

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Horváth Balázs

Káliumáramok szerepe kutya bal kamrai szívizomsejtek repolarizációjában



Témavezető:

Dr. Bányász Tamás

Programvezető:

Dr. Csernoch László

DEBRECENI EGYETEM

ORVOS-, ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

ÉLETTANI INTÉZET

Debrecen, 2009.

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| Rövidítések | 4 |
| Bevezetés | 5 |
| I. A kamrai szívműködés akciós potenciálja | 5 |
| II. Káliumáramok és káliumcsatornák a szívműködésben | 8 |
| II.1. Feszültségfüggő K^+ csatornák | 10 |
| II.1.1. Tranziens kifelé irányuló áram (I_{to}) | 10 |
| II.1.2. Késői káliumáram (I_K) | 13 |
| II.1.2.1. A késői káliumáram lassú komponense (I_{Ks}) | 15 |
| II.1.2.2. A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr}) | 16 |
| II.1.2.3. A késői káliumáram ultragyors komponense (I_{Kur}) | 19 |
| II.2. A befelé egyenirányító káliumcsatornák árama (I_{K1}) | 19 |
| III. Az egyes káliumáramok feltételezett szerepe a szívműködés repolarizációjában | 22 |
| III.1. Az I_{to} szerepe a korai repolarizációban | 23 |
| III.2. Az I_K komponenseinek szerepe a repolarizációban | 24 |
| III.3. Az I_{K1} szerepe az akciós potenciál során | 26 |
| IV. Az akciós potenciál clamp technika | 26 |
| Célkitűzés | 27 |
| Eszközök és módszerek | 28 |
| I. Kutya bal kamrai szívműködés izolálása | 28 |
| II. Elektrofiziológiai mérések | 29 |
| II.1. Akciós potenciálok elvezetése izolált szívműködésről | 30 |
| II.2. Az ionáramok mérése feszültség-clamp technikával | 30 |
| II.2.1. Akciós potenciál clamp | 31 |
| II.2.2. Az I_{Ks} mérése négyszögimpulzusokkal | 33 |
| III. Matematikai modellezés | 33 |
| IV. Statisztikai elemzés | 34 |

| | |
|--|----|
| Eredmények..... | 35 |
| I. Káliumáramok vizsgálata akciós potenciál clamp módszerrel | 35 |
| I.1. Tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to}) | 35 |
| I.2. A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr})..... | 35 |
| I.3. A késői káliumáram lassú komponense (I_{Ks})..... | 38 |
| I.4. A befelé egyenirányító káliumcsatornák árama (I_{K1}) | 38 |
| I.5. Az I_{Kr} és I_{K1} frekvenciafüggő sajátosságai | 40 |
| II. Az I_{Ks} vizsgálata chromanol-293B alkalmazásával | 42 |
| II.1. A chromanol hatása az akciós potenciál alakjára | 42 |
| II.2. A chromanol hatása isoproterenol és E-4031 jelenlétében..... | 43 |
| II.3. A chromanol hatása befelé irányuló árammal kezelt myocytákon | 44 |
| II.4. Az akciós potenciál alatti I_{Ks} áramprofil meghatározása matematikai modellezéssel..... | 47 |
| III. Az L-364,373 hatása az I_{Ks} -re kutya bal kamrai szívműködéseken..... | 48 |
| Megbeszélés..... | 52 |
| I. Káliumáramok lefutása a kamrai akciós potenciál során | 52 |
| II. Az I_{Ks} hozzájárulása a repolarizációhoz..... | 56 |
| II.1. Klinikai vonatkozások..... | 60 |
| III. Az L-364,373 nem növeli az I_{Ks} -t kutya kamrai szívműködéseken..... | 61 |
| Összefoglalás..... | 64 |
| Summary..... | 65 |
| Irodalomjegyzék | 66 |
| Tárgyszavak..... | 77 |
| Keywords | 77 |
| Köszönetnyilvánítás | 78 |
| Függelék: az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények..... | 79 |

Rövidítések

| | |
|-------------------------------|--|
| AP | akciós potenciál (action potential) |
| APD | akciós potenciál időtartam (action potential duration) |
| APD _x | az AP kezdetétől mért azon időtartam, mely az AP amplitúdójához képest mért x%-os repolarizációig telt el |
| GIRK | G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító K ⁺ csatorna (G-protein coupled IRK) |
| I _{Ca,Cl} | Ca ²⁺ által aktivált Cl ⁻ áram |
| I _{Ca,L} | az L-típusú Ca ²⁺ csatornákon folyó áram |
| I _{Ca,T} | a T-típusú Ca ²⁺ csatornákon folyó áram |
| I _{Na} | a gyors, feszültségfüggő Na ⁺ csatornákon folyó áram |
| I _{NaCa} | a Na ⁺ /Ca ²⁺ cserélő által létrehozott áram |
| I _{K1} | befelé egyenirányító K ⁺ csatornák által létrehozott áram (inward rectifier K ⁺ current) |
| I _K | késői K ⁺ áram (delayed rectifier K ⁺ current) |
| I _{K,AA} | arachidonsav (AA) által kapuzott K ⁺ csatorna |
| I _{K,Ach} | acetilkolin által vezérelt K ⁺ csatornák által létrehozott áram |
| I _{K,ATP} | ATP által vezérelt K ⁺ csatornák által létrehozott áram |
| I _{Kr} | az I _K gyorsan aktiválódó összetevője (rapid component of I _K) |
| I _{Ks} | az I _K lassan aktiválódó összetevője (slow component of I _K) |
| I _{Kur} | az I _K nagyon gyorsan aktiválódó összetevője (ultra rapid component of I _K) |
| I _{to} | transziens kifelé irányuló áram (transient outward current) |
| IRK | befelé egyenirányító K ⁺ csatorna (inward rectifier K ⁺ channel) |
| PKA | proteinkináz A |
| PKC | proteinkináz C |
| V ⁻ _{max} | a repolarizáció legnagyobb sebessége |

Bevezetés

I. A kamrai szívmembrán akciós potenciálja

Az emberi szervezetben található sejtek plazmamembránja az egymástól eltérő ionösszetételű intra-, és extracelluláris teret választja el. Az ingerelhető sejtek akciós potenciálja (AP) nem más, mint a sejtmembránon folyó térben és időben változó ionáramok következtében létrejövő feszültségváltozások. A szív ritmikus működését a sinuscsomóban kialakuló, és innen a pitvari izomsejteken, az ingerületvezető rendszeren, majd a kamrai munkaszöveten tovaterjedő akciós potenciálok hozzák létre. Az akciós potenciálok következtében az intracelluláris kalciumkoncentráció átmenetileg megnő, ami a szívmembrán összehúzódását eredményezi.

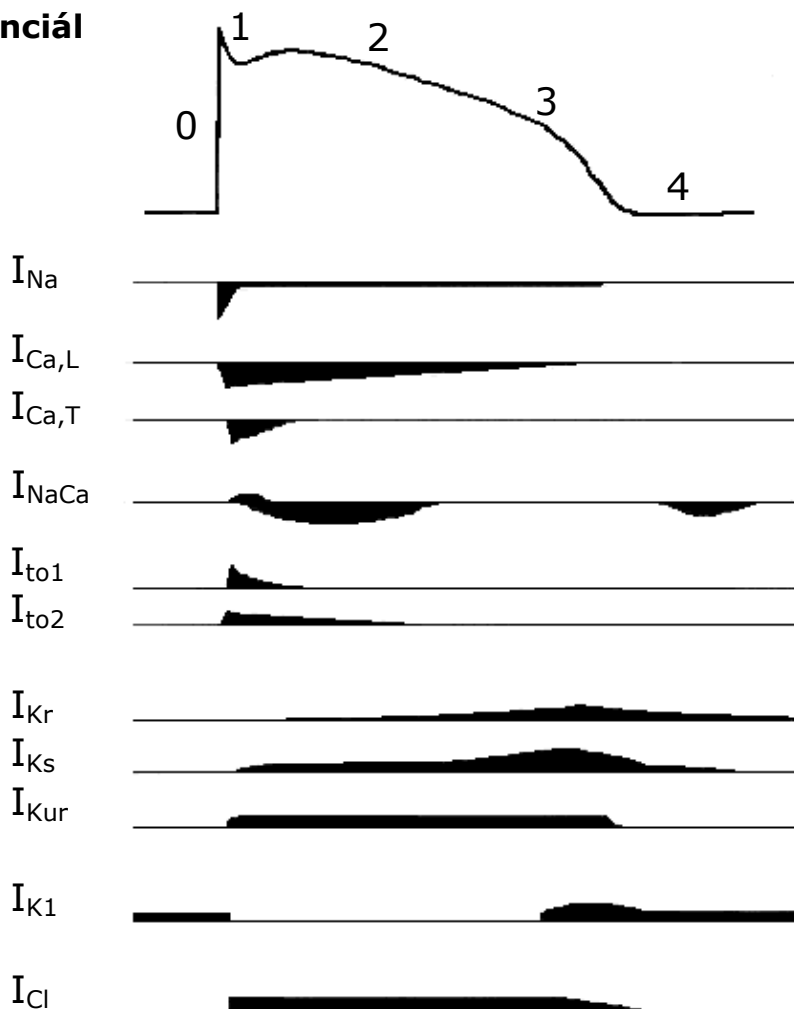
A sejtek mindenkori membránpotenciálja az adott időpillanatban a sejtmembrán két oldala közötti elektrokémiai gradiensektől, valamint a plazmamembrán egyes ionokra vonatkozó eltérő permeabilitásától függ. Ezt a jelenséget a Goldman–Hodgkin–Katz-egyenlet írja le.

Az elektrokémiai gradienseket különböző aktív pumpák generálják, és ezek az AP lezajlása után is szükségesek az eredeti ionösszetétel visszaállításához. Ezek a pumpák közvetlenül vagy közvetve ATP által tárolt energiát használnak fel. A Na^+/K^+ ATP-áz a Na^+ ionokat a sejtéből az extracelluláris térbe juttatja, miközben az extracelluláris térből K^+ ionokat visz a sejtbe. A pumpa $3 \text{Na}^+ / 2 \text{K}^+$ sztöchiometriával működik, emiatt kicsiny, a sejtéből kifelé irányuló ("outward") áramot generál. A másik jelentős pumpa a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter, amely 3Na^+ és 1Ca^{2+} ion egyidejű antiportját végzi, így az előző transzporthoz hasonlóan szintén elektrogén. Működése lehet mind befelé ("inward"), mind kifelé ("outward") irányuló, a pillanatnyi membránpotenciáltól és ionösszetételtől függően. Működése a sejtek Ca^{2+} háztartását illetően nélkülözhetetlen, segítik az AP során bejutott Ca^{2+} eltávolítását.

Az egyes ionokra a membrán nem egyformán permeábilis. A mindenkori membránpotenciál azon ion — Nernst-egyenletből adódó — egyensúlyi potenciáljához áll legközelebb, amelyre nézve a membrán leginkább átteresztő. A gerincesek kamrai szívmembránjaiban, nyugalmi állapotban K^+ ionokra vonatkozóan nagy, míg Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- ionokra nézve kicsi a membrán permeabilitása, tehát a nyugalmi membránpotenciál a K^+ ionok egyensúlyi potenciáljához esik közel. Élettani

Akciós potenciál

Ionáramok



1. ábra: A kamrai szívműködés akciós potenciáljának fázisai és az ezeknek megfelelő ionáramok. Az AP mellett feltüntetett arab számok az AP egyes fázisait jelölik. A nulla vonal felett látható jelek kifelé irányuló ("outward"), míg a vonal alatti jelek befelé irányuló ("inward") áramokat reprezentálnak. Varró és munkatársának közleménye [165] alapján módosítva

körülmények között az ionösszetételből, az egyes ioncsatorna-típusok permeabilitásából, illetve az elektrogén pumpák működéséből adódik a kamraizomsejtek körülbelül -80 mV-os nyugalmi membránpotenciálja, ami mintegy 5 – 10 mV-tal pozitívabb, mint a K^+ egyensúlyi potenciálja.

Magát az akciós potenciált az emlősök szívműködésében a plazmamembrán idő-, és feszültségfüggő ioncsatornáinak konduktancia-változásai hozzák létre [195]. A kamraizomsejtek akciós potenciálját öt fázisra osztjuk (**1. ábra**).

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 jelentős áramot eredményez, így a membránpotenciál aktuális értéke a Na^+ egyensúlyi potenciálja felé mozdul, tehát a membrán depolarizálódik. Ezt a fázist nevezik az AP felszálló szárának is a hirtelen nagymértékű membránpotenciál-változás idő-feszültség grafikonon ábrázolódó jellegzetes alakja miatt. A gyors Na^+ csatornák hamar inaktiválódnak és 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 nagy K^+ konduktancia (befelé egyenirányító K^+ csatornák) lecsökken a befelé történő egyenirányítás miatt, ez megakadályozza repolarizáló hatású K^+ áram létrejöttét a nulladik fázis alatt. A depolarizáció hatására ugyanakkor olyan korai kifelé irányuló áram ("transient outward current", I_{to}) aktiválódik. Az I_{to} felelős az akciós potenciál első fázisában tapasztalt gyors, átmeneti repolarizációért.

Az akciós potenciál második fázisáért (az ún. plateau fázisért) a főként Ca^{2+} ionokat szállító lassú befelé irányuló áram a felelős. A plateau fázis alatt nem történik jelentősebb mértékű repolarizáció az I_{to} inaktiválódása és a K^+ csatornák (I_{K1}) befelé történő egyenirányítása miatt.

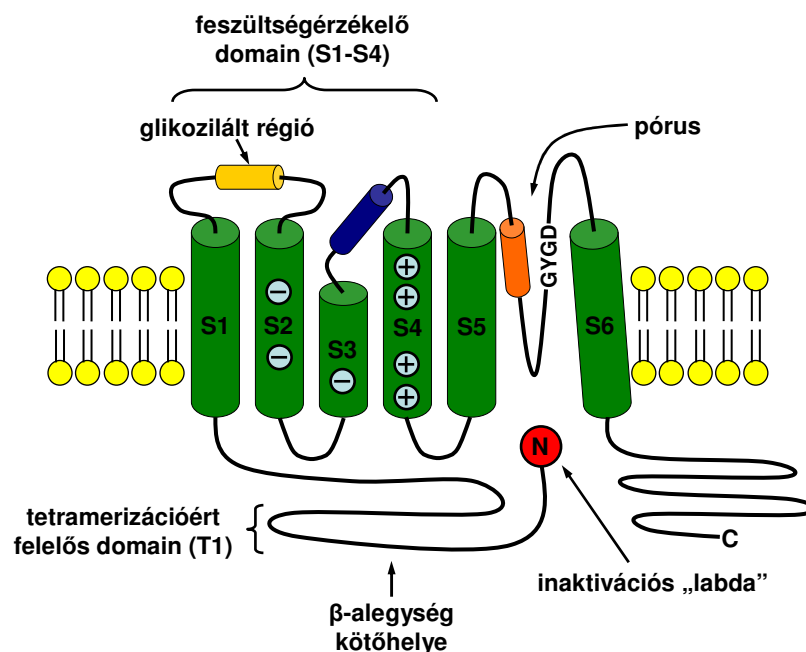
Az AP harmadik fázisában kezdődik meg a repolarizációs folyamat, mely az AP negyedik fázisára visszaállítja a membránpotenciál nyugalmi értékét. A repolarizációt számos áram együtt hozza létre. A kezdeti szakaszt az $I_{Ca,L}$ áram inaktivációja határozza meg leginkább, később egyre nagyobb szerep jut a késői K^+ áram (delayed rectifier, I_K) komponenseinek, majd a repolarizációt az I_{K1} áram teszi teljessé.

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

II. Káliumáramok és káliumcsatornák a szívizomsejteken

A szívizomsejteken a káliumcsatornák széles skálájának expressziójával találkozhatunk [34, 110, 123, 146]. Működésük szerint lehetnek feszültségfüggők (pl. I_{to} , I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}) és ligandvezéreltek (pl. $I_{K.Ach}$, $I_{K.ATP}$, $I_{K.AA}$), valamint van egy csatorna, amelyik sem feszültség sem ligand által nem kapuzott, ez hozza létre az I_{K1} áramot. Az I_{K1} áramot így "háttéráram"-ként is szokás említeni.

Mivel a membránpotenciál mind a systole, mind a diastole során pozitívabb, mint a K^+ equilibriumpotenciálja, ezért a nettó K^+ áram mindig kifelé irányuló, és a membrán repolarizációját, illetve a nyugalmi membránpotenciál fenntartását segíti elő. Élettani körülmények között ezt a szerepet főként a feszültségkapuzott csatornák és az I_{K1} , valamint az $I_{K.Ach}$ játssza. Ischaemiás szívizomzatban azonban dominánssá válhatnak a ligandvezérelt csatornák által létrehozott áramok, különösen az ATP által gátolt káliumáram ($I_{K.ATP}$) és az arachidonsav által kapuzott káliumcsatornák árama ($I_{K.AA}$).



2. ábra: A tetramer felépítésű, domainenként hat transzmembrán szegmenssel rendelkező káliumcsatornák szerkezete [91 és 110 alapján módosítva]

A K^+ csatornák aminosavsorrendje teljesen, térszerkezetük döntő többségükben ismert [4, 28]. Jelenleg főként az ionszelektív pórus pontos molekuláris viszonyait és a csatornák aktivációs-inaktivációs mechanizmusát övezi különös figyelem [36]. A feszültségfüggő K^+ csatornák valamint a Na^+ és Ca^{2+} csatornák aminosavsorrendje

között nagyfokú homológiát fedezhetünk fel, azonban a fehérjeláncok eltérően alakítják ki a definitív ioncsatornákat. Egy-egy Na^+ , illetve Ca^{2+} csatornát négy, egymáshoz kovalens kötésekkel láncszerűen kapcsolódó domain alkot. A domainek egyenként hat-hat transzmembrán szegmensből állnak. Ezzel szemben a K^+ csatornák négy, egymástól független alegységből (ún. α alegység) szerelődnek össze; mindegyik alegység hat transzmembrán szegmensből áll (**2. ábra**). A csatornában az S1–S4 szegmens a feszültségérzékelő [91]. A pórust a négy α -alegység S5 és S6 transzmembrán szegmense közötti, egyenként 19 aminosavból álló összekötő régiók alkotják. A pórusformáló régió glicin-tirozin-glicin (GYG) vagy glicin-fenilalanin-glicin (GFG) motívuma a csatornák K^+ szelektivitásának kézjegyei. A tényleges ioncsatornák a pórusformáló alegységeiken kívül még további járulékos, ún. β -alegységeket is tartalmazhatnak. A β -alegységek az ioncsatornák működésének szabályozásában játszhatnak szerepet.

A K^+ csatornában az inaktiváció két típusát írták le [119]. Az N-típusú inaktiváció során a csatornafehérje pozitív töltéssel rendelkező N-terminálisa mintegy „dugóként” eltömeszeli a nyitott csatornát. A C-típusú inaktiváció során először a szelektivitási szűrő konformációja változik, majd az egyes alegységek pórushoz közeli extracelluláris részeinek kooperatív kölcsönhatása eredményezi a permeabilitás csökkenését [81]. Ez utóbbi, C-típusú inaktiváció érzékeny a csatornához kötődő farmakonokra, illetve az extracelluláris tér K^+ koncentrációjára [110].

A befelé egyenirányító csatornák lényegesen egyszerűbb felépítésűek, amennyiben α alegységeiket mindössze két transzmembrán szegmens alkotja. A két szegmens között található a pórusképző régió. Ebbe a családba soroljuk az erősen befelé egyenirányító jellegű (ún. IRK) csatornákat is, melyekhez az I_{K1} áramot létrehozó csatorna is tartozik.

A teljesség kedvéért megjegyzem, hogy a K^+ csatornáknak létezik egy, a fentiekől jelentősen eltérő családja is, ezek a két pórusformáló domaint tartalmazó, négy transzmembrán szegmensből felépülő K^+ csatornák [50, 114]. Ide tartoznak többek között a TASK, TREK, TWIK, TALK, stb. K^+ csatornák. Néhányuk expresszióját már leírták szívizomsejteken is, ám ezeken a sejteken pontos szerepük még nem tisztázott.

A továbbiakban részletesen az általunk vizsgálni kívánt káliumáramok tulajdonságait tárgyalom (lásd: **1. Táblázat**).

1. Táblázat: A jelen értekezésben tárgyalt ionáramok pórusformáló és járulékos alegységei, valamint az áramok gátlására használt farmakonok összefoglalása.

| áram | α alegység | β alegység | gátlószer |
|-----------|------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| I_{tof} | $K_v4.2, K_v4.3$ | MIRP1, KChIP család | 4-aminopyridin (mM) |
| I_{tos} | $K_v1.4$ | $K_v\beta1, K_v\beta2$ család | 4-aminopyridin (mM) |
| I_{Kr} | $K_v11.1$ (hERG) | MinK, MIRP1 | E-4031, dofetilid, stb. |
| I_{Ks} | $K_v7.1$ (K_vLQT1) | MinK (MIRP1?) | chromanol-293B |
| I_{K1} | Kir2.1, Kir2.2 | — | Ba^{2+} |

II.1. Feszültségfüggő K^+ csatornák

A feszültségfüggő K^+ csatornákat több családba oszthatjuk: K_v1 (*Shaker*), K_v2 (*Shab*), K_v3 (*Shaw*), K_v4 (*Shal*), K_v5-9 (*eag* család, *eag*, *elk* és *erg* alcsaláddal) és a K_vLQT1 család. Szívizomsejtekben a feszültségkapuzott K^+ csatornák közül többféle is megtalálható [110, 123, 146, 154]. A legfontosabb feszültségfüggő K^+ áramok a szívben a tranziens kifelé irányuló áram (I_{to}), és a késői káliumáram (I_K) komponensei: I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kur} . Ezek az áramok meghatározó szerepet játszanak az akciós potenciál alakjának és sajátosságainak kialakításában.

II.1.1. Tranziens kifelé irányuló áram (I_{to})

A tranziens kifelé irányuló áram több komponensből áll. Az I_{to} (más néven I_{to1}) töltéshordozói K^+ ionok, azonban a Ca^{2+} aktivált Cl^- áram szintén rövid ideig fennálló kifelé irányuló áramként jelenik meg, emiatt I_{to2} -nek is nevezik [29, 160]. Az I_{to} depolarizáció hatására gyorsan aktiválódik, és gyorsan inaktiválódik is. Általánosan alkalmazott gátlószere a 4-aminopyridin, melyet mM-os nagyságrendben alkalmaznak. Elektrofiziológiai tulajdonságai hasonlóak a neuronok A-típusú áramához. A szív minden sejtípusában expresszálnak [110], a nodalis sejteket is beleértve [83, 102].

Kinetikai szempontok alapján két komponensét különíthetjük el: a gyors komponens (I_{tof}) és a lassú komponens (I_{tos}) [15, 160]. Kifejeződésük mind fajok között, mind a szív egyes részei között eltérést mutat [110]. Humán szívben mindkét komponens leírták [104], ám míg a pitvari sejteken csak a gyors komponens (I_{tof})

található meg [43, 180], addig a kamrai myocytákon mindkettőt azonosították [104]. Az I_{tof} expressziója magasabb a jobb kamrai sejtekben a bal kamrához viszonyítva [170].

Az I_{to} áramsűrűsége eltérő a szívizomzat egyes rétegei között is. Az emlős fajok (így az ember) kamráinak myocardiumában legnagyobb mennyiséget a subepicardialis, míg legkisebb expressziós szintet a subendocardialis sejtrétegben találtak [86, 90]. Továbbá a subendocardialis myocytákban az I_{to} inaktivációja és inaktivációból történő visszatérése jelentősen lassabb, ami arra utal, hogy itt főként az I_{tos} fejeződik ki [104]. Az I_{to} expressziós mintázatában fellelhető különbségek a kamrafal egyes rétegeinek akciós potenciál morfológiájában jelentős különbségeket eredményeznek. A pitvarokban szintén megfigyelhető a subepicardialis munkaizomsejtek kifejezettebb I_{to} expressziója [183].

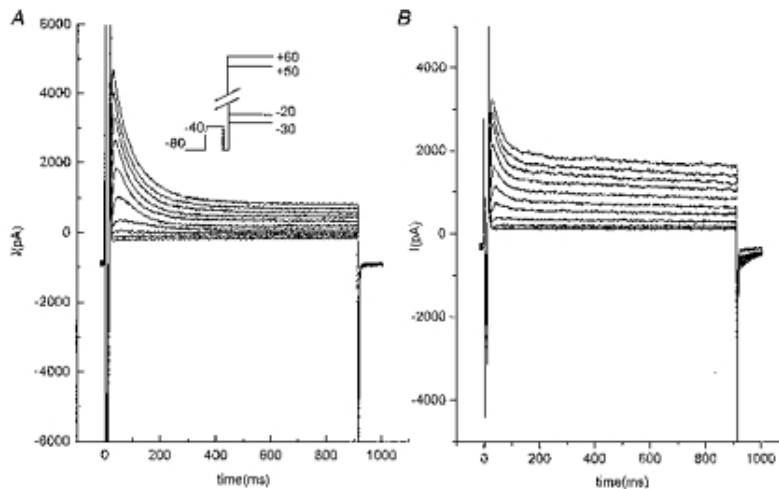
Felépítés

A $K_{\text{v}1.4}$, $K_{\text{v}4.2}$ és $K_{\text{v}4.3}$ fehérjék gyorsan aktiválódó és inaktiválódó, 4-aminopyridin-érzékeny áramot hoznak létre, és expressziójukat le is írták szívizomsejteken. Az I_{tof} áram molekuláris alapjai a $K_{\text{v}4.2}$ és $K_{\text{v}4.3}$ csatornafehérjék lehetnek. Kutya és humán szívizomsejteken az I_{tof} kialakítását főként a $K_{\text{v}4.3}$ fehérjének tulajdonítják [73, 180]. A $K_{\text{v}1.4}$ szintén expresszálódik a humán myocardiumban [73], ez eredményezi az I_{tos} létrejöttét a subendocardium sejtrétegében [180].

A $K_{\text{v}1.4}$ -et a 11. kromoszóma rövid karján található KCNA4 gén, a $K_{\text{v}4.2}$ -t és $K_{\text{v}4.3}$ -at rendre a 7. kromoszóma hosszú karján található KCND2, illetve az 1. kromoszóma rövid karján levő KCND3 gének kódolják.

A $K_{\text{v}1.4}$ moduláló alegységei a $K_{\text{v}}\beta 1$ (KCNA1 gén) és $K_{\text{v}}\beta 2$ (KCNA2 gén) fehérjecsald tagjai lehetnek.

A $K_{\text{v}4.2}$ -höz — és kisebb mértékben a $K_{\text{v}4.3}$ -hoz is — kapcsolódhat a MIRP1-nek (MinK-related peptide 1) nevezett kis fehérje, melyet a KCNE2 gén kódol. A MIRP1 és a csatornaalkotó fehérjék kölcsönhatása megváltoztatja az ionszatornák kinetikáját [197]. A $K_{\text{v}4}$ ionszatorna család további β -alegységeit képezhetik az ún. KChIP-ek (K_{v} channel interacting proteins) [197]. Bár szívizomsejteken még nem bizonyított, de a járulékos fehérjék aktuális jelenléte vagy hiánya megmagyarázhatja az I_{to} eltérő tulajdonságait a myocardium egyes területei között. Elképzelhető továbbá az egyes csatornaalkotó fehérjék hetero-oligomerizációja is.



3. ábra: Az I_{t0} időbeli lefutása humán (A) és patkány (B) kamrai szívizomsejteken depolarizáló négyszögimpulzusok hatására. Stengl és munkatársai közleménye [152] alapján

Biofizikai tulajdonságok

Az I_{t0} depolarizáció hatására aktiválódik. A steady-state aktiváció feszültségfüggése — mint az áram többi biofizikai tulajdonsága is — fajonként kissé eltérő, a teljes csatornapopuláció felét aktiváló feszültségértékek -10 mV és $+20$ mV között találhatóak [20, 41].

Az I_{tof} gyorsan aktiválódik, gyorsan inaktiválódik (lásd: **3. ábra**) és szintén gyors az inaktivációból való visszatérése. Az inaktiváció időállandói nagyságrendileg 25 ms és 75 ms közé esnek, és feszültségtől függetlenek. A steady-state inaktiváció félmaximális membránpotenciálértékeit -50 mV és -15 mV között mérték [19] (**4. ábra**). Az inaktivációból való visszatérés erősen feszültségfüggő, annál gyorsabb, minél hiperpolarizáltabb a membrán [3, 44, 53]. Az inaktivációból való visszatérés időállandói 20 ms–60 ms közöttiek -80 mV-on, és csak csekély mértékben függenek az ingerlési frekvenciától.

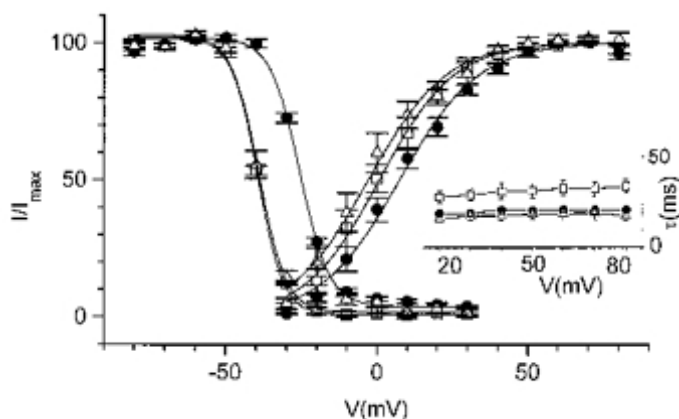
Néhány sejt típuson [19], például humán subendocardialis rostokon [104] az I_{t0} fő komponense az I_{tos} . A gyors komponenstől főként lassú inaktivációból való visszatérése (az időállandó értéke 1–6 s) különbözteti meg.

Az I_{t0} egy ioncsatornára vonatkozó konduktanciaértéke 10 pS–30 pS nagyságrendű [8, 27, 108].

Moduláció

Az I_{t0} expresszióját több humorális tényező is befolyásolja, és az életkorral is változik. Az adrenerg receptorok aktiválódása csökkenti az I_{t0} csatornafehérjék kifejeződését [108]. Az I_{t0} expressziója megnő közvetlenül a születés után [40, 70,

94, 177], továbbá a csatorna kapuzási kinetikája is változik [129]. A CGRP (calcitonin-gene-related peptide) csökkenti az I_{to} -t [151]. Az angiotenzin-II megváltoztatja az I_{to} áramot, de nem befolyásolja a $K_v4.3$ és $K_v1.4$ csatornafehérjék mRNS-einek szintjét, így a hatás valószínűleg a járulékos alegységek révén érvényesül [190].



4. ábra: Az I_{to} steady-state aktiválódásának és inaktiválódásának feszültségfüggése kontroll körülmények között (üres négyzet), $pH_e=6,0$ (tele körök), és normál pH-ra visszatérés hatására (üres háromszögek). Az extracelluláris acidosis mindkét görbét depolarizáltabb irányba tolja. [152] alapján

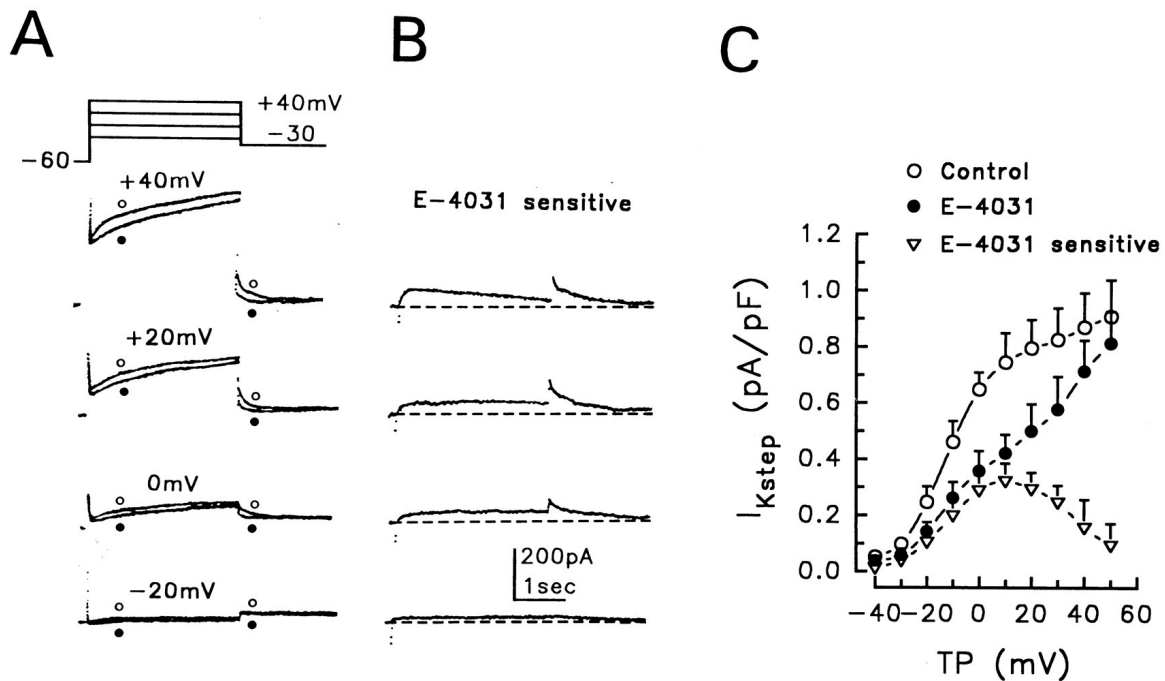
Az extracelluláris acidosis a csatorna aktiválódását és inaktiválódását is pozitívabb membránpotenciálok felé („jobbra”) tolja (lásd: **4. ábra**). A csatornát modulálhatja továbbá a myocyták aktuális redoxállapota a csatornafehérjéken található specifikus tiolcsoportok oxidációja, avagy redukciója által [145].

A tranziens kifelé irányuló áram megváltozik több kórállapotban is. Krónikus pitvarfibrilláció során csökkent az I_{to} csatornafehérjék kifejeződése a pitvari szívizomsejteken [52, 192]. Továbbá szívelégtelen betegekben [10], illetve pacemakeres kamrai ingerlés során is csökken az I_{to} expressziója a kamrai munkaizomsejteken [191]. Ezzel szemben szívelégtelenek pitvari cardiomyocytáin az I_{to} denzitását nagyobbak találták, és az áram kinetikája is megváltozott, ami hozzájárulhat az akciós potenciál rövidüléséhez [137].

II.1.2. Késői káliumáram (I_K)

A kinetikai és egyenirányító tulajdonságok, egyes farmakonok iránti érzékenység, valamint intracelluláris moduláció szempontjából a késői káliumáram három komponensét különböztethetjük meg [26, 103, 109, 110, 133] (**5. ábra**). A gyors komponens (I_{Kr}) mind aktivációt, mind inaktivációt mutat, a lassú komponens (I_{Ks})

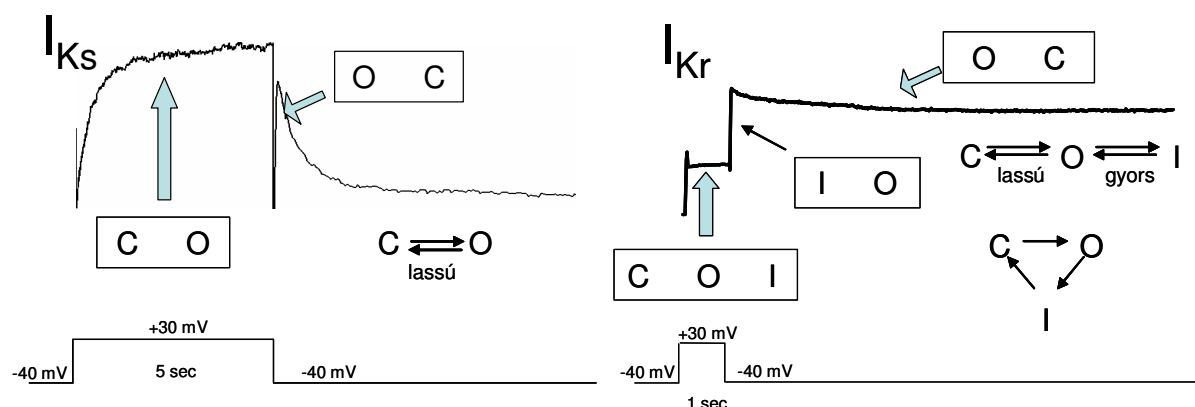
csak aktivációt, míg az ún. ultragyors komponens (I_{Kur}) aktiválódása nagyon gyors, és nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik (lásd: **6. ábra**).



5. ábra: A humán kamrai szívizomsejtek késői káliumárama legalább két komponensből áll: az egyik komponens E-4031-re érzékeny (I_{Kr}), a másik nem (I_{Ks}). **(A)** A depolarizáló négyszögimpulzusok során kapott áramgörbék időbeli lefutása kontroll esetben (üres szimbólumok) és E-4031 (az I_{Kr} gátlószere) jelenlétében (tele szimbólumok). Az E-4031 jelenlétében nyert adatok az I_{Ks} -t jelzik. **(B)** Az E-4031 érzékeny áram, tehát az I_{Kr} . **(C)** A késői káliumáram, illetve az egyes komponensek amplitúdójának feszültségfüggése. Li és munkatársainak közleménye [70] alapján

Az I_K áram jelenlétét minden szívsejtben leírták, ám az egyes komponensek áramsűrűsége jelentősen eltér a különböző fajokat, illetve a myocardium egyes régióit tekintve [112]. Az I_{Ks} és I_{Kr} mind pitvari, mind kamrai munkaizomsejteken megtalálható, bár a kamrából származó sejteken az I_K áramok amplitúdója kicsi [10, 12, 67, 78, 82, 85, 167, 182]. Humán myocardiumban az I_{Kur} jelenlétét eddig még csak pitvari sejteken bizonyították. A késői káliumáram komponenseinek a szív bal kamrájában eltérő szívcsúcs-szívbázis irányú, illetve transzmurális expressziója figyelhető meg. Nyúl preparátumokon mind az I_{Ks} , mind az I_{Kr} kisebb az apikális myocytákon, mint az annulus fibrosus felé eső, ún. „bázis” részen [24]. Munkacsoportunk kutya mintákon az I_{Kr} tekintetében sem az áram, sem a csatornafehérje szempontjából nem talált szignifikáns apico-bazalis különbséget, ám az I_{Ks} kisebb volt a bázis részen a szívcsúcsához képest [157]. A myocardium egyes rétegeit tekintve az I_{Kr} tekintetében munkacsoportunk szintén nem talált szignifikáns

különbséget, ám az I_{Ks} kisebb a kamra midmyocardialis rétegében a subepicardiumhoz viszonyítva [156].



6. ábra: Az I_{Ks} és I_{Kr} viselkedése depolarizáló négyzögimpulzus hatására. Az I_{Ks} a depolarizációt követően lassan aktiválódik, majd a -40 mV-ra történő repolarizáció hatására lassan deaktiválódik. Az I_{Ks} nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik. Az I_{Kr} depolarizáció hatására aktiválódik és ugyanekkor inaktiválódik is, majd a sejtmembránt -40 mV-ra repolarizálva az ioncsatornák gyorsan visszatérnek az inaktivációból. Ezt követően az I_{Kr} lassú deaktiválódása zajlik. C: zárt ioncsatornák; O: nyitott ioncsatornák; I: inaktív ioncsatornák

II.1.2.1. A késői káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

Szerkezet

A szívizomsejteken észlelhető I_{Ks} áramot a 11. kromoszóma rövid karján levő KCNQ1 (korábbi nevezéktan szerint K_vLQT1) gén által kódolt $K_v7.1$ csatornaféhrje és a MinK (avagy I_{sK}) peptid, mint járulékos fehrje együttes expressziója hozza létre [7, 130]. A KCNQ család K^+ csatornáit a feszültségfüggő K^+ csatornák doménjeinek klasszikus, hat transzmembrán szegmensből álló felépítése jellemzi. Azonban a KCNQ által kódolt α -alegységekből hiányzik a K_v csatornákra jellemző tetramerizációhoz szükséges régió. A 21. kromoszóma hosszú karján található KCNE1 gén által kódolt MinK peptid egyetlen transzmembrán domainből áll, és önmaga nem képez ioncsatornát. A KCNQ1 fehrjéhez β -alegységként kapcsolódva azonban modulálja a pórusformáló alegység működését és farmakológiai befolyásolhatóságát [161]. A veleszületett hosszú QT szindróma leggyakoribb formájáért, az 1-es típusú hosszú QT szindrómáért (LQT1) a KCNQ1 gén mutációja felelős [179]. A KCNE1 gén mutációját szintén leírták; ezt a mutációt a hosszú QT szindróma 5. típusában (LQT5) találhatjuk meg [38, 150].

Biofizikai tulajdonságok

Az I_{Ks} csak aktivációt mutat, nem inaktiválódik (**6. ábra**). Az aktiváció feszültségfüggését vizsgálva a félmáximális depolarizáló potenciál értékeit -13 mV és $+26$ mV között mérték [5, 87, 98]. Az aktiválódás időben meglehetősen elnyújtott, két exponenciális tag összegének segítségével illetve az aktiváció időfüggését az egyik időállandó 350 ms körül, a másik $8,5$ s körül találhatóak humán kamrai szívizomsejteken [87]. A deaktiváció időbelisége jelentősen fajfüggő; tengerimalac esetén lassú, viszont kutya és humán mintákon viszonylag gyors [48, 67, 164].

Az I_{Ks} áramot főként K^+ ionok hordozzák, de a csatorna kevésbé szelektív K^+ ionokra, mint az I_{Kr} áramot létrehozó ioncsatorna [98]. Egyetlen ioncsatorna konduktanciája mintegy $3-5$ pS emlősökben [5, 61]. Az extracelluláris $[K^+]$ nincs közvetlen hatással a konduktanciára, míg az intracelluláris $[Na^+]$ és $[Ca^{2+}]$ növekedése növeli az I_{Ks} áramot [111, 159].

Moduláció

β -adrenerg inger hatására az áram aktivációjának feszültségfüggése negatívabb membránpotenciálok irányába tolódik el, illetve lassul az áram deaktivációja [116, 176]. α -adrenerg hatás [175] és a proteinkináz C (PKC) aktiválódása [159] szintén növelik az I_{Ks} -t.

Amiodaron krónikus szedése, illetve hypothyroidismus csökkenti az I_{Ks} -t [13, 14, 75]. Kutyákban krónikus teljes AV-blokk miatti myocardium hypertrophiában mindkét szívkamra sejtjein kisebb az I_{Ks} amplitúdója, mint kontroll körülmények között [171].

II.1.2.2. A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Felépítés

Az I_{Kr} -t létrehozó ioncsatorna a feszültségfüggő K^+ csatornák eag családjának erg alcsaládjába tartozik. A csatornaalkotó $K_v11.1$ fehérjét a 7. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő KCNH2 gén (korábbi neve: hERG [184]) kódolja [131, 149]. A MiRP1 (minK-related peptide 1) fehérje [1] az ioncsatornával kölcsönhatásba kerülve módosítja annak kapuzását és permeabilitását [100]. A MiRP1-et a 21. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő KCNE2 gén kódolja. A $K_v11.1$ -hez járulékos alegységként a korábban már említett MinK is kapcsolódhat.

A KCNH2 mutációja a hosszú QT szindróma 2. típusát (LQT2) okozhatja [32], míg a KCNE2 gén mutációja felelős a hosszú QT szindróma 6. típusáért (LQT6) [25].

Biofizikai tulajdonságok

Az I_{Kr} gyorsan aktiválódik -40 mV-nál pozitívabb depolarizációra, az aktiváció félmaximális feszültségértéke -20 mV és -5 mV között van. A csatorna aktivációja független az extracelluláris $[K^+]$ -tól [139]. Az aktiváció és deaktiváció időállandói fajoként eltérőek, és függenek a membránpotenciáltól is. Az I_{Kr} aktivációs időállandója mintegy 100 – 500 ms [21, 133], humán myocardium esetén nagyjából 100 – 200 ms [87, 166, 167], ami jóval rövidebb, mint az I_{Ks} -re vonatkozó értékek. Humán és kutya szívizomsejteken azonban az I_{Kr} lassabban deaktiválódik, mint az I_{Ks} [48, 67, 164].

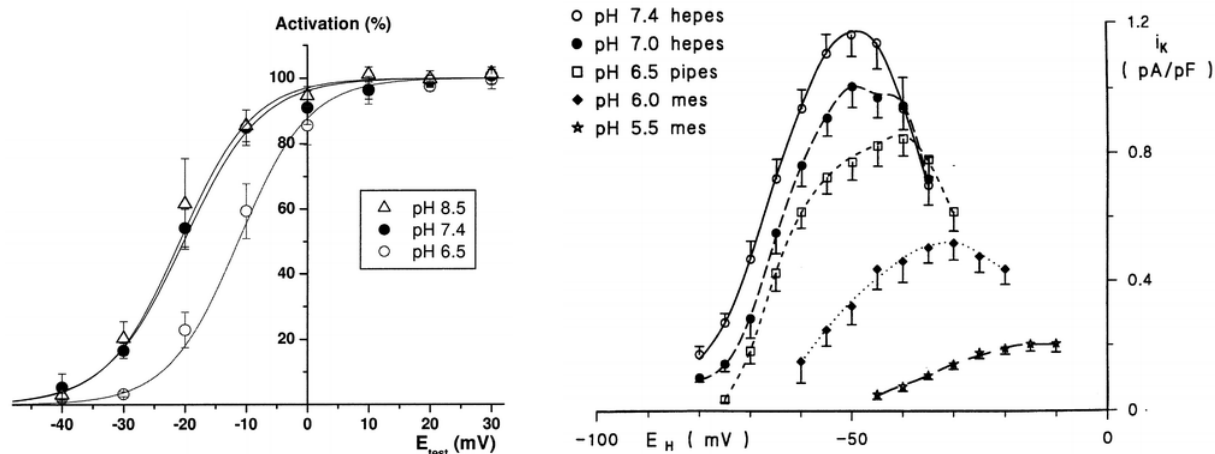
Az egészséges konfigurációban mért áramjel időbeli lefutása telítődést mutat az inaktiváció legcsekélyebb jele nélkül. A steady-state áram feszültségfüggése 0 mV környékén mutat maximumot, és nagyobb mértékű depolarizáció hatására az áramamplitúdó csökken; tehát az árammérések során az áram befelé egyenirányuló tulajdonságú (lásd az **5. ábra C** panelét, illetve a **7. ábra** jobb oldalán az áram-feszültség összefüggést). Kimutatták, hogy az áram befelé egyenirányulásáért valójában egy nagyon gyors, még a csatorna aktiválódását megelőző inaktivációs lépés felelős [139, 188]. Heterológ expressziós rendszerben az I_{Kr} csatornafehérjét kódoló KCNH2 gént kifejeztetve hasonló eredményt kaptak [131]. A $K_v11.1$ csatornák ezen tulajdonsága tehát nem a klasszikus értelemben vett egyenirányítás, hanem az ioncsatornák kapuzási kinetikájából következő sajátosság.

A csatorna főként K^+ ionokra nézve permeábilis, bár K^+ szelektivitása közel sem olyan nagymértékű, mint pl. az I_{K1} áramot létrehozó Kir2.1 fehérjékből álló ioncsatornának. Élettani körülmények között egyetlen ioncsatorna konduktanciája 2 pS körüli [77].

Moduláció

Egészen a közelmúltig azt gondoltuk, hogy β -adrenerg stimuláció nem módosítja az I_{Kr} -t, azonban újabb vizsgálatok során a cAMP többféle módosító hatását is leírták. Expresszált $K_v11.1$ csatornákon kimutatták, hogy a cAMP csökkenti az I_{Kr} áramot egyrészt a csatornához kötődve, másrészt a csatorna proteinkináz A (PKA) mediált foszforilációja által [30, 31, 76]. Ezzel szemben olyan adatokat is közöltek, melyekben a β -adrenerg stimuláció hatására növekedett az I_{Kr} áram, a csatornák befelé egyenirányításának mérséklődése miatt. Ez feltehetően a β -adrenerg hatásra bekövetkező $[Ca^{2+}]_i$ növekedés, és a következményes PKC aktiválódás hatására

alakul ki [56]. Saját, még nem publikált megfigyeléseink szerint a β -adrenerg receptorok isoproterenollal történő stimulációja az I_{Kr} áram növekedését okozta, azonban foszfodiészterázok által nem bontható cAMP analógot (8-Br-cAMP) intracellulárisan alkalmazva az I_{Kr} amplitúdója csökkent kutyákból származó izolált kamrai szívizomsejteken.



7. ábra: Az extracelluláris pH változásának hatása az I_{Kr} -re. Az ábra bal oldalán a steady-state aktiválódás feszültségfüggése, a jobb oldalon az I_{Kr} farokáramok amplitúdójának feszültségfüggése látható különböző extracelluláris pH-k esetén. Az extracelluláris acidosis hatására az aktiválódás pozitívabb feszültségértékek felé tolódik, csökken a farokáramok amplitúdója, továbbá gyorsul az áram deaktivációja is. Vereecke és munkatársának közleménye [168] alapján

Az I_{Kr} szelektív gátlószerei, mint az E-4031, a dofetilide vagy a D-sotalol metánszulfonanilid szerkezetű vegyületek és jelentősen meghosszabbítják a kamrai akciós potenciál hosszát [60, 72, 133, 149]. Ezt a hatást használják ki a III. osztályú antiarrhythmias gyógyszerek esetében is. A $K_v11.1$ csatornát gátolják továbbá egyéb antiarrhythmias szerek, így például a Na^+ csatorna blokkolók néhány képviselője (flecainid, disopyramid, amiodaron) is [23].

Az I_{Kr} áram gátlását azonban nem csak antiarrhythmias szerek esetében figyelhetjük meg, így például egyes antihisztamin szerek (pl. terfenadin, astemizol, cetirizin), mikroba-ellenes szerek (pl. erythromycin, ketokonazol), gyomor-bélrendszerre ható gyógyszerek (pl. cisaprid), illetve antipszichotikumok (pl. haloperidol) is hasonló hatást gyakorolnak az I_{Kr} -re [101]. Közös vonása a fent felsorolt szereknek, hogy legalább egy aromás gyűrűt tartalmaznak, valamint, hogy I_{Kr} blokkoló hatásuk a csatornába belépve és azokat mintegy “eldugítva” érvényesül. A szerek az ioncsatorna nyitott állapotában belépnek a pórusba, majd a csatorna aktivációs kapujának záródása után ottrekednek. Az extracelluláris $[K^+]$ csökkenése

csökkenti az I_{Kr} nagyságát [134, 188], és egyúttal érzékenyebbé teszi a csatornákat dofetilid vagy kinidin által okozott gátlással szemben [187]. A külső tér felől ható kétértékű kationok szintén gátolják a $K_v11.1$ csatornát [58, 59, 132, 148]. Az I_{Kr} csökken a szervezet acidosisának hatására is (**7. ábra**), mert ekkor egyrészt gyorsul az áram deaktivációja, másrészt az aktiváció feszültségfüggése is módosul [168].

A késői káliumáramot létrehozó csatornák expressziója változik az egyedfejlődés során [189]. Egér modellen végzett vizsgálatokban azt tapasztalták, hogy a foetusban főként $K_v11.1$ ioncsatornák (I_{Kr}) expresszálódnak, újszülött egerekben az arány megfordul a $K_v7.1$ ioncsatorna (I_{Ks}) javára; ugyanakkor felnőtt egerekben sem I_{Kr} sem I_{Ks} áram nem mutatható ki [178].

Kutya modellen létrehozott teljes AV-blokk, és következményes kamrai hypertrophia során az I_{Kr} áramsűrűsége csökkent a jobb kamrai cardiomyocytákban a kontroll csoporthoz képest, míg a bal kamrában nem volt szignifikáns eltérés [171].

II.1.2.3. A késői káliumáram ultragyors komponense (I_{Kur})

Gyorsan aktiválódó K^+ áram, mely nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik. Jelenlétét több preparátumon, köztük humán pitvari sejteken is igazolták [22, 109, 110, 137].

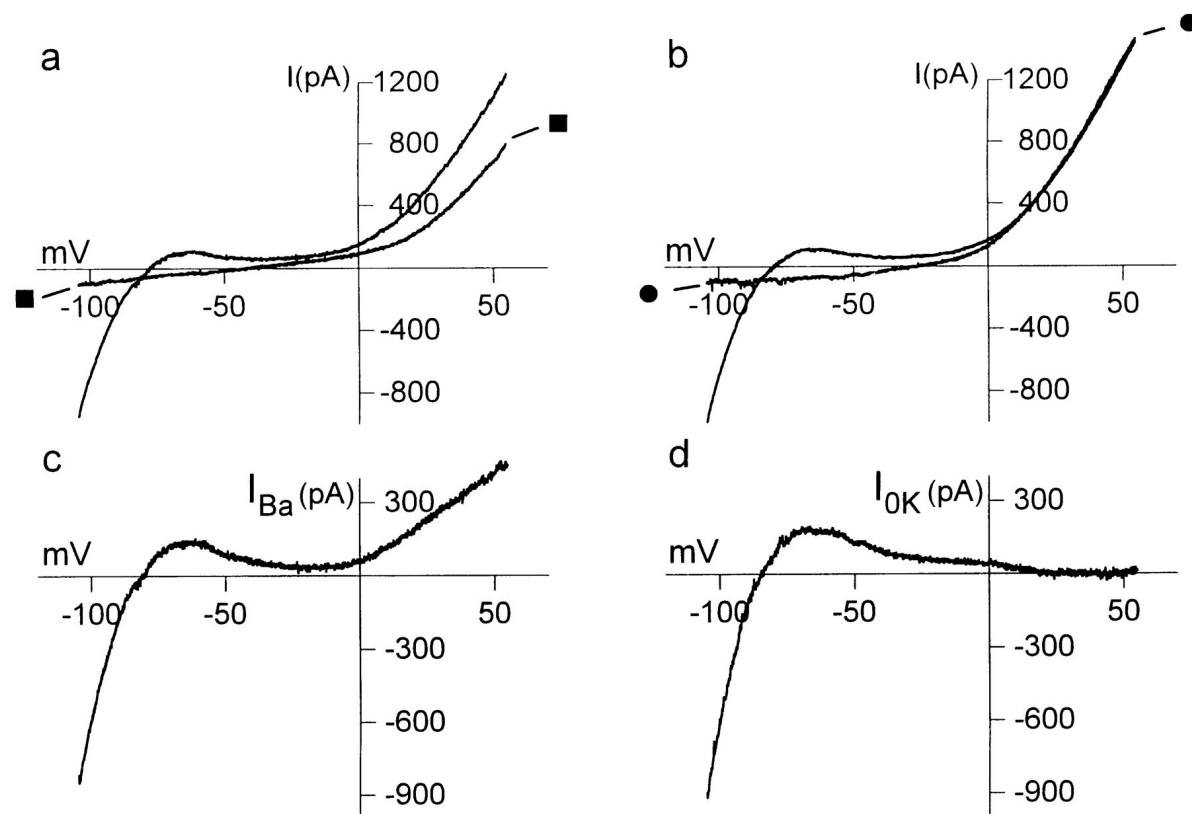
Az I_{Kur} -t egyesek, mint az I_K ultragyors komponensét írják le, azonban sokan az I_{to} nem inaktiválódó komponensének tartják. Az áram kinetikája és farmakológiai tulajdonságai fajtól és szövettípustól függően változóak. Úgy tűnik, hogy az I_{Kur} eltérő sajátságai a különböző csatornaalkotó fehérjék jelenléte miatt figyelhetőek meg, bár nem zárható ki a járulékos fehérjék szerepe sem. Humán pitvari szívizomsejteken kizárólag 4-aminopyridin érzékeny I_{Kur} mutatható ki, míg szívkamrai preparátumokon még nem igazolták I_{Kur} jelenlétét [87].

A KCNA5 gén által kódolt $K_v1.5$ fehérje a humán pitvarban megfigyelhető I_{Kur} áram legvalószínűbb molekuláris jelöltje [42, 147, 162, 181]. Egyéb preparátumokon a $K_v3.1$ (KCNC1), $K_v1.2$ (KCNA2) és $K_v2.1$ (KCNB1) jöhet szóba, mint csatornaalkotó fehérje [193].

II.2. A befelé egyenirányító káliumcsatornák árama (I_{K1})

A szívizomsejtekben megtalálhatóak az IRK csoportba tartozó, erősen befelé egyenirányító tulajdonságú ioncsatornák, melyek az I_{K1} áramot hozzák létre. Az I_{K1}

denzitása legnagyobb a Purkinje sejteken és a kamrai munkaizomsejteken [64], kisebb a pitvari cardiomyocytákon [57], és a sinuscsomó, valamint az AV-csomó sejtjein hiányzik [68]. Az I_{K1} enyhe növekedése tapasztalható a foetalis életkortól kezdve egészen a felnőttkorig [106, 174].



8. ábra: Az I_{K1} közelítésére használt Ba^{2+} érzékeny áram (I_{Ba}) és K^+ mentes extracelluláris oldatra érzékeny áram (I_{0K}) steady-state áram-feszültség összefüggése. Az áramokat $+55$ mV-tól -105 mV-ig alkalmazott $0,03$ V/s meredekségű lineáris feszültségrámpa segítségével vizsgálták. Az (a) és (b) panelen a normál Tyrode oldatban kapott, illetve az 1 mM $BaCl_2$ jelenlétében (tele négyzet), valamint káliummentes oldatban (tele kör) regisztrált áramgörbék láthatóak. Az ábra alsó része a kontroll és a $BaCl_2$ jelenlétében nyert (c), illetve a kontroll és a káliummentes oldatban kapott (d) áramgörbék különbségét jelöli. Az I_{Ba} és I_{0K} között a pozitív feszültségtartományban tapasztalható jelentős különbséget Ba^{2+} segítségével nem gátolható káliumáramok, illetve K^+ ionoktól különböző töltéshordozóval rendelkező ionáramok okozzák. Zaza és munkatársai közleménye [196] alapján.

Felépítés

Az I_{K1} legvalószínűbb csatornaalkotó fehérjéje a Kir2.1, melyet a 17. kromoszóma hosszú karján található KCNJ2 gén kódol [194]. A Kir2.1 a G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító káliumcsatornákkal (GIRK) — ezek hozzák létre például az $I_{K,Ach}$, $I_{K,ATP}$ áramokat — együtt a befelé egyenirányító káliumcsatornák (IRK) családjába tartozik. Az IRK csatornák tetramerek, egy-egy alegységüket mindössze két transzmembrán szegmens alkotja. A pórusformáló régió a két szegmens között helyezkedik el.

Biofizikai tulajdonságok

Az I_{K1} volt az első káliumáram, amit szívműködésben írtak le. Eredetileg időfüggő háttéráramnak gondolták. Később tisztázódott, hogy az I_{K1} időfüggő változásait intracelluláris Mg^{2+} [97, 163], valamint polyaminok (putreszcin²⁺, spermidin³⁺, spermin⁴⁺) [92] Kir2.1 csatornához való feszültség-, és időfüggő kötődése okozza.

Az I_{K1} áramot létrehozó ioncsatornák valamennyi szívvel kapcsolatban leírt káliumcsatorna közül a legszelektívebbek K^+ ionokra [74, 115, 126]. Az egyetlen ioncsatornára vonatkozó konduktancia értékét 9–45 pS között adják meg [46, 69, 74, 96, 127]. Tengerimalac kamrai myocytákon a csatornának egy teljesen nyitott állapotát, és négy kisebb vezetőképességű (ún. szubkonduktancia) állapotát írták le [95, 96].

A csatornák erősen befelé egyenirányító karakterisztikájúak (**8. ábra**). Befelé egyenirányításuk miatt ezeken az ioncsatornákon a nyugalmi membránpotenciálnál negatívabb feszültségértékek esetén jelentős áram folyhat keresztül, míg a -40 mV-nál pozitívabb membránpotenciálok esetén folyó kifelé irányuló áram kicsi. Az I_{K1} áram-feszültség függvénye -80 mV-nál pozitívabb potenciáltartományban negatív meredekségű [173, 195].

Moduláció

A csatorna működését sok tényező befolyásolja [125]. Az extracelluláris $[K^+]$ növekedése a Kir2.1 csatornák konduktanciáját növeli [115, 127]. Az I_{K1} áramot gátolja az intracelluláris acidózis [69], és Cs^+ , illetve Ba^{2+} extracelluláris alkalmazása.

Több antiarrhythmias szer is gátolja az I_{K1} áramot (pl. kinidin, amiodaron). Szintén csökken az áramamplitúdó lizofoszfátidilkolin [136] és oxidatív stressz hatására [99].

Humán kamrai szívműködésben β -adrenerg hatás gátolja az I_{K1} áramot PKA által közvetített foszforiláció következtében. Ez a β -adrenerg moduláció szignifikánsan csökken szívelégtelenségben [80]. α -adrenerg receptorok ingerlésének sejttípustól és fajtól függően eltérő hatása lehet; humán pitvari munkaizomsejteken például α_1 -adrenerg stimuláció gátolja az I_{K1} áramot PKC által mediált útvonalon [135]. Az I_{K1} nagymértékű csökkenését tapasztalták mind pitvari [79], mind kamrai [10] myocytákon szívelégtelenségben szenvedő betegeken végzett vizsgálatok során. Különböző szívműködés-hypertrophiás állatmodellek esetén leírták az I_{K1} növekedését, csökkenését, illetve nem szignifikáns változását is.

Patkány kamrai szívizomsejteken az I_{K1} nagymértékben megnő a foetalis élet utolsó szakaszában, mellyel együtt a szívizomsejteket jellemző nyugalmi membránpotenciál is negatívabb értéket vesz fel [105]. Érdeemes azonban megjegyezni, hogy ezzel párhuzamosan főként a KCNJ12 gén által kódolt Kir2.2 fehérje expressziójának növekedését mutatták ki, nem pedig a Kir2.1-ét.

III. Az egyes káliumáramok feltételezett szerepe a szívizomsejtek repolarizációjában

Az akciós potenciál csúcsa után a szívizomsejtek membránja repolarizálódni kezd. A teljes repolarizáció sejtípustól és ingerlési frekvenciától függően mintegy 100–400 ms között változhat. A későbbiekben bemutatandó kutya kamrai munkaizomsejtek esetében ez az időtartam 1 Hz-es ingerlőfrekvencia esetén mintegy 200–250 ms.

Ahogy azt a korábbiakban már bemutattam, az akciós potenciál felszálló szára (nulladik fázis) és a nyugalmi membránpotenciál helyreállása (harmadik fázis vége) között a szívizomsejtekre jellemző plateau fázis (második fázis) található. Ez a plateau fázis a kamraizomsejtekben sokkal kifejezettebb, mint a pitvari vagy nodalis sejtekben [195]. A pitvari és az ingerképző szövetből származó szívizomsejteken a plateau fázisból folyamatosan bontakozik ki a végső repolarizáció, a kamrai cardiomyocyták plateau fázisa és repolarizációja között élesebb az átmenet. A kamrai munkaizomsejtek membránjának 0 mV körüli depolarizáltsága tehát viszonylag hosszú ideig tart.

A kamrai szívizomsejtek repolarizációjának és az abban szerepet játszó áramok tulajdonságainak vizsgálata kiemelt jelentőségű a kardiológiai alap kutatásban. Ugyanis bármely szer, mely gátolja a kamrai szívizomsejtek repolarizációját (pl. az I_K áramot), megnyújtja az AP hosszát, és emiatt ún. szerzett hosszú QT szindrómához vezethet [37, 122, 124]. A hosszú QT szindróma öröklött (lásd korábban) vagy szerzett formái a syncope, egyes arrhythmiák (például torsade de pointes típusú kamrai tachycardia), és a hirtelen szívhalál fokozott kockázatával társulnak [25, 39, 118].

III.1. Az I_{to} szerepe a korai repolarizációban

Az akciós potenciál felszálló szárát követő korai gyors repolarizációt a Na^+ -csatornák inaktivációja, illetve a tranziens kifelé irányuló áram gyors aktivációja okozza. A tranziens kifelé irányuló áramot főként az I_{to} (I_{to1}) szállítja K^+ -áram formájában, ám a Ca^{2+} -aktivált Cl^- -áram ($I_{Ca,Cl}$ vagy I_{to2}) is hozzájárul az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedésével párhuzamosan.

A szívkamra izomzatát legalább három rétegre szokták osztani az egyes régiókban megfigyelhető AP morfológia (főként az első fázis és a plateau alaki eltérése) szempontjából, így megkülönböztethetünk subepicardiális, subendocardiális és a kettő között elhelyezkedő midmyocardiális régiót [86, 90, 195]. A subepicardiális sejteken az AP első fázisában igen kifejezett az átmeneti repolarizáció, majd ennek lezajlása után következik a plateaufázis, amely a nulladik fázisnál lassabb depolarizáció során éri el maximális magasságát. Ennek a régiónak az akciós potenciálját szokták "spike and dome" ("tüske és kupola") típusúnak nevezni. A subendocardiális sejtekben az átmeneti repolarizáció csak jelzett. A midmyocardiális ún. M-sejteknél ugyanez a kezdeti repolarizáció kevésbé mély, mint a subepicardiális sejtekben, de a subendocardiális sejtekénél kifejezettebb. A fent vázolt különbségek főként az I_{to} áram egyes myocardium-rétegekben észlelhető eltérő denzitásából adódnak [86]. Az áram legkifejezettebben a subepicardium sejtrétegeiben jelentkezik, míg kevésbé a subendocardiumban figyelhető meg. Transzmurális különbségeket írtak le a késői káliumáram egyes komponenseiben is, amik szintén hozzájárulhatnak az akciós potenciál regionális eltéréseihez [89]. Nyilvánvaló azonban, hogy a szívkamra nem háromféle sejtből vagy három élesen elkülönülő sejtrétegből épül fel; a fent említett subendocardiális–midmyocardialis–subepicardialis átmenet folytonos (úgy a regisztrálható AP, mint az I_{to} áramsűrűsége szempontjából), a háromféle sejtcsoport megkülönböztetése inkább didaktikai célokat szolgál.

Jelenleg még nem egyértelmű, hogy az I_{to} befolyásolja-e a humán szívizomsejtek akciós potenciáljának hosszát. Mivel a subendocardiumban az I_{to} igen kicsi, ezért ebben a régióban az APD-re gyakorolt hatása szinte teljes bizonyossággal kizárható. A szívizomzat többi rétegében azonban nem ilyen egyszerű a helyzet. Egyes modellkísérletek szerint az I_{to} gátlása nem okoz változást az akciós potenciál

hosszában [47, 117, 185]. Mások — szintén szimulációval kapott — eredményei alapján az I_{to} enyhe növelése az első fázis végére negatívabb membránpotenciált eredményez, ami az $I_{Ca,L}$ elhúzóbb aktiválódását eredményezi, és így meghosszabbodik az akciós potenciál. Az I_{to} nagymértékű növelése a membrán idő előtti teljes repolarizációját okozza, így az akciós potenciál sokkal hamarabb ér véget, mint normál esetben.

III.2. Az I_K komponenseinek szerepe a repolarizációban

Az I_{Kr} és I_{Ks} áramok fokozatosan növekednek a kamrai akciós potenciál plateau fázisa alatt. Az I_{Kr} meredekebben emelkedik, és nagyobb amplitúdójú, mint az I_{Ks} . Az I_{Kr} az akciós potenciál felszálló szára alatt és után aktiválódhatna ugyan, ám a korábban már említett nagyon gyors inaktivációja ezt nem teszi lehetővé. Ahogy a membránpotenciál egyre negatívabbá válik a plateau fázis során (főként az L-típusú kalciumcsatornák feszültségfüggő és intracelluláris $[Ca^{2+}]$ függő inaktivációja miatt), az I_{Kr} -t létrehozó ioncsatornák visszatérhetnek az inaktivációból, tehát az I_{Kr} növekedhet. Az áramot létrehozó $K_v11.1$ csatornák pozitív feszültségtartományban tapasztalható befelé egyenirányítása (gyors inaktiválódása) azonban nem teszi lehetővé, hogy a plateau fázis elején és közepén nagyon nagy I_{Kr} folyjon. Az I_{Kr} elegendően gyors aktiválódása, és a membránpotenciál negatívvá válása viszont az I_{Kr} kifejezett növekedését eredményezheti a végső repolarizáció során.

Az I_{Ks} nagyon lassan aktiválódik, és az akciós potenciál alatt csak kis amplitúdót ér el. Mivel azonban deaktivációja is nagyon lassú, valamint nem inaktiválódik, felvetették, hogy az I_{Ks} lehet a felelős az akciós potenciál frekvenciafüggő rövidülésében nagy ingerlési frekvenciákon. β -adrenerg hatásra szintén növekszik az áram amplitúdója, ami szintén csökkenti az akciós potenciál hosszúságát [172].

A plateau fázist követő végső repolarizációt (harmadik fázis) valószínűleg az L-típusú kalciumcsatornák inaktivációjának egyre kifejezettebbé válása, és ezzel párhuzamosan a késői K^+ -áram komponenseinek felerősödése indítja el. Az ionáramok egyensúlya a kifelé irányuló áramok felé tolódik, így növekszik a repolarizáció üteme [87]. A késői kifelé irányuló áramok szerepe a humán kamrai szívizomsejtek repolarizációjában mindmáig nem tisztázott pontosan. Bár az I_{Kr} és az I_{Ks} is megtalálható a kamrai cardiomyocytákon, amplitúdójuk (különösen az I_{Ks} -é) elég kicsiny. Azonban az I_{Kr} specifikus gátlása III. osztályú antiarrhythmiaszerekkel

megnyújtja a kamrai akciós potenciált. Ugyanezt a hatást okozza az I_{Kr} és az I_{Ks} csatornaalkotó vagy járulékos fehérjéinek defektusa is ún. „hosszú QT szindrómát” (long QT syndrome — LQT), vagyis az elektrokardiogramon látható jellegzetes QT-szakasz megnyúlást eredményezve (lásd korábban).

Bár a K^+ elektrokémiai gradiense a repolarizáció előrehaladásával fokozatosan csökken, az egyre negatívabbá váló membránpotenciál miatt $K_{v11.1}$ csatornák visszatérhetnek inaktivációjukból, így növelve az I_{Kr} nagyságát. Az I_{Kr} -t tartják felelősnek az akciós potenciál hosszúságának meghatározásáért. Az I_{Kr} lassú deaktivációja miatt felvetődött az I_{Kr} szerepe gyors ingerlés esetén az akciós potenciál frekvenciafüggő rövidülésében is [48].

Szemben az I_{Kr} repolarizációban játszott fontos szerepét övező egyetértéssel, az I_{Ks} hozzájárulása a normál kamrai repolarizációhoz jelenleg is vita tárgya. Az I_{Ks} megítélése nagyban függ a vizsgálat során alkalmazott fajtól és a kísérleti elrendezéstől is.

A tanulmányok többsége az I_{Ks} gátlása során megfigyelhető akciós potenciál hossz változásából próbál következtetni az I_{Ks} szerepére. Azok a munkacsoportok, akik szignifikáns akciós potenciál nyúlást tapasztaltak, az I_{Ks} fontosságát hangsúlyozzák [12, 93, 107], míg akik esetén az akciós potenciál hossz változása nem szignifikáns, azok az I_{Ks} normál repolarizációban betöltött elhanyagolható mértékű szerepe mellett érvelnek [84, 164]. Abban azonban széleskörű az egyetértés, hogy az akciós potenciál hosszának növekedésével [164], illetve β -adrenerg stimuláció hatására [71, 172] megnő az I_{Ks} hozzájárulása a repolarizációhoz.

Az antiarrhythmiaszerek kutatásában új irányzat az I_{Ks} -t aktiváló szerek fejlesztése [128, 186]. Az I_{Ks} aktiválásával ugyanis — a gyógyszerfejlesztők reményei szerint — anélkül lehetne növelni a refrakter periódust, hogy a kamrai akciós potenciálok hossza jelentősen változna. Ezáltal csökkenteni lehetne az antiarrhythmiaszerek proarrhythmias kockázatait.

Eltérő álláspontokkal találkozhatunk az I_{Ks} frekvenciafüggő viselkedését tanulmányozó vizsgálatokban is. Tengerimalac preparátumokon az I_{Ks} lassú deaktivációját írták le [133], ami alapján az I_{Ks} szerepet játszhat a nagyobb ingerlési frekvenciákon tapasztalt rövidebb akciós potenciál kialakításáért. Ezzel szemben humán [67] és kutya [48] preparátumokon az I_{Ks} viszonylag gyorsan deaktiválódik, ami még gyors ingerlés esetén is kizárhatja az I_{Ks} jelentős akkumulációját.

Az akciós potenciál repolarizációjának végére a késői K^+ -áram jelentősen lecsökken az alacsony elektrokémiai hajtóerő miatt, így a repolarizáció befejezésében az I_{Kr} és az I_{Ks} szerepe nem jelentős.

III.3. Az I_{K1} szerepe az akciós potenciál során

A kamraizomsejtek membránja az elektromos diastole alatt szinte kizárólag K^+ ionokra nézve permeábilis. Ez a nagy K^+ -konduktancia eredményezi az I_{K1} áramot, ami -80 mV körüli értéken stabilizálja a nyugalmi membránpotenciált. Az I_{K1} a korábbiakban már említett jellegzetes befelé egyenirányuló sajátságokat mutat. A Kir2.1 csatornákhöz -40 mV-nál pozitívabb membránpotenciálok esetén gyorsan Mg^{2+} , illetve polyaminok kötődnek, így deaktiválják az I_{K1} áramot. Így az akciós potenciál felszálló szára alatt az I_{K1} gyorsan deaktiválódik, és a plateau fázis során nem szolgáltat jelentős repolarizáló áramot. Ez is hozzájárul a kamrai szívizomsejtekben tapasztalható hosszú plateau fázis kialakulásához. A repolarizáció előrehaladásával a membrán egyre negatívabbá válik, és így az I_{K1} fokozatosan újra aktiválódhat. Bár a K^+ ionokra ható elektrokémiai hajtóerő egyre csökken, a nyitott Kir2.1 csatornák összessége elegendően nagy konduktanciát eredményez ahhoz, hogy az I_{K1} a nyugalmi membránpotenciál helyreállításáig növekedjen. Így feltehetően az I_{K1} alakítja ki a repolarizáció viszonylag gyors utolsó szakaszát [143, 158], és tartja fenn a nyugalmi membránpotenciált a következő akciós potenciál kezdetéig.

IV. Az akciós potenciál clamp technika

A repolarizációban szerepet játszó ionáramokat főként hagyományos feszültség-clamp technikával vizsgálják. A különböző pulzusprotokollok alkalmasak az ioncsatornák feszültség-, illetve időfüggő kapuzási paramétereinek leírására, azonban ezeknek az adatoknak az ismeretében legfeljebb találgatásokba bocsátkozhatunk arra vonatkozóan, hogy egy aktuális akciós potenciál alatt milyen ionáramok folynak. Ennek a problémának a feloldására vezették be az akciós potenciál clamp technikát [45]. A módszert részletesen az „Anyagok és módszerek” fejezetben ismertetem.

Célkitűzés

Kísérleteink célja a kutya bal kamrai szívműsejtekben megtalálható káliumáramok repolarizációban játszott pontos szerepének tisztázása volt. Ezt elsősorban az élettani viszonyokat leginkább tükröző akciós potenciál clamp körülmények között kívántuk elvégezni. Továbbá vizsgálni kívántuk az egyes ionáramok frekvenciafüggő sajátosságait is, hogy a repolarizációban betöltött szerepüket még pontosabban meghatározhatjuk.

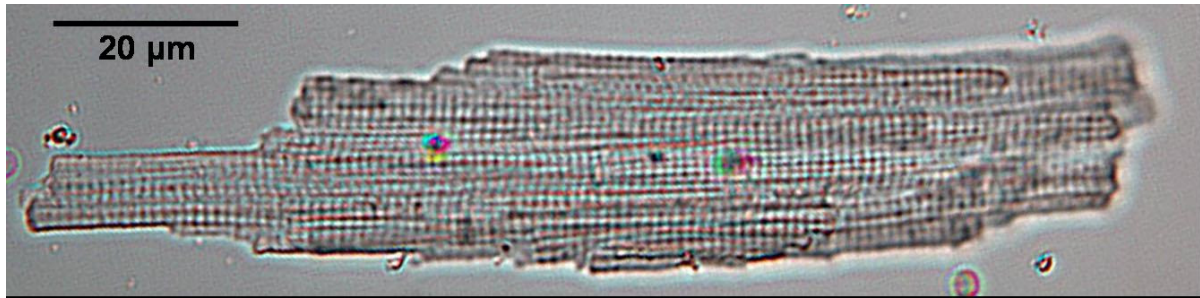
A kutya szívműsejteken végzett vizsgálatoknak azért van különös jelentősége, mert elektrofiziológiai szempontból a humán kamrai myocardium legjobb modellje a kutya szívműzat [51, 54, 156, 157]. Emiatt a kutya modellen végzett kísérleteket minimális fenntartással extrapolálhatjuk humán viszonyokra.

Anyagok és módszerek

I. Kutya bal kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket ivarérett, kísérleti célra tenyésztett kutyák szívéből nyertük, az anterográd szegmensperfúziós technika [157] alkalmazásával. A 10–20 kg-os állatokat 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsolvét, SelBruHa Kft., Magyarország) és 1 mg/kg xylazin-hidroklorid (Rometar, Alfasan, Hollandia) alkalmazásával altattuk. A mellkas megnyitása után a szívet gyorsan kiemeltük, és a bal elülső leszálló arteria coronaria ágat kanüláltuk, és ezen arteria vérellátási területének megfelelően perfundáltuk a myocardiumot Langendorff apparátus segítségével. A perfúzió első 5 percében Ca^{2+} mentes, taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l) és NaH_2PO_4 -tal (200 mg/l) módosított JMM oldatot (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, termékszám: M-0518; Sigma) alkalmaztunk a szövet Ca^{2+} és vértartalmának eltávolítása céljából.

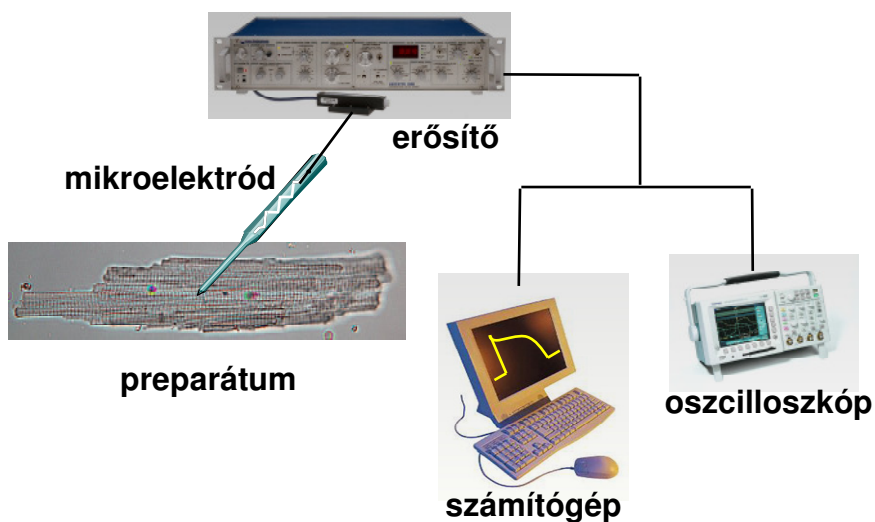
Ezt követően a preparátumot mintegy 30 percig perfundáltuk ugyanezzel a JMM alapoldattal, melyhez még kollagenázt (660 mg/l, Type II.; Worthington), borjú albumint (2 g/l, Fraction V.; Sigma) és CaCl_2 -ot (50 μM) adtunk. A sejtizolálás során az oldatokat végig karbogénnel equilibráltuk és a perfúziós oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. A kollagenázt is tartalmazó oldattal történő perfúzió végén a bal kamra falának midmyocardialis rétegét apró darabokra vágtuk, és a szövetdarabokat 50 μM kalciumot tartalmazó módosított JMM oldatban szuszpendáltuk. A sejtszuspenziót többször ülepítettük, szűrtük és mostuk egyre növekvő kalciumkoncentrációjú módosított JMM oldattal. Az izolálást követően a szuszpenzióban levő sejtek mintegy 30–60 %-a pálcika alakú volt és tiszta harántcsíkolatot mutatott 2,5 mM kalciumot tartalmazó oldatban (**9. ábra**). A sejtizolálás befejezése után két-három órával kezdtük meg a kísérletek végzését. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on tároltuk, Minimum Essential Medium Eagle oldatban (pH=7,4).



9. ábra: A mérésekhez használt kutya bal kamrából származó izolált szívizomsejt képe. Tisztán látható a szívizomsejtekre jellemző harántcsíkolat.

II. Elektrofiziológiai mérések

Valamennyi kísérletünk kezdetekor a szívizomsejteket 37 °C hőmérsékleten tartott, 1 ml térfogatú plexiüveg mérőkádba helyeztük. A kádban levő sejteket folyamatosan Tyrode oldattal (144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM glükóz; pH=7,4) perfundáltuk 10 ml/perc sebességgel. Az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez Axoclamp 2B, illetve Axoclamp 200B (Axon Instruments) erősítőket használtunk. A számítógépes vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 6.0 szoftvert alkalmaztunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot Digidata 1200 A/D-D/A (Axon Instruments) jelátalakító teremtette meg. Az erősítóből származó analóg jeleket oszcilloszkópon is megjelenítettük (lásd: **10. ábra**).



10. ábra: Az elektrofiziológiai mérésekhez használt elrendezés vázlata

II.1. Akciós potenciálok elvezetése izolált szívizomsejtekről

A transzmembrán potenciálokat 3 M KCl oldattal töltött boroszilikát mikroelektrodákkal regisztráltuk, melyek ellenállása 20–40 M Ω volt. A sejteket folyamatosan 1 ms szélességű négyszögimpulzusok alkalmazásával ingereltük, melyek amplitúdóját az ingerküszöb 110–120%-ára állítottuk, így az ingerlő jel és az AP felszálló szára között 1–2 ms szünet lehetett. Az AP-okat 100 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, és tároltuk a későbbi értékelésig.

A frekvenciafüggést vizsgáló kísérletek során az ingerlési ciklushosszt először 5 s-ra állítottuk, majd egyre csökkentettük a 0,5 s-os végső értékig. A tényleges mérések elvégzése előtt legalább 100 ciklust vártunk, hogy beálljon az egyensúlyi állapot.

Az akciós potenciálok hosszát a repolarizáció 50 %-ánál és 95 %-ánál határoztuk meg (rendre APD₅₀ és APD₉₅). A plateau fázis amplitúdóját a felszálló szár kezdetétől számítva az akciós potenciál hosszának (APD₉₅) 20 %-ánál mértük. A kísérletek során chromanol-293B (továbbiakban chromanol), E-4031 és isoproterenol oldatok hatásait vizsgáltuk. Mindegyik szerrel legalább 5 percig, a teljes hatás kialakulásáig perfundáltuk a sejteket. A chromanolt dimetilszulfoxidban oldottuk (10 mM törzsoldat), majd közvetlenül az alkalmazás előtt tovább hígítottuk a perfúziós Tyrode oldattal 10 μ M végkoncentrációra. Az E-4031-ből desztillált vízzel 1 mM-os törzsoldatot készítettünk. Az isoproterenolt minden kísérlet előtt közvetlenül oldottuk fel.

II.2. Az ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

A mérésekhez 1,5-2,5 M Ω ellenállású boroszilikát mikroelektrodákat használtunk. A pipetta belső oldata az alábbi anyagokat tartalmazta: 100 mM K-aszpartát, 45 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 3 mM K-ATP, 5 mM HEPES; pH=7,2. A pipetta hegyét a sejt felszínéhez érintve enyhe szívást alkalmaztunk, elősegítve a nagyellenállású kapcsolatot (1–10 G Ω ; ún. „gigaseal”) kialakulását. A gigaseal kialakulása után további szívással, vagy 1–5 ms hosszú 1,5 V nagyságú elektromos impulzus alkalmazásával törtük át a pipetta hegye alatti membrándarabot az egészséges elrendezés eléréséhez. A sejtek membránfelületének kapacitását

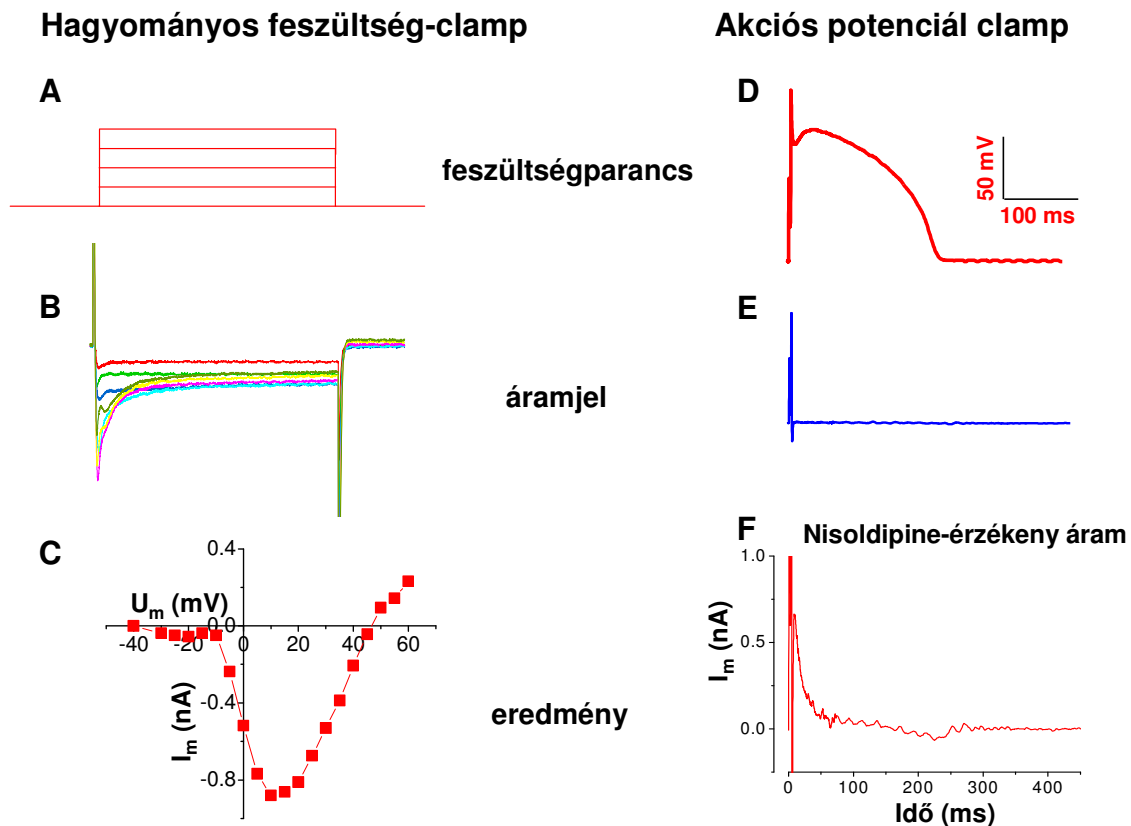
minden kísérlet előtt 10 ms hosszú, -10 mV-ról -20 mV-ra történő hiperpolarizáció segítségével megmértük, és az ionáramokat az így kapott sejtkapacitásra vonatkoztattuk. A feszültség-clamp kísérletekhez felhasznált sejtek átlagos kapacitása 128 ± 7 pF volt. A mérési elrendezés teljes soros ellenállása általában $4-8$ M Ω -nak adódott, melyet $50-80$ %-ban kompenzáltunk.

II.2.1. Akciós potenciál clamp

Az akciós potenciál clamp technika a feszültség-clamp technika speciális változata [45]. A módszer lényege, hogy parancsjelként a sejt saját akciós potenciálját alkalmazzuk, nem a hagyományos feszültség-clamp eljárásnál megszokott négyzög alakú feszültségjelet vagy háromszög alakú feszültségrámpát. További lényeges eltérés a két eljárás között, hogy a hagyományos feszültség-clamp technika alkalmazása során az extracelluláris, és az intracelluláris tér összetételét úgy állítjuk be, hogy a mérés során a membránon kizárólag az általunk vizsgálni kívánt áram haladjon keresztül. Ehhez sokszor a szervezetben élettani esetben elő sem forduló ionokat (pl. Cs^+ , Ba^{2+}), és ioncsatorna-gátlószereket használunk. Ezzel szemben az akciós potenciál clamp technika alkalmazása során a fiziológiás állapotot a lehető legjobban megközelítő feltételeket biztosíthatjuk. Az extracelluláris és intracelluláris tér összetétele az élettannival egyező lehet, és mindössze a vizsgálni kívánt ionáram szelektív gátlószereét kell alkalmaznunk. Az akciós potenciál clamp technika során feltétel, hogy a membránon áthaladó valamennyi nem vizsgált áram a kísérlet teljes időtartama alatt változatlanul a fiziológiás értéken maradjon, az intakt sejthez hasonlóan.

Az akciós potenciál clamp technika alkalmazásakor általánosan alkalmazott kísérleti protokollt a **11. ábra** szemlélteti. Első lépésben, áram-clamp körülmények között rögzítjük a sejt saját akciós potenciálját (**D panel**) Ha ezt a feszültségmintázatot parancsjelként játsszuk vissza feszültség-clamp üzemmódban, az akciós potenciál alatt mérhető áramjelünk folyamatosan nulla lesz (**E panel**), hiszen az egészséges sejt számára semmilyen külső áramra nincs ahhoz szükség, hogy saját akciós potenciálját fenntartsa. Ha ezt követően valamelyik ionáram szelektív gátlószereét alkalmazunk, az áramregisztrátumon megjelenik a "kikapcsolt" áram ellentétes előjellel (**F panel**). Ebben az esetben ugyanis az akciós potenciál normális lefutásához szükséges áramok közül a "kikapcsoltat" intracelluláris erősítőnk fogja biztosítani. Ezzel az eljárással tehát szert tettünk egy olyan

áramgörbére, melynek ellentettje megmutatja a vizsgálni kívánt áram akciós potenciál alatti pontos lefutását.



11. ábra: A hagyományos feszültség-clamp és az akciós potenciál clamp eljárások főbb különbségei az L-típusú kalciumáram mérésén keresztül bemutatva.

Az ábra bal oldalán a konvencionális feszültség-clamp, míg a jobb oldalon az akciós potenciál clamp technika lépései láthatóak vázlatosan. Az L-típusú Ca^{2+} -áram mérése hagyományos feszültség-clamp esetén megfelelően megválasztott négyzet alakú feszültségjelekkel (A) és intracellulárisan (tetraetil-ammónium), valamint extracellulárisan (4-aminopyridin) alkalmazott farmakonok segítségével történik. Az egyes depolarizáló lépcsők során kapott áramjelek (B) amplitúdóit az aktuális membránpotenciál függvényében ábrázolva kapjuk meg az L-típusú Ca^{2+} -áram steady-state aktivációjának feszültséggfüggését (C).

Az akciós potenciál clamp eljárás lépései:

1. A patch-clamp egészsejtes elrendezésének létrehozása
2. A sejt saját akciós potenciáljának rögzítése áram-clamp körülmények között, kontroll (normál Tyrode) oldatban (D)
3. A sejt saját akciós potenciáljának visszajátszása feszültségparancsként, feszültség-clamp módban, kontroll (normál Tyrode) oldatban; az így kapott áramjel rögzítése (elvileg zérus áram) (E)
4. A sejt saját akciós potenciáljának visszajátszása feszültségparancsként, feszültség-clamp módban, a vizsgálni kívánt ionáram specifikus gátlása után; az így kapott áramjel rögzítése (F — a panel az L-típusú kalciumáram gátlására alkalmazott nisoldipin jelenlétében mért áramgörbét szemlélteti)
5. A 3. és 4. pont alatt leírt áramgörbék különbsége mutatja meg a vizsgált ionáram akciós potenciál alatti megjelenését

A jelen vizsgálatok során alkalmazott akciós potenciál clamp technika részleteit az alábbiakban ismertetem. Az akciós potenciálokat egészsejtes elrendezésben,

áram-clamp üzemmódban rögzítettük a patch pipetta segítségével normál Tyrode oldatban. A sejteket folyamatosan 1 Hz-es (illetve a megfelelő kísérleteknél 0,2 Hz, 0,5 Hz, vagy 1,66 Hz) frekvenciájú 1 ms széles küszöb feletti négyszögjellel ingereltük úgy, hogy a stimulus műtermékét az akciós potenciál felszálló szárától jól el tudjuk különíteni. Sejtenként tíz egymást követő akciós potenciált rögzítettünk 100 kHz-es mintavételi frekvenciával, majd ezeket átlagoltuk. Ezt az átlagolt jelet használtuk ugyanazon a sejten és ugyanolyan ingerlési frekvenciával feszültségparancsként, immár feszültség-clamp módban. Az így kapott áramjel — a kezdeti néhány ms kapacitív tranziensének kivételével — a nulla vonalban futó vízszintes görbe volt. Az I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} és I_{K1} áramokat rendre 1 mM 4-aminopyridin, 1 μ M E-4031, 10 μ M chromanol-293B, illetve 50 μ M $BaCl_2$ alkalmazásával különítettük el, mindegyik szerrel legalább 3 percig perfundálva a sejteket. Az egyes ionáramok profilját úgy kaptuk meg, hogy a szerek alkalmazása előtti (végig közel zérus) áramgörbéből kivontuk a szerhatás utáni áramgörbét. Az akciós potenciál paraméterei közül meghatároztuk a 90 %-os repolarizációnál mért akciós potenciál hosszt (APD_{90}), a korai repolarizáció során elért legnegatívabb membránpotenciálértéket ($U_{incisura}$), a repolarizáció legnagyobb meredekségét (V_{max}^-), és a V_{max}^- időpontját.

II.2.2. Az I_{Ks} mérése négyszögimpulzusokkal

A kísérletek során tartópotenciálként -40 mV-ot alkalmaztunk. Az I_{Ks} -t 10 másodpercenként, 5 s hosszú $+30$ mV-ra történő depolarizáció segítségével aktiváltuk. A depolarizáció legvégén mért, a fenti módon aktivált áramot tekintettük teljesen aktivált I_{Ks} -nek, a tartópotenciálra történő repolarizáció után mért áramot pedig I_{Ks} farokáramnak. Az áram steady-state aktivációjának feszültségfüggését vizsgáló kísérleteink során -20 mV és $+50$ mV közötti potenciálra depolarizáltuk a sejtmembránt 10 mV-os lépcsőkben.

III. Matematikai modellezés

Számítógépes szimulációk segítségével elemeztük a plateau fázis magasságának, illetve az akciós potenciál hosszának az I_{Ks} kinetikájára gyakorolt hatását. Numerikus modellként az I_{Ks} feszültség-, és időfüggését is leíró Viswanathan és munkatársai által publikált modellt [169] alkalmaztuk, melyet saját

mérési eredményeinkhez adaptáltunk. A Viswanathan modelltől a G_{\max} értékében tértünk el, ezt ugyanis 0,084-gyel megszorozva alkalmaztuk. Azért tértünk el a paraméter eredeti értékétől, mert csak így kaptunk a modell segítségével olyan amplitúdóértékeket az I_{Ks} farokáram esetén, melyek jól egyeztek saját, korábbi mérési eredményeinkkel.

Az I_{Ks} áramprofiljának kiszámításához felhasznált akciós potenciálokat midmyocardialis szívizomsejteken rögzítettük. A plateau magasság, illetve az akciós potenciál hossz I_{Ks} -re gyakorolt hatásának elemzéséhez magunk készítettünk egy programot, mely egy korábban regisztrált akciós potenciált az általunk kívánt formájúra (tehát vagy kizárólag a plateau magasságát, vagy kizárólag az akciós potenciál hosszát változtatva) tudta alakítani. Így egyetlen kiindulási akciós potenciálból kizárólag az általunk vizsgálni kívánt paraméterben különböző akciós potenciál sorozatot készíthettünk.

A modellt Mathcad 2000i (Mathsoft Engineering & Education, Surrey, Egyesült Királyság) program segítségével futtattuk. Az akciós potenciál kezdete elé 10 ms hosszú nyugalmi membránpotenciált illesztettünk, hogy a modellezés során az áram steady-state értékre álljon az aktiválás előtt. Az integrációs lépések időtartama 1 ms volt. Mivel a modell figyelembe veszi a citoszól kalciumkoncentrációjának változását is, ezért egy mesterséges kalcium tranzienszt illesztettünk a modellbe. A diastole során 200 nM-os, míg a systole során 2 μ M-os intracelluláris kalcium koncentrációt állítottunk be.

IV. Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei \pm a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos varianciánalízist, Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollos t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdéseknek megfelelően. Az adatok közötti korrelációk meghatározásához lineáris regressziót használtuk. Az eltéréseket $P < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

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

Eredmények

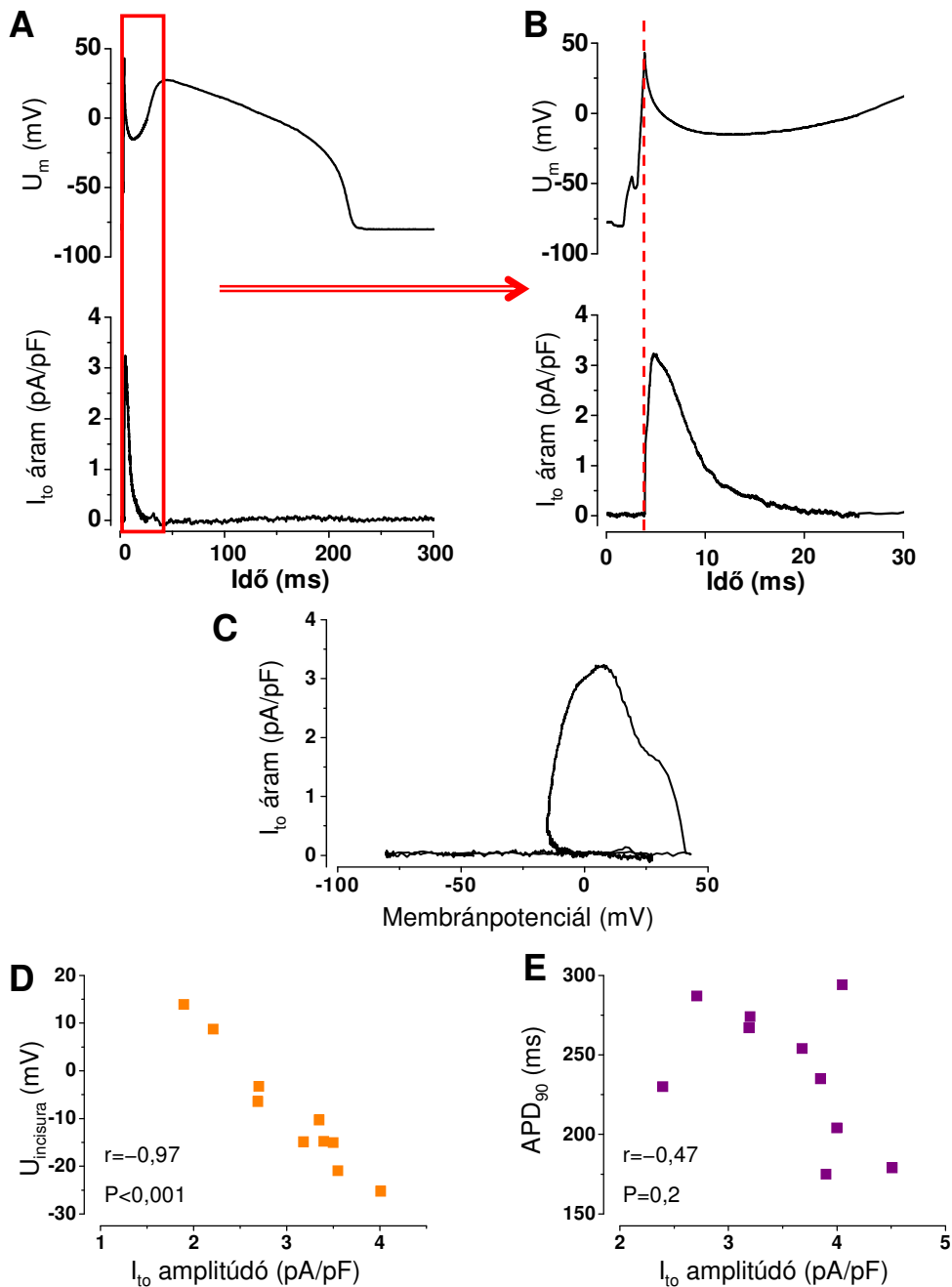
I. Káliumáramok vizsgálata akciós potenciál clamp módszerrel

I.1. Tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to})

Az I_{to} -t 1 mM 4-aminopyridin alkalmazásával különítettük el, amely ebben a koncentrációban az I_{to} 70 %-át gátolja anélkül, hogy egyéb kamraizomsejteken megtalálható káliumáramokra jelentős hatása lenne (**12. ábra**). Az akciós potenciál felszálló szárát követően az I_{to} gyorsan növekedett, és $4,4 \pm 0,7$ ms-mal az akciós potenciál csúcsa után érte el a maximumát (**12. ábra A, B**). A továbbiakban szereplő, akciós potenciál clamp körülmények között mért valamennyi időpontot szintén az akciós potenciál felszálló szárának kezdetétől számítottuk. A csúcs elérése után az áramjel $7,4 \pm 0,6$ ms-os időállandóval csökkent zérusra, így a 4-aminopyridinre érzékeny áram 50 ms alatt teljesen megszűnt. Az akciós potenciál felszálló szárának kezdetétől 50 ms elteltével $0,05 \pm 0,1$ pA/pF áramsűrűséget mértünk ($n=10$). Az I_{to} amplitúdója $3,0 \pm 0,23$ pA/pF-nak adódott, míg az áram által szállított töltésmennyiség $29,7 \pm 2,5$ fC/pF volt. A teljes töltésmennyiséget az áram-idő függvényen az áramgörbe alatti területként határoztuk meg. Az I_{to} csúcsa minden esetben megelőzte az akciós potenciál incisuráját (a kezdeti repolarizáció során elért legalacsonyabb membránpotenciál), amit a felszálló szár kezdetétől $10,0 \pm 0,8$ ms-mal mértünk. Az akciós potenciál clamp során nyert áram-feszültség összefüggés alapján (**12. ábra C**) — az I_{to} áram mért értékeit a parancsjelként használt akciós potenciál megfelelő feszültségértékeinek függvényében ábrázolva — megállapítottuk, hogy az I_{to} -15 mV és $+40$ mV között volt aktív, maximumát $+8,8 \pm 1,9$ mV-nál érte el. Az akciós potenciál incisurájánál mért feszültségérték ($U_{incisura}$) és az I_{to} maximális értéke fordítottan aránylott egymáshoz (**12. ábra D**). A 90 %-os repolarizációnál mért akciós potenciál hossz (APD_{90}) és az I_{to} amplitúdója között nem találtunk összefüggést (**12. ábra E**).

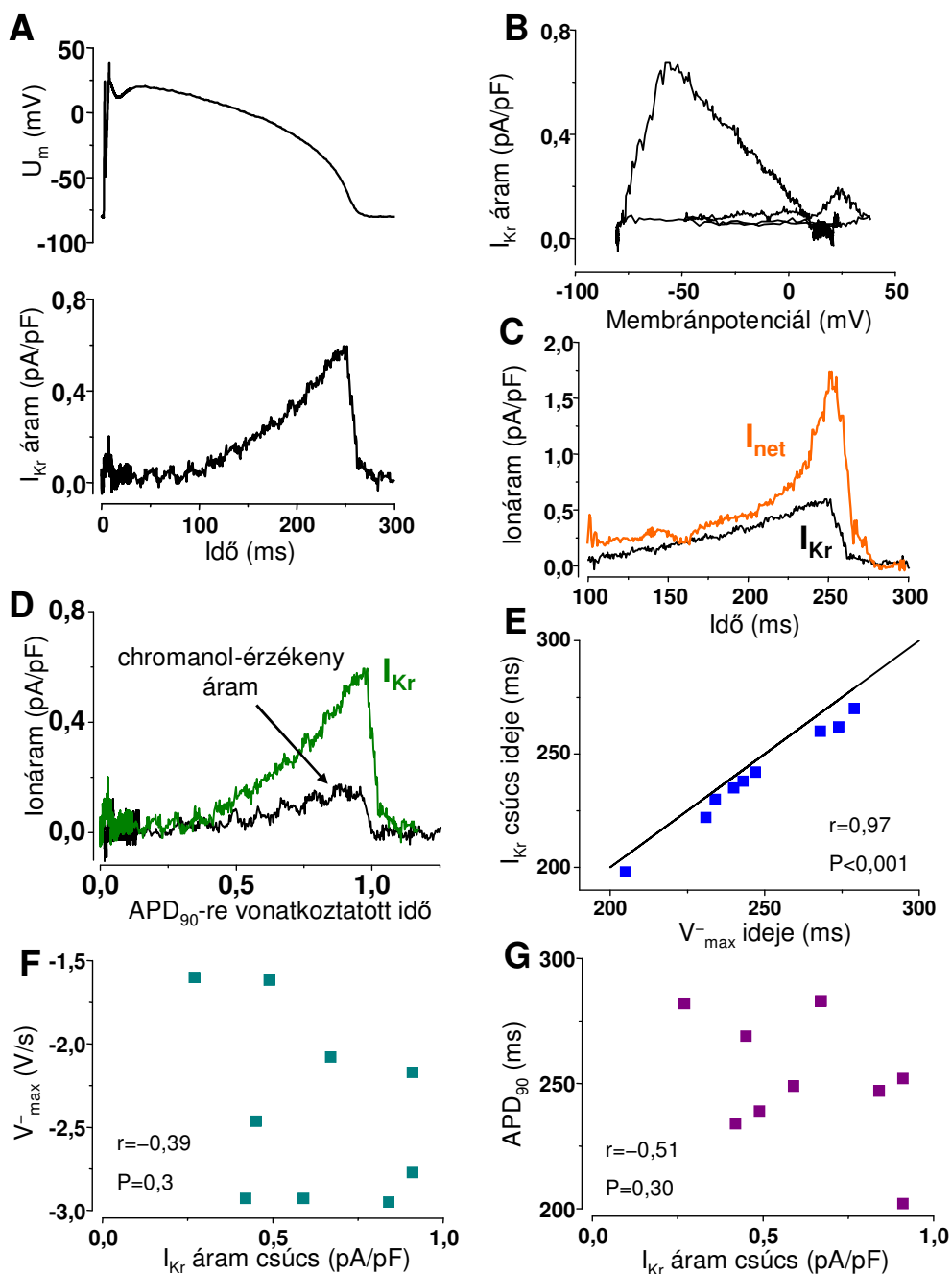
I.2. A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Az I_{Kr} vizsgálatát kilenc szívizomsejten végeztük el 1 Hz-es ingerlési frekvencián (**13. ábra**). Az áram szelektív gátlására 1 μ M E-4031-et alkalmaztunk. Az I_{Kr}



12. ábra: (A) Tranziens kifelé irányuló káliumáram regisztrátuma akciós potenciál clamp körülmények között. A reprezentatív akciós potenciált és az I_{to} áramprofilt 1 Hz-en mértük. A tranziens kifelé irányuló káliumáramot 4-aminopyridin-érzékeny áramként definiáltuk. (B) Az (A) panel kinagyítva. (C) Az I_{to} áram-feszültség diagramja. Az adott időpillanat membránpotenciálértékeinek függvényében ábrázoltuk az izokronálisan folyó 4-aminopyridin szenzitív áramot. (D) Az I_{to} amplitúdója és az incisura legmélyebb pontja közötti korreláció. (E) Az I_{to} amplitúdója és az akciós potenciál 90 %-os repolarizációjánál mért hossza (APD₉₀) közötti korreláció. Ezen és a következő ábrákon a korrelációs koefficientet „ r ”, míg a korreláció szignifikanciáját „ P ” jelöli.

fokozatosan emelkedett a plateau fázis során, csúcserő 0,62±0,08 pA/pF-nak adódott, az áram által szállított töltésmennyiség 57,6±6,7 fC/pF volt. Az akciós potenciál időtartamának felénél az I_{Kr} nagyságát 0,14±0,03 pA/pF-nak mértük, ami a



13. ábra: A késői káliumáram akciós potenciál clamp körülmények között. **(A)** Reprezentatív, akciós potenciál alatti I_{Kr} áramprofil 1 Hz-en mérve. Az I_{Kr} -t E-4031 szenzitív áramként határoztuk meg. **(B)** Az **(A)** panel alapján nyert reprezentatív I_{Kr} áram-feszültség diagram. **(C)** Az E-4031 érzékeny áram és a nettó membránáram lefutása az akciós potenciál során. **(D)** A chromanolérzékeny áram és az I_{Kr} akciós potenciál clamp körülmények között reprezentatív áramgörbéken szemléltetve. Az időpontokat a parancsjelként használt akciós potenciál APD₉₀ értékére normalizáltuk, így téve lehetővé a két áram különböző hosszúságú akciós potenciálok alatti összehasonlíthatóságát. **(E)** Az I_{Kr} áramcsúcs és a repolarizáció legnagyobb sebességének (V_{max}) időbeli viszonya. A folytonos vonal az egységnyi meredekségű egyenest jelöli. **(F, G)** Az I_{Kr} áram amplitúdója és rendje a V_{max} értéke, valamint az APD₉₀ közötti korreláció.

csúcsérték $23,1 \pm 4,6$ %-ának felelt meg. Az I_{Kr} áram-feszültség összefüggése a **13. ábra B** panelén látható. Az áram $+17 \pm 3,5$ mV-os membránpotenciál érték után

kezdett növekedni, maximumát $-54,2 \pm 1,7$ mV-nál érte el. Az áram tulajdonságait vizsgálva megállapítottuk, hogy összefüggés van az I_{Kr} áram csúcsának időpontja és a repolarizáció legnagyobb meredekségének (V_{max}^-) időpontja között: az akciós potenciál során az I_{Kr} mintegy 7 ms-mal a V_{max}^- előtt érte el maximumát (**13. ábra E**).

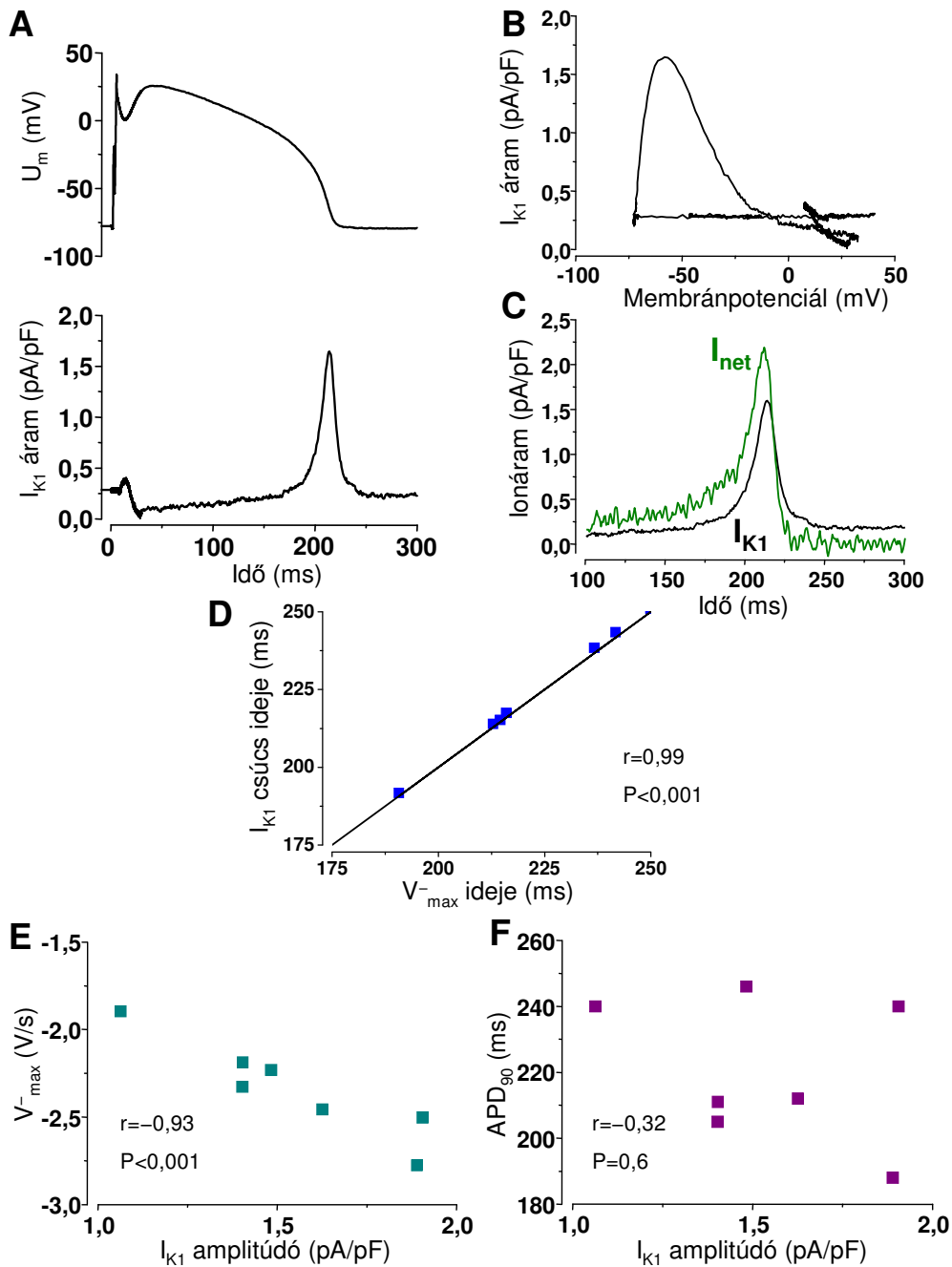
Az I_{Kr} és a membránon keresztül folyó nettó áram (**13. ábra C**; a nettó áramot a sejtmembrán kapacitása és a membránpotenciálváltozás idő szerinti első deriváltjának szorzataként számolhatjuk: $I_{net} = -C_m \cdot dU/dt$) összevetésekor azt láttuk, hogy a nettó membránáram a plateau fázis minden időpillanatában meghaladta az I_{Kr} értékét. A V_{max}^- időpontjában az I_{Kr} értéke a nettó membránáramnak mindössze egynegyede volt, így tehát az I_{Kr} nem lehet a repolarizáció végső fázisának domináló árama. Ennek megfelelően nem találtunk összefüggést sem az I_{Kr} amplitúdója és a V_{max}^- értéke sem pedig az I_{Kr} amplitúdója és az APD_{90} között (**13. ábra F, G**).

I.3. A késői káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

Az I_{Ks} akciós potenciál alatti áramprofilját 10 μ M chromanol-293B alkalmazásával kíséreltük meg megjeleníteni 1 Hz-es ingerlési frekvencián, öt szívizomsejten. A **13. ábra D** panelén reprezentatív I_{Kr} és chromanol-érzékeny áramok görbéi láthatóak, ahol az időpontokat a parancsjelként használt akciós potenciál APD_{90} értékére normalizáltuk, így téve lehetővé a két áram különböző hosszúságú akciós potenciálok alatti lefutásának összehasonlíthatóságát. Az ábrán látható, hogy az I_{Ks} áram amplitúdója nem haladta meg a kísérleti elrendezés zajszintjének háromszorosát. Továbbá a chromanolérzékeny áram és az I_{Kr} görbéinek akciós potenciál alatti lefutása nagyon hasonló volt, ami felvetette annak lehetőségét, hogy a chromanol nem teljesen szelektív I_{Ks} gátlószer. Ezek miatt — a többi káliumárammal ellentétben — az I_{Ks} -t nem jellemeztük akciós potenciál clamp körülmények között végzett kísérletsorozatunkban.

I.4. A befelé egyenirányító káliumcsatornák árama (I_{K1})

Az I_{K1} áram tulajdonságait hét kamrai szívizomsejt esetében vizsgáltuk 1 Hz-es ingerlőfrekvencián (**14. ábra**). Gátlószerként 50 μ M $BaCl_2$ -ot használtunk, melyről ismert, hogy az I_{K1} 88 %-át gátolja -58 mV-os membránpotenciálon, és ebben a koncentrációban egyéb káliumáramokra nincs jelentős hatása. Az I_{K1} áramot a diastole során is megfigyeltük: $0,26 \pm 0,03$ pA/pF áramsűrűséget mértünk a



14. ábra: A befelé egyenirányító káliumcsatornák áramának profilya akciós potenciál clamp körülmények között. **(A)** Reprezentatív, akciós potenciál alatt folyó I_{K1} áramgörbe 1 Hz-en. Az I_{K1} elkülönítésére $BaCl_2$ -ot alkalmaztunk. **(B)** Az I_{K1} áram feszültségfüggése, melyet az **(A)** panel alapján számoltunk. **(C)** A $BaCl_2$ érzékeny áram (I_{K1}) és a nettó membránáram akciós potenciál alatti görbéje. **(D)** Az I_{K1} áramcsúcs és a V_{max} időbeli viszonya. A folytonos vonal az egységnyi meredekségű egyenest jelöli. **(E, F)** Az I_{K1} áram amplitúdója és rendre a V_{max} értéke, valamint az APD₉₀ közötti korreláció.

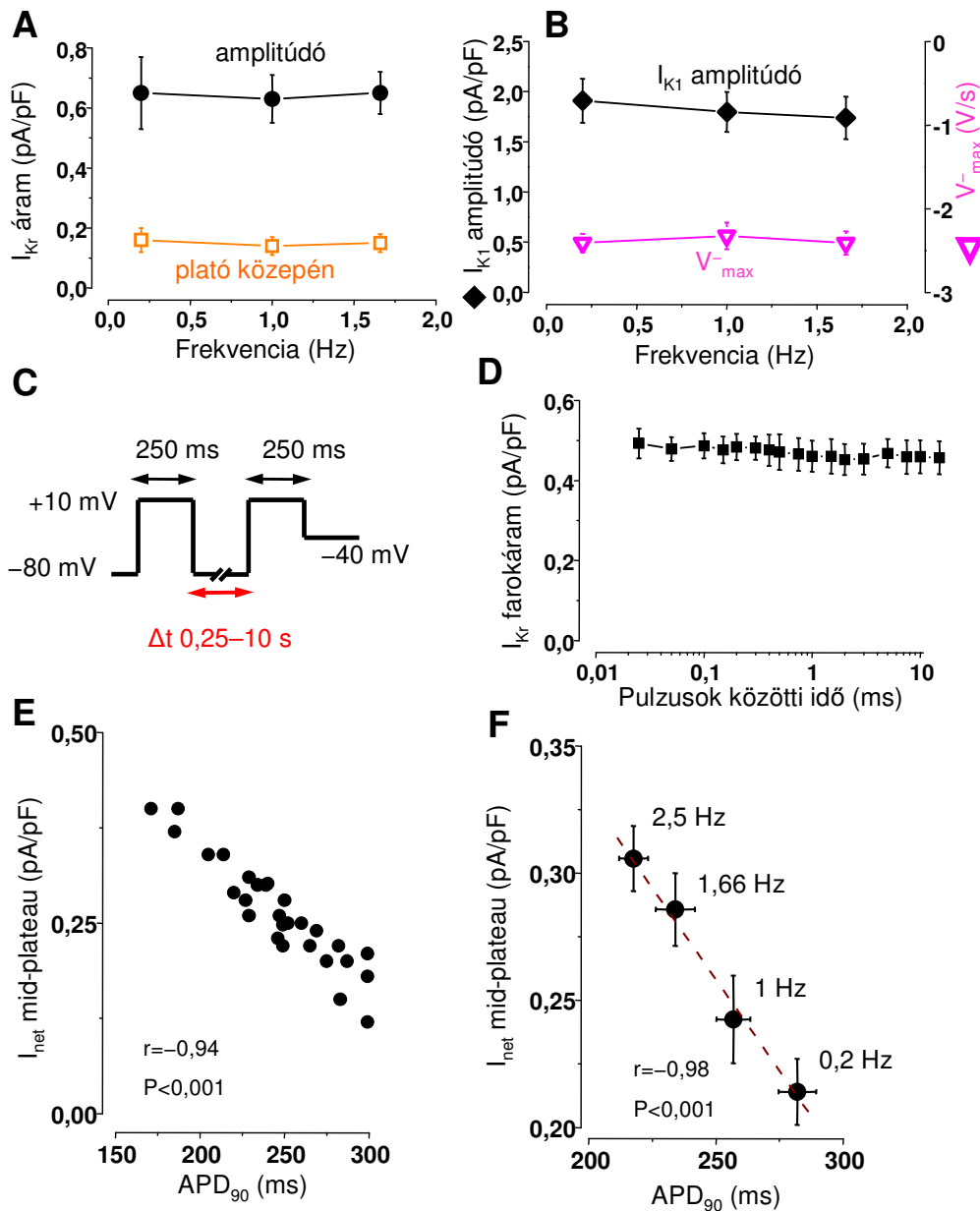
repolarizáció teljes lezajlása után, illetve a felszálló szár megkezdődése előtt **(14. ábra A)**. Az áram a felszálló szár alatt átmenetileg csökkent, majd a plateau fázis során lassan növekedett. Az akciós potenciál időtartamának felénél az I_{K1} értékét $0,13 \pm 0,03$ pA/pF-nak találtuk, mely még mindig kisebb volt, mint a diastole során a membránon átfolyó áram. Az áram-feszültség görbe alapján az I_{K1} növekedésének

hirtelen gyorsulása a repolarizáció során nagyjából -22 mV-os membránpotenciálnál következett be (**14. ábra B**). Az I_{K1} amplitúdója $1,8 \pm 0,1$ pA/pF volt, ezt $-58,3 \pm 0,6$ mV-os membránpotenciálnál érte el. Az I_{K1} maximális értéke és a V_{max}^- időpontja között szoros összefüggést fedeztünk fel: az I_{K1} a V_{max}^- után 1 ms-mal érte el maximumát (**14. ábra D**). Az I_{K1} idő szerinti határozott integrálja az akciós potenciál alatt $61,6 \pm 6,2$ fC/pF volt, melyet az áram akciós potenciál alatti kinetikája alapján két részre oszthatunk. Mintegy 20 fC/pF mennyiségű töltés az akciós potenciál plateau fázisa alatt, míg a maradék nagyjából 41 fC/pF a végső repolarizáció során hagyta el a sejtet. A V_{max}^- bekövetkeztének pillanatában az I_{K1} jelentette a nettó membránáram hozzávetőleg 75 %-át (**14. ábra C**). Ennek megfelelően a mértéke és az I_{K1} amplitúdója között szoros összefüggést találtunk (**14. ábra E**). Azonban — hasonlóan az I_{Kr} esetén tapasztaltakhoz — nem figyelhettünk meg összefüggést az I_{K1} csúcserő és az APD_{90} között (**14. ábra F**).

I.5. Az I_{Kr} és I_{K1} frekvenciafüggő sajátosságai

Az akciós potenciál morfológiájának frekvenciafüggő változásaiért valamely, az akciós potenciál során aktiválódó ionáram(ok) frekvenciafüggő sajátossága(i) kell, hogy feleljen(ek). Emiatt megvizsgáltuk az I_{Kr} és I_{K1} ionáramok frekvenciafüggését 0,2 Hz-es, és 1,66 Hz-es ingerlési frekvencia esetén is, amely percenként 12, illetve 100 szívverésnek felel meg (**15. ábra**). Megfigyeltük, hogy az I_{Kr} áramnak sem a maximális értéke, sem az akciós potenciál időtartamának felénél (a plateau fázis közepén) mért értéke nem változott szignifikánsan a különböző ingerlési frekvenciák esetén (**15. ábra A**). Ehhez hasonlóan, sem az I_{K1} amplitúdója sem a az akciós potenciál repolarizációjának maximális sebessége nem különbözött szignifikánsan a vizsgált frekvenciák esetén (**15. ábra B**).

Az I_{Kr} általunk tapasztalt frekvenciafüggetlen viselkedése nyilvánvalóan ellentmond annak a korábbi eredménynek, mely az I_{Kr} lassú deaktivációját írta le kutya kamrai szívizomsejteken. A lassú deaktivációs kinetikából ugyanis annak kellene következnie, hogy nagyobb ingerlési frekvenciák esetén az I_{Kr} akkumulálódik. Amiatt, hogy feloldhassuk ezt a látszólagos ellentmondást, kettős impulzus protokoll alkalmazásával megvizsgáltuk, hogyan változik az I_{Kr} farokáramok amplitúdója az előző depolarizációtól való időbeli távolság függvényében. A sejtmembránt -80 mV-os tartófeszültségről egyenként 250 ms hosszú, $+10$ mV-ra depolarizáló



15. ábra: Az I_{Kr} és az I_{K1} frekvenciafüggő sajátosságai. **(A)** Az I_{Kr} áram maximális értéke (üres körök) és az I_{Kr} értéke az akciós potenciál időtartam felénél (üres négyzet) 0,2 Hz, 1 Hz, és 1,66 Hz ingerlési frekvencián, akciós potenciál clamp segítségével mérve. **(B)** Az I_{K1} áram amplitúdói (üres körök) az ingerlőfrekvencia függvényében ábrázolva. A teli körök ugyanazon sejteken mért V_{max}^- értéket jelölik. A szimbólumok a számtani középértéket és a középérték körüli standard hibát jelölik, a zárójelben feltüntetett számok a független kísérletek számát jelentik. **(D)** Hagyományos feszültség-clamp kísérletek során, kettős pulzusprotokoll segítségével mért I_{Kr} farokáramok amplitúdói a két impulzus között eltelt időintervallum függvényében ábrázolva. Az áramokat $5 \mu M$ nifedipin és $30 \mu M$ chromanol-293B jelenlétében regisztráltuk. Az ábrán feltüntettem a pulzusprotokollt **(C)** is. **(E)** Az akciós potenciál hosszúság (APD_{90}) és a plateau közepén mért nettó membránáram (I_{net} mid-plateau) közötti korreláció akciós potenciál clamp körülmények között különböző ingerlési frekvenciákon mérve. A kísérletekhez felhasznált hét sejt feltüntetett frekvenciákon mért értékeinek átlagait az **(F)** panelen tüntettem fel. A szimbólumok a számtani középértéket, illetve a középérték körüli standard szórást jelölik, a szaggatott vonal a lineáris regressziós egyenes.

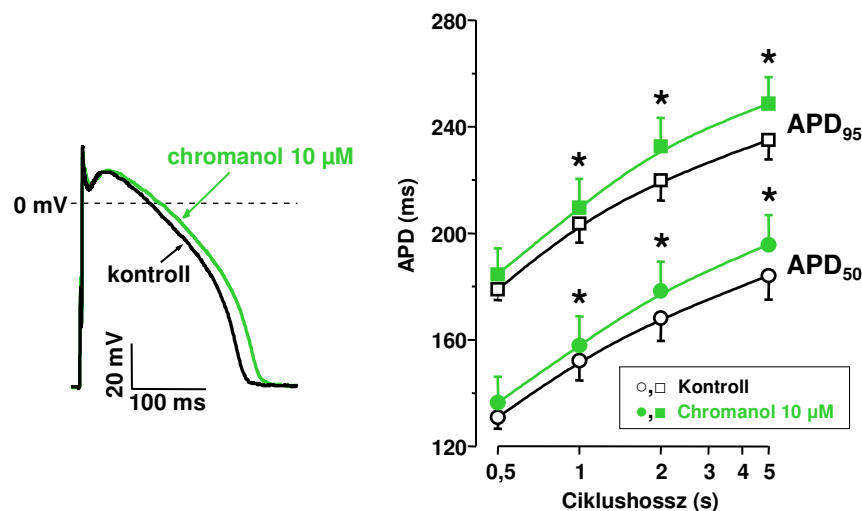
négyszögimpulzus párokkal ingereltük, majd a farokáramokat a második impulzus után -40 mV-ra történő repolarizáció során regisztráltuk (**15. ábra C**). A kísérleteket 5 μ M nifedipin és 30 μ M chromanol-293B jelenlétében végeztük, így eliminálva az L-típusú kalciumáramot, illetve a késői káliumáram lassú komponensét. Az ingerlőjelek paramétereit azért így választottuk meg, hogy hasonlítsanak két egymást követő akciós potenciálra. Eredményeink szerint az impulzuspárok egymáshoz való időbeli viszonya 25 ms– 10 s tartományban nem befolyásolta a farokáramok amplitúdóit, tehát az I_{Kr} nem akkumulálódik az egymást követő akciós potenciálok során (**15. ábra D**).

Az akciós potenciál clamp kísérletek során az akciós potenciál hosszúsága egyik általunk vizsgált ionáram amplitúdójával sem korrelált. Ezért megvizsgáltuk, hogyan viszonyul egymáshoz a plateau fázis közepén folyó nettó membránáram (I_{net} mid-plateau) és az akciós potenciál hossza (APD_{90}). A nettó membránáramot a plateau közepén mért feszültségváltozási sebesség és a membránkapacitás alapján ki tudjuk számítani. A kísérletek során áram-clamp módszerrel akciós potenciálokat rögzítettünk $0,2$ Hz és $2,5$ Hz közötti ingerlési frekvenciákat alkalmazva (**15. ábra E**). Amint az ábrán is látható, az APD_{90} és a I_{net} mid-plateau között fordított arányosságot találtunk. A **15. ábra F** panelén ugyanezeknek a kísérleteknek az APD_{90} – I_{net} mid-plateau diagramját tüntettem fel, ám ezúttal az ingerlési frekvenciák szerint csoportosítva. A plateau közepén folyó nettó membránáram 1 Hz-en $0,24 \pm 0,02$ pA/pF volt, amely közel azonos az akciós potenciál clamp kísérleteink során ugyanezen frekvencián kapott I_{Kr} ($0,14 \pm 0,03$ pA/pF) és I_{K1} ($0,13 \pm 0,03$ pA/pF) áramok plateau fázis közepén mért értékeinek összegével.

II. Az I_{Ks} vizsgálata chromanol-293B alkalmazásával

II.1. A chromanol hatása az akciós potenciál alakjára

A chromanol frekvenciafüggő módon nyújtotta az akciós potenciálokat, azonban más paramétereket nem változtatott meg. Az APD_{50} és APD_{90} értéke 10 μ M chromanol hatására rendre $152,0 \pm 7,4$ ms-ról $158 \pm 10,9$ ms-ra, illetve $200,5 \pm 8,2$ ms-ról $209,7 \pm 10,8$ ms-ra nőtt 1 Hz-es frekvencián. A nyújtó hatás tehát mérsékelt volt (az APD_{50} és APD_{90} esetén $6,0 \pm 1,6$ ms-os, illetve $9,2 \pm 3,5$ ms-os), ám statisztikailag szignifikáns ($P < 0,05$, $n=6$). A chromanol akciós potenciál hosszát növelő hatása

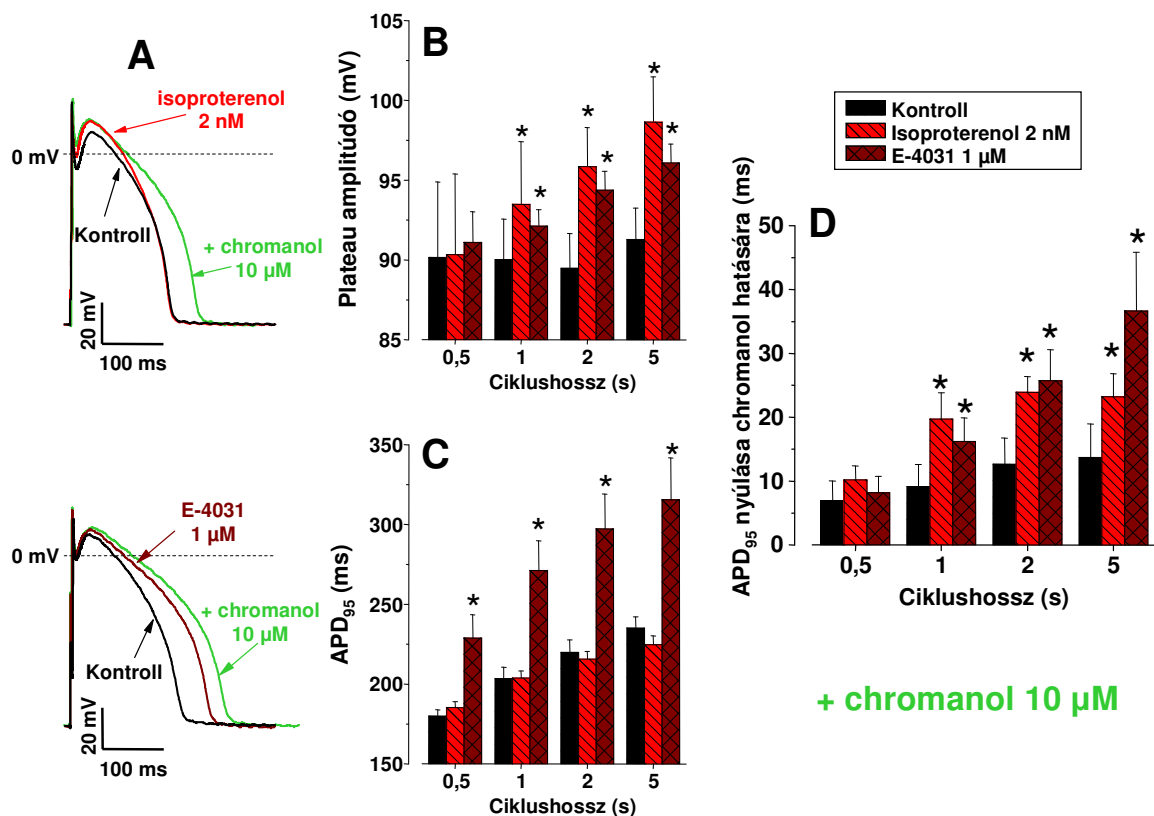


16. ábra: 10 μM chromanol-293B hatása az akciós potenciál alakjára. **(A)** Reprezentatív, 1 Hz-en regisztrált akciós potenciálok kontroll, illetve 5 perces chromanol-293B kezelés után. **(B)** A chromanol hatása az akciós potenciál hosszúságára a repolarizáció 50 és 95 %-ánál mérve (rendre APD_{50} és APD_{95}) az ingerlési frekvencia függvényében ($n=6$). A szimbólumok és a vonalak a számtani átlagot, és az akörüli standard szórását mutatják, csillaggal a statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelöltük. A statisztikai vizsgálathoz Student-féle önkontrollos t-próbát használtunk.

kifejezettebb volt alacsonyabb frekvenciákon (**16. ábra**). Chromanol kezelést követően nem találtunk szignifikáns különbségeket az akciós potenciál egyéb paramétereit illetően. A nyugalmi membránpotenciál $-81,0 \pm 2,8$ mV illetve $-82,7 \pm 2,1$ mV-nak, az akciós potenciálok amplitúdója $99,4 \pm 2,9$ mV illetve $101,2 \pm 3,2$ mV-nak, a plateau fázis amplitúdója $88,1 \pm 3,3$ mV illetve $90,2 \pm 3,5$ mV-nak, a depolarizáció legnagyobb sebessége 272 ± 23 illetve 286 ± 31 V/s-nak adódott rendre kontroll körülmények között, illetve 10 μM chromanol jelenlétében.

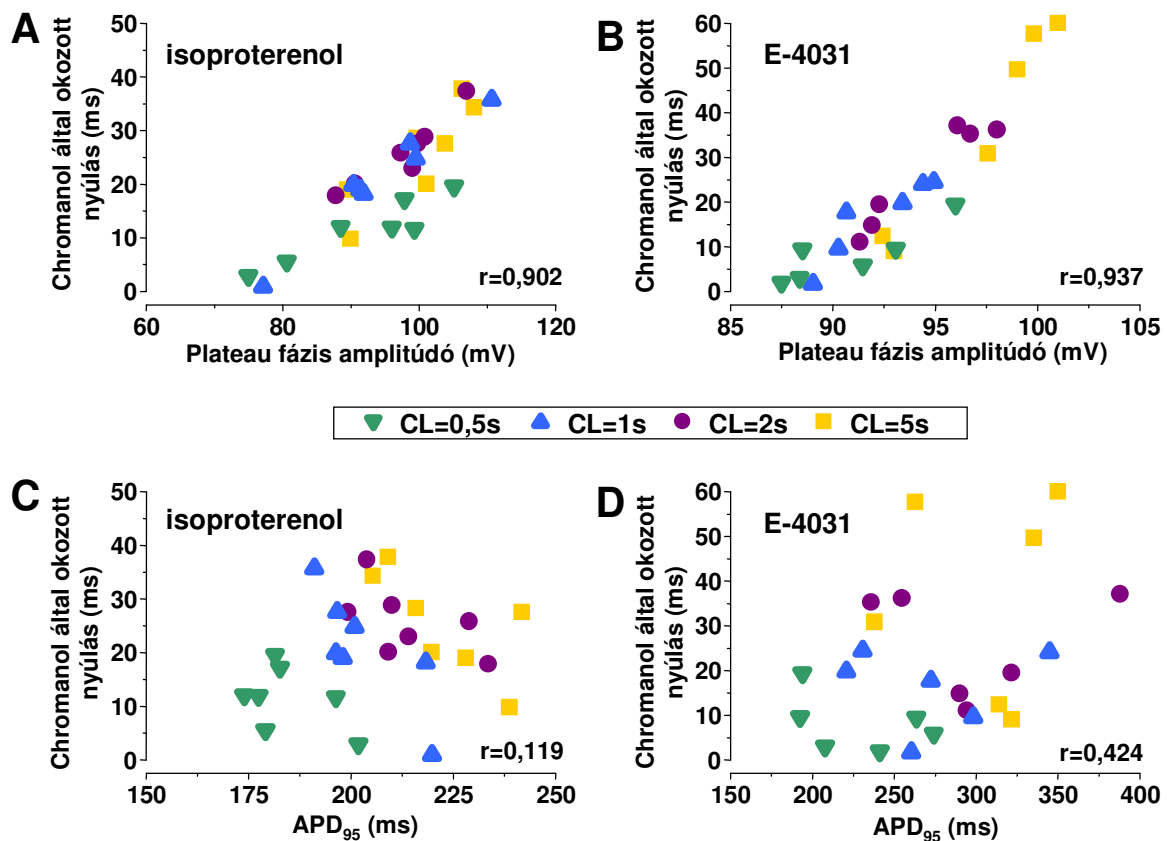
II.2. A chromanol hatása isoproterenol és E-4031 jelenlétében

Az alábbi kísérletekben 10 μM chromanol hatását vizsgáltuk 2 nM isoproterenol, illetve 1 μM E-4031 előkezelés után (**17. ábra**). Az isoproterenol ebben a koncentrációban megemelte a plateau amplitúdóját, ám nem volt hatása az APD_{95} -re (**17. ábra B**). Az E-4031 mind a plateau amplitúdóját, mind az APD_{95} -t növelte (**17. ábra C**). A két szernek ezen hatásai statisztikailag szignifikánsak voltak 1 s-nál nagyobb ciklushosszokon, és a ciklushossz növelésével egyre kifejezettebbé váltak. Ahogy az ábrán is látható, a chromanol által okozott akciós potenciál nyúlás jelentősen felerősödött mind isoproterenol mind E-4031 jelenlétében (**17. ábra D**). Ez a hatás szintén növekedett az ingerlési ciklushossz emelésével.



17. ábra: A chromanol hatása 2 nM isoproterenol, illetve 1 μM E-4031 jelenlétében (A) Reprezentatív, 1 Hz-en regisztrált akciós potenciál párok kontroll körülmények között, illetve 5 perces 2 nM isoproterenollal (felül), vagy 1 μM E-4031-gyel (alul) történt kezelés után. Az isoproterenol (n=7) és az E-4031 (n=6) frekvenciafüggő hatása a plateau fázis amplitúdójára (B), illetve az akciós potenciál hosszúságára (C). Csillagokkal a normál Tyrode oldatban mért kontrollhoz viszonyított, Student-féle önkontrollos t-próbával szignifikánsnak bizonyult eltéréseket jelöltük. (D) A chromanol által indukált akciós potenciál időtartam (APD₉₅) nyúlás kontroll esetben (n=6), isoproterenol (n=7), illetve E-4031 jelenlétében az ingerlési frekvencia függvényében ábrázolva. Ezen a diagramon csillagokkal az előkezelés nélküli kontrollhoz viszonyított, Student-féle kétmintás t-próbával nyert szignifikáns különbségeket jelöltük.

A jelen munkánk egyik fontos célja volt, hogy megkeressük azokat az akciós potenciál paramétereket, amelyek felelősek lehetnek az I_{Ks} aktiválásáért. Ezekre a paraméterekre a chromanol által létrehozott APD hosszabbító hatásból próbáltunk következtetni. Ezért a chromanol-indukált akciós potenciál nyújtó hatás és az APD₉₅, valamint a plateau amplitúdója között kerestünk korrelációt, isoproterenol illetve E-4031 jelenlétében (18. ábra). A chromanol akciós potenciált nyújtó hatása jól korrelált a plateau amplitúdójával: a korrelációs koefficiensek értékéül rendre 0,902-t és 0,937-t kaptunk isoproterenol (18. ábra A) illetve E-4031 (18. ábra B) jelenlétében. Ugyanakkor nem találtunk összefüggést a chromanol-indukált akciós potenciál nyújtó hatás és az APD₉₅ között sem isoproterenol (18. ábra C; r=0,119), sem E-4031 (18. ábra D; r=0,424) esetében. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a plateau fázis amplitúdója az I_{Ks} aktivációjának fontos tényezője az akciós potenciál

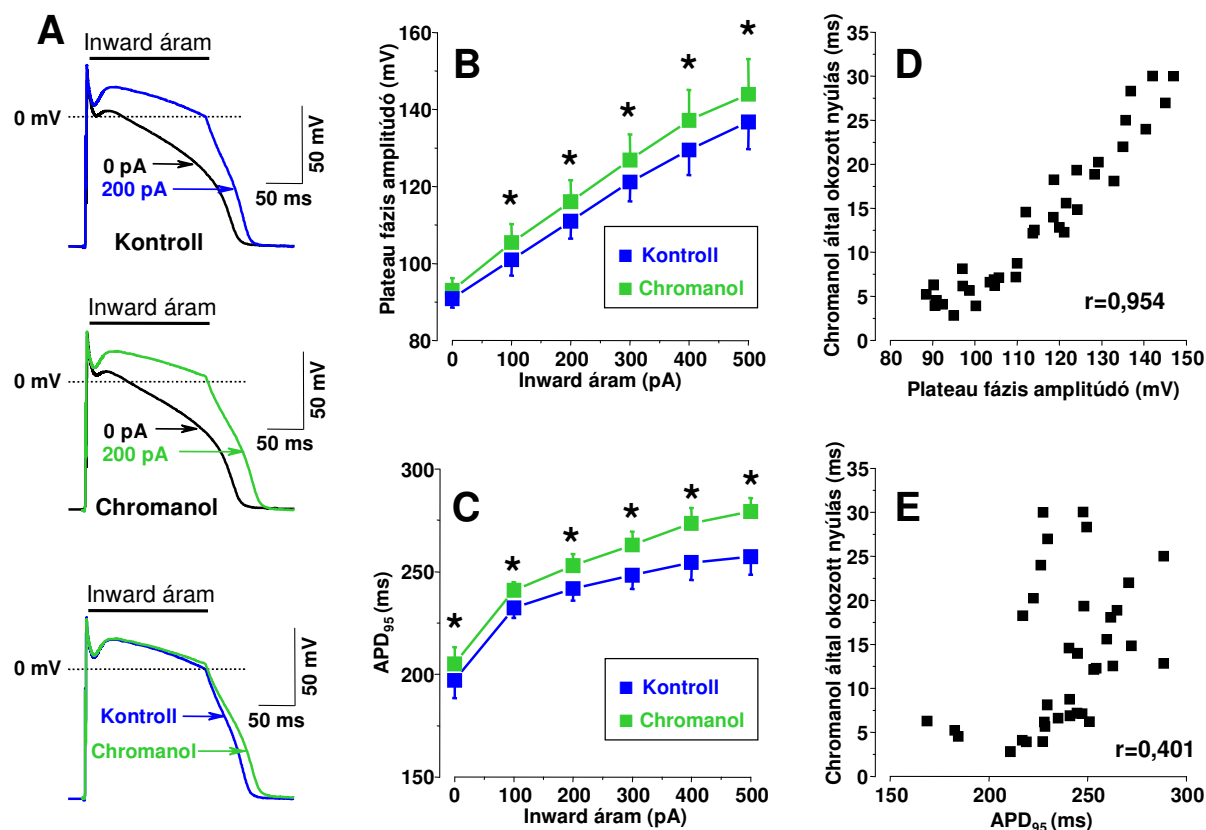


18. ábra: A chromanol által létrehozott akciós potenciál időtartam (APD₉₅) nyújtás és a plateau fázis amplitúdója (A, B), illetve az eredeti akciós potenciál hossz (C, D) közötti korreláció isoproterenol (A, C), vagy E-4031 (B, D) jelenlétében. Az adatokat a 9 ábra kísérletei alapján, valamennyi ingerlési frekvencián kapott eredmény felhasználásával nyertük. A korrelációs koefficienseket („r”) lineáris regresszió alkalmazásával kaptuk.

alatt, függetlenül attól, hogy mi idézi elő a plateau megemelkedését.

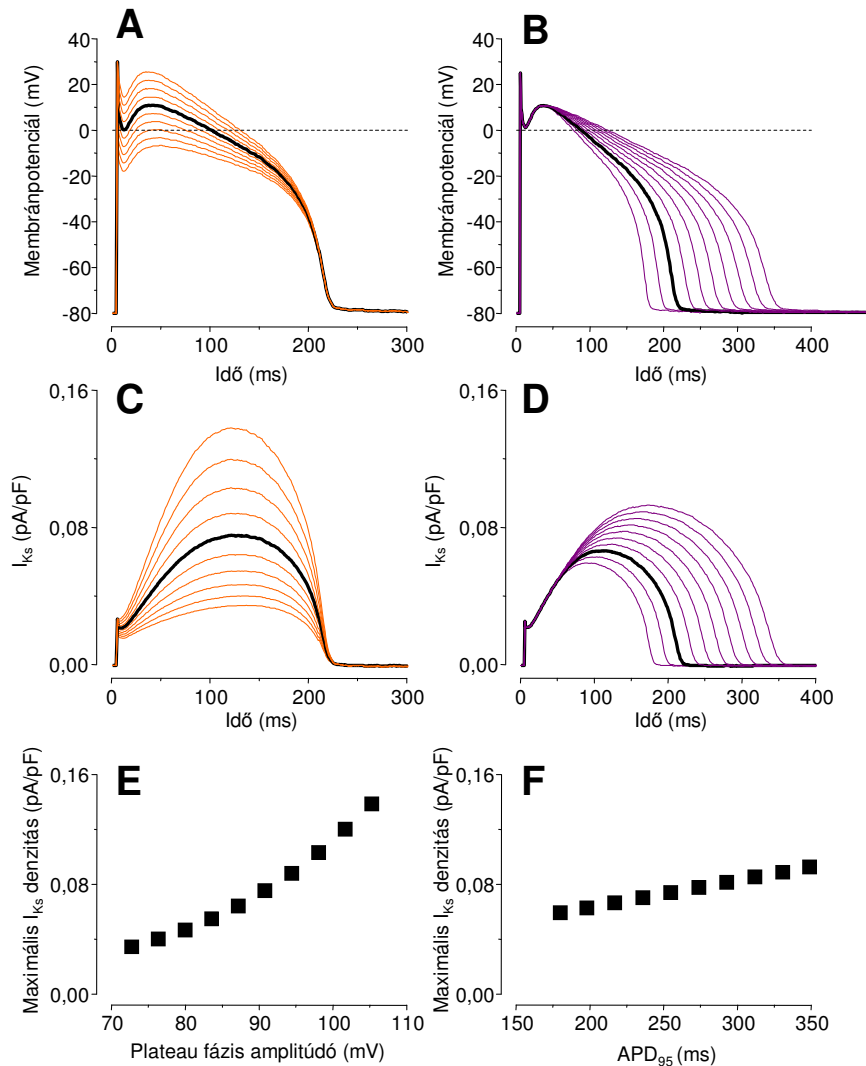
II.3. A chromanol hatása befelé irányuló árammal kezelt myocytákon

Mivel az isoproterenolról kutyából származó preparátumokon kimutatták, hogy megváltoztatja az I_{Ks} kinetikáját [55, 172], ezért keresnünk kellett egy olyan vizsgálati módszert, mely úgy okozza a plateau fázis megemelkedését, hogy közben nem változtatja meg az I_{Ks} áramot létrehozó $K_v7.1$ csatornák foszforilációs állapotát. Módszerünk a következő volt: a mikroelektrodán keresztül áram-clamp módban négyszögjelnek megfelelő befelé irányuló árammal tonizáltuk a sejteket az akciós potenciál csúcsától kezdődően. A négyszögjelek 170 ms hosszúak voltak, amplitúdójukat 100-500 pA-ig változtattuk 100 pA-es lépcsőkben. A tonizáló lépéseket mind kontroll körülmények között, mind chromanol előkezelés után megismételtük ugyanazon a sejten (19. ábra). Módszerünk segítségével a



19. ábra: A chromanol hatása befelé irányuló árammal tonizált myocytákon. (A) Reprezentatív, 1 Hz-es ingerlési frekvencián regisztrált akciós potenciálok, melyeket rendre normál Tyrode oldatban tonizáló áram alkalmazása előtt és után, illetve 10 μM chromanol jelenlétében áraminjekció előtt és után nyertünk. Az utolsó panelen az áraminjekció hatását mutatom be normál Tyrode oldatban és 10 μM chromanol kezelés után. Az ábrák mindegyikén a +200 pA amplitúdójú áraminjekciók hatása látható. (B, C) Az áraminjekciók hatása a plateau amplitúdójára (B), illetve az akciós potenciál időtartamára (C) kontroll esetben, illetve 10 μM chromanol előkezelés után. Az áramjelek nagyságát 100 pA-es lépésenként változtattuk. Csillaggal a chromanollal történő kezelés előtti és utáni értékek között szignifikánsnak mutató eltérést jelöltem. A statisztikai számításhoz Student-féle önkontrollos t-próbát használtunk. (D, E) A chromanol által okozott akciós potenciál időtartam (APD_{95}) nyúlás valamint a plateau fázis amplitúdója (D), illetve a chromanol alkalmazása előtti akciós potenciál hossz (APD_{95}) (E) közötti korreláció. Az adatokat a B és C panelen is látható eredmények felhasználásával nyertük. A korrelációs együttható („r”) értékét lineáris regresszió segítségével számoltuk.

chromanol által létrehozott akciós potenciál időtartam növelést több különböző APD_{95} és plateau amplitúdó esetén is megvizsgálhattuk ugyanazon a preparátumon. A befelé irányuló áram alkalmazása — a vártnak megfelelően — mind a plateau fázis amplitúdóját, mind az APD_{95} -t megnövelte. Ezek a hatások kifejezettebbek voltak 10 μM chromanol jelenlétében, mint kontroll körülmények között (19. ábra B, C). Az isoproterenollal és az E-4031-gyel végzett kísérleteinkhez hasonlóan a chromanol által indukált akciós potenciál nyújtó hatás arányos volt a plateau amplitúdójával (19. ábra D; $r=0,954$), azonban nem függött az akciós potenciálok hosszától (19. ábra E).



20. ábra: A plateau fázis amplitúdójának (**A, C, E**), illetve az akciós potenciál időtartamának (**B, D, F**) hatása a késői káliumáram lassú komponensének (I_{Ks}) akciós potenciál alatti profiljára a módosított Viswanathan modell alapján. A modell futtatása során egymástól mindössze a plateau magasságában (**A**), illetve az akciós potenciál időtartamában (**B**) különböző akciós potenciál sorozatot használtunk, hogy kiszámítsuk a hozzájuk tartozó I_{Ks} áram profilját (**C, D**). A normál Tyrode oldatban 1 Hz-en regisztrált akciós potenciálok és a hozzájuk tartozó áramgörbék vastag vonallal láthatóak az A, B, C, D panelen. Az adott akciós potenciál alatt a modell alapján folyó I_{Ks} maximumértéke a bemeneti akciós potenciál plateau amplitúdója (**E**), illetve az APD₉₅ (**F**) függvényében ábrázolva

II.4. Az akciós potenciál alatti I_{Ks} áramprofil meghatározása matematikai modellezéssel

Matematikai szimulációinkhoz a módosított Viswanathan modellt használtuk [169]. Modellkísérleteink során szintén a plateau magasságának és az akciós potenciál hosszának hatását vizsgáltuk az I_{Ks} áramsűrűségére (**20. ábra**). Vizsgálatainkhoz egyetlen korábban rögzített akciós potenciált használtunk, melyből

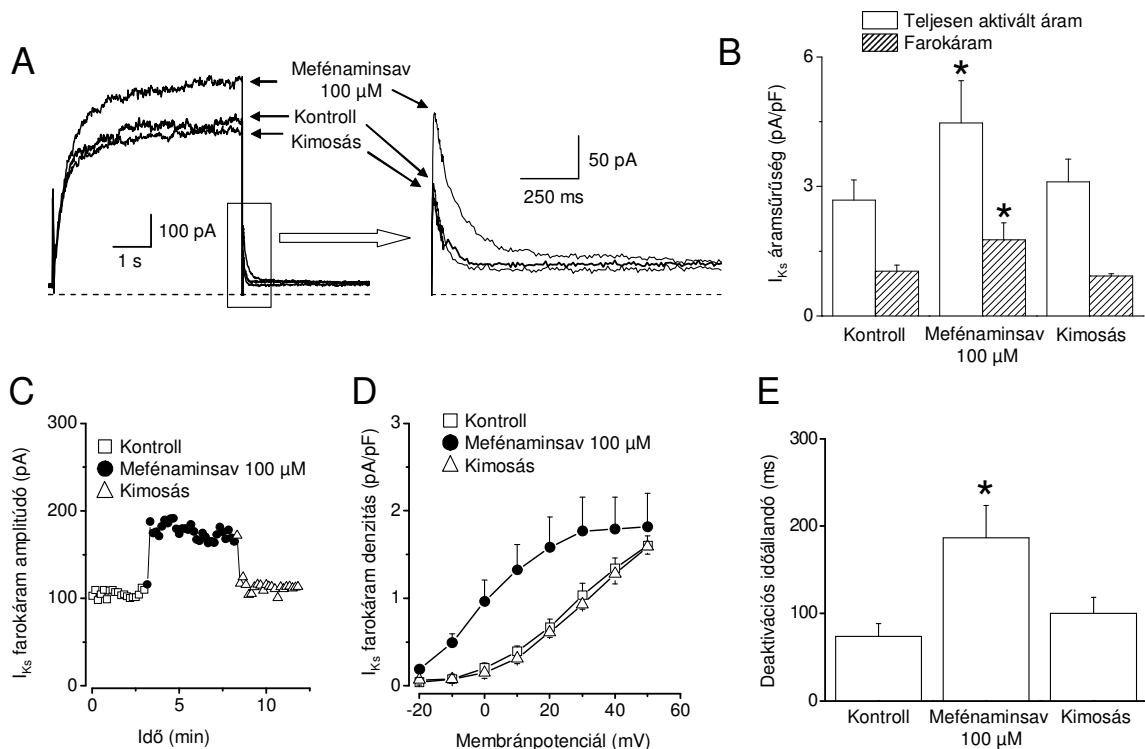
akciós potenciál sorozatot készítettünk. A sorozat egyes elemei csak a plateau fázisuk magasságában (**20. ábra A**), vagy a hosszukban (**20. ábra B**) különböztek egymástól. A szimuláció során a számítógépes program a betáplált akciós potenciálok, és az alkalmazott modell alapján kiszámította az I_{Ks} áram profilját az adott akciós potenciál alatt (**20. ábra C, D**). A plateau fázis amplitúdókat és az APD_{95} értékeket úgy választottuk meg, hogy átfedjenek az isoproterenol, E-4031 és a tonizáló kísérletekben kapott eredményekkel. A szimulált I_{Ks} áramgörbék amplitúdója jelentősen függött a plateau magasságától: a plateau amplitúdójának 72 mV-ról 102 mV-ra történő növelése mintegy négyszeres I_{Ks} amplitúdó növekedést okozott (**20. ábra E**). Az I_{Ks} amplitúdó változott az APD_{95} függvényében is, ám az APD_{95} közel megkétszerezése (180 ms-ról 350 ms-ra növelése) az I_{Ks} maximumát csak mintegy 50 %-kal növelte (**20. ábra F**).

A fenti eredmények szintén arra engednek következtetni, hogy az I_{Ks} aktiválódását elsősorban a plateau magassága határozza meg.

III. Az L-364,373 hatása az I_{Ks} -re kutya bal kamrai szívizomsejteken

Mivel az I_{Ks} áramot — főként kis amplitúdója miatt — nem tudtuk megbízhatóan jellemezni akciós potenciál clamp körülmények között, ezért felvetődött az I_{Ks} farmakológiai felerősítés utáni vizsgálatának lehetősége. Az akciós potenciál clamp méréseknél megszokott, hogy az egyes gátlószerek által okozott ionáramgátlások mértékének figyelembevételével következtetnek a ténylegesen folyó ionáramok nagyságára. Ezért úgy gondoltuk, hogy ugyanezt eljárást alkalmazhatjuk az ionáramok aktiválása során is, természetesen itt az aktiválás mértékére vonatkoztatva a kapott eredményeket.

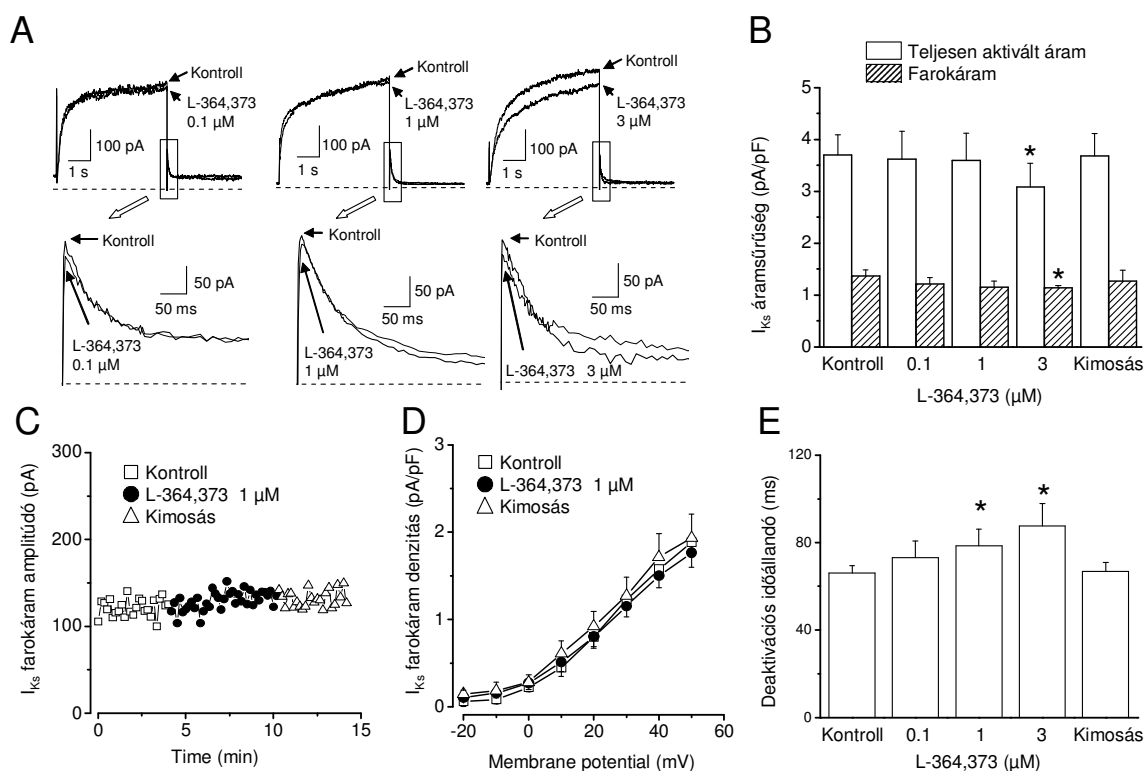
A vizsgálatok elvégzéséhez ideális jelöltnek látszott az L-364,373 anyag. Erről korábban kimutatták, hogy mikromólos koncentrációkban alkalmazva többszörösére növelte az I_{Ks} amplitúdóját tengerimalac és nyúl preparátumokon, valamint *Xenopus* oocytákban expresszált $K_v7.1$ (KCNQ1) csatornákon is. Ahhoz azonban, hogy akciós potenciál clamp körülmények között alkalmazhassuk a szert, meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy az L-364,373 az általunk vizsgálni kívánt kutya bal kamrai szívizomsejteken szintén megnöveli az I_{Ks} amplitúdóját. Ezen kísérletek elvégzéséhez hagyományos feszültség-clamp eljárást használtunk. Ahhoz, hogy az



21. ábra: A mefénaminsav hatása az I_{Ks} áramra kutya kamrai szívizomsejteken. **(A)** Teljesen aktivált I_{Ks} áramok és I_{Ks} farokáramok reprezentatív görbéi. Az áramot +30 mV-on 5 másodpercig aktiváltuk, majd a farokáramokat –40 mV-on regisztráltuk kontroll körülmények között, 5 percig tartó 100 μ M mefénaminsavval történő kezelés után, illetve 5 perces kimosást követően. Szaggatott vonallal a zérus áramot jelöltük. **(B)** Hat myocytán nyert eredmények átlagértékei. **(C)** A mefénaminsav hatásának kifejlődése, illetve visszaállása az idő függvényében. Az ábrán a mért farokáramok amplitúdóit jelöltük, két szomszédos pont időbeli távolsága 10 s. **(D)** Az I_{Ks} aktiválásának feszültségfüggése. Az áramot 5 s hosszan, az abszcisszán feltüntetett membránpotenciálértékeken aktiváltuk, az aktiválást követően kapott farokáramok amplitúdóit az ordinátán jelöltük. **(E)** Az I_{Ks} deaktivációs időállandója kontroll esetben, 100 μ M mefénaminsav jelenlétében és a mefénaminsav kimosása után. Az időállandók értékeit +30 mV-on történő aktiválást követően mért I_{Ks} farokáramok analízise során, a farokáramok lecsengését monoexponenciális függvénnyel illesztve nyertük. Az ábrán látható szimbólumok és oszlopok, illetve a hozzájuk kapcsolódó vonalak a számtani középértéket és a standard hibát jelölik, csillaggal a kontrollhoz képest szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelöltük.

L-364,373 anyag hatását megítélhessük, referenciamolekulaként (pozitív kontrollként) a mefénaminsavat alkalmaztuk.

100 μ M mefénaminsav szignifikánsan növelte mind a +30 mV-on mért teljesen aktivált I_{Ks} áramot ($2,68 \pm 0,47$ pA/pF vs. $4,46 \pm 0,98$ pA/pF), mind az I_{Ks} farokáramok amplitúdóját ($1,04 \pm 0,14$ pA/pF vs. $1,77 \pm 0,39$ pA/pF), melyet a tartópotenciálra visszatérve –40 mV-on mértünk ($n=6$) **(21. ábra B)**. A mérőkád oldatához hozzáadva a mefénaminsavat az I_{Ks} növelő hatás szinte azonnal, egyetlen mérési epizód (20 s) alatt létrejött, és normál Tyrode oldattal történő kimosás során teljesen reverzibilisnek



22. ábra: Az L-364,373 anyag hatásai az alkalmazott koncentrációk (0,1 μM , 1 μM és 3 μM) függvényében kutya bal kamrai szívizomsejteken. Az ábra C és D paneljén kizárólag 1 μM L-364,373 hatásai láthatóak. Az ábrák felépítése a továbbiakban megegyezik a mefénaminsav hatásait bemutató ábrával (ld: **21. ábra**)

adódott (**21. ábra C**). A mefénaminsav hatása feszültségfüggést mutatott: az I_{Ks} farokáramok amplitúdóját kifejezettebben növelte kevésbé pozitív prepotenciálok esetén (**21. ábra D**). Az ábrán is látható, hogy a mefénaminsav I_{Ks} aktiváló hatása az áram feszültségfüggésének negatívabb feszültségértékek irányába történő eltolása révén valósult meg. Az I_{Ks} amplitúdójának növelésén kívül a mefénaminsav 100 μM -os koncentrációban szignifikánsan növelte az áram deaktivációs időállandóját is (**21. ábra E**; 74 ± 15 ms vs. 186 ± 37 ms).

Az L-364,373 anyag hatását 0,1 μM , 1 μM és 3 μM -os koncentrációkban vizsgáltuk ($n=5$; $n=6$; $n=6$). A mefénaminsavval ellentétben az L-364,373 nem növelte sem a teljesen aktivált I_{Ks} áram, sem az I_{Ks} farokáram amplitúdóját az általunk vizsgált membránpotenciál-tartományban (**22. ábra A, B, D**). A teljesen aktivált áramok amplitúdói 3,94 \pm 0,36 pA/pF; valamint 3,62 \pm 0,53 pA/pF; 3,59 \pm 0,53 pA/pF; 3,08 \pm 0,46 pA/pF voltak, rendre normál Tyrode oldatban, illetve 0,1 μM ; 1 μM és 3 μM L-364,373 jelenlétében. A farokáramok amplitúdói a következőképpen alakultak: 1,23 \pm 0,1 pA/pF, illetve 1,21 \pm 0,13 pA/pF; 1,15 \pm 0,12 pA/pF; 1,14 \pm 0,04 pA/pF rendre normál Tyrode oldatban, illetve 0,1 μM ;

1 μM és 3 μM L-364,373 alkalmazása során. A kapott eredményeket statisztikailag elemezve azt kaptuk, hogy az L-364,373 anyag I_{Ks} áramamplitúdókat csökkentő hatása a 3 μM -os koncentráció esetén szignifikáns volt (**22. ábra B**). Mindezek mellett az L-364,373 anyag a mefénaminsavhoz hasonlóan, szintén lassította az áram deaktivációját. A deaktivációs időállandókat rendre 66 ± 3 ms-nak, illetve 73 ± 8 ms-nak; 78 ± 8 ms-nak és 87 ± 10 ms-nak mértük normál Tyrode oldatban, illetve 0,1 μM ; 1 μM és 3 μM L-364,373 anyag jelenlétében (**22. ábra E**).

Megbeszélés

Az egyes káliumáramok szerepe a kutya bal kamrai munkaizomsejtek repolarizációjában mindmáig nem tisztázott pontosan. Munkánk során négy, a kutya kamrai szívizomsejteken megtalálható káliumáram (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) akciós potenciál repolarizációjában játszott szerepét jellemeztük. Ezek közül három (I_{to} , I_{Kr} , I_{K1}) áram profilját maradéktalanul meg tudtuk jeleníteni akciós potenciál clamp technikával. Ez a technika a legalkalmasabb az áramok tényleges akciós potenciál alatti lefutásának megítélésére a fiziológiához leginkább közelítő körülmények miatt. Továbbá megvizsgáltuk az egyes ionáramok frekvenciafüggő sajátosságait is, hogy a repolarizációban betöltött szerepüket még pontosabban meghatározhassuk.

I. Káliumáramok lefutása a kamrai akciós potenciál során

A jelen munka jelentőségét az adja, hogy először mi írtuk le pontosan az I_{to} , I_{Kr} és I_{K1} akciós potenciál alatti megjelenését kutya bal kamrai szívizomsejteken, valamint parametrikusan is jellemeztük ezeket az áramokat. A három áram közül kettő (nevezetesen az I_{Kr} és I_{K1}) erősen befelé egyenirányuló karakterű. Emiatt a hagyományos, négyszögimpulzusokkal végzett feszültség-clamp mérésekből csak nagyon bizonytalanul, esetleg matematikai modellezéssel lehet egy tényleges akciós potenciál alatt kialakuló tulajdonságaikra következtetni.

Az I_{Ks} áramot akciós potenciál clamp technika alkalmazásával nem tudtuk kielégítően megítélni, így ennél az áramnál az I_{Ks} szelektív gátlószerének segítségével próbáltunk következtetni az áram repolarizációban betöltött szerepére.

Az I_{Kr} általunk 1 Hz-es ingerlőfrekvencián akciós potenciál clamp módszerrel mért átlagosan 0,62 pA/pF nagyságú amplitúdója (**13. ábra**) hasonló nagyságú a korábban már Hua és munkatársai által szintén kutya myocyták esetén kapott 0,55 pA/pF-os értékhez [62], ám kisebb, mint a tengerimalacokon eddig leírt 0,86 pA/pF nagyságú [120] áramcsúcs. Jelen kísérletek során az I_{K1} maximuma ($1,8 \pm 0,1$ pA/pF 50 μ M $BaCl_2$ alkalmazásával; **14. ábra**) is kisebb volt, mint amiket a tengerimalac modelleket használók leírtak (2,7 pA/pF 1 mM $BaCl_2$ jelenlétében [196], illetve 514 pA 15 mM CsCl használatával [66]). Az azonban feltétlenül említést érdemel, hogy az előbbi esetben a $BaCl_2$ koncentrációja húszszorosa volt az általunk

alkalmazottnak. A céziumról pedig kimutatták, hogy aktiválja a PKA-t [16], így megnöveli az I_{K1} amplitúdóját, tehát az Ibarra és munkatársai által végzett mérések [66] valószínűleg túlbecsülték az I_{K1} áram nagyságát. Az I_{K1} áramban tapasztalható különbségeken túl tengerimalacokban nagyobb a plateau fázis során folyó $I_{Ca,L}$, mint kutyákban [88 illetve 6]. Ezek alapján megállapítható, hogy a kutya szívizomsejtek a plateau fázis során kisebb transzmembrán áramokkal dolgoznak, mint a tengerimalacok cardiomyocytái. Így a plateau fázis alatti finom elektromos egyensúly kevesebb energia befektetésével valósulhat meg kutyákban.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy mind az I_{Kr} , mind az I_{K1} fokozatosan növekedett, ahogy a membrán a plateau fázis után egyre inkább repolarizálódott. Az I_{Kr} 7 ms-mal a V_{max}^- időpontja előtt, $-54,2 \pm 1,7$ mV-os membránpotenciál-értéken (**13. ábra E**), míg az I_{K1} 1 ms-mal a V_{max}^- után, $-58,3 \pm 0,6$ mV-on (**14. ábra D**) érte el maximumát. Megfigyeléseink alapján tehát valószínű, hogy az I_{Kr} felgyorsítja a repolarizáció végső szakaszát, és ezzel mintegy „triggereli” az I_{K1} áramot. Az a szűk membránpotenciál-tartomány, ahol az I_{Kr} és I_{K1} elérte maximumát szintén azt sugallja, hogy a két áram aktiválódását inkább a membránpotenciál irányítja, mint valamely időfüggő tényező. A repolarizáció végső fázisának ezzel a pozitív visszacsatolási mechanizmusával összhangban a repolarizáció legnagyobb sebességének időpillanatában a nettó membránáram mintegy egynegyedét az I_{Kr} , a fennmaradó háromnegyedét pedig az I_{K1} szolgáltatta. Hasonló eredményekre jutott Gintant [49], amikor az akciós potenciál repolarizációját rámpa protokollok segítségével szimulálta. Az I_{K1} áram maximális értéke és a V_{max}^- közötti korreláció alapján (**14. ábra E**) kijelenthetjük, hogy a repolarizáció legnagyobb sebességét elsősorban az I_{K1} határozza meg kutya kamrai szívizomsejteken.

Érdekes módon azonban nem találtunk összefüggést egyetlen általunk vizsgált ionáram nagysága és az akciós potenciál hosszúsága között, ami többféle módon magyarázható. Egyrészt valószínű, hogy a repolarizáció kezdetét nem egyetlen ionáram, hanem a plateau fázis során folyó ionáramok elektromos egyensúlya együttesen határozza meg. Másrészt a plateau fázis során és a repolarizáció kezdetekor folyhatnak olyan áramok, melyek csatornafehérjéit molekuláris biológiai módszerekkel már kimutattak a szívizomsejtek membránjában, azonban ezeket elektrofiziológiai szempontból még mind a mai napig nem sikerült kellően jellemezni (például transzmembrán klorid áramok) [63].

Bár a három általunk vizsgált ionáram által szállított töltésmennyiség hasonló nagyságrendű volt (I_{t0} : $29,7 \pm 2,5$ fC/pF; I_{Kr} : $57,6 \pm 6,7$ fC/pF; I_{K1} : $61,6 \pm 6,2$ fC/pF), az akciós potenciál során játszott szerepük jelentősen különbözőnek tűnik.

Megfigyeléseink szerint a vizsgált áramok az akciós potenciál során egymást követően aktiválódnak, és az akciós potenciál eltérő részein biztosítják a kifelé irányuló, repolarizáló áramot. Eredményeink alapján az I_{t0} a korai repolarizáció során, az I_{Kr} a plateau fázis közepétől kezdődően a végső repolarizáció triggereléséig, az I_{K1} pedig a repolarizáció teljessé tételében játszik szerepet.

Az I_{t0} az akciós potenciál felszálló szára után gyorsan aktiválódik és a plateau fázis legelején aktív, és meghatározza a korai repolarizáció kialakulását (**12. ábra D**). Mivel azonban gyorsan, 7,4 ms-os időállandóval lecseng, szinte kizárható, hogy a végső repolarizációban az I_{t0} bármilyen szerepet is játszana (**12. ábra E**). Hasonló megfontolás alapján nem valószínű, hogy az I_{t0} befolyásolhatná az akciós potenciál hosszát. Sun és munkatársai is erre világítottak rá elegáns dinamikus clamp kísérletsorozatukban [155]. Vizsgálataik során kutya bal kamrájából származó subendocardialis sejtekbe „illesztették” az I_{t0} áramot, amely következtében a sejteken megjelent a subepicardialis myocytákra jellemző „tüske és dóm” akciós potenciál morfológia, ám az akciós potenciálok hosszúsága nem változott. Ez egybevág több korábbi matematikai modellezéssel nyert vizsgálati eredménnyel is [47, 117, 185], bár megjegyzendő, hogy akadt olyan tanulmány is, melyből az I_{t0} akciós potenciált nyújtó hatását vezették le [65]. A fenti megfontolások, illetve az idézett közlemények eredményei miatt az I_{t0} késői repolarizációban betöltött szerepét nem elemeztük tovább.

A késői káliumáram lassú komponensének (I_{Ks}) akciós potenciál clamp technikával történő megítélésére vonatkozó kísérleteink technikai nehézségek miatt nem hoztak megfelelően értelmezhető eredményt. Az áram kicsiny amplitúdója, amely a kísérleti elrendezés zajszintjének mindössze 3-szorosa volt, nem tette lehetővé az áram akciós potenciál alatti lefutásának precíz megítélését (**13. ábra D**). Problémásnak látszott az is, hogy az akciós potenciál clamp körülmények között megjelenített I_{Ks} és I_{Kr} áramgörbék időbeli lefutása szinte teljesen megegyezett, különbséget csak a két áram értékében láttunk. Az I_{Ks} áramprofilnak azonban elméleti megfontolások, saját matematikai modellkísérleteink, illetve más szerzők által megjelenített mérési eredmények [164] alapján ettől jelentősen eltérőnek kellett volna mutatkoznia. Ez alapján felmerül annak a lehetősége is, hogy a chromanol nem

teljesen szelektív I_{Ks} gátlószer. A fentiek miatt — a többi káliumárammal ellentétben — az I_{Ks} -t nem jellemeztük akciós potenciál clamp körülmények között végzett kísérletsorozatunkban.

Az I_{Kr} és I_{K1} áramokra vonatkozóan azt láttuk, hogy a plateau fázis közepén folyó nettó transzmembrán áram ($I_{net}=C_m \cdot dU/dt$) közel azonos az ugyanekkor mérhető I_{Kr} és I_{K1} áramok összegével (lásd: **13. ábra és 14. ábra C** panelek). Ez valószínűleg nem azt jelenti, hogy ekkor nem folyik más ionáram, hanem azt, hogy a többi ekkor jelen levő kifelé és befelé irányuló áram nagyjából kiegyenlíti egymást.

Az akciós potenciál clamp kísérletek során jól megjeleníthetőek az egyes ionáramok akciós potenciál alatt folyó tényleges profiljai, amennyiben egy megfelelően szelektív gátlószer áll rendelkezésünkre, amellyel teljes gátlás elérhető. Mindkét követelménynek azonban kizárólag az I_{Kr} gátlására használt E-4031 felelt meg az általunk alkalmazott szerek közül. Sajnos sem a 4-aminopyridin, sem a $BaCl_2$ nem teljesen specifikus abban a koncentrációban, amely már teljes I_{to} illetve I_{K1} gátlást okoz.

Ilyen esetben a legjobb stratégia, ha alacsonyabb, még éppen szelektívnek ítélt koncentrációk alkalmazásával elkerüljük az egyéb áramokkal történő kontaminációt, mint ahogy azt a jelen kísérletek során is láthattuk. $50 \mu M$ $BaCl_2$ az I_{K1} 88 %-át gátolja -58 mV-os membránpotenciálon [141], ott, ahol mi az áram csúcsértékét észleltük a repolarizáció során. Az I_{to} gátló 4-aminopyridint 1 mM-os koncentrációban használtuk, mely nagyjából 70 %-os gátlást okoz. Emiatt ha a tényleges áramértékeket szeretnénk tudni, az I_{to} esetén nagyjából 1,14-szoros, míg az I_{K1} esetén mintegy 1,43-szoros szorzófaktorot kell alkalmaznunk. Méréseink alapján a 4-aminopyridin 1 mM-os koncentrációban elég szelektív, mivel a 4-aminopyridin-érzékeny áram diagramján a plateau fázis kezdete után végig nulla áram folyt, tehát 1 mM 4-aminopyridin nem befolyásolta az akciós potenciál végső repolarizációja során maximumot mutató I_{Kr} , illetve I_{K1} áramot.

Az akciós potenciál hosszúságának frekvenciafüggő tulajdonsága régóta foglalkoztatja az elektrofiziológiával foglalkozó kutatókat. A frekvenciafüggő sajátságokat legtöbbször az akciós potenciált kialakító ionáramok frekvenciafüggésével próbálják magyarázni. Eredményeink szerint sem az I_{Kr} sem az I_{K1} nem volt frekvenciafüggő az általunk vizsgált $0,2$ Hz– $1,66$ Hz-es tartományban (**15. ábra A, B**). Ez nem meglepő az I_{K1} vonatkozásában, ám az I_{Kr} lassú deaktivációs kinetikája alapján joggal feltételezték, hogy ez az ionáram hozzájárul az

akciós potenciál gyorsabb ingerlés során tapasztalt rövidüléséhez [120]. Saját kísérleteink alapján azonban azt a következtetést kell levonnunk, hogy — lassú deaktivációja ellenére — az I_{Kr} nem akkumulálódik. Ezt azért jelenthetjük ki, mert az I_{Kr} farokáramok amplitúdója nem függött a farokáram aktiválásához közvetlenül felhasznált impulzus és az azt megelőző depolarizáló jel közötti időintervallumtól (**15. ábra D**). Feltehetően az okozza az I_{Kr} akkumulációjának hiányát, hogy az akciós potenciál teljes repolarizációja után esetlegesen nyitvamaradó $K_v11.1$ csatornák inaktiválódnak a következő akciós potenciál felszálló szára alatt.

Korábbi $K_v11.1$ csatornákat expresszálo HEK sejteken végzett megfigyelések alapján az I_{Kr} tág ingerlési frekvencia tartományban sem mutatott frekvenciafüggést [9]. Kutyaszív bal kamrájából származó subendocardialis cardiomyocytákon Hua és munkatársai sem tudtak kimutatni szignifikáns frekvenciafüggő változásokat az I_{Kr} vonatkozásában 2 Hz-nél lassabb ingerlés esetén, ám 3,3 Hz-nél gyorsabb ingerlés során az I_{Kr} maximális értéke csökkent, míg a diastole során folyó I_{Kr} esetén növekedést tapasztaltak [62].

Az I_{K1} farokáramok kapcsán is kimutatták, hogy nagyobb ingerlési frekvencián módosulnak, ám ezek a változások 0,3 s-on belül visszaálltak az eredeti értékre [143]. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy az akciós potenciálok hosszúságának frekvenciafüggő változásáért nem az I_{Kr} vagy az I_{K1} , hanem más ionáram(ok) tulajdonságaiban bekövetkező változások tehetők felelőssé. Feltétlenül említést érdemel azonban, hogy az APD_{90} és a plateau közepén folyó nettó membránáram között szoros összefüggést találtunk (**15. ábra E, F**).

Összességében megállapíthatjuk, hogy a jelen kísérleteink szerint sem az I_{Kr} , sem az I_{K1} nem mutatott frekvenciafüggő változást 0,2–1,66 Hz-es ingerlés során. Ez azt jelenti, hogy ennek a két ionáramnak — az I_{to} -val és az I_{Ks} -sel együtt — csekély lehetősége lehet a kamrai munkaizomsejtek akciós potenciál hosszúságának befolyásolásában normál vagy alacsony szívfrekvenciák esetén.

II. Az I_{Ks} hozzájárulása a repolarizációhoz

A szakirodalomban mindmáig vitatott kérdés, hogy az I_{Ks} hozzájárul-e, és ha igen, akkor mennyiben a kutya kamrai myocyták repolarizációjához. Több tanulmány eredménye szerint az I_{Ks} normál körülmények között nem vesz részt a kutya kamrai szívizomsejtek repolarizációjában [84, 164], melyet az áram túlságosan lassú

aktivációjával és viszonylag gyors deaktivációjával magyaráznak. Saját eredményeink alapján azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy az I_{Ks} fiziológias körülmények között is hozzájárul a kutya bal kamrai szívizomsejtek repolarizációjához. Ezt az alapján jelenthetjük ki, hogy a chromanol — bár kismértékű, de — statisztikailag szignifikáns akciós potenciált nyújtó hatással bírt kísérleteink során 0,5 Hz-nél nagyobb ingerlési frekvenciákat alkalmazva (**16. ábra**).

Kimutattuk továbbá, hogy az I_{Ks} repolarizációban való részvételét elsősorban a plateau fázis magassága (membránpotenciálértéke) határozza meg. Alátámasztottuk a chromanol akciós potenciál hosszúságot növelő hatásának felerősödését isoproterenol illetve E-4031 jelenlétében (**17. ábra**), mely megerősíti néhány korábbi vizsgálat eredményeit [71, 172].

Az I_{Ks} normál kamrai repolarizációhoz történő hozzájárulását vitató tanulmányok mindegyikében szintén megfigyelték az I_{Ks} gátlására alkalmazott szerek (chromanol-293B, HMR-1556, és L-735,821) akciós potenciál nyújtó hatását, azonban ezt a hatást a szerzők nem találták szignifikánsnak [84, 164, 172]. Az általunk elvégzett mérések alapján ez az akciós potenciált nyújtó hatás szignifikánsnak bizonyult, bár kétségtelen, hogy mindössze $9,2 \pm 3,5$ ms volt az APD_{90} esetén. Másrészt viszont bármely, a plateau fázis magasságát növelő beavatkozás (isoproterenollal, illetve E-4031-gyel történő előkezelés, valamint befelé irányuló áramimpulzusok alkalmazása) drámaian megnövelte a chromanol által okozott akciós potenciál hosszabbodást (**17. ábra D**). Ezeket az eredményeket alátámasztottuk matematikai szimulációkkal is, melyek alapján a plateau amplitúdóját 72 mV-ról 107 mV-ra növelve (ami -80 mV-os nyugalmi membránpotenciált feltételezve abszolút értékben -8 mV-ról $+27$ mV-ra növelné a plateau magasságát) megközelítőleg négyszeres növekedést tapasztaltunk az I_{Ks} áram maximumértékében. A **20. ábra** mutatja, hogy a plateau magasságának változása tisztán az I_{Ks} feszültségfüggő aktiválódását befolyásolja, és ez megmagyarázhatja a témakörben fellelhető vizsgálatok oly eltérő következtetéseit. Így például egy tengerimalac kamrai szívizomsejtben a plateau abszolút potenciálja akár $+30$ mV-nál is nagyobb lehet, míg kutya Purkinje sejtekben ugyanez az érték akár a negatív feszültségtartományba is eshet. Ennek megfelelően az előbb említett két preparátum esetén jelentős különbségeket tapasztaltak I_{Ks} gátlószer alkalmazása során. Míg Bosch és munkatársai az I_{Ks} gátlás kifejezett akciós potenciál hosszúságot növelő hatását írták le tengerimalac kamrai sejteken [12], addig Varró és munkatársai kutya

Purkinje sejteken gyakorlatilag nem tapasztaltak akciós potenciál hosszúság változást [164]. Saját, kutya kamrai munkaizomsejteken végzett kísérleteink során a plateau potenciál +10 mV környékén volt, ami jól magyarázza a chromanol által kifejtett szignifikáns, ám mérsékelt akciós potenciált nyújtó hatást. Nakashima és munkatársai szintén hasonló következtetésre jutottak, ugyanis β -adrenerg receptor gátlás alkalmazása és az I_{Ks} egyidejű gátlásának hatására elhúzódó kamrai repolarizációt figyeltek meg [107].

A chromanol által indukált APD nyúlás és a plateau fázis magassága között erős korrelációt találtunk ($r=0,902$; $r=0,937$; $r=0,954$ rendre isoproterenol; E-4031 és befelé irányuló tonizáló áramok esetén; **18. ábra A, B** és **19. ábra D**). Ezzel szemben szinte semmi összefüggés nem mutatkozott a chromanol akciós potenciált meghosszabbító hatása és az APD_{95} között (a korrelációs együtthatók rendre 0,119; 0,424 és 0,401 voltak; **18. ábra C, D** és **19. ábra E**). Ez látszólag ellentétes a matematikai modell segítségével kapott lineáris összefüggéssel.

Az ellentmondást azzal tudjuk feloldani, ha meggondoljuk, hogy az *in vitro* kísérletek során kismértékben bár, de kétségtelenül ingadozott mind az akciós potenciálok hossza, mind az akciós potenciálok plateau fázisainak amplitúdója. Ezzel szemben az *in silico* modellezés során kizárólag az akciós potenciál egyik paraméterét változtattuk. Így ha elfogadjuk az *in silico* kísérletek alapján kapott összefüggéseket, az bizonyos, hogy az APD_{95} és az I_{Ks} amplitúdója közötti korrelációt sokkal nehezebb lesz *in vitro* kimutatni az összefüggés kisebb meredeksége miatt. Ez tehát azt jelenti, hogy az APD_{95} és az I_{Ks} amplitúdója között lehet összefüggés, de elképzelhető, hogy a szívizomsejtek plateau fázis magasságának véletlenszerű ingadozása miatt az általunk elvégzett *in vitro* kísérletek ezt az összefüggést nem tudták megjeleníteni.

Varró és munkatársai a chromanol által okozott akciós potenciál nyúlás felerősödését figyelték meg, amennyiben az akciós potenciált előzőleg veratrin vagy E-4031 előkezeléssel hosszabbították meg, így sejtetve az akciós potenciál eredeti hosszának szerepét a chromanol-indukált nyújtó hatásban [164]. Mivel azonban a veratrinról és az E-4031-ről is ismert, hogy növelik a plateau fázis amplitúdóját, nem zárhatjuk ki ennek szerepét sem a szerzők által megfigyelt chromanol-indukált nyújtó hatásban. Az is említésre méltó továbbá, hogy saját kísérleteink során a legkifejezettebb chromanol-indukált akciós potenciál nyúlást éppen E-4031 jelenlétében láttuk (**17. ábra D**), annak ellenére, hogy az E-4031 jóval kevésbé

emelte a plateau magasságát, mint például az isoproterenol. Ez a megfigyelés alátámaszthatja az akciós potenciál hosszának szerepét az I_{Ks} aktiválásában.

Figyelembe véve azonban az APD_{95} és a chromanol-indukált APD növelés közötti gyenge korrelációt, valószínűbbnek tűnik, hogy az I_{Kr} gátlása megnövelte az I_{Ks} relatív hozzájárulását a repolarizációhoz, és emiatt hozhatott létre a chromanol olyan kifejezett akciós potenciál nyúlást E-4031 jelenlétében. Ennek értelmében az I_{Ks} — ha nem is járul hozzá olyan jelentősen a normál körülmények közötti repolarizációban — mintegy „repolarizációs tartalékot” képez, ahogy azt már több közlemény is felvetette [11, 121, 122]. Tehát ha a repolarizáció túlzottan elhúzódna, az I_{Ks} már elegendő mértékben aktiválódhat ahhoz, hogy megrövidítse az akciós potenciált. Emiatt valószínűsíthetjük, hogy a chromanol által indukált akciós potenciál nyúlás jelentékenyebb lesz bármely olyan állapotban, amikor a repolarizációs tartalék csökkent [11].

Hasonló logikával látható be a chromanol által indukált akciós potenciál nyúlás fordított frekvenciafüggése is (**17. ábra D**). Rocchetti és munkatársai tengerimalac kamraizomsejteken az I_{Kr} frekvenciafüggő akkumulációját tapasztalták, és ezért felvetették az I_{Kr} repolarizációban játszott jelentősebb szerepét gyorsabb szív működés esetén [120]. Saját, kutya kamrai myocytákon nyert adataink azonban ennek ellentmondanak, ugyanis az I_{Kr} nem volt frekvenciafüggő az általunk vizsgált 0,2 Hz–1,66 Hz-es tartományban (**15. ábra A**). Mivel az I_{Ks} 500 ms-nál nagyobb ciklushosszok esetén nem akkumulálódik kutya kamrai myocytákban [153], így az I_{Ks} -nek szintén megkérdőjelezhető a szerepe a nagyobb szívfrekvenciákon tapasztalt rövidebb akciós potenciálok kialakításában.

Mivel a szívizomsejtek akciós potenciáljának kialakításában sok befelé és kifelé irányuló áram együttesen vesz részt, ezért bármely, a plateau fázis magasságának növelését okozó manipuláció bizonyosan több, a repolarizációban szerepet játszó ionáram tulajdonságait is megváltoztatja. A késői káliumáram komponenseinek (I_{Kr} , I_{Ks}) növelésén kívül például egyidejűleg az L-típusú kalciumcsatornákon keresztül lejátszódó kalciumbelépés hajtóereje is csökken a plateau fázis potenciáljának növekedésével. Így az $I_{Ca,L}$ csökkenése miatt kisebb befelé irányuló áram folyik, ami szükségszerűen a nettó ionáramot eltolja a kifelé irányuló áramok irányába. A kifelé irányuló áramok kifejezettebbé válása pedig megnöveli a repolarizációs rezervet. Ennek épp az ellenkezője várható isoproterenol jelenlétében, ugyanis β -adrenerg hatás során a kalciumáram jelentősen növekszik. Ezekon kívül még több más

ionáram tulajdonságai is függhetnek a plateau fázis magasságától, amiket figyelembe véve tovább módosulhat a korábbi, kizárólag az I_{Ks} szerepére koncentrált értékelés.

II.1. Klinikai vonatkozások

Az I_{Ks} áramot szelektíven gátló anyagok (például az általunk is alkalmazott chromanol-293B) fejlesztéséhez nagy reményeket fűztek, mert úgy gondolták, hogy kevésbé kifejezett az arrhythmogén hatásuk, mint az I_{Kr} gátlószereinek. Ezt az elképzelést arra alapozták, hogy az I_{Ks} gátlószereinek hatásában talán kevésbé nyilvánul meg a klinikai szempontból igen kedvezőtlen fordított frekvenciafüggő tulajdonság, ami a tisztán I_{Kr} -t blokkoló anyagokat egytől-egyig jellemzi [60, 72]. Azonban az általunk végzett kísérletekből — sok más, hasonló eredményt felmutató vizsgálattal együtt [12, 172]— az derül ki, hogy a helyzet nem egészen felel meg a fenti optimista várakozásoknak.

A jelen tanulmányban a chromanol hatását két, főként kóros esetekben fennálló állapotban is teszteltük. Az isoproterenolt alacsony koncentrációban (2 nM) alkalmazva a fokozott szimpatikus tónushoz hasonló környezetet igyekeztünk teremteni. A szimpatikus tónus növekedése megfigyelhető több kardiológiai kórállapotban is, így például a magasvérnyomás-betegség, az angina pectoris, vagy éppen a szívinfarktus. Eredményeink azt mutatták, hogy a chromanol akciós potenciált nyújtó hatása (ami tulajdonképpen az elvárt III. osztályú antiarrhythmias működés) jelentősen kifejezettebb volt isoproterenol jelenlétében. Ez a tény — az I_{Ks} normál repolarizáció során játszott alárendelt szerepe ellenére — annak a lehetőségét vetíti előre, hogy *in vivo* jelentősen nagyobb mértékű akciós potenciál nyújtó hatása lehet a chromanolnak, különösképp fokozott szimpatikus tónussal járó esetekben. Ehhez hasonló következtetésre jutottak Volders és munkatársai [172], valamint Jost és munkatársai [71] kutya, illetve humán kamraizomzatot tanulmányozva. Ezzel a megállapítással vitába lehet szállni, mondván, hogy az I_{Ks} gátlása mégis hasznos lehet klinikailag, mert a nagyobb szimpatikus izgalom önmagában is rövidíti az akciós potenciált, amit az I_{Ks} gátlás csak ellensúlyoz, és így meghosszabbítja a refrakter periódust. Bár az I_{Ks} gátlók valóban csökkentették a repolarizáció diszperzióját szívelégtelenségben szenvedő kutya modellekben [113], ám az I_{Ks} gátlószereit β -adrenerg stimulációt követően alkalmazva az akciós

potenciálok hosszúságának heterogenitását és következményes arrhythmia kialakulását írták le [142].

Az I_{Kr} gátló E-4031 alkalmazásával a csökkent repolarizációs tartalékú kamraizomzat modellezése volt a célunk. A repolarizációs rezerv csökkenését több öröklött (például a bizonyos ioncsatornák mutációjával járó veleszületett hosszú QT szindrómák), és szerzett kórkép (elektrolitzavarok, gyógyszerek mellékhatása) is okozhatja [124]. A helyzetet bonyolítja, hogy a csökkent repolarizációs tartalék sokszor rejtett marad, és — például egy további repolarizáló ionáramot (terápiás céllal, vagy mellékhatásként) gátló gyógyszer adása során — csak egy manifeszt ritmuszavar következtében derül rá fény. Az egyébként is csökkent repolarizációs rezervet tovább ronthatják az I_{Ks} gátlószerei, így drámaian megnövelve a torsade de pointes típusú arrhythmia kialakulásának lehetőségét [39]. Amennyiben az I_{Ks} blokád alacsony szívfrekvencia esetén, vagy a szimpatikus aktivitás növekedésekor (esetleg részlegesen már egyébként is gátolt I_{Kr} mellett) következik be, az arrhythmia létrejötte, és így a végzetes kimenetel is mind valószínűbbé válik. Ezek alapján mi úgy véljük, hogy az I_{Ks} gátlása jelentős proarrhythmias veszélyt rejthet magában. Összegzésül tehát elmondhatjuk, hogy az I_{Ks} gátlás, mint kezelési lehetőség inkább tűnik károsnak, mint hasznosnak, jóllehet a döntő klinikai vizsgálatok még tisztázhatják az I_{Ks} gátlásának terápiás hasznát [33].

III. Az L-364,373 nem növeli az I_{Ks} -t kutya kamrai szívizomsejteken

Korábban láttuk, hogy az I_{Ks} áramot — főként kis amplitúdója miatt — nem tudtuk megbízhatóan jellemezni akciós potenciál clamp körülmények között. Ezért megvizsgáltuk, hogy egy I_{Ks} aktivátor molekulával (L-364,373) fel tudjuk-e úgy erősíteni a vizsgálni kívánt áramot, hogy az lehetővé tegye az akciós potenciál clamp körülmények között történő mérést.

A kísérletsorozat legfőbb következtetése az volt, hogy az L-364,373 anyag még 3 μM -os koncentrációban sem növelte az I_{Ks} áramot kutya kamrai myocytákon (22. ábra). Ez éles ellentétben áll a korábbi, nyúl, illetve tengerimalac preparátumokon tapasztaltakkal, ahol az L-364,373 már 0,1–1 μM -os koncentrációban is jelentősen növelte az I_{Ks} áramot azáltal, hogy az áram aktivációjának feszültségfüggését negatívabb membránpotenciálok felé tolta [128, 186]. Így az L-364,373 molekulát a

továbbiakban nem tudtuk felhasználni az I_{Ks} felerősítésére a tervezett akciós potenciál clamp mérésekhez.

Ezzel szemben a mefénaminsavval kapcsolatos vizsgálataink során az I_{Ks} hasonló jellegű változását észleltük, mint amit expressziós rendszerekbe klónozott $K_v7.1$ csatornákon leírtak [2, 17, 18, 161]. A mefénaminsav -26 mV-tal balra, tehát negatívabb feszültségértékek felé tolta az I_{Ks} aktivációjának görbét (**21. ábra**). Ez összevethető azzal a -24 mV-os eredménnyel, amit korábban tengerimalac preparátumon az L-364,373 anyagról leírtak [128], ám jelentősebb mértékű a nyúl cardiomyocytáin kapott $-10,6$ mV-nál [186]. Összehasonlításképp 50 nM isoproterenol $-8,1$ mV-tal tolta negatívabb irányba az I_{Ks} aktiválódásának feszültségfüggését leíró függvényt, és az I_{Ks} farokáramok amplitúdóját több, mint kétszeresére növelte. (Saját, kutya bal kamrájából származó izolált szívizomsejteken kapott, közleményben eddig meg nem jelent eredmények szerint. Az I_{Ks} farokáramokat 4 másodpercig tartó $+50$ mV-os aktiváló négyszögimpulzust követően -40 mV-on mértük.)

Az számunkra sem tisztázódott még, hogy mi lehet annak a molekuláris háttere, hogy az L-364,373 nem aktiválja az I_{Ks} áramot. A mefénaminsavról kimutatták, hogy kizárólag akkor növelte az I_{Ks} -t, ha az áramot létrehozó csatorna pórusformáló α alegységét ($K_v7.1$, KCNQ1) a szabályozásért felelős β alegységgel (MinK, KCNE1) együtt expresszáltatták [2, 17]. Ehhez hasonló eredményekről számoltak be dodekanoáttal folytatott kísérletekben is [35]. Ezekkel a megfigyelésekkel ellentétben az L-364,373 anyag a heteromultimer csatorna összeszerelődését lehetővé tevő, KCNQ1 és KCNE1 gént is tartalmazó expressziós rendszerben nem mutatkozott hatásos I_{Ks} aktivátornak [128]. Bár mind a mefénaminsav, mind az L-364,373 a pórusformáló $K_v7.1$ alegységhez kötődik, a két különböző kötőhelyet másképp befolyásolja a MinK-val történő kapcsolódás. Emiatt a fajok közötti eltérő $K_v7.1$ /MinK arány talán magyarázhatja az általunk kapott eredményeket. Ugyanerre mutatnak a korábban már említett nyúlból, illetve tengerimalacból származó L-364,373 anyagra vonatkozó megfigyelések is. Salata és munkatársai [128] $0,1$ μ M L-364,373 jelenlétében az I_{Ks} amplitúdójának négyszeres növekedését észlelték tengerimalacban, a maximális aktiváló hatás (1 μ M esetén) pedig mintegy tizenötszörösnek (!) adódott [128, 3. ábra b panel]. Ezzel ellentétben nyúl preparátumokon [186] a 1 μ M L-364,373 sokkal gyengébb hatását tapasztalták, így ennél kisebb koncentrációkat nem is alkalmaztak [186, 1. ábra]. Az a lehetőség, hogy

az L-364,373 nem kötődne a $K_v7.1$ fehérjéhez kutya szívmusclejeken eredményeink alapján kizárható, hiszen mind az L-364,373, mind a mefenaminsav megnövelte az I_{Ks} deaktivációs időállandóját a jelen kísérleti elrendezésben.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az L-364,373 humán gyógyászatban történő felhasználása az eddig rendelkezésre álló adatok alapján igencsak megkérdőjelezhető. Az biztos azonban, hogy a rágcsáló modellek nem alkalmasak a szer potenciális terápiás hasznának megítélésére. Elképzelhető, hogy — az emlős fajok közötti jelentős elektrofiziológiai különbségek megléte miatt — az I_{Ks} aktivátorok humán preparátumokon történő vizsgálata is szükségessé válhat a későbbiekben.

Összefoglalás

A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja alatt folyó káliumáramok részt vesznek a sejtmembrán repolarizációjában, azonban az egyes áramok pontos szerepét még nem sikerült tisztázni. Ezt a témakörben fellelhető tanulmányok sokasága ellenére az okozza, hogy a hagyományos feszültség-clamp körülmények között végzett vizsgálatokból csak feltételezéseket tehetünk az akciós potenciál alatt ténylegesen folyó káliumáramok profiljára.

Kísérleteink célja a kutya bal kamrai szívizomsejtekben megtalálható négy káliumáram (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) repolarizációban játszott pontos szerepének tisztázása volt. Ezt elsősorban az élettani viszonyokat leginkább tükröző akciós potenciál clamp körülmények között kívántuk elvégezni. Továbbá vizsgálni kívántuk az egyes ionáramok frekvenciafüggő sajátosságait is.

Vizsgálatainkhoz a patch-clamp egészsejtes elrendezésének feszültség-clamp és akciós potenciál clamp módszerét, konvencionális mikroelektróda-technikát és matematikai modellezést alkalmaztuk. Valamennyi in vitro mérésünket kutyák bal kamrájából enzimatikusan izolált szívizomsejteken végeztük.

Eredményeink alapján az I_{to} kizárólag az akciós potenciál kezdetén, 20–30 ms ideig aktív, és a korai repolarizáció létrehozásáért felelős. Az I_{to} nem vesz részt az akciós potenciál hosszának meghatározásában. Az I_{Kr} folyamatosan növekedik a plateau fázis során, és maximumát röviddel a repolarizáció legnagyobb meredeksége előtt éri el, mintegy triggerelve az I_{K1} csúcsának létrejöttét. Az I_{K1} a diastole alatt is aktív, azonban az akciós potenciál felszálló szára alatt deaktiválódik. Később a repolarizáció ütemének növekedésével az I_{K1} is egyre nagyobbá válik. Az I_{K1} határozza meg a repolarizáció legnagyobb meredekségét, tehát az akciós potenciál végső repolarizációjáért felelős. Vizsgálataink során az I_{Kr} illetve I_{K1} áramamplitúdók függetlennek bizonyultak az ingerlési frekvenciától.

Kimutattuk, hogy az I_{Ks} normál körülmények között is hozzájárul a repolarizációhoz. Méréseink során az I_{Ks} növekedését tapasztaltuk mind az akciós potenciál hosszának növekedése, mind a plateau fázis magasságának emelkedése hatására. Kísérleteink alapján az I_{Ks} nagyságát elsősorban az akciós potenciál plateau fázisának amplitúdója határozza meg.

Az L-364,373 anyaggal kapcsolatos vizsgálataink nem támasztották alá a molekula I_{Ks} -t aktiváló hatását.

A kamrai akciós potenciál létrehozásában szerepet játszó ionáramok tulajdonságainak pontos ismerete a későbbiekben lehetővé teheti hatékonyabb, és kevesebb proarrhythmias mellékhatással rendelkező antiarrhythmias gyógyszerek fejlesztését.

Summary

Potassium currents flowing during a ventricular action potential contribute to the repolarization of the cell membrane, however the exact role of each current has not been cleared yet. Although there are many studies in this topic most of them were carried out with conventional voltage-clamp technique. With this method only presumptions can be made regarding a current flowing during an action potential in reality.

The goal of our experiments were to clarify the exact role of four potassium currents (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) found in canine left ventricular myocardium. For this reason, action potential clamp method has been used. Furthermore the frequency dependent properties of the currents were studied as well.

During our experiments conventional microelectrode technique, voltage-clamp and action potential clamp method in whole-cell configuration of the patch-clamp technique and mathematical modeling has been used. All of our in vitro experiments were carried out on enzymatically isolated canine left ventricular cardiomyocytes.

According to our results I_{to} is flowing only in the beginning of the action potential for about 20 ms, and is responsible for the early repolarization phase. I_{to} does not play a role in determining the length of the action potential. I_{Kr} is gradually increasing during the plateau phase, reaching its peak shortly before the maximal rate of repolarization as it were triggering the peak of I_{K1} . The I_{K1} is also active in the period of diastole but it is deactivated by the rising phase of the action potential. Later together with the gradually increasing rate of repolarization I_{K1} is becoming larger determining the maximal rate of repolarization, so thus governing the terminal repolarization. Neither I_{Kr} nor I_{K1} showed frequency dependent changes in our experiments.

We demonstrated that I_{Ks} contributes to the normal repolarization. During our measurements I_{Ks} appeared to increase together with the longer action potential duration and with the higher amplitude of the plateau phase. However our results suggest that primarily the amplitude of the plateau determines the amplitude of I_{Ks} .

We could not confirm the I_{Ks} activating effect of the L-364,373 compound previously obtained by others.

Drugs with higher effectiveness and with less proarrhythmic adverse effects can be developed by knowing the exact properties of the ionic currents establishing the action potential.

Irodalomjegyzék

1. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA (1999) MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97(2): 175–187
2. Abitbol I, Peretz A, Lerche C, Busch AE, Attali B (1999) Stilbenes and fenamates rescue the loss of I_{Ks} channel function induced by an LQT5 mutation and other I_{Ks} mutants. *EMBO J* 18: 4137–4148
3. Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U (1996) Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 491 (Pt 1): 31–50
4. Ashcroft FM (2000) Ion Channels and Disease. Academic Press London
5. Balsler JR, Bennett PB, Roden DM (1990) Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Gating kinetics of the delayed rectifier. *J Gen Physiol* 96(4): 835–863
6. Bányász T, Fülöp L, Magyar J, Szentandrassy N, Varró A, Nánási PP (2003) Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. *Cardiovasc Res* 58: 66–75
7. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1996) K_v LQT1 and I_{Ks} (mink) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* 384(6604): 78–80
8. Benndorf K, Nilius B (1988) Properties of an early outward current in single cells of the mouse ventricle. *Gen Physiol Biophys* 7(5): 449–466
9. Berecki G, Zegers JG, Verkerk AO, Bhuiyan ZA, de Jonge B, Veldkamp MW, Wilders R, van Ginneken ACG (2005) HERG channel (dys)function revealed by dynamic action potential clamp technique. *Biophys J* 88: 566–578
10. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1993) Alterations of K^+ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73(2): 379–385
11. Biliczki P, Virág L, Iost N, Papp JGy, Varró A (2002) Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve. *Br J Pharmacol* 137: 361–368
12. 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 repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 38: 441–450
13. Bosch RF, Li GR, Gaspo R, Nattel S (1999) Electrophysiologic effects of chronic amiodarone therapy and hypothyroidism, alone and in combination, on guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 289(1): 156–165
14. Bosch RF, Wang Z, Li GR, Nattel S (1999) Electrophysiological mechanisms by which hypothyroidism delays repolarization in guinea pig hearts. *Am J Physiol* 277: H211–220
15. Boyle WA, Nerbonne JM (1992) Two functionally distinct 4-aminopyridine-sensitive outward K^+ currents in rat atrial myocytes. *J Gen Physiol* 100(6): 1041–1067
16. Brette F, Lacampagne A, Sallé L, Findlay I, Le Guennec JY (2003) Intracellular Cs^+ activates the PKA pathway, revealing a fast, reversible, Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type Ca^{2+} current. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(2): C310–318
17. Busch AE, Busch GL, Ford E, Suessbrich H, Lang HJ, Greger R, Kunzelmann K, Attali B, Stuhmer W (1997) The role of the I_{Ks} protein in the specific pharmacological properties of the I_{Ks} channel complex. *Br J Pharmacol* 122: 187–189
18. Busch AE, Herzer T, Wagner CA, Schmidt F, Raber G, Waldegger S, Lang F (1994) Positive regulation by chloride channel blockers of I_{Ks} channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 46: 750–753

19. Campbell DL, Rasmusson RL, Comer MB, Strauss HC (1995) The cardiac calcium-independent outward potassium current: kinetics, molecular properties, and role in ventricular repolarization. In: *Cardiac Electrophysiology From Cell to Bedside* (szerk: DP Zipes, J Jalife) pp 83–96. Saunders Co, Philadelphia
20. Campbell DL, Rasmusson RL, Qu Y, Strauss HC (1993) The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. *J Gen Physiol* 101(4): 571–601
21. Carmeliet E (1992) Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide. *J Pharmacol Exp Ther* 262(2): 809–817
22. Carmeliet E (1999) Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev* 79(3): 917–1017
23. Carmeliet E, Mubagwa K (1998) Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanisms of action. *Prog Biophys Mol Biol* 70(1): 1–72
24. Cheng J, Kamiya K, Liu W, Tsuji Y, Toyama J, Kodama I (1999) Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K⁺ current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilide class III agents. *Cardiovasc Res* 43(1): 135–147
25. Chiang CE, Roden DM (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 36(1): 1–12
26. Chinn K (1993) Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 264(2): 553–560
27. Clark RB, Giles WR, Imaizumi Y (1988) Properties of the transient outward current in rabbit atrial cells. *J Physiol* 405: 147–168
28. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 233–285
29. Coraboeuf E, Carmeliet E (1982) Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 392(4): 352–359
30. Cui J, Kagan A, Qin D, Mathew J, Melman YF, McDonald TV (2001) Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *J Biol Chem* 276(20): 17244–17251
31. Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV (2000) Cyclic AMP regulates the HERG K⁺ channel by dual pathways. *Curr Biol* 10(11): 671–674
32. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80(5): 795–803
33. Curtis MJ (2004) Is cardiac I_{Ks} a relevant drug target? *Cardiovasc Res* 61: 651–652
34. Deal KK, England SK, Tamkun MM (1996) Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol Rev* 76(1): 49–67
35. Doolan GK, Panchal RG, Fonnes EL, Clarke AL, Williams DA, Petrou S (2002) Fatty acid augmentation of the cardiac slowly activating delayed rectifier current I_{Ks} is conferred by hminK. *FASEB J* 16: 1662–1664
36. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280(5360): 69–77
37. Drici MD, Barhanin J (2000) Cardiac K⁺ channels and drugacquired long QT syndrome. *Therapie* 55: 185–193
38. Duggal P, Vesely MR, Wattanasirichaigoon D, Villafane J, Kaushik V, Beggs AH (1998) Mutation of the gene for IsK associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano–Ward forms of Long-QT syndrome. *Circulation* 97(2): 142–146

39. El-Sherif N, Turitto G (1999) The long QT syndrome and torsade de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol* 22: 91–110
40. Escande D, Loisanche D, Planche C, Coraboeuf E (1985) Age-related changes of action potential plateau shape in isolated human atrial fibers. *Am J Physiol* 249: H843–850
41. Fedida D, Giles WR (1991) Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *J Physiol* 442: 191–209
42. Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM (1993) Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 73(1): 210–216
43. Fermini B, Wang Z, Duan D, Nattel S (1992) Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 263: H1747–1754
44. Firek L, Giles WR (1995) Outward currents underlying repolarization in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 30(1): 31–38
45. Fischmeister R, DeFelice LJ, Ayer RK, Levi R, DeHaan RL (1984) Channel currents during spontaneous action potentials in embryonic chick heart cells. The action potential patch clamp. *Biophys J* 46: 267–271
46. Furukawa T, Kimura S, Furukawa N, Bassett AL, Myerburg RJ (1992) Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res* 70(1): 91–103
47. Gima K, Rudy Y (2002) Ionic current basis of electrocardiographic waveforms: a model study. *Circ Res* 90: 889–896
48. 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
49. Gintant GA (2000) Characterization and functional consequences of delayed rectifier current transient in ventricular repolarization. *Am J Physiol* 278: H806–H817
50. Goldstein SA, Bockenbauer D, O'Kelly I, Zilberberg N (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2(3): 175–184
51. Gralinski MR (2003) The dog's role in the preclinical assessment of QT interval prolongation. *Toxicol Pathol* 31 Suppl: 11–16
52. Grammer JB, Bosch RF, Kühlkamp V, Seipel L (2000) Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 11(6): 626–633
53. Gross GJ, Burke RP, Castle NA (1995) Characterisation of transient outward current in young human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 29(1): 112–117
54. Hamlin RL (2007) Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther* 113(2): 276–295
55. Han W, Wang Z, Nattel S (2001) Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol* 280: H1075–H1080
56. Heath BM, Terrar DA (2000) Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, I_{Kr}, through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 522 Pt 3: 391–402
57. Heidbüchel H, Vereecke J, Carmeliet E (1989) Different K⁺ channels in human atrial cells. *Pflügers Arch* 414 Suppl 1: S171–172
58. Ho WK, Earm YE, Lee SH, Brown HF, Noble D (1996) Voltage- and time-dependent block of delayed rectifier K⁺ current in rabbit sino-atrial node cells by external Ca²⁺ and Mg²⁺. *J Physiol* 494 (Pt 3): 727–742
59. Ho WK, Kim I, Lee CO, Earm YE (1998) Voltage-dependent blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by external Ca²⁺ and Mg²⁺. *J Physiol* 507 (Pt 3): 631–638
60. 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

61. Horie M, Hayashi S, Kawai C (1990) Two types of delayed rectifying K⁺ channels in atrial cells of guinea pig heart. *Jpn J Physiol* 40(4): 479–490
62. Hua F, Gilmour RF (2004) Contribution of I_{Kr} to rate-dependent action potential dynamics in canine endocardium. *Circ Res* 94: 810–819
63. Hume JR, Duan D, Collier ML, Yamazaki J, Horowitz B (2000) Anion transport in heart. *Physiol. Rev.* 80: 31–81.
64. Hume JR, Uehara A (1985) Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J Physiol* 368: 525–544
65. Hund TJ, Rudy Y (2004) Rate dependence and regulation of action potential and calcium transient in a canine cardiac ventricular cell model. *Circulation* 110: 3168–3174
66. Ibarra J, Morley GE, Delmar M (1991) Dynamics of the inward rectifier K⁺ current during the action potential of guinea pig ventricular myocytes. *Biophys J* 60: 1534–1539
67. Jost N, Virag L, Opincariu M, Szecsi J, Varro A, Papp JG (1998) Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 40: 508–515
68. Irisawa H, Brown HF, Giles W (1993) Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 73(1): 197–227
69. Ito H, Vereecke J, Carmeliet E (1992) Intracellular protons inhibit inward rectifier K⁺ channel of guinea-pig ventricular cell membrane. *Pflügers Arch* 422(3): 280–286
70. Jeck CD, Boyden PA (1992) Age-related appearance of outward currents may contribute to developmental differences in ventricular repolarization. *Circ Res* 71(6): 1390–1403
71. Jost N, Virag L, Bitay M, Takacs J, Lengyel C, Biliczki P, Nagy Z, Bogats G, Lathrop DA, Papp JG, Varro A (2005) Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation* 112: 1392–1399
72. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC (1993) Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 72: 75–83
73. Kääh S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF (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(14): 1383–1393
74. Kameyama M, Kiyosue T, Soejima M (1983) Single channel analysis of the inward rectifier K current in the rabbit ventricular cells. *Jpn J Physiol* 33(6): 1039–1056
75. Kamiya K, Mitcheson JS, Yasui K, Kodama I, Sanguinetti MC (2001) Open channel block of HERG K⁺ channels by vesnarinone. *Mol Pharmacol* 60(2): 244–253
76. Kiehn J, Karle C, Thomas D, Yao X, Brachmann J, Kübler W (1998) HERG potassium channel activation is shifted by phorbol esters via protein kinase A-dependent pathways. *J Biol Chem* 273(39): 25285–25291
77. Kiehn J, Lacerda AE, Wible B, Brown AM (1996) Molecular Physiology and Pharmacology of HERG. Single-Channel Currents and Block by Dofetilide. *Circulation* 94: 2572–2579
78. Konarzewska H, Peeters GA, Sanguinetti MC (1995) Repolarizing K⁺ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes. *Circulation* 92(5): 1179–1187
79. Koumi S, Arentzen CE, Backer CL, Wasserstrom JA (1994) Alterations in muscarinic K⁺ channel response to acetylcholine and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts. *Circulation* 90(5): 2213–2224
80. Koumi S, Backer CL, Arentzen CE, Sato R (1995) beta-Adrenergic modulation of the inwardly rectifying potassium channel in isolated human ventricular myocytes. Alteration in channel response to beta-adrenergic stimulation in failing human hearts. *J Clin Invest* 96(6): 2870–2881.

81. Kurata HT, Fedida D (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 92(2): 185–208
82. Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS, Tseng YZ, Lien WP, Huang SK (1999) Changes in the mRNA levels of delayed rectifier potassium channels in human atrial fibrillation. *Cardiology* 92(4): 248–255
83. Lei M, Honjo H, Kodama I, Boyett MR (2000) Characterization of the transient outward current in rabbit sinoatrial node cells. *Cardiovasc Res* 46: 433–441
84. Lengyel C, Iost N, Virag L, Varro A, Lathrop DA, Papp JG (2001) 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
85. Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S (1996) Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K^+ current in human atrial myocytes. *Circ Res* 78(5): 903–915
86. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M (1998) Transmural heterogeneity of action potentials and Ito1 in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol* 275(2 Pt 2): H369–377
87. 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
88. Linz KW, Meyer R (2000) Profile and kinetics of the L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflügers Arch* 439: 588–599
89. Liu DW, Antzelevitch C (1995) Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res* 76(3): 351–365
90. Liu DW, Gintant GA, Antzelevitch C (1993) Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res* 72(3): 671–687
91. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309(5736): 903–908.
92. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372(6504): 366–369
93. Lu Z, Kamiya K, Opthof T, Yasui K, Kodama I (2001) Density and kinetics of I_{Kr} and I_{Ks} in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of I_{Ks} blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit: implications for arrhythmogenesis in humans. *Circulation* 104: 596–951
94. Mansourati J, Le Grand B (1993) Transient outward current in young and adult diseased human atria. *Am J Physiol* 265(4): H1466–1470
95. Matsuda H (1988) Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 397: 237–258
96. Matsuda H, Matsuura H, Noma A (1989) Triple-barrel structure of inwardly rectifying K^+ channels revealed by Cs^+ and Rb^+ block in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 413: 139–157
Erratum in: *J Physiol (Lond)* 418: 441
97. Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature* 325(7000): 156–159
98. Matsuura H, Ehara T, Imoto Y (1987) An analysis of the delayed outward current in single ventricular cells of the guinea-pig. *Pflügers Arch* 410(6): 596–603
99. Matsuura H, Shattock MJ (1991) Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated ventricular myocytes. *Am J Physiol* 261(5): H1358–1365
100. Mazhari R, Greenstein JL, Winslow RL, Marbán E, Nuss HB (2001) Molecular interactions between two long-QT syndrome gene products, HERG and KCNE2, rationalized by in vitro and in silico analysis. *Circ Res* 89(1): 33–38

101. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC (2000) A structural basis of drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12329-12333
102. Mitcheson JS, Hancox JC (1999) Characteristics of a transient outward current (sensitive to 4-aminopyridine) in Ca²⁺-tolerant myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node. *Pflügers Arch* 438(1): 68–78
103. Mitcheson JS, Sanguinetti MC (1999) Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 9(4-5): 201–216
104. Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 93(1): 168–177
105. Nagashima M, Tohse N, Kimura K, Yamada Y, Fujii N, Yabu H (2001) Alternation of inwardly rectifying background K⁺ channel during development of rat fetal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33(3): 533–543
106. Nakamura TY, Lee K, Artman M, Rudy B, Coetzee WA (1999) The role of Kir2.1 in the genesis of native cardiac inward-rectifier K⁺ currents during pre- and postnatal development. *Ann N Y Acad Sci* 868: 434–437
107. Nakashima H, Gerlach U, Schmidt D, Nattel S (2004) In vivo electrophysiological effects of a selective slow delayed-rectifier potassium channel blocker in anesthetized dogs: potential insights into class III actions. *Cardiovasc Res* 61: 705–714
108. Nakayama T, Fozzard HA (1988) Adrenergic modulation of the transient outward current in isolated canine Purkinje cells. *Circ Res* 62(1): 162–172
109. Nattel S, Yue L, Wang Z (1999) Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 9(4-5): 217–226
110. Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525: 285–298
111. Nitta J, Furukawa T, Marumo F, Sawanobori T, Hiraoka M (1994) Subcellular mechanism for Ca(2+)-dependent enhancement of delayed rectifier K⁺ current in isolated membrane patches of guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 74(1): 96–104
112. Ono K, Shibata S, Iijima T (2000) Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. *J Physiol* 524: 51–62
113. Pajouh M, Wilson LD, Poelzing S, Johnson NJ, Rosenbaum DS (2005) I_{Ks} blockade reduces dispersion of repolarization in heart failure. *Heart Rhythm* 2: 731–738
114. Patel AJ, Honoré E (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci*;24(6): 339–346
115. Payet MD, Rousseau E, Sauvé R (1985) Single-channel analysis of a potassium inward rectifier in myocytes of newborn rat heart. *J Membr Biol* 86(2): 79–88
116. Potet F, Scott JD, Mohammad-Panah R, Escande D, Baró I (2001) AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(5): H2038–2045
117. Priebe L, Beuckelmann DJ (1998) Simulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ Res* 82: 1206–1223
118. Priori SG, Napolitano C (2004) Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Ann N Y Acad Sci* 1015: 96–110
119. Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC (1998) Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. *Circ Res* 82(7): 739–750
120. 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
121. Roden DM (1998) Taking the “idio” out of “idiosyncratic”: predicting torsades de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol* 21: 1029–1034

122. Roden DM (2006) Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J Intern Med* 259: 59–69
123. Roden DM, George AL Jr. (1997) Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. *Am J Physiol* 273(2): H511–525
124. Roden DM, Viswanathan PC (2005) Genetics of acquired long QT syndrome. *J Clin Invest* 115: 2025–2032
125. Ruppertsberg JP (2000) Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflügers Arch* 441(1): 1–11
126. Sakmann B, Trube G (1984) Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 347: 641–657
127. Sakmann B, Trube G (1984) Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in the guinea-pig heart cell membrane. *J Physiol* 347: 659–683
128. 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
129. Sánchez-Chapula J, Elizalde A, Navarro-Polanco R, Barajas H (1994) Differences in outward currents between neonatal and adult rabbit ventricular cells. *Am J Physiol* 266(3): H1184–1194
130. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384(6604): 80–83
131. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 81(2): 299–307
132. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1990) Lanthanum blocks a specific component of I_K and screens membrane surface charge in cardiac cells. *Am J Physiol* 259(6): H1881–1889
133. 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
134. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1992) Role of external Ca²⁺ and K⁺ in gating of cardiac delayed rectifier K⁺ currents. *Pflügers Arch* 420(2): 180–186
135. Sato R, Koumi S (1995) Modulation of the inwardly rectifying K⁺ channel in isolated human atrial myocytes by alpha 1-adrenergic stimulation. *J Membr Biol* 148(2): 185–191
136. Sato T, Arita M, Kiyosue T (1993) Differential mechanism of block of palmitoyl lysophosphatidylcholine and of palmitoylcarnitine on inward rectifier K⁺ channels of guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* (7 Suppl 3): 575–584
137. Schreieck J, Wang Y, Overbeck M, Schömig A, Schmitt C (2000) Altered transient outward current in human atrial myocytes of patients with reduced left ventricular function. *J Cardiovasc Electrophysiol* 11(2): 180–192
138. 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
139. Shibasaki T (1987) Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol* 387: 227–250
140. Shibata EF, Drury T, Refsum H, Aldrete V, Giles W (1989) Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 257(6): H1773–1781
141. 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
142. Shimizu W, Antzelevitch C (1998) Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the long-QT syndrome: effects of beta-adrenergic agonists and antagonists and sodium channel blockers on transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes. *Circulation* 98: 2314–2322

143. Shimoni Y, Clark RB, Giles WR (1992) Role of an inwardly rectifying potassium current in rabbit ventricular action potential. *J Physiol* 448: 709–727
144. Shinagawa Y, Satoh H, Noma A (2000) The sustained inward current and inward rectifier K⁺ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol* 523 Pt 3: 593–605
145. Shontz RD, Xu Z, Patel KP, Rozanski GJ (2001) Inhibition of K⁺ currents by homocysteine in rat ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12(2): 175–182
146. Snyders DJ (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 42(2): 377–390
147. Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB (1993) A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 101(4): 513–543
148. Song DK, Earm YE, Ho WK (1999) Blockade of the delayed rectifier K⁺ currents, I_{Kr}, in rabbit sinoatrial node cells by external divalent cations. *Pflügers Arch* 438(2): 147–153
149. Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC (1996) Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* 78(3): 499–503
150. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT (1997) Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 17(3): 338–340
151. Stengl M, Barták F (2000) Calcitonin gene-related peptide suppresses the transient outward current in rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 441(1): 138–143
152. Stengl M, Carmeliet E, Mubagwa K, Flameng W (1998) Modulation of transient outward current by extracellular protons and Cd²⁺ in rat and human ventricular myocytes. *J Physiol* 511: 827–836
153. Stengl M, Volders PGA, Thomsen MB, Spatjens RLHMG, Sipido KR, Vos MA (2003) Accumulation of slowly activating delayed rectifier potassium current (I_{Ks}) in canine ventricular myocytes. *J Physiol* 551: 777–786
154. Strauss HC, Morales MJ, Wang S, Brahmajothi MV, Campbell DL (2001) Voltage-dependent K⁺ channels. In: *Heart Physiology and Pathophysiology* (szerk: N Sperelakis, Y Kurachi, A Terzic, MV Cohen) pp. 259–280. Academic Press, San Diego
155. Sun X, Wang HS (2005) Role of the transient outward current (I_{to}) in shaping canine ventricular action potential – a dynamic clamp study. *J Physiol* 564, 411–419
156. Szabó G, Szentandrassy N, Bíró T, Tóth IB, Czifra G, Magyar J, Bányász T, Varró A, Kovács L, Nánási PP (2005) Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflügers Arch* 450: 307–316
157. Szentandrassy N, Bányász T, Bíró T, Szabó G, Tóth IB, Magyar J, Lázár J, Varró A, Kovács L, Nánási PP (2005) Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 65: 851–860
158. Tanemoto M, Fujita A, Kurachi Y (2001) Inwardly-rectifying K⁺ channels In: *Heart Physiology and Pathophysiology* (szerk: N Sperelakis, Y Kurachi, A Terzic, MV Cohen) pp. 281–308. Academic Press, San Diego
159. Tohse N, Kameyama M, Irisawa H (1987) Intracellular Ca²⁺ and protein kinase C modulate K⁺ current in guinea pig heart cells. *Am J Physiol* 253(5): H1321–1324
160. Tseng GN, Hoffman BF (1989) Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res* 64(4): 633–647
161. Unsöld B, Kerst G, Brousos H, Hubner M, Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Bleich M (2000) KCNE1 reverses the response of the human K⁺ channel KCNQ1 to cytosolic pH changes and alters its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflügers Arch* 441: 368–378

162. Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM (1997) Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 80(6): 772–781
163. Vandenberg CA (1987) Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(8): 2560–2564
164. Varró A, Baláti B, Iost N, Takács J, Virág L, Lathrop DA, Lengyel Cs, Tálósi L, Papp JGy (2000) The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol* 523: 67–81
165. Varró A, Papp JGy (1992) The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. *Cardioscience* 3(3): 131–144
166. Veldkamp MW (1998) Is the slowly activating component of the delayed rectifier current, I_{Ks}' absent from undiseased human ventricular myocardium? *Cardiovasc Res* 40(3): 433–435
167. Veldkamp MW, van Ginneken AC, Ophhof T, Bouman LN (1995) Delayed rectifier channels in human ventricular myocytes. *Circulation* 92(12): 3497–3504
168. Vereecke J, Carmeliet E (2000) The effect of external pH on the delayed rectifying K⁺ current in cardiac ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 439(6): 739–751
169. 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
170. Volders PG, Kulcsár A, Vos MA, Sipido KR, Wellens HJ, Lazzara R, Szabo B (1997) Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 34(2): 348–359
171. Volders PG, Sipido KR, Vos MA, Spätiens RL, Leunissen JD, Carmeliet E, Wellens HJ (1999) Downregulation of delayed rectifier K⁺ currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation* 100(24): 2455–2461
172. Volders PGA, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Spatjens RLHMG, Beekman JDM, Sipido KR, Vos MA (2003) Probing the contribution of IKs to canine ventricular repolarization: key role for b-adrenergic receptor stimulation. *Circulation* 107: 2753–2760
173. Wahler GM (2001) Cardiac action potentials. In: *Heart Physiology and Pathophysiology* (szerk: N Sperelakis, Y Kurachi, A Terzic, MV Cohen) pp. 199–211. Academic Press, San Diego
174. Wahler GM, Dollinger SJ, Smith JM, Flemal KL (1994) Time course of postnatal changes in rat heart action potential and in transient outward current is different. *Am J Physiol* 267(3): H1157–1166
175. Walsh KB, Kass RS (1988) Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science* 242(4875): 67–69
176. Walsh KB, Kass RS (1991) Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed IK by protein kinases A and C. *Am J Physiol* 261(6): C1081–1090
177. Wang L, Duff HJ (1997) Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. *Circ Res* 81(1): 120–127
178. Wang L, Feng ZP, Kondo CS, Sheldon RS, Duff HJ (1996) Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. *Circ Res* 79(1): 79–85
179. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12(1): 17–23
180. 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(5): 551–561
181. Wang Z, Fermini B, Nattel S (1993) Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 73(6): 1061–1076

182. Wang Z, Fermini B, Nattel S (1994) Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 28(10): 1540–1546
183. Wang ZG, Fermini B, Nattel S (1991) Repolarization differences between guinea pig atrial endocardium and epicardium: evidence for a role of I_{to} . *Am J Physiol* 260(5): H1501–1506
184. Warmke JW, Ganetzky B (1994) A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3438–3442
185. Winslow RL, Rice J, Jafri S, Marban E, O'Rourke B (1999) Mechanism of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, II: model studies. *Circ Res* 84: 571–586
186. 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
187. 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
188. 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(6): 782–789
189. Yokoshiki H, Tohse N (2001) Developmental changes of ion channels. In: *Heart Physiology and Pathophysiology* (szerk: N Sperelakis, Y Kurachi, A Terzic, MV Cohen) pp. 719–735. Academic Press, San Diego
190. Yu H, Gao J, Wang H, Wymore R, Steinberg S, McKinnon D, Rosen MR, Cohen IS (2000) Effects of the renin-angiotensin system on the current I_{to} in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart. *Circ Res* 86(10): 1062–1068
191. Yu H, McKinnon D, Dixon JE, Gao J, Wymore R, Cohen IS, Danilo P Jr, Shvilkin A, Anyukhovsky EP, Sosunov EA, Hara M, Rosen MR (1999) Transient outward current, I_{to1} , is altered in cardiac memory. *Circulation* 99(14): 1898–1905
192. 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(7): 776–784
193. Yue L, Wang Z, Rindt H, Nattel S (2000) Molecular evidence for a role of Shaw (Kv3) potassium channel subunits in potassium currents of dog atrium. *J Physiol* 527 Pt 3: 467–478
194. Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL (2001) The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K^+ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 533(Pt 3): 697–710
195. Zaza A (2000) The cardiac action potential. In: *An introduction to Cardiac Cellular Electrophysiology* (szerk: A Zaza, MR Rosen), pp. 59–82. Harwood Academic Publishers
196. Zaza A, Rocchetti M, Brioschi A, Cantadori A, Ferroni A (1998) Dynamic Ca^{2+} -induced inward rectification of K^+ current during the ventricular action potential. *Circ Res* 82: 947–956
197. Zhang M, Jiang M, Tseng GN (2001) MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 88(10): 1012–1019

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények:

Bányász T, Magyar J, Szentandrassy N, Horváth B, Birinyi P, Szentmiklósi J, Nánási PP (2007) Action potential clamp fingerprints of K^+ currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiol*; 190: 189–198
[IF=2,085]

Horváth B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nánási PP, Bányász T (2006) Contribution of I_{Ks} to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflügers Arch* 452(6): 698–706
[IF=4,807]

Magyar J, Horváth B, Bányász T, Szentandrassy N, Birinyi P, Varró A, Szakonyi Z, Fülöp F, Nánási PP (2006) L-364,373 fails to activate the slow delayed rectifier K^+ current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373(1): 85–90
[IF=2,779]

Az értekezésben fel nem használt in extenso közlemények:

Virág L, Jost N, Acsai K, Horváth B, Bányász T, Bitay M, Bogáts G, Papp JGy, Varró A, Nánási PP (2009) 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
[IF=4,333; JCR 2007 alapján]

Szabó A, Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Magyar J, Nánási PP (2008) Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Anesthesiology* 108(4): 693–702
[IF=4,596; JCR 2007 alapján]

Szabó A, Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J (2007) Effects of articaine on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. *Brit J Anaesth* 99: 726–733
[IF=2,948]

Birinyi P, Acsai K, Bányász T, Tóth A, Horváth B, Virág L, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Fülöp F, Nánási PP (2005) Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na^+/Ca^{2+} exchange current and L-type Ca^{2+} current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 372(1): 63–70
[IF=2,098]

Tárgyszavak

elektrofiziológia

káliumáram

akciós potenciál

akciós potenciál clamp

kamrai repolarizáció

kutya szívműködés

frekvenciafüggés

Keywords

electrophysiology

potassium current

action potential

action potential clamp

ventricular repolarization

canine cardiomyocyte

frequency dependence

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki dr. Csernoch László professzor úrnak, aki az Élettani Intézet igazgatójaként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Bányász Tamásnak áldozatkész segítségét, bátorítását, elméleti és gyakorlati tanácsait, amelyekkel bevezetett a laboratórium mindennapi életébe. Köszönöm továbbá dr. Magyar Jánosnak, hogy témavezetőm távollétében is segítségemre volt a mérések és az adatelemzés során is.

Köszönettel tartozom az Szívelektrofiziológiai Laboratórium vezetőjének, dr. Nánási Péternek a hasznos tanácsokért és a bátorításért, dr. Fülöp Lászlónak, aki felkeltette az érdeklődésemet a szívelektrofiziológia iránt és dr. Szentandrassy Norbertnek, aki számos elméleti és gyakorlati útmutatással segített. Hálásan gondolok PhD hallgató társaimra, dr. Birinyi Péterre, dr. Szabó Gergelyre és dr. Harmati Gáborra, akikkel megoszthattam a közösen végzett munka felejthetetlen pillanatait.

Külön köszönetemet fejezem ki dr. Szentmiklósi Józsefnek, dr. Fülöp Ferencnek, dr. Szakonyi Zsoltnak és dr. Varró Andrásnak, akik hozzájárultak az értekezésben bemutatott eredmények elkészítéséhez.

A kísérletek előkészítése során nélkülözhetetlen segítséget nyújtott Víghné Horváth Katalin.

Függelék

Az értekezést megalapozó közlemények gyűjteménye