

KÜLÖNBÖZŐ OXIDOREDUKTÍV ÁGENSEK HATÁSA A KONTRAKTILITÁSRA HUMÁN BAL KAMRAI CARDIOMYOCYTÁKON

Hertelendi Zita¹, Tóth Attila¹, Borbély Attila¹, Galajda Zoltán², Vaszi Miklós², Édes István¹, Papp Zoltán¹

¹DEOEC, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék, Debrecen
²DEOEC, Kardiológiai Intézet, Szívsebészeti Centrum, Debrecen

Ebben a tanulmányban a stunning során feltehetően szerepet játszó posztranszlációs fehérjemódosítások (szulfhidril-csoport oxidáció, nitroirozin képződés) funkcionális következményeit vizsgáltuk. Az izometrikus erő kialakulását permeabilizált izolált humán bal kamrai cardiomyocytákon mértük peroxinitrittel (PN), 2,2'-dithiodipiridinnel (DTDP, SH-specifikus oxidálószer) és hidrogénperoxidral (H₂O₂) történő inkubációkat követően. A reverzibilitást a következő SH-specifikus redukálószer alkalmazásával tanulmányoztuk: dithiothreitol (DTT), redukált glutation (GSH) és N-acetil-L-cisztein (NAC). A kontraktilis fehérjék szulfhidril-csoportjainak számában bekövetkező változást Ellman-reagenssel követtük. A DTDP és a PN-kezelés dózisfüggő módon csökkentette a Ca²⁺-aktivált maximális erőt (ECDDTDP₅₀=2,73 mM; ECPN₅₀=26,2 μM). A kontraktilis erő csökkenését a DTDP esetében a szabad SH-csoportok teljes oxidációja kísérte (6±3%-ra, 10 mM DTDP-koncentrációnál), míg PN csak részben oxidálta a szabad SH-csoportokat (69±6%-ra, 1 mM PN koncentrációnál). Továbbá a DTDP hatására kialakuló erő csökkenés (2,5 mM DTDP koncentrációnál mérve) teljes mértékben reverzálhatóan bizonyult 10 mM DTT-vel. Azonban 10 mM DTT csak részleges (delta erő 13%), de szignifikáns mértékű reverziót volt képes kialakítani 50 mikroM PN-kezelés után. Szemben a DTT-vel 10 mM GSH (n=9) és 10 mM NAC (n=8) alkalmazásával nem tudunk a DTDP-kezelést követően növekedést elérni a kontraktilis erőben. Azonban az NAC és a DTT egyaránt hatékonyan bizonyult PN-tel történő inkubációt követően. Meglepő módon a H₂O₂ által kiváltott kontraktilis és fehérjevaltozások minimálisak voltak még magas H₂O₂-koncentrációk mellett is. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a PN és a DTDP különböző mechanizmusokon keresztül csökkentette a Ca²⁺-aktivált maximális erőt. A PN elsősorban nitroirozin képződést indukált, amelyet egy kismértékű, de szignifikáns SH-oxidáció kísér. Mindkét mechanizmus szerepet játszott a PN hatására kialakuló erőcsökkenés létrejöttében. Az SH-oxidáció reverzálhatósága az oxidáló és a redukáló szerek közötti molekuláris kölcsönhatás jellegzetességeitől függ. ETT 449/2006 támogatásával.

THE EFFECT OF DIFFERENT OXIDOREDUCTIVE AGENTS ON THE CONTRACTILE FORCE PRODUCTION IN HUMAN LEFT VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES

stunning, oxidation, sulfhydryl

In the present study we aimed to characterize the functional consequence of those posttranslational protein modifications (oxidation of the sulfhydryl groups and/or nitrotyrosine formation) that are implicated during myocardial stunning. Using permeabilized isolated left ventricular cardiomyocytes from human hearts isometric force production was measured following incubations in the presence of: peroxinitrite (PN) or 2,2'-dithiodipyrindine (DTDP, known as an SH-specific oxidant) or hydrogenperoxide (H₂O₂). Reversibility was tested following subsequent incubations in the presence of SH-specific reductive agents: dithiothreitol (DTT), reduced glutathione (GSH) or N-acetyl-L-cysteine (NAC). Changes in free sulfhydryl group (SH) statuses of the contractile proteins were monitored by the Ellman reaction. Both DTDP and PN diminished myofibrillar force in a concentration dependent manner (ECDDTDP₅₀=2.73 mM; ECPN₅₀=26.2 μM). The reduction in force was paralleled by complete elimination of the free SH groups by DTDP (to 6±3% at a DTDP concentration of 10 mM), while the PN induced reduction in free SH groups was only partial (to 69±6% at a PN concentration of 1 mM). Moreover, the DTDP evoked reduction in force (as assessed at a DTDP concentration of 2.5 mM) was completely restored by 10 mM DTT. In contrast, 10 mM DTT could induce only a partial (delta force by 13%), however significant recovery in force after a 50 mikroM PN treatment. In contrast to 10 mM DTT 10 mM GSH (n=9) or 10 mM NAC (n=8) could not restore force after DTDP treatments. However, NAC was equally effective as DTT after PN treatments. Surprisingly, the H₂O₂-evoked contractile and protein alterations were minor even at high H₂O₂ concentrations. In conclusion, PN and DTDP decreased the Ca²⁺-activated maximal force production via different mechanisms. PN mainly induced nitrotyrosine formation, and to a small but significant degree also evoked SH group oxidation. Both of these mechanisms were involved in the reduction of force after PN exposures. The reversibility of SH group oxidation depended on the molecular interplay between the applied oxidative and reductive agents. Supported by ETT 449/2006.

HUMÁN- ÉS KUTYA-SZÍVIZOMZAT IONCSATORNÁINK MEGOSZLÁSA A BAL KAMRA RÉTEGEIBEN

Horváth Balázs, Nánási Péter Pál, Biró Tamás, Bányász Tamás, Szentandrassy Norbert, Szabó Gergely, Magyar János
Debreceni Egyetem OEC, Élettani Intézet, Debrecen

A jelen vizsgálatok célja az volt, hogy összehasonlítsuk az ionáramok- és az ioncsatornákat alkotó fehérjék megoszlását humán és kutya balkamrai szívizomzat subepicardialis (EPI) és midmyocardialis (MID) rétegeiben. Az akciós potenciálok és az ionáramokat a myocardium megfelelő rétegéből származó, enzimatikusan izolált kutya bal kamrai szívizomszöveteken mértük. Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz konvencionális mikroelektroda-technikát, illetve teljes sejt voltage-clamp módszert használtunk. A csatornafehérjék mennyiségének meghatározása Western-blot technikával történt kutya és humán mintákból. Megállapítottuk, hogy EPI-sejteken kisebb az akciós potenciálok amplitúdója (134±1 mV vs. 138±1 mV), nagyobb mértékű a korai repolarizáció (51±3 mV vs. 41±2 mV), és rövidebbek az akciós potenciálok (197±9 ms vs. 222±8 ms APD90 esetén) a MID sejtekhez képest. A vizsgált ionáramok közül a transziens kifelé irányuló áram (I_{to}) és a késői egyenirányító kálium áram lassú komponense (I_{Ks}) esetében az EPI-sejteken mért áramok nagysága meghaladta a MID-sejteken mért áramokét (29,5±1,5 pA/pF vs. 19,0±2,3 pA/pF, illetve 10,3±2,3 pA/pF vs. 6,5±1,0 pA/pF). Nem találtunk szignifikáns EPI-MID különbséget a káliumáram (I_K), a befelé egyenirányító káliumáram (I_{Kr}), valamint a késői egyenirányító káliumáram gyors komponense (I_{Kr}) esetében. A megfelelő rétegekből származó sejteken mért ionáramok megoszlásának különbségei jól magyarázzák a regisztrált akciós potenciálok eltérő mintázatát. Kutyamintákon az EPI-régióban a Kv4.3, Kv1.4, KChIP₂ és KvLQT₁ fehérjék szignifikánsan nagyobb, míg a Nav1.5 és MinK-fehérjék szignifikánsan kisebb mennyiségben voltak jelen a MID-réteghez képest. Eredményeink alapján a mért csatornafehérje denzitások viszonyai jól tükrözik a talált ionáram-megoszlásokat. A kutya és humán mintákat összehasonlítva az ioncsatornákat alkotó fehérjék EPI-MID megoszlásának nagyfokú hasonlóságát tapasztaltuk. Eredményeink egyrészt igazolják, hogy elektrofiziológiai szempontból az emberi szívizomzat megfelelő állatmodellje a kutyaszív, másrészt felhívják a figyelmet a myocardium fiziológiásan is jelen lévő elektromos heterogenitására.

DISTRIBUTION OF ION CHANNELS IN THE LAYERS OF HUMAN AND CANINE LEFT VENTRICULAR MYOCARDIUM

regional differences, subepicardium, midmyocardium, cardiac myocytes, human heart, ion channels, ionic currents, action potential

The object of this study was to compare the distribution of ionic currents and ion channel proteins in human and canine subepicardial (EPI) and midmyocardial (MID) layers of the left ventricular myocardium. Action potentials and ionic currents were measured on enzymatically isolated canine left ventricular cardiomyocytes derived from the proper layer of myocardium. During the electrophysiological experiments we used conventional microelectrode technique and whole-cell voltage clamp method. Quantity of ion channel proteins in both human and canine preparations were determined by Western blotting. We obtained that on EPI cells the amplitude of action potentials were smaller (134±1 mV vs. 138±1 mV), the early repolarization was greater (51±3 mV vs. 41±2 mV) and the action potentials were shorter (197±9 ms vs. 222±8 ms at APD90) compared to MID myocytes. Among the studied ionic currents the densities of the transient outward current (I_{to}) and the slow component of the delayed rectifier potassium current (I_{Kr}) were larger on EPI than on MID cells (29.5±1.5 pA/pF vs. 19.0±2.3 pA/pF and 10.3±2.3 pA/pF vs. 6.5±1.0 pA/pF, respectively). We found no significant EPI-MID differences in the calcium current (I_{Ca}), the inward rectifier potassium current (I_{K1}) and the rapid component of the delayed rectifier potassium current (I_{Kr}). The differences of the distribution of ionic currents measured on cells of the proper layers well explain the dissimilar patterns of the measured action potentials. In the EPI layer of canine heart the quantity of Kv4.3, Kv1.4, KChIP₂ and KvLQT₁ proteins were significantly higher, and that of Nav1.5 and MinK much lower than in the MID region. Regarding our results the relations of channel protein densities were consistent with the measured ionic current distributions. Comparing the human and canine preparations they showed high similarities in the EPI-MID distribution of ion channel proteins. Our results prove that from electrophysiological point of view canine heart is an adequate model of human myocardium, and also draw attention to the electrical heterogeneity of the myocardium which can be observed even under physiological circumstances.