869-876.
174. Priori SG, Napolitano C, Bloise R, Schwartz PJ (1998). Low penetrance in the long QT syndrome: the importance of molecular diagnosis. *Eur Heart J* 19/(Abstract suppl.): 424.
175. Ravens U, Amos GJ, Li Q, Metzger F, Himmel HM, Wettwer E (1997). Effects of the antiarrhythmic agent tedisamil on cardiac potassium currents in humans. *Exp Clin Cardiol* 2:31-36.
176. Rocchetti M, Besana A, Gurrola GB, Possani LD, Zaza A (2001). Rate dependency of delayed rectifier currents during the guinea-pig ventricular action potential. *J Physiol* 534:721-732.
177. Roden DM (2006). Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J Internal Medicine* 259:59-69.
178. Roden DM, Yang T (2005). Protecting the heart against arrhythmias: Potassium current physiology and repolarization. *Circulation* 112:1376-1378.
179. Roden DM (1998). Taking the "idio" out of "idiosyncratic": Predicting torsades de pointes. *PACE* 21:1029-1034.
180. Roden DM, Lazzara R, Rosen M, for the SADS Foundation Task Force on LQTS (1996). Multiple mechanisms in the long-QT syndrome current knowledge, gaps, and future directions. *Circulation* 94:1996-2012.
181. Roden DM, Bennett PB, Snyders DJ, Balser JR, Hondeghem LM (1988). Quinidine delays I_K activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 62:1055-1058.
182. Rolf S, Haverkamp W, Borggreffe M, Musshoff U, Eckardt L, Mergenthaler J, et al. (2000). Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *N-S Arch Pharmacol* 362:22-31.
183. Rook MB (2007). Physiologic function of I_{K1} requires a combination of Kir2 isoforms. *Heart Rhythm* 4:497-499.
184. Salata JJ, Jurkiewicz NK, Wang J, Evans BE, Orme HT, Sanguinetti MC (1998). A novel benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K^+ currents. *Mol Pharmacol* 54:220-230.
185. Salata JJ, Brooks RR (1997). Pharmacology of azimilide dihydrochloride (NE-10064), a Class III antiarrhythmic agent. *Cardiovasc Drug Rev* 15:137-156.
186. Salata JJ, Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC, Siegl PK, Clareman DA, Remy DC, Elliot JM, Libby BE (1996). The novel class III antiarrhythmic agent, L-735-821 is a potent and selective blocker of I_{Ks} in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation* 94:I-529.
187. Salata JJ, Wasserstrom JA (1988). Effects of quinidine on action potentials and ionic currents in isolated canine ventricular myocytes. *Circ Res* 62:324-337.
188. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 96:195-215.
189. Sanguinetti MC, Keating MT (1997). Role of delayed rectifier potassium channels in cardiac repolarisation and arrhythmias. *News Phys Sci* 12:152-158.
190. Schotten U, Haase H, Frechen D, Greiser M, Stellbrink C, Vazquez-Jimenez JF et al (2003a). The L-type Ca^{2+} channel subunits $\alpha 1C$ and $\beta 2$ are downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 35:437-443.
191. Schotten U, Duytschaever M, Ausma J, Eijssbouts S, Neuberger HR, Allessie M (2003b). Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation* 107:1433-1439.
192. Schreieck J, Wang Y, Gjini V, Korth M, Zrenner B, Schömig A, Schmitt C (1997). Differential effect of beta-adrenergic stimulation on the frequency-dependent electrophysiologic actions of the new class III antiarrhythmics dofetilide, ambasilide, and chromanol 293B. *J Cardiovasc Electrophysiol* 8:1420-1430.
193. Seeböhm G, Pusch M, Chen J, Sanguinetti MC (2003). Pharmacological activation of normal and arrhythmia-associated mutant KCNQ1 potassium channels. *Circ Res* 93:941-947.
194. Sheets MF, Hanck DA, Fozzard HA (1988). Nonlinear relation between V_{max} and I_{Na} in canine cardiac Purkinje cells. *Circ Res* 63:386-398.

195. Sheng X, Scherlag BJ, Yu L, Li S, Ali R, Zhang Y et al (2011). Prevention and reversal of atrial fibrillation inducibility and autonomic remodeling by low-level vagosympathetic nerve stimulation. *J Am Coll Cardiol* 57: 563-571.
196. Shibasaki T (1987). Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol* 387:227-250.
197. Shieh RC, Chang JC, Arreola J (1998). Interaction of Ba²⁺ with the pores of the cloned inward rectifier K⁺ channels Kir2.1 expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 75:2313-2322.
198. Shimizu W, Antzelevitch C (1998). Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the Long-QT syndrome. Effects of β -adrenergic agonists and antagonists and sodium channel blockers on transmural dispersion of repolarisation and Torsade de Pointes. *Circulation*, 98:2314-2322.
199. Shimon Y, Clark RB, Giles WR (1992). Role of an inwardly rectifying potassium current in rabbit ventricular action potential. *J Physiol* 448:709-727.
200. Sicouri S, Moro S, Litovsky S, Elizari MV, Antzelevitch C (1997). Chronic amiodarone reduces transmural dispersion of repolarization in the canine heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 8:1269-1277.
201. Singh BN (1999). Current antiarrhythmic drugs: an overview of mechanisms of action and potential clinical utility. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10:283-301.
202. Singh BN, Ahmed R (1994). Class III antiarrhythmic drugs. *Curr Opinion Cardiol* 9:12-22.
203. Singh BN, Vaughan-Williams EM (1970a). A third class of anti-arrhythmic action. Effects on atrial and ventricular intracellular potentials, and other pharmacological actions on cardiac muscle, of MJ 1999 and AH 3474. *Br J Pharmacol* 39:675-687.
204. Singh BN, Vaughan Williams EM (1970b). The effect of amiodarone, a new antianginal drug, on cardiac muscle. *Br J Pharmacol* 39:657-667.
205. Skasa M, Jüngling E, Picht E, Schöndube F, Lückhoff A (2001). L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 96:151-159.
206. Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC (1996). Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *J Gen Physiol* 107:611-619.
207. Spinelli W, Follmer C, Parsons R, Colatsky T (1990). Effects of cromakalim, pinacidil and nicorandil on cardiac refractoriness and arterial pressure in open-chest dogs. *Eur J Pharmacol* 179:243-252.
208. Stanton MS (1995). Class I antiarrhythmic drugs: quinidine, procainamide, disopyramide, lidocaine, mexiletine, tocainide, phenytoin, moricizine, flecainide, propafenone. In: Zipes DP, Jalife J. *Cardiac electrophysiology, from cell to bedside*. Second edition. WB Saunders Co, pp 1296-1317.
209. Strauss HC, Bigger JT Jr, Hoffman BF (1970). Electrophysiological and beta-receptor blocking effects of MJ 1999 on dog and rabbit cardiac tissue. *Circ Res* 26:661-678.
210. Sun ZQ, Thomas GP, Antzelevitch C (2001). Chromanol 293B inhibits slowly activating delayed rectifier and transient outward currents in canine left ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12:472-478.
211. Sun W, Sarma JS, Singh BN (1999). Electrophysiological effects of dronedarone (SR33589), a noniodinated benzofuran derivative, in the rabbit heart: comparison with amiodarone. *Circulation* 100:2276-2281.
212. Sun H, Gaspo R, Leblanc N, Nattel S (1998). Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation* 98:719-727.
213. Surawicz B (1989). Electrophysiologic substrate of Torsades de Pointes: Dispersion of repolarization or early afterdepolarizations? *J Am Coll Cardiol* 14:172-184.
214. Swan H, Saarinen K, Kontula K, Toivone L, Viitasalo M (1998). Evaluation of QT interval duration and dispersion and proposed clinical criteria in diagnosis of long QT Syndrome in patients with a genetically uniform type of LQT1. *J Am Coll Cardiol*; 32: 486-491.
215. Ter Keurs HE, Boyden PA (2007). Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Rev* 87:457-506.
216. The CASCADE Investigators (1993). Randomized antiarrhythmic drug therapy in survivors of cardiac arrest (the CASCADE Study). *Am J Cardiol* 72:280-287.

217. The CAST Investigators (1989). Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in randomized trial arrhythmia suppression after myocardial infarction. *N Engl J Med* 321:406-412.
218. Thomsen MB, Verduyn SC, Stengl M, Beekman JD, de Pater G, van Opstal J, Volders PG, Vos MA (2004). Increased short-term variability of repolarization predicts d-sotalol-induced torsades de pointes in dogs. *Circulation* 110:2453-2459.
219. Tomaselli GF, Marban E (1999). Electrophysiological remodelling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 42: 270-283.
220. Torp-Pedersen C, Moller M, Bloch-Thomsen PE, et al for the Danish Investigations of Arrhythmia and Mortality on Dofetilide (DIAMOND) Study Group (1999). Dofetilide in patients with congestive heart failure and left ventricular dysfunction. *N Engl J Med* 341:857-865.
221. Tóth A, Kiss L, Varró A, Nánási PP (2009). Potential therapeutic effects of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibition in cardiac diseases. *Curr Med Chem* 16:3294-3321.
222. Tsuchihashi K, Curtis MJ (1991). Influence of tedisamil on the initiation and maintenance of ventricular fibrillation: chemical defibrillation by I_{to} blockade? *J Cardiovasc Pharmacol* 18:445-456.
223. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne J (1999). Atrial L-type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 85:428-426.
224. Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM (1997). Outward K current densities and $\text{Kv}1.5$ expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 80:772-781.
225. Vaughan Williams EM (1975). Classification of anti-dysrhythmic drugs. *Pharmacol Ther* 1:115-138.
226. Varró A, Baczkó I (2011). Cardiac ventricular repolarization reserve: a principle for understanding drug-related proarrhythmic risk. *Br J Pharmacol* 164:14-36.
227. Varró A, Fazekas T, Varró A (2009). Az antiaritmiás gyógyszerek klinikai alkalmazásának farmakológiai alapjai. In: Fazekas T, Merkely B, Papp Gy., Tenczer J. (Szerk.) *Klinikai szív-elektrofiziológia és aritmológia.*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 24. Fejezet, 805-832.
228. Varró A, Papp JG (2006). Low penetrance, subclinical congenital LQTS: concealed LQTS or silent LQTS? *Cardiovasc Res* 70:404-406.
229. Varró A, Baláti B, Jost N, Takács J, Virág L, Lathrop DA et al (2000). The role of the delayed rectifier component I_{Ks} in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol* 523:67-81.
230. Varró A, Virág L, Papp JG (1996). Comparison of the chronic and acute effects of amiodarone on the calcium and potassium currents in rabbit isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 117:1181-1186.
231. Varró A, Lathrop DA (1990). Sotalol and mexiletine: combination of rate-dependent electrophysiological effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 16:557-567.
232. Varró A, Nakaya Y, Elharrar V, Surawicz B (1985). Use-dependent effects of amiodarone on V_{max} in cardiac Purkinje and ventricular muscle fibers. *Eur J Pharmacol* 112:419-422.
233. Vaidyanathan R, Taffet SM, Vikstrom KL, Anumonwo JM (2010). Regulation of cardiac inward rectifier potassium current I_{K1} by SAP97. *J Biol Chem* 285:28000-28009.
234. Verduyn SC, Vos MA, van der Zande J, van der Hulst FF, Wellens HJ (1997). Role of interventricular dispersion of repolarization in acquired torsades de pointes arrhythmias: reversal by magnesium. *Cardiovasc Res* 34:453-463.
235. Vikstrom KL, Vaidyanathan R, Levinsohn S, O'Connell RP, Qian Y, Crye M, Mills JH, Anumonwo JM (2009). SAP97 regulates $\text{Kir}2.3$ channels by multiple mechanisms. *Am J Physiol Heart-Circ Physiol* 297:H1387-H1397.
236. Virág L, Varró A, Papp JG (1998). Effect of disopyramide on potassium currents in rabbit ventricular myocytes. *N-S Arch Pharmacol* 357:268-275.
237. Virág L, Jost N, Papp R, Koncz I, Kristóf A, Kohajda Z et al (2011). Analysis of the contribution of I_{to} to repolarization in canine ventricular myocardium. *Br J Pharmacol* 164:93-105.
238. Viswanathan PC, Shaw RM, Rudy Y (1999). Effects of I_{Kr} and I_{Ks} heterogeneity on action potential duration and its rate dependence. A simulation study. *Circulation* 99:2466-2474.

239. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I et al (2012). Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and increased Na^{+} - Ca^{2+} exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 125:2059-2070.
240. Voigt N, Makary S, Nattel S, Dobrev D (2010). Voltage-clamp-based methods for the detection of constitutively active acetylcholine-gated $\text{I}_{\text{K,ACh}}$ channels in the diseased heart. *Methods Enzymol* 484:653-675.
241. Voigt N, Maguy A, Yeh YH, Qi X, Ravens U, Dobrev D, Nattel S (2008). Changes in $\text{I}_{\text{K,ACh}}$ single-channel activity with atrial tachycardia remodelling in canine atrial cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 77:35-43.
242. Voigt N, Friedrich A, Bock M et al (2007). Differential phosphorylation-dependent regulation of constitutively active and muscarinic receptor-activated $\text{I}_{\text{K,ACh}}$ channels in patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 74:426-437.
243. Volders PG, Vos MA, Szabo B, Sipido KR, de Groot SH, Gorgels AP, Wellens HJ, Lazzara R (2000). Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and Torsades de Pointes: time to revise current concepts. *Cardiovasc Res* 46:376-392.
244. Volders PGA, Sipido KR, Vos MA, Späthjens RL, Leunissen JD, Carmeliet E, Wellens HJ (1999). Downregulation of delayed rectifier K^{+} currents in dog with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation* 100:2455-2461.
245. Vos MA, Verduyn SC, Gorgels AP, Lipcsei GC, Wellens HJ (1995). Reproducible induction of early afterdepolarizations and torsade de pointes arrhythmias by d-sotalol and pacing in dogs with chronic atrioventricular block. *Circulation* 91:846-872.
246. Wald RW, Waxman MB, Colman JM (1981). Torsades de pointes ventricular tachycardia. A complication of disopyramide shared with quinidine. *J Electrocardiol* 14:301-307.
247. Waldo AL, Camm AJ, de Ruyter H, et al. for the SWORD Investigators (1996). Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. *Lancet* 348:7-12.
248. Waldo AL, Wit AL (1993). Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Lancet* 341:1189-1193.
249. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM et al (1998). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22:447-455.
250. Wang Z, Feng J, Shi H, Pond A, Nerbonne JM, Nattel S (1999). Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K^{+} current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ Res* 84:551-561.
251. Wang J, Feng J, Nattel S (1994). Class III antiarrhythmic drug action in experimental atrial fibrillation. Differences in reverse use dependence and effectiveness between d-sotalol and the new antiarrhythmic drug ambasilide. *Circulation* 90:2032-2040.
252. Warren M, Guha PK, Berenfeld O, Zaitsev A, Anumonwo JM, Dhamoon AS et al (2003). Blockade of the inward rectifying potassium current terminates ventricular fibrillation in the guinea pig heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14:621-631.
253. Watano T, Harada Y, Harada K, Nishimura N (1999). Effect of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor, KB-R7943 on ouabain-induced arrhythmias in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 127:1846-1850.
254. Wickenden AD, Tsushima RG, Losito VA, Kaprielian R, Backx PH (1999). Effect of Cd^{2+} on $\text{Kv}4.2$ and $\text{Kv}1.4$ expressed in *Xenopus* oocytes and on the transient outward currents in rat and rabbit ventricular myocytes. *Cell Physiol Biochem* 9:11-28.
255. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA (1995). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake, chronically instrumented conscious goats. *Circulation* 92:1954-1968.
256. Willis BC, Ponce-Balbuena D, Jalife J (2015). Protein assemblies of sodium and inward rectifier potassium channels control cardiac excitability and arrhythmogenesis. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 308:H1463-H1473.
257. Workman AJ, Kane KA, Rankin AC (2001). The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 52:226-235.
258. Xu X, Salata JJ, Wang J, Wu Y, Yan GX, Liu T, Marinchak RA, Kowey PR (2002). Increasing I_{Ks} corrects abnormal repolarization in rabbit models of acquired LQT2 and ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 283:H664-H670.

259. Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* 50:723-757.
260. Yang T, Snyders DJ, Roden DM (1997). Rapid inactivation determines the rectification and $[K^+]_o$ dependence of the rapid component of the delayed rectifier K^+ current in cardiac cells. *Circ Res* 80:782-789.
261. Yang T, Roden DM (1996). Extracellular potassium modulation of drug block of I_{Kr} . Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence. *Circulation* 93(3):407-411.
262. Yeh YH, Lemola K, Nattel S (2007). Vagal atrial fibrillation. *Acta Cardiol Sin* 23:1-12.
263. Yeola SW, Snyders DJ (1997). Electrophysiological and pharmacological correspondence between $Kv4.2$ current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc Res* 33:540-547.
264. Yue L, Melnyk P, Gaspo R, Wang Z, Nattel S (1999). Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 84:776-784.
265. Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S (1996). Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 270:H2157-H2168.
266. Zareba KM (2006). Dronedaron: a new antiarrhythmic agent. *Drugs Today* 42:75-86.
267. Zittoun J, Marquet J, Pilorget JJ, Tonetti C, De Gialluly E (1991). Comparative effect of 6S, 6R and 6RS leucovorin on methotrexate rescue and on modulation of 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 63:885-888.
268. Zvara A, Szekeres G, Janka Z, Kelemen JZ, Cimmer C, Puskás LG (2005). Over-expression of dopamine D2 receptor and inwardly rectifying K^+ - channel genes in drug-naïve schizophrenic peripheral blood lymphocytes as potential diagnostic markers. *Dis Markers* 21:61-69.

Publikációk, szabadalmak, scientiometriai adatok

Az értekezés alapját képező eredeti, összefoglaló (review) közlemények és könyvek illetve könyvfejezetek

(SCI szerinti impakt faktor és független idézetek számával megadva)

Eredeti közlemények:

1. Varró A, Takács J, Németh M, Hála O, Virág L, **Jost N**, Baláti B, Ágoston M, Vereckei A, Pastor G, Delbruyère M, Gautier P, Nisato D, Papp JGy. Electrophysiological effects of dronedarone (SR 33589), a noniodinated amiodarone derivative in the canine heart: comparison with amiodarone. Br J Pharmacol, 133:625-634, 2001.
Scimago: D1 Impact factor (2001): 3.502 Citációk száma: 90
2. Opincariu M, Varró A, **Jost N**, Virág L, Hála O, Szolnoki J, Szécsi J, Bogáts G, Szenohradszky P, Mátyus P, Papp JGy. The cellular electrophysiologic effect of a new amiodarone like antiarrhythmic drug GYKI 16638 in undiseased human ventricular muscle: comparison with sotalol and mexiletine. Curr Med Chem, 9:41-46, 2002.
Scimago: D1 Impact factor (2002): 4.966 Citációk száma: 4
3. Biliczki P, Virág L, **Jost N**, Papp JGy, Varró A. Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of the repolarization reserve. Br J Pharmacol, 137:361-368, 2002.
Scimago: D1 Impact factor (2002): 3.450 Citációk száma: 82
4. **Jost N**, Virág L, Varró A, Papp JGy. Comparison of the effect of Class I/A antiarrhythmics on transmembrane potassium currents in rabbit ventricular myocytes. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 8:31-41, 2003.
Scimago: Q2 Impact factor (2003): - Citációk száma: 21
5. **Jost N**, Virág L, Hála O, Varró A, Thormählen D, Papp JGy. Effect of the antifibrillatory compound tedisamil (KC-8857) on transmembrane currents in mammalian ventricular myocytes. Curr Med Chem, 11:3219-3228, 2004.
Scimago: D1 Impact factor (2004): 4.382 Citációk száma: 13
6. **Jost N**, Virág L, Bitay M, Takács J, Lengyel Cs, Biliczki P, Nagy ZA, Bogáts G, Lathrop DA, Papp JGy, Varró A. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for I_{Ks} in human ventricular muscle. Circulation, 112:1392-1399, 2005.
Scimago: Q1/D1 Impact factor (2005): 11.632 Citációk száma: 221
7. Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, **Jost N**, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G-protein gated potassium current $I_{K,ACh}$ is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. Circulation, 112:3697-3706, 2005.
Scimago: Q1/D1 Impact factor (2005): 11.632 Citációk száma: 219
8. **Jost N**. A szívizom repolarizációjában részt vevő különböző káliumcsatornák kölcsönhatásának vizsgálata emlős kamraizmon - a repolarizációs tartalék jelentősége. Cardiol Hung, 38:10-16, 2008.
9. **Jost N**, Acsai K, Horváth B, Bányász T, Baczkó I, Bitay M, Bogáts G, Nánási PP. Contribution of I_{Kr} and I_{K1} to ventricular repolarization in canine and human myocytes. Is there any influence of action potential duration? Basic Res Cardiol, 104:33-41, 2009.
Scimago: D1 Impact factor (2009): 5.973 Citációk száma: 19
10. Corici C, Kohajda Z, Kristóf A, Horváth A, Virág L, Szél T, Nagy N, Szakonyi Zs, Fülöp F, Muntean DM, Varró A, **Jost N**. R-L3 enantiomers have adverse modulating effects on I_{Ks} in rabbit ventricular myocytes. Can J Physiol Pharmacol, 91:586-592, 2013.
Scimago: Q2 Impact factor (2013): 1.546 Citációk száma: 1

11. Szűts V, Ménesi Z, Varga-Orvos Z, Zvara A, Houshmand N, Bitay M, Bogáts G, Virág L, Baczkó I, Szalontai B, Geramipour A, Cotella D, Wettwer E, Ravens U, Deák F, Puskás LG, Papp JG, Kiss I, Varró A, **Jost N**. Altered expression of genes for Kir ion channels in dilated cardiomyopathy. Can J Physiol Pharmacol, 91:648-656, 2013.

Scimago: Q2 Impact factor (2013): 1.546 Citációk száma:12

12. **Jost N**, Virág L, Comtois P, Ördög B, Szűts V, Seprényi Gy, Bitay M, Kohajda Zs, Koncz I, Nagy N, Szél T, Magyar J, Kovács M, Puskás LG, Lengyel Cs, Wettwer E, Ravens U, Nanasi PP, Papp JGy, Varró A, Nattel S. Ionic mechanisms limiting cardiac repolarization-reserve in humans compared to dogs. J Physiol (London) 591:4189-4206, 2013.

Scimago: D1 Impact factor (2013): 4.544 Citációk száma: 50

13. **Jost N**, Nagy N, Corici C, Kohajda Z, Horváth A, Acsai K, Biliczki P, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Toth A, Papp JGy, Varró A, Virág L. ORM-10103, a novel specific inhibitor of the sodium/calcium exchanger, decreases early and delayed afterdepolarization in the canine heart. Br J Pharmacol, 170:768-778, 2013.

Scimago: D1 Impact factor (2013): 4.990 Citációk száma: 21

14. Geramipour A, Kohajda Zs, Corici C, Prorok J, Szakonyi Zs, Oravec K, Márton Z, Nagy N, Tóth A, Acsai K, Virág L, Varró A, **Jost N**. The investigation of the cellular electrophysiological and antiarrhythmic effects of a novel selective sodium-calcium exchanger inhibitor GYKB-6635 in canine and guinea pig hearts. Can J Physiol Pharmacol, 94:1090-1101, 2016.

Scimago: Q2 Impact factor (2016): 1.822 Citációk száma:0

15. Christ T, Kovács PP, Acsai K, Knaut M, Eschenhagen T, **Jost N**, Varró A, Wettwer E, Ravens U. Block of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger by SEA0400 in human right atrial preparations from patients in sinus rhythm and in atrial fibrillation. Eur J Pharmacol, 788:286-293, 2016.

Scimago: Q2 Impact factor (2016): 2.896 Citációk száma:4

16. Kohajda Z, Kristóf A, Horváth A, Juhász V, Ságghy L, Virág L, Baczkó I, Fazekas T, Varró A, **Jost N**. Repolarizáló káliumáramok tulajdonságainak vizsgálata szinuszritmusú és pitvarfibrilláló kutyákból izolált pitvari szívműsejteken. Cardiol Hung, 47: G29-G39, 2017.

Scimago: - Impact factor (2017): - Citációk száma:-

Összefoglaló (review) közlemények és könyvek illetve könyvfejezetek

1. **Jost N**, Papp J.Gy, Varró A. Slow delayed rectifier potassium current (I_{Ks}) and the repolarization reserve (*felkért review*). Ann Noninvas Electro, 12:64-78, 2007.

Scimago: Q2 Impact factor (2007): 1.151 Citációk száma:49

2. Pitvarfibrilláció. A szívműsejttől a betegágyig (*monográfia szerk.* Fazekas T, Bogáts G, Csanádi Z, **Jost N**, Lőrincz I), 556 oldal, Medicina Kiadó, 2010; ISBN: 978-963-226-303-8.

3. **Jost N**, Fazekas T. Pitvari (elektromos, kontraktilis és strukturális) remodelling. In. Pitvarfibrilláció. A szívműsejttől a betegágyig (szerk. Fazekas T, Bogáts G, Csanádi Z, **Jost N**, Lőrincz I). pp. 91-138, Medicina Kiadó, 2010.9+55

4. **Jost N**, Fazekas T. A pitvarfibrilláció genetikája. In. Pitvarfibrilláció. A szívműsejttől a betegágyig (szerk. Fazekas T, Bogáts G, Csanádi Z, **Jost N**, Lőrincz I). pp. 139-157, Medicina Kiadó, 2010.

5. **Jost N**, Kohajda Zs, Kristóf A, Kovács PP, Husty Z, Juhász V, Kiss L, Varró A, Virág L, Baczkó I. Atrial remodelling and novel pharmacological strategies for antiarrhythmic therapy in atrial fibrillation (*máshol még nem közölt saját eredeti adatokkal kiegészített review*). Curr Med Chem, 18:3675-3694, 2011.

Scimago: D1 Impact factor (2011): 4.859 Citációk: 8

6. Kohajda Z, Kristóf A, Corici C, Virág L, Muntean DM, Varró A, **Jost N**. Novel pharmacological strategies for antiarrhythmic therapy in atrial fibrillation. In Treatment Strategies in Cardiology (Ed. Laura Hajba; ebook), Vol 3, Issue 2, pp. 50-55, 2011, Publisher Cambridge Research Centre, London, UK.
7. **Jost N**, Muntean DM, Christ T. Cardiac Arrhythmias: Introduction, Electrophysiology of the Heart, Action Potential and Membrane Currents. in Pathophysiology and Pharmacotherapy of Cardiovascular Disease. Eds. Jagadeesh G, Balakumar P, Maungh-U K, pp 977-1002, 2015, ISBN: 978-3-319-15960-7, doi: 10.1007/978-3-319-15961-4_46.
8. Christ T, Pecha S, **Jost N**. Treatment of Atrial Fibrillation and Atrial Flutter. in Pathophysiology and Pharmacotherapy of Cardiovascular Disease. Eds. Jagadeesh G, Balakumar P, Maungh-U K, pp 977-1002, 2015, ISBN: 978-3-319-15960-7, doi: 10.1007/978-3-319-15961-4_50.
9. Varró A, Virág L, **Jost N**. A lassú késői egyenirányító káliumáram (I_{Ks}) és a repolarizációs rezerv kutatásnak két évtizede a Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben (review). Cardiol Hung, 47:G47-G55, 2017.
Scimago: - Impact factor (2017): - Citációk száma:-

A dolgozat alapját képező közlemények összesített impakt faktora 68.891 (az eredeti közleményeké 62.881, az összefoglalóké 6.01)
Ezekre a közleményekre történő összes független hivatkozás (SCI és Scopus): 814

Az értekezés témájához kapcsolódó (*de nem bemutatott*) eredeti és összefoglaló (*review*) közlemények (SCI szerinti impakt faktor és *független idézetek* számával megadva)

1. Baláti B, **Jost N**, Simon J, Varró A, Papp JGy. Analysis of the electrophysiological effects of ambasilide, a new antiarrhythmic agent, in canine isolated ventricular muscle and Purkinje fibres. *Gen Pharmacol*, 34:85-93, 2000.
Scimago: Q2 Impact factor (2000): 1.140 Citációk száma: 6
2. Takács J, **Jost N**, Lengyel C, Virág L, Nesic TM, Varró A, Papp JGy. Multiple amiodarone like cellular electrophysiological effects of azimilide in canine cardiac preparations. *Eur J Pharmacol*, 470:163-170, 2003.
Scimago: Q2 Impact factor (2003): 2.352 Citációk száma: 8
3. Varró A, Biliczki P, **Jost N**, Virág L, Hála O, Kovács P, Mátyus P Papp JGy. Theoretical possibilities for the development of novel antiarrhythmic drugs (review). *Curr Med Chem*, 11:1-11, 2004.
Scimago: D1 Impact factor (2004): 4.382 Citációk száma: 37
4. Bárándi L, Virág L, **Jost N**, Horváth Z, Koncz I, Papp R, Harmati G, Horváth B, Szentandrassy N, Bányász T, Magyar J, Zaza A, Varró A, Nánási PP. Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations. *Bas Res Cardiol*, 105(3):315-23, 2010.
Scimago: D1 Impact factor (2010): 6.128 Citációk száma: 22
5. Szél T, Koncz I, **Jost N**, Baczkó I, Husti Z, Virág L, Bussek A, Wettwer E, Ravens U, Papp JGy, Varró A. Class I/B antiarrhythmic property of ranolazine, a novel antianginal agent, in dog and human cardiac preparations. *Eur J Pharmacol*, 668:419-426, 2011.
Scimago: Q1 Impact factor (2011): 2.516 Citációk száma: 19
6. Koncz I, Szél T, Bitay M, Cerbai E, Fülöp F, **Jost N**, Virág L, Orvos P, Tálosi L, Kristóf A, Baczkó I, Papp JGy, Varró A. Electrophysiological effects of ivabradine in dog and human cardiac preparations: potential antiarrhythmic actions. *Eur J Pharmacol*, 668:419-426, 2011.
Scimago: Q1 Impact factor (2011): 2.516 Citációk száma: 25

7. Pueyo E, Corrias A, Virág L, **Jost N**, Szél T, Varró A, Szentandrassy N, Nánási PP, Burrage K, Rodríguez B. A multiscale investigation of repolarization variability and its role in cardiac arrhythmogenesis. *Biophys J*, 101:2892-2902, 2011.
Scimago: D1 Impact factor (2011): 3.653 Citációk száma: 35
8. Lengyel Cs. Virág L, Kovács PP, Kristóf A, Pacher P, Kocsis E, Koltay ZM, Nánási PP, Tóth M, Kecskeméti V, Papp JGy, Varró A, **Jost N**. Role of slow delayed rectifier K^+ -current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart. *Acta Physiologica*, 192:359-368, 2008.
Scimago: Q2 Impact factor (2008): 2.455 Citációk száma: 27
9. Kristóf A, Husti Z, Koncz I, Kohajda Z, Szél T, Juhász V, Biliczki P, **Jost N**, Baczkó I, Papp JGy, Varró A, Virág L. Diclofenac prolongs repolarization in ventricular muscle with impaired repolarization reserve. *PLoS ONE* 7(12): e53255, 2012.
Scimago: D1 Impact factor (2012): 3.730 Citációk száma: 3
10. Ford J, Milnes J, Wettwer E, Christ T, Rogers M, Sutton K, Madge D, Virag L, **Jost N**, Horvath Z, Matschke K, Varro A, Ravens U. Human electrophysiological and pharmacological properties of XEN-D0101: A novel atrial Selective $Kv1.5/I_{Kur}$ inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol*, 61:408-415, 2013.
Scimago: Q2 Impact factor (2013): 2.111 Citációk száma: 28
11. Muntean DM, Kohajda, Fazekas T, **Jost N**. Atrial remodeling in permanent atrial fibrillation: Mechanisms and pharmacological implications. *J Clin & Exp Cardiol*, 4:273, doi: 10.4172/2155-9880.1000273, 2013
Scimago: Q4 Impact factor (2013): - Citációk száma: 1
12. Muntean DM, Kiss L, **Jost N**, Baczkó I. ATP-sensitive potassium channel modulators and cardiac arrhythmias: an update (review). *Curr Pharm Design*, 21(8):1091-1102, 2015.
Scimago: Q1 Impact factor (2015): 3.052 Citációk száma: 2
13. Baczkó I, **Jost N**, Virág L, Bősze Zs, Varró A. Rabbit models as tools for preclinical cardiac electrophysiological safety testing: importance of repolarization reserve (review saját adatokkal). *Prog Biophys Mol Biol*, 121(2):157-168, 2016.
Scimago: Q1 Impact factor (2016): 3.227 Citációk száma: 6
14. Kohajda Zs. Farkas-Morvay N, **Jost N**, Nagy N, Geramipour A, Horváth A, Varga RS, Hornyik T, Corici C, Acsai K, Horváth B, Prorok J, Ördög B, Déri Sz, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Baczkó I, Leprán I, Nánási PP, Papp JGy, Varró A, Virág L. The effect of a novel highly selective inhibitor of the sodium/calcium exchanger (NCX) on cardiac arrhythmias in *in vitro* and *in vivo* experiments. *PLoS One*, 11(11): e0166041, 2016.
Scimago: D1 Impact factor (2015): 2.806 Citációk száma: 7
15. Oravec K, Kormos A, Gruber A, Márton Z, Kohajda Z, Mirzaei L, **Jost N**, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Papp JG, Nánási PP, Antoons G, Varró A, Acsai K, Nagy N. Inotropic effect of NCX inhibition depends on the relative activity of the reverse NCX assessed by a novel inhibitor ORM-10962 on canine ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*, 818:278-286, 2018.
Scimago: Q2 Impact factor (2017): 3.040 Citációk száma: -

Az értekezés témájához nem kapcsolódó eredeti és összefoglaló (review) közlemények, könyvfejezetek illetve monográfia szerkesztések (SCI szerinti impakt faktor és független idézetek számával megadva)

Eredeti és review közlemények

PhD értekezés megvédése előtt:

1. Kovács I, **Iost N**, Solymosi F. Thermal and photo-induced dissociation of (C₂H₅)₂Zn to yield C₂H₅ on the Pd(100) surface. J Chem Phys, 101:4236-4247, 1994.
Scimago: Q1 Impact factor (1994): 3.635 Citációk száma: 7
2. **Iost N**, Virág L, Opincariu M, Szécsi J, Varró A, Papp JGy. Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. Cardiovasc Res, 40:508-515, 1998.
Scimago: D1 Impact factor (1998): 2.996 Citációk száma: 58
3. Virág L, Fazekas T, **Iost N**, Varró A, Berlin KD, Scherlag B, Lazzara JR, Papp JGy. Effect of GLG-V-13, a class III antiarrhythmic agent, on potassium currents in rabbit ventricular myocytes. Life Sciences, 66: PL253-PL258, 2000.
Scimago: Q1 Impact factor (2000): 1.808 Citációk száma: 5
4. Varró A, Baláti B, **Iost N**, Takács J, Virág L, Lathrop DA, Lengyel C, Tálosi L, Papp JGy. The role of the delayed rectifier component I_{Ks} in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. J Physiol (London), 523:67-81, 2000.
Scimago: D1 Impact factor (2000): 4.455 Citációk száma: 149

PhD értekezés megvédése után:

5. Magyar J, **Iost N**, Körtvély Á, Bányász T, Virág L, Szigligeti P, Varró A, Opincariu M, Szécsi J, Papp JG, Nánási PP. Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes. Pflügers Archiv, 441:144-149, 2000.
Scimago: Q1 Impact factor (2000): 2.203 Citációk száma: 51
6. Baczkó I, El-Reyani NE, Farkas A, Virág L, **Iost N**, Leprán I, Mátyus P, Varró A, Papp JGy. Antiarrhythmic and electrophysiological effects of GYKI-16638, a novel N-(phenoxyalkyl)-N-phenylalkylamine, in rabbits. Eur J Pharmacol, 404:181-190, 2000.
Scimago: Q2 Impact factor (2000): 2.236 Citációk száma: 5
7. Lengyel Cs, **Iost N**, Virág L, Varró A, Lathrop DA, Papp JGy. Pharmacological block of the slow component of the outward delayed rectifier current (I_{Ks}) fails to lengthen rabbit ventricular muscle QTc and action potential duration. Br J Pharmacol, 132:101-110, 2001.
Scimago: D1 Impact factor (2001): 3.502 Citációk száma: 75
8. Virág L, **Iost N**, Opincariu M, Szolnoky J, Szécsi J, Bogáts G, Szenohradszky P, Varró A, Papp JGy. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. Cardiovasc Res, 49:790-797, 2001.
Scimago: D1 Impact factor (2001): 4.552 Citációk száma: 75
9. Lengyel Cs, Horváth Cs, Biliczki P, Dézsi L, Németh M, **Iost N**, Virág L, Tálosi L, Papp JGy, Varró A. Effect of a neuroprotective drug, eliprodil on cardiac repolarization: importance of the decreased repolarisation reserve in the development of proarrhythmic risk. Br J Pharmacol, 143:152-158, 2004.
Scimago: D1 Impact factor (2004): 3.325 Citációk száma: 9
10. Biliczki P, Acsai K, Virág L, Tálosi L, **Iost N**, Biliczki A, Papp JGy, Varró A. Cellular electrophysiological effect of terikalant in the dog heart. Eur J Pharmacol, 510:161-166, 2005.
Scimago: Q2 Impact factor (2005): 2.477 Citációk száma: 3
11. Cotella D, **Iost N**, Darna M, Ravens U, Wettwer E. Silencing the cardiac potassium channel Kv4.3 by RNA interference in a CHO expression system. Biochem Biophys Res Commun, 330:555-560, 2005.
Scimago: Q1 Impact factor (2005): 3.00 Citációk száma: 2

12. Radicke S, Cotella D, Graf EM, Banse U, **Jost N**, Varro A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current I_{to} by KCNE β -subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res*, 71:695-703, 2006.
Scimago: D1 Impact factor (2006): 5.826 Citációk száma: 90
13. Lengyel C, Virág L, Bíró T, **Jost N**, Magyar J, Biliczki P, Kocsis E, Skoumal R, Nánási PP, Tóth M, Kecskeméti V, Papp JGy, Varró A. Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res*, 73:512-520, 2007.
Scimago: D1 Impact factor (2007): 6.127 Citációk száma: 48
14. Prorok J, Kovács PP, Kristóf AA, Nagy N, Tombácz D, Tóth JS, Ördög B, **Jost N**, Virág L, Papp JG, Varró A, Tóth A, Boldogkoi Z. Herpesvirus – mediated delivery of a genetically encoded fluorescent Ca^{2+} sensor to canine cardiomyocytes. *J Biomed Biotechnol*, Vol. 2009, Article ID 361795, doi:10.1155/2009/361795, 2009.
Scimago: - Impact factor (2009): 1.750 Citációk száma: 3
15. Virág L, **Jost N**, Papp R, Koncz I, Kristóf A, Kohajda Z, Harmati G, Carbonell-Pascual B, Ferrero JM Jr, Papp JG, Nánási PP, Varró A. Analysis of the contribution of I_{to} to repolarization in canine ventricular myocardium. *Br J Pharmacol*, 164:93-105, 2011.
Scimago: D1 Impact factor (2011): 4.409 Citációk száma: 7
16. Mozsos I, Hancu M, **Jost N**. Isointegral body surface maps and left ventricular hypertrophy in post-infarction heart failure patients. *Acta Physiol Hung*, 99:18-24, 2012.
Scimago: - Impact factor (2012): 0.882 Citációk száma:-
17. Nagy N, Acsai K, Kormos A, Sebők Zs, Farkas AS, **Jost N**, Nánási PP, Papp JGy, Varró A, Tóth A. $[Ca^{2+}]_i$ -induced augmentation of the inward rectifier potassium current (I_{K1}) in canine and human ventricular myocardium. *Pflügers Archiv*, 465:1621-1635, 2013.
Scimago: Q1 Impact factor (2013): 3.073 Citációk száma: 15
18. Ördög B, Hategan L, Kovács M, Seprényi G, Kohajda Z, Nagy I, Hegedűs Z, Környei L, **Jost N**, Katona M, Szekeres M, Forster T, Papp JGy, Varró A, Sepp R. Identification and functional characterisation of a novel KCNJ2 mutation, VAL302DEL, causing Andersen-Tawill syndrome. *Can J Physiol Pharmacol*, 93:569-579, 2015.
Scimago: Q2 Impact factor (2015): 1.704 Citációk száma: 1
19. Nagy N, Szél T, **Jost N**, Tóth A, Papp JGy, Varró A. Novel experimental results in human cardiac electrophysiology: measurement of Purkinje fibre action potential from undiseased human heart. *Can J Physiol Pharmacol*, 93:803-810, 2015.
Scimago: Q2 Impact factor (2015): 1.704 Citációk száma: 2
20. Petruş A, Duicu OM, Sturza A, Noveanu L, Kiss L, Dănilă M, Baczkó I, Muntean DM, **Jost N**. Modulation of mitochondrial respiratory function and ROS production by novel benzopyran analogues. *Can J Physiol Pharmacol*, 98:811-818, 2015.
Scimago: Q2 Impact factor (2015): 1.704 Citációk száma: 3
21. Pueyo E, Dangerfield CE, Britton OJ, Virág L, Kistamás K, Szentandrassy N, **Jost N**, Varró A, Nánási PP, Burrage K, Rodríguez B. Experimentally-Based computational investigation into beat-to-beat variability in ventricular repolarization and its response to ionic current inhibition. *PLoS ONE* 11(3): e0151461, 2016.
Scimago: D1 Impact factor (2015): 2.806 Citációk száma: 7
22. Major P, Baczkó I, Hiripi L, Odening KE, Juhász V, Kohajda Z, Horváth A, Seprényi G, Kovács M, Virág L, **Jost N**, Prorok J, Ördög B, Doleschall Z, Nattel S, Varró A, Bósze Z. A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of KCNE1 gene. *Br J Pharmacol*, 173:2046-2061, 2016.
Scimago: D1 Impact factor (2015): 5.491 Citációk száma: 6

23. Petrus A, Sturza, Duicu OM, Utu D, Bedreag O, Kis L, Baczko I, Muntean DM, **Jost N**. Modulation of vascular reactivity by novel synthetic benzopyran analogues in rat aortas. *Revista Chimie (Bucharest)*, 67(5), 908-910, 2016.

Scimago: Q3

Impact factor (2016): 1.232

Citációk száma: 2

24. Horváth A, Lemoine MD, Löser A, Mannhardt I, Flenner F, Uzun AU, Neuber C, Breckwoldt K, Hansen H, Girdauskas E, Reichenspurner H, Willems S, **Jost N**, Wettwer E, Eschenhagen T, Christ T. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, inward rectifier K⁺ current, I_{K1}, I_{K,ACh}, engineered heart tissue, resting membrane potential, repolarization fraction, action potential duration. *Stem Cells Reports*, 10(3):822-833, 2018

Scimago: D1

Impact factor (2017): 6.537

Citációk száma: 0

25. Orvos P, Kohajda Z, Szlovák J, Gazdag P, Árpádfy-Lovas T, Tóth D, Geramipour A, Tálosi L, **Jost N**, Varró A, Virág L. Evaluation of possible proarrhythmic potency: comparison of the effect of dofetilide, cisapride, sotalol, terfenadine and verapamil on hERG and native I_{Kr} currents and on cardiac action potential. *Toxicol Sci*, doi: 10.1093/toxsci/kfy299, 2018.

Scimago: D1

Impact factor (2017): 4.181

Citációk száma: 0

Könyvfejezetek:

1. Varró A, P Biliczki, **Jost N**, Virág L, Hála O, Papp JGy. Pharmacology of potassium channel blockers. In. *Solvay Pharmaceutical Conferences. Atrial Fibrillation: New Therapeutic concepts*. Szerk. J.G. Papp, M. Straub, D. Ziegler, IOS Press, pp. 27-39, 2003, ISBN: 1 58603-387-5.

2. **Jost N**. Transmembrane ionic currents underlying cardiac action potential in mammalian hearts. In. *Advances in cardiomyocyte research*. Ed. Péter P. Nánási. Transworld Research Network, Tivandrum, Kerala, India, pp. 1-45, 2009, ISBN: 978-81-7895-418-9, 2009.

3. **Jost N**. The cardiac action potential and the underlying currents. In. *Principles and Experiments Guide in Electrophysiology and Molecular Biology*. Eds: N Jost and DM. Muntean. Editura Victor Babes, Timisoara, 2014, pp. 9-26. ISBN: 978-963-306-302-6 (HU), 978-606-8456-33-1 (RO).

Monográfia szerkesztés:

1. Translational research in cardiovascular disease. A cross-border approach. Eds. Muntean D, Varró A, **Jost N**, Fira-Mladinescu O, Tóth A, Mozsos I, Virág L), 120 oldal, Editura Victor Babes, Timisoara, 2010. ISBN 978-606-92022-7-2 (HU) and ISBN 978-963-482-981-2 (RO).

2. Principles and experiments guide in electrophysiology and molecular biology. Eds. **Jost N**, Muntean DM). 184 oldal, Editura Victor Babes, Timisoara, 2014; ISBN: 978-963-306-302-6 (HU) and 978-606-8456-33-1 (RO).

Szabadalmak:

Mátyus P, Polonkáné Bálint Á, Krajsovsky G, Balogh B, Czompa A, Deme R, Varró A, Virág L, Baczkó I, Jost N, Tálosi L, Orvos P, Bánsághi Sz, Szerémy P, Tóth-Molnár E. Gyógyszerkészítmény pitvarfibrilláció kezelésére

Lajstromszám: P1300389

Benyújtás éve: 2013.

Közzététel éve: 2013

Varró A, Mátyus P, Baczkó I, Falkay Gy, **Jost N**, Leprán I, Sztojkov-Ivanov A, Virág L, Buzás N. Desethylamiodarone compositions

Lajstromszám: WO2013186746 A1

Lajstromszám: PCT/IB2013/054871

Benyújtás éve: 2013.

Közzététel éve: 2015

Baczkó I, Bősze Zs, **Jost N**, Major P, Hiripi L, Varró A, Virág L. A KCNE1 gén domináns recesszív mutációja által okozott hosszú QT szindróma transzgenikus nyúl modellje

Lajstromszám: P 13 00 705 A1

Benyújtás éve: 2013

Közzététel éve: 2015

Acsai K, Baczkó I, Fülöp F, **Jost N**, Leprán I, Márton Z, Nagy N, Prorok J, Szakonyi Zs, Tóth A, Varró A, Virág L. Carbocyclic nucleoside analogues as novel selective sodium/calcium exchange inhibitors

Lajstromszám: még nincs

Benyújtás éve: 2016. május 26.

Benyújtás száma: P16000342

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom gimnáziumi tanárainknak, akik szakmai tudása és emberi hozzáállása indított el ezen a pályán. Különösen osztályfőnökömnek és fizika tanáromnak, **Varga Annának**, illetve matematika tanáromnak, **Kiss Máriának**, kiktől nemcsak a tantárgyukkal kapcsolatos átfogó tudást, de életszemléletet, problémamegoldó gondolkodást és munkámmal szembeni igényességet is tanultam. Köszönöm kívülük valamennyi kiváló egyetemi oktatómnak, különösen diplomamunkám témavezetőinek (Prof. Solymosi Frigyes akadémikus úrnak és Dr. Kovács Imre tudományos munkatársnak), hogy a magas szintű ismeretek átadásán kívül hozzásegítettek az igényes tudományos gondolkodás és kísérletes munka alapjainak elsajátításához.

Hálás köszönettel tartozom **Prof. Papp Gyula akadémikus úrnak**, első munkahelyi vezetőmnek, hogy fizikus létemre lehetővé tette bekapcsolódásomat az orvostudományi kutatások sűrűjébe, megszerettette velem a kardiovaszkuláris élet és kórélettant, farmakológiát és folyamatosan segített tudományos előre haladásomban.

Köszönettel tartozom **Varró András professzor úrnak**, aki a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetbe történő első belépésem napjától a legjobb mentorom, és egyben barátom lett, és aki mellett magam is sikerült kutatónak és oktatónak válnom, és aki nélkül ezeket a sorokat sem írhatnám.

Különösen hálás vagyok **Dr. Virág László tanár úrnak**, akivel szintén az első naptól kezdve együtt dolgoztam, akitől sokat tanultam, majd akivel sikeresen vezettük/vezetjük az *In vitro* elektrofiziológiai laboratóriumot.

Őszintén hálás vagyok Ursula Ravens, Erich Wettwer, Dobromir Dobrev professzoroknak és Dr. Torsten Christ tanár úrnak, akik németországi tanulmányutam alatt voltak vezetőim, illetve kollegáim, és akik bizalmat szavaztak és adtak nekem, és akikkel számos értékes eredményt értünk el elsősorban a pitvarfibrilláció kutatási témában.

Köszönettel tartozom Dr. Lengyel Csaba, Dr. Leprán István, Dr. Tóth András és Dr. Végh Ágnes professzoroknak, Dr. Baczkó István és Dr. Pataricza János tanár uraknak, Dr. Ördög Baláznak, Dr. Szűts Viktóriának, Dr. Prorok Jánosnak, Dr. Nagy Norbertnek, Dr. Orosz Andreának, Baczkó Gabriellának, Váradi Editnek, Molnárné Zsuzsának, Csomor Magdolnának, Girst Gábornak, Dobai Gábornak és valamennyi további olyan külön meg nem nevezett munkatársamnak, barátomnak támogatásukért vagy segítségükért, ami nagymértékben hozzájárult kutatómunkám eredményességéhez.

Külön szeretném megköszönni saját volt PhD hallgatóimnak Dr. Nagy Zsolt Ákosnak, Dr. Corici Klaudiának, Dr. Nagy (Kohajda) Zsófiának, Dr. Amir Geramipournak, Dr. Horváth Andrásnak és Kovács Péter Pálnak is akik szakmai elkötelezettsége és szorgalma nélkülözhetetlen volt az értekezésben foglalt jelentős mértékű eredmények eléréséhez.

Köszönetet mondok Fazekas Tamás professzor úrnak, akitől sokat tanultam a pitvarfibrilláció mechanizmusáról és klinikai-elméleti összefüggéseiről.

Köszönetet mondok Dr. Nánási Péter, Dr. Bányász Tamás és Dr. Magyar János professzoroknak, illetve Dr. Szentandrassy Norbert tanár úrnak és valamennyi debreceni partneremnek a sikeres kooperációkért és gyakorlati segítségükért a jelen értekezésben szereplő több kutatási témában is.

Szintén köszönetet mondok Fülöp Ferenc és Kiss Loránd professzoroknak és Dr. Szakonyi Zsolt tanár úrnak (GYTK Gyógyszerkémiai Intézet) a sikeres kooperációkért és gyakorlati segítségükért az NCX szerek kutatása témában.

Köszönettel tartozom szüleimnek, akiktől emberi tisztességet és őszinte szeretetet tanultam. Hálás vagyok feleségemnek, Krisztinának, és gyerekeimnek, Benedeknek és Zitának türelmükért és feltétlen támogatásukért, amivel sokat segítettek tudományos pályafutásomban.

Végül, szeretnék köszönetet mondani kutatásaim anyagi támogatóinak is:

- Először is köszönetemet fejezem ki a MTA Támogatott Kutatócsoport Programnak, amely 2000 óta folyamatosan biztosította és biztosítja stabil kutatói állásom.
- Kutatásaimat témavezetőként a következő projektek támogatták: OTKA: F-67879, K-82079 és NN-109904; ETT: 483/2006 és 306/2009; BAROSS NKTH Programok: REG_DA_KFI_09-2-2009-0115; HU-RO Programok: HURO-TWIN, HURO/1101/086/2.2.1, Romániai Felsőoktatási KFI Programok: PN-II-ID-PCE-2012-4-0512; Bolyai Ösztöndíj (2002, 2005 és 2008 időszakok) és a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program.
- Szenior közreműködő kutatóként több mint 20 olyan projektben vettem részt, amelyet az OTKA, ETT, NKTH Baross és Jedlik Programok, HURO Program, TAMOP, NKFIH-OTKA, GINOP és EFOP programok támogattak.