Doktori (PhD) értekezés tézisei

A késői nátriumáram szerepe a bal kamrai szívizomsejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak kialakításában

Dr. Hézső Tamás

Témavezető: Dr. Horváth Balázs

DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

A késői nátriumáram szerepe a bal kamrai szívizomsejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak kialakításában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Hézső Tamás okleveles orvos és fogorvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
Élettan és Neurobiológia programja keretében

Témavezető: Dr. Horváth Balázs, PhD

Az értekezés bírálói:
Dr. Bencsik Péter, PhD
Dr. Szántó G. Tibor, PhD

A bírálóbizottság:
elnök: Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora
tagok: Dr. Bencsik Péter, PhD
Dr. Szántó G. Tibor, PhD
Dr. Nagy Zsófia, PhD
Prof. Dr. Pórszász Róbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület
2024. szeptember 27. 13:00

Bevezetés

Általános megfontolások

A feszültségfüggő nátriumcsatornák (Na_v) kulcsszerepet játszanak a szívizomsejtek aktiválódásában és az elektromos jelek szívizmon belüli terjedésében. A kamrai szívizomsejtek Na_v-i hozzák létre az akciós potenciál (AP) felszálló szárát. A membránpotenciál és a Na_v- k közötti pozitív visszacsatolás néhány milliszekundumon belül a csatornák zárt állapotból nyitott állapotba való jutását eredményezi, amelyet gyors inaktiváció követ. Ennek köszönhetően 3-5 milliszekundummal az AP felszálló szárának kialakulása után a Na_v-k 99 %-a inaktiválódott, nem vezető állapotba kerül. Az áramnak ezt a keskeny kiugrását korai nátriumáramnak ($I_{Na,korai}$) nevezzük. Ennek ellenére a csatornák egy kis hányada nem inaktiválódik, és az AP plató fázisa alatt tartós áramot tart fenn, amelyet késői nátriumáramnak ($I_{Na,késői}$) nevezünk. Még most sem ismerjük pontosan a nem inaktiválódott csatornák működésének pontos részleteit és a szakirodalomban pedig a jelenség magyarázatára többféle mechanizmust javasolnak.

A $I_{Na,késői}$ kis amplitúdójú, de a teljes plató fázis alatt folyik, így befolyásolja a szív AP-ok repolarizációját, továbbá részt vesz a szívizomsejtek nátrium és kalcium homeosztázisában is. Egyre növekvő mennyiségű adat bizonyítja azt, hogy a megnövekedett $I_{Na,késői}$ jelentős patofiziológiai szereppel bír több szerzett szívizombetegségben, például a szívizomzat iszkémiájában vagy a szívelégtelenségben (SZE) is. A megnövekedett $I_{Na,késői}$ megnyújtja a repolarizációt és megnöveli a szívizomsejtek intracelluláris nátriumion koncentrációját ($[Na^+]_i$), így szívritmuszavarokat okozhat, csökkentheti a szívizomzat kontraktilitását, és károsíthatja a szívizomsejt energiaháztartását is.

A $I_{Na,késői}$-ra vonatkozó jelenlegi ismereteink többnyire az egyszerűsített körülmények között nyert feszültség-clamp adatokon nyugszanak. Az így nyert eredményeket a korábbi tanulmányok során modellszimulációkban használták a $I_{Na,késői}$ AP alatti dinamikus profiljának rekonstruálására azzal a céllal, hogy megértsék szerepét az AP kialakításában. Bár e megközelítés is értékes ismeretekkel járult hozzá a $I_{Na,késői}$ tanulmányozásához, ez önmagában nem alkalmas a $I_{Na,késői}$ fiziológiás körülmények közötti tulajdonságainak vizsgálatára. A fő ok a Na_v-k különleges biofizikai jellemzője, az úgynevezett nem egyensúlyi kapuzás.

Feszültségfüggő nátriumcsatornák

A szakirodalomban közölt különböző $I_{Na,késői}$ profilok rávilágítanak a Na_v-k kapuzásának bonyolultságára. Eddigi ismereteink szerint a $I_{Na,korai}$-ot döntően az $Na_v1.5$ alakítja ki. Mivel az AP során a membránpotenciál dinamikus változásai jelentősen befolyásolják a $I_{Na,késői}$-ot, szükségesnek láttuk, hogy az áramot közvetlenül rögzítsük AP feszültség-clamp (APVC) körülmények között, melyet a disszertáció 4. fejezetében részletesen tárgyalok.

A Na_v-ról továbbá ismert, hogy a Ca^{2+}, a kalmodulin (CaM) és a Ca^{2+}/CaM-függő proteinkináz II (CaMKII) által is szabályozott; e molekulák mindegyike külön-külön és együttesen is modulálja a $I_{Na,késői}$ -ot. Az említett komplex szabályozás egyes elemeit feltáró korábbi tanulmányok ellentmondásos eredményekről számoltak be. Egyes eredmények alapján azt feltételezték, hogy a Ca^{2+} a C-terminusban lévő EF-kéz motívumhoz való közvetlen kötődéssel modulálja a Na^+ áramot, ám további tanulmányok bizonyítékokat szolgáltattak ez

ellen az elképzelés ellen. A jelenlegi konszenzus szerint a Ca^{2+}-CaM-CaMKII jelátvitel megnöveli a szív $[Na^+]_i$-ját. A hagyományos feszültség-clamp kísérletekben alkalmazott egyszerűsített körülmények azonban jelentősen megnehezítik a Ca^{2+}-CaM-CaMKII jelátviteli útvonal nátriumáramra gyakorolt integrált hatásainak meghatározását az AP alatt. Korábbi vizsgálatokban hagyományos feszültség-clamp módszert használtak négyszög alakú impulzus protokollokkal, azonban a Na_v nem egyensúlyi kapuzását nem vizsgálták ezekben a kísérletekben.

A Na_v-ra ható, Vaughan-Williams osztályozásban az I. osztályba sorolt antiaritmiás gyógyszerek közül több a $I_{Na,késői}$-ot is gátolja a feszültségfüggő nátriumáram korai komponense ($I_{Na,korai}$) mellett. Ez utóbbi hatásról sokáig úgy vélték, hogy fokozza a ritmuszavarok kockázatát és következésképpen a hirtelen szívhalál előfordulását. Ezen irodalmi adatok alapján egy $I_{Na,késői}$ szelektív gátlására szolgáló szer felkutatása jó fejlesztési irány lehet. Az egyik ilyen szer a GS-458967 néven ismert 6-(4-(trifluormetoxi)fenil)-3-(trifluormetil)-[l,2,4]triazolo[4,3-a]piridin (a továbbiakban GS967) nyúl kamrai sejtekben tesztelve különösen szelektív jelöltnek bizonyult.

Azt is kimutatták, hogy az egyes szívizom preparátumok elektrofiziológiai tulajdonságaiban jelentős fajok közötti eltérések vannak. Mind a jelen munkában bemutatott, mind korábban közölt adatok alapján a kutya kamrai szívizomsejtek a humán kamrai sejtek viszonylag jó modelljének tekinthetőek bizonyos ionáramok tekintetében.

A Na^+ áram viselkedése időben nem monoton. Amikor a membránpotenciál eléri a Na_v-k küszöbértékét, akkor jelentős Na^+ beáramlás depolarizálja a membránt, így létrehozza az AP felszálló szárát. Ez a gyors, korai Na^+-áram csúcs ($I_{Na,korai}$) azonban gyorsan inaktiválódik, ami a $I_{Na,korai}$ gyors lecsengését okozza. Bizonyos körülmények között a Na_v-k visszatérhetnek az inaktivációból és újra megnyílhatnak az AP platófázisa alatt, ami további depolarizáló Na^+ beáramlást eredményez, amit késői Na^+ áramnak ($I_{Na,késői}$) nevezünk. Mivel a $I_{Na,korai}$ növeli az intracelluláris Na^+-koncentrációt ($[Na^+]_i$) az AP felszálló száránál, ezért a Na^+/Ca^{2+}-cseremechanizmus (NCX) átvált reverz üzemmódba, és az intracelluláris Ca^{2+}-terhelés rovására eltávolítja a Na^+-t a sejtből. Ez a reverz üzemmód csak nagyon rövid ideig áll fenn, és a NCX az AP fennmaradó részében „forward" üzemmódban működik, ami leggyakrabban szarkolemmális Ca^{2+} extrúziót okoz. A $I_{Na,késői}$ egy apró, de tartós befelé irányuló áram, amely egészséges szívizomsejtekben sokkal kisebb amplitúdójú, mint a $I_{Na,korai}$. Bizonyos patofiziológiai körülmények között azonban a $I_{Na,késői}$ sokkal nagyobb lehet, és Na^+ vagy Ca^{2+} túlterhelést okozhat, ami szívritmuszavarok kialakulásához vezethet.

A feszültségfüggő nátriumcsatornák szerkezete

A Na_v-k egy nagy póusképző pszeudotetramer α alegységből, járulékos β alegységekből és állványfehérjékből állnak. Eddig 9 különböző α alegységet azonosítottak ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$), amelyeket 9 különböző gén (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN8A, SCN9A, SCN10A, SCN11A) kódol. Amint olvashatjuk, a felsorolásból hiányzik az SCN6A és az SCN7A. Ennek az az oka, hogy az SCN6A elnevezést már nem használjuk, mivel ezt a gént korábban ortológnak találták az egér SCN7A génnel. Az SCN7A gént pedig Na_x-nek nevezik a szakirodalomban, mivel nem feszültségfüggő. Ez egy atipikus, nem inaktiválódó nátriumcsatorna, amelynek expressziója a

szenzoros cirkumventrikuláris szervekben elengedhetetlen a test folyadékháztartásának fenntartásához. Az Na_x-et homeosztatikus effektor neuronokban is kimutatták, például a vazopresszint kibocsátó magnocelluláris neuroszekretoros sejtekben, amelyek hipertónia és hipernatrémia hatására vazopresszint választanak ki a véráramba és fontos szerepet töltenek be az ozmoregulációban.

Az összes izoforma közül a $Na_v1.5$-öt tartják a domináns szív izoformának. A $Na_v1.5$ viszonylag érzéketlen a tetrodotoxinnal (TTX) szemben, amely tulajdonság még a későbbiekben szerephez jut a disszertációban. Ugyanakkor más TTX-érzékeny altípusok (a $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ és $Na_v1.8$) kifejeződéséről is beszámoltak a szívben. A 6 lehetséges β alegységet (β1, β1A, β1B, β2, β3, β4) négy gén (SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B) kódolja. Az α alegység önmagában elegendő a funkcionális csatorna kialakításához; a kiegészítő β alegységek azonban szükségesek a szabályos csatorna kinetika kialakításához és a sejtfelszíni expresszióhoz. A β alegységek modulálják a sejtfelszínen elérhető csatornák számát és szerepet játszanak a csúcsáramsűrűség szabályozásában. Továbbá a β alegységek a feszültségtartomány megváltoztatásával szabályozzák az aktiválódást, az inaktivációt és az inaktivációból való visszatérést.

A Na_v α alegységei körülbelül 2000 aminosavból állnak és négy domént (DI-DII-DII-DIII-DIV) alkotnak. Mindegyik domén hat transzmembrán szegmensből (S1-S6) áll. Az 1-4. szegmensek (S1-S4) a csatorna feszültségérzékelő doménjeként működnek. Ez a domén érzékeli a membrán depolarizációját, ami a csatorna aktiválódásához vezet. Az S1-S4 egy intracelluláris csatlakozón keresztül kapcsolódik a csatorna pórusképző doménjéhez, az S5-S6-hoz. A szelektivitási szűrő szintén a pórusdoménben helyezkedik el. Ez a nyitott pórus legszűkebb része, amelyet az áthaladó ionnal specifikusan kölcsönhatásba lépő fehérje-ligandumok bélelnek. Kulcsszerepet játszik a csatorna szelektivitásának szabályozásában, mivel szerkezetének/összetételének megváltoztatása a szelektivitás jelentős vagy teljes elvesztését eredményezi. Krisztallográfiás, mutagenezis és csatorna-blokkoló kötődésvizsgálatokkal feltárták számos nátriumcsatorna szelektivitási szűrő oligomer szerkezetét, összetételét és pórusméretét. A csatorna szelektivitási szűrőjét a négy domén S5 és S6 szegmensei közötti pórushurkok együttesen alakítják ki, az összes domén hozzájárul aminosav oldallánccal a DEKA szekvenciájú szűrőhöz. A pórus többi részét az S6 szegmensek veszik körül, és ezek alakítják ki a pórus intracelluláris oldalán az aktivációs kaput.

A Na_v küszöbértékéhez képest negatívabb membránpotenciálokon a csatorna nyitási valószínűsége alacsony. Depolarizáció hatására azonban az α alegység feszültségérzékelő S1-S4 doménjének konformációja megváltozik, ami az aktiválódási kapu és a Na_v gyors megnyílásához vezet. Ennek hatására a csatornán Na^+-ok áramlanak keresztül, mely a szívizomsejt membránjának további depolarizációját okozza, létrehozva az AP felszálló szárát. Néhány milliszekundummal később az inaktivációs kapu lezárja a csatorna pórusdoménjét, így nem vezető állapotot eredményez, a csatorna tehát gyorsan inaktiválódik.

A homológ domének intracelluláris doménközi hurkokkal (IDI/II, IDII/III és IDIII/IV) kapcsolódnak egymáshoz. Az inaktivációs kaput a legkisebb intracelluláris interdomén hurok (IDIII/IV) alkotja, mely „fedőként” funkcionál. Inaktivációkor lezárja a pórust, ahogy ezt az a korábbi kutatások során már leírták. Ezt a gyors inaktivációt a három aminosavból álló IFM motívum hozza létre a pórus intracelluláris oldalához bekötődve és elzárva az ionáramlás útját.

A csatorna gyors inaktivációja megakadályozza a túlzott depolarizációt, és hozzájárul a repolarizációhoz. Egyes szerzők szerint az inaktivációs kapu molekuláris komplexként alakul ki és stabilizálódik, amelyet az IDIII/IV és az α alegység C-terminálisánál elhelyezkedő hurok együttesen alkot. Az AP repolarizációja során a Na_v fokozatosan visszatérnek az inaktiválódott állapotukból, készen arra, hogy újra aktiválódjanak.

A INa,késői elektrofiziológiai azonosítása

Az emlősök szívizomsejtjei a Na_v izoformák széles skáláját expresszálják, amelyek egységnyi vezetőképességben, feszültségérzékenységben, kinetikában és gyógyszerérzékenységben is különböznek. A szívizomzatban a pórusképző alegység domináns izoformája a $Na_v1.5$, amely viszonylag érzéketlen a tetrodotoxin (TTX) hatására. A TTX-érzékeny („nem szív eredetű") Na_v-k ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$ és $Na_v1.6$) közül többről is kimutatták, hogy a szívizomzatban is jelen van. A sinuscsomó sejtjeiben az $Na_v1.5$ mellett az $Na_v1.1$ fejeződik ki a mérhető mennyiségben. Az $Na_v1.5$ többnyire a nagyobb sejtekben és azok perifériáján helyezkedik el, ezzel szemben az $Na_v1.1$ eloszlása egyenletes a sejten belül és a kisebb sejtekben is megtalálható. A pórusképző alegység mellett négy járulékos alegység (ß1, ß2, ß3 és ß4) és bizonyos állványfehérjék (scaffold) is részt vesznek a teljes komplex felépítésében, amely ezáltal a citoszkeletonhoz is képes kötődni. Ezek a molekulák kölcsönhatásba léphetnek egymással, és módosíthatják a tényleges csatorna kinetikáját és feszültségfüggését.

A későbbiekben tárgyalt mechanizmusok hozzájárulhatnak a $I_{Na,késői}$ AP alatti profiljához. E mechanizmusok jobb megértése hasznos lehet a $I_{Na,késői}$-t célzó új antiaritmiás terápiás stratégiák kifejlesztésében.

A késői nátriumáram tulajdonságai

A $I_{Na,késői}$ általában egy kicsi, de perzisztens áram. A szív AP platófázisában aktív, ezért az áram jelentős szerepet játszhat az AP időtartamának és alakjának meghatározásában. Ennek az ellentmondásnak (azaz, hogy egy apró áram nagy hatást gyakorol az AP-ra) egyik lehetséges magyarázatát a nettó membránáram adja. Az AP plató fázisában a sejtmembrán impedanciája magas, és Ohm törvénye szerint ebben a szakaszban a nettó membránáram kis változásai viszonylag nagy változásokat eredményeznek a membránpotenciálban és ennek következtében az AP időtartamában (APD) is.

A $Na_v1.5$ három különböző kapuzási módját írták le kamrai szívizomsejtekben. A tranziens mód (TM) a $I_{Na,korai}$ fő kapuzási módja. A burst mód (BM) és a késői elszórt mód (LSM) felelős a $I_{Na,késői}$-ért; azonban a BM nyitások száma gyorsan lecsökken, így a LSM lesz a $I_{Na,késői}$ fő kapuzási módja a plató fázis alatt. Ezenkívül egyes szerzők több inaktivációs folyamatot javasoltak, amelyek mindegyike az APD-t, a Na_v egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését és a sejt nátrium áramlási mérlegét szabályozza. A gyors inaktiváció csak az első milliszekundumokban zajlik, és a csatorna negatív membránpotenciáloknál kb. 5-10 ms alatt helyreáll. Ezt követi az intermedier inaktiváció, amely a gyors inaktivációhoz képest lassabban regenerálódik. A lassú inaktiváció a nyitott állapotból több száz milliszekundum alatt következik be, majd ezután az ultralassú inaktiváció másodpercekig is eltarthat.

Az „ablak nátriumáram” a Na_v jól ismert jelensége. Az állandósult állapotú aktiválódási és inaktivációs görbék közötti átfedés („potenciálok ablaka”) miatt a Na_v-k egy része képes az inaktivációból felépülni és újra megnyílni. Figyelembe véve azonban ennek az ablakáramnak a feszültségtartományát, messze az AP fiziológiás platópotenciálja alatt van, így nem valószínű, hogy jelentős szerepet játszik a $I_{Na,késői}$ kialakításában.

A $I_{Na,késői}$ profiljában markáns fajok közötti különbségek észlelhetőek. Az egyik gyakorlati különbség az AP alakja és időtartama, ami eltérő $I_{Na,késői}$ profilokat eredményez. Horváth és munkatársai, valamint Hegyi és munkatársai arról számoltak be korábban, hogy a $I_{Na,késői}$ áramsűrűsége tengerimalac és nyúl szívizomsejtekben hasonló mértékű a fő repolarizáló K^+–áramokhoz. Nyulakban ezen kívül nagyobb volt a $I_{Na,késői}$ pitvari áramsűrűsége, összehasonlítva a kamrákban mért adatokkal.

A $I_{Na,késői}$ fordított frekvenciafüggő tulajdonságokat mutat, azaz minél nagyobb az ingerlési frekvencia (szívfrekvencia), annál kisebb az áramsűrűség. A korai és a késői komponenseknél azonban eltérő változásokat tapasztaltak a korábban elvégzett kísérletek során. A mérések alapján a nagy frekvencián megfigyelhető magasabb $[Na^+]_i$–t elsősorban a korai komponens határozza meg, mivel a $I_{Na,késői}$ gyors ingerlés esetén lassan regenerálódik az inaktivációból. Emellett magasabb frekvenciáknál az APD általában lerövidül, így kevesebb idő áll rendelkezésre a $I_{Na,késői}$ aktiválódására. Ez az jelenti, hogy minél rövidebb az APD, annál kisebb a $I_{Na,késői}$ és a Na^+ beáramlás. Ezzel szemben bradikardia során az APD hosszabb és ebben az esetben nagyobb rövidtávú beat-to-beat variabilitást (SV) mutat. Ezekből az eredményekből arra lehet következtetni, hogy a bradikardia (amely fokozott $I_{Na,késői}$–mal jár együtt) erősen proaritmiás hatású lehet. Mivel a szívfrekvencia és az APD tekintetében jelentős fajok közötti különbségek vannak, a hosszú AP–lal rendelkező fajokban (pl. ember, kutya, tengerimalac) várhatóan nagyobb a $I_{Na,késői}$ és a Na^+–beáramlás, mint a rövidebb AP–lal rendelkező fajoknál (pl. patkány, egér).

A késői nátriumáram különböző kapuzási módjai

Nyugalmi membránpotenciálon (RMP) a $Na_v1.5$–k túlnyomó többsége zárt állapotban van. Depolarizáció hatására a $Na_v1.5$–k 1–2 ms alatt megnyílnak, majd gyorsan inaktiválódnak. Ez az áram hozza létre a $I_{Na,korai}$-t és az ingert nem keltő szívizomsejtek AP-jának felszálló szárát. Tartós depolarizáció során a $Na_v1.5$ ioncsatornák kis valószínűséggel újra megnyílhatnak. Kamrai szívizomsejtekben a $Na_v1.5$ aktiválódásnak három módját jellemezték egycsatornás kísérletekben, melyek a TM, a BM és a LSM. A $I_{Na,korai}$ főként a TM aktiválódás eredménye, míg a BM és a LSM a tartós nátriumáramért, a $I_{Na,késői}$–ért felelős. A tartós áramkomponens nagysága a depolarizáló impulzus kezdete után 50 ms–mal mért $I_{Na,korai}$–nak csak kb. 0,5–1%–a. A tartós depolarizáció során a BM megnyílások gyorsan csökkennek az első néhány tíz milliszekundumban, így a platófázis vége felé az LSM lesz a fő kapuzási mód, amely elsősorban a $I_{Na,késői}$–ért felelős.

A csatornafehérje mutációi és bizonyos betegségek megváltoztathatják a különböző $Na_v1.5$ aktiválódási mintázatok hozzájárulását a makroszkopikus áramhoz, így növelve a $I_{Na,késői}$-ot. Úgy tűnik, hogy minden egyes kapuzási mód külön gyógyszerérzékenységgel és gyógyszeraffinitással is rendelkezik. A gyors disszociációs kinetikájú gyógyszerek (például a lidokain) hatékonyak lesznek a korai extrasziszstolék ellen és döntően a tranziens kapuzási

módnál hatnak. Ezzel szemben a lassú disszociációs kinetikájú gyógyszerek (például a flekainid) a diasztolé végén is jelentősen gátolnak. Ez az elhúzódó gátlás a szívfrekvencia növekedésével fokozódik, mely kisebb mértékben a burst módot és jelentősebb mértékben a késői elszórt módot befolyásolja.

Ennek alapján bizonyos kapuzási módok szelektív farmakológiai célzása potenciális antiaritmiás vagy kardioprotektív hatással bírhat. A $I_{Na,késői}$ valódi kapuzási mechanizmusának jellemzése szintén közelebb vihet egy hatékonyabb terápiás protokoll kialakításához.

Az „ablak nátriumáram”

A legtöbb Na_v állandósult állapotú aktiválódásának és inaktivációjának feszültségfüggése átfedésben van egymással. Ez az átfedés egy olyan feszültségtartományt („ablakot”) biztosít, ahol az inaktiválódott Na_v–k képesek az inaktivációból kilépni, majd esetleg újra kinyílni. Amikor a tényleges membránpotenciál ebbe az átfedési „ablakba” esik, akkor tartós áram keletkezik. Fiziológiás körülmények között ez az ablak nátriumáram valószínűleg korlátozott szerepet játszik a $I_{Na,késői}$-ban, mivel a $Na_v1.5$ feszültségablaka -70 mV körül van, ami elég messze esik az AP platónál észlelt feszültség értékektől. Ráadásul az ablak feszültségtartományban az áramsűrűség kevesebb, mint 5%-a az egészséges szívizomsejtekben mért maximális áramsűrűségnek. Ebből következik, hogy az ablak nátriumáram valószínűleg nem a $I_{Na,késői}$ fő meghatározója az egészséges szívizomsejtekben. Azonban a megváltozott szabályozás bizonyos betegségekben vagy az egyes csatornafehérjék mutációi eltolhatják a Na_v–k egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggését, ezáltal jelentősen módosítva ezt a feszültségablakot, így megnövelve a $I_{Na,késői}$-ot ezen kóros körülmények között. A hosszú QT szindróma (LQTS) 3-as típusánál eddig három különböző mutációt azonosítottak. Ezek közé tartozik három aminosav deléciója (Lys-1505, Pro-1506 és Glu-1507, ΔKPQ), valamint két pontmutáció, az N1325S (Asp-1325 Szerinné alakul) és az R1644H (Arg-1644 Hisztidinné alakul) is.

„Nem egyensúlyi csatorna kapuzás”

A szívizomsejtek AP-ja során a membránpotenciál folyamatosan változik. A Na_v–k beépülnek ebbe a dinamikus rendszerbe. Clancy és munkatársai 2003-ban leírták, hogy a membránpotenciál változások előzménye modulálja a Na_v kapuzási állapotok közötti átmeneteket, amit „nem egyensúlyi kapuzásnak” neveztek el. Ennek eredményeképpen az inaktivációból való visszatérést is a feszültségváltozás dinamikája modulálja. Az elméletet kísérleti adatok támasztják alá, amelyek azt mutatják, hogy a repolarizáló feszültség rámpák vagy AP alakú feszültség parancsok alkalmazása nagyobb $I_{Na,késői}$-t idéz elő a hagyományos négyszög alakú impulzusokhoz vagy olyan modellszimulációkhoz képest, ahol a nem egyensúlyi kapuzás nem része a numerikus modellnek.

Egyéb típusú nátriumcsatorna izoformák a szívben

Ahogyan ez ismeretes az epilepszia és bizonyos vázizombetegségek kóros EKG-felvételekkel társulhatnak. Ezen vizsgálatok alapján felmerült a kérdés, hogy a nem szív eredetű Na_v mutációk okozhatnak-e elektromos elváltozásokat a szívben. A feltételezések

alapján később a $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ és $Na_v1.8$ izoformákat is azonosították a szívizomszövetben. Biet és munkatársai eredményei alapján a $I_{Na,késői}$ akár 44%-át is a nem szíveredetű Na_v-k adják a kutya kamrai szívizomsejtekben. Továbbá Yang és munkatársai kimutatták, hogy egerekben és nyúlban a TTX-rezisztens $Na_v1.8$ alkotja a $I_{Na,késői}$ jelentős részét. E kísérleti adatok alapján az izoforma specifikus Na_v modulátorok jó megközelítést jelenthetnek a későbbiekben az antiaritmiás terápia során.

A késői nátriumáram szerepe a szív fiziológiájában

Mivel a szív AP platófázisát kicsiny befelé és kifelé irányuló áramok közötti kényes egyensúly alakítja ki, ezért az ezekben az áramokban bekövetkező enyhe változás is jelentősen megváltoztathatja az AP időtartamát. A $I_{Na,késői}$ gátlása jelentősen lerövidíti a szív AP-t konduktív rendszerben és kamrai sejtekben is, ami arra utal, hogy a $I_{Na,késői}$ jelentősen hozzájárul az AP időtartamának létrehozásában.

A tartós nátriumáram szintén fontos szerephez jut a szinuszcsomóban található sejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak kialakításában. Az 1 μM-nál alacsonyabb koncentrációban alkalmazott tetrodotoxin csökkenti a spontán depolarizáció sebességét a szinoatriális sejtekben, ami egyértelműen jelzi, hogy a TTX-érzékeny $Na_v1.1$ izoforma is hozzájárul a szív ingerképzéséhez, azonban ezzel kapcsolatos százalékos eloszlást a szakirodalomban eddig nem találtunk.

A gyors válasz idejű AP-lal rendelkező szívizomsejtek között a szív Purkinje sejtjeinek van a legnagyobb AP időtartam (APD) frekvenciafüggése. A Purkinje sejtek AP-ja alacsonyabb stimulációs frekvencián hosszabb, míg magasabb frekvencián rövidebb, mint a kamrai sejtek AP-ja, amely tulajdonsághoz a $I_{Na,késői}$ is hozzájárul. Ennek eredményeként a Purkinje sejtek $I_{Na,késői}$ értéke alacsony szívfrekvencián jelentősen nagyobb, míg magas szívfrekvencián kisebb a kamrai sejtekhez képest. Ez az egyedülálló tulajdonság hajlamosítja a Purkinje sejteket arra, hogy triggerként szolgáljanak az aritmiák generálásában.

A $I_{Na,késői}$ szerepet játszik a pitvari AP kialakításában is. A $I_{Na,késői}$ várhatóan nagyobb a pitvarokban, mint a kamrákban, mivel a $I_{Na,korai}$ áramsűrűsége nagyobb a pitvari sejtekben hasonló körülmények között, ami arra utal, hogy a pitvari sejtekben nagyobb a Na_v-k expressziója. Másrészt a pitvari sejtekben az összességében pozitívabb membránpotenciál és a nátriumáram negatívabb állandósult inaktivációs feszültsége csökkenti a Na_v-k elérhetőségét. Luo és munkatársai egyik kísérletsorozatában a maximális $I_{Na,késői}$ áramsűrűség nagyobbnak bizonyult a nyúl bal pitvari szívizom sejtjeiben, mint a kamrai sejtekben. Egy másik vizsgálatban ezzel szemben a két sejttípus hasonlóan viselkedett, tehát nincs egyértelmű magyarázat ebben a kérdéskörben.

A $I_{Na,késői}$ szerepe a szívizomsejtek nátrium-homeosztázisában

A $[Na^+]_i$-t a sejtbe beáramló Na^+ és az intersticiális térbe távozó Na^+ dinamikus egyensúlya határozza meg. Az ingert nem keltő kamrai szívizomsejtek $[Na^+]_i$ értéke 4-8 mM körül van tengerimalacban, nyúlban és kutyában; patkányban és egérben pedig körülbelül kétszer ilyen

magas (9-14 mM) ez az érték. Az ingert nem keltő emberi szívizomsejtekben a $[Na^+]_i$ feltehetően 4-10 mM tartományban van.

A Na^+ a Na_v–kon, a NCX-on és a Na^+/H^+–cseremechanizmuson (NHE) keresztül juthat be a sejtbe. A Na^+ elsősorban a Na^+/K^+ pumpa (NKP) révén távozik a sejtből, de a szív AP első néhány milliszekundumában a reverz módú NCX is felelős a mérsékelt Na^+ kiáramlásért. Továbbá a Na^+/HCO_3^-kotranszport, a Na^+/Mg^{2+} cseremechanizmus és a $Na^+/K^+/2Cl$–kotranszport is kis mértékben szerepet játszhat a szívizomsejtek nátrium homeosztázisában. Ezen kívül azt is meg kell említeni, hogy a citoszol és az intracelluláris sejtszervecskék közötti Na^+ koncentrációk folyamatosan egyensúlyban vannak.

Ingerlés hatására a $[Na^+]_i$ egyenesen arányosan emelkedik az ingerlési frekvencia növelésével, amit a Na_v–on és az NCX–on keresztül történő nagyobb Na^+ beáramlás okoz. Az ingerelt szívizomsejtekben körülbelül 25 %–a Na_v–on keresztül történő Na^+ bejutás. A Na_v–on keresztül történő Na^+ beáramlás körülbelül egyenlő mértékben $I_{Na,korai}$ és $I_{Na,késői}$ között oszlik meg, azonban ez az eloszlás függ a szívfrekvenciától. A nagyobb Na^+ beáramlás az ingerelt sejtekbe egyidejűleg egy megnövekedett kiáramlással jár együtt az NKP fokozott működésén keresztül. Ezt főként a megnövekedett $[Na^+]_i$ okozza, de nitrogén–oxid–, és foszfolemmán–függő mechanizmusok is hozzájárulhatnak ehhez a hatáshoz.

Késői nátriumáram szerepe a szívbetegségekben

Egészséges szívizomsejtekben a $I_{Na,késői}$ amplitúdója kevesebb, mint 0,1%-a a $I_{Na,korai}$ csúcsértékének. Azonban az áram perzisztens, 100-400 ms-ig tart, ezért a $I_{Na,késői}$ által szállított befelé irányuló töltés összehasonlítható az 1-2 ms alatt létrejövő $I_{Na,korai}$ -mal. Az irodalomban egyes tanulmányok ezt „endogén” $I_{Na,késői}$-nak nevezik, és úgy gondolják, hogy nincs aritmiás tulajdonsága. A $I_{Na,késői}$ azonban megnövekedhet számos patofiziológiás állapot, például szívelégtelenség (SZE), hipertrófiás kardiomiopátia, öröklött LQTS 3-as típusa, oxidatív stressz vagy pitvarfibrilláció (PF) esetén. Ezenkívül az alacsony pulzusszám vagy a különböző farmakológiai intervenciók is megnövelhetik a $I_{Na,késői}$-ot. A $I_{Na,késői}$ fokozódik a szívizom iszkémiás-reperfúziós károsodásában és az iszkémia jellegzetes komponenseinek (pl. hipoxia, iszkémiás metabolitok, hidrogén-peroxid) jelenlétében is, amint azt a különböző feszültség-clampes kísérletek során dokumentálták.

A megnövekedett $I_{Na,késői}$ AP megnyújtó hatása SZE-ben is megfigyelhető. A megnövekedett $I_{Na,késői}$ Na^+ túlterhelést eredményez, ami az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) emelkedéséhez vezet, ahogyan ezt korábban a NCX kapcsán említettem. Az ezzel együtt járó kóros ingerületvezetés hirtelen halált okozhat a SZE-ben szenvedő betegekben. A vezetési sebességet a Na_v működése is meghatározza. A kamrai vezetőrendszerben (Purkinje rostok) a kamrai szívizommal ellentétben a lassú ingerlés nagyobb, míg a gyors ingerlés szignifikánsan kisebb $I_{Na,késői}$-ot eredményez. Ez a transzmurális inhomogenitás a szívritmuszavarok kiváltó oka lehet. Mindezek a mechanizmusok komplex kóros elektromos és mechanikai állapotokhoz vezethetnek, például kontraktilis diszfunkcióhoz, zavart szívizom-energetikához és ritmuszavarokhoz. A megnövekedett $I_{Na,késői}$ azokban az esetekben a leginkább aritmogén, amikor a repolarizációs rezerv már veszélyeztetett, például I_{Kr}-gátlókkal való kezelés során vagy a remodellált szívizomban.

A nátrium homeosztázis és az emelkedett $I_{Na,késői}$ szerepe a szívritmuszavarokban

A szívritmuszavarok patofiziológiája az általánosan elfogadott elmélet szerint egy proaritmiás szubsztrát, egy trigger és a vegetatív idegrendszer moduláló hatásának kombinációjából tevődik össze. A szívritmuszavarokat befolyásolják ezen kívül még a kardiális betegségek, egyéb társbetegségek és etiológiai tényezők is. A kóros $[Na^+]_i$ homeosztázis szerepet játszhat az aritmiára hajlamos szubsztrát létrehozásában, valamint a ritmuszavar generálásában. A szívelégtelen kísérletes modellek szívizomsejtjeiben a $[Na^+]_i$ körülbelül 2-6 mM-mal nagyobb, mint fiziológiás körülmények között. Egy nyomás- és térfogattúlterheléses nyúl SZE modellben Despa és munkatársai megnövekedett TTX-érzékeny Na^+ beáramlást találtak. Érdekes módon ez a nagyobb beáramlás nem csak az elektromosan stimulált szívizomsejtekben volt jelen, hanem a**z** ingert nem keltő munkaizomsejtekben is. Az ingerképző sejtekben a megnövekedett TTX-érzékeny Na^+-beáramlás legnagyobb valószínűséggel a $I_{Na,korai}$–nak köszönhető. Ennek a beáramlásnak a mögöttes mechanizmusa azonban még nem teljesen tisztázott a szívizomsejtekben.

Klinikai vizsgálatok - antiaritmiás gyógyszerfejlesztés

Mivel a $I_{Na,késői}$, a $[Na^+]_i$ és a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése aritmogén, ezért ilyen körülmények között hatékony antiaritmiás kezelésre van szükség. Kézenfekvő cél lehet a Na_v-k gátlása. A CAST és SWORD vizsgálatok kiábrándító eredményei azonban egyértelművé tették, hogy egyetlen ioncsatorna specifikus gátlása önmagában váratlan káros hatásokat eredményezhet. Az utóbbi időben inkább olyan szelektív inhibitorok iránti igény merült fel, amelyek képesek a $I_{Na,késői}$-ot gátolni anélkül, hogy a $I_{Na,korai}$-ra jelentős hatásuk lenne. A szelektivitás rendkívül fontos, mivel az áram korai komponensének blokkolása a vezetési sebesség csökkenéséhez, így vezetési blokkhoz és „reentry aritmiákhoz” vezethet.
Eddig számos inhibitort fejlesztettek ki, többek között ranolazint, eleklazint (GS-6615), lidokaint, GS-458967, GS-462808 és F15845-öt, azonban legtöbb kísérleti és klinikai vizsgálathoz elsősorban ranolazint használtak. Ezekkel az inhibitorral az a fő probléma, hogy feszültségfüggő módon működnek, szelektív $I_{Na,késői}$ gátló hatásukat főként a fiziológiásnál alacsonyabb membránpotenciálon fejtik ki és gátló hatásuk függ az ingerlési frekvenciától. Mivel a nátriumáram gátlása az ingerlési frekvenciával együtt nő, így ezek a szerek kisebb hatást gyakorolnak a $I_{Na,késői}$-ra bradikardiában, amikor a $I_{Na,késői}$ feltételezhetően jelentősen nagyobb, mint tachycardiában.

Célkitűzés

Viszonylagos fontossága ellenére a $I_{Na,késői}$ számos aspektusa még mindig kevéssé ismert. A nyúl, tengerimalac és sertés szívizomsejteken nyert részletes adatokkal ellentétben a natív, AP alatt élettani körülmények között megjelenő humán és kutya $I_{Na,késői}$-ról csak korlátozott számú kísérletes adat áll rendelkezésünkre, mivel ezeket a kísérleteket jellemzően hagyományos feszültség-clamp módszerrel, és legtöbbször szobahőmérsékleten végezték. Olyan APVC mérések, amelyek a sejt saját AP-ját használják parancsjelként, nem állnak rendelkezésre az irodalomban sem kutya, sem humán kamrai szívizomsejtekről.

1. Mivel a kutya kamrai szívizomsejteket általában a humán kamrai sejtek jó modelljének tartják elektrofiziológiai szempontból, ezért szerettük volna rögzíteni és összehasonlítani a $I_{Na,késői}$ AP alatti profilját kutya-, tengerimalac- és nem beteg emberi szívből nyert kamrai sejtekben. Ezzel egy lépést szerettünk volna tenni a kísérletes kardiológia azon célja felé, hogy keressünk egy olyan állatmodellt, amely helyettesítheti az igen korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló humán kamrai szövetmintákat.
2. A jelen disszertációban bemutatott kísérletek során APVC technikát használtunk a $I_{Na,késői}$ profiljának közvetlen rögzítésére az AP alatt a sejtek normál Ca^{2+} homeosztázisa során. Ezáltal meg szerettük volna jobban érteni a késői nátriumáram bal kamrai szívizomsejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak kialakításában játszott szerepét.
3. Vizsgálni szerettük volna továbbá, hogy a Na_v-k inaktivációját megakadályozó Anemone toxin II (ATX-II) hogyan változtatja meg a $I_{Na,késői}$ AP alatti profilját.
4. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a $I_{Na,késői}$ milyen szerepet tölthet be szívritmuszavarok kialakításában.
5. Meg szerettük volna vizsgálni, hogy a $I_{Na,késői}$ gátlása megvalósítható-e a $I_{Na,korai}$-tól teljesen függetlenül.
6. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy élesen különbözik-e a szelektívnek mondott $I_{Na,késői}$ gátlószerek, illetve az „általános” I/B osztályú Na_v gátlószerek esetén leírt frekvenciafüggő $I_{Na,késői}$ gátlás.

Anyagok és módszerek

Felhasznált preparátumok

Méréseinkhez kísérleti célra tenyésztett keverék kutyák és tengerimalacok szíveit, illetve transzplantációs célból eltávolított humán szíveket használtunk fel. A kísérleti állatokkal kapcsolatos valamennyi beavatkozás az Európai Parlament állatkísérletekre vonatkozó útmutatásának (2010/63/EU) megfelelően, illetve a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottság által jóváhagyott protokoll alapján (9/2015/DEMÁB) történt. A humán szövetek felhasználása a Helsinki Deklarációval összhangban, a Szegedi Egyetem és a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság által jóváhagyott protokollok alapján (4991–0/2010-1018EKU, 339/PI/010) történt.

A kísérleti célra tenyésztett, felnőtt, vegyes ivarú keverék kutyákat (8−12 kg-os testtömeg) 10 mg/ttkg ketamin-hidroklorid (Calypsol) és 1 mg/ttkg xylazin-hidroklorid (Sedaxylan) alkalmazásával altattuk. A hímnemű, 3-5 hónapos Hartley tengerimalacokat véralvadásgátlás (heparin 800 NE i.p.) után pentobarbitállal (100 mg/ttkg i.p.) altattunk. Az altatás mélységét a kétoldali szemhéjzárási reflexxel, a fájdalomérzés (lábujjak fájdalmas összecsípése) és az állkapocszárás tónusának vizsgálatával két percenként monitoroztuk. A műtéti beavatkozás azután kezdődött, amikor mindkét oldalon hiányzott a szemhéjzárási reflex, a fájdalomingert követően nem tapasztaltunk sem végtagelhúzást, sem légzési válaszreakciót, továbbá, amikor kutyáknál az állkapocs tónusa már legalább 6 perce (három egymást követő vizsgálatnak megfelelően) észrevehetően csökkent.

Az egészséges humán donorszívek olyan páciensekből származtak, akik nem kaptak gyógyszeres kezelést furoszemiden, dobutaminon, illetve plazmaexpandereken kívül. A szívekből a billentyűket transzplantációs célra eltávolították, a megmaradt kamrai szövetet használtuk fel kísérletes céljainkhoz. A szíveket az eltávolítást követően kardioplégiás oldatban tároltuk.

Kísérleteinkhez ezen kívül még multicelluláris preparátumokat is felhasználtunk, amelyek kutya, tengerimalac, emberi bal kamrai trabekulákból, valamint kutya jobb kamrai papilláris izmokból származtak.

Szívizomsejtek izolálása

A kutyák mellkasának megnyitását követően a szívet gyorsan eltávolítottuk, majd ezt követően a bal elülső leszálló koronária ágat (LAD) kanüláltuk, és ezen keresztül perfundáltuk a szívizomzatot Langendorff apparátus alkalmazásával. Az emberi sejtizolálás során is az úgynevezett anterográd szegmens-perfúziós technikát alkalmaztuk.

A perfúziót megkezdve 5 percig 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) Joklik által módosított oldatot (JMM, Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, termékszám: M0518; Sigma) alkalmaztunk, amellyel a szövet Ca^{2+} és vértartalmát távolítottuk el.

Ezután a preparátumot nagyjából 30 percig perfundáltuk ismét a JMM alapoldattal. Ezt az oldatot kiegészítettük még kollagenázzal (660 mg/l, 325 U/mg, Type II.), borjú albuminnal (2 g/l, Fraction V) és $CaCl_2$-al (50 μM) is. A sejtizolálás alatt a perfúziós oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk és az oldatokat mindvégig karbogénnel buborékoltattuk át. Az enzimatikus emésztést követően a LAD ellátási területének megfelelően félkör formájú metszést ejtettünk a szívcsúcs felé a kamrafal középső rétegében. Az elfolyósodott izomszövet réteget kis darabokra vágtuk, majd ezeket a darabokat 50 μM kalciumot tartalmazó módosított JMM oldatban szuszpendáltuk. Ezt a sejtszuszpenziót egyre növekvő kalciumkoncentrációjú módosított JMM oldattal többször ülepítettük, szűrtük és mostuk. Az izolálást követően a szuszpenzióban levő sejtek mintegy 30–60 %-a közel téglalap keresztmetszetű, éles szélű, ép citoplazmájú volt és szabályos harántcsíkolatot mutatott 1,3 mM ionizált kalciumot tartalmazó oldatban. A mérések során a megfelelő sejt kiválasztásához ezeket a tulajdonságokat figyeltük, mert ezek nagyban meghatározzák a sejtek életképességét.

A sejtizolálás végezte után két-három órával kezdtük el a méréseket. Felhasználásig a sejteket 14-16 °C-on tároltuk, Minimum Essential Medium Eagle oldatban (pH=7,4).

A tengerimalacok szívét az aortánál fogva Langendorff apparátusra rögzítettük, majd Tyrode oldattal (NaCl 135 mM, KCl 5.4 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, NaH_2PO_4 0.3 mM, HEPES 10 mM, glükóz 10 mM; pH=7.2 [NaOH]) 3-5 percig átmostuk. Ezt követően kalciummentes, 0,05 mM EGTA-val kiegészített Tyrode oldattal perfundáltuk a szívet 3 percig. Végül 25-30 percig kollagenázt (600 mg/l, 298 U/mg, Type II.) és proteázt (50 mg/l, Type XIV) tartalmazó, kalciummentes Tyrode oldattal történő perfúzió következett enzimatikus emésztés céljából. Ennek végeztével a bal kamrát apró darabokra vágtuk, majd a legutóbb leírt, kollagenázt és proteázt is tartalmazó oldatban inkubáltuk további 40, 60, illetve 80 percig 37 °C-on, hogy megkapjuk a izolált bal kamrai szívizomsejteket. Az inkubációs periódus végeztével a sejtszuszpenziót átmostuk és módosított, bikarbonátot is tartalmazó Tyrode oldatba (121 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,3 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM glükóz; pH=7,35; továbbiakban: BTy) helyeztük. A BTy oldat ozmolalitása 300±3 mOsm volt. A sejtszuszpenziót felhasználásig szintén 14-16 °C-on tároltuk.

Elektrofiziológiai mérések

Valamennyi kísérletünk kezdetekor a szívizomsejteket (vagy multicelluláris preparátumokat) megfelelő 0,5 ml térfogatú plexiüveg mérőkádba helyeztük, melyet egy invertált mikroszkóp (Nikon Eclipse TE2000-U vagy Diaphot 300) tárgyasztalába építettünk. A mikroszkópot egy rezgésmentes asztallal és Faraday-kalitkával együtt használtuk. A mérőkádat folyamatos 1-2 ml/perc sebességgel BTy oldattal perfundáltuk gravitáció-vezérelt perfúziós rendszerrel a mérések közben. Az ettől eltérő összetételű oldatokat az egyes fejezetekben külön említem. A mérőkádban levő oldatok hőmérsékletét egy hőmérsékletszabályzó (Cell MicroControls) segítségével állandó 37 °C hőmérsékleten tartottuk. Ennek az oldatnak az ozmolalitása 300 ± 3 mOsm volt. Ezt gőznyomásos ozmométerrel (Vapro 5520) ellenőriztük. Az oldatok pH-ját megfelelő mennyiségű HCl és NaOH (extracelluláris oldatok esetén) vagy KOH (intracelluláris oldatok esetén) hozzáadásával Orion 3 Star pH mérő készülék segítségével állítottuk be a kívánt értékre. BTy esetében a pH:7,35 volt, míg az intracelluláris oldatok esetében a pH-t 7,3 és 7,2-re állítottuk.

Az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez legtöbbször Multiclamp 700A és 700B erősítőket használtuk. Ettől eltérő esetben a mérőműszert külön részletezve említem a szövegben. A számítógépes vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 10.0 szoftvert alkalmaztunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot Digidata 1440A vagy 1332 analóg-digitális jelátalakító teremtette meg.

Patch-clamp technika

A mérésekhez 2-3 MΩ ellenállású boroszilikát mikroelektródákat (patch pipetta) használtunk. A patch pipettákat és a hegyes mikroeletródákat egyaránt a P-2000 típusú pipettahúzó segítségével készítettük el. Működési elvüket tekintve a piacon a platina vagy nikkel-króm filamenttel, illetve CO_2 lézerrel működő termékek kaphatóak. A P-2000-es típus lézerrel működik, ezért boroszilikát és kvarcüveg megmunkálására is képes. A piacon ez az egyik legkisebb hegyet előállító készülék, ezért esett erre a választásunk.

Az általánosan használt pipettában levő belső oldatunk az alábbi anyagokat tartalmazta: 120 mM K-aszpartát, 30 mM KCl, 3 mM MgATP, 10 mM HEPES, 3 mM Na_2-foszfokreatin, 0,01 mM EGTA, 0,002 mM cAMP, 10 mM KOH; pH=7,3. Az intracelluláris oldatok ozmolaritása: 285 ± 3 mOsm volt. Amely kísérleteknél az eredeti oldat módosítását alkalmaztunk, ott ezt külön feltüntetem a szövegben. A legtöbb kísérletnél nem, vagy csak minimális mennyiségben használtunk kalcium-kelátort. Szerettünk volna a fiziológiáshoz minél közelebbi állapotot elérni és szükségünk volt a sejtek folyamatos összehúzódásának biztosítására. Ezért használtunk az intracelluláris oldatban az ATP-t és a foszfokreatint is. A sejtek in vivo működését szerettünk volna leutánozni a lehető legmegfelelőbben. Az ATP-nek számottevő hatása van a feszültségfüggő áramok amplitúdójára és kinetikájára, ezért szerettük volna ezt standardizálni. Ezen kívül az ATP-függő K+-áramot is befolyásolhatja az ATP.

A pipetta hegyét a sejt felszínéhez érintve enyhe szívást alkalmaztunk, ezáltal egy nagyellenállású kapcsolat (2–8 GΩ; úgynevezett „gigaseal”) alakulhatott ki. A gigaseal kialakulása után további szívással, vagy 1–5 ms hosszú 1,5 V nagyságú elektromos impulzusok használatával törtük át a pipetta hegye alatti membrándarabot, hogy elérjük az egészsejtes elrendezést. A sejtek membránfelületének kapacitását minden kísérlet előtt 10 ms hosszú, −10 mV-ról −20 mV-ra történő hiperpolarizáció segítségével mértük meg, és az ionáramokat az így kapott sejtkapacitásra vonatkoztattuk. A mérési elrendezés teljes soros ellenállása átlagosan 3-8 MΩ volt, melyet 50–80 %-ban kompenzáltunk szükség esetén.

Az $[Ca^{2+}]_i$ nagyjából 100 nM-ra történő puffereléséhez (MaxChelator segítségével számított érték) a 1,2-Bisz(2-aminofenoxi)etán-N,N,N’,N’-tetraecetsav (BAPTA) Ca^{2+}-kelátort is tartalmazó pipettaoldatot használtuk: 85 mM K-aszpartát, 30 mM KCl, 25 mM KOH, 3 mM Mg-ATP, 10 mM HEPES, 3 mM Na_2-foszfokreatin, 0.002 mM cAMP, 10 mM BAPTA, 2,48 mM $CaCl_2$; pH=7.2.

Akciós potenciálok elvezetése egyedi szívizomsejtekről

A patch-clamp technika teljes sejtes elrendezésében, áram-clamp üzemmódban a sejteket folyamatosan 2 ms szélességű négyszög alakú impulzusok alkalmazásával ingereltük. Az áramimpulzusok amplitúdóját a küszöbinger 150 %-ára állítottuk, hogy az ingerlő jel és az AP

felszálló szára jól elkülönüljön egymástól. Az AP-okat 100 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk és tároltuk a későbbi értékelésig.

Az AP alakjának frekvenciafüggését vizsgáló kísérletek során az ingerlési ciklushosszt (CL) először 5 s-ra állítottuk, majd egyre csökkentettük a 0,5 s-os végső értékig. A tényleges mérések kivitelezése előtt legalább 100 ciklust vártunk, hogy beálljon az egyensúlyi állapot. A frekvenciafüggést először kontroll körülmények között (BTy oldatban) vettük fel, majd 10, 30 és 100 nM ATX-II-vel történő kezelés után rendre megismételtük.

Akciós potenciál feszültség-clamp

Méréseink során a patch-clamp technika teljes sejt konfigurációjában, a feszültség-clamp speciális, úgynevezett „akciós potenciál feszültség-clamp" (APVC) módszer két változatát alkalmaztuk tengerimalac, kutya és humán szívizomsejteken. Az egyik a sejt saját AP-ját használja feszültségparancsként (ún. „saját APVC" – sAPVC), míg a másik technikával egy korábban rögzített, „kanonikus" midmiokardiális AP-t használunk parancsjelként (ún. „kanonikus" APVC – cAPVC).

Az akciós potenciálokat áram-clamp üzemmódban rögzítettük a patch pipetta segítségével a BTy oldatban. A sejteket folyamatosan 700 ms CL-ú (1,43 Hz frekvenciájú; 85 ütés/perces szívfrekvenciának megfelelő), 1 ms széles, küszöb feletti, négyszög alakú impulzussal ingereltük úgy, hogy a stimulus műtermékét az akciós potenciál felszálló szárától jól el tudjuk különíteni. A *sAPVC* esetén minden sejtről 5-10 percig vezettünk el AP-okat 100 kHz-es mintavételi frekvenciával, majd ezek közül kiválasztottuk az adott sejtre leginkább jellemzőt. Ezt a jelet használtuk ugyanazon a sejten és ugyanolyan ingerlési frekvenciával feszültségparancsként, immár feszültség-clamp módban. Az így kapott „háttér" áramjel ($I_{háttér}$) — a kezdeti néhány ms kapacitív tranziensének kivételével — a nulla vonalban futó vízszintes görbe volt. A *cAPVC* kísérletek során egy korábban rögzített, „kanonikus" midmiokardiális AP-t használtunk parancsjelként. Ezen kísérletek során a háttéráram annál közelebb esett a nulla vonalhoz, minél inkább hasonlított a sejt saját AP-ja a kanonikus AP-hoz. A cAPVC legnagyobb előnye a sAPVC-vel szemben, hogy kiküszöböli az áramjelek azon különbségeit, melyek a sAPVC esetén az egyedi, csak az adott sejten alkalmazott feszültségparancsból adódnak. Ugyanakkor a sAPVC esetén a sejteken a leginkább fiziológiás feszültségparancs hatására létrejövő áramjeleket tanulmányozhatjuk.

Az áramjeleket mindkét APVC technika esetén az ún. „szekvenciális ionáramelkülönítés" módszerével rögzítettük. Ennek lényege, hogy az egyes ionáramokat specifikus gátlószereik megfelelő szekvenciában történő alkalmazásával meghatározhatjuk ugyanarról a sejtről. A feszültségparancs folyamatos alkalmazása során, a háttéráram ($I_{háttér}$) rögzítése után hozzáadjuk a perfúziós oldathoz az első vizsgálni kívánt áram specifikus gátlószerét, mely kimetszi a neki megfelelő áramot a háttéráramból (I_{szer1}). Ebből meghatározható az eredeti AP alatt folyó első áram profilja ($I_1 = I_{háttér} - I_{szer1}$). Ezt követően a további ionáramok szelektív gátlószereit alkalmazva meghatározhatóak az eredeti AP alatt folyó áramok (Az n-edik ionáram: $I_n = I_{szer(n-1)} - I_{szer(n)}$). Minden egyes szerrel legalább 5 percig perfundáltuk a sejteket, hogy a hatások teljesen kifejlődjenek.

Vizsgálataink az alábbi három jelentős tényező miatt nagyon jól közelítik az élettani körülményeket. A sejt saját AP-ját, vagy egy ahhoz nagyon hasonló „kanonikus" AP-t

használunk feszültségparancsként. Az intra-, és extracelluláris oldatokban élettani, vagy ahhoz nagyon hasonló folyadékösszetételeket alkalmaztunk. Továbbá nem avatkoztunk be exogén Ca^{2+}-pufferekkel a sejt saját kalciumháztartásába.

Hagyományos feszültség-clamp kísérletek

Kutya, tengerimalac és humán izolált szívizomsejteken is végeztünk hagyományos feszültség-clamp kísérleteket, négyszög alakú impulzusok parancsjelként történő alkalmazásával, állandó tesztpotenciálok mellett a $I_{Na,késői}$ áramsűrűségének és inaktivációs kinetikájának megállapítása céljából.

Ebben az esetben külső oldatként HEPES-t tartalmazó Tyrode oldatot használtunk, amely az alábbiakat tartalmazta (mM-ban): NaCl 144, NaH_2PO_4 0,4, KCl 4,0, $CaCl_2$ 1,8, $MgSO_4$ 0,53, glükóz 5,5 és HEPES 5,0; pH=7,4). Ezt az alapoldatot a kísérletek során 1 μM nizoldipinnel, 0,5 μM HMR-1556-tal és 0,1 μM dofetiliddel egészítettük ki a Ca^{2+}-, és K^+-áramok gátlása céljából. A pipettaoldat összetétele a következő volt (mM-ban): CsCl 125, TEACl 20, MgATP 5, EGTA 10, HEPES 10, pH=7,2).

A $I_{Na,késői}$-ot -120 mV-os tartófeszültségről 2 s hosszan −20 mV-ra történő depolarizációval határoztuk meg. Ezt a feszültségprotokollt alkalmaztuk a szerek alkalmazása előtt és után. Az áramgörbéket ezt követően kivonással határoztuk meg. A $I_{Na,késői}$ áramsűrűségét az impulzus kezdete után 50 ms-mal olvastuk le. Az áramintegrál meghatározásakor a kezdeti 20 ms-ot kizártuk az értékelésből, hogy minimalizáljuk a $I_{Na,korai}$ hozzájárulását a vizsgált áramgörbéhez.

A $I_{Na,késői}$ egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésének vizsgálata érdekében a −20 mV-os tesztpotenciál előtt 2 s hosszúságú, −130 és −40 mV közötti előimpulzusokat alkalmaztunk. Az ezen előimpulzusok során mért csúcsáramokat (I_{teszt}) a −130 mV-os előimpulzus során mért csúcsáramra (I_{max}) normalizáltuk, és ezeket a I_{teszt}/I_{max} arányokat a megfelelő előimpulzus-potenciálok függvényében ábrázoltuk. Az adatokat Boltzmann-függvénnyel illesztettük.

Akciós potenciálok elvezetése multicelluláris preparátumokból

Az AP-ok rögzítéséhez azért választottuk a multicelluláris preparátumokat (kutya-, tengerimalac-, és humán bal kamrai trabekulákat, illetve kutya jobb kamrai papilláris izmokat), hogy elkerüljük az izolált szívizomsejtek vizsgálatainak korlátait (például a sejtek közötti kapcsolatok hiánya vagy a csatornafehérjék esetleges károsodása). Ebben a kísérleti elrendezésben bizonyos szempontok szerint jobban helyettesíthetjük az in vivo körülményeket. A transzmembrán potenciálokat 3 M KCl-dal töltött üveg mikroelektródákkal rögzítettük, amelyek ellenállása 10-20 MΩ között volt. Ezeket az elektródákat egy nagy impedanciájú elektrométer (MDE GmbH, Heidelberg, Németország) bemenetéhez csatlakoztattuk. A preparátumokat egy platina elektródapárral 1 ms széles, a küszöbérték kétszeresének megfelelő amplitúdójú négyszög alakú impulzusokkal ingereltük 37 °C-on. A kísérletek megkezdése előtt a preparátumokat 1 s CL-on ingereltük legalább 60 percen keresztül.

Az 1 s CL-on történő ingerlést követően az ingerlés CL-át szekvenciálisan változtattuk 0,3-5 s között. Minden egyes CL-on a 25. AP-t rögzítettük, majd változtattuk a CL-t, így összességében egy egyensúlyi frekvenciafüggést rögzítettünk, viszonylag rövid idő alatt. Az AP-kat egy ADA 3300 adatgyűjtő kártyával (Real Time Devices Inc.) 100 kHz-es frekvencián digitalizáltuk, majd a későbbi elemzésig tároltuk. Miután valamennyi CL-on rögzítettük a

kontroll körülmények közötti adatokat, a preparátumokat 20 percig 2 μM TTX-nal (kutya, tengerimalac és humán bal kamrai trabekulák esetén), illetve 1 μM GS967-gyel vagy 40 μM mexiletinnel (kutya jobb kamrai papilláris izmok) perfundáltuk, majd megismételtük a CL váltási protokollt. Törekedtünk arra, hogy minden egyes kísérlet során fenntartsuk az eredeti elektróda pozíciót. Amennyiben az elektróda kimozdult a preparátumból, megkíséreltük az elektródát újra pozícionálni. Azonban, ha az újra pozícionálást követően rögzített AP paraméterei több mint 5%-kal eltértek a korábbi paraméterekhez képest, a kísérletet elvetettük.

Az APD rövid távú beat-to-beat variabilitásának meghatározása izolált szívizomsejtekben

Mivel a szomszédos sejtek kiegyenlítő hatása miatt az APD beat-to-beat variabilitása viszonylag kicsi a többsejtes preparátumokban, ezeket a kísérleteket izolált szívizomsejteken végeztük. Az 50 egymást követő akciós potenciálból álló sorozatokat elemeztük az APD beat-to-beat variabilitásának becsléséhez, amelyet rövidtávú variabilitásként (SV) határoztunk meg, a következő képlet szerint:

$$SV=\Sigma(|APD_{i+1}-APD_i|)/[n_{ütés}*\sqrt{2}]$$

ahol SV a rövidtávú variabilitás, az APD_i és az APD_{i+1} az i-edik, illetve az i+1-edik AP időtartamát jelöli a repolarizáció 90%-os szintjén, az $n_{ütés}$ pedig az elemzett egymást követő ütések számát. A SV változásait Poincaré-ábrák formájában mutatjuk be, ahol 50 egymást követő APD-értéket ábrázolunk, mindegyiket az előző AP időtartamával összehasonlítva.

Statisztikai elemzés

Az eredményeket számtani középérték ± számtani középérték körüli standard hibaként (SEM) fejezzük ki. A csoportok összehasonlításakor egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), Student-féle kétmintás t-próbát, illetve önkontrollos t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdéskörnek megfelelően. Az adatok közötti korrelációk meghatározásához lineáris regressziót használtuk. A korrelációkat Pearson-féle korrelációs koefficienssel (r), és az egyenes meredekségével (m) fejeztük ki. A korrelációs koefficiensek és meredekségek közti szignifikanciát szintén Student-féle t-próbával vizsgáltuk. Az n a vizsgált szívizomsejtek vagy multicelluláris preparátumok számát jelöli. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p kisebb volt, mint 0,05. Az adatok feldolgozása, elemzése és az ábrák készítése Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) és Origin 2015 programmal történt.

Eredmények

Az optimális TTX-koncentráció meghatározása

Először a $I_{Na,késői}$ elemzéséhez szükséges optimális TTX-koncentrációt határoztuk meg kutya kamrai szívizomsejtekben. Olyan TTX koncentrációt szerettünk volna használni, amely alkalmas a $I_{Na,késői}$ kellően nagy részének gátlására, lehetővé téve az áram valódi profiljának megjelenítését. A reprezentatív mérések azt mutatják, hogy a TTX hatása 10 µM-os koncentrációnál szaturálódik. Az adatok Hill-egyenlethez való illesztésével kapott koncentráció-áramsűrűség görbék alapján a 10 µM TTX az áram körülbelül 87% -os gátlását okozta. Ezért 10 µM TTX-t választottunk a $I_{Na,késői}$ vizsgálatára a későbbi feszültség-clamp kísérletekhez. Fontos megjegyezni, hogy ez a megközelítés valószínűleg kissé alábecsüli a $I_{Na,késői}$ áramsűrűségét és integrálját. Ennek megfelelően a magas TTX-affinitású „neuronális" Na_v-k működését nem monitoroztuk, és az alacsonyabb (nanomoláris) TTX-koncentrációk hatásait sem vizsgáltuk. Ez némileg torzíthatja a TTX-ra kapott fél maximális effektív koncentráció (EC_{50}) értékeket. Ezeket a méréseket 1 µM nizoldipin jelenlétében hajtottuk végre, hogy gátoljuk az L-típusú Ca^{2+} áramot, mivel a magas TTX koncentráció gátolja a Ca^{2+} áramot is korábbi kutatások szerint.

A kutya és tengerimalac kamrai sejtekben rögzített INa,késői valódi profiljai saját APVC körülmények között

A kutya $I_{Na,késői}$ –nál megjelent egy „decrescendo" profil, tehát az AP időbeli lefolyása alatt az amplitúdó monoton csökkent. Ezzel szemben a tengerimalac kamrai szívizomsejteknél az áram amplitúdója a plató fázis alatt nőtt, és csak a terminális repolarizáció során csökkent nullára, tehát egy „crescendo" profilt mutatott. Ezeket a különbségeket tükrözik a kutya- és tengerimalac sejtekben kapott áram-feszültség görbék. További kvantitatív mérésekkel vizsgáltuk a $I_{Na,késői}$ alakját, ezért meghatároztuk a TTX-érzékeny áramsűrűségét az APD_{90} 20%-ánál , 50%-ánál és 100%-ánál, ahol az APD_{90} a 90 %-os repolarizációnál mért AP hosszat jelenti. Ennek megfelelően a $I_{Na,késői}$ áramsűrűsége az APD_{90} 20%-ánál -0,52 ± 0,09 A/F volt a kutya sejtekben, míg -0,21 ± 0,05 A/F a tengerimalac sejtekben ($p < 0,05$). Ezzel szemben az APD_{90}-nál a $I_{Na,késői}$ áramsűrűsége nagyobb volt a tengerimalac sejtekben (- 0,78 ± 0,07 A/F), a kutya sejtekhez képest (- 0,03 ± 0,02 A/F, $p < 0,05$). Az APD_{90} 50%-ánál mért áramsűrűség nem különbözött szignifikánsan a két faj között. Bár a szállított össztöltés magasabb volt a tengerimalac sejtekben (86,2 ± 10,8 mC/F, n = 20/9) a kutya sejtekkel (67,1 ± 9,2 mC/F, n=7/4, $p < 0,05$) összehasonlítva, azonban az áramintegrálok hasonló tartományba estek.

A parancsfeszültség alakjának hatása a INa,késői profiljára kutya szívizomsejtekben

Ahogyan korábban említettük, a $I_{Na,késői}$ profilját kutya szívizomsejteken határoztuk meg APVC körülmények között, két eltérő kísérleti csoportban. Az első csoportnál kanonikus APVC-et használtunk, és a $I_{Na,késői}$-ot 1 μM nizoldipin (n=9/5) jelenlétében határoztuk meg. A második csoportban saját APVC-et használtunk nizoldipin jelenléte nélkül (n=7/4). Bár az áramdenzitás értékek valamivel kisebbek voltak nizoldipin jelenlétében, mégsem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között az APD_{90} 20%, 50% vagy 100%-ánál (-0,48 ± 0,08 versus - 0,52 ± 0,09 A/F, -0,30 ± -0,06 versus - 0,34 ± 0,06 A/F, és - 0,06 ± 0,02 versus a - 0,03 ± 0,02 A/F). Az integrálok hasonlóan alakultak (63,1 ± 9,2 mC/pF, n=9/5 versus a 67,1 ± 9,2 mC/pF, n=7/4).

Mivel az AP konfigurációról korábban kimutatták, hogy az APVC körülmények között befolyásolja az áramprofilokat, megvizsgáltuk, hogy a „decrescendo" típusú kutya $I_{Na,késői}$ megváltozik-e, ha kutya sejteken tengerimalac szívizomsejtekre jellemző feszültségparancsokat alkalmazunk. A kutya AP időtartamához illesztett kanonikus tengerimalac AP-okat és egy átlagos tengerimalac AP plató fázisára emlékeztető feszültség rámpa protokollt alkalmaztunk a következő kísérletsorozatban. A rámpa - 80 mV-ról indult, 10 ms-ot töltött + 40 mV-on, és 200 ms alatt - 20 mV-ra csökkent. Egyik változtatás sem volt képes a kutya „decrescendo" áramprofiljának átalakítására „crescendo", tengerimalacszerű $I_{Na,késői}$ profilra. Az áramintegrálok is hasonlóan alakultak a kutyasejtekben, függetlenül attól, hogy a parancs AP kutya vagy tengerimalac eredetű volt-e (63,1±9,2 mC/F, n=9/5 versus 65,4±10,7 mC/F, n=6/5).

Az ATX-II által indukált TTX-érzékeny áramprofil tengerimalac és kutya kamrai sejtekben

Korábbi kutatások alapján a zöld viaszrózsa (*Anemonia sulcata*) egyik toxinja (Anemone toxin II; ATX-II) a Na_v-k gyors inaktivációjának gátlása során a szívizomsejtekben a $I_{Na,késői}$-hoz hasonló áramot váltott ki. Tengerimalac szívizomsejtekben a TTX-érzékeny áram profilja hasonló volt 10 nM ATX-II hiányában és jelenlétében is, bár az áram amplitúdóját jelentősen megnövelte az ATX-II, azaz az áram mindkét esetben „crescendo" profilt mutatott. Ezzel szemben a kutya szívizomsejtekben gyakran megfigyeltünk EAD-kat, amikor 10 nM ATX-II-t perfundáltattunk keresztül a rendszeren 3 percig. Annak érdekében, hogy ezt elkerüljük a kutya sejteken alacsonyabb (1 nM) ATX-II-koncentrációt alkalmaztunk a végső kísérletsorozatban. A TTX-érzékeny áram ezekben a kutyasejtekben platószerű alakot mutatott, azaz az áramsűrűségek nagyrészt hasonlóak voltak 20%, 50% és 100% APD-nél az ATX-II jelenlétében. Az az áramprofil, amely a $I_{Na,késői}$ és az ATX-II által kiváltott áramkomponenst is tartalmazta jelentősen különbözött az ATX-II hiányában regisztráltaktól. Egy másik kísérleti elrendezésben, ahol csak az ATX-II-indukált áramot vizsgáltuk, az ATX-II-indukált áram mérsékelt „crescendo" jelleget mutatott a kutya szívizomsejtekben. A TTX-érzékeny áramintegrálok szignifikánsan nagyobbak voltak ATX-II jelenlétében (a kutya szívizomsejtek esetében 1 nM-os, míg a tengerimalac szívizomsejtek esetében 10 nM-os koncentrációt alkalmaztunk) a kontroll szívizomsejtekhez képest (kutya szívizomsejteknél: 102±13 mC/F, n=7/4 versus 67±9 mC/F, n=7/4; tengerimalac szívizomsejteknél 145±19 mC/F, n=5/3 versus 86±11 mC/F, n=20/9, mindkét esetben $p<0,05$). 1 nM ATX-II alkalmazása után az APD_{90} szignifikánsan nőtt a kutyasejtekben 214±13 ms-ról 257±17 ms-ra (43,2 ms-os átlagos megnyúlás, n=7/4, $p<0,05$), ellentétben a tengerimalac szívizomsejtekben mért adatokkal, ahol a 10 nM ATX-II által kiváltott növekedés (192±15-ről 212±20 ms-ra, 19,5 ms-os átlagos megnyúlás, n=5/3) statisztikailag nem volt szignifikáns. Ezek az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy a kutya szívizomsejtek sokkal érzékenyebbek az ATX-II-re, mint a tengerimalac szívizomsejtek. Azonban ami még ennél is fontosabb, hogy az ATX-II által indukált áramprofil eltér a kutya szívizomsejtekben a natív $I_{Na,késői}$-tól.

A humán, kutya és tengerimalac szívizomsejtekből felvett INa,késői tulajdonságainak összehasonlítása

A következő kísérletsorozatban a $I_{Na,\text{késői}}$ profilját (saját APVC körülmények között) és kinetikai tulajdonságait (hagyományos feszültség-clamp technikával) hasonlítottuk össze kutya-, emberi és tengerimalac kamrai szívizomsejtekben. A 20 µM TTX-érzékeny ionáramok hasonlóan alakultak az összes szívizomsejt típusban, amikor a membránpotenciált a -120 mV-os tartófeszültségről a -20 mV-os potenciálra változtattuk 1 µM nizoldipin, 0,1 µM dofetilid és 0,5 µM HMR-1556 jelenlétében. Amikor a TTX-érzékeny áram változását monoexponenciális függvényre illesztettük (a kezdeti 50 ms-os periódus kivételével), az inaktivációs időállandó átlagosan 60±3 ms (n=13/7) volt a kutya, 67±5 ms (n=5/3) a humán és 155±16 ms (n=5/3) a tengerimalac szívizomsejtekben. A $I_{Na,\text{késői}}$ inaktivációjának időbeli lefolyása tehát hasonló volt a humán és a kutya szívizomsejtekben, de szignifikánsan ($p<0,05$) lassabban következett be a tengerimalac szívizomsejtekben. A megfelelő átlagos áramsűrűség (amelyeket szintén monoexponenciális illesztési eljárással kaptunk) -0,56±0,04 A/F volt a kutya, -0,47±0,05 A/F a humán és -0,54±0,14 A/F a tengerimalac szívizomsejtekben. Ezek az értékek nem különböztek szignifikánsan egymástól. Az áramprofilok szintén nagyon hasonlóak voltak a kutya- és humán sejtekben (mindkettő „decrescendo” karakterisztikájú), míg a tengerimalacban a „crescendo” típus jelent meg.

A tetrodotoxin hatása az APD90-re multicelluláris humán, kutya és tengerimalac kamrai preparátumokban

A TTX sebességfüggő hatása az AP morfológiájára a három fajból származó multicelluláris kamrai preparátumokban. Minden preparátumot 2 μM TTX-szel perfundáltunk, és a méréseket az egyensúly beállta után végeztük. Az APD-t minden egyes ciklushossznál rövidítette a TTX. Az 1 s ciklushosszon mért TTX-indukált rövidülés az emberben volt a legnagyobb (67 ± 16 ms, n = 4/3), közepes (21 ± 4 ms, n = 5/5) a kutyában és legkisebb (11 ± 3, n = 7/7) a tengerimalac preparátumokban. A nyugalmi membránpotenciált és az AP amplitúdóját a TTX nem változtatta meg. A depolarizáció maximális sebességét (dV/dt_{max}) a TTX mérsékelten csökkentette: 310 ± 48-ról 259 ± 24 V/s-ra emberben, 231 ± 40-ről 169 ± 33 V/s-ra kutyában és 226 ± 32-ről 176 ± 21 V/s-ra tengerimalacban, azonban ezek a változások nem érték el a szignifikancia szintet - kivéve a kutya preparátumokat.

A GS967 és a mexiletin hatása akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között

Clancy és munkatársai „nem egyensúlyi kapuzási elmélete" alapján a Na_v kapuzását szorosan befolyásolja az alkalmazott feszültségprotokoll alakja. Ennek kapcsán a GS967 és a mexiletin $I_{Na,késői}$-ra gyakorolt hatását akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között is vizsgáltuk kanonikus midmiokardiális AP-okat használva parancsjelként. Az 1 μM GS967 és a 40 μM mexiletin befelé irányuló $I_{Na,késői}$ profilokat hozott létre, amelyeknek az áramsűrűsége (az APD_{90} 50%-ánál mérve) -0,37 ± 0,07 és -0,28 ± 0,03 A/F, az áramintegráljai pedig -56,7 ± 9,1 és -46,6 ± 5,5 mC/F értékűek voltak. Ezek a különbségek azonban statisztikailag nem voltak szignifikánsak. Mivel a Ca^{2+} és a K^+ áramokat a kísérlet megkezdése előtt blokkoltuk, a rögzített áramprofilokat a GS967 és a mexiletin által gátolt $I_{Na,késői}$-nak tekintjük a szabályos kamrai AP alatt.

A $I_{Na,késői}$ teljes sűrűségét és integrálját a kutya-izomsejtekben a referencia vegyületként alkalmazott TTX-nal kapott koncentráció-válasz görbék segítségével becsültük meg. A Hill-egyenlet maximális értéke adta a $I_{Na,késői}$ teljes nagyságát. Az 1 μM GS967 és 40 μM mexiletin által gátolt megfelelő áramsűrűségeket és integrálokat összehasonlítva ezekkel a TTX-nal kapott maximális értékekkel, a GS967 és a mexiletin gátló hatásait lehetett kifejezni százalékos formában. Ennek megfelelően a GS967 a teljes $I_{Na,késői}$-sűrűség 88%-át és a teljes $I_{Na,késői}$ -integrál 78%-át, míg a mexiletin a teljes $I_{Na,késői}$-sűrűség 67%-át, illetve a teljes $I_{Na,késői}$ -integrál 64%-át blokkolta. Ennél is fontosabb, hogy a GS967 és a mexiletin által gátolt áramprofilok eltérő alakúak voltak. A GS967-érzékeny áram monoton csökkent az AP során, hasonlóan a TTX-érzékeny áramhoz, míg a mexiletin érzékeny áram nyeregszerű profilt mutatott. Ez a különbség valószínűleg a GS967-nek a mexiletinnél háromszor gyorsabb disszociációjának tulajdonítható.

A GS967 és a mexiletin hatása az APD beat-to-beat variabilitására

Az emelkedett beat-to-beat QT intervallum variabilitás a kamrai aritmia jó előjelzője lehet a betegek széles körében, míg az egyes sejtek szintjén az APD beat-to-beat variabilitása használható (más néven rövidtávú variabilitás, SV). Mindkét paramétert az aritmia kockázat indikátorának tekintik. A többsejtes preparátumokkal ellentétben, ahol a szomszédos sejtek

hatékonyan kiegyenlíthetik az APD egyéni különbségeit, a SV az egyes sejtekben sokkal kifejezettebb, ezért a GS967 és a mexiletin SV-ra gyakorolt hatását izolált kamrai szívizomsejtekben vizsgáltuk, amelyeket 1 s-os állandó CL-szal ingereltünk. Ilyen körülmények között a SV-t 1 µM GS967 és 40 µM mexiletin is szignifikánsan csökkentette (GS967 esetében az SV csökkenés: 1,01 ± 0,19 vagy 42,1 ± 6,5%, p: 0,00137; Mexiletin esetében az SV csökkenés: 0,63 ± 0,2 ms vagy 24,6 ± 12,8%, p: 0,021, n=8). Az APD mérsékelten 32,5 ± 6,9 ms-mal az egyik, míg 41,4 ± 4,1 ms-mal rövidült meg a másik esetben (mindegyik $p<0,05$ és n=8). Mindezek a hatások nagyrészt reverzibilisek voltak kimosáskor. Mivel maga az APD is ismert, hogy befolyásolja a SV nagyságát, bevezettük a relatív SV (RSV) kifejezést. Ennek megfelelően RSV = dSV / dAPD, azaz a SV változását az APD változásához normalizáltuk. A RSV értéke szignifikánsan magasabb volt a GS967 esetében, mint a mexiletinnél (0,039 ± 0,007, p:0,0111 n=8 versus 0,015 ± 0,007, p:0,041 n=8). Ez a GS967 jobb antiaritmiás hatékonyságát jelezheti a mexiletinhez képest.

Megbeszélés

A megnövekedett $I_{Na,késői}$ számos szívbetegségben jelen van. A megnövekedett $I_{Na,késői}$ meghosszabbítja a szív AP-ját, növeli az $[Na^+]_i$-t, és a szívizomsejtek Ca^{2+}-túlterhelését okozza a forward módú NCX ellensúlyozása révén. Az emelkedett Ca^{2+} szint (főként a CaMKII-n keresztül) tovább növelheti a $I_{Na,késői}$-ot egy ördögi kört létrehozva. Ezek a patofiziológiai mechanizmusok együttesen a szív kontraktilis diszfunkcióját és szívritmuszavarokat eredményezhetnek. Az elhúzódó AP szubsztrátként viselkedhet, amely hajlamosít a ritmuszavarokra, míg a Ca^{2+}-túlterhelés kiváltó okként is szerepelhet. Úgy tűnik, hogy a $I_{Na,késői}$ patogenetikai szereppel rendelkezik, különösen a PF-ban és a bradikardia alatt fellépő kamrai aritmiákban.

Ahogyan azt a korábbiakban bemutattuk ebben a tanulmányban összehasonlítottuk a humán és kutya kamrai szívizomsejtek $I_{Na,késői}$ profilját saját APVC körülmények között. Ebből a szempontból eredményeink összhangban vannak Murphy és munkatársai eredményeivel, akik a kutya $I_{Na,késői}$ profilját mutatták be kanonikus AP-ok alkalmazásával. A legfontosabb eredményünk annak bizonyítása volt, hogy a kutyai szívizomsejtek viszonylag jó modellként használhatók a humán $I_{Na,késői}$ vizsgálatára - ellentétben a más emlősökből, köztük tengerimalacból, nyúlból és sertésből származó szívizomsejtekkel, mivel ez utóbbi fajok mindegyikében az áram „crescendo” profilt mutat. Ennek a fajok közötti különbségnek fontos következménye, hogy a $I_{Na,késői}$ relatív hozzájárulása az akciós potenciálok morfológiájához (az ezzel együtt járó Na^+ és Ca^{2+} terhelés, ami fokozott aritmia hajlamot eredményez) növekszik az APD megnyúlásával a „crescendo” csoportban, szemben a „decrescendo” csoporttal. Valószínűsíthető, hogy rövidebb APD esetén viszonylag kisebb a relatív szerepe. Érthetőbben, a $I_{Na,késői}$ amplitúdója a terminális repolarizáció idején a „crescendo” típusú fajokban a legnagyobb, következésképpen az APD meghosszabbodása (pl. HERG-csatorna gátló alkalmazása miatt) várhatóan nagyobb befelé irányuló $I_{Na,késői}$ áramot okoz (nagyobb Na^+ és Ca^{2+} terheléssel együtt). Ez a folyamat felnagyíthatja a K^+-csatorna gátlók APD-t meghosszabbító hatását. Mivel a $I_{Na,késői}$ gyakorlatilag inaktiválódik ebben az időben a „decrescendo” típusú preparátumokban, az APD megváltozása alig fogja módosítani a $I_{Na,késői}$-on keresztül történő Na^+-beáramlás nagyságát. Hasonló érvelés alapján a $I_{Na,késői}$ gátlók terápiás hatása (beleértve az APD rövidülését és a sejtek Na^+ és Ca^{2+} tartalmának csökkenését) várhatóan kevésbé lesz kifejezett a kutya és humán szívizomban, mint a tengerimalacból, nyúlból és sertésből származó hasonló preparátumokban. Ezt figyelembe kell venni, amikor a $I_{Na,késői}$ gátlószerekkel vagy módosító anyagokkal végzett farmakológiai vizsgálatok eredményeit értelmezik vagy extrapolálják emberi populációra, mivel néhány ilyen vegyülettel végzett vizsgálatot olyan fajokon végeztek, amelyek crescendo $I_{Na,késői}$ profilt mutatnak. A jelen eredmények alapján kutya kamrai szövetek vagy szívizomsejtek javasoltak a $I_{Na,késői}$-mal kölcsönhatásba lépő gyógyszerekkel végzett farmakológiai vizsgálatokhoz.

Azt is feltártuk, hogy miért növekszik a tengerimalac $I_{Na,késői}$ az AP plató alatt, míg a kutya és a humán $I_{Na,késői}$ csökken az AP időbeli lefolyása alatt. A kutya- és humán szívizomsejtekben a $I_{Na,késői}$ inaktivációs időállandója -20 mV-on 60-67 ms tartományban volt, következésképpen az áram a terminális repolarizáció idejére gyakorlatilag teljesen inaktiválódott. Ezzel szemben a tengerimalacban az inaktivációs időállandó sokkal hosszabbnak bizonyult (156 ms). Az

utóbbi esetben az inaktiváció kellően lassú volt ahhoz, hogy a Na_v-k jelentős része nyitva maradjon a terminális repolarizáció idejére. Következésképpen a Na^+ -okra ható növekvő befelé irányuló hajtóerő növelhette a $I_{Na,késői}$ amplitúdóját a lassú repolarizáció során tengerimalacban (és valószínűleg nyúlban és sertésben is). A tengerimalacban jól ismert „crescendo” $I_{Na,késői}$ profilt eredetileg Clancy és munkatársai „nem egyensúlyi kapuzás” elméletével magyarázták. Ez a modell a $I_{Na,késői}$ növekedését valószínűsíti a plató fázis alatt a tengerimalac rámpaszerű konfigurációjának következményeként. A tengerimalac AP-ok, valamint a repolarizációs rámpák parancsjelként való alkalmazása azonban nem tudta a kutyasejtek „decrescendo” $I_{Na,késői}$ profilját „crescendo” profillá alakítani, ami arra utal, hogy nem az AP konfiguráció, hanem a hagyományos feszültség-clamp kísérletek által feltárt 2,5-szer lassabb inaktivációs kinetika felelős a tengerimalac „crescendo” $I_{Na,késői}$ profiljáért. Mivel a $I_{Na,késői}$ egy részét a kutyaszívben a nem-kardiális Na_v-k működésének tulajdonítják lehetséges, hogy ezen TTX-érzékeny csatornák relatív hozzájárulása, illetve szabályozó alegységeik eltérései eltérőek a kutyában (és az emberben) a tengerimalachoz (és a sertéshez vagy nyúlhoz) képest. A $I_{Na,késői}$ különböző fajok közötti eltérő inaktivációs kinetikája azonban további vizsgálatokat igényel.

Itt kell megemlíteni, hogy az LQT3 szindrómáért felelős SCN5 mutációk széles skálája létezik, a mutáció helyétől és típusától függően a Na_v kapuzásának számos paramétere megváltozhat, mint például az inaktiváció és a visszatérés sebessége, az aktiválódás és az inaktiváció feszültségfüggése. Kijelenthetjük, hogy a $I_{Na,késői}$ szint emelkedése minden esetben kritikus és közös jellemző. Mivel a teljes Na_v populációnak csak nagyon kis hányada járulhat hozzá a $I_{Na,késői}$ generálásához (hasonlítsuk össze a $I_{Na,késői}$ néhány tíz pA-es amplitúdóját a Na^+ csúcsáram több nA-es amplitúdójával), a nátriumáram kapuzás makroszkopikus változásai patofiziológiai szempontból kevésbé relevánsak, mint a $I_{Na,késői}$ tényleges nagysága.

A jelen tanulmányban rávilágítottunk arra, hogy a kutyasejtekben APVC körülmények között rögzített ATX-II-indukált áram profilja jelentősen eltér a natív kutyai $I_{Na,késői}$ alakjától, mivel az ATX-II-indukált áram mindkét fajban „crescendo” profilt mutatott - hasonlóan a tengerimalac-, nyúl- és sertésszívek natív $I_{Na,késői}$-ához, de eltér a kutyai szívizomsejtekből rögzített natív $I_{Na,késői}$-tól. Ez összefüggheet azzal a jól ismert ténnyel, hogy az ATXII lassítja a Na_v-k inaktivációját. Az ATX-II-t széles körben használják a fokozott $I_{Na,késői}$ következményeinek farmakológiai utánzására, ami gyakran patológiás körülmények között figyelhető meg. A kutya szívizomsejtekben (vagyis azokban a sejtekben, amelyek a legjobb modellnek tűnnek a humán $I_{Na,késői}$ tanulmányozására) azonban ez a megközelítés félrevezető lehet a natív $I_{Na,késői}$ és az ATX-II által kiváltott áramprofilok között megfigyelt különbségek miatt. Ennek következtében az ATX-II-vel módosított Na_v-k a gyógyszerérzékenységükben is különbözhetnek a natív csatornáktól, ami megnehezíti az ATX-II jelenlétében kapott eredmények értelmezését.

A többsejtű kutya-, humán- és tengerimalac preparátumokból rögzített APD-ket 2 μM TTX rövidítette, amely hatás a humán preparátumokban volt a legnagyobb, a kutya preparátumokban közepes mértékű és a tengerimalac preparátumokban pedig a legkisebb. Ez a sorrend nem magyarázható a $I_{Na,késői}$ ismert (és jelenleg leírt) tulajdonságaival, mivel az áramsűrűségek és integrálok nagyrészt hasonlóak voltak a három fajban. Valószínűbb tehát, hogy a TTX-indukált rövidülés nagysága a szívizom tényleges repolarizációs tartalékától függ,

amely a humán szívizomsejteknél a legkisebb, a kutyában közepes erősségű, és a jelentős mértékű I_{Ks} mellett a tengerimalac kamrai szívizomban a legnagyobb. Ez egy további érv amellett, hogy kutya szívizomsejteket használjunk modellként a későbbiekben. Ez a repolarizációs tartalékban mutatkozó fajok közötti különbség (a kutya és a tengerimalac közötti) magyarázhatja a kutya magasabb ATX-II-érzékenységét is a tengerimalachoz képest. A kutya szívizomsejtekben 1 nM ATX-II kétszer nagyobb AP-megnyúlást okozott, mint 10 nM ATX-II a tengerimalac szívizomsejtek esetében. Amikor 10 nM ATX-II-t alkalmaztunk kutya szívizomsejteknél, akkor EAD-k kialakulását észleltük.

Az ezt követő kísérletsorozatunkban a GS967 (1 μM) és az I/B osztályú antiaritmiás gyógyszer (40 μM mexiletin) $I_{Na,késői}$-ra és $I_{Na,korai}$-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze kutya kamrai szívizomsejteknél a hagyományos mikroelektródás és akciós potenciál feszültség-clampes technikák kombinálásával. Megállapítottuk, hogy a $I_{Na,késői}$ szelektív blokkolójának tartott GS967 a $I_{Na,korai}$-ot is gátolja. Ez a gátlás hasonló a mexiletinéhez, de nagyobb hatékonyságú. A GS967-et feltételezett szelektív $I_{Na,késői}$-blokkoló jellege alapján korábban új VI. osztályú antiaritmiás szerként említették. A szelektív $I_{Na,késői}$-gátlás elméleti lehetőségének megkérdőjelezése nélkül azonban egy alternatív megközelítést is figyelembe kell venni. Érdekes és még mindig megoldatlan kérdés az, hogy a $I_{Na,késői}$ szelektíven blokkolható-e. Bizonyítékok utalnak arra, hogy a szívizomszövetben a Na^+ áramot a szívspecifikus $Na_v1.5$-kon kívül más Na_v-k is vezethetik, amelyekről feltételezték, hogy mind a $I_{Na,korai}$-hoz, mind a $I_{Na,késői}$-hoz hozzájárulnak. Szerepükre vonatkozóan azonban még mindig nincs megfelelő funkcionális bizonyíték, miközben jelentős fajközi különbségeket figyeltek meg. Ha ezek a csatornák a $I_{Na,késői}$-ban szerepet játszanak, de a $I_{Na,korai}$-ban nem, akkor farmakológiai gátlásuk szelektív $I_{Na,késői}$-blokádot eredményezhet. A GS967-ről azonban nem mutatták ki, hogy gátolja az ilyen típusú Na_v-kat, de arról beszámoltak, hogy gátolja a szív típusú $Na_v1.5$-kat. Ebből kifolyólag nehéz megbecsülni a neuronális típusú Na_v-k relatív hozzájárulását a GS967-érzékeny áramhoz.

A jelen eredményeket és az irodalmi adatokat összevetve valószínűsíthető, hogy egy, a GS967-hez hasonló kinetikai tulajdonságokkal rendelkező vegyület nagyon ígéretes antiaritmiás szer lehetne, mivel számos in vitro és in vivo vizsgálat alátámasztja a GS967 erős antiaritmiás hatását. Jobb kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a mexiletin (amint azt ez a tanulmány is mutatja) és a ranolazin, amelyről ismert, hogy elnyomja a $I_{Na,késői}$-ot. A GS967 nagy agyi penetrációval rendelkezik, amely tulajdonsága miatt a későbbiekben potenciálisan új antiepileptikus vegyületként lehetne használni. Jelenleg nem teljesen tisztázott, hogy a GS967 idegrendszerre gyakorolt hatásai kizárják-e a hatóanyag antiaritmiás szerként való alkalmazását, azonban egy olyan új szer, amely a GS967-tel megegyező kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, de nem mutat központi idegrendszeri mellékhatásokat, ígéretes jelöltnek bizonyulhat a jövőbeli fejlesztéshez.

A $Na_v1.5$-knak többféle nyitott és zárt állapota is lehet különböző gyógyszer-kötési tulajdonságokkal, amelyek az aktiválódott, az inaktiválódott és a nyugalmi csatornaállapotokat szabályozzák. Ennek megfelelően a csatornák kötőhelyeivel kölcsönhatásba lépő gyógyszerek a csatornák tényleges nyitott vagy zárt állapotától függően változó hatást gyakorolhatnak a $I_{Na,korai}$-ra és a $I_{Na,késői}$-ra. Ha egy gyógyszer gyorsan és nagy affinitással kötődik a nyitott és inaktiválódott csatornaállapotokhoz, és gyorsan disszociál a zárt nyugalmi

csatornaállapotokból, akkor nagy valószínűséggel nem a $I_{Na,korai}$-ot, hanem a $I_{Na,késői}$-ot gátolja. Ennek az az oka, hogy a csatorna zárt állapotában a gyógyszer teljesen disszociál a kötőhelyről, kivéve, ha a frekvencia nagyon magas vagy a CL rövidebb, mint a csatornáról való disszociáció. Következésképpen az, hogy egy gyógyszer szelektíven gátolja-e a $I_{Na,korai}$-ot vagy a $I_{Na,késői}$-ot, vagy mindkettőt, nagyban függ a stimulációs protokolltól, de kevésbé a meglévő specifikus $I_{Na,korai}$ vagy $I_{Na,késői}$ kötőhelyektől. A jelenlegi eredmények és a nemrégiben publikált adatok összhangban vannak ezzel a feltételezéssel, és nem támasztják alá azt a mechanizmust, amely a specifikus $I_{Na,késői}$-gátláson alapul, amely határozottan különbözik az olyan gyógyszerek, mint a mexiletin, lidokain, amiodaron és ranolazin esetében leírt I/B osztályú antiaritmiás hatásoktól. Ez a megközelítés összhangban van a ranolazin magas (38-szoros) szelektivitásával is a $I_{Na,késői}$-ra a $I_{Na,korai}$-mal szemben, amely az amiodaron esetében 13-szoros, a flekainid esetében pedig sokkal alacsonyabbnak (csak háromszoros) bizonyult.

A jelen és más eredmények alapján egyértelmű, hogy a GS967 erősen sebesség- és mérsékelten fajfüggő módon hat a $I_{Na,korai}$-ra. A GS967 számos preparátumban, többek között patkány, egér, nyúl és humán kamrai szívizomsejtekben széles koncentrációtartományban (0,1-1 μM) rövidítette az APD-át. A megnyúlt APD GS967-tel történő rövidülése a fokozott diszperzió és a repolarizáció rövidtávú változékonyságának csökkentését eredményezheti, amely változások gyakran megelőzhetik a Torsade de Pointes aritmiák kialakulását.

Összefoglalva, a GS967 - a mexiletinhez hasonlóan - gátolta a Na^+-áram korai- és késői komponenseit, és csökkentette az APD beat-to-beat variabilitását. Kinetikai tulajdonságai alapján a GS967 egy új és hatásos I/B osztályú antiaritmiás szernek minősíthető.

A jelen vizsgálat eredményei azt is sugallják, hogy a „szelektív" $I_{Na,késői}$-gátlók vizsgálatát az ingerületátviteli sebesség széles skáláján keresztül kell végezni, mivel az olyan gyógyszerek, mint a GS967 vagy a mexiletin hatása félreértelmezhető. Ezek a szerek a $I_{Na,korai}$-gátlás gyors offset (blokkból való helyreállás) kinetikájával rendelkeznek.

Ahogy azt korábban olvashattuk, patofiziológiai vizsgálatok sokasága vonta le azt a következtetést, hogy a szelektív $I_{Na,késői}$ gátlás kedvező antiaritmiás módszer számos kísérleti elrendezésben. Mindezen vizsgálatok ellenére a piacon lévő egyetlen olyan gyógyszer, amely szelektíven gátolja a $I_{Na,késői}$-t, a ranolazin, mely más ionáramokra is jelentősen hat. A ranolazin 2006 óta biztonságos és hatékony anginaellenes gyógyszer nagy elemszámú randomizált vizsgálatok alapján. Néhány újabb klinikai bizonyíték is utal rá, hogy a ranolazin kedvező hatást mutat PF-ban és kamrai aritmiákban. Helytállóbb kutatási eredményekhez több 3. fázisú klinikai vizsgálatra van szükség. A $Na_v1.8$ specifikus gátlókkal való célzott kezelése szintén érdekes új megközelítés a jövőbeni antiaritmiás gyógyszeres terápia szempontjából

Az értekezésben szereplő új kutatási eredmények

- Ez az első olyan tanulmány, amely bemutatja a humán és kutya kamrai $I_{Na,késői}$ profilját saját APVC körülmények között.
- A nem beteg humán kamrai sejtek tekintetében ez az első APVC technikát alkalmazó megfigyelés.
- Először bizonyítottuk, hogy a $I_{Na,késői}$-gátlók terápiás hatása (beleértve az APD rövidülését és a sejtek Na^+ és Ca^{2+} tartalmának csökkenését) várhatóan kevésbé lesz kifejezett a kutya és humán szívizomban, mint a tengerimalacból, nyúlból és sertésből származó hasonló preparátumokban. Ezt figyelembe kell venni, amikor a $I_{Na,késői}$ gátlószerekkel vagy módosító anyagokkal végzett farmakológiai vizsgálatok eredményeit értelmezik vagy extrapolálják emberi populációra, mivel néhány ilyen vegyülettel végzett vizsgálatot olyan fajokon végeztek, amelyek crescendo $I_{Na,késői}$ profilt mutattak.
- A jelen eredmények alapján a kutya kamrai szövetek vagy szívizomsejtek javasoltak a $I_{Na,késői}$-mal kölcsönhatásba lépő gyógyszerekkel végzett farmakológiai vizsgálatokhoz.
-A legfontosabb eredményünk annak bizonyítása volt, hogy a kutyai szívizomsejtek viszonylag jó modellként használhatók a humán $I_{Na,késői}$ vizsgálatára - ellentétben az irodalomban korábban leközölt más emlősökből, köztük a tengerimalacból, nyúlból és sertésből származó szívizomsejtekkel.
- Azt is elsőként feltártuk, hogy miért növekszik a tengerimalac $I_{Na,késői}$ az AP plató alatt, míg a kutya és a humán $I_{Na,késői}$ csökken az AP időbeli lefolyása alatt.
- Jelen vizsgálatok további fontos eredménye az volt, hogy kimutattuk, hogy a kutyasejtekben APVC körülmények között rögzített ATX-II-indukált áram profilja jelentősen eltér a natív kutyai $I_{Na,késői}$ alakjától.
- Az ATX-II-indukált áram a kutya és tengerimalac fajokban „crescendo” profilt mutatott (hasonlóan a tengerimalac-, nyúl- és sertés-szívizomsejtek natív $I_{Na,késői}$-ához) , de eltért a kutyai szívizomsejtekből rögzített natív $I_{Na,késői}$-tól. Ez összefüggheet azzal a jól ismert ténnyel, hogy az ATX-II lassítja a Na_v-k inaktivációját.
- Megállapítottuk, hogy a $I_{Na,késői}$ szelektív blokkolójának tartott GS967 a $I_{Na,korai}$-ot is gátolja. Ez a gátlás hasonló a mexiletinéhez, de nagyobb hatékonyságú.
-Először bizonyítottuk, hogy a GS967 a mexiletinhez hasonlóan gátolta a Na^+-áram korai és késői komponensét, továbbá csökkentette az APD rövidtávú variabilitását.
- Kijelenthető, hogy a $I_{Na,késői}$ gátlása nem valósítható meg a $I_{Na,korai}$-tól teljesen függetlenül.
- Nem különbözik lényegesen a szelektívnek mondott $I_{Na,késői}$ gátlószerek, illetve az „általános” I/B osztályú Na_v gátlószerek esetén leírt frekvenciafüggő $I_{Na,késői}$ gátlás.

Összefoglalás

Régóta ismert, hogy a $I_{Na,késői}$ hozzájárul az AP platójának kialakulásához, ezért az utóbbi időben egyre több kutatás célozza meg az áram antiaritmiás gyógyszerekkel vagy gyógyszerjelölt vegyületekkel történő modulálását. Ennek az áramnak számos aspektusa azonban még mindig kevéssé ismert. A jelen munka egyik célja a $I_{Na,késői}$ valódi profiljának vizsgálata és összehasonlítása volt kutya, tengerimalac és nem beteg emberi szívizomsejtekben. A $I_{Na,késői}$-ot tetrodotoxin-érzékeny áramként definiáltuk, APVC körülmények között rögzítettük, parancsjelként kanonikus- vagy saját AP-okat használva. APVC körülmények között a kutya- és humán $I_{Na,késői}$ amplitúdója monoton csökkent a plató fázis alatt (decrescendo profil), ellentétben a tengerimalacéval, ahol az amplitúdó növekedését észleltük (crescendo profil). A kutya $I_{Na,késői}$ decrescendo-profilját nem lehetett crescendo-morfológiává alakítani rámpaszerű parancsfeszültségek vagy tengerimalac szívizomsejtekből rögzített parancs akciós potenciálok alkalmazásával. A többsejtű kamrai preparátumokból hegyes mikroelektródával rögzített AP-ok tetrodotoxin hatására lerövidültek, amely hatás az emberi preparátumokban volt a legnagyobb, míg a kutyában kisebb, és a tengerimalac preparátumokban a legkisebb. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a $I_{Na,késői}$ viselkedésében jelentős fajok közötti különbségek vannak. Jelenleg úgy véljük, hogy a kutya szívizomsejtek jelentik a humán kamrai szívizomsejtek legjobb modelljét a $I_{Na,késői}$ tulajdonságai tekintetében.

A jelen munka másik célja a GS967 $I_{Na,késői}$-ra és az AP morfológiára gyakorolt hatásának vizsgálata volt kutya kamrai szívizomsejtekben APVC és hegyes mikroelektródás technika alkalmazásával. A GS967 (1 μM) hatását az I/B osztályú antiaritmiás vegyület, a mexiletin (40 μM) hatásával hasonlítottuk össze. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a GS967 elektrofiziológiai hatásai hasonlóak a mexiletin hatásaihoz. Ezen kívül a beat-to-beat variabilitást mind a GS967, mind a mexiletin szignifikánsan csökkentette.

Ezen eredményeket figyelembe kell venni a $I_{Na,késői}$-mal végzett farmakológiai vizsgálatok értelmezésekor és az emberre történő extrapoláláskor. Ennek megfelelően kutya kamrai szövetek vagy szívizomsejtek javasoltak a $I_{Na,késői}$ gátlókkal vagy módosítókkal végzett farmakológiai vizsgálatokhoz. A jelenlegi adatok humán akciós potenciál modellekbe történő beépítése a $I_{Na,késői}$ akciós potenciál morfológiában, aritmogenezisben és intracelluláris kalciumdinamikában betöltött szerepének jobb megértését eredményezhetik.

A késői nátriumáram jelentős szerepet játszik a szív elektromos és mechanikai működésében. A késői nátriumáram orvosi relevanciája számos szív- és érrendszeri betegség patofiziológiájában és kezelésében kiemelkedő. Ide tartoznak a már korábban említett szívritmuszavarok a prolongált akciós potenciálok és a triggerelt aktivitás vonatkozásában. Megemlíthetjük a szívelégtelenségben betöltött szerepét a kalcium túlterhelés és az energiafogyasztás kapcsán (az ionegyensúly fenntartásához több ATP szükséges). Fontos szót ejteni az iszkémiás szívbetegségekben fellépő iszkémiás reperfúziós károsodásról is. Jelenleg a ranolazinon kívül más szer nem használható a klinikai gyakorlatban, így további kutatások folynak annak érdekében, hogy új gyógyszereket fejlesszenek ki, amelyek célzottan csökkentik a késői nátriumáramot, javítva a különböző szívbetegségek prognózisát. Ennek megfelelően a késői nátriumáram gátlása ígéretes terápiás stratégia lehet ezen állapotok kezelésében.

DEBRECENI EGYETEM

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/492/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hézső Tamás
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068095

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kistamás, K., **Hézső, T.**, Horváth, B., Nánási, P. P.: Late sodium current and calcium homeostasis in arrhythmogenesis.
   Channels. 15 (1), 1-19, 2021.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2020.1854986
   IF: 3.493

2. **Hézső, T.**, Naveed, M., Dienes, C., Kiss, D. Z., Prorok, J., Árpádffy-Lovas, T., Varga, R., Fujii, E., Mercan, T., Topal, L., Kistamás, K., Szentandrássy, N., Almássy, J., Jost, N., Magyar, J., Bányász, T., Baczkó, I., Varró, A., Nánási, P. P., Virág, L., Horváth, B.: Mexiletine-like cellular electrophysiological effects of GS967 in canine ventricular myocardium.
   Sci. Rep. 11, 9565, 2021.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-88903-3
   IF: 4.996

3. Horváth, B., **Hézső, T.**, Kiss, D. Z., Kistamás, K., Magyar, J., Nánási, P. P., Bányász, T.: Late Sodium Current Inhibitors as Potential Antiarrhythmic Agents.
   Front. Pharmacol. 11, Article 413, 2020.
   DOI: http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.00413
   IF: 5.81

4. Horváth, B., **Hézső, T.**, Szentandrássy, N., Kistamás, K., Árpádffy-Lovas, T., Varga, R., Gazdag, P., Veress, R., Dienes, C., Baranyai, D., Almássy, J., Virág, L., Nagy, N., Baczkó, I., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P.: Late sodium current in human, canine and guinea pig ventricular myocardium.
   J. Mol. Cell. Cardiol. 139, 14-23, 2020.
   DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.12.015
   IF: 5

DEBRECENI EGYETEM * Egyetemi és Nemzeti Könyvtár *

DEBRECENI EGYETEM

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

5. Kovács, Z. M., Dienes, C., **Hézső, T.**, Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Szentandrássy, N.: Pharmacological Modulation and (Patho)Physiological Roles of TRPM4 Channel-Part 1: modulation of TRPM4.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (1), 1-24, 2022.
DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ph15010081
IF: 5.215 (2021)

6. Dienes, C., Kovács, Z. M., **Hézső, T.**, Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Szentandrássy, N.: Pharmacological Modulation and (Patho)Physiological Roles of TRPM4 Channel-Part 2: TRPM4 in Health and Disease.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (1), 1-34, 2022.
DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ph15010040
IF: 5.215 (2021)

7. Dienes, C., **Hézső, T.**, Kiss, D. Z., Baranyai, D., Kovács, Z. M., Szabó, L., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Gönczi, M., Szentandrássy, N.: Electrophysiological Effects of the Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Inhibitor (4-Chloro-2-(2-chlorophenoxy)acetamido) Benzoic Acid (CBA) in Canine Left Ventricular Cardiomyocytes.
Int. J. Mol. Sci. 22 (17), 9499, 2021.
DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179499
IF: 6.208

8. Horváth, B., Kiss, D. Z., Dienes, C., **Hézső, T.**, Kovács, Z. M., Szentandrássy, N., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P.: Ion current profiles in canine ventricular myocytes obtained by the "onion peeling" technique.
J. Mol. Cell. Cardiol. 158, 153-162, 2021.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.05.011
IF: 5.763

DEBRECENI EGYETEM * Egyetemi és Nemzeti Könyvtár *

DEBRECENI EGYETEM

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

9. Kiss, D. Z., Horváth, B., **Hézső, T.**, Dienes, C., Kovács, Z. M., Topal, L., Szentandrássy, N., Almássy, J., Prorok, J., Virág, L., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P., Magyar, J.: Late Na+ Current Is [Ca2+]i-Dependent in Canine Ventricular Myocytes.
Pharmaceuticals (Basel). 14 (11), 1142, 2021.
DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ph14111142
IF: 5.215

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 46,915
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 19,299

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.12.07.

DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár