

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Területi és nemi inhomogenitás az emlős kamrai szívizomszövetben

Dr. Szabó Gergely

Témavezető: Dr. Bányász Tamás



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2009.**

Betétlap

**Területi és nemi inhomogenitás az emlős kamrai
szívizomszövetben**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében

Írta: Dr. Szabó Gergely

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori
Iskolája

(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bányász Tamás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Tóth András, PhD

Dr. Szentmiklósi József, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2009. október 13.

Az értekezés bírálói:

Dr. Mohácsi Attila, PhD

Dr. Varga Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Mohácsi Attila, PhD

Dr. Varga Zoltán, PhD

Dr. Tóth András, PhD

Dr. Szentmiklósi József, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2009. október 13.

I. BEVEZETÉS

A szív izomzata a hagyományos elképzelések szerint homogén morfológiájú és funkciójú sejtek által felépített úgynevezett „functionalis syncytium”. Ez a hosszú időn át, szinte dogmaként kezelt felfogás gyorsan semmivé foszlott, amikor az első megfigyelések napvilágot láttak a jobb és a bal kamra falát alkotó sejtek funkcionális különbözőségéről. Ahogy ez lenni szokott, a kezdeti megfigyeléseket lavinaszerűen követték az újabbak, s a szívizmot alkotó sejtek funkcionális inhomogenitása ma már tankönyvi adat. Az akciós potenciál morfológiája jelentős különbséget mutat a pitvar és a kamra, vagy a jobb kamra bal kamra, epikardiális és endokardiális régió összehasonlításakor. Az akciós potenciáloknak a szívizmon belüli különbözőségéért a sejtmembrán ionáramainak ugyancsak megfigyelt regionális inhomogenitása a felelős. Ebben a munkában azt kívántuk megvizsgálni, hogy a szívizomsejtek elektrofiziológiai inhomogenitása magyarázható-e az ioncsatornák expressziós mintázatának különbségeivel.

I/1. A szívizom rétegei közötti inhomogenitás

Az emlős kamrai szívizomról korábban azt gondolták, hogy homogén, egyfoma sejtek alkotják, ugyanakkor a kamrafal különböző rétegeiben találtak különbségeket a sejtek akciós potenciáljai között. Először a könnyen elkülöníthető epikardiumhoz valamint endokardiumhoz közel eső sejtek akciós potenciáljai között találtak karakterisztikus különbségeket. Később, ahogy a kísérleti technikák fejlődtek, már a kutya kamrafal középső rétegében (midmiokardium) is találtak egy, az eddigiektől különböző sajátosságokkal rendelkező sejttypust, az M-sejtet.

Az akciós potenciál kamrafalon belüli különböző konfigurációit több fajban is részletesen leírták, köztük kutyában, sertésben, tengerimalacban, nyúlban, patkányban és emberben is. Az akciós potenciál felszálló szárát létrehozó Na^+ -áram (I_{Na}) szívizom rétegeken belüli különbségeit is megfigyelték több különböző állatfajban. Amikor az akciós potenciálok amplitúdóját hasonlítjuk össze a szívizom rétegeiben, eltérő fajok között, ellentmondásokkal találkozunk. A közlemények eredményeit összevetve megállapíthatjuk hogy az epikardiális sejtek kisebb akciós potenciál amplitúdóval rendelkeznek az endokardiális réteghez viszonyítva.

Az akciós potenciál felszálló, 0. fázisa után a korai, gyors repolarizáció alkotja az AP 1. fázisát és az azt követő ismételt depolarizációval együtt alakítja ki a tipikus “spike-and-dome” AP konfigurációt. Ez a jellegzetes AP alak csak az epikardiális és az M-sejtekben alakul ki, az endokardiális sejtekben hiányzik. Legmarkánsabban kutya szívizomsejtekben jelenik meg, kevésbé mutatható ki ember, sertés és nyúl szívizomsejtekben, és teljesen hiányzik tengerimalac szívizomban. Kutya szívizomszövetben a korai repolarizáció nagysága kisebb az endokardiális sejtekben, mint a két másik sejttípusban, ugyanakkor az epikardiális sejtekben nagyobb, mint az M-sejtekben. Ionáramok szintjén vizsgálva, nagyobb I_{to} csatorna denzitást találtak az epikardiális és midmiokardiális sejtekben az endokardiális réteghez viszonyítva egér, nyúl, patkány, kutya és humán szívizomsejtekben. Az epikardiális és az M-sejtek közül az epikardiális sejteknek volt szignifikánsan nagyobb I_{to} amplitúdója.

Az akciós potenciál plató fázisa után következik be az I_{K} és az I_{K1} áramok által létrehozott AP repolarizáció. A végső repolarizáció és így az akciós potenciál hossza nagymértékben függ a plató magasságától: ha nagyobb a 2. fázis amplitúdója akkor gyorsabban aktiválódik a késői típusú káliumáram gyors komponense (I_{Kr}), így hamarabb létrejön a

végző repolarizáció és rövidebb lesz az AP. Ez történik az epikardiális sejtekben, ahol a legnagyobb a plató fázis magassága és a legrövidebb az AP kutya, sertés, tengerimalac és nyúl szívizomsejtekben. Az M-sejtek akciós potenciáljai minden közlemény szerint hosszabbak az epi- és endokardiális sejtek AP-hoz képest, és ezen sejtek AP hosszának volt a legmeredekebb frekvencia függése, tehát az ingerlési ciklushossz növelésekor ezen sejtek akciós potenciálja nyúlt meg a legnagyobb mértékben.

Ha megvizsgáljuk a terminális repolarizációt létrehozó ionáramokról szóló közleményeket, akkor láthatjuk, hogy nyúl bal kamrai midmiokardiális szívizomsejtekben kisebb I_{Ks} amplitúdót írtak le az epi- és endokardiális sejtekhez képest, míg az I_{Kr} amplitúdója hasonló volt minden sejttypusban. Az epi- és endokardiális sejtek összehasonlításakor nagyobb I_{Ks} -denzitást találtak az epikardiális rétegben, ami összhangban volt az itt megfigyelt rövidebb akciós potenciálokkal. Az I_{Ks} transzmurális gradiensét kutya szívizomsejtekben is tanulmányozták, minden esetben újfent a midmiokardiumban volt az áram amplitúdója a legkisebb. Az epi- és endokardiumot összehasonlítva azonban nem találtak jelentős különbséget sem az I_{Ks} és I_{Kr} áram amplitúdójában sem kinetikai sajátságaiban. A befelé egyenirányító kálium áram (I_{K1}) sajátságaiban nem találtak különbséget a szívizom rétegein belül egyik vizsgált emlősfajban sem.

Az epikardiális/endokardiális különbségek miatt létrejövő transzmurális gradiens élettani jelentősége az EKG repolarizáló, a T és (feltételezések szerint) az U hullámok pozitív kitéréseinek létrehozása.

I/3. Vertikális különbségek a szívben belül

Az előző fejezetben tárgyalt transzmurális különbségekhez képest a szívizom vertikális inhomogenitásáról sokkal kevesebb publikáció jelent meg. Az apiko-bazális különbségeket vizsgálták többek között kutya, nyúl, patkány, vadászgörény, sertés, tengerimalac és ember szívekben.

Casis és mtsai. patkány szívizomsejteken a szívcsúcson mért akciós potenciálokat rövidebbnek találták, mint a bazális területeken regisztráltakat, ugyanakkor a közleményben az apikális epikardium és a bazális endokardiumot hasonlították össze, így a bemutatott vertikális különbséget nagymértékben befolyásolhatta a transzmurális grádiens. Watanabe és mtsai. tengerimalac multicelluláris preparátumot használva az AP paramétereiben nem találtak vertikális grádiens, egyedül az akciós potenciál hossza változott a szívizom különböző területein: rövidebb apikális akciós potenciálokat mértek a jobb kamra endokardiális és a bal kamrai szeptum bazális részéhez képest. Emberi szíveket vizsgálva is találunk az irodalomban apikálisan hosszabb és rövidebb akciós potenciálokat is.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy jelentős mennyiségű, de gyakran egymásnak ellentmondó adatot találunk az irodalomban a szívizom regionális inhomogenitását illetően mind az akciós potenciál tulajdonságaiban mind az azt kialakító ionáramok karakterisztikájában. Ezzel egyidőben az adatokban nagymértékű a fajok közötti különbség, így a emberi mintákon végzett vizsgálatoknak különösen nagy jelentőségük van.

Munkánkban tehát célul tűztük ki az emlős kamrai szívizom transzmurális és vertikális inhomogenitásának szisztematikus feltérképezését elektrofiziológiai módszerekkel. Kíváncsiak voltunk, hogy a talált funkcionális eltérések milyen mértékben tükröződnek az ioncsatorna-fehérjék expressziós mintázatában.

I/4. Nemi hormonok hatása a szívizom elektromos sajátosságaira

Nemcsak egy egyed szívében belül végezhetők összehasonlítások, hanem ugyanazon faj különböző egyedeinek szívei között is találunk különbségeket. Kézenfekvő egy fajon belüli egyedek közötti nemi különbségek vizsgálata, mivel jól ismert különbségek vannak akár csak a kamrai repolarizációban is férfiak és nők között.

Mivel az AP paramétereiben és az ionáramokban bekövetkezett változások jól nyomon követhetők a testfelszíni EKG regisztrátumon, ezért első megközelítésben EKG mérésekkel összehasonlíthatjuk különböző egyedek szívének elektrofiziológiai sajátosságait. Amennyiben látunk különbségeket az EKG paraméterekben, feltételezhetjük, hogy a szívizom elektrofiziológiája és az ioncsatorna-fehérjék expressziós szintjei is eltéréseket mutathatnak.

A nemi különbségeket – amiket normál és kasztrált férfiak és nők összehasonlító EKG tanulmányaiból tudunk – úgy tűnik, hogy elsősorban a hím nemi hormon, a tesztoszteron jelenlétének vagy hiányának tudhatjuk be, kisebb szerepe van a női szexuáliszteroidoknak. A tesztoszteron és az ösztrogén szívre gyakorolt hatása máig alig ismert, tehát egy állatmodell nagymértékben segíthet tisztázni a nemi hormonoknak a szívizom ioncsatornáira és ionáramjaira gyakorolt molekuláris hatását.

Mivel a nemi hormonok szubsztitúciója jelenleg is alkalmazott gyakorlat a klinikumban, munkánk nemi különbségeket vizsgáló részét úgy terveztük meg, hogy kutya EKG paraméterein vizsgáljuk meg az ösztrogén és tesztoszteron hatásait, amely eredményeket össze tudunk hasonlítani az irodalomban található emberi EKG eredményekkel.

Kutya állatmodellünket (bár korlátokkal) megfelelőnek találtuk a nemi különbségek vizsgálatára, és arra is, hogy emberre vonatkozó releváns konklúziókat vonjunk le.

II. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy az emlős szívizmon belüli, illetve ugyanazon faj egyedei közötti elektrofiziológiai inhomogenitás magyarázható-e az ioncsatornák expressziójában megfigyelhető különbségekkel.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III/1. Szívizom preparátumok

Vizsgálatainkhoz kutatási célra tenyésztett vegyes nemű ivarérett kutyák szívét használtunk. A humán kamrai szöveteket 7 db, kardioplégias oldatban tartott, egészséges donor szívből nyertük. A szíveket olyan szervdonorokból kaptuk, akiknek a szemilunáris billentyűjét transzplantációra használták fel. A kutya és a humán szívek esetében is először 5x5 mm-es darabokat vágunk ki a szívek bal kamrai szabad falának apikális és bazális régióiból, majd dermatómmal lenyúztunk egy 0,5 mm vastag szubepikardiális csíkot a bal kamra felületéről az apikális-bazális tengely felénél. Hasonló módon vettünk mintát a midmiokardium középső rétegéből is 3 mm-el az epikardium alatt.

III/2. Elektrofiziológiai vizsgálatok

III/2. 1. Sejtizolálás

A kutya kamrai szívizom sejteket anterográd irányú enzimatus szegmentperfúziós technika alkalmazásával nyertük.

III/2. 2. Az akciós potenciálok mérése

A membránpotenciál mérésére a Volders és mtsai. által egysejtes rendszerre kidolgozott, nagyellenállású üveg-mikroelektrodás eljárást alkalmaztuk. Kísérleteink során a sejtsuszpenzióból 2-3 cseppet egy invertáló mikroszkóp tárgyasztalára rögzített mérőkádba cseppentettünk. A kád és a perfundáló oldatok hőmérsékletét a kísérletek során termosztát és perfúziós rendszer segítségével végig 37 °C-on tartottuk. A sejtek membránpotenciáljának követésére 3 M-os KCl-dal töltött, 25-30 M Ω ellenállású mikroelektrodát használtunk. Minden mérés során 10 egymást követő AP-t rögzítettünk, átlagoltuk őket majd az elemzés során a következő paramétereket határoztuk meg: a nyugalmi membránpotenciál értéke, a depolarizáció maximális sebessége ($V_{\max}$), az AP amplitúdója, valamint az AP 20, 50 illetve 90%-os repolarizációjához tartozó időtartama (a későbbiekben APD₂₀, APD₅₀ és APD₉₀).

III/2. 3. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában, feszültség-clamp körülmények között mértük. A méréseket 37 °C-on, normál Tyrode oldatban végeztük.

III/3. EKG mérések

Az EKG mérések altatott állapotban történtek, 10-10 db, felnőtt korú, kutatási célra tenyésztett hím és nőstény kutyán. Az EKG értékeket (szívfrekvencia, PQ-intervallum, QRS-időtartam és QT-intervallum) folyamatosan monitoroztuk egy 12 csatornás PC-vezérelt elektrokardiográfon. A kontroll EKG felvétel elvezetése után az állatokat Dofetiliddel (HERG-csatorna gátló) kezeltük.

A mérések elvégzése után mind a hím, mind a nőstény állatokat kasztráltuk. 1 hónapos időtartam után, miután a kutyák endokrin státusza

stabilizálódott, az EKG méréseket a Dofetilide adásával együtt megismételtük. Ezek után az állatok inverz hormon szubsztitúciót kaptak 4 héten keresztül, a kasztrált hím kutyák 17β -ösztadiol-benzoátot kaptak, a nőstényeket pedig 5α -dihidroxytesztoszteron - propionáttal kezeltük. Végül az EKG méréseket ismét elvégeztük a Dofetilide kezeléssel együtt.

A kísérletek minden egyes fázisában, a Dofetilide alkalmazása előtt 3 mL vért vettünk a kutyáktól. A 17β -ösztadiol- és a tesztoszteron-szinteket elektro-kemilumineszcens immunoesszé technikát (ECLIA kit) alkalmazva határoztunk meg. A fent leírt protokoll után az állatok szívét kiemeltük és a szívizmukból a korábbiakban leírtaknak megfelelően (a regionális különbségeket figyelmen kívül hagyva) mintákat vettünk az ioncsatorna-fehérjék denzitásának meghatározása céljából.

III/4. Western (immuno)blot

A szívizom különböző területeiről származó minták membrán proteinjeinek kinyerését Han és mtsai. módosított módszerét használva végeztük. A következő elsődleges antitesteket használtuk: nyúl anti-Kv1.4, anti-Kv4.3, anti-Kir 2.1, anti-Nav1.5, anti- α_{1C} , anti-minK, anti-HERG és anti-MiRP1, kecske anti-KchIP2 és anti-LQT1.

III/5. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A mérések során kapott adatokat átlagoltuk és kiszámítottuk a standard hibát (SE). Az átlagértékek különbségeinek megítélésakor egyváltozós ANOVA-t és Student-féle kétmintás t-próbát használtunk. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p értéke kisebb volt, mint 0,05.

Minden elvégzett vizsgálat összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publication No 85-23. revised 1996) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A humán minták kezelését és

a kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (No. 51-57/1997 OEJ).

IV. EREDMÉNYEK

IV/1. Akciós potenciál karakterisztika és membránkapacitás

A munka során az apikális (APEX) és bazális (BASE) területről származó, valamint az epikardiális (EPI) és midmiokardiális (MID) rétegből származó sejtek akciós potenciáljait és azok jellegzetes paramétereit hasonlítottuk össze. Az APEX-BASE összehasonlításnál használt sejtek a szívizom középső (MID) rétegből származtak. Az EPI sejtek akciós potenciáljai rövidebbek voltak a MID sejtekénél, az APEX sejtek akciós potenciáljai pedig a BASE sejtekénél. Az EPI és APEX sejtek akciós potenciáljai prominens első fázis repolarizációval rendelkeztek, míg a MID és BASE sejtek esetében ez kisebb volt. Ugyanakkor a MID sejtek maximális depolarizációs sebessége ($V_{\max}$) szignifikánsan meghaladta az EPI sejteken mért értéket, és az AP amplitúdója is szignifikánsan nagyobb volt. Az apikális és bazális sejtek $V_{\max}$ értéke között nem találtunk különbséget, mint ahogy nem volt különbség az AP amplitúdójában sem a két területről származó sejtek között. A vizsgált sejtcsoportok nyugalmi membránpotenciál-értékei között nem találtunk szignifikáns különbséget.

A sejtek kapacitását feszültség-clamp üzemmódban határoztuk meg. A kapacitásértékek átlagai minden vizsgált sejtcsoportban hasonló értéket mutattak, szignifikáns különbséget sehol nem találtunk. Ez arra utal, hogy a sejtek mérete valamennyi vizsgált régióban egyforma volt.

IV/2. Befelé egyenirányító káliumáram (I_{KI})

A membrán egyensúlyi áram-feszültség (I/V) összefüggését 400 ms hosszú, -130 és +50 mV közötti, 5 millivoltos lépcsőkben alkalmazott

teszt impulzusokkal határoztuk meg 5 μM Nifedipin jelenlétében. Az egyes régiókból származó sejtek átlagait összehasonlítva a -130 és +40 mV közötti tartományban szignifikáns különbségeket sehol nem találtunk.

IV/3. L-típusú kalciumáram (I_{Ca})

Az L-típusú kalciumáram méréseknél Tyrode oldatot 3 mM koncentrációjú 4-aminopiridinnel, 1 μM E-4031-gyel és 30 μM chromanol 293B-vel egészítettük ki, hogy blokkoljuk a káliumáramokat. Vizsgáltuk az áram amplitúdójának, inaktivációjának feszültségfüggését, és a +5 mV értéken mért inaktiváció időállandóját. Az egyes régiókban mért paraméterek között szignifikáns különbséget sehol nem figyeltünk meg. Tehát a kalciumáramok paraméterei az általunk vizsgált régiókban megegyeznek.

IV/4. Tranziens, kifelé irányuló káliumáram (I_{to})

Az I_{to} -t -80 mV-os tartó feszültségről aktiváltuk 400 ms hosszú, -20 és +60 mV közötti tesztimpulzusokkal, 10 mV-os lépésközökkel. Minden egyes tesztimpulzus előtt egy rövid (5 ms időtartamú) -30 mV-os depolarizáló lépcsőt alkalmaztunk, hogy inaktiváljuk a gyors, feszültség függő Na^+ -áramot, a külső oldat pedig az $I_{Ca,L}$ gátlása céljából 5 μM Nifedipint tartalmazott. Az EPI és az APEX sejteknek a +10 illetve +20 mV feletti feszültségértékeknél szignifikánsan nagyobb I_{to} csúcsáram amplitúdója volt, mint a velük összehasonlításra kerülő MID és BASE sejteknek. Az áram inaktivációjának feszültségfüggését -80 mV-os tartó feszültségről -70 és -10 mV közötti, 5 mV-os lépcsőkben alkalmazott előimpulzust követő +50 mV-ra történő depolarizációval vizsgáltuk. Az előimpulzusok alkalmazása után +50 mV-on kiváltott csúcs áramokat az előimpulzus nélkül, ugyancsak +50 mV-on kiváltott áram csúcserősségére

normalizáltuk, és a hányadost az előimpulzus feszültségértékének függvényében ábrázoltuk, majd Boltzmann függvénnel illesztettük. Az EPI és MID sejtek esetében nem volt szignifikáns különbség az I_{to} egyensúlyi inaktivációjában. Az APEX sejtekben az inaktivációs görbe 4 mV-al jobbra helyezkedett el a BASE sejtek görbéjéhez képest. Ugyanakkor az APEX sejtek inaktivációjának feszültségfüggése görbéje kis mértékben, de szignifikánsan meredekebbnek adódott, mint a BASE sejteké.

Az I_{to} inaktivációjának időfüggését a +50 mV-on kialakult áram leszálló szárának exponenciális illesztésével kaptuk. Az inaktiváció sebességében nem találtunk szignifikáns különbséget egyik vizsgált csoport között sem.

IV/5. A késői típusú káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Az I_{Kr} aktiválását 200 ms hosszú -20 és +40 mV közötti, 10 mV-os lépcsőkben alkalmazott depolarizáló pulzusokkal végeztük. Az I_{Kr} -t farokáramként mértük a -40 mV-os tartófeszültségre történő repolarizáció során. A mérések során az $I_{Ca,L}$ és az I_{Ks} áramot 5 μ M Nifedipinnel és 30 μ M Chromanol 293B-vel gátoltuk. A +40 mV-os aktivációkor nem volt különbség az APEX és BASE sejtek farokáramai között. Ugyanakkor az aktiváló feszültség egy kis tartományában (+10 mV körül) az apikális áramamplitúdók szignifikánsan kisebbek voltak, mint a bazális sejtek áramai. Az I_{Kr} áram aktivációjának feszültség-függése esetén a görbéket két-állapotú Boltzmann függvénnel illesztettük. Azt találtuk, hogy az I_{Kr} kevésbé pozitív feszültségértékeken aktiválódik a BASE területeken, mint az APEX sejteiben. Az áram aktivációjának időállandóit envelope-teszttel határoztuk meg. Ezen protokoll során +30 mV-os depolarizáló pulzusokat alkalmazunk 5-900 ms időtartamban. A kapott áramamplitúdókat a pulzusok hosszának függvényében ábrázoltuk, majd

monoexponenciális egyenlettel illesztettük. Az aktivációs időállandók nem különböztek szignifikánsan a szívizom különböző, összehasonlításra került területein. A deaktivációs időállandókat két exponens illesztésével kaptuk a farokáram leszálló szakaszán. Nem volt szignifikáns különbség sem a gyors, sem a lassú időállandókban az APEX és BASE sejtek I_{Kr} áramai között.

Az I_{Kr} EPI/MID összehasonlítása során meghatároztuk az I_{Kr} aktivációjának feszültségfüggését, de nem találtunk szignifikáns különbséget az EPI és a MID sejtekben. Az áram deaktivációja gyorsabb volt az EPI sejtekben, mint a MID régióban: mind a gyors, mind a lassú deaktivációs időállandók szignifikánsan kisebbek az EPI sejtekben.

IV/6. A késői típusú káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

A késői típusú káliumáram lassú komponensét (I_{Ks}) teljesen aktivált és farokáramként egyaránt meghatároztuk. Tartó feszültségként -40 mV-ot, aktiváló feszültségként 3 s hosszú, -30 és +50 mV közötti feszültségértékeket alkalmaztunk 10 mV-os lépésközökkel. Az I_{Ca} -t 5 μ M Nifedipine, az I_{Kr} -t 1 μ M E-4031 segítségével blokkoltuk. Mind a teljesen aktivált, mind a farokáram szignifikánsan nagyobb volt az APEX, mint a BASE sejteken. Az I_{Kr} eredményekkel ellentétben az I_{Ks} aktivációs és deaktivációs időállandója is szignifikánsan kisebb volt az APEX sejtek esetében. Az aktiváció sebességét envelope-tesztel határoztuk meg. Az kapott időállandók az apikális sejtek esetében szignifikánsan alacsonyabbak, mint a bazális sejtek esetében. Az I_{Ks} deaktivációját -40 és +30 mV közötti feszültségértékeken vizsgáltuk, egy 3 s hosszú +50 mV-os depolarizáló impulzust követően. A kapott áramgörbék leszálló szarait exponenciális egyenlettel illesztettük, és a kapott időállandókat a deaktiváló feszültség függvényében ábrázoltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a -10 és +20 mV közötti feszültség tartományban a

deaktiváció szignifikánsan gyorsabb az APEX sejtek esetében, mint a BASE területeken.

Az EPI rétegben az I_{Ks} áram amplitúdóját szignifikánsan nagyobbak találtuk, mint a MID rétegben. Az aktiváció feszültségfüggése nem különbözött egymástól a két rétegben, csakúgy mint az aktiváció időállandói sem. Az I_{Ks} deaktivációját biexponenciális függvényekkel tudtuk megilleszteni, de sem a gyors, sem a lassú időállandók esetében nem találtunk különbséget az EPI és MID rétegek között.

IV/7. Ioncsatorna proteinek eloszlása a szívizom különböző területein

A további kísérletek célja annak eldöntése volt, hogy a vizsgált ionáramok paramétereiben észlelt különbségek (akár APEX/BASE, akár EPI/MID viszonylatban tapasztalt eltérések legyenek) eredhetnek-e az ioncsatornák expressziójának különbségeiből. Ezért meghatároztuk a fő ioncsatornaproteinek (α -alegységek), és azok ismert másodlagos szabályozó proteinjeinek expressziós mintázatát APEX/BASE és EPI/MID mintákban. A Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetével történő együttműködésünk keretein belül lehetőségünk nyílt egészséges, humán szívizomminták vizsgálatára is.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az L-típusú Ca^{2+} -csatorna α_{1C} (pórus formáló) alegységének, a befelé egyenirányító K^+ -csatorna Kir2.1 (pórus formáló) alegységének, valamint az I_{Kr} -csatorna HERG (pórus formáló) és MiRP1 (regulatórikus) alegységének expressziója nem különbözött szignifikánsan az APEX és BASE mintákban. Ezzel szemben a KvLQT1 és MinK (az I_{Ks} -csatorna pórus formáló és regulatórikus) alegységek expressziója szignifikánsan kisebb volt a BASE területekről származó mintákban. Hasonló asszimetriát találtunk az I_{to} áramot létrehozó csatornafehérjék expressziós mintázatában is: a Kv1.4- és a

KChIP2-fehérjék (pórus formáló és másodlagos I_{to} alegységek) szignifikánsan kisebb mértékben voltak jelen a BASE területeken, mint az APEX részen. A Kv4.3 expressziója (az I_{to} másik pórus formáló alegysége) ugyan kisebb volt a BASE mintákban, de a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak. Összevetve a kutya miokardiumból származó eredményekkel mennyiségi különbségek vannak a KChIP2, a MinK és a Kv1.4 expressziós szintjeinek relatív értékeiben, az APEX/BASE asszimetria emberi anyagban hasonló volt a kutyából származó mintákon megfigyeltékéhez.

Az α_{1C} , a Kir2.1, a HERG és a MiRP1 proteinek (sorrendben az I_{Ca} , az I_{K1} és az I_{Kr} áramokért felelős csatornák) expresszióiban nem volt szignifikáns különbség a kutyaszív epikardiális és a midmiokardiális rétegeből származó minták között. Ezzel szemben szignifikánsan nagyobb volt az epikardiális mintákban az I_{to} áramot létrehozó ioncsatorna fehérjéknek, a Kv4.3, a Kv1.4 és a KChIP2 proteineknek (két pórus formáló és egy regulatórikus alegység) az expressziója. A KvLQT1 és a MinK fehérjék (I_{Ks}) denzitása aszimmetrikus volt: a KvLQT1 expressziója magasabb volt az EPI területeken, míg a MinK denzitása a MID régióban volt magasabb. Ezen kívül itt megvizsgáltuk még a Nav1.5 (a gyors, feszültség függő Na^+ -csatorna pórus formáló alegysége) expressziós szintjét is, ami MID régióban mintegy kétszerese volt az EPI területen találtnak. Az EPI/MID ioncsatorna expressziós különbségeket 5 humán szíven is alkalmunk nyílt megvizsgálni: alapvetően hasonló ioncsatorna expressziós mintázatot kaptunk itt is, mint amit kutya mintákban észleltünk, kisebb mennyiségi különbségeket leszámítva. Egyedül a HERG-fehérje expressziójának EPI/MID hányadosa volt nagyobb a humán mintákban a kutya miokardiumban megfigyelt értékhez képest.

IV/8. Nemi hormonok hatása az EKG paraméterekre

A korábbi kísérleteinkben az ioncsatornák expressziójának és funkciójának szíven belüli inhomogenitását tanulmányoztuk. A következő kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy hogyan változik meg a szív ioncsatornáinak expressziója és funkciója különböző hormonstátuszú állatmodellekben. Vizsgáltuk kasztráció, illetve inverz hormon szubsztitúció hatásait.

IV/8. 1. Plazmahormon-szintek

Mind a plazmatesztoszteron-, mind a plazmaösztrogén-szinteket folyamatosan meghatároztuk a kísérletek során. A hím kutyák kasztrációja a plazmatesztoszteron-szint közel egy nagyságrendű csökkenéséhez vezetett, olyan szintre csökkent a plazma tesztoszteronkoncentrációja, mint a kontroll, vagy kasztrált nőstény állatokban. A kasztrált nőstény állatok tesztoszteron kezelése magasabb plazmatesztoszteron-szintet eredményezett, mint amit a kontroll hím állatokban tapasztaltunk. Az ösztrogénkoncentrációk a kontroll hímekben és ovariectomizált nőstényekben nem haladták meg az általunk használt kit detekciós határát ($18,4 \text{ pmol L}^{-1}$), a kontroll nőstényekben pedig igen nagy szórást mutattak. Egyedüli kivételt az ösztrogén kezelt hímek jelentettek, ahol a csoport átlaga $162 \pm 43 \text{ pmol L}^{-1}$ 17β -ösztradiol volt. Ezek az adatok kielégítően igazolják, hogy az inverz hormon szubsztitúció hatásos volt.

IV/8. 2. Szívfrekvencia és az atrioventrikuláris vezetés

Ha egy szívben, illetve azon belül a szinusz csomóban vagy pitvar-kamrai csomóban megváltozik az ioncsatornák funkciója, akkor a változás tükröződik a szívfrekvenciában és az atrioventrikuláris vezetés sebességében (PQ intervallum). A kasztráció kis mértékben

lecsökkentette mind a hím, mind a nőstény kutyák szívfrekvenciáját. Ezek a változások a nőstények esetében statisztikailag szignifikánsak voltak, míg a hím állatoknál nem érte el a változás a szignifikáns szintet. Inverz nemi hormon szubsztitúcióját követően (ösztrogén adagolása a kasztrált hímeknek és tesztoszteron a nőstényeknek) a szívfrekvencia nem különbözött a kontroll csoporttól sem hímek, sem nőstények esetében. Ehhez hasonló változásokat tapasztaltunk a PQ-intervallum viselkedésében is kasztráció, és kasztrációt követő inverz hormon szubsztitúció hatására. A kasztráció meghosszabbította, majd a hormonok fordított adása helyreállította a PQ- intervallumot.

IV/8. 3. Kamrai depolarizáció és repolarizáció

Az intraventrikuláris vezetésről a QRS-komplexum hossza nyújt információt a felszíni EKG-regisztrátumon. Sem a kasztráció, sem az inverz hormonszubsztitúció nem befolyásolta szignifikánsan a QRS-komplexum hosszát, ami arra utal, hogy az intraventrikuláris vezetésre nem hatnak a szexuáliszteroidok szintjében bekövetkező változások.

A depolarizációval ellentétben, a kamrai repolarizáció időtartama nagy mértékben függött a tesztoszteron szintjétől. Orchiectomia szignifikánsan megemelte a QT és a korrigált QT intervallum (QTc) hosszát hím kutyákban. A kasztrált hím kutyák 1 hónapig tartó ösztrogén kezelése tovább növelte a QT- és QTc-intervallum hosszát, de ez a növekedés a kasztrált állatok értékeihez képest már nem bizonyult szignifikánsnak. Nőstény kutyákban az ovariectomia nem okozott szignifikáns változást a QT- és QTc-intervallumban. A tesztoszteron egy hónapon át történő adagolása lerövidítette a repolarizáció időtartamát. Orchiectomia szignifikánsan megnövelte a QT- és QTc-diszperziót is, amit az ösztrogén adása tovább növelt. A QT- és QTc-intervallumokhoz hasonlóan, nőstény kutyákban ovariectomiával nem sikerült a diszperzió

mértékét megváltoztatni, de a tesztoszteron kezelés lecsökkentette a QT- és QTc-diszperziót a kasztrált nőstény állatokban.

IV/8. 4. Dofetilide indukált repolarizáció nyújtás

Dofetilide adása mindkét nemből, – függetlenül az aktuális hormonszintektől – percenként 20-30 ütéssel csökkentette le a szívfrekvenciát. Ez a bradikardia mindig együtt járt a QT-és QTc-intervallumok nagymértékű megnyúlásával. A hím állatok kasztrálása szignifikánsan felerősítette ezt a nyújtó hatást, ugyanakkor tesztoszteron adása a kasztrált nőstény kutyáknak szignifikánsan lecsökkentette a Dofetilide indukált QT- és QTc-időtartam megnyúlását. Az ösztrogénszint megváltozása sem a nőstény állatok kasztrálása, sem a kasztrált hím kutyák ösztrogénkezelése esetében nem befolyásolta a Dofetilide repolarizáció-nyújtó, bradikardizáló hatását.

IV/9. Nemi hormonok hatása az ioncsatorna proteinek expressziós mintázatára

Ioncsatornát alkotó proteinek (α -alegységek) és a másodlagos, szabályozó alegységek expressziós szintjeit először a tesztoszteron-kezelt ovariectomizált nőstény állatokban és az ösztrogén-kezelt orchietomizált hímekben határoztuk meg, és hasonlítottunk össze. A vizsgált ioncsatorna-fehérjék nagy többségének expressziója nem különbözött szignifikánsan a két vizsgált csoportban. Ezzel szemben szignifikáns különbségeket találtunk az I_{K1} és az I_{to} áram létrehozásáért felelős Kir2.1 (I_{K1} csatorna pórusformáló alegysége) és a Kv4.3 (az I_{to} csatorna egyik pórusformáló alegysége) fehérjék expressziójában, mindkét fehérje szignifikánsan nagyobb denzitást mutatott a tesztoszteron-kezelt kasztrált nőstényekben, mint az ösztrogén kezelt kasztrált hímekben. A Kv1.4 (az I_{to} másik részért felelős csatorna pórusformáló alegysége) expressziós

szintje szintén magasabb volt a tesztoszteronnal kezelt, kasztrált nőstény csoportban, ez az emelkedés azonban elmaradt a szignifikáns mértéktől. Érdekes módon a KChIP2 szintje, ami a legfontosabb regulatórikus alegysége a tranziens kifelé egyenirányító K^+ -csatornának (I_{to}), nem mutatott különbséget a két vizsgált csoportban.

A vizsgálatok további részében a Kv4.3 és a Kir2.1 relatív optikai denzitásait megvizsgáltuk négy különböző csoportban: kontroll (nem kezelt) hím és nőstény kutyák, tesztoszteron-kezelt ovariectomizált nőstények és ösztrogén-kezelt orchietomizált hím kutyák. Mind a Kir2.1, mind a Kv4.3 proteinek expressziós szintjei szignifikánsan magasabbak voltak a tesztoszteron-kezelt kasztrált nőstényekben és normál hímekben, mint a tesztoszteronnal nem rendelkező csoportokban. Más szóval egyedül a tesztoszteron hatása volt a döntő, függetlenül az állat aktuális nemétől vagy az ösztrogén jelenlététől illetve hiányától.

V. DISZKUSSZIÓ

Annak ellenére, hogy számos tanulmány foglalkozik az emlős szívizom regionális és transzmurális heterogenitásával, mai tudásunk ezen a területen (különösen a humán szívizomra vonatkozóan) korántsem nevezhető teljesnek. Adódik ez részben a szisztematikus, átfogó elemzések hiányából (a legtöbb közlemény egy adott, markánsan megfigyelhető különbség vizsgálatára szorítkozik), másrészt pedig az egészséges humán szívizomminták hozzáférhetőségének nehézségeiből. Ezen utóbbi hiányában nagyon fontos, hogy megfelelő modellt találjunk a vizsgálatokhoz, hiszen az orvosbiológiai kutatások végső célja mégiscsak az ember. Ez a tanulmány az első szisztematikus összehasonlító elemzés az egészséges humán szívizom ioncsatorna-fehérjéinek területi és regionális eloszlásáról, összehasonlítva az azonos körülmények között vizsgált kutya szívizomminták eredményeivel. Ezeknek az expressziós

mintázatoknak a kutya miokardium elektrofiziológiai sajátágaival történő összevetése választ adhat arra a kérdésre, hogy mennyiben járul hozzá egy-egy csatornaegység expressziójának inhomogenitása az ionáramok és az akciós potenciál szívizmon belüli, illetve egyedek közötti variabilitáshoz.

V/1. A szívizom regionális különbségei

V/1. 1. EPI/MID asszimetria

Vizsgálataink során bizonyítottuk a markáns epikardiális-midmiokardiális inhomogenitás jelenlétét az ionáramban és ioncsatorna-expresszióban kutya és humán miokardium esetében. Az I_{to} és az I_{Ks} áram denzitása nagyobb volt az EPI rétegekben, mint a midmiokardiumban (kb. 55 és 50%-al), miközben nem találtunk különbséget az I_{Kr} és az I_{K1} áram eloszlásában. Ami az I_{Ks} -t illeti, eredményeink hasonlóak a más laboratóriumok által publikált adatokhoz, tehát magasabb az epikardium I_{Ks} denzitása. Az I_{to} és az I_{Ks} magasabb EPI/MID arányai rövidebb, és kifejezettebb „spike-and-dome” konfigurációjú akciós potenciálokat eredményezhetnek az epikardium sejtjein, ugyanakkor kérdés, hogy az akciós potenciál időtartamában tapasztalt változások a szívizom rétegein belül megmagyarázhatók-e kizárólag az I_{to} és az I_{Ks} asszimetrikus eloszlásával. Valószínűleg nem. A nátriumcsatorna-fehérje (Nav1.5) denzitása csak 49% volt az epikardiális sejteken, a midmiokardiumban mérthez képest. Mivel az I_{to} gyors inaktivációs kinetikája és az I_{Ks} nagyon lassú aktivációs időállandói csökkenthetik ezen áramok szerepét a repolarizációban, valószínűnek tűnik, hogy a kifejezettebb Na^+ -áram (amit a nagyobb Nav1.5 denzitás, a nagyobb V_{max} és AP amplitúdó jelez) azon komponense, amely a plató fázis alatt is aktív (nem inaktiválódó, úgynevezett háttér Na^+ -áram), lehet felelős a midmiokardiumban az ott tapasztalható hosszabb akciós potenciálokért.

Más tanulmányokhoz hasonlóan mi sem tapasztaltunk EPI/MID különbségeket az I_{Kr} áram amplitúdójában, amikor a megszokott, alacsony stimuláló ciklushosszt (20 s) használtuk. Ugyanakkor az áram deaktivációs kinetikája lassabb volt a midmiokardiumban, ami arra utal, hogy fiziológiás szívfrekvencián az I_{Kr} erősebb lehet ebben a rétegben. Ha az I_{Kr} áram nem tud teljes mértékben deaktiválódni akkor a csatornapopuláció egy része még nyitott állapotban van, amikor a következő ingerület megérkezik. Így az áramnak egy része akkumulálódik és erősebb repolarizációt hoz létre. Ez hozzájárulhat a 3. osztályú antiarritmiás szerek midmiokardiális rétegben tapasztalt jelentősebb AP nyújtó hatásához.

Az összes I_{to} -ért felelős csatorna protein (Kv4.3, Kv1.4 és KChIP2) expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt az epikardiális rétegben, mint a midmiokardiálisban – ez jól egyezik az elektrofiziológiai mérések eredményeivel. Ezek közül az I_{to} fehérjék közül a Kv4.3 denzitása volt a legjobban arányban az I_{to} csúcsértékeivel. Első pillantásra ez nem meglepő, hiszen a Kv4.3 a fő pórusalkotó proteinje az I_{to} csatornának, mind kutyában, mind a humán miokardiumban. Ugyanakkor érdemes megemlíteni, hogy Rosati és mtsai. csak kis mértékű Kv4.3 mRNS expressziós különbséget láttak az epikardium és a midmiokardium között kutya kardiális izomszövetében, és a nagy transzmurális I_{to} gradiens jobban korrelált a KChIP2 mRNS szintjével. Ennek az ellentmondásnak az lehet az oka, hogy az mRNS-szintek és a fehérjeexpresszió nem mindig identikusak egymással.

Az elektrofiziológiai mérések során megállapított I_{Ks} EPI/MID asszimetria nagyon jó korrelációt mutatott a pórusformáló alegység KvLQT1 EPI/MID eloszlásával, mivel a KvLQT1 protein denzitása és az I_{Ks} farokáram amplitúdója egyformán 50%-al nagyobb volt az epikardiumban, mint a midmiokardiális rétegben. Ezzel szemben,

fordított EPI/MID eloszlást találtunk a regulatórikus alegység MinK esetén (a MinK denzitása az epikardiális rétegben csak 65% és 71%-a volt a midmiokardiális rétegben észleltekénél, kutya és humán miokardiumban). Más szóval az egyenlőtlen I_{Ks} eloszlás az EPI/MID rétegek között egyedül az asszimetrikus KvLQT1 fehérjének tulajdonítható, és független a regulatórikus, MinK alegységtől. Ez egyezik a transzmurális MinK mRNS expresszió asszimetria hiányával, amit Péréon és mtsai. humán kardiomiopátiás szövetmintákban találtak. A MinK azonban nem csak a KvLQT1-el hanem más α -alegységekkel is előszeretettel társul, tehát ez a téma további vizsgálatokat igényel.

A Na^+ -áram a kutya szívizomzat midmiokardiális rétegében a legkifejezettebb, és így meredekebb felszálló szárral rendelkező akciós potenciálokat hoz létre, mint akár az epikardiális vagy az endokardiális rétegben. A mi vizsgálatunkban 49%-os EPI/MID arányt találtunk a Nav1.5 fehérje denzitásban, ami közel van a kutya szívizmában Zygmunt és mtsai. által feszültség-clamp körülmények között mért 59%-os Na^+ -áram arányhoz. A Nav1.5 fehérjére vonatkoztatott 49%-os EPI/MID arány elég messze van a V_{max} 79%-os arányától. Annak ellenére, hogy a V_{max} -ot gyakran használják a publikációkban a Na^+ -konduktancia vagy a I_{Na} karakterizálására, a V_{max} és a Na^+ -áram nem lineárisan aránylik egymáshoz. Ennek a nonlinearitásnak a mértéke vita tárgyát képezi, de pl. 50%-os Na^+ -konduktancia csökkenés csak közel 20%-os V_{max} csökkenést fog okozni, ami egybevág a mi eredményeinkkel.

V/1. 2. APEX/BASE inhomogenitás

Kísérleteinkben leírtuk a markáns ionáram és ioncsatorna-expresszió inhomogenitást a kutya és a humán szívizom apikális és bazális részein. A emlős akciós potenciál repolarizációjáért legnagyobb mértékben felelős I_{to} és I_{Ks} áram denzitásait közel kétszer nagyobbak találtuk a szív csúcsi

részén, mint a bázison, ami magyarázatot ad a rövidebb apikális akciós potenciálokra.

Az I_{to} áram létrehozásáért felelős csatornafehérjék közül a Kv1.4 és a KCHIP2 protein expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a bazális területeken, mint a csúcson. Ez az eredmény egybevág az I_{to} apikális dominanciájával; ugyanakkor ne felejtsük el, hogy a Kv4.3 a fő pórusformáló I_{to} csatorna alegység mind kutya mind a humán kamrai szívizomban. Tehát a Kv4.3 expressziójában tapasztalt kis mértékű apiko-bazális inhomogenitás nem magyarázza az áramdenzitás jelentős különbségeit a szívizom különböző területei között. Mivel a szabályozó KCHIP2 alegységről ismert, hogy mind a kutya, mind a humán szívizomban társul a Kv4.3 alegységgel, és a két alegység közös expressziója megnöveli az I_{to} amplitúdóját, feltételezhetjük, hogy a KCHIP2 fehérje magasabb apikális expressziója felelős az erősebb csúcsi I_{to} -ért. Erre a következtetésre jutottak Rosati és mtsai. is, amikor a már fentebb említett epi-endokardiális transzmurális differenciákat vizsgálták. Tehát inkább a KCHIP2 expressziója okozza az I_{to} amplitúdóbeli különbségeket és nem a Kv4.3. Egy másik közvetett bizonyítékot szolgáltat erre Yu és munkacsoportja amikor leírják, hogy az angiotenzin II és losartan megváltoztatta az I_{to} amplitúdóját és kinetikai paramétereit anélkül hogy a Kv4.3 vagy a Kv1.4 alegységek relatív expresszióját érdemben megváltoztatná. Habár az I_{to} inaktivációból való visszatérését nem vizsgáltuk, a Kv1.4 alegység (mivel az alegység ismert módon megváltoztatja a csatorna aktivációs kinetikáját) csökkent bazális expressziója felgyorsult áram-reaktivációt feltételez.

Az elektrofiziológiai módszerekkel meghatározott apiko-bazális I_{Ks} asszimetriát alátámasztják a humán és kutya mintákon végzett Western blot eredmények, ugyanis mind a KvLQT1, mind a MinK (az I_{Ks} -t létrehozó csatorna fehérjék) szintje szignifikánsan magasabb volt az

apikális területeken, mint a bazálisokon. Az áram lassú aktivációs kinetikája miatt az I_{Ks} repolarizációban való szerepét az utóbbi időben többen megkérdőjelezték, mások megerősítették. Az I_{Ks} aktivációja 44%-al gyorsabb volt a csúcsi területeken, mint a bázison, ami arra utal, hogy ezen áram aktivációja felgyorsíthatja a repolarizációt, vagy legalábbis jobban erősítheti a repolarizációs rezervet az apikális szívműködősejtekben.

Annak ellenére, hogy sem az I_{Kr} áramdenzitásokban, sem a HERG és a MiRP1 proteinek expressziójában nem találtunk szignifikáns apiko-bazális különbséget, az I_{Kr} aktivációja lassabb volt a csúcsi területeken, mint a bázison. Ezt a relatív nyújtó hatást az apikális sejtekben azonban úgy tűnik kompenzálja az I_{Ks} és az I_{to} erőteljesebb AP rövidítő hatása.

V/1. 3. Jelentőség és a vizsgálatok korlátai

Egészséges humán szívműködőre vonatkozó releváns elektrofiziológiai adatok hiányában egyedül a Western blot eredményeket tudjuk összehasonlítani a kutyában kapott eredményekkel. Általánosságban elmondható, hogy az EPI/MID inhomogenitás nagyon hasonló volt a két fajban, kivételt csak a HERG protein eloszlása képez. Kutyában nem találtunk eltérést a két miokardiális rétegben a HERG csatorna eloszlását illetően, míg a humán mintákban az EPI/MID arány 1,49 volt. A különbség okára magyarázatot adni nem tudunk, humán mintákon végzett elektrofiziológiai mérésekre lenne szükség, hogy felfedjük ennek az okát.

Az apiko-bazális asszimetriát illetően is nagyon hasonló a kutya és a humán miokardium, habár kvantitatív különbségeket fedezhetünk fel a KChIP2, a MinK és a Kv1.4 fehérjék expressziós szintjeiben.

Eredményeink alapján a kutya szívműködő megfelelő modell lehet a humán szív elektromos inhomogenitásának tanulmányozására. Ugyanakkor az irodalomban található nagy fajok közötti különbségeket figyelembe véve, amelyek az apiko/bazális és az

epikardiális/midmiokardiális grádiensekre vonatkoznak a kutya kamrai miokardium, a fennálló kvantitatív különbségek ellenére még mindig a humánhoz leginkább hasonlító modellnek számít. A tanulmányban bemutatott repolarizációs inhomogenitás a patológiás esetben megnövekedett elektromos diszperzió miatt a szívritmuszavarok fokozott előfordulásához vezethet, vagy az antiaritmiás szerek hatásának módosulását okozhatja. Jelen eredmények nagyban hozzájárulhatnak alapvető ismereteink bővítéséhez a szívritmuszavarok kialakulásának mechanizmusáról, és segíthetnek hatékonyabb és ésszerűbb antiaritmiás terápiák kifejlesztésében.

V/2. Nemi hormonok és kardiális ioncsatornák

Vizsgálataink során megvizsgáltuk a legfontosabb emlős nemi hormonok, a tesztoszteron és az ösztrogén hatásait az emlős kamrai szívizom elektrofiziológiai paramétereire és ioncsatorna eloszlására. A két hormonnak azonos hatása volt a szívfrekvenciára és a pitvar-kamrai vezetési időre. Mind a szívfrekvencia, mind az atrioventrikuláris csomó vezetési sebessége emelkedett az ösztrogén és tesztoszteron kezelés hatására, míg a szexuáliszteroidok hiányának (kasztráció) ellentétes hatása volt. Vizsgálataink legérdekesebb eredménye annak kimutatása, hogy a kutya kamrai izomszövet – az ingerképző szövettel ellentétben – máshogy reagál a tesztoszteronra, mint az ösztrogénre: a tesztoszteron felgyorsította a kamrai repolarizációt, lecsökkentette a Dofetilide-indukált repolarizáció nyúlást, és mindkét nemben lecsökkentette a szívizom elektromos diszperzióját, miközben az ösztrogénnek nem volt hatása ezekre a paraméterekre. Eredményeink jó összhangban vannak a humán EKG tanulmányokkal, ami újfent arra utal, hogy a kutya modell alkalmas a nemi hormonok szívre gyakorolt hatásának vizsgálatára, továbbá humán szívizomra is releváns következtetéseket vonhatunk le az eredményekből.

Mivel sem a nőstény kutyák kasztrálása, sem a kasztrált hím kutyák ösztrogén kezelése nem okozott szignifikáns változást a kamrai repolarizáció sebességében, feltételezhető, hogy az inverz hormonszubsztituált kutyák ioncsatorna-expressziójában tapasztalt különbségeket kizárólag a tesztoszteron jelenléte vagy hiánya okozta. Ezt a következtetésünket az a kísérlet is alátámasztja, amikor a Kv4.3 és a Kir2.1 csatornafehérjék expresszióját nemcsak a kasztrált és inverz hormonkezelt állatok csoportjai között, hanem kezeletlen kutyák csoportjaiban is összehasonlítottuk. A kezeletlen kutyák összehasonlítása megmutatta ezen csatorna alegységek magasabb expressziós szintjét a kontroll hím állatokban a normál nőstényekhez képest. Ez az eredmény nehezen egyeztethető össze a kontroll körülmények között regisztrált QT- és QTc-intervallumokkal, amelyek gyakorlatilag megegyeztek a kontroll állapotban. Ugyanakkor az feltételezhető, hogy a nemek közötti különbségek más, olyan általunk nem vizsgált csatorna alegységeket is érinthetnek, amelyek kompenzálhatják a hím állatokban talált magasabb K^+ -csatorna sűrűséget.

Amint azt fentebb is említettük, a tesztoszteron kezelés fokozta két K^+ -csatornafehérje (Kir2.1 és Kv4.3) kifejeződését, amelyek az I_{K1} és az I_{to} áram kialakításáért felelősek. Az I_{K1} felelős az AP terminális repolarizációjáért, így az AP hosszának szabályozásában kiemelt szerepe van, tehát amplitúdójának megnövekedése szerepet játszhat a tesztoszteron által létrehozott QT- és QTc-intervallumok lerövidülésében. Habár az I_{to} kutya kamrai szívizomsejtek repolarizációjában betöltött szerepét megkérdőjelezzük, mindkét áram hozzájárul a repolarizációs rezerv kialakításához. Így tehát meglepő módon az I_{K1} és az I_{to} megnövekedett expressziója szerepet játszik a tesztoszteronnal kezelt szívizom csökkent Dofetilide-érzékenységében – annak ellenére, hogy az I_{Kr} áramot létrehozó HERG csatornafehérjék (amelyet a Dofetilide gátol)

sűrűsége nem változik. Mindezek ellenére a többi, általunk nem vizsgált K^+ -csatorna alegység (pl. a Kv3.4 vagy a Kv1.7) szerepét sem lehet kizárni.

V/2. 1. Jelentőség és az EKG vizsgálatok korlátai

Mivel nincs releváns információ arra vonatkozóan, hogyan hat az ösztrogén és a tesztoszteron az egészséges humán szívizom ioncsatornáin, a mi Western blot eredményeinket nem tudjuk közvetlenül összehasonlítani humán adatokkal. A kutya és a humán szívizomsejt celluláris elektrofiziológiai hasonlóságai, és a humán EKG adatokkal való jó egyezés alapján azonban nagy biztonsággal kijelenthetjük, hogy a kutya jó modell a nemi hormonok hatásának tanulmányozására. Ugyanakkor ennek a modellnek is vannak korlátai. A legszembetűnőbb különbség a kutya és az ember nemi működése között az az emberben tapasztalható 28 napos menstruációs ciklus a kutya anösztruszához képest, amikor a nőstény állatokban gyakran az ECLIA kit detekciós határánál ($18,4 \text{ pmol L}^{-1}$) alacsonyabb ösztrogén szinteket találunk. Tehát a kezeletlen kutyák nem reprezentálják tökéletesen az emberben nemtől függően kialakuló különbségeket, mégis – főleg kasztráció után – a kutya modell adja a legjobb megközelítést a szexuáliszteroidok hatásmechanizmusának vizsgálatához.

V/3. Konklúzió

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy az emlős szívizmon belüli, illetve ugyanazon faj egyedei közötti elektrofiziológiai inhomogenitás magyarázható-e az ioncsatornák expressziójában megfigyelhető különbségekkel. A szívizmon belüli inhomogenitás vizsgálatakor a tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to}) és a késői típusú káliumáram lassú komponense (I_{Ks}) jó korrelációt mutatott az áramokat létrehozó

ioncsatorna-proteinek expressziójával. Elektrofiziológiai módszerekkel nem találtunk különbséget a szívizom különböző területei között az L-típusú kalciumáram (I_{Ca}), a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) és a késői típusú káliumáram gyors komponensének (I_{Kr}) paramétereiben, amely adatok jól korrelálnak az ioncsatorna expressziós szintekkel, ahol szintén nem találtunk különbséget a szívizom egyes területei között. A nemek közötti inhomogenitás vizsgálatakor a talált repolarizációs különbségek jól korreláltak az I_{to} és I_{K1} ioncsatorna-fehérjék változásaival, és visszavezethetők a tesztoszteron hatásaira.

Az emlős szívizomszövet nem homogén, mint azt korábban feltételezték. Valójában sok eltérést tudunk felfedezni az akciós potenciál morfológiájában, az ionáramok amplitúdóiban, kinetikai sajátságaiban és az ioncsatorna-fehérjék eloszlásában mind a szívizom rétegein belül, mind a szívizom különböző területei között és különböző nemű egyedek között is. A különbségek élettani jelentősége egyrészt az EKG-regisztrátum repolarizációs hullámainak létrehozása, aminek nagy diagnosztikai jelentősége van. Az inhomogenitás lehetséges patológiás következménye a farmakológiai behatásokra adott változatos válasz, amelyek pl. az antiaritmiás szerek esetében proaritmiás hatást eredményezhetnek. Érthető tehát, hogy minél többet tudunk a szívizom inhomogenitásáról, annál hatékonyabb és biztonságosabb gyógyszeres beavatkozásokat tudunk tervezni és alkalmazni a szívbetegségben szenvedő betegeknél.

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények:

1. **Szabó G**, Szentandrassy N, Bíró T, Tóth IB, Czifra G, Magyar J, Bányász T, Varró A, Kovács L, Nánási PP: Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflügers Arch* 2005;450:307-316 [**IF=3,564**]
2. Szentandrassy N, Bányász T, Bíró T, **Szabó G**, Tóth B, Magyar J, Lázár J, Varró A, Kovács L, Nánási PP: Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 2005;65:851-860 [**IF=5,283**]
3. Fülöp L, Bányász T, **Szabó G**, Tóth IB, Bíró T, Lőrincz I, Balogh Á, Pető K, Mikó I, Nánási PP: Effects of sex hormones on ECG parameters and expression of cardiac ion channels in dogs. *Acta Physiol (Scand)* 2006;188:163-171 [**IF=2.23**]

Az értekezésben fel nem használt in extenso közlemények:

4. Szabó A, Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, **Szabó G**, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J: Effects of articaine on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. *Br J Anaesthesia* 2007;99:726-733 [**IF=2.948**]
5. Szabó A, Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, **Szabó G**, Bányász T, Márton I, Magyar J, Nánási PP: Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Anesthesiology* 2008 Apr;108(4):693-702; [**IF=4.596**]