

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A kardiális akciós potenciál időtartam beat-to-beat  
variabilitásának mechanizmusa**

**Kistamás Kornél**

**Témavezető: Prof. Dr. Magyar János**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2015**

# Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Bevezetés</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Irodalmi áttekintés</b> .....	<b>6</b>
3.1. A szívimsejtek akciós potenciálja .....	6
3.2. A szívimsejtek akciós potenciálját kialakító ionáramok és ioncsatornák jellemzése	7
3.2.1. A szívimsejt ioncsatornái és ionáramai .....	7
3.2.2. A bal kamrai akciós potenciálok transzmurális heterogenitása .....	10
3.3. A szívimsejtek kalcium homeosztázisának bemutatása .....	11
3.4. A kamrai aritmiák kialakulásának előrejelzése .....	14
3.5. Az akciós potenciál időtartam beat-to-beat variabilitása .....	15
3.5.1. A beat-to-beat variabilitás háttérében álló mechanizmusok .....	15
3.5.2. Szimulációs kísérletek a beat-to-beat variabilitás tanulmányozására .....	17
3.6. A beat-to-beat variabilitás meghatározása kísérletes körülmények között .....	18
3.7. A beat-to-beat variabilitás a gyakorlatban, mint lehetséges aritmia prediktor .....	19
3.7.1. A QT variabilitás index .....	20
3.8. A beat-to-beat variabilitás vizsgálatára használt állat- és sejtmodellek .....	21
<b>4. Célkitűzések</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Anyagok és módszerek</b> .....	<b>23</b>
5.1. A kamrai szívimsejtek izolálása .....	23
5.2. Elektrofiziológiai mérések .....	24
5.2.1. A szívimsejtek akciós potenciáljának elvezetése .....	25
5.2.2. Az akciós potenciál időtartam változtatása .....	26
5.3. Az akciós potenciálok analízise .....	27
5.4. A beat-to-beat variabilitás kvantitatív jellemzése .....	28
5.5. A sejtrövidülés mérése .....	29
5.6. Vegyszerek és oldatok .....	30
5.7. Statisztikai analízis .....	30
<b>6. Eredmények</b> .....	<b>32</b>
6.1. Az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitása a bal kamra falának különböző rétegeiben .....	32
6.2. Az akciós potenciál időtartam és a rövidtávú beat-to-beat variabilitás közötti összefüggés .....	34
6.2.1. Az elektrotónus injektálásával megváltoztatott akciós potenciál időtartam hatása a rövidtávú beat-to-beat variabilitásra .....	34
6.2.2. Az ingerlési frekvencia megváltoztatásának hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására .....	37
6.3. Az ionáramok szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásának meghatározásában .....	39
6.3.1. Outward áramok szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásának meghatározásában .....	39

6.3.2. Inward áramok szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásának meghatározásában.....	42
6.4. Az akciós potenciál időtartam és a rövidtávú beat-to-beat variabilitás közötti összefüggés további tanulmányozása.....	44
6.5. Az intracelluláris kalcium homeosztázis befolyásolásának hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására .....	47
6.5.1. Az intracelluláris kalcium koncentráció változásának hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására .....	47
6.5.2. A szarkoplazmatikus retikulumból történő kalcium felszabadulás szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásában.....	53
6.5.3. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásában .....	55
6.5.4. A kalcium homeosztázist befolyásoló szerek hatása a sejtrövidülés mértékére ...	56
6.6. A $\beta$ -adrenerg stimuláció hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására .....	58
6.7. A szöveti redox potenciál hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására .....	60
6.7.1. Redukáló környezet hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására.....	60
6.7.2. Oxidáló környezet hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására.....	60
6.7.3. A redox potenciál szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásában .....	61
6.8. Klinikumban is alkalmazott gyógyszermolekula hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására.....	64
<b>7. Megbeszélés.....</b>	<b>66</b>
7.1. Az akciós potenciál időtartam szerepe a rövidtávú beat-to-beat variabilitásban.....	66
7.2. Az ionáramok szerepe a beat-to-beat variabilitásban .....	68
7.3. Az intracelluláris kalcium szerepe a beat-to-beat variabilitásban.....	70
7.3.1. A szarkoplazmatikus retikulumból származó kalcium szerepe a beat-to-beat variabilitásban.....	71
7.4. A redox potenciál szerepe a beat-to-beat variabilitásban.....	72
7.5. Klinikai vonatkozások.....	73
<b>8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények.....</b>	<b>77</b>
<b>9. Összefoglalás .....</b>	<b>78</b>
<b>10. Summary .....</b>	<b>79</b>
<b>11. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>80</b>
<b>12. Tárgyszavak.....</b>	<b>96</b>
<b>13. Keywords.....</b>	<b>96</b>
<b>14. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>97</b>
<b>15. Függelék .....</b>	<b>98</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

$[Ca^{2+}]_i$	intracelluláris kalcium koncentráció
$[Ca^{2+}]_{SR}$	szarkoendoplazmatikus retikulum kalcium koncentráció
AP	akciós potenciál
APD	AP időtartam (a repolarizáció 90 %-ához tartozó időtartam)
DAD	késői utódepolarizáció (delayed afterdepolarization)
EAD	korai utódepolarizáció (early afterdepolarization)
EKG	elektrokardiogram
ENDO	szubendokardiális
EPI	szubepikardiális
$I_{Ca,L}$	L-típusú kalciumáram (L-type calcium current)
$I_{K1}$	befelé egyenirányító káliumáram (inward rectifier potassium current)
$I_{K-ATP}$	ATP-függő káliumáram (ATP-dependent potassium current)
$I_{Kr}$	késői egyenirányító káliumáram gyors komponense (rapid component of delayed rectifier potassium current)
$I_{Ks}$	késői egyenirányító káliumáram lassú komponense (slow component of delayed rectifier potassium current)
$I_{Kur}$	késői egyenirányító káliumáram ultragyors komponense (ultra rapid component of delayed rectifier potassium current)
$I_{Na}$	nátriumáram (sodium current)
$I_{to1}$	transziens kifelé irányuló káliumáram (transient outward potassium current)
$I_{to2}$	$Ca^{2+}$ -függő kloridáram (transient outward chloride current)
MID	midmiokardiális
NCX	$Na^+/Ca^{2+}$ cseremechanizmus ( $Na^+/Ca^{2+}$ exchanger)
PMCA	plazmamembrán $Ca^{2+}$ -ATPáz
RYR	rianodin receptor
SERCA	szarkoendoplazmatikus retikulum $Ca^{2+}$ -ATPáz
SR	szarkoendoplazmatikus retikulum
SV	rövidtávú variabilitás (short term beat-to-beat variability of APD)
TdP	Torsades de Pointes

## 2. Bevezetés

A szívelégtelenségben szenvedő betegek esetében a halálozások körülbelül feléért a hirtelen szívhalált okozó szívritmuszavarok tehetők felelőssé. Ez világszerte több, mint 500.000 halálesetet jelent évente. Ezért fontos olyan paraméterek keresése, amelyek előrejelzik ezen – a hirtelen szívhalált okozó – aritmiák kialakulását. Napjainkban a QT-intervallum időtartamának növekedését tekintik a kamrai szívritmuszavarok, különösen a Torsades de Pointes (TdP) típusú kamrai tachycardia rizikófaktorának<sup>154</sup>.

Újabb kutatások azonban megkérdőjelezték a megnövekedett QT-intervallum és az aritmiák kialakulása közötti összefüggést. Ismert ugyanis, hogy a különböző szerhatások okozta azonos mértékű QT-időtartam növekedés mellett nem ugyanakkora a TdP incidenciája<sup>18, 122, 159</sup>. Megfigyelték azt is, hogy ugyanazon szer különböző dózisainak proaritmiás hatása független a QT-intervallum időtartamától<sup>84, 153</sup>, sőt a sikeres antiaritmiás kezeléseknél sem feltétlenül következik be QT-időtartam rövidülés<sup>63, 116</sup>.

Kutyán és nyúlön végzett kísérletek azt bizonyítják, hogy a szer-indukálta TdP aritmiák esetében a QT-időtartam beat-to-beat variabilitása hatékonyabban előrejelzi a ritmuszavar kialakulását, mint maga a QT-időtartam növekedése<sup>105, 153</sup>. Állandó szívfrekvencia esetén, az egymást követő ütéseknel a kamrai repolarizáció véletlenszerű változásai (QT-intervallum) ütésről-ütésre (beat-to-beat) történő variabilitásban manifesztálódnak<sup>97</sup>. Ezen eredmények alapján feltételezhető tehát, hogy a csökkent beat-to-beat variabilitás antiaritmiás hatású, míg a kritikusan megnövekedett variabilitás a QT-intervallum időtartamától függetlenül kamrai aritmiákra hajlamosít. Ezért a repolarizáció beat-to-beat variabilitásának kvantitatív meghatározása egy olyan paraméter lehet, ami előrejelezheti a proaritmiás állapotokat. A repolarizáció időbeni változásának meghatározására különböző módszerek használata javasolt, így a klinikumban is használatos QT-intervallum variabilitás index, vagy a kísérletesen alkalmazott akciós potenciál időtartam (APD) rövidtávú variabilitásának a mérése (rövidtávú variabilitás – short term beat-to-beat variability of action potential duration, SV)<sup>135, 152, 153</sup>.

Feltételezzük, hogy a SV eredete multifaktoriális, így befolyásolja az ioncsatornák sztochasztikus viselkedése<sup>131</sup> (mely felelős az ionáramok fluktuációiért), az intracelluláris kalcium koncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ )<sup>139</sup> és a sejtek közötti elektromos kapcsolatok<sup>67</sup>.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A szívizomsejtek akciós potenciálja

Valamennyi élő sejtre jellemző, hogy a membrán két oldala között potenciálkülönbség áll fenn, az intracelluláris tér elektronegatívabb az extracelluláris térhez képest. A nyugalmi membránpotenciál értéke sejttípustól függően  $-50$  és  $-90$  mV között változhat. A nyugalmi membránpotenciál eredete többféle mechanizmusra vezethető vissza.

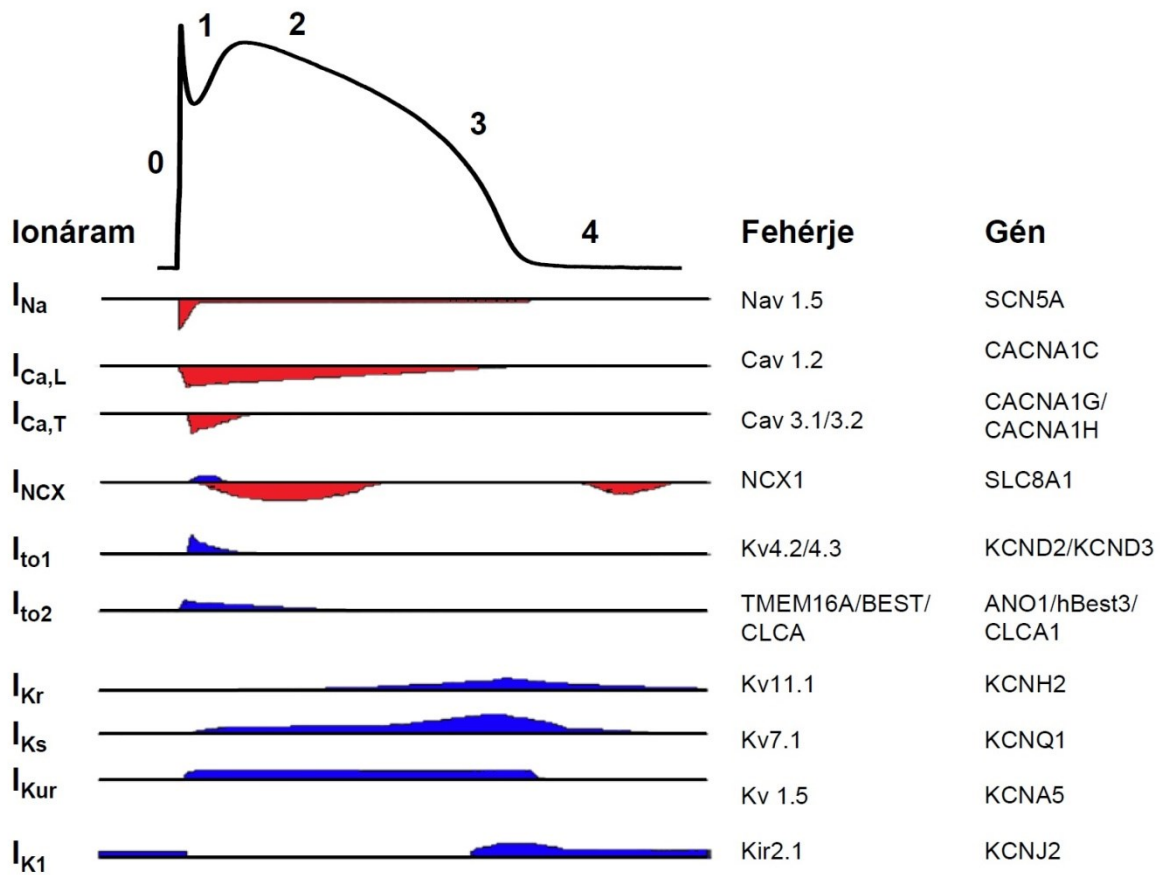
A nyugalmi membránpotenciál elektrofiziológiai módszerekkel mérhető, illetve a Goldman-Hodgkin-Katz egyenlet alapján számítható. Ennek értelmében a nyugalmi membránpotenciál értéke annak az ionnak az egyensúlyi potenciáljához áll közel, amelyekre nézve a sejtmembránnak a legnagyobb a permeabilitása.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+}[K^+]_e + P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{Ca^{2+}}[Ca^{2+}]_e + P_{Cl^-}[Cl^-]_e}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{Ca^{2+}}[Ca^{2+}]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}$$

#### 1. egyenlet

ahol  $V_m$  az aktuális membránpotenciál értéke,  $R$  az egyetemes gázállandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet,  $F$  a Faraday-konstans,  $P$  a membrán adott ionra vonatkoztatott permeabilitása, valamint az  $[ion]_e$  és  $[ion]_i$  az adott ion extra- (e) illetve intracelluláris (i) koncentrációja<sup>68, 83</sup>.

A kamrai szívizomsejtek esetén a nyugalmi membránpotenciál értéke  $-80$  mV, köszönhetően a nagy nyugalmi  $K^+$  konduktanciának, melyért a befelé egyenirányító káliumáram (inward rectifier potassium current,  $I_{K1}$ ) felelős. A szívizomsejtek akciós potenciálját (AP) öt fázisra szokás felosztani (**1. ábra**). A nulladik fázis során, a gyors, feszültségfüggő  $Na^+$  csatornák aktiválódnak, ami létrehozza az AP felszálló szárát. Az első fázis egy gyors, rövid ideig tartó repolarizáció, mely kialakításáért a tranziens kifelé irányuló áram felelős. Ennek van egy 4-aminopiridin érzékeny komponense (tranziens kifelé irányuló káliumáram – transient outward potassium current,  $I_{to1}$ ) valamint egy  $Ca^{2+}$ -függő kloridáram komponense (transient outward chloride current,  $I_{to2}$ ). A második fázis során – plató-fázis – aktiválódik az L-típusú kalciumáram (L-type calcium current,  $I_{Ca,L}$ ) és a késői káliumáramok. Ennek hatására emelkedik az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint, így további depolarizáció jön létre. Ezt követi a harmadik fázis, mely során az  $I_{Ca,L}$  inaktiválódását számos káliumáram fokozatos aktiválódása egészíti ki. Ebben fontos szerep jut a késői egyenirányító káliumáram lassú és gyors komponensének (slow/rapid component of delayed rectifier potassium current,  $I_{Ks}/I_{Kr}$ )



**1. ábra: A kutya bal kamrai munkaizomsejtek jellemző akciós potenciálja és annak ionáramai.** A számok az akciós potenciál fázisait jelölik. Piros szín jelzi a befelé irányuló (inward) áramokat, míg a kék szín a kifelé irányulókat (outward). Az ábra jobb oldalán az ionáramokért felelős ioncsatornákat kódoló gének és fehérjék láthatók. Varró és munkatársának közleménye alapján módosítva<sup>162</sup>.

és végül a terminális repolarizációban résztvevő – már említett –  $I_{K1}$ -nak. Az automatíát mutató nodális sejtekkel (sinus csomó, atrioventrikuláris csomó) ellentétben a kamrai sejtek stabil nyugalmi membránpotenciállal rendelkeznek (elektromos diasztole), mely a repolarizáció befejeztével, a fennmaradó nagy  $I_{K1}$  konduktancia által jön létre, kialakítva az AP negyedik fázisát.<sup>35</sup>

### 3.2. A szívizomsejtek akciós potenciálját kialakító ionáramok és ioncsatornák jellemzése

#### 3.2.1. A szívizom ioncsatornái és ionáramai

A humán és kutya szívizomban az SCN5A-gén (3. kromoszóma) által kódolt  $Na_v1.5$  csatornán keresztüli  $Na^+$  beáramlás felelős az AP felszálló száráért. A  $Na^+$  csatornák egy körülbelül 260 kDa tömegű pórusformáló  $\alpha$  alegységből valamint járulékos  $\beta$  alegységekből állnak. A funkcionális csatorna létrehozásához az  $\alpha$  alegység jelenléte önmagában is

elegendő, azonban a csatorna működésének szabályozásához a  $\beta$  alegységekre is szükség van. A felnőtt emberi szívben  $\beta 1$ - $\beta 4$  alegységek találhatóak, melyek amellet, hogy befolyásolják a csatorna feszültségfüggését és inaktivációs kinetikáját, szabályozzák a csatornadenzitást is a felszíni membránban<sup>38</sup>. A  $\text{Na}^+$  csatornák egy kis populációjára jellemző, hogy fenntartott depolarizáció során nem inaktiválódnak teljesen, vagy újra aktiválódhatnak, ezáltal létrehozva a késői nátriumáramot (late  $I_{\text{Na}}$ ), mely jelentős szereppel bírhat az AP időtartam és a platópotenciál kialakításában<sup>36, 88, 111</sup>. A  $\text{Na}^+$  csatornák az olyan I. osztályú antiaritmiás szerek támadáspontjai, mint például a lidokain vagy a flekainid. Hatásukra lassul az ingerületvezetés, így az elektrokardiogram (EKG) QRS-komplexumának kiszélesedését okozzák. Kísérletes körülmények között gyakran alkalmazott gátlószerük a tetrodotoxin.

Szívizomban a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák két típusát írták le, a T- és az L-típusú kalciumcsatornát. Kamrai munkaizomsejteken elsősorban az L-típusú kalciumcsatorna fordul elő. Legfontosabb feladatuk a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok sejt belsejébe juttatása és a kontrakciós mechanizmus beindítása<sup>39</sup>. Szívizomsejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák négy alegységből épülnek fel, melyek közül a legfontosabb a 190-250 kDa tömegű  $\alpha$  alegység. A csatorna szerkezeti felépítése nagyban hasonlít a  $\text{Na}^+$  csatornáéhoz,  $\alpha$  alegysége négy homológ doménből áll, melyekben azonos helyet foglal el a feszültség szenzor (S4) és a pórusformáló szegmens (S5-S6). Szintén az  $\alpha$  alegység tartalmazza az aktivációs és inaktivációs kapukat, valamint a gyógyszerek és toxinok kötőhelyeit. Az  $\alpha$  alegység 661 aminosavból álló C-terminusa (és a hozzá kihorgonyozott kalmodulin) kritikus fontosságú a csatorna  $\text{Ca}^{2+}$ -függő inaktivációjában és a csatorna működésének szabályozásában<sup>110, 128, 186</sup>. Az intracelluláris  $\beta$ , valamint a transzmembrán elhelyezkedésű  $\alpha 2\delta$  alegységek szintén szabályozó szereppel bírnak. Az L-típusú kalciumcsatorna  $\alpha$  alegysége a  $\text{Ca}_v1.2$ , melyet a 12-es kromoszómán elhelyezkedő CACNA1C-gén kódol<sup>141</sup>. A csatorna aktivációjához jelentősebb depolarizáció (~30 mV) szükséges. A  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna gátlószerük – mint például a verapamil vagy a diltiazem – a IV. osztályú antiaritmiás szerek közé tartoznak. Hatásukra megnő az EKG-on az RR- és PQ-távolság<sup>147</sup>. További gátlószerük például a nifedipin vagy a nifedipin.

Egy szívizomsejt AP-ja során számos káliumáram aktiválódik, mint például a korai és a késői repolarizációban részt vevő káliumáramok. A  $\text{K}^+$  csatornáknak öt típusát különböztetjük meg: (1) a hat transzmembrán egységből és egy pórusformáló egységből álló (6TM/1P) feszültségfüggő  $\text{K}^+$  csatornák, (2) a két transzmembrán és egy pórusformáló egységből álló (2TM/1P) befelé egyenirányító  $\text{K}^+$  csatornák, (3) a négy transzmembrán és két pórusformáló egységből álló (4TM/2P)  $\text{K}^+$  csatornák, (4) a hat transzmembrán és egy pórusformáló egységből (6TM/1P) valamint a két transzmembrán és egy pórusformáló egységből álló (2TM/1P) szegmensek dimerizációjából létrejött 8TM/2P  $\text{K}^+$  csatornák és (5) a

hét transzmembrán egységből álló (7TM)  $K^+$  csatornák<sup>72</sup>. A továbbiakban kizárólag a kamrai AP releváns káliumcsatornái kerülnek bemutatásra.

A feszültségfüggő  $K^+$  csatornák kapuzására jellemző, hogy az aktivált állapotból inaktív állapotba kerülnek, ebből az állapotból a csatorna újra nyitható. Az ioncsatornák inaktivációja kétféle lehet. Az N-típusú inaktiváció során – melyet a „ball-and-chain” modell ír le – a csatorna intracelluláris része elzáródik az N-terminus által. A C-típusú inaktivációban viszont a hosszantartó depolarizáció és konformáció változás hatására a csatorna extracelluláris része záródik<sup>132</sup>.

Az AP kezdetén a depolarizáció hatására gyorsan aktiválódik és inaktiválódik a  $K_v4.2$  és  $K_v4.3$  csatornák alakította tranziens áram, a  $I_{to1}$ , melyeket a KCND2 és KCND3 gének kódolnak (7. és 1. kromoszóma). A csatorna  $\alpha$  alegysége mellett egyéb járulékos fehérjék is részt vesznek a csatornák szabályozásában, mint például a KCNE2 gén kódolta MinK-related peptide 1 (MIRP1), valamint a KCNIP2 gén által kódolt  $K_v$  channel interacting protein 2 (KChIP2). A MIRP1 a csatorna kinetikáját, míg a KChIP2 a csatorna membrándenitását szabályozza<sup>183</sup>. A  $I_{to1}$  az első fázis során hozza létre az emlős miokardiumra jellemző „spike-and-dome” („tüske és kupola”) AP morfológiát. Gátlószerei a 4-aminopiridin és a kinidin.

A késői egyenirányító  $K^+$  áram ( $I_K$ ) három komponensét írták le: lassú ( $I_{Ks}$ ), gyors ( $I_{Kr}$ ) és ultragyors komponens ( $I_{Kur}$ ). A  $I_{Ks}$  pórusformáló alegységét a  $K_v7.1$  (korábbi nevén  $K_vLQT1$ ) fehérje alkotja, melyet a 11. kromoszóma KCNQ1 génje kódol. Funkcionális működéshez szükséges továbbá a MinK peptid alkotta járulékos alegység (KCNE1 gén)<sup>15</sup>. A  $I_{Ks}$  lassú aktivációját követően – inaktivációs kapu hiányában – a csatorna a feszültségtől függően deaktiválódik. A deaktiváció során a csatorna nyitott állapotból közvetlenül zárt állapotba kerül (inaktív állapot nélkül). Az alegységek génjeit érintő mutációk hozzájárulnak a veleszületett hosszú QT szindróma 1-es és 5-ös típusát (long QT syndrome 1 és 5, innen a csatorna korábbi neve)<sup>166</sup>. A  $I_{Kr}$  gyorsabban aktiválódik, mint a  $I_{Ks}$ , inaktivációs mechanizmusa gyorsabb, mint az aktivációs, így depolarizáció hatására a csatornák rövidebb idő alatt kerülnek inaktív állapotba, mint nyitottba és ez a repolarizáció kezdetéig így is marad. Az inaktivációból történő visszatérés gyors, amit a csatorna lassú deaktivációja követ. Az így reaktivált  $I_{Kr}$  az egyik legfontosabb repolarizáló áram, azonban az említett mechanizmusnak köszönhetően a plató fázis alatt a  $I_{Kr}$  amplitúdója közel nulla<sup>143</sup>. A membránpotenciáltól függő aktiváció és deaktiváció időállandói fajok közötti eltéréseket mutathatnak, például humán és kutya sejtek gyors késői  $K^+$  árama lassabban deaktiválódik, mint a  $I_{Ks}$ <sup>161</sup>. A  $K_v11.1$  fehérje (7. kromoszóma KCNH2 gén által kódolt) alkotta  $I_{Kr}$ -csatorna  $\alpha$  alegységéhez a KCNE2-gén kódolt MiRP1 és járulékos alegységként a MinK is kapcsolódhat. A két gén mutációja a hosszú QT szindróma 2-es és 6-os típusát okozza<sup>42, 44</sup>. A

$I_{Kur}$  a pitvari sejtek repolarizációjáért felelős, azonban a kamrai sejteken nincs jelen<sup>120</sup>. Az antiaritmiás szerek III. osztályát a repolarizációt lassító  $K^+$  csatorna blokkolók alkotják. Ilyenek például a *d*-sotalol, dofetilid vagy bretylium.

A befelé egyenirányító  $K^+$  csatornákra (inward rectifier,  $K_{ir}$ ) jellemző a 2TM/1P felépítés, valamint az, hogy csak aktivációs kapuval rendelkeznek. A legfontosabb csatornaalkotó fehérjének a  $K_{ir}2.1$ -et tartják, melyet a 17. kromoszómán található KCNJ2 gén kódol<sup>181</sup>. Azonban érdemes megemlíteni, hogy a legújabb nomenklatúra idesorolja a KCNJ12 és KCNJ4 által kódolt  $K_{ir}2.2$  és  $K_{ir}2.3$  alegységet is<sup>101</sup>. A csatorna elnevezése arra utal, hogy a  $I_{K1}$  esetében – ugyanakkora hajtóerő esetén – nagyobb mértékű inward áram jön létre mint outward áram. Azonban fontos hozzátenni, hogy fiziológiásan a membránpotenciál értéke mindig pozitívabb, mint a kálium egyensúlyi potenciálja ( $E_K$ ), így a csatornán keresztül outward áram folyik. Az áram amplitúdója körülbelül  $-70$  mV-ig nő, majd  $-20$  mV körül szűnik meg (deaktiválódik). A csatorna egyenirányító tulajdonságaiért az intracelluláris  $Mg^{2+}$  és poliaminok felelősek<sup>114</sup>. Mivel a csatornák az AP alatt  $-20$  mV-nál pozitívabb membránpotenciál értékek esetén deaktiválódnak és csak kellően negatív feszültség esetén nyílnak újra, nem ellensúlyozzák a plató fázis alatt a depolarizáló áramokat. A  $I_{K1}$  gátlására a  $BaCl_2$ -ot használják.

Az említett ioncsatornákon kívül, a kamrai sejteken expresszálódik az ATP-függő  $K^+$  csatorna is, amely létrehozza az ATP-függő  $K^+$  áramot ( $I_{K-ATP}$ ). Ez az ioncsatorna ( $K_{ir}6.2$  fehérje és SUR2A járulékos alegység, melyeket a 11. kromoszómán elhelyezkedő KCNJ11 és a 12. kromoszómán elhelyezkedő ABCC9 gének kódolnak) fiziológiás körülmények között zárt állapotban van, azonban ATP-szint csökkenésre (pl.: hipoxia és iszkémia) aktiválódik és további repolarizációt eredményez, vagyis rövidíti az APD-ot<sup>99</sup>. Aktiválására lemakalimot, míg gátlására glibenklamidot alkalmaznak.

A repolarizációban részt vesznek a  $Ca^{2+}$ -függő kloridcsatornák is. Feltehetőleg a TMEM16A (transmembrane protein 16A) nevű fehérje alkotta csatorna hozza létre a már említett  $Ca^{2+}$ -függő  $I_{to2}$ -ot mely az első fázis során aktiválódik<sup>176</sup>.

### 3.2.2. A bal kamrai akciós potenciálok transzmurális heterogenitása

Számos állatmodell esetén leírták, így a kutya<sup>107</sup>, macska<sup>62</sup>, vadászgöreyény<sup>29</sup>, nyúl<sup>58</sup>, sertés<sup>144</sup>, tengerimalac<sup>31</sup> és humán<sup>57</sup> szíven is, hogy a kamrafal különböző rétegei között markáns AP morfológia eltérések tapasztalhatók. A humán és kutya kamrafal legnagyobb részét, tehát magát a szívizomzatot a midmiokardiális sejtek (MID) alkotják. A MID sejteken kívül azonban megtalálható egy néhány sejsornyi régió a szívfal külső (szubepikardiális, EPI)

és belső (szubendokardiális, ENDO) oldalán. A MID és EPI sejteken ún. „spike-and-dome” konfigurációjú AP-ok mérhetők. Az EPI sejteken sokkal markánsabb a kezdeti gyors repolarizáció, mint a MID sejteken. Ezzel szemben az ENDO sejteken minimális a korai repolarizáció, amelynek az oka, hogy ezeken a sejteken kisebb a  $I_{to1}$  denzitása, mint a MID és EPI sejteken. Érdekes módon a szív eltérő régióiban a  $K_{v4.3}$  csatornafehérje mindenhol jelen van, különbség mutatkozik viszont a járulékos alegység, a KCHIP2 kifejeződésében<sup>133</sup>. További érdekesség, hogy az áram denzitása az életkorral is változik. Újszülött, 50-60 napos és kifejlett (10 hónapnál idősebb) kutya EPI sejteken a  $I_{to1}$  az életkor előrehaladtával folyamatosan nő<sup>94</sup>. Munkacsoportunk korábban leírta, hogy az EPI sejteken 50 %-kal nagyobb  $I_{to1}$  és  $I_{Ks}$  áramdenzitás és csatorna expresszió tapasztalható, mint a MID sejteken. Ezzel szemben a  $I_{Na}$ -ért felelős  $Na_v1.5$  fehérje kétszeres mennyiségben fordul elő a MID sejteken, mint az EPI sejteken<sup>145</sup>. Alacsony (0,2 Hz) és magas (3,3 Hz) frekvenciával történő ingerlés esetén a legkifejezettebb AP hosszváltozást a MID sejteken mérhetjük, míg az ENDO és az EPI AP-ok időtartama kevésbé változik. Az AP morfológia és a frekvencia-függő sajátosságok figyelembevételével, nagy biztonsággal megállapítható, hogy egy adott sejt a kamrafal melyik rétegéből származik.

### 3.3. A szívimsejtek kalcium homeosztázisának bemutatása

A szívimsejtek  $Ca^{2+}$ -homeosztázisa alatt a sejtben végbemenő  $Ca^{2+}$  szintet fokozó és  $Ca^{2+}$  eltávolító mechanizmusok finoman szabályozott egyensúlyát értjük, mely elengedhetetlen a sejtek normális működéséhez.

A sinus csomóban képződött ingerület (AP) tovaterjed a szív távolabbi régiói felé. A kamrai sejteken a depolarizáció hatására megnyíló  $Na^+$  csatornák AP-t váltanak ki. Ezt a depolarizációt érzékelik a T-tubulusban elhelyezkedő  $Ca_v1.2$   $Ca^{2+}$  csatornák feszültség-szenzorai, mely  $Ca^{2+}$  influxot eredményez. A  $Ca^{2+}$  beáramlás ( $I_{Ca,L}$ ) a sejt intracelluláris raktáraiból (szarkoendoplazmatikus retikulum, SR) történő  $Ca^{2+}$  felszabadulást eredményez. Ez a folyamat a  $Ca^{2+}$  indukálta  $Ca^{2+}$  felszabadulás ( $Ca^{2+}$  induced  $Ca^{2+}$  release, CICR), mely a 2-es típusú rianodin receptorokon keresztül történik (RYR2). Ezt az teszi lehetővé, hogy a T-tubulus  $Ca^{2+}$  csatornái és a SR üregrendszere a juncionális résben ún. diádokat alkotnak, mely komplexum integritásáért a junctophilin 2 fehérje felelős<sup>142</sup>. Egy ilyen komplexumban 10 db  $Ca^{2+}$  csatornára körülbelül 100 db RYR2 jut. Az  $[Ca^{2+}]_i$  megemelkedéséért legnagyobb részben a SR-ból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulás a felelős. Az egyedi RYR2-okon elemi  $Ca^{2+}$  felszabadulási események,  $Ca^{2+}$  sparkok alakulnak ki, amelyek kumulálódnak és gyors tovaterjedő  $Ca^{2+}$  hullámot ( $Ca^{2+}$  tranziens) formálnak, majd a

megemelkedett  $[Ca^{2+}]_i$  kontrakciós fehérjéket aktivál. Az excitációs-kontrakciós kapcsolat (elektromechanikai csatolás) eredménye a sejt és a szívizom szisztole alatti kontrakciója.

A RYR2 egy ~550 kDa tömegű, homotetramer felépítésű, nagy vezetőképességű, de alacsony szelektivitású ioncsatorna a SR membránjában. Nevét egy mérgező növényi alkaloid, a *Ryania speciosa* szárában és gyökerében megtalálható rianodintról kapta<sup>60</sup>. A négy alegység mindegyike tartalmaz egy transzmembrán és egy intracelluláris domént. A C-terminális régiót tartalmazó TM-domén hozza létre a pórusformáló alegységet és felelős a csatorna kapuzásáért. Az intracellulárisan elhelyezkedő N-terminális régió különböző szabályozófehérjék kapcsolódási helye, mint például a FKBP12.6 (FK506-binding protein 12.6 kDa, más néven calstabin2)<sup>98, 103</sup>. A rianodin receptor másik két típusa leginkább a vázizomzatban (RYR1) és az agyban (RYR3) expresszálódik. A RYR2 működését befolyásolja a dihidropiridin szerkezetű  $Ca^{2+}$  csatorna, az ATP és  $Mg^{2+}$  koncentráció. A SR  $Ca^{2+}$  tartalmának csökkentése a RYR2 záródásához vezet.

A kétféle – forward és reverz – módban működő  $Na^+/Ca^{2+}$  cseremechanizmus (NCX) a szarkolemmában megtalálható elektrogén, másodlagosan aktív antiporter fehérje. Forward módban 1  $Ca^{2+}$ -ot távolít el a sejtől és vele egyidőben 3  $Na^+$  kerül a sejt belsejébe. Amikor a sejtmembrán depolarizált,  $Na^+$ -ok kerülnek az intracelluláris térbe (az AP felszálló szára), ekkor a NCX reverz módban  $Ca^{2+}$ -ot juttat a sejtbe a  $Na^+$  ellenében. A NCX a repolarizáció során ismét forward módban  $Ca^{2+}$ -ot távolít el a sejtől. A NCX 9 TM  $\alpha$ -hélixből, egy intracelluláris hurokból (5-6 TM domén között), egy intracelluláris C-terminálisból és egy extracelluláris N-terminálisból áll. A 2-3 és 7-8 TM közötti  $\alpha$ -alegységeknek az ionkötés és transzport mechanizmusban, míg az intracelluláris hurokban található  $\beta$ -alegységeknek a  $Ca^{2+}$  érzékelésben és megkötésben van szerepe ( $Ca^{2+}$  binding domain 1 és 2). Utóbbi doménnel léphetnek kölcsönhatásba a foszfolemman és a kalcineurin, mindkettő gátló hatást fejt ki. Az intracelluláris hurok  $Ca^{2+}$  kötése aktiválja, míg  $Na^+$  kötése deaktiválja az antiportert. A NCX az SLC8 molekulacsalád tagja és három izoformáját különítjük el. A szívben kifejeződő altípus a NCX1, azonban jelentős expressziót mutat az agyban és a vesében is. Emellett a NCX2 és a NCX3 szelektíven expresszálódik az agyban és a vázizomzatban<sup>30</sup>. Intenzív kutatás folyik szelektív NCX gátlók kifejlesztésére, jelenleg a SEA0400-at tekintjük megfelelő gátlószernek.

Az  $[Ca^{2+}]_i$  csökkentésének két módja lehet; a  $Ca^{2+}$  vagy az extracelluláris tér felé távolítódik el, vagy pedig a sejt belső raktáraiba kerül visszavételre. Az egyik ilyen mechanizmus a már említett NCX. A plazmamembrán  $Ca^{2+}$ -ATPáz (PMCA) szintén szarkolemmális  $Ca^{2+}$  eltávolító mechanizmus. Nevéből is látható, hogy működése energiaigényes folyamat, ATP hidrolízisére van szükség. A csatorna 1  $Ca^{2+}$  : 1 ATP

sztoichiometriával rendelkezik<sup>76</sup>. A PMCA a plazmamembrán teljes fehérjepopulációjának mindössze a 0,1 %-át teszi ki, azonban feltételezik, hogy a PMCA-nak finomhangoló szerepe lehet, ugyanis olyan koncentráció tartományokban is működőképes ahol az alacsony affinitású NCX már hatástalan<sup>30</sup>. A szívizomzatban megtalálható két izoforma közül a PMCA1 vesz részt a  $\text{Ca}^{2+}$  beat-to-beat módon történő eltávolításában<sup>119</sup>. A intracelluláris raktárak közül a SR a legfontosabb. A SR membránjában elhelyezkedő SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz (SERCA) 2  $\text{Ca}^{2+}$  : 1 ATP sztoichiometriával pumpálja vissza a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot<sup>156</sup>. Újabban írták le a mitokondriumok jelentőségét mint intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak, melyek fontos szerepet tölthetnek be, ugyanis a szívizomsejtek térfogatának mintegy egyharmadát alkotják<sup>52, 172</sup>. Megfigyelték, hogy csökkent mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter expressziót mutató állatmodellekben, a beat-to-beat  $\text{Ca}^{2+}$  oszcillációk amplitúdója szignifikánsan emelkedett, míg overexpresszált állatokban ennek az ellenkezőjét tapasztalták<sup>56</sup>. Abban az esetben, ha a mitokondriumok túltöltődnek  $\text{Ca}^{2+}$ -mal, a mitokondriumok belső membránjában elhelyezkedő permeabilitási tranzíciós pórusok megnyílnak és az így felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  (valamint a következményes depolarizáció) aritmogén hatású lehet<sup>127</sup>. Nyúl (valamint tengerimalac<sup>21</sup>, vadászmenyét<sup>17</sup> és humán<sup>130</sup>) szívizomsejtekben kimutatták, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  visszavétel 70 %-áért a SR, 28 %-áért a NCX felelős és csupán 1-2 % zajlik a PMCA-on és a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  uniporterén keresztül<sup>20</sup>.

A SERCA pumpa egy körülbelül 110 kDa tömegű fehérje a SR membránjában. Több izoformája is ismert, a szívizomban a SERCA2a fordul elő, melyet a 12. kromoszómán elhelyezkedő SERCA2 (ATP2A2) gén kódol. A SERCA egy 10 transzmembrán hélixet (10 TM) tartalmazó régióból, valamint egy intracelluláris feji régióból áll, melyet egy pentahelikális szár egészít ki. A feji régióban az ATP kötőhelyen kívül szabályozó foszforilációs domének is helyet foglalnak. A 10 TM régió tartalmazza a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelyet, valamint szerepe van a fehérje konformáció változásában<sup>113</sup>. A SERCA pumpasűrűség a SR membránjában igen nagy (20.000-30.000 db/ $\mu\text{m}^2$ ), egyes becslések szerint a SR membránfehérjék 90 %-át teszi ki<sup>113</sup>. Működését befolyásolhatja a SR  $\text{Ca}^{2+}$  tartalma ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ ), a foszfolambán és az endogén membránkötött  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin függő protein kináz II (CaMKII). Abban az esetben, ha megfelelően alacsony a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ , az  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  nem képes kiváltani a CICR-t a SR-on keresztül. Ez a folyamat lehetőséget (és időt) biztosít a szívizomsejtnek, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  raktárait feltöltse. A  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$  növelése lehetséges megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$  influx, csökkent  $\text{Ca}^{2+}$  efflux vagy pedig fokozott SERCA aktivitás útján<sup>138</sup>.

### 3.4. A kamrai aritmiák kialakulásának előrejelzése

A szív-elektrofiziológia rengeteget fejlődött az első dokumentált kamrafibrilláció óta, azonban a halálesetek száma (450.000/év az USA-ban, 20-30.000/év Magyarországon) még napjainkban is megdöbbentően magas. A szíveredetű halálokok leginkább a hirtelen szívhalálhoz és a szívelégtelenséghez köthetőek. A két betegség gyakran együtt alakul ki számos egyéb kórkép hatására, mint például a koronária-betegség, kardiomiopátia vagy szívritmuszavar. A szívelégtelen betegek 50 %-a hirtelen szívhalál miatt hal meg. Az implantálható kardioverter-defibrillátor (ICD) terápia magas költségei, valamint a betegek nagy száma miatt igény van egy olyan paraméterre ami előrejelezheti a végzetes kimenetelű aritmiák kialakulását. Amennyiben mégis kamrafibrilláció alakul ki, azonnali elektromos kardioverzióra és a beteg kórházba szállítására van szükség. Ennek során a szűk keresztmetszet az idő, vagyis az aritmia minél hamarabbi detektálása életet menthet.

Egyes szívritmuszavarok kialakulását megelőzően az egyes sejtek repolarizációs ideje megnő, amelyet a gyakorlatban az EKG QT-intervallumának időtartam növekedése reprezentál. Az 1990-es évek közepétől az International Conference on Harmonization (ICH S7B és ICH E14) irányelveit elfogadva a QT időtartam-növekedés lett az elfogadott biomarker a TdP kockázat megítélésére<sup>4, 5, 16, 59, 77</sup>.

Újabb közlemények azonban rámutattak arra a tényre, hogy a megnövekedett AP időtartam (és QT-intervallum) önmagában nem feltétlenül hajlamosít aritmiák kialakulására<sup>6, 86, 154</sup>. Ezért a veleszületett vagy szerzett TdP aritmiák kialakulásának előrejelzésében a jelenlegi biomarkereket – az APD növekedése és a korai utódepolarizációk (EAD) kialakulása mellett – a TRIAD mozaikszó írja le. Ezek az AP háromszögesedése (Triangulation), a fordított frekvenciafüggés (Reverse rate dependence), valamint az APD megnövekedett térbeli és időbeli variabilitása (Instability and Dispersion of the AP)<sup>85-87</sup>. A TdP típusú kamrai aritmia kialakulásához két feltétel szükséges. Szükségeltetik az ún. aritmia szubsztrát (hosszabb repolarizáció, a repolarizáció térbeli és időbeli diszperziója), aminek táptalaján az ún. trigger (extraszisztole) kiváltja a ritmuszavart<sup>105</sup>.

Állatmodelleken (kutya és nyúl) végzett kísérletekben – különböző farmakológiai módszerekkel megváltoztatott APD-ok esetében is – a QT-intervallum beat-to-beat variabilitása hatékonyabban prognosztizálta a – kísérlet folyamán később kialakuló – TdP típusú eseményeket, mint önmagában a QT-intervallum monitorozása<sup>82, 105, 135, 153, 174</sup>. Ezt később humán betegek esetében is megerősítették<sup>90</sup>. Megállapították, hogy azon gyógyszerek, melyek összehasonlítható mértékű – mind abszolút, mind relatív – repolarizáció időtartam növekedést okoztak, más TdP incidenciával rendelkeztek<sup>18, 84, 86, 115, 118, 122, 159</sup>. Bizonyos

gyógyszerek proaritmiás hatása a különböző alkalmazott koncentrációk függvénye volt és nem a QT-intervallum növekedésével állt összefüggésben<sup>84, 153, 155</sup>. Egy adott gyógyszer infúziós sebességének megváltoztatása is aritmogén lehet anélkül is, hogy a QT-intervallum időtartama megváltozna<sup>33, 53, 168, 170</sup>. Mindezekkel összhangban, állatmodellekben bizonyítást nyert az is, hogy a sikeres antiaritmiás kezelés során nem feltétlenül szükséges az APD rövidítése<sup>63, 116, 121</sup>. Mindezt az is bizonyítja, hogy számos antiaritmiás beavatkozás, melyet a TdP kezelésére alkalmaznak (pl.: intravénás KCl adása,  $I_{K-ATP}$  aktiváció, steady-state kamrai ingerlés), csökkenti a beat-to-beat variabilitást annak ellenére, hogy a QT-intervallum továbbra is jelentősen hosszabb marad<sup>154</sup>.

A humán eredmények és az állatkísérletek alapján feltételezik, hogy a QT-intervallum beat-to-beat variabilitásának csökkenése antiaritmiás hatású, míg a megemelkedett beat-to-beat variabilitás aritmogén – torsadogén –, függetlenül a QT-intervallum időtartamától. A repolarizáció diszperziójának növekedése tehát számos körülmény között aritmogén hatású<sup>7</sup>. Ezért a repolarizáció-időtartam variabilitásának kvantitatív meghatározása előrejelezheti az aritmia kialakulását, a proaritmiás állapotot.

### **3.5. Az akciós potenciál időtartam beat-to-beat variabilitása**

A természetes, biológiai rendszerek sajátja a változékonyság, a variabilitás. Ez megjelenhet akár a genetikai polimorfizmus, fenotípusos variabilitás, vagy akár mint populációk közötti variabilitás is. A szívre jellemző, hogy állandó szívfrekvencia esetén az egymást követő ütések során az APD-ok nem identikusak, fluktuálva változnak. Ezen random variációkat leíró jelenség az APD ütésről ütésre történő variabilitása, vagy más néven beat-to-beat variabilitás. A beat-to-beat variabilitás a szív működés egy intrinzik tulajdonsága, mely több szinten is megnyilvánulhat. Megfigyelhető a transzmembrán, vagy monofázisos AP-ok időbeli és térbeli variabilitásaként, helyi aktivációs és recovery intervallumokban vagy a testfelszíni EKG QT-intervallumának variabilitásaként.

#### **3.5.1. A beat-to-beat variabilitás háttérében álló mechanizmusok**

Számos tényezőről leírták már, hogy szerepe lehet a beat-to-beat variabilitás létrehozásában. Ezek közül a legfontosabbak az ioncsatornák sztochasztikus viselkedése<sup>104, 131</sup>, az ingerlési frekvencia és különböző farmakológiai behatások<sup>97</sup>, az AP morfológia és időtartam<sup>80</sup>, az ioncsatorna denzitás, a cirkadián ritmus, a sejt fizikai helyzete a miokardiumban<sup>95</sup>, sejt-sejt kapcsolatok<sup>180</sup>, vagy az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint szabályozás<sup>96</sup>,

tehát a jelenség egyértelműen multifaktoriális. Azonban nem tisztázott a különböző faktorok relatív szerepe, valamint az sem, hogy az egyes ionáramok milyen szereppel bírnak a beat-to-beat variabilitás modulálásában. Érdekes, hogy a sejtizolálási procedúra is hatással lehet az AP alakjára, végső soron a SV-ra is<sup>178</sup>. Tapasztalataink is bizonyítják, hogy az enzimes emésztés idejének pontatlan megválasztása valóban az egyes ioncsatornák mennyiségét és minőségét is befolyásolhatja. Így mintegy saját standardként csak olyan sejteken végeztünk kísérleteket, melyek AP-jai a következő feltételeknek megfeleltek. A sejtek nyugalmi membránpotenciál értéke  $-80$  mV körüli volt, az AP-ok gyors nulladik fázissal, megfelelő platópotenciál értékkel ( $0$  mV fölött), valamint a  $-$  káliumcsatornák és káliumáramok sértetlenségét jelző  $-$  megfelelő repolarizációval (APD értéke  $170-300$  ms között) ill. alacsony kontroll beat-to-beat variabilitással ( $4$  ms alatt) rendelkeztek. Amennyiben ezek a feltételek nem teljesültek, az adott sejten a mérést nem folytattuk.

Walmsley és mtsai a beat-to-beat variabilitás háttérében álló tényezőket két csoportra osztja<sup>165</sup>. A különböző miociták közötti eltéréseket *extrinzik cell-to-cell variabilitásként* (pl.: sejt helyzete, ioncsatorna denzitás, cirkadián ritmus, rés-kapcsolatok), míg a sejten belülieket *intrinzik beat-to-beat variabilitásként* kategorizálják.

A szívizomsejt AP-ja számos ioncsatorna működésének az eredőjeként jön létre. Az ioncsatornák sztochasztikus kapuzása következtében az egymást követő AP-ok időtartama és alakja nem teljesen megegyező. Az AP alatt a sejtmembrán impedanciája folyamatosan változik, ami arra utal, hogy pillanatról pillanatra változik az aktiválódott, nyitott állapotú ioncsatornák száma. A membrán impedanciája az AP plató fázisa alatt nagy. Ohm törvénye értelmében ilyenkor az ionáramok kismértékű változása is viszonylag nagy membránpotenciál változást eredményez, ami APD változáshoz vezet. Ezért a plató fázis ideje alatt mérhető ionáramok jelentős mértékben befolyásolják az AP-ok időtartamát. Munkacsoportunk korábbi eredményei azt bizonyítják, hogy a plató fázis alatt folyó nettó áram és az APD fordítottan arányosak, nevezetesen, a nagy nettó membrán áram mellett a membrán ellenállása kicsi, így az AP időtartama rövid lesz<sup>13</sup>.

Irodalmi adatokból és személyes tapasztalatok alapján tudjuk, hogy multicelluláris preparátumokon jóval kisebb mértékű az AP repolarizációjának variabilitása mint izolált sejteken<sup>96, 104, 180</sup>. Ezt legjobban azon kísérletek bizonyították, melyekben két olyan szívizomsejt között hoztak létre elektromos kapcsolatot, melyek eredendően különböző hosszúságú AP-lal rendelkeztek<sup>106</sup>. Az összekapcsolt sejteken a két eltérő időtartamú AP azonos időtartamúvá válik. A folyamat aszimmetrikus, ugyanis az eredetileg hosszabb AP

nagyobb időtartam változáson megy keresztül, mint a kezdetben rövidebb AP. Ennek hátterében valószínűleg az említett intrinzik membránellenállás állhat, így a hosszabb AP-ok érzékenyebbek a nettó membránáram változásaira. Abban az esetben, ha két eredetileg megegyező AP-lal rendelkező sejtet kapcsolnak össze, akkor az APD nem változott, viszont alacsonyabb lett a SV. A kísérletes eredményeket szimulációs modellek is alátámasztották<sup>80</sup>. Tengerimalac kísérleti modellben a  $I_{Ks}$ -ének gátlását követően megnőtt az APD és a beat-to-beat variabilitás, valamint nőtt a EAD incidencia is. Ha ezt követően ezt a sejtet egy fizioiógias APD-mal rendelkező sejtthez kapcsolták, a EAD-k azonnal megszűntek, majd csökkent az APD variabilitása is.

Szöveti szinten az alacsony ellenállású gap junction kapcsolatok a EAD-k kialakulását és tovaterjedését is megakadályozzák. Azonban kísérletes és szimulációs eredmények is azt bizonyítják, hogy a megnövekedett ellenállású réskapcsolatok már nem képesek erre a hatásra, sőt a sejtek teljes elszigetelődését is okozhatják<sup>80, 180</sup>. Patológias körülmények között (pl. iszkémia) a megnövekedett ellenállás lassabb ingerületvezetéshez vezet, valamint kisebb mértékű lesz az elektrotónus terjedése két sejt között. Hatására megnő a refrakter periódus, az APD és a SV<sup>80, 173</sup>. Ez a kifejezett APD diszperzió azonban csak a sérült terület határáig tart<sup>16</sup>. A megnövekedett variabilitás és refrakter periódus hatására az ingerületvezetés megváltozhat, vezetési blokk, re-entry aritmia<sup>106, 160, 180</sup>, kamrafibrilláció, valamint végső esetben hirtelen szívhalál alakulhat ki<sup>37, 50, 100, 140</sup>.

### 3.5.2. Szimulációs kísérletek a beat-to-beat variabilitás tanulmányozására

A szív-elektrofizioiógiasban a valós kísérletes mérések mellett, a számítógépes modellezés több, mint 50 éves múltra tekint vissza<sup>47, 61, 123, 124</sup>. A szimulációs munkák segítettek jobban megismerni a szívizom különböző sejt típusait, azok ioncsatornáinak jellemzőit, vagy akár frekvenciafüggő sajátságait. Azonban a szimulációk zöme determinisztikus modell, ahol a változatlan APD mellett lehetetlen a beat-to-beat variabilitást vizsgálni<sup>51</sup>. Ezzel szemben a sztochasztikus modellek a vizsgált folyamatokban a véletlen szerepét is figyelembe veszik. Az első sztochasztikus modellek egyike a Wilders és Jongma<sup>171</sup>, valamint Tanskanen és mtsai által közölt modell volt, utóbbi azonban főleg EAD-k kiváltására fókuszált<sup>150</sup>. Ezt követően jelent meg Lemay és mtsai munkája, melyben a sztochasztikus ioncsatorna kapuzás hatását vizsgálták a repolarizáció variabilitásában<sup>104</sup>. Munkacsoportunk experimentális eredményeinek felhasználásával is végeztek szimulációs kísérleteket<sup>131</sup>. Az egyik legújabb számítógépes modellezést Heijman és mtsai végezték. Azt tapasztalták, hogy a determinisztikus modell futtatása során valóban nem volt tapasztalható SV, míg

sztochasztikus esetekben az experimentálisához hasonló eredményt kaptak. Ez is bizonyítja a sztochasztikus ioncsatorna működés kiemelkedő jelentőségét a beat-to-beat variabilitás modulálásában. Érdekesség, hogy számos komponens megvizsgálták, azonban az ionpumpák és exchangerek nem voltak hatással a SV-ra, a nagy membránpotenzialis ellenére sem. A 13 sztochasztikus komponens (pl.:  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Na}$ , RYR, SERCA, stb.) beillesztése a rendszerbe növelte a SV-t, azonban a hatások nem bizonyultak additívnak, vagyis az egyes véletlenszerű fluktuációk kiüthetik egymás hatását<sup>80</sup>. A legjobb bizonyíték arra, hogy a SV nem kizárólag az APD függvénye az, hogy teljes  $I_{Ks}$ -ének gátlása esetén –  $\beta$ -adrenerg stimulációt követően – a determinisztikus modell esetében is tapasztalható volt beat-to-beat variabilitás az AP időtartamában.

### 3.6. A beat-to-beat variabilitás meghatározása kísérletes körülmények között

Az AP az egyes sejtek membránpotenzialis változásait reprezentálja, míg az EKG számos szívréteg különböző sejtjeiről származó elektromos aktivitás összege, így értelemszerűen egy sokkal komplexebb rendszert alkot. Ahogy azt már említettem, multicelluláris preparátumokon az experimentálisan regisztrált beat-to-beat variabilitás értéke alacsonyabb. Azonban mivel ismereteink hiányosak a beat-to-beat variabilitással kapcsolatban – valamint alaputatásról lévén szó –, jelen tanulmányban izolált sejtekkel dolgoztunk. Így elkerülhetővé válik a multicelluláris preparátumok, valamint az elvezetett EKG regisztrátumok komplexitása és jobban megérthető az egyedi sejtek ionáramainak szerepe a beat-to-beat variabilitás modulálásában. További problémát jelent ezen felül, hogy a különböző ionáramok vizsgálatára használt vegyszerek diffúziójának az *in vitro* multicelluláris preparátumok (pl.: Purkinje rostok alkalmazása) akadályt jelenthetnek<sup>40</sup>. Az izolált sejtek esetében ez a barrier nem áll fenn, így elérhetővé válik a vegyszerek gyors eljuttatása közvetlenül a vizsgált sejtekhez.

Számos módszer ismert a beat-to-beat variabilitás kvantitatív meghatározására. A variabilitás meghatározásához ismerni kell az egymást követő AP-ok időtartamát. A Poincaré diagramok megszerkesztésével a SV vizualizálható is. A Poincaré diagramok információt adnak egyrészt az egymást követő ütésekről, másrészt az összes, a kalkulációba bevont AP-ról. Thomsen és mtsai által ismertetett módszerek a rövidtávú variabilitás (short term variability, SV), a hosszútávú variabilitás (long term variability, LV), valamint a Poincaré diagram terület módszere<sup>153</sup>. Az elnevezés megtévesztő lehet, ugyanis a LV ugyanannyi AP-lal számol, mint a SV. A SV meghatározásakor a pontok önazonossági egyeneshez képest megvalósuló merőleges irányú eloszlását vesszük figyelembe a Poincaré diagramon. Ezzel

szemben a LV esetében a pontok eloszlását az önazonossági egyenes mentén vizsgáljuk. A kettő eredményeként egy ellipszist lehet illeszteni a Poincaré diagram területre (ellipse fitting technique). Más szerzők további két megoldást is leírtak, ezek az instabilitás<sup>158</sup> és a teljes kombinált variabilitás (total combined variability, TCV)<sup>79</sup>. A Poincaré diagram terület módszerével meghatározható a Poincaré diagramon található pontok által lefedett terület nagysága, melyhez a pontok összekötése által kapott poligonális konvex területet használják fel. A Poincaré diagram terület meghatározásának előnye a SV-hoz és a LV-hoz képest, hogy a teljes variabilitást láthatóvá teszi, azonban hátránya, hogy végtelen azon diagramok száma, amelyek ugyanakkora területtel rendelkeznek mégis más aritmiás kimenetelt mutatnak<sup>79</sup>.

Egy alternatív módszer a beat-to-beat instabilitás számítása, mely három komponensből tevődik össze: rövidtávú (short term instability, STI), hosszútávú (long term instability, LTI) és teljes instabilitás (total instability, TI). Az instabilitás paraméterek (TI, STI, LTI) meghatározásakor a Poincaré diagramon ábrázolt pontok geometriai súlypontjától való távolságokat veszik figyelembe.

A TCV módszere kombinálja a SV, a LV és a Poincaré diagram terület módszereket, melynek eredményeképpen az aritmogén és nem-aritmogén szignálok közti különbségek felerősödnek. Hátránya, hogy a TCV különböző beat-to-beat meghatározási módszerek empirikusan megalkotott kombinációja, így az AP sorozat fiziológiai jellemzőit nehezen tudjuk megítélni vele.

Heijman összehasonlította a fent említett módszereket és arra az eredményre jutott, hogy az APD értéke önmagában a legkevésbé megfelelő módszer az aritmiák előrejelzésében. A legérzékenyebb módszer a TCV, valamint a SV és a Poincaré diagram terület volt. Szintén a SV bizonyult az egyik legmegbízhatóbb módszernek abban az esetben is, amikor az input adathalmaz nem az APD, hanem az AP alatti terület volt.

### **3.7. A beat-to-beat variabilitás a gyakorlatban, mint lehetséges aritmia prediktor**

A repolarizáció időbeli változékonyságának mérésére több módszert is kifejlesztettek. Ilyen a klinikumban is alkalmazott QT-intervallum variabilitása<sup>9, 19, 24</sup>, valamint az experimentálisan használt instabilitás<sup>84</sup>, és a beat-to-beat variabilitás<sup>53, 135, 152, 153</sup>. Thomsen és mtsai szív- és érrendszeri gyógyszerek vizsgálata során sikeresen előrejelezték a szer-indukálta ritmuszavarokat a beat-to-beat variabilitás segítségével<sup>53, 153</sup>.

### 3.7.1. A QT variabilitás index

A repolarizáció instabilitásának mérésére Berger és mtsai 1997-ben a QT-intervallum beat-to-beat variabilitásának mérését javasolták (QT variabilitás index, QTVI)<sup>19</sup>. A QTVI a repolarizáció variabilitását hasonlítja a szívfrekvencia variabilitásához<sup>54</sup>.

$$QTVI = \log \frac{(QTV/\text{átlag } QT^2)}{(HRV/\text{átlag } HR^2)}$$

#### 2. egyenlet

ahol QTVI a QT variabilitási index, HR a szívfrekvencia, HRV a szívfrekvencia-variabilitás, a QTV pedig a QT-intervallum variabilitása.

A **2. egyenlet** alapján a QT-intervallum és/vagy a szívfrekvencia változásai egyaránt okozhatják a QTVI változását. A QT-intervallum növekedését okozhatja például a membrán instabilitásának fokozódása, a repolarizáció transzmurális eltéréseinek hangsúlyosabbá válása, korai depolarizáció, vagy esetleg vezetési blokk az egyik helyen, míg fokozott konduktivitás egy másik helyen. Ezek összességében reentry aritmiákat, végeredményképpen pedig kamrafiibrillációt okozhatnak.

Az egymást követő szívütések közötti időtartamban történő oszcillációkat a HRV jellemzi. A HRV esetén a problémát az jelenti, ha a variabilitás elkezd csökkenni. A HRV értéke változhat sinus ritmus esetén is, hiszen a légzés, keringés folyamatos ingadozásai vagy a hormonális és idegi állapotok megváltozása is befolyásolják. A HRV meghatározása könnyű, automatizált méréssel végezhető. A HRV csökkenését kimutatták cukorbetegség<sup>102</sup>, miokardiális infarktus<sup>2</sup> és antiaritmiás szerek esetén, mint például flekainid, enkainid, moricizin<sup>23</sup>, azonban direkt prognosztizáló hatása nincs bizonyítva.

Önmagában tehát a szívfrekvencia csökkenése növeli a QTVI értékét, azonban ez nem feltétlenül növeli az aritmia kialakulásának kockázatát. Ugyanakkor, ha az alacsonyabb szívfrekvenciához hosszabb repolarizáció társul, mint például élvonalbeli labdarúgók esetén, a QTVI szignifikáns mértékben növekedhet<sup>105</sup>.

A fiatal élsportolók között ritka a hirtelen szívhalál (1:50.000-1:100.000), azonban még így is 2-4-szer magasabb mint a korban illesztett egészséges, nem élsportolóknak<sup>43</sup>. A QTVI kora és nemmel változik, idősebb betegekben illetve nőkben magasabb a QTVI értéke<sup>129</sup>. A gyakorlatban a már kialakult szívelégtelenségben szenvedő betegek esetén alkalmazzák, valamint számos egyéb betegség során is (szer-indukálta hosszú QT szindróma, kokain injekció, pánikbetegségek, miotóniás disztrófia, veseelégtelenség). Azon kívül, hogy kardiomiopátiákban és akut koronária szindrómában szignifikánsan emelkedett a QTVI,

pozitív korrelációt mutat a New York Heart Association (NYHA) által létrehozott stádiumokkal is<sup>55, 73</sup>.

A QTVI gyakorlati alkalmazását az is nehezíti, hogy meghatározása még nem megoldott a napi rutinmunka során, valamint a háttérben álló mechanizmusok sem ismertek. További vizsgálatokat igényel annak a megállapítása, hogy mekkora QTVI érték felett tekintjük kórosnak a páciens állapotát. A QTVI módszere különbözik a korrigált QT-intervallum mérésétől (QTc), mely a QT-intervallum időtartamát a szívfrekvencia függvényében adja meg, valamint nem számol az EKG U hullámával.

### **3.8. A beat-to-beat variabilitás vizsgálatára használt állat- és sejtmmodellek**

Egyes újabb tanulmányok összehasonlították a preklinikai modellek használhatóságát, azonban felmérésük csak a papilláris izomra, valamint a Purkinje rostokra terjedt ki, kamrai szívizomsejtekre nem<sup>75, 126</sup>. Több munkacsoport is foglalkozott tengerimalac kamrai szívizomsejtekkel<sup>49, 151</sup> egyes szerek APD növelő hatását vizsgálva, mely során Terrar és mtsai azt találták, hogy ezen sejtek megfelelő alternatív modellek lehetnek a kutya Purkinje rostok helyett. Megjegyzendő, hogy bár a tengerimalac AP – rágcsáló volta ellenére – platófázissal rendelkezik, humán eredményekre való extrapolálás nem biztos, hogy szerencsés ezen faj esetében. Erre a célra megfelelőbb lehet a kutyaszív, mivel annak szívizomsejtjein mind az AP morfológia, mind az APD nagymértékben hasonlít a humánra<sup>145</sup>, emellett vizsgálták már beagle kutyákon is a preklinikai tesztelés lehetőségét<sup>69</sup>. A kutya állatmodellben a legmegfelelőbb sejtípusnak a kamrai szívizomsejteket, azok közül is a bal kamrai miocitákat tekintik. Teszik ezt azért, mert a bal kamra fő rétegét alkotó MID sejtek repolarizációja nagyban meghatározza a T-hullámot<sup>6</sup>, vagyis az ezeken történő mérések vélhetően a legjobban kapcsolódnak a QT-intervallum mérésekhez kutyákban és emberekben. Ezenkívül a többszörös áteresztőképesség, a kisebb állatigény és az izolált sejtek már említett előnyei is a kamrai miociták használata mellett szól a Purkinje rostokkal szemben.

Jelenleg a TdP vizsgálatára leggyakrabban kutyát, tengerimalacot és nyulat használnak<sup>14, 32, 34, 74, 93, 125</sup>.

## 4. Célkitűzések

Napjainkig sem tisztázott teljesen, hogy milyen mechanizmusok állhatnak a beat-to-beat variabilitás kialakulásának hátterében. Fontos tisztázni, hogy melyek azok a folyamatok, melyek végeredményben különböző – akár halálos kimenetelű – szívritmuszavarokat hozhatnak létre a megnövekedett variabilitáson keresztül.

Célunk volt, hogy feltárjuk és megismerjük az APD rövidtávú variabilitásának okait és modulátorait. Feltételezzük, hogy az emelkedett beat-to-beat variabilitás súlyos aritmiák indikátora lehet, valamint, hogy ezen jelenség multifaktoriális, ezért vizsgálni kívántuk:

- az ingerlési frekvencia megváltoztatásának hatását a SV-ra
- a SV-t a bal kamra különböző rétegeiből származó szívizomsejteken
- az elektrotónus injektálásával történő APD módosítás (csökkentés illetve növelés) hatását a SV-ra
- az intracelluláris  $Ca^{2+}$  homeosztázis befolyásolásának hatását a SV-ra
- az inward és outward áramok szerepét a SV modulálásban
- valamint a redox potenciál szerepét a SV létrehozásában.

Méréseinket kutya szívizomsejteken végeztük, ugyanis elektrofiziológiai paraméterek tekintetében ez a modell áll legközelebb a humán szívizomsejtekhez<sup>145, 146</sup>. Másrészt a SV-sal kapcsolatos *in vitro* és *in vivo* eddigi tanulmányok és publikációk zöme is kutya eredetű miocitákról származik<sup>1, 96, 97, 105, 153, 158</sup>.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. A kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kutyaszív bal kamrájából izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket kísérleti célra tenyésztett, vegyes nemű, ivarérett állatok szívéből nyertük. Jelen disszertáció eredményeihez kizárólag bal kamrai szívizomsejteket használtunk. A 10-15 kg-os állatok altatásához intramuszkulárisan injektált 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország) és 1 mg/kg xylazin-hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV, Bladel, Hollandia) keverékét használtuk. Az általunk alkalmazott protokollok összhangban voltak a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publikációs száma: 85-23., 1996. javított verzió) és a Helsinki Deklaráció 1964-ben lefektetett alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (engedély száma: 18/2012/DEMÁB). Az állatok fájdalommentes mélyaltatását akkor tekintettük megfelelőnek, ha a cornea reflex nem volt kiváltható és az állat fájdalomra nem reagált. A mellkas megnyitását követően (a scapula csúcsát és a processus xyphoideust összekötő vonal felezőpontjánál lévő bordaköznél) a szívet gyorsan kiemeltük, majd hideg fiziológiás Tyrode oldatba helyeztük (144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 10 mM glükóz, pH=7,4). Az anterográd szegmentperfúziós technikának megfelelően, a bal elülső leszálló koszorúér (left anterior descending coronary artery, LAD) ágát kanüláltuk<sup>109</sup>. Így az ezen artéria vérellátási területének megfelelően perfundáltuk a szívizomzatot, Langendorff apparátus segítségével.

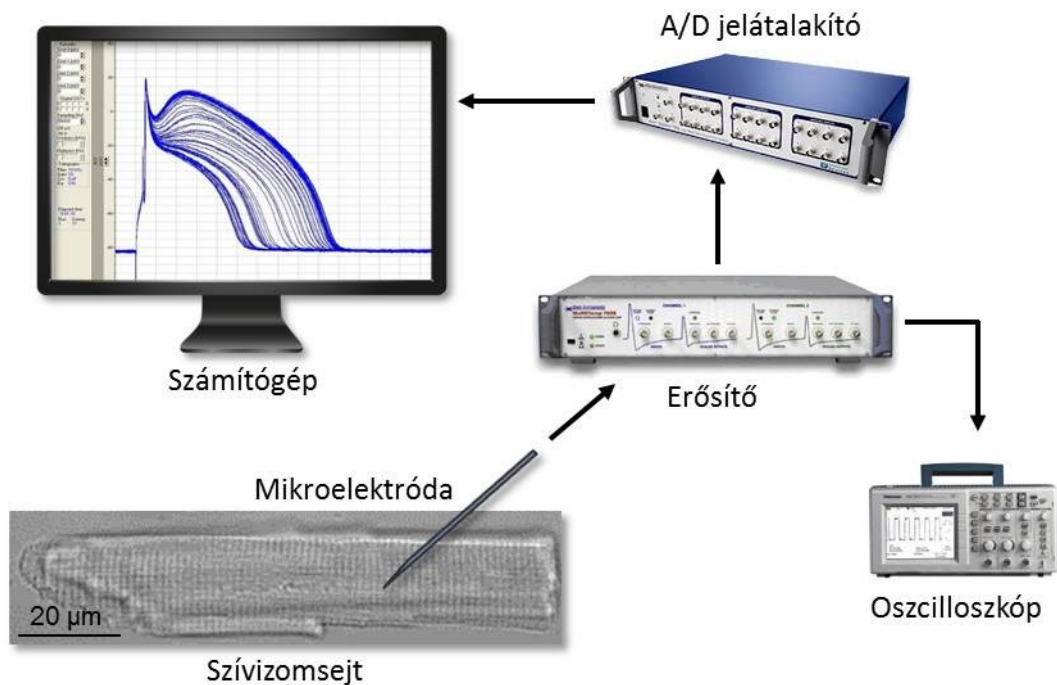
Az enzimátikus emésztést megelőzően a Ca<sup>2+</sup> és a vér eltávolítása céljából Ca<sup>2+</sup>-mentes JMM oldattal (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) perfundáltuk a szívet körülbelül 5 percig. A JMM oldat kiegészítésként taurint (2,5 g/l), piruvátot (175 mg/l), ribózt (750 mg/l), allopurinolt (13,5 mg/l), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-ot (200 mg/l) és NaHCO<sub>3</sub>-ot (1,4 g/l) tartalmazott. A perfundáló oldatot karbogen gázzal (95 % O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub>) kevertettük 37 °C-on. A következő körülbelül 30 perces emésztés során az 1 mg/ml koncentrációjú kollagenázzal (Type II., 230 U/mg; Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA), 0,2 % borjú albuminnal (2 g/l, Fraction V.; Sigma-Aldrich Co.) és 50 µM CaCl<sub>2</sub>-dal kiegészített JMM oldatot alkalmaztuk. Az emésztési idő leteltével U alakú bemetszést ejtettünk a koronária által perfundált (elfolyósodott) területen, majd az így kihajtott „nyelv” alakú kamrafalból szike segítségével távolítottuk el a sejteket, melyeket már Ca<sup>2+</sup>-tartalmú JMM oldatban szuszpendáltunk. A

sejteket a szövetközi törmelékektől 4 lépcsős szűrési és további 2 lépcsős mosási folyamat során tisztítottuk meg, mely során az oldat  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmát fokozatosan emeltük és állítottuk fizioiógias értékre. Az elektrofiziológiai mérésekig a sejteket 14 °C-on tároltuk MEM tápoldatban (Minimum Essential Medium Eagle, pH=7,4,  $[\text{Ca}^{2+}]$ =2,5 mM, Sigma-Aldrich Co.). A sejteket az enzimes emésztési procedúra során jelentős fizikai stressz éri, ezért méréseinket csak néhány órával később végeztük, időt adva a sejteknek a regenerálódásra. Az életképes sejtek szabályos téglalap alakúak és éles határvonalúak voltak, ép citoplazmával és harántcsíkolattal rendelkeztek. A sejtek átlagosan az izolálást követő nap végéig voltak használhatók (maximum 36 óra).

A sejtseparálás jellegéből adódóan méréseinket zömmel midmiokardiális sejteken végeztük. Azonban egyes kísérleteinkhez a bal kamra szabad falának külső (szubepikardiális, EPI) és belső (szubendokardiális, ENDO) régióiból izolált szívizomsejteket használtunk. Ezekben az esetekben dermatóm (Bard Medical Division, Covington, GA, USA) segítségével 0,5 mm vastagságú EPI és ENDO szeleteket metszettünk a kamra legkülső és legbelső rétegéből. Ettől a ponttól kezdve az izolálási procedúra megegyezett a fentiekben bemutatottakkal.

## 5.2. Elektrofiziológiai mérések

Méréseinket minden esetben 37 °C-on végeztük. A sejteket egy invertált mikroszkóp (Olympus CK-2, Olympus Corporation, Tokió, Japán) tárgyasztalához rögzített 1 ml térfogatú plexiüveg kádba helyeztük. A mérőkád alsó részét egy vékony, fényáteresztő, fűhető fenéklemez alkotta (HI-25p heater, Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA), mely a hőmérsékletszabályozó termosztáttal (Analog TC<sup>2</sup>BIP 2/3Ch Bipolar Temp Controller, Cell MicroControls), ill. az előfűtő rendszerrel (HPRE2 Pre-heater, Cell MicroControls) folyamatosan 37 °C-on tartotta a mérőoldat és a kád hőmérsékletét. Az élő sejtek kitapadtak a mérőkád aljára, a 2 ml/perces perfúzió pedig eltávolította a nem élő sejteket illetve a szövettörmeléket. Méréseink során karbogénnel buborékoltatott fizioiógias Krebs oldatot használtunk, melynek összetétele a következő: 128,3 mM NaCl, 21,4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,42 mM MgCl<sub>2</sub> és 10 mM glükóz 7,4-es pH érték mellett. A perfúziós rendszerben az oldatok – a közlekedő edények elve alapján – a gravitációnak megfelelően kerültek a mérőkádba.



**2. ábra: Az elektrofiziológiai mérésekhez használt mérőrendszer vázlata.**

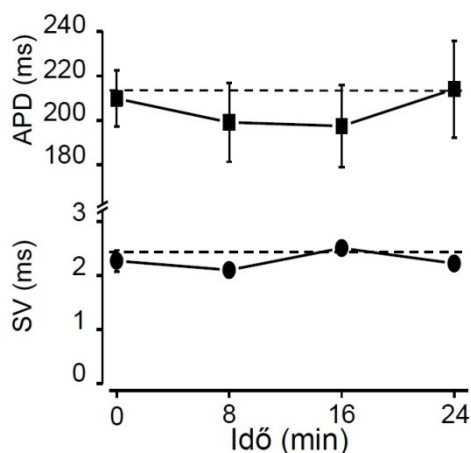
### 5.2.1. A szívizomsejtek akciós potenciáljának elvezetése

A membránpotenciál mérésekre Volders és mtsai által az izolált sejtekre kidolgozott nagy ellenállású üveg mikroelektroda technikát alkalmaztuk<sup>163</sup>. A sejtek AP-ját nagy ellenállású (20-40 MΩ), boroszilikát üvegkapilárisból (GC100F-15, Harvard Apparatus Ltd., Holliston, MA, USA) készített mikroelektrodákkal vezettük el. A mikroelektrodákat a programozható, P-2000 típusú kapilláris húzóval készítettük el (Sutter Instrument, Novato, CA, USA), majd 3 M-os KCl-oldattal töltöttük meg. A mikroelektrodákat ezek után a mechanikus makromanipulátorral (Mitutoyo, Kawasaki, Kanagawa, Japán) és a három irányba mozgatható, piezoelektromos elven működő mikromanipulátorral (Burleigh PCS-250, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) pozícionáltuk a sejtekhez. Az ekkor adott rövid (1-2 ms) depolarizáló impulzusokkal tudtuk az AP-okat kiváltani. A sejteket impulzusgenerátor (Digital Stingray DS-R2 ingerlő, Főnixcomp, Debrecen, Magyarország) segítségével folyamatosan 1-2 ms szélességű négyszögimpulzusokkal stimuláltuk, melyek amplitúdója az ingerküszöb legalább kétszerese volt (szupramaximális amplitúdó). A már kiváltott AP-ok esetében úgy választottuk meg az ingerlés amplitúdóját, hogy az AP felszálló szár jól elkülönüljön a kapacitív tranziens által létrehozott artefaktumtól. A sejtekről elvezetett transzmembrán potenciálváltozásokat a CV-7B típusú fejegységen (Molecular Devices) keresztül a Multiclamp 700B (Molecular Devices) erősítő áram-clamp (current clamp)

módjával valamint pClamp 10 (Molecular Devices) szoftver segítségével detektáltuk. Az analóg-digitális konverziót Digidata 1440A (Molecular Devices) digitalizálóval értük el 200 kHz-es mintavételi frekvenciával. Az analóg jeleket a kétesatornás TDS1001B oszcilloszkóppal (Tektronix Inc., Beaverton, OR, USA) folyamatosan monitoroztuk, míg a digitalizált AP-okat eltároltuk későbbi analízisre (**2. ábra**).

A sejteket 1 Hz állandó frekvenciával ingereltük, kivéve a frekvenciafüggést vizsgáló kísérleteinket. Ezekben az ingerlési frekvenciát 0,2 Hz és 3,33 Hz között (5 sec; 3 sec; 2 sec; 1,5 sec; 1 sec; 0,7 sec; 0,5 sec; 0,4 sec és 0,3 sec széles ciklushossz) módosítottuk, változatlan impulzus szélesség mellett. Az ingerlési frekvencia változtatásakor minden esetben legalább 50-100 ütést vártunk a mérés megkezdése előtt azért, hogy az AP paraméterek stabilizálódjanak.

Ez a kísérleti elrendezés – mivel nem dializálódik a sejt intracelluláris tere – lehetővé tette, hogy az AP paraméterek ne változzanak szignifikáns mértékben a méréseink alatt (**3. ábra**)<sup>1, 90</sup>.



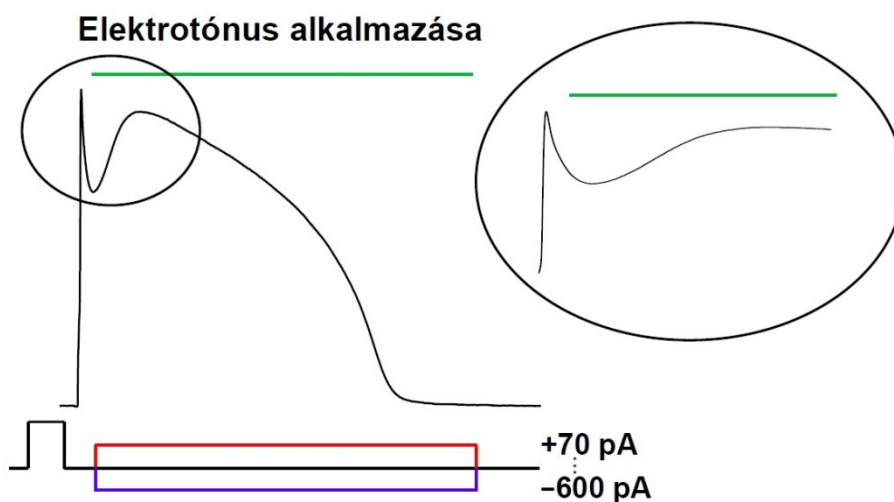
**3. ábra: A midmiokardiális eredetű szívizomsejteken vizsgált akciós potenciál paraméterek (APD és SV) változása az idő függvényében (n=5).**

A környezetből érkező zajforrásokat saját építésű Faraday-kalitka (elektromágneses hullámok kiküszöbölése) valamint antivibrációs asztal (mechanikai rezgések kiküszöbölése, LW3036B-OPI, Newport Corporation, Irvine, CA, USA) segítségével szűrtük ki.

### 5.2.2. Az akciós potenciál időtartam változtatása

Egyes kísérleteinkben az APD megváltoztatására törekedtünk, melyet többféle módon értünk el. Az APD módosítható az ingerlési frekvencia megváltoztatásával, vagy például az ioncsatornákra ható szelektív gátló- vagy aktiválószer segítségével. Egy következő módszer az elektrotónus alkalmazása, mely során egy konstans befelé irányuló (inward) vagy pedig

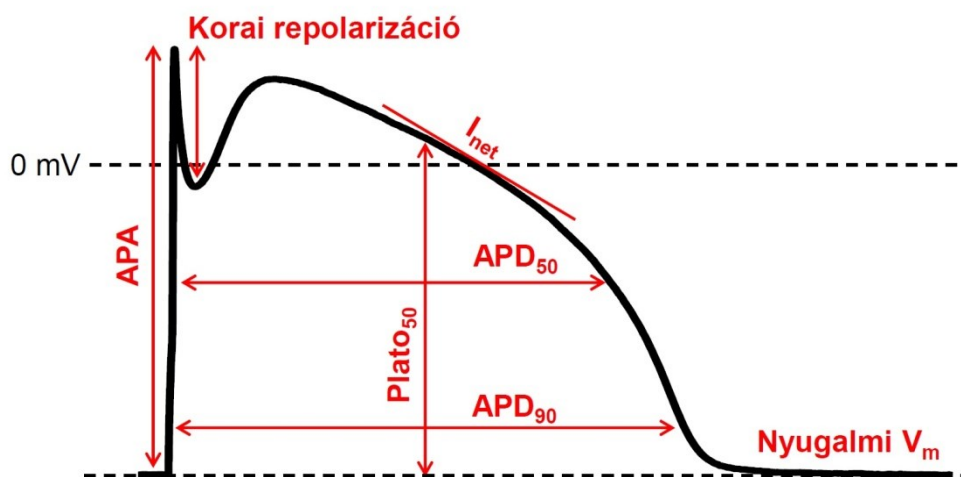
kifelé irányuló (outward) áram injektálásával növeltük, vagy pedig csökkentettük az AP időtartamát. Az elektrotónus injekciója az AP nulladik fázisát követően kezdődött és 50 milliszekundummal az adott AP repolarizációját követően ért véget (**4. ábra**). Beiktattunk egy jelkapcsolót (Signal Switch, Főnixcomp) is a rendszerbe, annak érdekében, hogy az AP-t kiváltó ingerlőjel valamint az digitalizálóból érkező – elektrotónusos – jel elkülönüljön egymástól. A kísérlet céljának eléréséhez folyamatos, mérés közbeni (on-line) analízisre volt szükség.



**4. ábra: A kontroll SV-APD összefüggés meghatározásához használt elektrotónusos vizsgálatokban alkalmazott kísérleti protokoll.** Az elektrotónus injektálását minden esetben az ingerlő négyszögimpulzus után kezdtük meg (zöld vonal), ami a nulladik fázist követően a korai repolarizációtól a terminális repolarizációt követő 50 milliszekundumig tartott.

### 5.3. Az akciós potenciálok analízise

Az AP paraméterek meghatározása, egy a munkacsoportunk által fejlesztett szoftver segítségével történt. Meghatároztuk a nyugalmi membránpotenciál értékét (RMP), a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ,  $dV/dt_{max}$ ), az AP csúcspotenciáljának az értékét (Peak), az AP amplitúdóját (APA), a korai repolarizáció amplitúdójának értékét (Phase1), az AP időtartamának az 50 és a 90 %-ához tartozó időtartamot ( $APD_{50}$ ,  $APD_{90}$ ), az  $APD_{90}$  értékének felénél mérhető platópotenciál értékét, valamint a plató fázis felénél mérhető nettó membránáramot ( $I_{net}$ ) (**5. ábra**).



5. ábra: Az akciós potenciálok kiértékelése során meghatározott paraméterek.

#### 5.4. A beat-to-beat variabilitás kvantitatív jellemzése

A kamrai szívműködés repolarizációjának beat-to-beat variabilitásának jellemzésére úgynevezett Poincaré diagramokat használunk (6. ábra). Ezek megszerkesztéséhez az egyes APD értékeket az azt megelőző APD értékek függvényében ábrázoljuk: „ $\ddot{u}t\acute{e}s_n$ ,  $\ddot{u}t\acute{e}s_{n+1}$ ,  $\ddot{u}t\acute{e}s_{n+2}$ , ...”, ahol  $n$  a regisztrált  $\ddot{u}t\acute{e}s$  sorszáma.

Az így kapott diagramon mérésenként 50 pont található, az 50 regisztrált AP-nak megfelelően. A pontok által lefedett terület nagysága megegyezik a SV-sal, és egyértelműen jelzi, ha valamilyen körülmény hatására megemelkedik a beat-to-beat variabilitás<sup>153</sup>. Amennyiben az egymást követő adatok között nagy az eltérés – azaz, nagy a SV –, akkor a Poincaré diagramra illesztett önazonossági egyenestől (line of identity,  $y=x$  egyenes) nagyobb távolságra helyezkednek el a pontok (6. ábra).

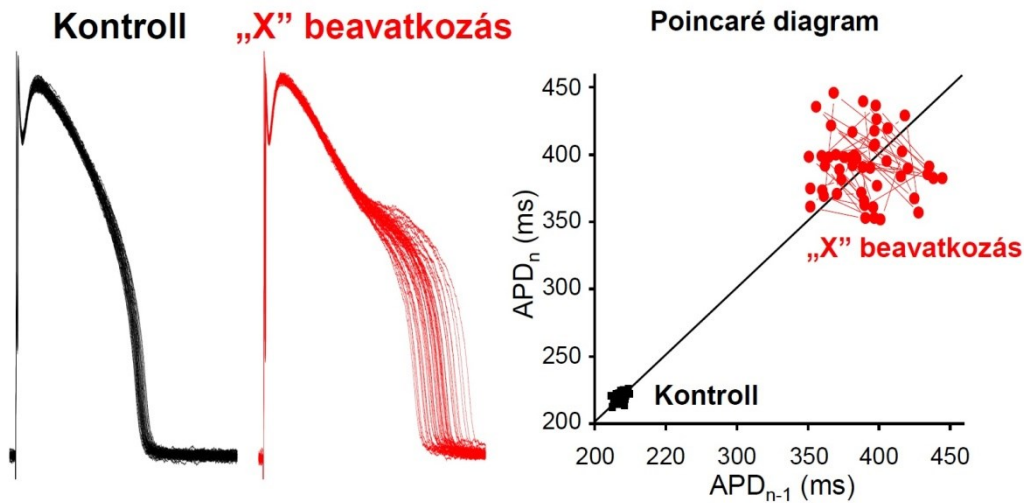
A SV kvantitatív meghatározásához szükség van az APD értékre valamint az alábbi képletre.

$$SV = \frac{\sum_{i=1} (|APD_n - APD_{n-1}|)}{[n \sqrt{2}]}$$

#### 3. egyenlet

ahol SV a rövidtávú variabilitás,  $APD_n$  és  $APD_{n-1}$  az  $n$ -edik és  $n-1$ -edik AP időtartamának 90 %-ához tartozó időtartam,  $n$  pedig az egymást követő AP-ok számának felel meg (esetünkben  $n=50$ ). A későbbiekben APD jelzés alatt az  $APD_{90}$  értékét értem.

Fontos megemlíteni, hogy a tanulmány teljes ideje alatt csak olyan szívműködés AP-ját vettük számításba, melyeken kontroll körülmények között nem volt tapasztalható triggerelt aktivitás (EAD ill. késői utódepolarizáció (DAD)).



**6. ábra: A kamrai szívműsejtek akciós potenciál időtartamának (APD) rövidtávú beato-beat variabilitása (SV).** Az ábra bal oldalán 50 egymást követő akciós potenciál látható kontroll körülmények között, ill. valamely „X” beavatkozást követően. Az ábra jobb oldalán az ezen akciós potenciálok APD értékeinek felhasználásával készített Poincaré diagram látható. A fekete szín jelzi a kiindulási állapotot, míg piros a valamely „X” beavatkozás jelenlétében ábrázolt értékeket.

A disszertációban felhasznált eredmények 571 kutya kamrai szívműsejtből származnak összesen 158 állatból. Az összes vizsgált sejten – a szer adását megelőzően – kontroll állapotban kapott két legfontosabb paraméter átlaga és szórása a következő: APD  $221 \pm 1$  ms és SV  $2,72 \pm 0,03$  ms.

### 5.5. A sejtrövidülés mérése

A sejtrövidülés mérése során a sejteket 1 Hz frekvenciával alkalmazott szupramaximális ingerrel stimuláltuk 37 °C-on. Az ingerlést az AP mérésekkel ellentétben téringerléssel végeztük, melyhez egy 0,5 mm átmérőjű platina elektródapárt használtunk (Advent Research Materials Ltd., Oxford, Anglia). Az optikai jeleket (video edge detector system, VED-105, Crescent Electronics, Sandy, Utah, USA) Digidata 1440A (Molecular Devices) A/D átalakító segítségével, 240 Hz mintavételi frekvenciával digitalizáltuk. Az analóg-digitális konverzió **5.2.1. fejezetben** leírtak szerint történt. Az adatok kiértékelése során 10 egymást követő sejtrövidülést átlagoltunk és meghatároztuk a paramétereit (alapvonal, csúcsérték, amplitúdó). Az átlagolást percenként végeztük kontroll körülmények között – amint a kontrakciók amplitúdója stabil maradt –, valamint a szerhatást követően, kivéve a szerhatás első 5 percét, ahol is a folyamatok jobb nyomon követése érdekében fél percenként történt a kiértékelés. Eredményeink során a sejtrövidülés mértékét a kontroll körülmények között mért diasztolés sejt hossz százalékában fejeztük ki.

## 5.6. Vegyszerek és oldatok

Munkánk során az alábbi oldatokat használtuk:

- JMM tápoldat (Joklik-féle módosított MEM tápoldat): taurin (2,5 g/l), piruvát (175 mg/l), ribóz (750 mg/l), allopurinol (13,5 mg/l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (200 mg/l) és  $\text{NaHCO}_3$  (1,4 g/l), pH=6,8.
- MEM tápoldat: taurin (2,5 g/l), piruvát (175 mg/l), ribóz (750 mg/l), allopurinol (13,5 mg/l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (200 mg/l) és  $\text{NaHCO}_3$  (1,1 g/l), pH=7,4,  $[\text{Ca}^{2+}] = 2,5$  mM.
- Emésztő oldat: JMM tápoldat, 1 mg/ml kollagenáz (Type II, 230 U/mg), 0,2 % 2 g/l borjú albumin, 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ .
- Tyrode oldat: 144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, 10 mM glükóz, pH=7,4.
- Krebs oldat: 128,3 mM NaCl, 21,4 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 4 mM KCl, 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,42 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM glükóz, pH=7,4.
- Pipetta belső oldat: 3 M KCl, 3 mM  $\text{K}_2\text{ATP}$ , pH=7,3.

A mérések során alkalmazott különböző farmakonok felsorolását, alkalmazott koncentrációikat és a hatásuk rövid leírását az **1. táblázat** tartalmazza.

Méréseinket az AP paraméterek stabilizálódását követően kezdtük meg, a farmakonokat pedig a stabil hatás kialakulásáig perfundáltuk, általában 5-10 percig. Ahol releváns volt, ott – kontroll oldattal történő – kimosással zártuk a kísérletet.

Az alkalmazott vegyszerek törzsoldatait mindig a mérés napján, frissen készítettük és hígítottuk a felhasználni kívánt koncentráció értékre. A végkoncentráció elérésekor az oldószer (desztillált víz, etanol, DMSO) koncentrációja nem haladta meg a 0,1 %-ot, melyről bizonyított, hogy nincs hatással az ionáramokra<sup>1, 11</sup>.

## 5.7. Statisztikai analízis

A méréseink során kapott kísérleti eredményekből meghatároztuk a számtani középértéket, valamint a középérték körüli standard mérési hibát (standard error of the mean, SEM). Az adatok összehasonlítása során egy szempontos varianciaanalízist (one-way ANOVA), Student-féle kétmintás *t*-próbát vagy önkontrollos *t*-próbát alkalmaztunk. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a *P* értéke kisebb volt, mint 0,05. Az ábrákon a számtani középérték  $\pm$  SEM, valamint szignifikáns eltérés esetén csillag látható.

**1. táblázat: A mérések során használt szerek és azok alkalmazott koncentrációi, valamint a szerek hatásának bemutatása.**

<b>Alkalmazott szer</b>	<b>Alkalmazott koncentráció</b>	<b>Hatás</b>
4-aminopyridin	1 mM	nem szelektív $I_{to,1}$ gátlószer
A23187	1 $\mu$ M	$Ca^{2+}$ ionofór
BaCl <sub>2</sub>	0,3, 1, 3, 5 és 10 $\mu$ M	$I_{K1}$ gátlószer
BAPTA-AM	5 $\mu$ M	$Ca^{2+}$ kelátor
Bay K8644	20 és 200 nM	$I_{Ca,L}$ aktiváló szer
chromanol 293B	100 $\mu$ M	$I_{Ks}$ és $I_{to,1}$ gátlószer
ciklopiazonsav	1 $\mu$ M	SERCA gátlószer
DL-dithiothreitol	1 mM	redukálószer, antioxidáns
dofetilid	10, 30, 100 és 300 nM	$I_{Kr}$ gátlószer
E-4031	200 nM	$I_{Kr}$ gátlószer
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 $\mu$ M	oxidálószer
HMR 1556	500 nM	$I_{Ks}$ gátlószer
izoproterenol	10 nM	nem szelektív $\beta$ -receptor agonista
L-aszkorbinsav	1 mM	redukálószer, antioxidáns
lemakalim	0,1, 0,3, 1 és 5 $\mu$ M	$I_{K-ATP}$ aktiváló szer
L-glutation	1 mM	redukálószer, antioxidáns
lidokain	50 $\mu$ M	$I_{Na}$ gátlószer
nizoldipin	1 $\mu$ M	$I_{Ca,L}$ gátlószer
pioglitazon	1 és 10 $\mu$ M	antidiabetikus hatású, inzulinérzékenyítő
rianodin	10 $\mu$ M	RYR2 gátlószer
SEA0400	300 nM	$I_{NCX}$ gátlószer
tetrodotoxin	3 $\mu$ M	$I_{Na}$ gátlószer
veratridin	10, 30 és 100 nM	$I_{Na}$ aktiváló szer

## 6. Eredmények

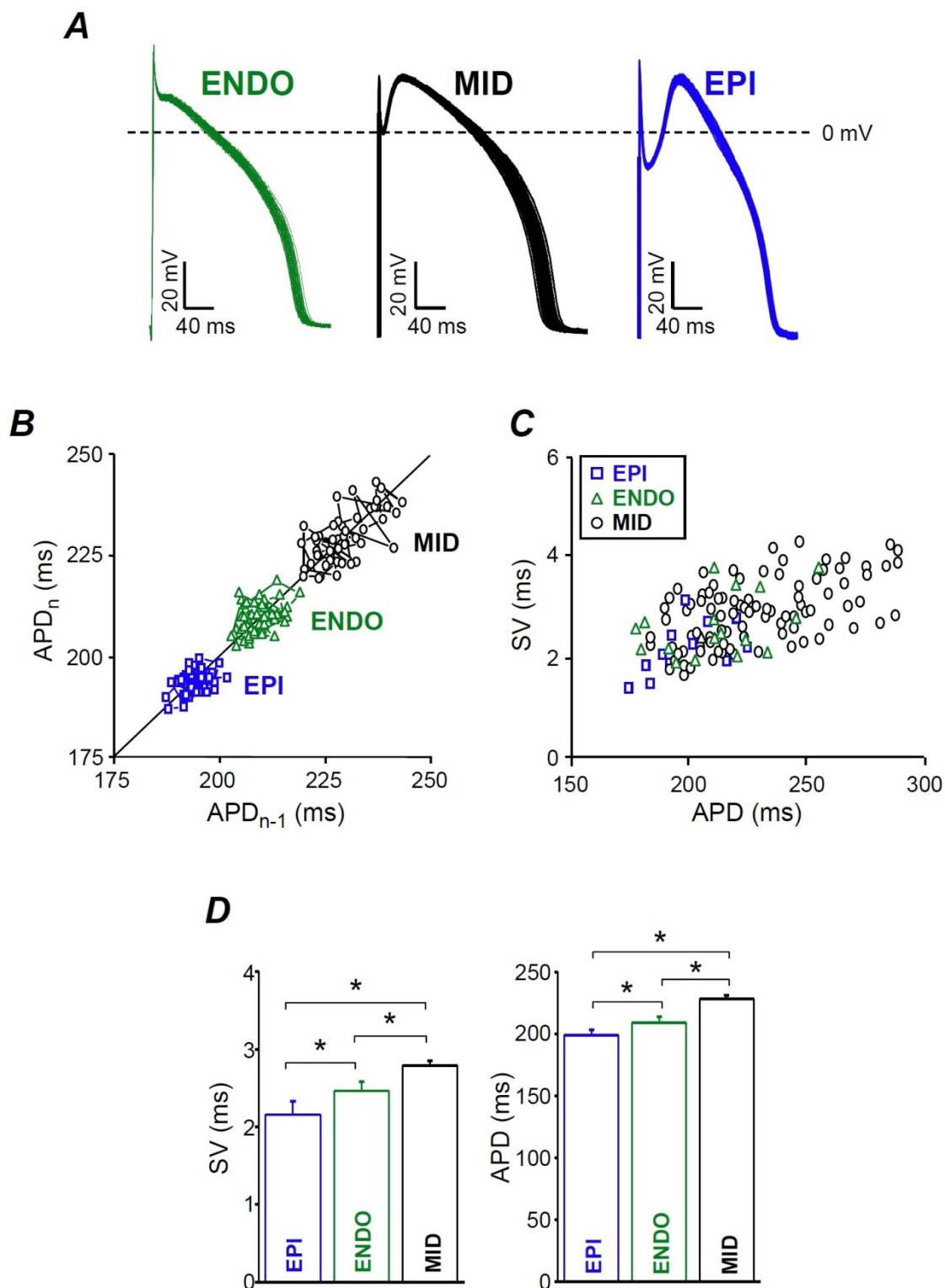
### 6.1. Az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitása a bal kamra falának különböző rétegeiben

Ahogy arról munkacsoportunk már beszámolt, a kamrafal különböző régióiból származó sejtek eltérő elektrofiziológiai tulajdonságokat és csatorna expressziós mintázatot mutatnak, mely magyarázatot ad az áramsűrűségekből található különbségekre<sup>145</sup>. A heterogén AP morfológia ismeretében tanulmányoztuk, hogy a transzmurális heterogenitás hogyan befolyásolja a SV-t. A MID sejtek mellett EPI és ENDO rétegből származó sejteken is vizsgálni kívántuk a SV-t.

Megállapítottuk, hogy az AP időtartama a MID sejteken a leghosszabb ( $229 \pm 3$  ms;  $n=94$ ), az EPI sejteken a legrövidebb ( $199 \pm 4$  ms;  $n=13$ ) és a kettő között helyezkednek el az ENDO sejtek APD értékei ( $209 \pm 5$  ms;  $n=18$ ). A SV értékek szintén ezt a mintázatot követik, így MID sejteken figyelhető meg a legnagyobb SV ( $2,93 \pm 0,07$  ms;  $n=94$ ), míg az EPI sejteken a legkisebb ( $2,16 \pm 0,17$  ms;  $n=13$ ). Az ENDO sejtek egy közbülső SV értéket ( $2,53 \pm 0,16$  ms;  $n=18$ ) mutatnak (**7. ábra**). Az APD és SV értékeket tekintve a MID sejtek szignifikánsan különböztek mind az EPI ( $P < 0,001$ ), mind az ENDO sejtektől ( $P < 0,003$ ). Az EPI és ENDO sejtek közötti különbségek is szignifikánsnak adódtak mindkét paraméter tekintetében ( $P < 0,05$ ).

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy vajon az EPI és MID sejtekre jellemző „spike-and-dome” AP morfológia milyen mértékben befolyásolja a SV-t, EPI sejteken gátoltuk a korai repolarizációért felelős  $I_{to1}$  áramot 1 mM 4-aminopiridinnel. A 4-aminopiridinnel kezelt EPI sejtek AP-jai így nagyban hasonlítottak az ENDO sejtek AP-jaira, azonban a SV növekedése helyett kis mértékű csökkenést tapasztaltunk (kontroll:  $3,24 \pm 0,35$  ms, 4-aminopiridin:  $2,67 \pm 0,31$  ms;  $n=9$ ). Az alkalmazott 4-aminopiridin nem volt hatással az APD-ra (kontroll:  $238 \pm 14$  ms, 4-aminopiridin:  $230 \pm 13$  ms;  $n=9$ ).

A transzmurális különbségek vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az AP időtartama nagyban befolyásolta a SV-t (**7. ábra, D**) ezért a továbbiakban a SV-APD összefüggést részleteiben kívántuk tanulmányozni. A dolgozat további részében bemutatott eredményeink MID sejteken végzett mérésekből származnak.

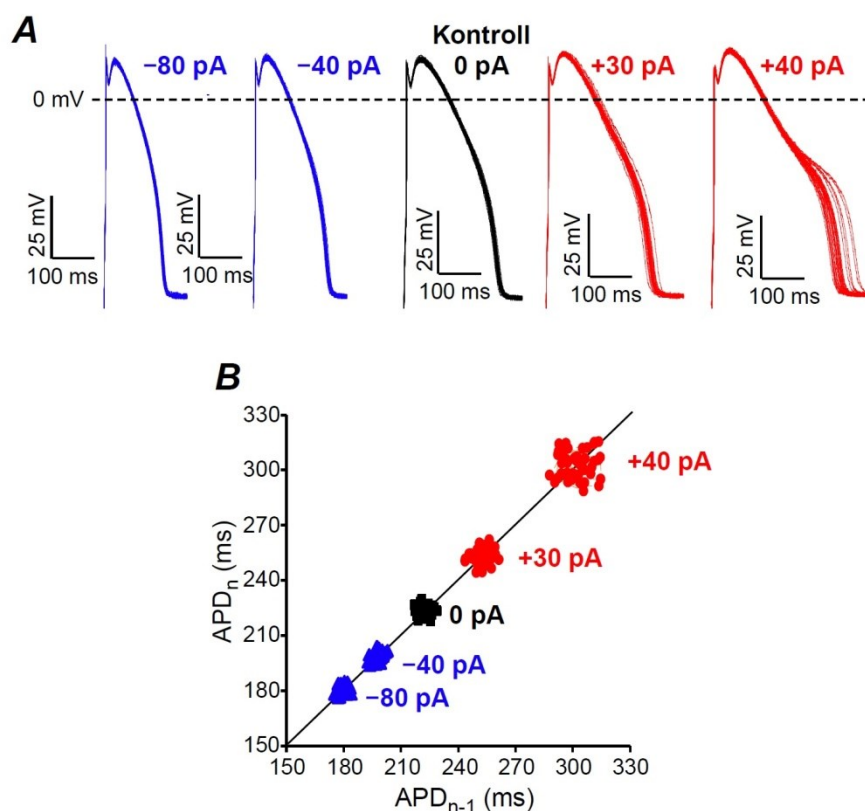


**7. ábra: A SV transmurális heterogenitása a kutyaszív bal kamrájának falában.** A kamra különböző régióiból izolált sejteken – szubepikardiális (EPI), midmiokardiális (MID) és szubendokardiális (ENDO) – meghatároztuk az APD-ot és a SV-t. **(A)** 50 db reprezentatív akciós potenciál az ENDO, MID és EPI sejteken. **(B)** Reprezentatív Poincaré diagram az előzőekben bemutatott három akciós potenciál sorozat alapján. Az ábra **C** és **D** paneljén az EPI (n=13), ENDO (n=18) és MID (n=94) régiókból származó sejteken kapott SV és APD értékek láthatóak. Csillaggal az egyes csoportok közötti szignifikáns eltéréseket ( $P < 0,05$ ) jelöltük.

## 6.2. Az akciós potenciál időtartam és a rövidtávú beat-to-beat variabilitás közötti összefüggés

### 6.2.1. Az elektrotónus injektálásával megváltoztatott akciós potenciál időtartam hatása a rövidtávú beat-to-beat variabilitásra

A transzmurális heterogenitást vizsgáló kísérleteink eredményei szerint a SV függ az APD-tól is. Ezért a továbbiakban különböző módokon változtattuk az APD-ot. Először a SV-APD közötti összefüggés vizsgálatához elektrotónus alkalmazásával befelé irányuló (inward) vagy kifelé irányuló (outward) áramot injektáltunk a sejtekbe áram-clamp (current-clamp) kísérleti elrendezésben, mely segítségével növeltük vagy épp csökkentettük az APD-ot. Ennek a kísérletsorozatnak a legfontosabb sajátága, hogy az áraminjekcióval – kémiai ágensek alkalmazása nélkül – egy meglehetősen széles skálán tudtuk változtatni az AP időtartamát (20-500 ms). Mindezt úgy tehetjük meg, hogy nem módosítottuk specifikusan egyik ionáramot sem (**8. ábra**). Ez az érvelés azért is helytálló, mivel az egyes ioncsatorna gátló- ill. aktiválószerre tekinthetünk úgy is, mintha egy befelé vagy kifelé irányuló áramot adnánk hozzá az AP platója alatt folyó nettó membránáramhoz, vagy vonnánk ki abból.



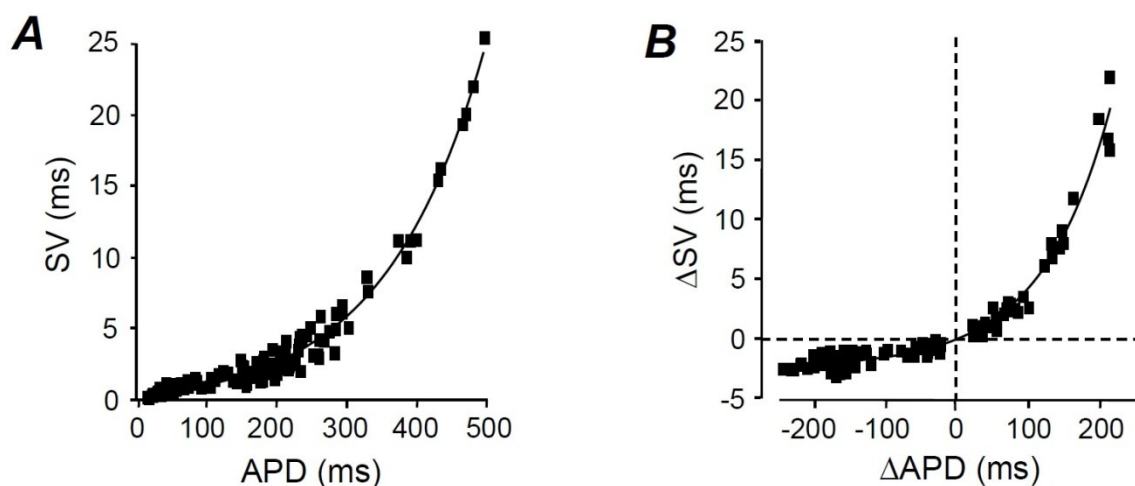
**8. ábra: Az APD és SV közötti összefüggés tanulmányozása.** Elektrotónus injektálásával megváltoztattuk az APD-ot. (A) 50 db reprezentatív akciós potenciál a -80, -40, +30 és +40 pA amplitúdójú injektált áram hatására valamint az áraminjekció nélküli kontroll esetben. (B) A Poincaré diagramot az A panelen bemutatott akciós potenciálok alapján szerkesztettük.

**2. táblázat: Az APD és SV közötti összefüggés tanulmányozása.** Az elektrotónusos kísérleteink során kapott APD és SV értékek az egyes áram amplitúdók esetén (n=9).

Áram (pA)	APD (ms)		SV (ms)	
	átlag	SEM	átlag	SEM
-600	32,20	4,02	0,42	0,07
-500	40,90	4,49	0,56	0,08
-400	44,93	5,87	0,64	0,10
-300	55,79	7,47	0,86	0,11
-200	84,50	10,80	1,12	0,13
-80	138,09	11,70	1,69	0,17
-40	167,94	4,31	1,85	0,18
0	213,47	6,97	2,69	0,16
30	242,94	9,59	3,74	0,41
40	310,56	18,91	7,44	1,28
50	386,13	29,65	11,53	1,92
60	451,20	16,20	17,85	1,85
70	480,44	14,63	22,00	3,00

Az elektrotónus amplitúdóját  $-600$  és  $+70$  pA között változtattuk (**2. táblázat**). Az áraminjekcióról bővebben az **Anyagok és módszerek** fejezet ad leírást (**4. ábra**). Az így kapott eredményeinket kiértékelve 117 adatpontot kaptunk (n=9). Minden egyes pont az adott elektrotónus esetén mért 50 AP átlagát reprezentálja (**9. ábra, A,B**). Kontrollnak az elektrotónus alkalmazása előtti (0 pA áram) AP-okat tekintettük.  $-80$  pA amplitúdójú anelektrotónus injektálása rövidítette az APD-ot ( $213 \pm 7$  ms-ról  $138 \pm 12$  ms-ra;  $P < 0,0001$ ) és csökkentette a SV-t ( $2,69 \pm 0,16$  ms-ról  $1,69 \pm 0,17$  ms-ra;  $P < 0,0001$ ),  $+40$  pA amplitúdójú katelektrotónus viszont növelte az APD-ot ( $311 \pm 19$  ms-ra;  $P = 0,0001$ ) és a SV-t is ( $7,44 \pm 1,28$  ms-ra;  $P < 0,02$ ). A további 10 elektronónus esetén kapott paraméterek átlagértékeit a **2. táblázat** foglalja össze.

Az elektrotónus alkalmazásával kapott eredményeinket ábráztuk a **9. ábrán**. Ezen eredményeink azt mutatták, hogy a SV értéke függ az APD-tól, nevezetesen, a két paraméter közötti összefüggés exponenciális (**9. ábra, A**). Ugyanígy exponenciális összefüggést kaptunk amennyiben az áraminjektálás hatására bekövetkezett SV és APD változásokat ( $\Delta SV$ ,  $\Delta APD$ ) ábráztuk (**9. ábra, B**). Ez azt jelenti, hogy bármilyen beavatkozás, ami megváltoztatja az APD-ot, az egyúttal SV változást is okoz, ezért minden szer-indukálta SV változást ( $\Delta SV$ ) csak az azt kísérő APD változás ( $\Delta APD$ ) tükrében szabad értelmezni. Így bevezetni kívánjuk a *relatív SV* fogalmát. A Krebs mérőoldatban, 1 Hz ingerlési frekvenciával folyamatosan stimulált sejteken az elektrotónus injektálásával regisztrált kontroll SV-APD és  $\Delta SV$ - $\Delta APD$  összefüggést leíró exponenciális görbékre (**9. ábra**) a továbbiakban mint *standard görbére* hivatkozom, és az egyes szerek okozta SV változást ehhez viszonyítom, az ettől való eltérést pedig *relatív SV*-nek nevezem.



**9. ábra: Az APD és SV közötti összefüggés tanulmányozása.** Az APD-ot elektrotónus injektálásával változtattuk meg. A teljes vizsgált tartomány: -600, -500, -400, -300, -200, -80, -40, 0, +30, +40, +50, +60 és +70 pA. **(A)** Az összes vizsgált elektrotónusos áram amplitúdó esetén a SV-t az APD függvényében ábrázoltuk. **(B)** Az áraminjekció nélküli (0 pA) kontroll esetekhez képesti SV változást ( $\Delta SV$ ) az elektrotónus hatására megváltozott APD-hoz hasonlítottuk ( $\Delta APD$ ). Az ábrán látható fekete folyamatos görbék (*standard görbék*) az **A** és a **B** panelen feltüntetett adatokból kapott exponenciális illesztés eredményei. Az ábrákon 117 egyedi mérési pont látható, melyek mindegyike 50 db akciós potenciál APD és SV értékeinek átlagát reprezentálja az egyes áram injekciók mellett. A mérési pontok 9 db sejt méréseiből származnak. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik.

Ennek értelmében ha egy folyamat, például egy ioncsatorna-gátlószer *relatív SV* növelő hatású, azt jelenti, hogy egységnyi APD változás mellett nagyobb SV növekedést okoz, így a gátlószerhez tartozó SV érték a **9. ábrán** látható *standard görbe* fölött helyezkedik.

A teljes vizsgált tartományban (-600 és +70 pA között) mért adatainkra illesztett egyeneseket a következő exponenciális egyenletek segítségével kaptuk:

$$SV = SV_0 + A \cdot e^{APD/t}$$

**4. egyenlet**

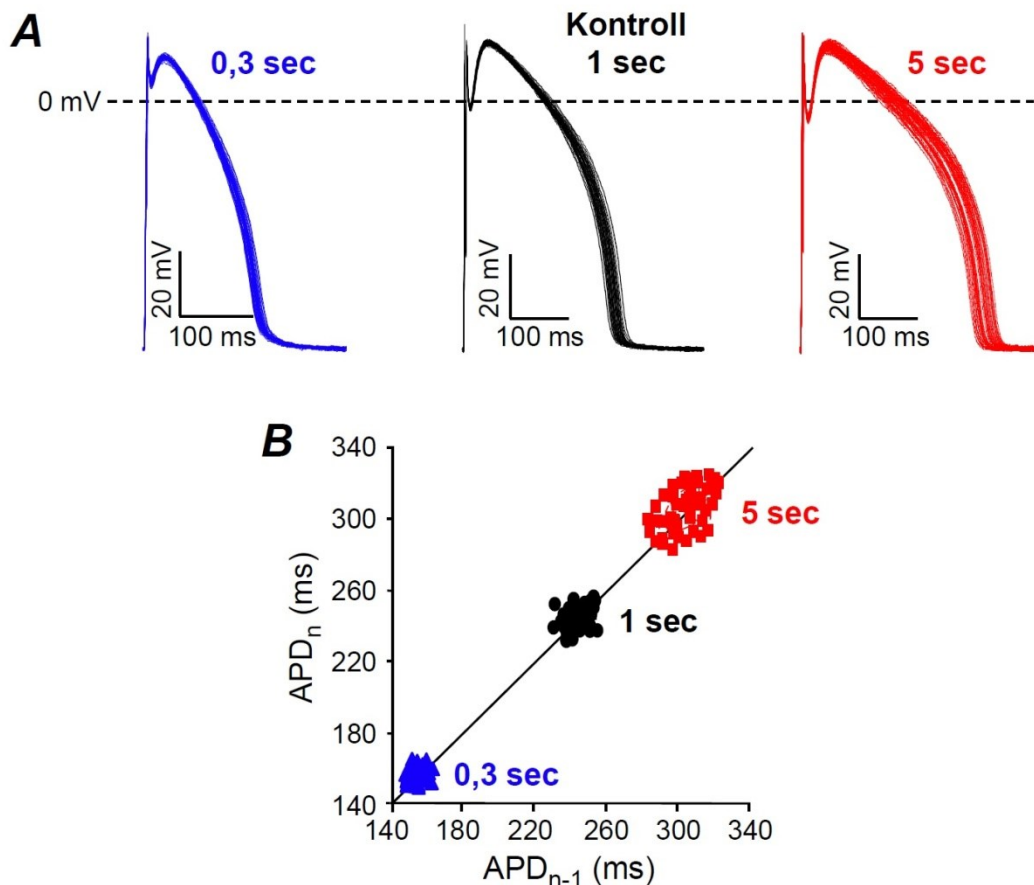
$$\Delta SV = \Delta SV_0 + A \cdot e^{APD/t}$$

**5. egyenlet**

A **4. egyenlet** alapján kapott paraméterek a következők voltak:  $SV_0=0$  ms,  $A=0,56$  ms és  $t=131$  ms, a regressziós koefficiens pedig  $r^2=0,98$ . A **5. egyenlet** alapján kapott paraméterek pedig:  $\Delta SV_0=-2,39$  ms,  $A=2,37$  ms és  $t=97$  ms, a regressziós koefficiens pedig  $r^2=0,97$ .

## 6.2.2. Az ingerlési frekvencia megváltoztatásának hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

Az AP hosszát nagymértékben befolyásolja az ingerlési frekvencia mértéke, így további kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a SV frekvencia-függő változásai hogyan viszonyulnak az elektrotónussal meghatározott értékekhez. Azaz, az APD változásával mennyire jósolható elő a SV változás. Azt tapasztaltuk, hogy az ingerlési frekvencia csökkentésével – tehát nagyobb ciklushossz esetén – nőtt az APD, és vele együtt a SV is (kontroll 1 Hz/1 sec: APD  $244 \pm 8$  ms, SV  $3,50 \pm 0,17$  ms; 0,2 Hz/5 sec: APD  $308 \pm 13$  ms, SV  $6,33 \pm 0,42$  ms;  $P < 0,0002$ ,  $n=8$ ) (10. ábra, A,B, 11. ábra, A,B). Magasabb ingerlési frekvencia esetén mind a két paraméter értéke csökkent (3,33 Hz/0,3 sec: APD  $153 \pm 5$  ms, SV  $2,42 \pm 0,19$  ms;  $P < 0,0001$ ,  $n=8$ ). A további ingerlési frekvenciákon mért eredményeinket a 3. táblázatban tüntettem fel.

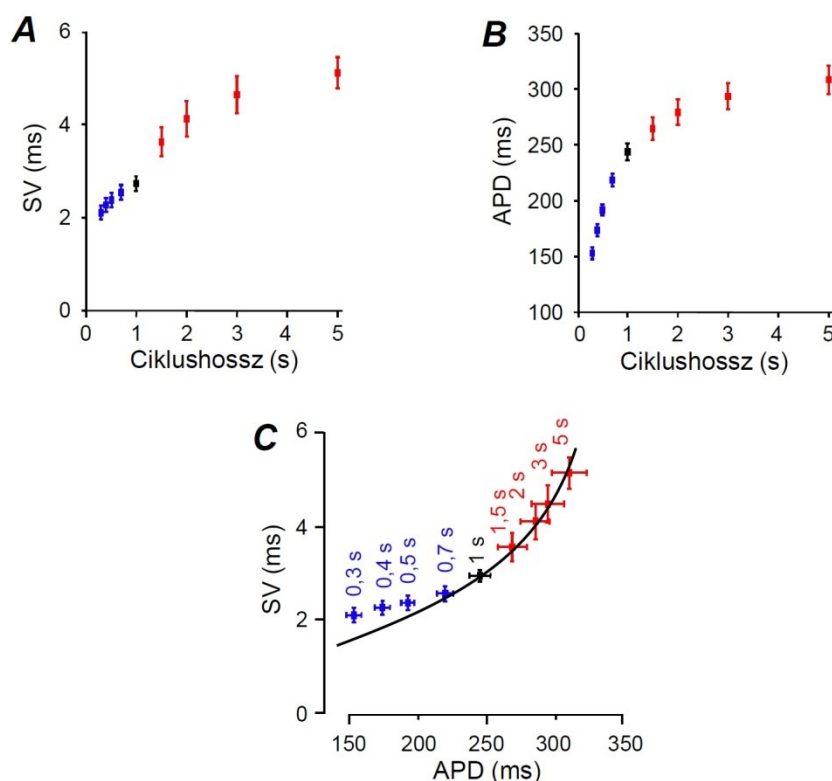


**10. ábra: Az ingerlési ciklushossz megváltoztatásának hatása az APD-ra és a SV-ra. (A)** 50 db reprezentatív akciós potenciál a 0,3 sec és 5 sec ciklushossz mellett, valamint a kontroll 1 sec ciklushossz (1 Hz) esetében. **(B)** A reprezentatív Poincaré diagramot az előzőekben bemutatott ciklushosszak esetén kapott akciós potenciálok alapján szerkesztettük.

**3. táblázat: Az ingerlési ciklushossz megváltoztatásával kapott APD és SV értékek az egyes ciklushosszak esetén (n=8).**

Ciklushossz (s)	APD (ms)		SV (ms)	
	átlag	SEM	átlag	SEM
0,3	152,81	5,25	2,42	0,19
0,4	173,41	5,43	2,84	0,19
0,5	191,75	4,85	2,97	0,20
0,7	218,66	5,77	3,12	0,20
1	243,72	7,66	3,50	0,16
1,5	264,42	10,36	4,63	0,39
2	279,34	11,51	5,41	0,48
3	290,85	11,80	5,72	0,50
5	308,28	12,69	6,33	0,42

Amennyiben az elektrotónus alkalmazása során kapott exponenciális görbével együtt ábrázoltuk az ingerlési frekvencia változtatása során kapott SV és APD értékeket, azt tapasztaltuk, hogy a pontok közel tökéletesen illeszkednek a *standard görbére*. Ez alól kivétel a 2 Hz-nél gyorsabb frekvenciák – 0,5 sec, vagy annál rövidebb ciklushosszak esetén –, amikor is a SV értékek nagyobbak bizonyultak az APD-SV összefüggésből várhatótól (**11. ábra, C**). Ez alapján feltételezzük, hogy valamely más – APD-tól független – faktor is befolyásolhatja a SV-t.



**11. ábra: Az ingerlési ciklushossz megváltoztatásának hatása az APD-ra és a SV-ra.** A SV (A) és APD (B) értékek változása a ciklushosszak függvényében. A teljes tartomány, amiben az ingerlési ciklushosszt vizsgáltuk: 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1, 1,5, 2, 3, 5 sec. (C) Az egyes ciklushosszak esetén kapott SV értékek az APD értékek függvényében. A fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD összefüggést jellemző – *standard görbe*. A frekvencia-függést vizsgáló kísérleteinkből származó eredmények 8 db szívizomsejtet reprezentálnak.

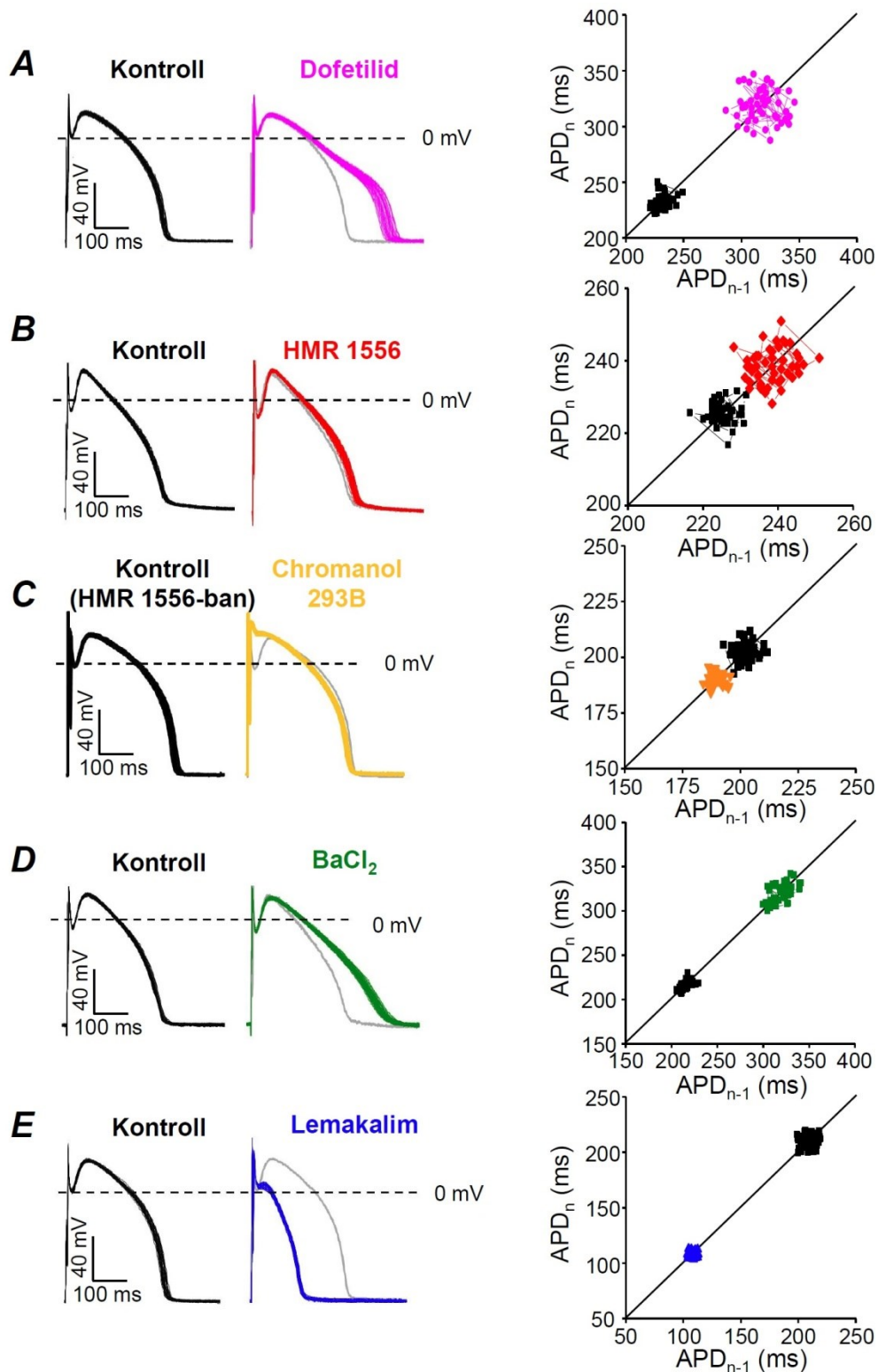
### 6.3. Az ionáramok szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásának meghatározásában

#### 6.3.1. Outward áramok szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásának meghatározásában

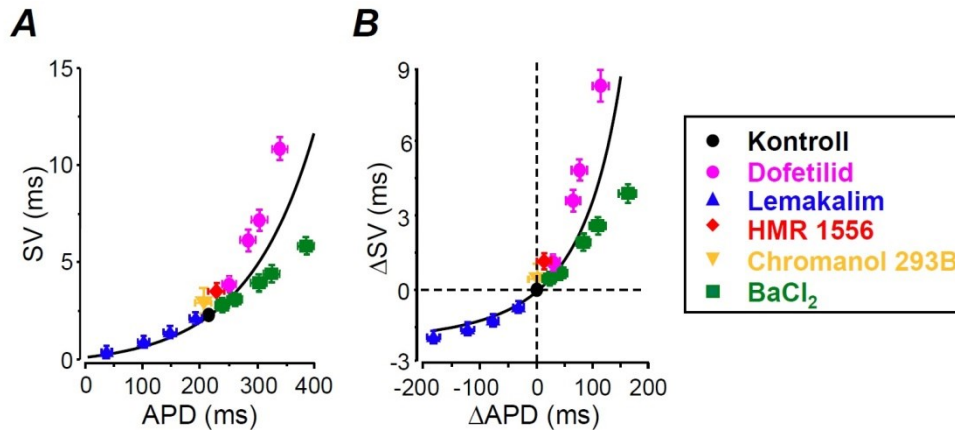
Az AP kialakításában részt vevő ionáramok közül elsőként az outward áramok szerepét vizsgáltuk a SV modulálásában. Ehhez a különböző áramok legszelektívebbnek vélt aktiváló- ill. gátlószereit alkalmaztuk (**1. táblázat**). Az outward áramok közül az öt releváns káliumáramot vizsgáltuk. Dofetiliddel gátoltuk a  $I_{K1}$ -ét, HMR 1556-tal az  $I_{Ks}$ -ét, chromanol 293B-vel (HMR 1556 jelenlétében) a  $I_{to1}$ -ot és végül  $BaCl_2$ -dal a  $I_{K1}$ -ot (**12. ábra, A-D**). Az  $I_{K-ATP}$ -ot pedig lemakalimmal aktiváltuk (**12. ábra, E**).

A kontroll AP-okhoz képest a dofetilid, a HMR 1556 és a  $BaCl_2$  kezelés növelte az APD-ot, a chromanol 293B nem befolyásolta, míg a lemakalim rövidítette azt. Az egyes szerek abszolút és relatív hatásait úgy tanulmányozhatjuk, ha a **9. ábrán** bemutatott *standard görbéhez* (kontroll SV-APD összefüggés) hasonlítjuk eredményeinket (**13. ábra**). Megállapítottuk, hogy a dofetilid mind a négy alkalmazott koncentrációja szignifikánsan növelte a SV-t (kontroll:  $2,71 \pm 0,12$  ms;  $3,83 \pm 0,37$  ms,  $6,52 \pm 0,61$  ms,  $7,29 \pm 0,51$  ms,  $10,97 \pm 0,69$  ms, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM dofetilidben;  $P < 0,04$ ,  $n=7-30$ ), és az APD-ot (kontroll:  $218 \pm 4$  ms;  $246 \pm 5$  ms,  $287 \pm 5$  ms,  $301 \pm 8$  ms,  $342 \pm 8$  ms, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM dofetilidben;  $P < 0,0001$ ,  $n=7-30$ ). A dofetilid okozta SV növekedés nagyobb mértékű volt, mint ami az APD növelés alapján várható lenne, azaz a *relatív SV* növekedett (**13. ábra, B**).

Hasonló eredményt kaptunk az 500 nM HMR 1556 esetében is, a markáns SV növekedés ( $2,64 \pm 0,26$  ms-ról  $3,60 \pm 0,32$  ms-ra;  $P=0,002$ ,  $n=11$ ) csak kismértékű APD növekedéssel társult ( $207 \pm 6$  ms-ról  $220 \pm 7$  ms-ra;  $P < 0,0001$ ,  $n=11$ ). Ez a hatás leginkább akkor volt szembetűnő, amikor a  $\Delta SV$  értékeket ábrázoltuk a  $\Delta APD$  értékek függvényében. Ekkor ugyanis a HMR 1556 jelenlétében mért értékek a pozitív  $\Delta APD$  tartományban, a *standard görbe* fölött helyezkednek el (**13. ábra, B**). Ez azt bizonyítja, hogy a HMR 1556 SV növelő hatása jóval nagyobb mint azt a korábban tárgyalt kontroll SV-APD összefüggés alapján feltételeznénk. A  $I_{to1}$ -blokkoló chromanol 293B-t (100  $\mu M$ ) a HMR 1556 jelenlétében alkalmazva, az APD kismértékben ( $217 \pm 7$  ms-ról  $212 \pm 8$  ms-ra;  $n=17$ ), míg a SV szignifikánsan csökkent ( $3,47 \pm 0,25$  ms-ról  $2,63 \pm 0,17$  ms-ra;  $P < 0,004$  a HMR 1556-hoz képest,  $n=17$ ). Ezek a hatások nagyban hasonlítottak azokra az eredményeinkre, amikor az EPI sejteken a  $I_{to1}$ -ot 4-aminopiridinnel gátoltuk. Ez esetben a  $I_{Ks}$  gátlószereit is perfundáltuk, így a kapott adathalmaz szintén a *standard görbe* fölött található (**13. ábra, B**).



**12. ábra: Az outward ionáramok szerepe a SV modulálásában.** Az outward áramok közül gátoltuk a  $I_{Kr}$ -ét (100 nM dofetilid, **A**), a  $I_{Ks}$ -ét (500 nM HMR 1556, **B**), a  $I_{to1}$ -ot (100 μM chromanol 293B, 500 nM HMR 1556 jelenlétében, **C**) és a  $I_{K1}$ -ot (5 μM  $BaCl_2$ , **D**), valamint aktiváltuk az  $I_{K-ATP}$ -ot (1 μM lemakalim, **E**). Minden esetben 50 db reprezentatív akciós potenciál látható kontroll esetben és az egyes ioncsatorna gátló- és aktiválószerke jelenlétében. Az ábra jobb oldalán található Poincaré diagramokat a bemutatott akciós potenciálok időtartama alapján szerkesztettük. A szürke akciós potenciál az adott sejt kontrolljának – az átlagot reprezentáló – egy akciós potenciálja.



**13. ábra: Az outward ionáramok szerepe a SV modulálásában.** Gátoltuk a  $I_{K_r}$ -ét (10 nM, 30 nM, 100 nM és 300 nM dofetilid;  $n=7, 7, 30, 11$ ), a  $I_{K_s}$ -ét (500 nM HMR 1556;  $n=11$ ), a  $I_{to1}$ -ot (100  $\mu$ M chromanol 293B, 500 nM HMR 1556 jelenlétében;  $n=17$ ) és a  $I_{K1}$ -ot (0,3, 1, 3 és 5  $\mu$ M  $BaCl_2$ ;  $n=6, 18, 7, 27$ ), valamint aktiváltuk az  $I_{K-ATP}$ -ot (0,1, 0,3, 1 és 5  $\mu$ M lemakalim;  $n=6, 6, 7, 6$ ). A fekete körök a csatorna modulátorok nélkül kapott poolozott kontrollt jelölik. (A, B) A gátló- és aktiválószer által indukált APD és SV változások. Az A és B paneleken látható fekete folyamatos görbe a 9. ábrán bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD vagy  $\Delta SV-\Delta APD$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik.

Az  $I_{K-ATP}$  aktiválószer lemakalim minden alkalmazott koncentrációja csökkentette a SV-t (kontroll:  $2,87 \pm 0,16$  ms;  $2,28 \pm 0,31$  ms,  $1,56 \pm 0,22$  ms,  $1,11 \pm 0,15$  ms,  $0,64 \pm 0,09$  ms, 0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M lemakalimban;  $P < 0,0003$ ,  $n=6$ ), és ezzel együtt az APD-ot is olyan mértékben csökkentette (kontroll:  $217 \pm 6$  ms;  $191 \pm 7$  ms,  $148 \pm 9$  ms,  $102 \pm 9$  ms,  $38 \pm 5$  ms, 0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M lemakalimban;  $P < 0,0001$ ,  $n=6$ ), hogy mind a négy mérési pont a *standard görbén* helyezkedik el, így a lemakalim – vagyis az aktivált  $I_{K-ATP}$  – feltehetőleg nincs specifikus hatással a SV-ra (13. ábra, B).

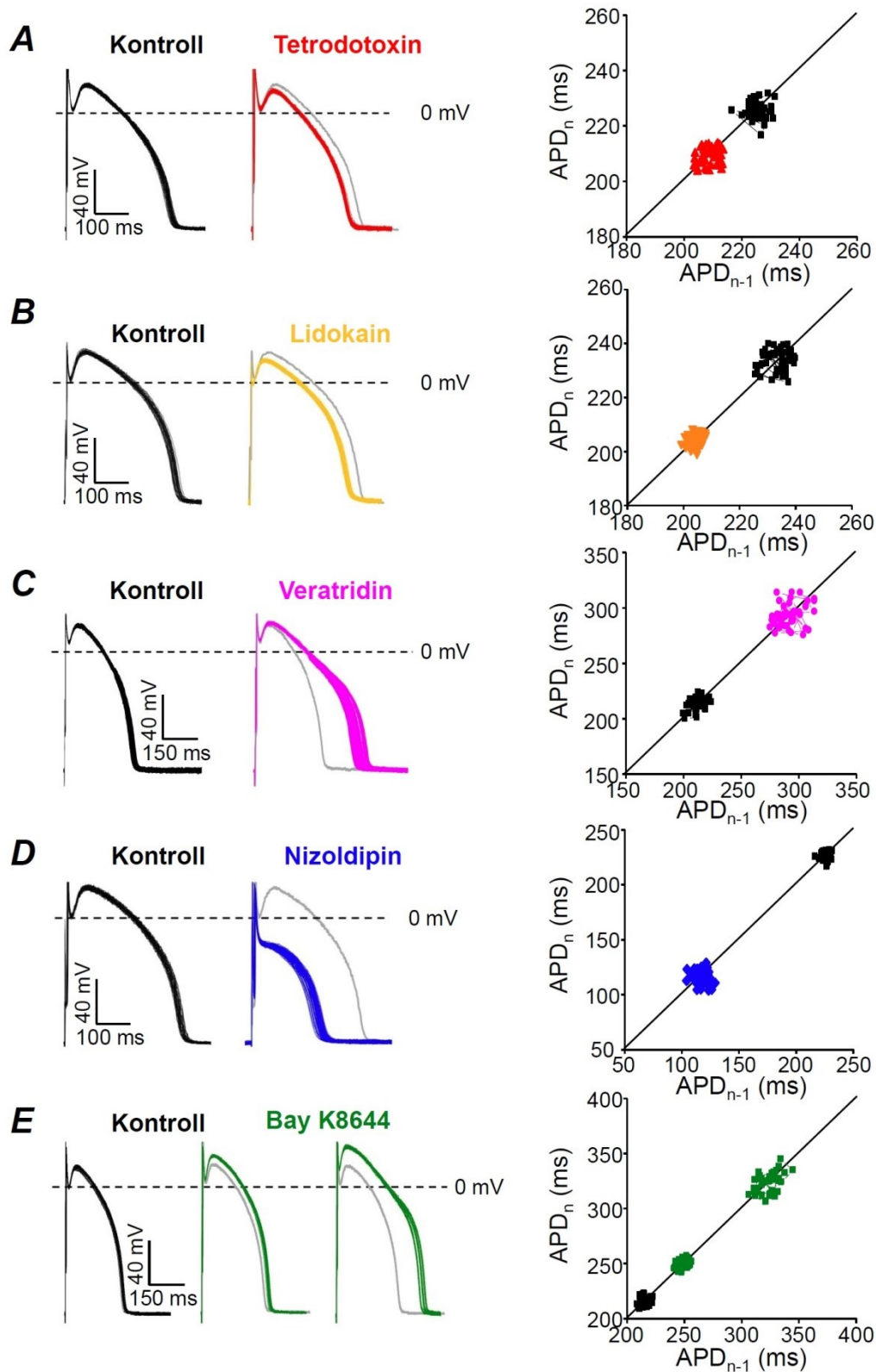
A  $BaCl_2$  perfúziót követően a nagyon jelentős APD növekedés (kontroll:  $215 \pm 4$  ms;  $239 \pm 8$  ms,  $260 \pm 8$  ms,  $304 \pm 5$  ms,  $324 \pm 7$  ms, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M  $BaCl_2$ -ban;  $P < 0,002$ ,  $n=6-27$ ) mellett csak kisebb mértékű SV növekedést (kontroll:  $2,39 \pm 0,09$  ms;  $2,60 \pm 0,18$  ms,  $3,42 \pm 0,14$  ms,  $4,06 \pm 0,21$  ms,  $4,52 \pm 0,23$  ms, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M  $BaCl_2$ -ban;  $P < 0,004$ ,  $n=6-27$ ) tapasztaltunk. A  $I_{K1}$  gátlásakor kapott pontok ábrázolásából kiderül, hogy a SV növelő hatás elmarad a kontroll SV-APD összefüggés során megállapítottól, ami azt sugallja, hogy a  $I_{K1}$  egy *relatív SV* növelő áram (13. ábra, B). A  $BaCl_2$  azonban az AP markáns ún. „háromszögesedését” okozta (12. ábra, D), vagyis változatlan platópotenciál mellett növelte az APD-ot, ezért relevánsabb lehet a  $BaCl_2$  esetén egy korrekciót bevezetni. A háromszögesedés meghatározásához az  $APD_{90}$  és az  $APD_{50}$  különbségét vesszük, mely kontroll esetben  $47 \pm 3$  ms, míg 5  $\mu$ M  $BaCl_2$  esetén  $90 \pm 8$  ms ( $P < 0,005$ ,  $n=8$ ). Amennyiben az  $APD_{90}-APD_{50}$  különbségével korrigáljuk a kapott adathalmazt, akkor a pontok az X tengely mentén 43 ms-mal balra tolnak és ebben az esetben az összes pont a *standard görbén* helyezkedik el, azt mutatva, hogy a  $I_{K1}$  egy indifferens ionáram a SV modulálásában.

### 6.3.2. Inward áramok szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásának meghatározásában

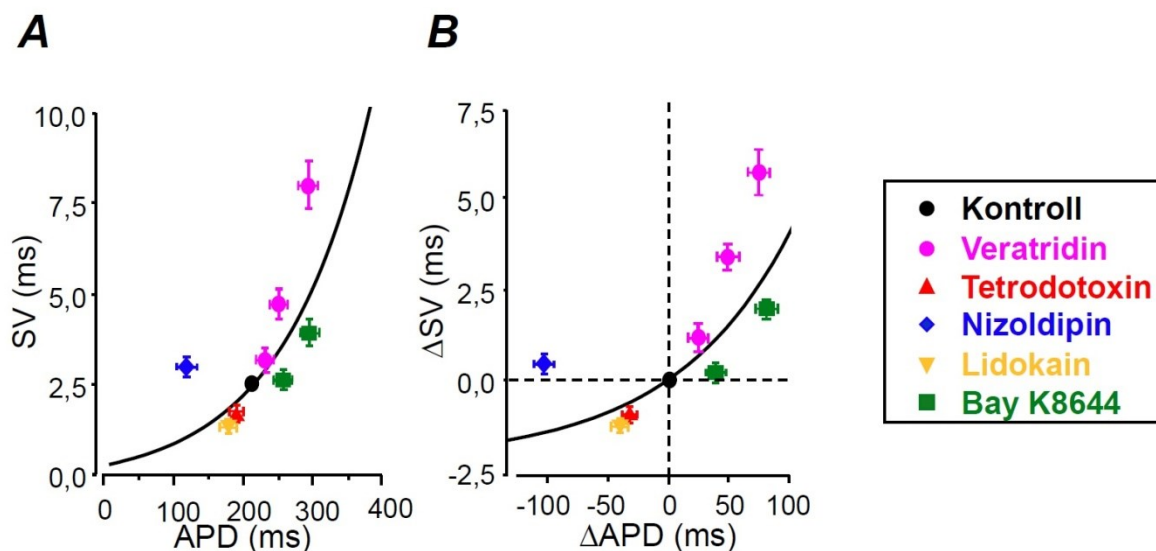
Az inward áramok közül a  $I_{Na}$  és az  $I_{Ca,L}$  szerepét tanulmányoztuk. A  $I_{Na}$ -ot tetrodotoxinnal vagy lidokainnal gátoltuk (**14. ábra, A,B**), míg aktiválására veratridint alkalmaztunk (**14. ábra, C**).

A veratridin koncentráció-függő módon, markánsan növelte mind az APD-ot (kontroll:  $214 \pm 7$  ms;  $216 \pm 11$  ms,  $249 \pm 11$  ms,  $295 \pm 14$  ms, 10 nM, 30 nM, 100 nM veratridinben;  $P < 0,04$ ,  $n=6-19$ ) mind a SV-t (kontroll:  $2,33 \pm 0,14$  ms;  $2,95 \pm 0,74$  ms,  $4,62 \pm 0,34$  ms,  $8,04 \pm 1,00$  ms, 10 nM, 30 nM, 100 nM veratridinben;  $P < 0,0001$ ,  $n=6-19$ ). Tetrodotoxin (kontroll: APD  $237 \pm 8$  ms, SV  $2,78 \pm 0,15$  ms; 3  $\mu$ M tetrodotoxin: APD  $204 \pm 8$  ms, SV  $1,95 \pm 0,14$  ms;  $P < 0,0001$ ,  $n=13$ ) és lidokain jelenlétében ezzel ellentétben mind az APD, mind a SV csökkent (kontroll: APD  $228 \pm 13$  ms, SV  $3,28 \pm 0,45$  ms; 50  $\mu$ M lidokain: APD  $187 \pm 13$  ms, SV  $2,25 \pm 0,44$  ms;  $P < 0,002$ ,  $n=9$ ). A Na-csatorna gátlás okozta SV csökkenés, valamint ellenkező esetben a veratridin hatására létrejött SV emelkedés is nagyobbak bizonyult mint azt a kontroll SV-APD összefüggésből várhatnánk (**15. ábra, A,B**). Ebből arra következtetünk, hogy a  $I_{Na}$  relatív SV növelő hatással bír.

Az  $I_{Ca,L}$  szerepének tanulmányozása során is egy gátlószert (nizoldipin) illetve egy aktiválószert (Bay K8644) alkalmaztunk (**14. ábra, D-E**). 1  $\mu$ M nizoldipin rendkívül jelentősen rövidítette az APD-ot ( $220 \pm 6$  ms-ról  $116 \pm 7$  ms-ra;  $P < 0,0001$ ,  $n=19$ ), ezzel együtt növelte a SV-t ( $2,44 \pm 0,20$  ms-ról  $2,96 \pm 0,27$  ms-ra;  $P < 0,02$ ,  $n=19$ ). A Bay K8644 kétféle koncentrációban került alkalmazásra. 20 nM Bay K8644  $224 \pm 7$  ms-ról  $262 \pm 6$  ms-ra ( $P < 0,0001$ ,  $n=12$ ), míg a 200 nM Bay K8644  $209 \pm 5$  ms-ról  $291 \pm 10$  ms-ra növelte az APD-ot ( $P < 0,0001$ ,  $n=21$ ), ugyanakkor a SV-ra kifejtett hatásuk eltérő volt. A 20 nM Bay K8644 nem változtatta meg a SV-t (kontroll:  $2,63 \pm 0,16$  ms; 20 nM Bay K8644:  $2,59 \pm 0,20$  ms;  $n=12$ ), míg 200 nM szignifikánsan növelte azt ( $2,20 \pm 0,13$  ms-ról  $4,16 \pm 0,30$  ms-ra;  $P < 0,0001$ ,  $n=21$ ). Ha a kapott SV és APD értékeket és változásokat a kontroll SV-APD összefüggéshez hasonlítjuk, akkor a Bay K8644 perfundálásakor kapott pontok a *standard görbe* alatt helyezkednek el, így relatív SV csökkenést tapasztalunk, míg az  $I_{Ca,L}$  gátlása relatív SV növelő hatású (**15. ábra, A,B**). Ezek alapján megállapítottuk, hogy az  $I_{Ca,L}$  jelentősen csökkenti a SV-t.



**14. ábra: Az inward ionáramok szerepe a SV modulálásában.** Az inward áramok közül a  $I_{Na}$ -ot  $3 \mu\text{M}$  tetrodotoxinnal (A) vagy  $50 \mu\text{M}$  lidokainnal (B) gátoltuk, a csatorna aktiválásához pedig  $100 \text{ nM}$  veratridint használtunk (C). Az  $I_{Ca,L}$ -ot  $1 \mu\text{M}$  nizoldipinnel gátoltuk (D) vagy  $20 \text{ nM}$  és  $200 \text{ nM}$  Bay K8644-gyel aktiváltuk (E). Minden esetben  $50$  db reprezentatív akciós potenciál látható kontroll esetben és az egyes ioncsatorna gátló- és aktiválószerke jelenlétében. Az ábra jobb oldalán található Poincaré diagramokat a bemutatott akciós potenciálok időtartama alapján szerkesztettük. A szürke akciós potenciál az adott sejt kontrolljának – az átlagot reprezentáló – egy akciós potenciálja.



**15. ábra: Az inward ionáramok szerepe a SV modulálásában.** Gátoltuk a  $I_{Na}$ -ot (3  $\mu$ M tetrodotoxin;  $n=13$  és 50  $\mu$ M lidokain;  $n=9$ ) és az  $I_{Ca,L}$ -ot (1  $\mu$ M nizoldipin;  $n=19$ ) vagy ellenkező esetben aktiváltuk a  $I_{Na}$ -ot (10 nM, 30 nM és 100 nM veratridin;  $n=6, 11, 19$ ) és az  $I_{Ca,L}$ -ot (20 nM és 200 nM Bay K8644;  $n=12, 21$ ). A fekete körök a csatorna modulátorok nélkül kapott poolozott kontrollt jelölik. **(A, B)** A gátló- és aktiválószerke által indukált APD és SV változások. Az **A** és **B** panelen látható fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD vagy  $\Delta$ SV- $\Delta$ APD összefüggést jellemző – *standard görbe*. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik.

#### 6.4. Az akciós potenciál időtartam és a rövidtávú beat-to-beat variabilitás közötti összefüggés további tanulmányozása

Annak érdekében, hogy valamely ionáram specifikus SV módosító szerepét elkülönítsük az APD módosító hatásától, elektrotónusos vagy pedig farmakológiai kompenzációt alkalmaztunk. Első esetben 100 nM dofetilid, 5  $\mu$ M  $BaCl_2$ , 100 nM veratridin és 200 nM Bay K8644 esetén egy konstans, pontosan meghatározott amplitúdójú outward áramot injektáltunk a sejtekbe (**16. ábra, B-E**), míg 3  $\mu$ M tetrodotoxin és 1  $\mu$ M nizoldipin esetén azonos metodikával alkalmazott inward áramot injektáltunk (**16. ábra, F,G**). Minden esetben az volt a célunk, hogy a megváltozott AP időtartamot minél precízebben a kontroll AP időtartamnak megfelelően kompenzáljuk (tűrészhatár:  $\pm 5$  ms a kontroll APD-hoz képest).

Megállapítottuk, hogy dofetilid kezelést követően az elektrotónus injektálás ellenére is – kiindulási AP időtartam mellett – magasabb maradt a SV (kontroll:  $2,37 \pm 0,19$  ms; dofetilid+tónus:  $2,68 \pm 0,29$  ms;  $P < 0,05$ ,  $n=7$ ) (**16. ábra, B**). Ezzel ellentétben  $BaCl_2$  esetében az APD változás kompenzálása után a SV szignifikánsan kisebbnek bizonyult a kontrollhoz képest (kontroll:  $2,31 \pm 0,20$  ms;  $BaCl_2$ +tónus:  $1,97 \pm 0,16$  ms;  $P < 0,04$ ,  $n=8$ ) (**16. ábra, C**). Ez szintén azt jelentené, hogy változatlan APD esetén a  $I_{K1}$  hiányában a SV alacsonyabb lenne.



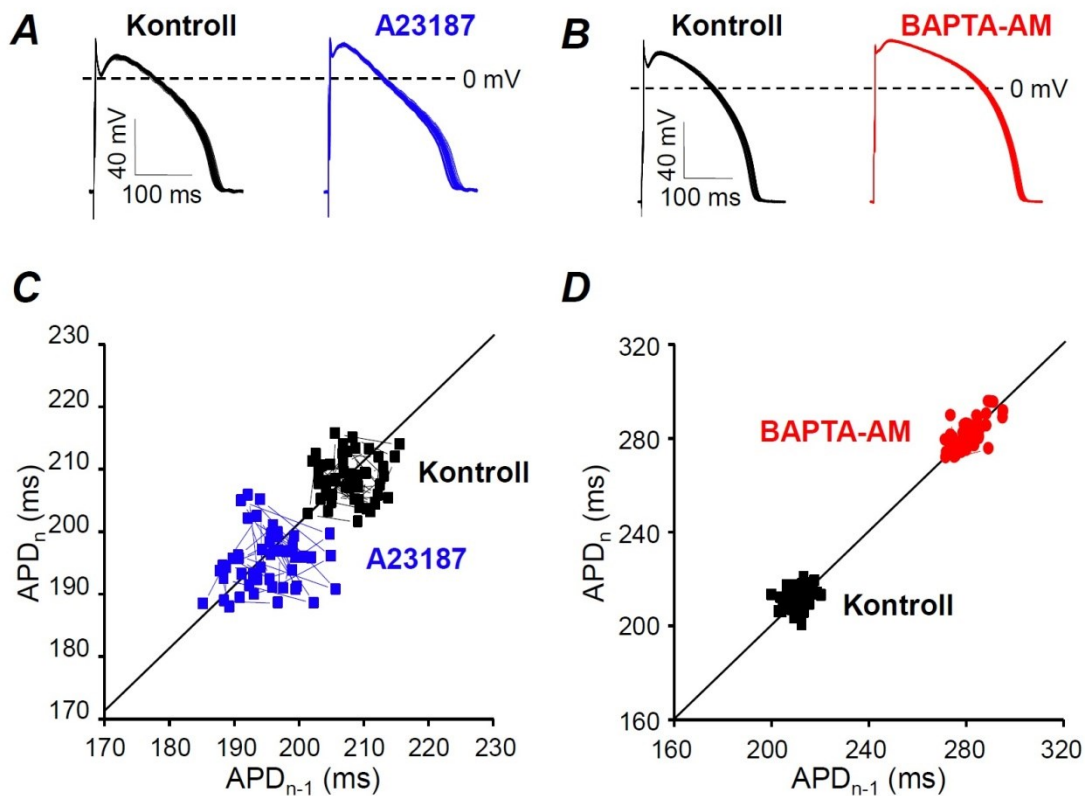


**A-D).** Ehhez ki kellett választanunk két olyan szert, amelyik növeli vagy csökkenti az APD-ot. Mivel a lemakalim jelentős APD rövidülést, a BaCl<sub>2</sub> pedig markáns APD növekedést okozott és mindezt a *relatív SV* szempontjából indifferens módon tették, választásunk e két szer alkalmazására esett. Az APD kompenzálásához a két szer koncentrációjának nagyon pontos titrálására volt szükség. A dofetilid és a veratridin APD növelő hatását lemakalim adásával kompenzáltuk, míg tetrodotoxin és nizoldipin esetén BaCl<sub>2</sub>-ot alkalmaztunk a kompenzáláshoz. A kiindulásival megegyező APD-ok mellett továbbra is emelkedett SV-t tapasztaltunk dofetilid (kontroll: 3,04±0,22 ms; dofetilid+lemakalim: 4,35±0,28 ms;  $P<0,04$ , n=5) (**17. ábra, A**) és veratridin (kontroll: 2,87±0,13 ms; veratridin+lemakalim: 4,65±0,52 ms;  $P<0,02$ , n=8) (**17. ábra, B**) jelenlétében. Tetrodotoxin esetén ez az érték a kontroll SV alá csökkent (kontroll: 2,36±0,10 ms; tetrodotoxin+BaCl<sub>2</sub>: 2,10±0,09 ms;  $P<0,05$ , n=6) (**17. ábra, C**), végül pedig nizoldipin hatására a SV még tovább emelkedett (kontroll: 2,06±0,26 ms; nizoldipin+BaCl<sub>2</sub>: 5,38±0,68 ms;  $P=0,0006$ , n=7) (**17. ábra, D**). A két különböző módszerrel történő APD kompenzálás eredményei tehát hasonlóknak bizonyultak, nevezetesen, hogy a I<sub>Kr</sub> és az I<sub>Ca,L</sub> specifikusan SV csökkentő hatású, míg a I<sub>Na</sub> növeli azt. Azt azonban mindenképp érdemes kiemelni, hogy a legmarkánsabb hatások azon kísérleteinkben voltak láthatóak – függetlenül attól, hogy melyik módszerrel végeztük a kompenzálást – ahol nizoldipint alkalmaztunk. Ez ismételtén bizonyítja az I<sub>Ca,L</sub> fontos szerepét a SV szabályozásában.

## **6.5. Az intracelluláris kalcium homeosztázis befolyásolásának hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására**

### **6.5.1. Az intracelluláris kalcium koncentráció változásának hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására**

Többféle lehetőség is adott az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> megváltoztatására. Kísérleteink során az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> növelésére a nagy Ca<sup>2+</sup>-szelektivitású A23187 (Ca<sup>2+</sup> ionofór, calcimycin) nevű, antibiotikus tulajdonsággal is bíró Ca<sup>2+</sup> ionofór molekulát alkalmaztunk, mely stabil 2:1 komplexet képes alkotni divalens kationokkal. Jelenlétében a Ca<sup>2+</sup> képes átjutni a sejtmembránon. Intakt sejteken gyakorta használnak Ca<sup>2+</sup> ionofór molekulákat az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelésére<sup>112, 167</sup>. 1 μM A23187 25 percig történő inkubálása után az emelkedett [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> hatására APD rövidülést tapasztaltunk (207±4 ms-ról 170±5 ms-ra;  $P<0,0001$ , n=14) míg az abszolút SV értékét csak a kísérlet kezdetén változtatta meg (kontroll: 2,81±0,13 ms; 3,29±0,19 ms, 2,83±0,19 ms, 5. és

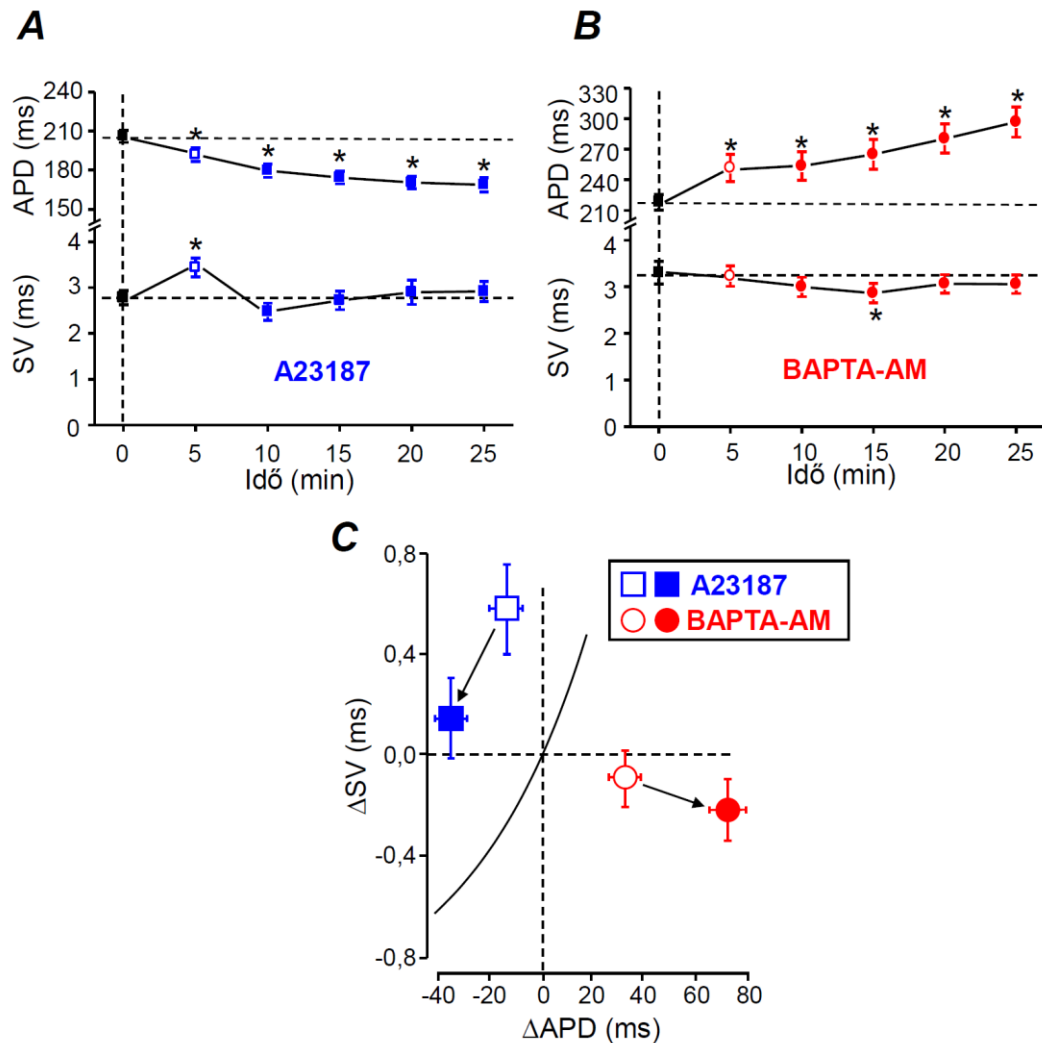


**18. ábra: Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) hatása a SV-ra. (A, C) Az  $[Ca^{2+}]_i$  növeléséhez 1  $\mu M$  A23187  $Ca^{2+}$  ionofórt alkalmaztunk (B, D) Az  $[Ca^{2+}]_i$  csökkentéséhez 5  $\mu M$  BAPTA-AM intracelluláris  $Ca^{2+}$  kelátort használtunk. (A, B) 50 db reprezentatív akciós potenciál kontroll esetekben ill. az A23187 vagy BAPTA-AM jelenlétében. (C, D) Az A és B paneleken bemutatott akciós potenciálok alapján szerkesztett reprezentatív Poincaré diagramok 25 perc szerhatást követően.**

25. perc A23187-ben;  $P < 0,03$  az 5. perc A23187 esetében a kontrollhoz viszonyítva,  $n=14$ ). Összességében az APD rövidüléshez nem társult SV csökkenés (18. ábra, A,C).

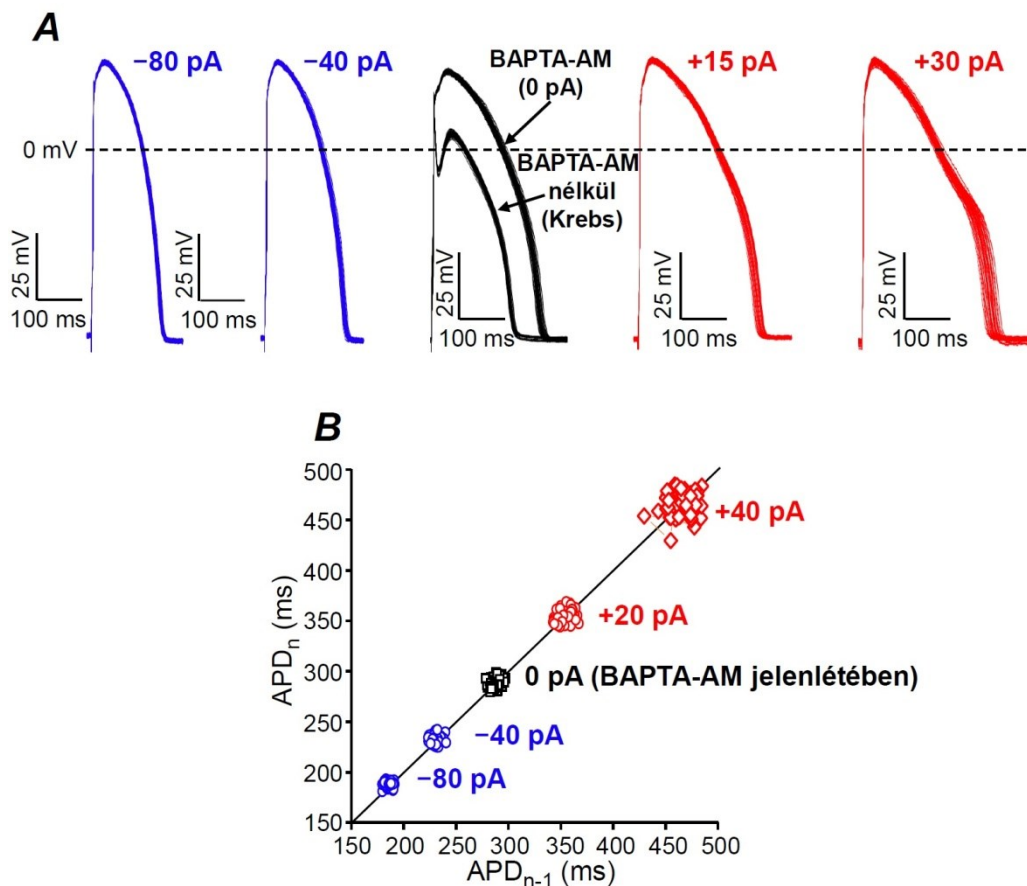
Vizsgálatunk másik részében a BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) nevű  $Ca^{2+}$  kelátort alkalmaztuk. A BAPTA nagyobb  $Ca^{2+}$  szelektivitású mint az egyéb kelátorok (pl. EDTA, EGTA), ezeknél 50-400x gyorsabban köti és szabadítja fel a  $Ca^{2+}$ -ot, valamint kevésbé érzékeny a pH változásaira<sup>157</sup>. Minden BAPTA molekula két  $Ca^{2+}$  megkötésére képes. Kísérleteinkben a sejteket a BAPTA acetoximetilészter formájával inkubáltuk (BAPTA-AM), amely képes átlépni a sejtmembránon, majd az intracelluláris nem specifikus észterázok lehasítják az észter csoportot, és az így keletkezett aktív forma már képes a  $Ca^{2+}$  megkötésére. 5  $\mu M$  BAPTA-AM hatására az AP időtartama (az észterázok folyamatos hasításának eredményeképpen) fokozatosan nőtt (25. percben 218 $\pm$ 8 ms-ról 297 $\pm$ 15 ms-ra;  $P < 0,0001$ ,  $n=17$ ) (18. ábra, B,D), azonban a SV értéke vagy nem változott, vagy csökkent (kontroll 3,30 $\pm$ 0,25 ms; 2,86 $\pm$ 0,21 ms, 3,06 $\pm$ 0,20 ms, 15. és 25. perc BAPTA-AM-ben;  $P < 0,03$  a 15. perc BAPTA-AM esetében a kontrollhoz viszonyítva,  $n=17$ ) (19. ábra, B). A két vizsgált szer esetében lassan állt be a steady-state állapot, így

méréseinket legalább 25 percig végeztük (**19. ábra, A,B**). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a citoszólikus  $Ca^{2+}$  koncentráció emelkedése a *relatív SV* növekedését okozza (**19. ábra, C**).



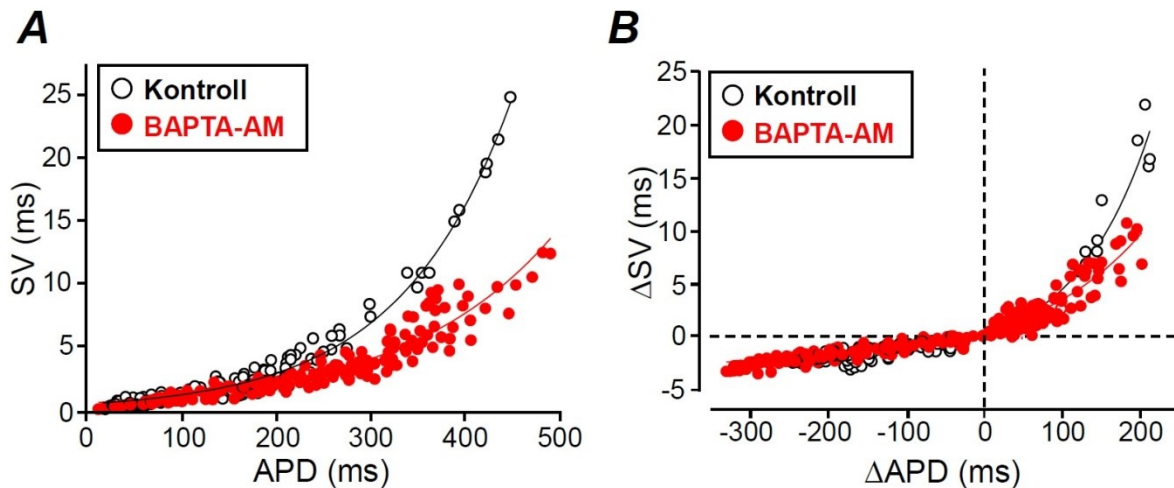
**19. ábra:** Az  $[Ca^{2+}]_i$  változás időfüggő hatása a SV-ra és az APD-ra. (**A, C**) Az  $[Ca^{2+}]_i$  növeléséhez  $1 \mu M$  A23187  $Ca^{2+}$  ionofórt ( $n=14$ ) alkalmaztunk, (**B, C**) ellenkező esetben az  $[Ca^{2+}]_i$  csökkentéséhez pedig  $5 \mu M$  BAPTA-AM intracelluláris  $Ca^{2+}$  kelátort ( $n=17$ ) használtunk. (**A, B**) Az A23187 és a BAPTA-AM indukálta APD és SV változásokat az idő függvényében ábrázoltuk. (**C**) Az A23187 és a BAPTA-AM hatása a *relatív SV*-ra ( $\Delta SV - \Delta APD$ ). Az üres szimbólumok a szerhatást követő 5. perc, míg a teli szimbólumok a 25. perc eredményeit mutatják. Az **C** panelen látható fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll  $\Delta SV - \Delta APD$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik. Csillaggal a kontroll adatokhoz (APD és SV) képesti szignifikáns eltéréseket ( $P < 0,05$ ) jelöltük.

Következő kísérletsorozatunkban a BAPTA-AM kezelést kombináltuk a korábban bemutatott elektrotónus injekciójával (**20. ábra**). A BAPTA-AM hatás stabilizálódása (markáns platópotenciál emelkedés ill. APD növekedés) után mért AP-okat tekintettük kontrollnak (0 pA) (**20. ábra, A,B**). Az egyre nagyobb amplitúdójú inward áram injektálása tovább növelte az APD-ot, míg az outward áram az AP rövidülését okozta. A mérési protokoll



**20. ábra: Az SV-APD összefüggés tanulmányozása intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  kelátor jelenlétében.** Ezen kísérleteinkben a 25 perc 5  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM perfúziót követően kialakult áraminjekció nélküli (0 pA) APD-hoz viszonyítottuk az elektrotónus hatására megváltozott értékeket. Ezt követően elektrotónus injektálásával megváltoztattuk az APD-ot. **(A)** 50 db reprezentatív akciós potenciál a  $-80$ ,  $-40$ ,  $+15$  és  $+30$  pA amplitúdójú injektált áram hatására valamint az áraminjekció nélküli esetekben (Krebs mérőoldat vagy BAPTA-AM jelenlétében). **(B)** A reprezentatív Poincaré diagramot az előzőekben bemutatott öt tartomány alapján szerkesztettük.

megegyezett a korábbiakban bemutatottakkal. Az injektált elektrotónusok amplitúdójában különbség tapasztalható ( $-600 - +45$  pA) a korábbi, csak elektrotónussal végzett kísérleteinkhez képest. Ezt az magyarázza, hogy BAPTA-AM jelenlétében eleve hosszabbak az AP-ok, így a pozitív elektrotónus hatására a sejtek hajlamosabbak voltak a EAD generálásra. A SV-t ábrázolva az APD függvényében azt tapasztaltuk, hogy BAPTA-AM jelenlétében az elektrotónussal előidézett APD változás kisebb mértékű SV növekedést okozott, mint amit BAPTA-AM kezelés nélkül láttunk. Ez a hatás a hosszabb AP-ok esetén még kifejezettebb volt **(21. ábra, A,B)**.  $-80$  pA amplitúdójú anelektrotónus mellett is hosszabb AP-ok voltak mérhetőek BAPTA-AM jelenlétében (APD  $190 \pm 7$  ms, SV  $1,86 \pm 0,12$  ms), csakúgy, mint  $+40$  pA amplitúdójú katelektrotónus esetén (APD  $414 \pm 25$  ms, SV  $9,14 \pm 2,46$  ms). A további 11 elektronónus esetén kapott paraméterek átlagértékeit a **4. táblázat** foglalja össze.



**21. ábra: Az SV-APD összefüggés tanulmányozása intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  kelátor jelenlétében.** Az APD-ot 25 perc  $5 \mu\text{M}$  BAPTA-AM előkezelést követően  $-600 \text{ pA}$  és  $+45 \text{ pA}$  közötti elektrotónus injektálásával változtattuk meg. **(A)** Az összes vizsgált elektrotónusos áram amplitúdó esetén a SV-t az APD függvényében ábrázoltuk. **(B)** Az elektrotónus hatására bekövetkező SV és APD változást ( $\Delta\text{SV}$ ,  $\Delta\text{APD}$ ) az elektrotónus nélküli SV és APD értékekhez viszonyítottuk. Az üres fekete szimbólumok és a fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD vagy  $\Delta\text{SV}$ - $\Delta\text{APD}$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. A piros teli szimbólumok és a piros folyamatos görbe pedig a BAPTA-AM jelenlétében injektált elektrotónusos kísérletekből származó adataink, ill. az azokra kapott exponenciális illesztés eredménye. Az ábrákon 117 kontroll (9 db miocita) és 209 BAPTA-AM jelenlétében kapott (14 db miocita) egyedi mérési pont látható, melyek mindegyike 50 db akciós potenciál APD és SV értékeinek átlagát reprezentálja az egyes áram injekciók mellett. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik (Krebs mérőoldathoz vagy BAPTA-AM-hez képest).

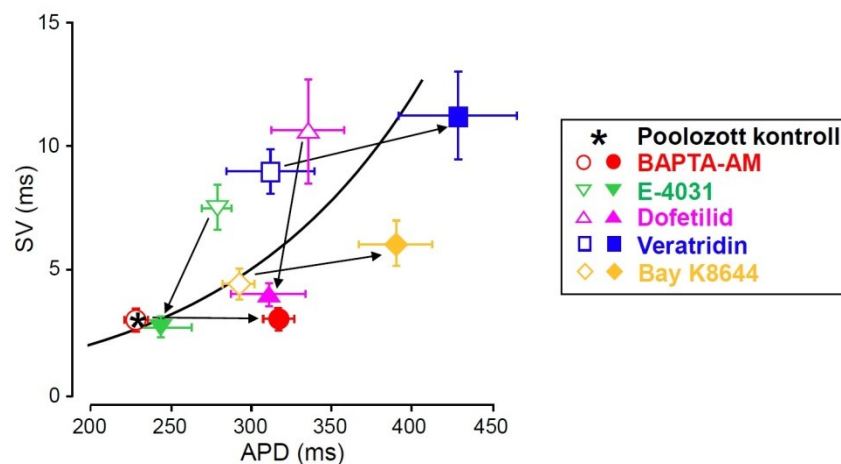
A teljes vizsgált tartományban ( $-600$  és  $+45 \text{ pA}$  között) mért adatainkra illesztett egyeneseket exponenciális egyenletek segítségével kaptuk. A **4. egyenlet** alapján kapott paraméterek a következők voltak:  $\text{SV}_0=0 \text{ ms}$ ,  $A=0,63 \text{ ms}$  és  $t=176 \text{ ms}$ , a regressziós koefficiens pedig  $r^2=0,86$ . A **5. egyenlet** alapján kapott paraméterek pedig:  $\Delta\text{SV}_0=-2,8 \text{ ms}$ ,  $A=3,1 \text{ ms}$  és  $t=146 \text{ ms}$ , a regressziós koefficiens pedig  $r^2=0,92$ .

Ezek után kíváncsiak voltunk arra, hogyan befolyásolja a BAPTA-AM a *relatív SV*-t egy megelőző – farmakológiai módszerekkel történő – APD növelést követően (**22. ábra**). Megismételtük a gátló- és aktiválószerrel végzett kísérleteinket, melyek során az adott szer hatásának beállta után, az adott szer jelenlétében alkalmaztuk a BAPTA-AM kezelést. A  $I_{\text{Kr}}$ -ét ez esetben is  $100 \text{ nM}$  dofetiliddel vagy  $200 \text{ nM}$  E-4031-gyel gátoltuk, a  $I_{\text{Na}}$  aktiválására  $100 \text{ nM}$  veratridint, míg az  $I_{\text{Ca,L}}$  aktiválásához  $200 \text{ nM}$  Bay K8644-et alkalmaztunk. Önmagában alkalmazva mind a négy szer markánsan növelte az APD-ot. Azonban a  $I_{\text{Kr}}$  gátlást követő BAPTA-AM perfúzió csökkentette az AP időtartamát (dofetilid:  $330 \pm 21 \text{ ms}$ ; dofetilid+BAPTA-AM:  $300 \pm 18 \text{ ms}$ ;  $P < 0,02$ ,  $n=7$ ; E-4031:  $275 \pm 10 \text{ ms}$ ; E-4031+BAPTA-AM:

**4. táblázat: Az APD és SV közötti összefüggés tanulmányozása az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> kelátor BAPTA-AM jelenlétében.** Az elektrotónusos kísérleteink során kapott APD és SV értékek az egyes áram amplitúdók esetén (n=14).

Áram (pA)	APD (ms)		SV (ms)	
	átlag	SEM	átlag	SEM
-600	53,34	2,63	0,50	0,04
-500	69,14	1,93	0,66	0,04
-400	78,23	4,65	0,72	0,05
-300	100,47	4,07	0,99	0,07
-200	139,13	3,52	1,17	0,08
-80	189,94	7,07	1,86	0,12
-40	230,29	8,51	2,24	0,11
0	291,83	11,12	2,78	0,14
10	333,80	17,23	4,20	0,29
20	371,79	25,81	5,26	0,76
30	393,23	23,43	7,07	1,08
40	414,09	25,13	9,14	2,46
45	416,63	6,53	10,20	1,24

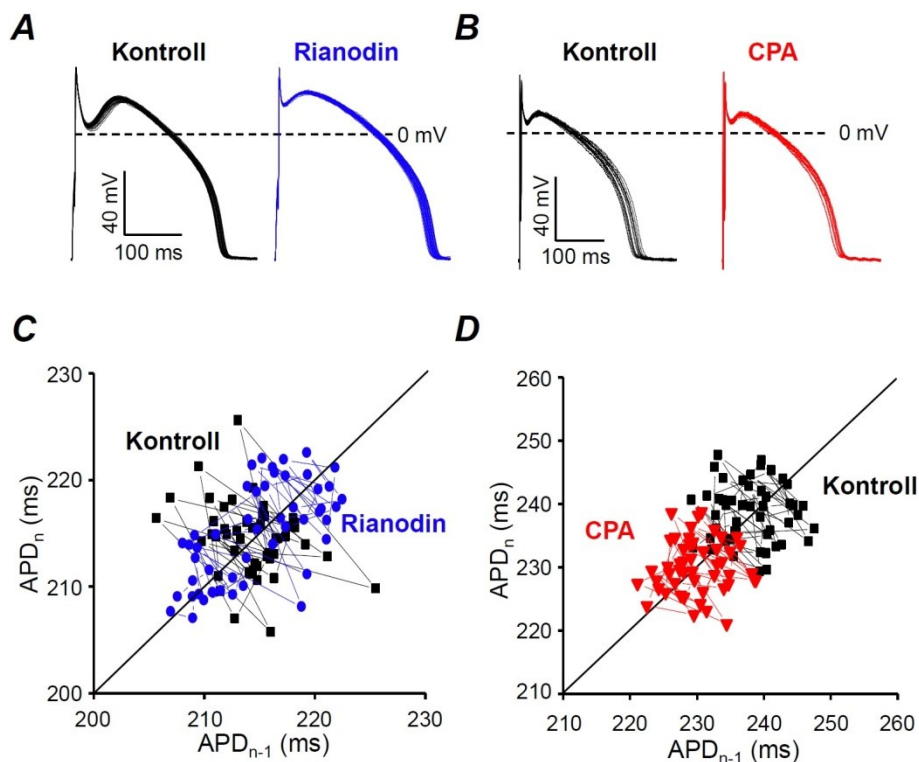
240±17 ms;  $P<0,05$ , n=7). BAPTA-AM jelenlétében az inward áramok aktiválása tovább növelte az AP időtartamát (veratridin: 308±26 ms; veratridin+BAPTA-AM: 400±41 ms;  $P<0,003$ , n=7; Bay K8644: 290±11 ms; Bay K8644+BAPTA-AM: 384±22 ms;  $P=0,007$ , n=6) (**22. ábra**). Eredményeink azt mutatják, hogy a BAPTA-AM az összes kísérleti elrendezésben csökkentette a *relatív SV*-t. Erre utal, hogy az összes, a BAPTA-AM perfúziót követő mérési pont a *standard görbe* alatt helyezkedik el, még azokban az esetekben is, ha az APD nagyon jelentős mértékben megnőtt (**22. ábra**).



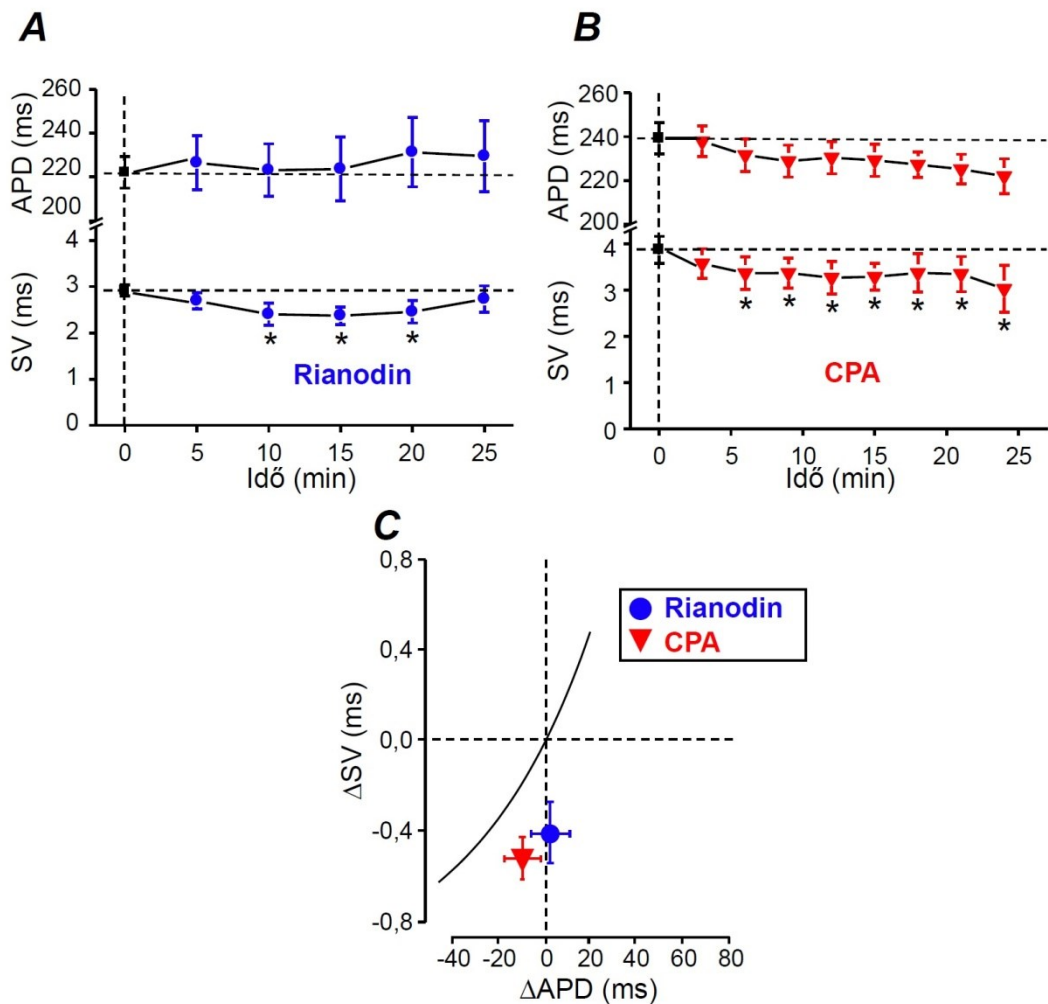
**22. ábra: A BAPTA-AM és ioncsatorna gátló- és aktiválószer kombinált hatása a SV-ra.** A sejteken először I<sub>Kr</sub> gátlással (100 nM dofetilid; n=7 vagy 200 nM E-4031; n=7), vagy I<sub>Na</sub> (100 nM veratridin; n=7) ill. I<sub>Ca,L</sub> (200 nM Bay K8644; n=6) aktiválással megnöveltük az APD-ot. A 25 percig tartó 5 µM BAPTA-AM perfúziót a szerek hatásainak stabilizálódását követően kezdtük meg. A piros teli kör a csak BAPTA-AM kezelést kapott sejtekről származik, a piros üres kör pedig ezen sejtek szer nélküli kontrollja. Többi esetben az üres szimbólumok a gátló- és aktiválószer hatását mutatja, a teli szimbólumok pedig ezen szerek kombinációját 25 perc BAPTA-AM kezeléssel. A fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD összefüggést jellemző – *standard görbe*.

## 6.5.2. A szarkoplazmatikus retikulumból történő kalcium felszabadulás szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásában

Az  $[Ca^{2+}]_i$  befolyásolásának egy következő módszere, a SR-ból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulás megváltoztatása. Ehhez rianodint és ciklopiazonsavat használtunk (**23. ábra**). A rianodin a RYR2 gátlásán keresztül (az általunk alkalmazott  $10\ \mu\text{M}$ -os koncentráció csökkenti a csatorna nyitvatartási valószínűségét<sup>117</sup>) megakadályozza a  $Ca^{2+}$  SR-ból történő felszabadulását. A ciklopiazonsav pedig a SERCA pumpa szelektív inhibitora, melynek hatására a SR-ból felszabadulni képes  $Ca^{2+}$  mennyisége csökken<sup>137, 148, 177</sup>. A  $10\ \mu\text{M}$  rianodin 15 perc alatt átmenetileg  $2,92\pm 0,12\ \text{ms}$ -ról  $2,37\pm 0,19\ \text{ms}$ -ra ( $P=0,01$ ,  $n=8$ ) csökkentette a SV-t, míg az APD-ot nem befolyásolta (kontroll:  $222\pm 7\ \text{ms}$ ; 15. perc rianodin:  $224\pm 15\ \text{ms}$ ;  $n=8$ ) (**23. ábra, A,C, 24. ábra, A**).  $1\ \mu\text{M}$  ciklopiazonsav hatására a SV  $3,87\pm 0,29\ \text{ms}$ -ról 15 perc alatt  $3,29\pm 0,29\ \text{ms}$ -ra csökkent ( $P=0,02$ ,  $n=9$ ), míg az AP időtartamát szignifikánsan nem befolyásolta (kontroll:  $239\pm 7\ \text{ms}$ ; 15. perc ciklopiazonsav:  $229\pm 7\ \text{ms}$ ;  $n=9$ ) (**23. ábra, B,D, 24. ábra, B**). Eredményeink alapján mindkét szer hatékonyan csökkentette a *relatív SV*-t (**24. ábra, C**), vagyis a szisztolé alatti  $Ca^{2+}$  felszabadulás egy meghatározó eleme a SV-nak.



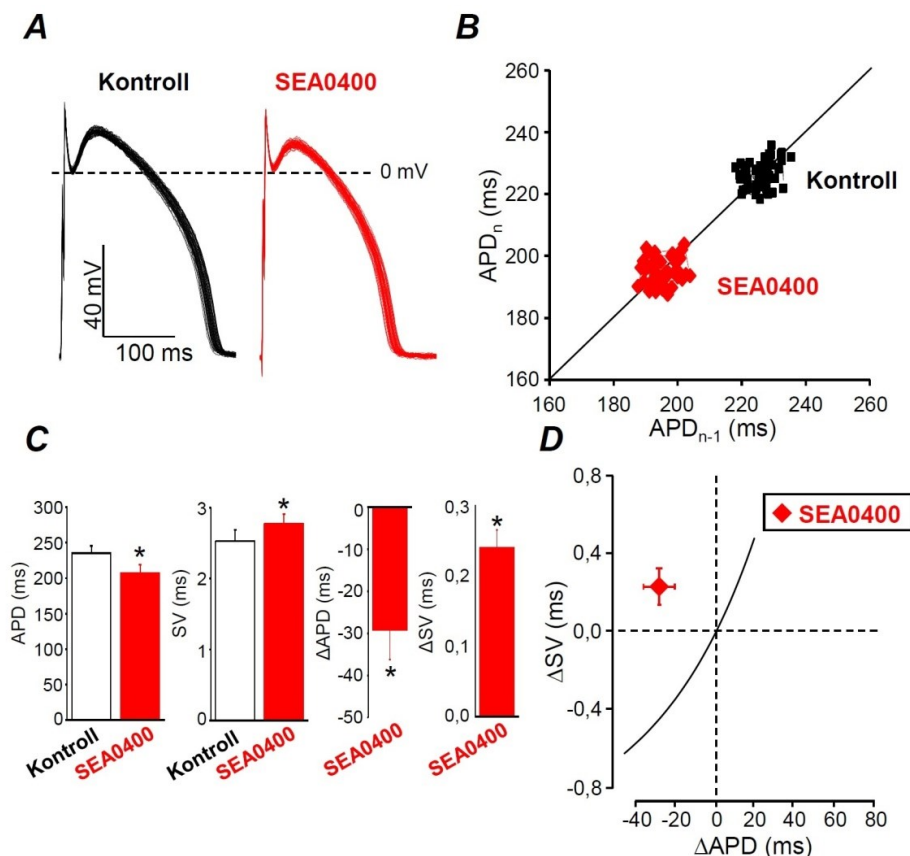
**23. ábra: A szarkoplazmatikus retikulumból (SR) történő  $Ca^{2+}$  felszabadulás hatása a SV-ra.** (A, C) A SR-ból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulást  $10\ \mu\text{M}$  rianodinnal, vagy (B, D)  $1\ \mu\text{M}$  ciklopiazonsavval (CPA) módosítottuk. (A, B) 50 db reprezentatív akciós potenciál kontroll esetekben és a rianodin ill. a CPA hatására, valamint a hozzájuk tartozó (C, D) reprezentatív Poincaré diagramok 25 perc szerhatást követően.



**24. ábra: A SR-ból történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás időfüggő hatása a SV-ra és az APD-ra.** (A, C) A SR-ból történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást  $10 \mu\text{M}$  rianodinnal ( $n=8$ ), vagy (B, C)  $1 \mu\text{M}$  ciklopiazonsavval (CPA;  $n=9$ ) módosítottuk. (A, B) A szer indukálta APD és SV változásokat az idő függvényében ábrázoltuk. (C) A rianodin és a CPA hatása a *relatív SV*-ra ( $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$ ). A szimbólumok a szerhatást követő 15. perc eredményeit mutatják. A C panelen látható fekete folyamatos görbe a 9. ábrán bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll  $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik. Csillaggal a kontroll adatokhoz (APD és SV) képesti szignifikáns eltéréseket ( $P<0,05$ ) jelöltük.

### 6.5.3. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásában

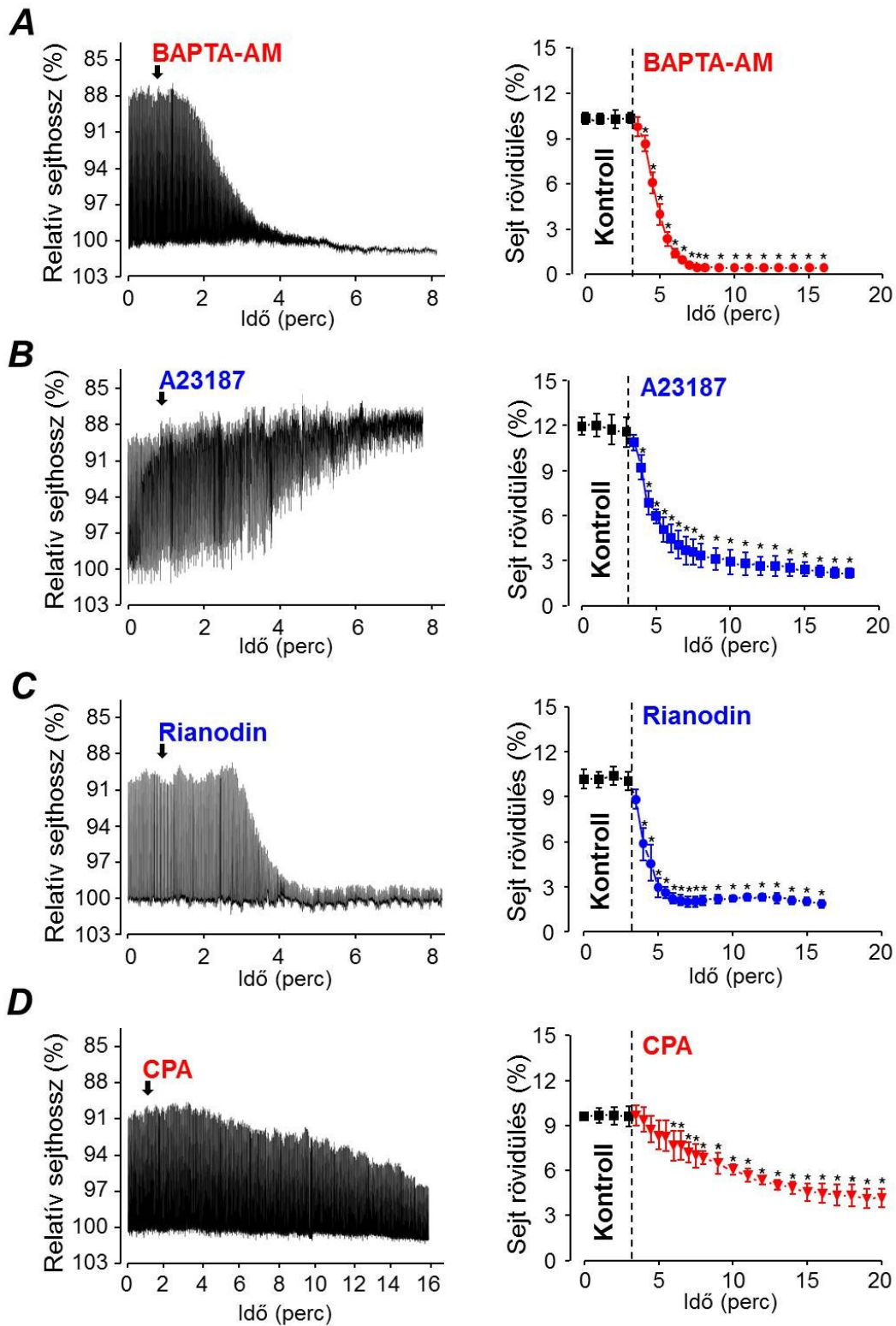
Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis egyik meghatározó eleme a NCX mechanizmus, mely fontos  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolító szereppel bír a szívizomsejtekben. Korábbi kísérleteink bizonyították az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szerepét a SV mechanizmusában, ezért kíváncsiak voltunk arra is, hogyan befolyásolja a SV-t a NCX. A NCX gátlásához a szelektívnek vélt SEA0400-at alkalmaztuk. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján az alacsony koncentrációjú – 300 nM – SEA0400 nincs hatással egyéb ionáramokra<sup>25</sup>. Megállapítottuk, hogy a 300 nM SEA0400 25 percig tartó inkubálása az APD rövidítő hatás ellenére ( $235 \pm 10$  ms-ról  $206 \pm 13$  ms-ra;  $P < 0,007$ ,  $n=7$ ) szignifikánsan növelte mind az abszolút SV-t ( $2,53 \pm 0,16$  ms-ról  $2,77 \pm 0,14$  ms-ra;  $P < 0,0001$ ,  $n=7$ ), mind a *relatív SV*-t (25. ábra, A-D).



**25. ábra: A  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cseremechanizmus szerepe (NCX) a SV modulálásában. (A-D)** Az NCX gátlásához 300 nM SEA0400-at alkalmaztunk ( $n=7$ ). (A) 50 db reprezentatív akciós potenciál kontroll esetben és a SEA0400 hatására, (B) valamint a hozzá tartozó reprezentatív Poincaré diagram 25 perc szerhatást követően. (C) A kontroll és a SEA0400 esetén kapott APD és SV értékek, valamint a SEA0400-indukálta APD és SV változások ( $\Delta\text{SV}$  és  $\Delta\text{APD}$ ). (D) A SEA0400 hatása a *relatív SV*-ra ( $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$ ). A D panelen látható fekete folyamatos görbe a 9. ábrán bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll  $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik. A C panelen látható oszlopok a szerhatást követő 25. perc adatainak számtani középértéke  $\pm$  SEM, csillaggal a kontroll adatokhoz képesti szignifikáns eltéréseket ( $P < 0,05$ ) jelöltük.

#### 6.5.4. A kalcium homeosztázist befolyásoló szerek hatása a sejtrövidülés mértékére

Az  $[Ca^{2+}]_i$  változás indikátoraként – egy indirekt módszert –, a rögzítetlen miociták rövidülésének (shortening) mérését használtuk. A kísérletsorozatunkban alkalmazott szerek perfúzióját a vizsgált sejt rövidülésének stabilizálódása után kezdtük meg. Mind a négy vizsgált szer (5  $\mu$ M BAPTA-AM, 1  $\mu$ M A23187, 10  $\mu$ M rianodin és 1  $\mu$ M ciklopiazonsav) csökkentette a rövidülés mértékét, azonban eltérő mértékben és eltérő kinetikával. Megállapítottuk, hogy a BAPTA-AM (kontroll:  $10,35 \pm 0,33$  %; 5. perc BAPTA-AM-ben:  $0,48 \pm 0,10$  %;  $P < 0,0001$ ,  $n=7$ ), a rianodin (kontroll:  $10,02 \pm 0,60$  %;  $2,15 \pm 0,32$  %,  $2,00 \pm 0,31$  %, 5. és 15. perc rianodinban;  $P < 0,03$ ,  $n=5$ ), és az A23187 (kontroll:  $11,58 \pm 1,01$  %;  $3,33 \pm 0,80$  %,  $1,93 \pm 0,32$  % 5. és 15. perc A23187-ben;  $P < 0,002$ ,  $n=5$ ) gátolta a sejtek rövidülését (**26. ábra, A-C**). Az említett három szer hatása gyors volt. A ciklopiazonsav csökkentette ugyan a rövidülések amplitúdóját (kontroll:  $9,61 \pm 0,69$  %;  $7,32 \pm 0,45$  %,  $5,31 \pm 0,73$  % 5. és 15. perc ciklopiazonsavban;  $P < 0,02$ ,  $n=4$ ), azonban teljes gátlást még 15 perc inkubálás után sem okozott (**26. ábra, D**). A BAPTA-AM, a rianodin és a ciklopiazonsav hatására a diasztolés sejthossz nem változott szignifikáns mértékben, míg a szisztolés sejthossz nőtt, jelezve a csökkent  $Ca^{2+}$  felszabadulást (**26. ábra, A-C**). Az A23187 esetén a szisztolés sejthossz változatlan maradt, azonban a diasztolés érték jelentősen csökkent (**26. ábra, D**). Az a megfigyelés, hogy a  $Ca^{2+}$  ionofór alkalmazásával a szívizomsejtek kevésbé relaxálnak, összhangban áll azzal a feltevéssel, miszerint a  $Ca^{2+}$  ionofór hatására akkumulálódik a  $Ca^{2+}$  a sejten belül. Munkacsoportunk korábban már megvizsgálta a SEA0400 hatását a sejtrövidülésre, ami nem változott szignifikáns mértékben (minimálisan fokozódott) a kontrollhoz viszonyítva<sup>25</sup>.

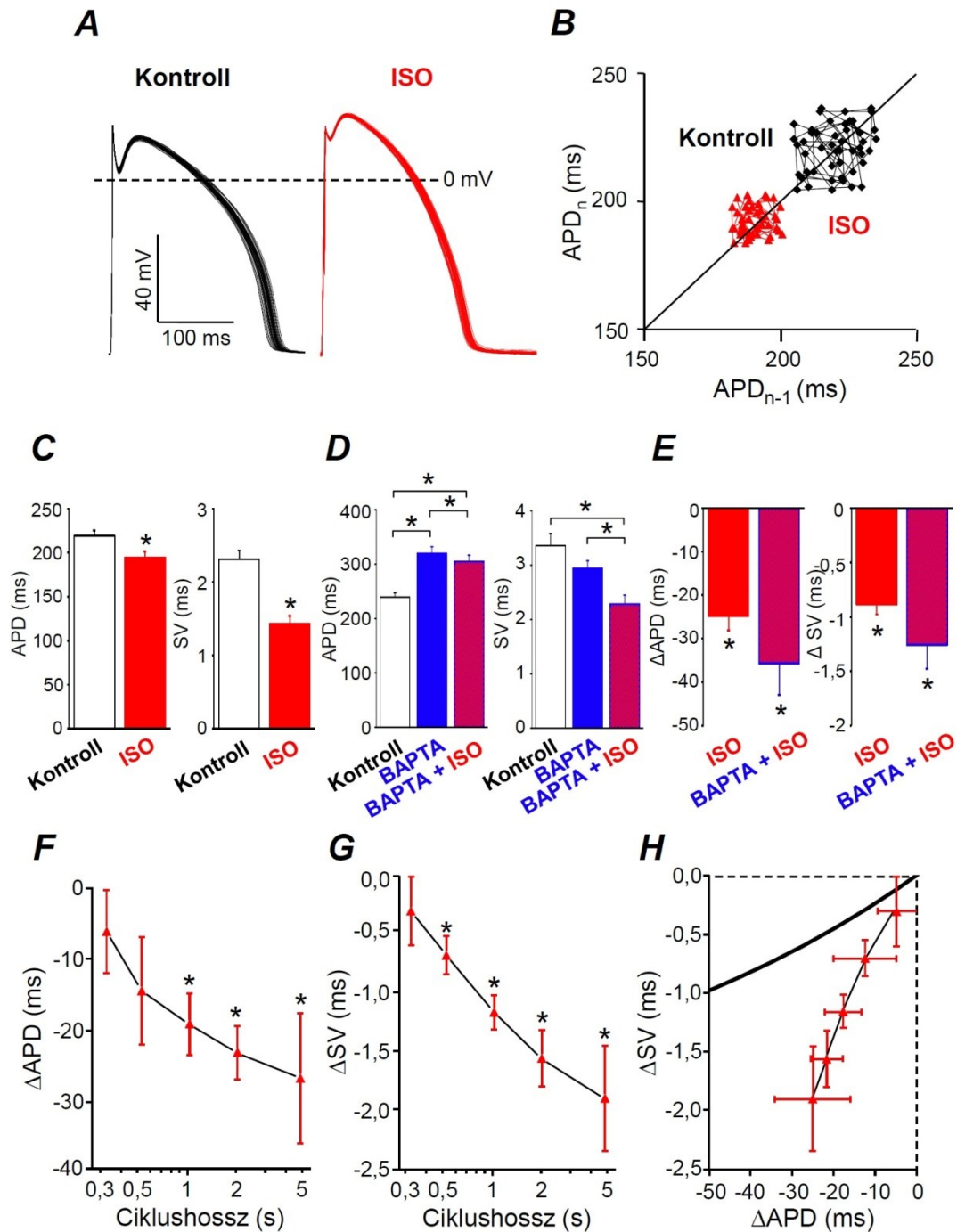


**26. ábra: A  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázist befolyásoló szerek hatása a sejtrövidülés mértékére.** A rögzítettlen kamrai szívműködősejtek rövidülését (A) BAPTA-AM ( $5 \mu\text{M}$ ;  $n=7$ ), (B) A23187 ( $1 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), (C) rianodin ( $10 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ) és (D) ciklopiazonsav (CPA,  $1 \mu\text{M}$ ;  $n=4$ ) jelenlétében vizsgáltuk. Az ábra bal oldalán reprezentatív kísérletek eredményei, míg az ábra jobb oldalán a mérések átlagai láthatóak. A szerek perfundálását a kontroll esetekben mért sejtrövidülések amplitúdójának stabilizálódását követően kezdtük meg. A relatív sejthosszt a szer adása előtti utolsó percben mért diasztolés sejthosszra (100 %) normalizáltuk. A sejtrövidülés mértékét a diasztolés sejthossz százalékában fejeztük ki. A nyilak és a szaggatott vonalak a szerek perfúziójának kezdőpontját jelölik. Csillaggal a Krebs mérőoldatban (kontroll) kapott sejtrövidüléshez képesti szignifikáns eltéréseket ( $P < 0,05$ ) jelöltük.

## 6.6. A $\beta$ -adrenerg stimuláció hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

Az eddigi eredményeink azt bizonyítják, hogy a  $I_{Ks}$  és az  $I_{Ca,L}$  hatékonyan csökkenti a *relatív SV*-t. Ezért megvizsgáltuk, hogy a  $\beta$ -adrenerg stimuláció milyen hatással van a SV-ra, ugyanis hatására nő a  $I_{Ks}$  és az  $I_{Ca,L}$  amplitúdója, valamint az  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>134</sup>. Kísérleteink során a  $\beta$ -adrenerg stimuláció modellezésére egy nem specifikus agonistát, az izoproterenolt alkalmaztunk (**27. ábra**). 10 nM izoproterenol kismértékben ugyan, de szignifikánsan rövidítette az AP időtartamát (219±6 ms-ról 195±7 ms-ra;  $P < 0,0001$ ,  $n=13$ ), ezzel együtt jelentősen csökkentette a SV-t is (2,31±0,12 ms-ról 1,43±0,11 ms-ra;  $P < 0,0001$ ,  $n=13$ ) (**27. ábra, C**). Ez a SV csökkenés nagyobb mértékű volt, mint amit a kontroll APD-SV összefüggésből várhatnánk (**27. ábra, H**). Ugyanakkor a  $\beta$ -adrenerg stimuláció növeli az  $[Ca^{2+}]_i$ -t amiről kimutattuk, hogy *relatív SV* növelő hatású. Ezek után logikus lépésnek tűnt megvizsgálni az izoproterenol hatását 5  $\mu$ M BAPTA-AM előkezelést követően is (**27. ábra, D,E**). A 25 perc  $Ca^{2+}$  kelátor előkezelés – ahogy a korábbi kísérleteinkben is – szignifikáns mértékben növelte az APD-ot, anélkül, hogy a SV-t jelentős mértékben megváltoztatta volna. Ha a sejteken BAPTA-AM előkezelést követően vizsgáltuk az izoproterenol hatását, azt tapasztaltuk, hogy a szernélküli állapotokhoz hasonló mértékben csökkentette mind az APD-ot (336±14 ms-ról 301±11 ms-ra;  $P < 0,003$ ,  $n=7$ ), mind a SV-t (3,52±0,34 ms-ról 2,26±0,19 ms-ra;  $P < 0,002$ ,  $n=7$ ). Nem tapasztaltunk különbséget az izoproterenol *relatív SV*-ra kifejtett hatásában BAPTA-AM jelenlétében vagy hiányában. Ez arra enged következtetni, hogy az izoproterenol SV módosító hatását nem az  $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változások okozzák, feltehetőleg ez a  $I_{Ks}$  és az  $I_{Ca,L}$  növelés eredménye.

Megvizsgáltuk az izoproterenol frekvencia-függő hatását is. Az ilyen kísérletek során a különböző frekvenciák beállításakor időre van szükség a steady-state eléréséhez, az azonban limitálja a lehetőségeket, hogy az izoproterenol hatása körülbelül 5 perc alatt beáll, majd a változatlan koncentráció mellett is megkezdődik a  $\beta$ -receptorok deszenzitizációja. Így ezen kísérleteinkben 10 AP-t regisztráltunk minden egyes frekvencián, hogy minimalizáljuk a két felvétel közötti időt. Az alkalmazott ingerlési ciklushosszak a következők voltak: 0,3 sec, 0,5 sec, 1 sec, 2 sec, 5 sec. Az izoproterenol mindkét hatása – APD rövidítés és SV csökkentés – fokozódott az ingerlési frekvencia csökkentésével (**27. ábra, F,G**), összességében a *relatív SV* is fokozatosan csökkent (**27. ábra, H**).



**27. ábra: Az izoproterenol (ISO) hatása a SV-ra.** A  $\beta$ -adrenerg stimulációt ISO (10 nM) segítségével modelleztük. **(A)** 50 db reprezentatív akciós potenciált mértünk kontroll esetben és 10 nM ISO jelenlétében. **(B)** A kapott APD értékek felhasználásával reprezentatív Poincaré diagramot szerkesztettünk. Az ISO hatása az APD-ra és a SV-ra Krebs mérőoldatban (n=13; **C**), valamint 25 perc 5  $\mu$ M BAPTA-AM perfúziót követően (n=7; **D**). Az ISO-indukálta APD és SV változások ( $\Delta$ SV és  $\Delta$ APD) Krebs mérőoldatban, valamint 25 perc BAPTA-AM perfúziót követően (**E**). **(F, G)** Az ISO-indukálta APD és SV változások ( $\Delta$ SV és  $\Delta$ APD) frekvencia-függő sajátosságai (n=8). A teljes ingerlési ciklushossz tartomány a következő volt: 0,3, 0,5, 1, 2, 5 sec. **(H)** Az ISO hatása a *relatív SV*-ra ( $\Delta$ SV- $\Delta$ APD) különböző ingerlési ciklushosszak mellett. A **H** panelen látható vastag fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll  $\Delta$ SV- $\Delta$ APD összefüggést jellemző – *standard görbe*. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik. Csillaggal a szignifikáns ( $P < 0,05$ ) ISO hatásokat jelöltük (Krebs mérőoldathoz és/vagy BAPTA-AM-hez képest).

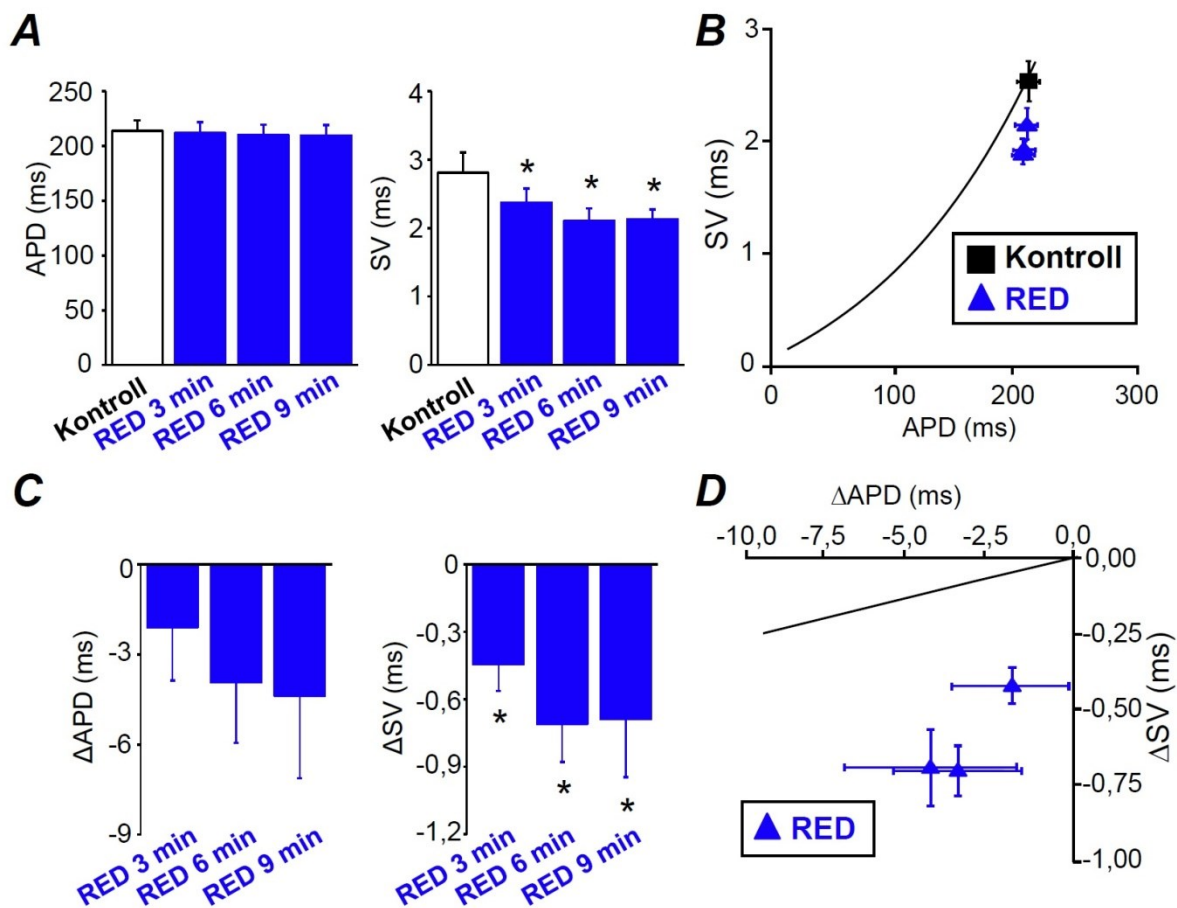
## 6.7. A szöveti redox potenciál hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

### 6.7.1. Redukáló környezet hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

A sejtek közvetlen környezetében végbemenő szöveti redox potenciál megváltozása markáns hatással bír a szövet elektrofiziológiai tulajdonságaira. Következő kísérletsorozatunkban a redox potenciált oxidatív és redukzív irányban változtattuk. A redukáló környezet modellezésére redukálószerekből, 1 mM DL-dithiothreitolból, 1 mM L-glutationból és 1 mM L-aszkorbinsavból álló koktélt alkalmaztunk. A redukáló koktél alig volt hatással az AP alakjára, az APD-ot nem befolyásolta (kontroll:  $214 \pm 10$  ms; 9. perc redukáló koktélban:  $210 \pm 10$  ms;  $n=12$ ), viszont a SV-t szignifikáns mértékben csökkentette (kontroll:  $2,81 \pm 0,30$  ms; 9. perc redukáló koktélban:  $2,12 \pm 0,15$  ms;  $P < 0,03$ ,  $n=12$ ) (**28. ábra, A,C**). A hatás kifejlődéséhez körülbelül 6 percre volt szükség, az AP paraméterek közül a SV inentől kezdve már nem változott tovább. Amennyiben a kontroll SV-APD összefüggéshez hasonlítjuk a redukáló koktél alkalmazása során kapott eredményeinket, láthatjuk, hogy az a *relatív SV*-t csökkentette (**28. ábra, B,D**), ugyanis a pontok a *standard görbe* alatt találhatók, mivel a nem számottevő AP rövidüléshez képest szignifikánsan csökkent a SV.

### 6.7.2. Oxidáló környezet hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

A redukáló környezettel ellentétben az oxidáció markáns hatással volt az AP alakjára (**29. ábra, A**). Az oxidáló környezet modellezésére  $10 \mu\text{M}$  hidrogén-peroxidot ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) alkalmaztunk, ami fokozatosan növelte az APD-ot, valamint a SV-t is (**29. ábra, A-C**). Jellemzően 10-15 perccel a szer perfundálását követően – az összes vizsgált sejt esetében – EAD-k alakultak ki. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatására az APD és a SV is körülbelül ugyanolyan mértékben nőtt (kontroll: APD  $214 \pm 8$  ms, SV  $2,57 \pm 0,24$  ms; 9. perc  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ban: APD  $265 \pm 10$  ms, SV  $9,46 \pm 1,43$  ms;  $P < 0,001$ ,  $n=10$ ) (**30. ábra, A,C**), azonban mégis nagymértékben növelte a *relatív SV*-t (**30. ábra, B,D**). A méréseink azon szakaszában, ahol a EAD-k kialakultak, az APD akár 600-800 ms hosszú is lehetett, amivel párhuzamosan a SV értéke magától értetődő módon extrém mértékben nőtt (akár 50-100 ms különbség két egymást követő APD között),

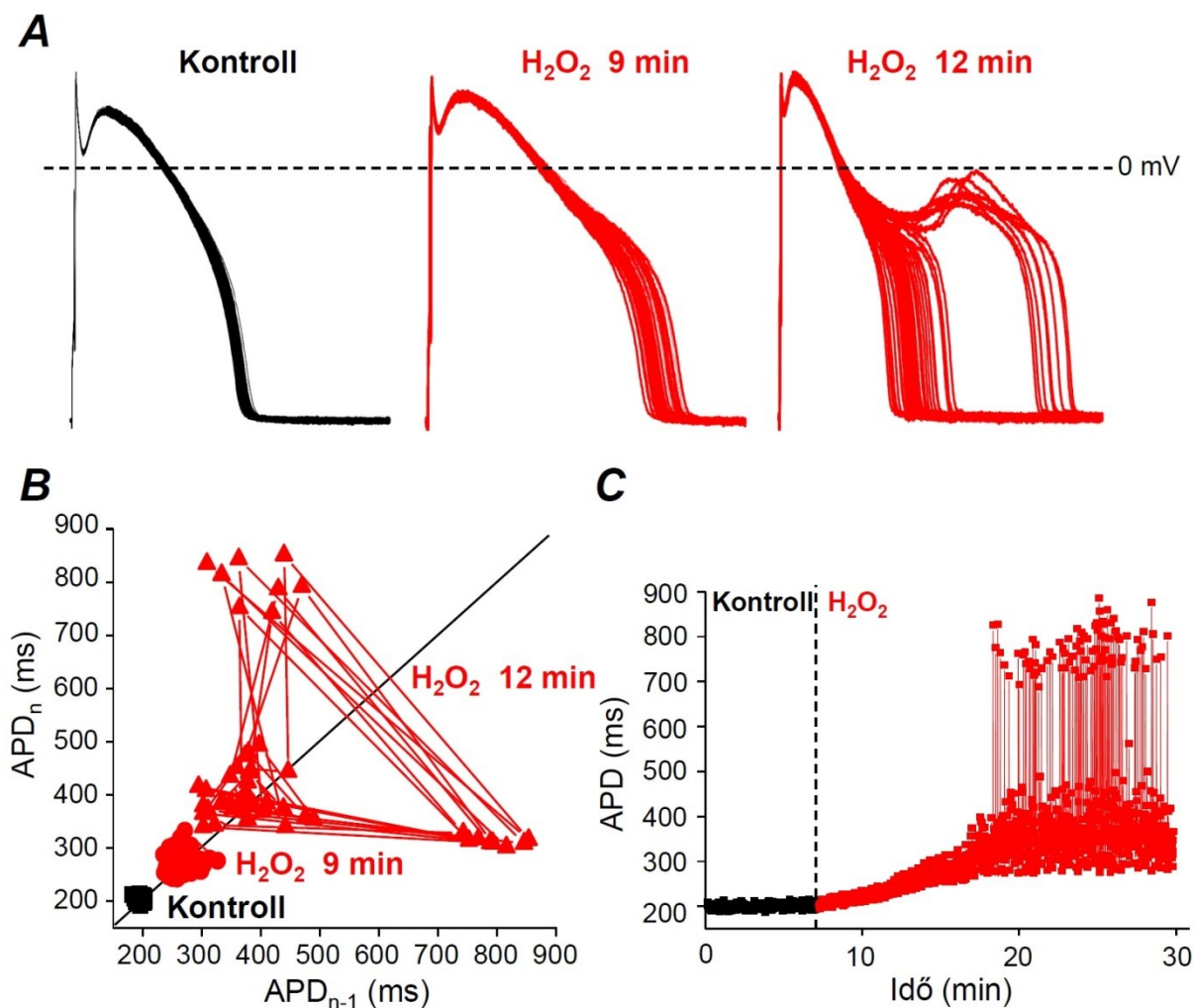


**28. ábra: A redox potenciál szerepe: a redukáló környezet hatása a SV-ra.** Az 1 mM DL-dithiothreitolból, 1 mM redukált L-glutationból és 1 mM L-aszcorbinsavból álló redukáló koktéllal (RED) 9 percig perfundáltuk a sejteket. **(A)** A RED időfüggő hatása az APD-ra és az SV-ra 3, 6 és 9 perc RED perfúziót követően (n=12). **(B)** A kontroll körülmények között, valamint a RED perfúziót követően kapott SV értékek az APD értékek függvényében. **(C)** A RED-indukálta APD és SV változások ( $\Delta SV$  és  $\Delta APD$ ) a 3., 6. és 9. percben. **(D)** A 3, 6 és 9 perc RED perfúzió hatása a *relatív SV-ra* ( $\Delta SV - \Delta APD$ ). Az **B** és **D** panelen látható fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD vagy  $\Delta SV - \Delta APD$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. Csillaggal a kontroll körülményekhez képesti szignifikáns eltéréseket ( $P < 0,05$ ) jelöltük.

azonban a méréseink első 9 percében tapasztalt SV emelkedés nem áll összefüggésben a EAD-k kialakulásával.

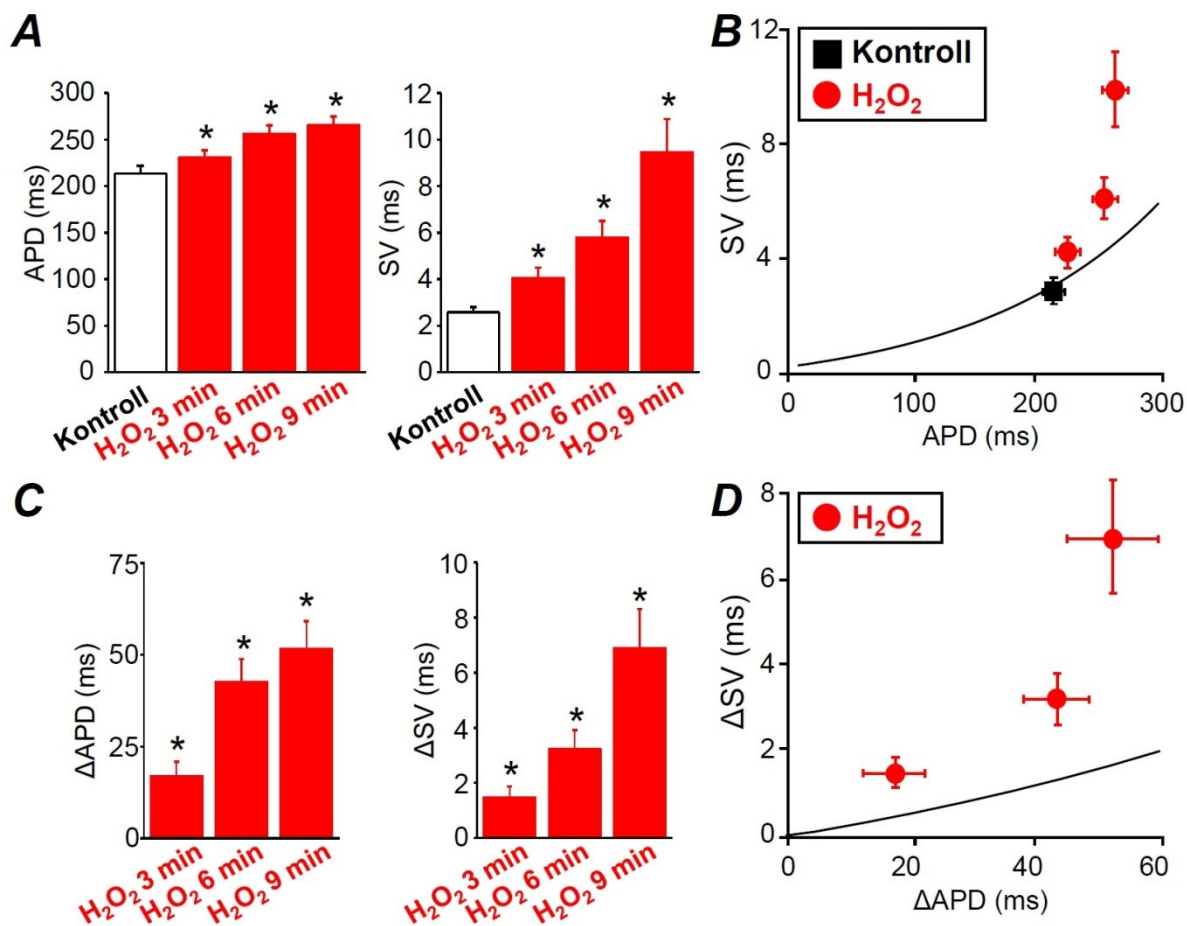
### 6.7.3. A redox potenciál szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásában

Annak tisztázására, hogy a drasztikus  $H_2O_2$  hatás valóban a redox potenciálban történő változás eredménye, megismételtük az előző kísérleteinket úgy, hogy a sejteket a redukáló koktéllal előkezeltük, majd ezt követte a redukáló koktél+oxidáló oldat ( $H_2O_2$ ) kezelés. Mivel a redukáló hatás gyorsnak és stabilnak bizonyult, ezen kísérleteinkben a sejteket 5 percig

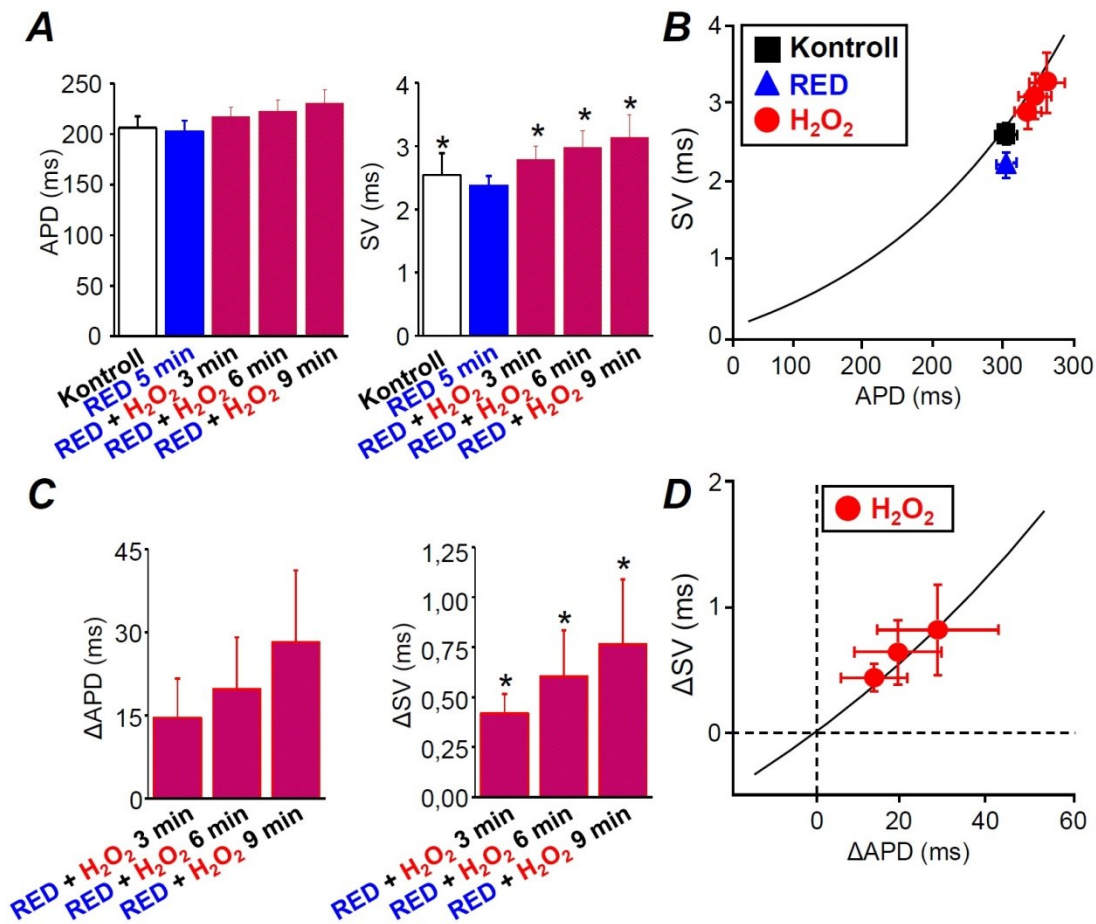


**29. ábra: A redox potenciál szerepe: az oxidáló környezet hatása a SV-ra és az APD-ra.** Az oxidáló környezetet  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúziójával hoztuk létre. (A) 50 db reprezentatív akciós potenciál kontroll esetben, valamint a  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúziót követő 9. és 12. percben, (B) valamint a bemutatott akciós potenciálok APD értékeinek felhasználásával szerkesztett reprezentatív Poincaré diagram. (C) 30 perc hosszú reprezentatív kísérlet, mely demonstrálja a  $\text{H}_2\text{O}_2$  korai utódepolarizációt generáló hatását, amely látható az ábra A és B panelén is. A szaggatott vonal a  $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúziójának kezdőpontját jelöli.

perfundáltuk a redukáló koktéllal. A  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , a redukáló koktéllal való előkezelés ellenére is növelte mind az APD-ot (redukáló koktéllban:  $203 \pm 11$  ms; 9. perc  $\text{H}_2\text{O}_2$ +redukáló koktéllban:  $231 \pm 13$  ms;  $n=6$ ), mind a SV-t (redukáló koktéllban:  $2,37 \pm 0,15$  ms; 9. perc  $\text{H}_2\text{O}_2$ +redukáló koktéllban:  $3,14 \pm 0,36$  ms;  $P < 0,05$ ,  $n=6$ ) (31. ábra, A,C). Azonban a  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatásai nem voltak olyan kifejezetten redukáló környezet alkalmazása mellett, valamint az így elvégzett kísérletek egyikében sem jelentkezett EAD, mint ahogy azt az előzőekben részletezett kísérletek során tapasztaltuk. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a redukáló környezet sikeresen ellensúlyozta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  relatív SV növelő hatását, az összes mérési pont a standard görbén helyezkedik el (31. ábra, B,D).



**30. ábra: A redox potenciál szerepe: az oxidáló környezet hatása a SV-ra.** Az oxidáló környezetet 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúziójával hoztuk létre. **(A)** A 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  időfüggő hatása az APD-ra és az SV-ra 3, 6 és 9 perc  $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúziót követően ( $n=10$ ). **(B)** A kontroll körülmények között, valamint a  $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúziót követően kapott SV értékek az APD értékek függvényében. **(C)** A  $\text{H}_2\text{O}_2$ -indukálta APD és SV változások ( $\Delta\text{SV}$  és  $\Delta\text{APD}$ ) a 3., 6. és 9. percben. **(D)** A 3, 6 és 9 perc  $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúzió hatása a *relatív SV-ra* ( $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$ ). Az **B** és **D** panelen látható fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD vagy  $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. Csillaggal a kontroll körülményekhez képesti szignifikáns eltéréseket ( $P<0,05$ ) jelöltük.



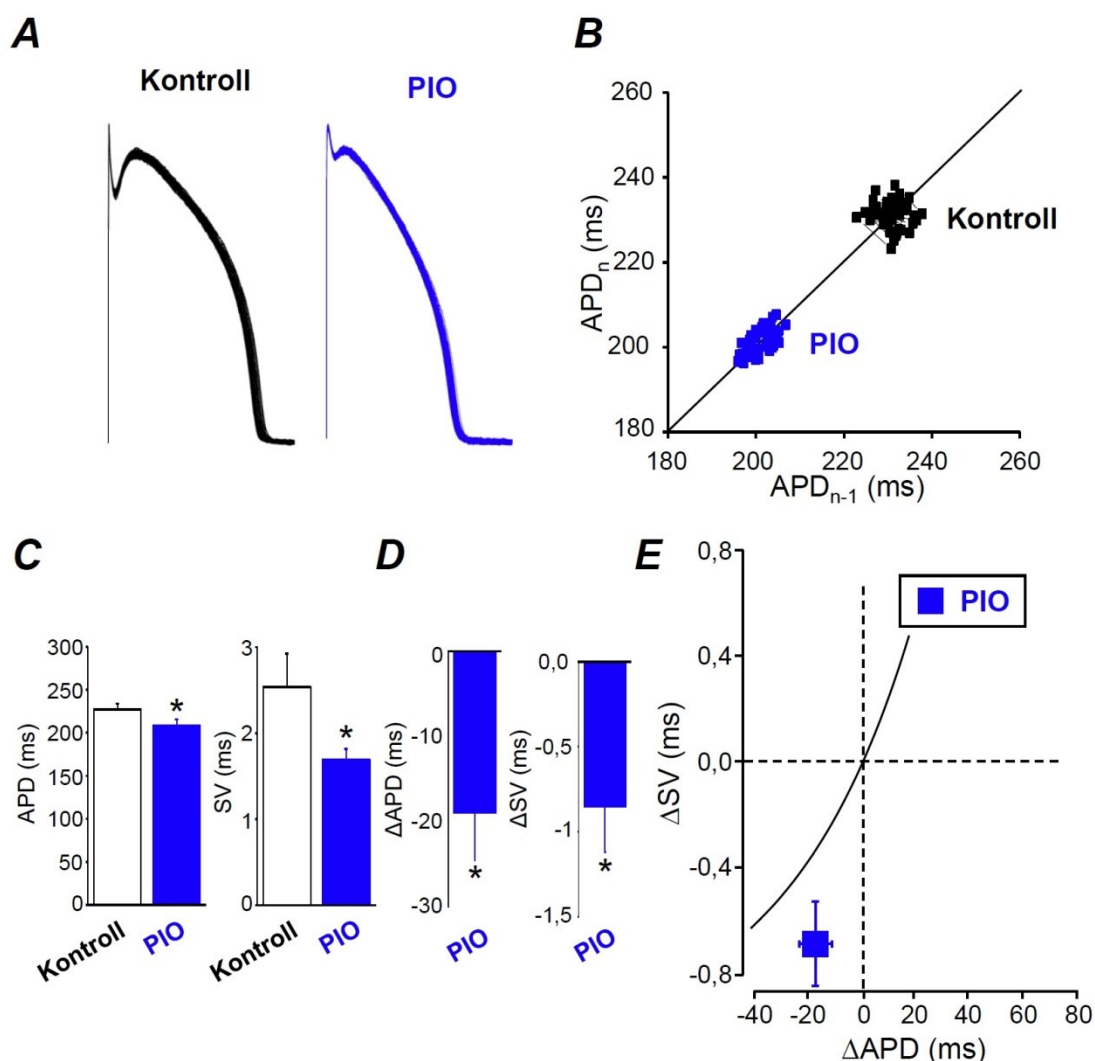
**31. ábra: A redox potenciál szerepe: az oxidáló és redukáló környezet együttes hatása a SV-ra.** A 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúziót 5 perc redukáló koktélt (RED: 1 mM DL-dithiothreitol, 1 mM redukált L-glutacion és 1 mM L-aszcorbinsav) alkalmazását követően kezdtük meg. **(A)** A 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  és a RED együttes időfüggő hatása az APD-ra és a SV-ra ( $n=6$ ). **(B)** A kontroll körülmények között, valamint a RED, majd a RED+ $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúziót követően kapott SV értékek az APD értékek függvényében. **(C)** A  $\text{H}_2\text{O}_2$ -indukálta APD és SV változások ( $\Delta\text{SV}$  és  $\Delta\text{APD}$ ) a 3., 6. és 9. percben 5 perc RED alkalmazását követően. **(D)** A 3, 6 és 9 perc  $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúzió hatása a *relatív SV*-ra ( $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$ ) 5 perc RED alkalmazását követően. Az **B** és **D** panelen látható fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD vagy  $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. A szaggatott vonalak a  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatását megelőző nulla változást jelölik (RED-ban). Csillaggal a RED-hoz képesti szignifikáns eltéréseket ( $P<0,05$ ) jelöltük.

### 6.8. Klinikumban is alkalmazott gyógyszermolekula hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

Megvizsgáltunk egy, a klinikumban is alkalmazott gyógyszermolekula hatását a SV-ra. Választásunk a tiazolidindion szerkezetű pioglitazonra esett. A pioglitazont a 2-es típusú diabetes mellitus második vagy harmadik vonalbeli kezelésére javasolják, emellett gyakorta alkalmazzák cukorbeteg állatmodellekben is. Jellemző tulajdonsága, hogy nagy affinitással kötődik a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gammához (PPAR $\gamma$ ),

inzulin-érzékenyítő, tehát kedvező hatással bír a cukorháztartásra, valamint antiatherosclerotikus hatású is.

Ahogy az az ionáram méréseinkből is kiderült, a pioglitazon csökkentette a  $I_{to1}$  amplitúdóját, ezzel összhangban az AP mérések során a korai repolarizáció csökkenését tapasztaltuk (**32. ábra, A**). 1 és 10  $\mu\text{M}$  pioglitazont vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy míg az 1  $\mu\text{M}$  nem befolyásolta (kontroll: APD  $227 \pm 7$  ms, SV  $2,54 \pm 0,38$  ms; 1  $\mu\text{M}$  pioglitazon: APD  $225 \pm 6$  ms, SV  $2,29 \pm 0,28$  ms;  $n=5$ ), addig a 10  $\mu\text{M}$  pioglitazon szignifikánsan csökkentette mind az APD-ot, mind pedig a SV-t (10  $\mu\text{M}$  pioglitazon: APD  $208 \pm 7$  ms, SV  $1,69 \pm 0,13$  ms;  $P < 0,04$ ,  $n=5$ ), (**32. ábra, B-D**). A pioglitazon hatékonyan csökkentette a *relatív SV*-t (**32. ábra, E**).



**32. ábra: A pioglitazon (PIO) hatása a SV-ra.** (A) 50 db reprezentatív akciós potenciál kontroll esetben és 10  $\mu\text{M}$  PIO hatására, (B) valamint a hozzá tartozó reprezentatív Poincaré diagram. (C) A kontroll és a PIO esetén kapott APD és SV értékek. (D) A PIO-indukálta APD és SV változások ( $\Delta\text{SV}$  és  $\Delta\text{APD}$ ). (E) A PIO hatása a *relatív SV*-ra ( $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$ ). Az E panelen látható fekete folyamatos görbe a **9. ábrán** bemutatott – elektrotónus injektálásával kapott kontroll SV-APD vagy  $\Delta\text{SV}-\Delta\text{APD}$  összefüggést jellemző – *standard görbe*. A szaggatott vonalak a nulla változást jelölik. Csillaggal a kontroll körülményekhez képesti szignifikáns eltéréseket ( $P < 0,05$ ) jelöltük.

## 7. Megbeszélés

Máig sem teljesen tisztázott, hogy a beat-to-beat variabilitás szabályozásában az egyes folyamatok milyen relatív szereppel bírnak. Fontos feladat feltárni mindazon eseményeket és az azok hátterében álló mechanizmusokat melyek súlyos szívritmuszavarokat, például a hirtelen szívhalálhoz vezető kamrafibrillációt okozhatnak. Az elmúlt évek kutatómunkája alapján bebizonyosodott, hogy önmagában a QT-intervallum mérése nem minden esetben jelzi előre pontosan az életveszélyes aritmiák kialakulását. Ezért a kutatócsoportok arra törekednek, hogy olyan prediktorokat találjanak, melyek megbízhatóan előrejelezhetik az aritmiák kialakulását a gyakorló orvosok számára. A tudományos világ egyre nagyobb érdeklődést mutat a téma iránt, így a kísérletes – állatmodelleken végzett –, vagy számítógépes modellezést végző munkák és közlemények száma az elmúlt pár évben folyamatosan nőtt. Mivel nem ismert kellően a beat-to-beat variabilitás háttere, célul tűztük ki, hogy annak okait és modulátorait tanulmányozzuk kutya szívéből származó bal kamrai izolált kardiomiocitákon. Az AP mérésekhez a konvencionális hegyes mikroelektróda technikát alkalmaztunk.

### 7.1. Az akciós potenciál időtartam szerepe a rövidtávú beat-to-beat variabilitásban

Számos tanulmány leírta már a különböző ioncsatornákra ható szerek hatását az AP morfológiára, valamint a SV-ra, azonban ezeket a méréseket speciális feltételek mellett végezték (pl.:  $\beta$ -adrenerg stimuláció kombinációja  $I_{Ks}$  gátlással). Több betegségben ismert, hogy megnő az AP repolarizációjának időtartama és így a QT-intervallum<sup>45, 136, 139</sup>, valamint a SV is. Újabb kutatások azonban kimutatták, hogy sikeres antiaritmiás kezelés során nem feltétlenül szükséges a QT-intervallum csökkentése. Így magától értetődő a kérdés, hogy vajon a SV milyen mértékben függ az APD-ától? Az említett kérdésre az irodalomban található adatok nem adnak egyértelmű választ. Jelen munka legfőbb célja tehát az volt, hogy megállapítsuk, hogy milyen mechanizmusok állhatnak a SV hátterében, valamint annak kiderítése, hogy milyen mértékben függ a SV az APD-ától. Célunk volt annak meghatározása is, hogy meg tudjuk ítélni valamely beavatkozás hatását a SV-ra, függetlenül az előidézett APD változástól. Ez alapján csoportosíthatjuk az AP-t kialakító ionáramokat abból a szempontból, hogy melyek APD stabilizáló, azaz antiaritmiás hatásúak (csökkentik a *relatív SV-t*), és mely ionáramok okozzák az APD instabilitását, vagyis potenciálisan aritmogén hatásúak (növelik a *relatív SV-t*).

A SV kialakításának háttérében többek között az ionszatornák kapuzásának sztochasztikus viselkedése állhat<sup>104, 131</sup>. A SV-ban történő változásokat azonban az APD negatív visszacsatolású (negative feedback) szabályzása is magyarázhatja. Nevezetesen, egy inward áram fokozott aktiválódása önmagában növeli az AP időtartamát, azonban a pozitív platópotenciál hatására repolarizációt segítő ionáramok –  $I_{Kr}$  és  $I_{Ks}$  – aktiválódnak, ami végeredményben az APD rövidüléséhez vezet. Eredményeink azt mutatják, hogy az  $I_{Ca,L}$ , a  $I_{Kr}$  és a  $I_{Ks}$  csökkentik a SV-t, gátlásuk értelemszerűen növeli azt. Érdekes módon a két, egyaránt befelé irányuló áram – az  $I_{Ca,L}$  és a késői  $I_{Na}$  – ellenkező hatással volt a SV-ra, annak ellenére, hogy mindkettő növeli az AP időtartamát. A különbséget a két inward áram között az magyarázhatja, hogy az  $I_{Ca,L}$  a plató fázis kezdetén aktív<sup>10</sup>, míg a késői  $I_{Na}$  a plató fázis későbbi szakaszán a legaktívabb<sup>88, 182</sup>. Az  $I_{Ca,L}$  hatására megemelkedett platópotenciál nagyobb mértékben képes aktiválni a  $I_{Kr}$ -ét és a  $I_{Ks}$ -ét, míg a  $I_{Na}$  időben későbbi megjelenése miatt már nem képes erre. Az AP platófázisa alatt nagy a membrán impedanciája<sup>180</sup>, így az Ohm törvény értelmében ilyenkor a nettó membránáramban történő kis változások is viszonylag nagy membránpotenciál és APD változást eredményeznek<sup>12, 13</sup>. Vélhetően ez magyarázza a  $I_{Na}$  SV növelő hatását.

Azon kísérleteinkben ahol az ingerlési ciklushosszat változtattuk, hasonló eredményeket kaptunk, mint Johnson és mtsai<sup>97</sup>. Eszerint az ingerlési ciklushossz növelésével – az ingerlési frekvencia csökkentése esetén – a SV fokozatosan nőtt. A 700 ms-os, vagy annál nagyobb ciklushossz esetén (1-5 sec) a SV-ban történő változások követték az AP időtartamában történő változásokat, vagyis megfeleltek az elektrotónusos kísérletünkben megállapított kontroll SV-APD összefüggésnek. Ennek háttérében valószínűleg az egyes ionáramok frekvencia-függő sajátságai állhatnak, ugyanis ismert, hogy a ciklushossz emelésével az  $I_{Ca,L}$  amplitúdója növekszik, míg a  $I_{Ks}$ -ének amplitúdója csökken. A 300, 400 és 500 ms-os ciklushosszak esetén azonban eltérést tapasztaltunk a *relatív SV*-ban, vagyis vélhetően valamilyen más – APD-től független – faktor is befolyásolhatja a SV-t. Ennek feltehetőleg a pozitív lépcsőjelenségként ismert élettani folyamat lehet az oka, ugyanis rövid ciklushosszak esetén jelentősen nő az  $[Ca^{2+}]_i$  és a kontrakciók amplitúdója.

A  $\beta$ -adrenerg stimulációt szimuláló kísérleteinkben az izoproterenol hatása is frekvencia-függőnek bizonyult. Az izoproterenol *relatív SV* csökkentő hatása az ingerlési frekvencia csökkentéssel kifejezettebbé vált. Ez jellemző volt a humán szívfrekvencia tartománynak megfelelő 0,5-1 sec széles ciklushosszak esetén is. Hasonló eredményt kaptunk amikor az izoproterenolt BAPTA-AM jelenlétében alkalmaztuk, tehát az  $I_{Ca,L}$  és a  $I_{Ks}$  fokozódása domináns az  $[Ca^{2+}]_i$  változásával szemben. 300 ms-os ciklushossz esetén azonban az izoproterenol érdemben nem befolyásolta a *relatív SV*-t, vagyis a gyors frekvencián történő

$\text{Ca}^{2+}$  akkumulálódás ellensúlyozhatta az izoproterenol hatását. Azt azonban érdemes megjegyezni, hogy Johnson és mtsaival ellentétben, a kísérleteink során nem tapasztaltunk AP alternánst, még 300 ms-os ciklushossz esetén sem<sup>97</sup>.

A *relatív SV* bevezetésének van egy további előnye is. Az irodalomban található adatok elég nagy tartományt fognak át a kontroll AP időtartamot és SV-t tekintve. Abi-Gerges és mtsai eredményei 300-377 ms hosszú APD-ot és 5-12 ms-os SV-t mutatnak<sup>1</sup>, míg ezek az értékek Johnson és mtsai kísérleteiben 276 ms-nak (APD) és 5,9 ms-nak (SV) bizonyultak<sup>97</sup>. Bal kamrai monofázisos AP mérés esetén Thomsen és mtsai az APD-ot 324-353 ms-nak találták, a SV értéke pedig 1,8-2,3 ms volt<sup>154</sup>. Heijman és mtsai közleményében a sztochasztikus szimulációs kísérletekben az APD 252 ms-nak, a SV pedig 4,3 ms-nak bizonyult<sup>80</sup>. A kísérleteink során tapasztalt kontroll SV értékek ezeknél alacsonyabbnak bizonyultak, ami feltehetőleg a munkacsoportunk által beállított stabil, jól működő enzimikus izolálás eredménye. Az összehasonlíthatóság érdekében azonban célszerűbb a *relatív SV*-t használni.

## 7.2. Az ionáramok szerepe a beat-to-beat variabilitásban

A kísérletek tervezésekor úgy gondoltuk, hogy az APD és a SV között lineáris összefüggés állhat fenn, azaz, ha hosszabb az AP időtartama, nagyobb lesz a SV is. Vizsgálataink alapján azonban megállapítottuk, hogy a SV-APD összefüggés nem-lineáris, hanem exponenciális összefüggést mutat. Az ioncsatorna modulátorokkal végzett kísérleteink eredményeit az elektrotónusos kísérletek során megállapított kontroll SV-APD összefüggéshez viszonyítottuk, mert úgy véljük, hogy ez az összefüggés adhat valós képet az egyes ionáramok relatív szerepéről. Ez alapján legfőbb megállapításunk, hogy az  $I_{\text{Ca,L}}$ , a  $I_{\text{Kr}}$  és a  $I_{\text{Ks}}$  stabilizálja az APD-ot, míg a  $I_{\text{Na}}$  és a  $I_{\text{to1}}$  az APD labilitását okozza.

Korábban számos ioncsatornára ható szerről leírták, hogy befolyásolja a beat-to-beat variabilitást, azonban egyik tanulmány sem vizsgálta a SV AP időtartamtól való függését. Az első erre irányuló kísérletet számítógépes modellezés segítségével végezték<sup>80</sup>. Korábbi vizsgálatok során kutya szívműsejteken a dofetilid, HMR 1556, ATX-II<sup>97</sup> és izoproterenol<sup>96</sup>, míg tengerimalac sejteken a tetrodotoxin és intracelluláris EGTA<sup>180</sup> hatását tanulmányozták. Eredményeink megerősítik, hogy a  $I_{\text{Na}}$  és a  $I_{\text{Kr}}$  jelentős hatással bír a SV-ra. Kísérleteink során 1 Hz-es ingerlési frekvencia mellett  $I_{\text{Kr}}$  gátlószerek jelenlétében sem tapasztaltunk EAD-k megjelenését, szemben Abi-Gerges és mtsaival, akik szintén egészséges, kontroll kutyák szívéből származó bal kamrai szívműsejtekkel dolgoztak<sup>1</sup>. A kezdeti vizsgálatok eredményei alapján is az úgymond APD stabilizáló áramok közé sorolható a  $I_{\text{Ks}}$ <sup>97</sup>. A mi

munkánk is ezt mutatta, jöllehet, a különbségek csak a  $\Delta SV-\Delta APD$  összefüggések vizsgálatakor váltak nyilvánvalóvá, mivel a HMR 1556 önmagában csak kismértékű APD növekedést okozott. Pueyo és mtsai által készített szimulációs kísérletben meghatározó tényezőnek adódott a  $I_{Ks}$  csatornák száma<sup>131</sup>. MID sejteken alacsonyabb  $I_{Ks}$  csatornaszámot (és nagyobb SV-t) figyeltek meg mint ENDO és EPI sejteken, ami összhangban áll a mi eredményeinkkel is. A  $I_{Kr}$  és a  $I_{Ks}$  vizsgálata során kapott eredményeink és az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a repolarizációs rezerv fordítottan arányos a SV-sal. Különbség adódott azonban az  $I_{Ca,L}$  vizsgálatakor kapott eredményeinkben az irodalmi adatokhoz képest. A megelőző publikációk stabilizáló áramnak titulálták az  $I_{Ca,L}$ -ot, a mi kísérleteinkben viszont messze a legfontosabb ionáramnak bizonyult a SV modulálásban. Ezt a nizoldipin és Bay K8644 szerekkel kapott eredményeink bizonyítják, miszerint a publikált SV-ra kifejtett mérsékelt hatásokkal szemben az  $I_{Ca,L}$  gátlásakor jelentős mértékben nőtt a *relatív SV*, míg annak fokozásakor a *relatív SV* csökkent<sup>48, 80</sup>. Megemlítendő, hogy egy újabb, kutya szívizomsejteken mért eredményeken alapuló – még nem publikált – *in silico* tanulmány szerint a  $I_{to1}$  a legfontosabb SV moduláló ionáram, ezt követi sorrendben a  $I_{Kr}$ , az  $I_{Ca,L}$ , és a  $I_{Ks}$ <sup>48</sup>.

Az AP időtartam mellett az AP morfológia is fontos szereppel bír a SV meghatározásában<sup>80</sup>. Heijman és mtsai szimulációs kísérletükben leírták, hogy az AP „háromszögesedése” csökkentette, míg „négyzögesedése” markánsan emelte a SV-t<sup>80</sup>. A „négyzögesedést” úgy érték el, hogy a modellbe táplált  $I_{Ca,L}$  amplitúdóját 75 %-kal, a  $I_{to1}$ -ét pedig 20 %-kal csökkentették, miközben a  $I_{K1}$  és a  $I_{Kur}$ -ét 20-20 %-kal növelték. A háromszögesedés során pedig a  $I_{K1}$  és a  $I_{to1}$  amplitúdóját csökkentették 70, és 60 %-kal, a  $I_{Kur}$ -ét pedig 275 %-kal növelték. A mi kísérleteinkben nizoldipin jelenlétében tapasztaltunk négyzög alakú AP morfológiát és emelkedett *relatív SV*-t, míg a  $I_{K1}$  gátlása háromszögesedést okozott. Mivel az APD negatív feedback szabályzásában kiemelkedően fontos a platópotenciál értéke, így a háromszögesedés során az  $APD_{90}$  értéke túlbecsüli a valós helyzetet. Ezért nem tekintjük a  $I_{K1}$ -ot proaritmiás hatásúnak, még annak ellenére sem, hogy a  $BaCl_2$  csökkentette a *relatív SV*-t.

Ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy az AP morfológia változása nem minden esetben jár SV változással. Legjobb példa erre a 4-aminopiridin alkalmazása EPI sejteken. Hatására nem találtunk szignifikáns különbséget az ENDO sejtek APD és SV értékeihez képest. Munkacsoportunk korábbi és jelenlegi eredményei kimutatták, hogy az emlős szívizom nem homogén, eltérések tapasztalhatók az egyes régiókból származó sejtek APD és SV értékei között<sup>145</sup>. A különböző ioncsatorna-expresszió és ionáramdenzitás élettani jelentősége, hogy egyes farmakológiai behatások más választ eredményezhetnek a szív

különböző régióiban. Ennek patológiás következménye, hogy egyes antiaritmiás szerek akár proaritmiás hatást is eredményezhetnek.

Az egyes ionáramok hatásának vizsgálata során törekedtünk a legszelektívebb gátló- és aktiválószerre, illetve azok megfelelő koncentrációinak kiválasztására. Szelektivitási probléma épp a  $I_{to1}$  esetén adódott, ugyanis még az alkalmazott 1 mM-os 4-aminopiridin koncentráció sem tekinthető teljesen szelektívnek, ugyanúgy, ahogy a 100  $\mu$ M chromanol 293B sem. Mivel utóbbi hatással van a  $I_{Ks}$ -ére is, ezért az ionáramok gátlásakor a chromanol 293B inkubációt HMR 1556 kezelés előzte meg, így ebben az esetben a HMR 1556 hatásához hasonlítottuk eredményünket.

Korábbi eredményeink szerint a pioglitazon szignifikáns mértékben gátolta a  $I_{to1}$ , az  $I_{Ca,L}$  és a  $I_{Kr}$  amplitúdóját, valamint az indirekt módszerrel –  $V_{max}$  értéke csökkent az AP nulladik fázisa során – jellemezhető  $I_{Na}$ -ot is. A  $I_{to1}$ , az  $I_{Ca,L}$  és a  $I_{Kr}$  gátlása várhatóan egyértelműen növeli a SV-t, azonban úgy látszik, hogy a  $I_{Na}$  blokkolás kellőképpen ellensúlyozni tudta ezen hatásokat, melyek nettó eredménye *relatív SV* csökkenés.

### 7.3. Az intracelluláris kalcium szerepe a beat-to-beat variabilitásban

Az  $[Ca^{2+}]_i$  lehetséges szerepének vizsgálatára két egyszerű módszert alkalmaztunk. Az  $[Ca^{2+}]_i$  csökkentésére BAPTA-AM  $Ca^{2+}$  kelátort, míg annak emelésére A23187  $Ca^{2+}$  ionofórt használtunk. Ezzel a módszerrel lehetőségünk volt a sejt teljes  $[Ca^{2+}]_i$  változásának hatását megítélni a SV-ra, azonban a szív ciklushoz kapcsolódó dinamikus változások tanulmányozására ez a módszer alkalmatlan. Megállapítottuk, hogy az  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedése növeli a *relatív SV*-t, míg ellenkező esetben a *relatív SV* csökkenését tapasztaltuk. Az összes általunk alkalmazott kísérletes körülmény mellett a BAPTA-AM csökkentette a *relatív SV*-t. Érdekes módon akkor is csökkent a *relatív SV*, ha az AP időtartamát megelőzőleg szignifikáns mértékben növeltük. Legjobb példa erre a  $I_{Kr}$  gátlást (dofetilid, E-4031) követő *relatív SV* csökkenés BAPTA-AM jelenlétében. A BAPTA-AM önmagában is szignifikáns mértékben növeli az APD-ot, melyet magyarázhat az  $I_{Ca,L}$   $Ca^{2+}$ -függő inaktivációjának hiánya. Ezen felül egy újabb közlemény rámutatott arra, hogy a BAPTA-AM közvetlen gátló hatással bír a  $I_{Kr}$ -ére HEK 293 sejtvonalon<sup>149</sup>. Az alacsonyabb  $[Ca^{2+}]_i$  csökkentette a *relatív SV*-t abban az esetben is, ha Bay K8644 vagy veratridin alkalmazásával tovább aktiváltuk az  $I_{Ca,L}$ -ot és a  $I_{Na}$ -ot. A gyors ingerlési frekvenciák esetén tapasztalt SV növekedés létrejöhetett a pozitív lépcsőjelenség következtében is. Annak ellenére, hogy az előbbieken említett jelenségek háttérben alapvetően eltérő mechanizmusok állhatnak, összességében elmondhatjuk, hogy az alacsonyabb  $[Ca^{2+}]_i$  csökkenti a *relatív SV*-t.

A kardiomiocitákban az egyik legfontosabb  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolító mechanizmus a  $\text{I}_{\text{NCX}}$ <sup>64</sup>. Amennyiben SEA0400 alkalmazásával gátoltuk a NCX-t, a *relatív SV* markánsan nőtt. Patkány szívből származó sejteken leírták, hogy a NCX gátlás hatására emelkedik a szubsarkolemmális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció<sup>3</sup>. Ezzel ellentétben munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatják, hogy kutya miocitákon a SEA0400 nincs szignifikáns hatással az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra<sup>26</sup>, így vélhetően a SEA0400 ezekben a sejtekben is csak a közvetlen membrán alatti terület  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációját változtatja meg. A NCX gátlószerek különböző kísérleti feltételek mellett akár más hatással is bírhatnak<sup>108</sup>. Hipertrofiás, remodeláció során strukturálisan és elektromosan átépült sejtek esetén például 1  $\mu\text{M}$  SEA0400 a dofetilid hatására megnövelt SV-t csökkentette, valamint a EAD incidenciát is megakadályozta, ezzel együtt a megnöött  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdót is sikeresen csökkentette<sup>28</sup>.

### **7.3.1. A szarkoplazmatikus retikulumból származó kalcium szerepe a beat-to-beat variabilitásban**

A teljes sejt  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmának befolyásolása mellett, a SR raktárakból felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  is szignifikáns szerepet játszik a SV modulálásában. A SR szerepének tisztázására két olyan szert alkalmaztunk, mely vagy a  $\text{Ca}^{2+}$  SR raktárba történő felvételét, vagy a SR raktárból történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulását gátolja. A SR  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmának kiürítéséhez ciklopiazonsavat<sup>148, 177</sup>, a RYR2 gátlásához pedig rianodint használtunk<sup>117</sup>. Megállapítottuk, hogy mindkét szer csökkentette a sejtrövidülés mértékét (a rianodin nagyobb mértékben), mely összhangban áll azokkal a megfigyelésekkel, mely szerint a ciklopiazonsav és a rianodin csökkenti az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdóját<sup>169, 179</sup>. Ezekben a kísérletekben a sejtek rövidülését használtuk az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  indikátoraként. Bár a két szer hatása között adódtak időbeli különbségek, mindkettő hatékonyan csökkentette a *relatív SV*-t. A SR SV meghatározó szerepét írták le Johnson és mtsai is, akik  $\beta$ -adrenerg stimulációt követően azt figyelték meg, hogy a sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -mal való töltődése egy idő után, a SR-ból történő spontán diasztolés  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást eredményez. Ez szignifikánsan növeli a SV-t, sőt a diasztolés csurgás egy tranziens inward áram indukálásán keresztül DAD és EAD kialakulásához is vezethet<sup>96</sup>. A DAD kialakulását követő AP-ok időtartama hosszabb volt a nyugalmi időtartamhoz képest. Ugyanezen munkacsoport eredményei szerint a rianodin megszüntette a DAD-kat, és drasztikus SV csökkenést okozott.

A SR-ból történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulásnak tehát jelentős szerepe van a SV befolyásolásában. Ezt feltehetőleg az magyarázza, hogy a felszíni membránban elhelyezkedő  $\text{Ca}^{2+}$ -függő ioncsatornák közvetlenül érzékelik a szubsarkolemmális térben történő  $\text{Ca}^{2+}$

koncentráció változásokat, melyeket a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek befolyásolnak. Heijman és mtsai szintén azt tapasztalták, hogy a SV nem csak az APD-ától függ, hanem az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban történő lokális változásoktól is (például a spontán diasztolés  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulástól, mely egy nagyban lokalizált szubcelluláris esemény)<sup>80</sup>.

Eredményeink alapján tehát megállapítottuk, hogy az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fontos regulátora a SV-nak, mivel annak emelkedése jelentős SV növelő hatással bír. Ez a hatás vélhetően az  $I_{\text{Ca,L}}$   $\text{Ca}^{2+}$ -függő inaktivációjának módosításán keresztül valósul meg. Természetesen további  $\text{Ca}^{2+}$ -függő ionáramok (pl.:  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -áram vagy számos  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ -áram) is hozzájárulhatnak a SV kialakításához, de a jelen munka nem tér ki ezek vizsgálatára.

#### 7.4. A redox potenciál szerepe a beat-to-beat variabilitásban

A SV-t a sejtek redox állapota is befolyásolja. Ennek vizsgálatára háromféle kísérleti elrendezést alakítottunk ki. Oxidáló közegnek  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot alkalmaztunk, a redukáló közeg modellezésére pedig  $1 \text{ mM}$  DL-dithiothreitolból,  $1 \text{ mM}$  redukált L-glutathionból és  $1 \text{ mM}$  L-aszkorbinsavból álló redukáló koktélt használtunk. Végül a két módszert kombináltuk, előbb adva a redukáló koktélt, majd az oxidáló  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot. Az alkalmazott redukálószer koncentrációk megfelelő puffer kapacitással bírtak, mellyel a  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatását is sikerült biztonságosan ellensúlyozni. Megállapítottuk, hogy a redukáló közeg alkalmazása (5-10 perc redukáló koktél) hatékonyan csökkentette a *relatív SV*-t. Ezzel ellentétben az oxidáló környezetben (10-15 perc  $\text{H}_2\text{O}_2$  perfúzió) markánsan nőtt az APD valamint a *relatív SV* is, mindezek mellett az összes vizsgált sejt esetében EAD-k jelentek meg. Amennyiben a sejteket előzőleg a redukáló koktélban inkubáltuk 5 percig, a  $\text{H}_2\text{O}_2$  nem volt képes EAD generálásra, vagyis a  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatása valóban a redox potenciál oxidatív irányban történő elmozdításán keresztül jött létre. Egyes patológiás esetekben, ahol oxidatív stressz alakul ki a szívizomzatban – mint például az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások, hipertenzió, diabétesz vagy ateroszklerózis esetében<sup>46</sup> –, a redox potenciál és vele együtt a SV megváltozása magyarázhatja az ilyen betegségekben kialakuló szívritmuszavarok gyakoribb előfordulását.

Az irodalomban található közlemények a redox potenciál megváltozásának számos ionáramra kifejtett hatását leírják, azonban az adatok meglehetősen eltérő kísérleti elrendezésekből illetve különböző speciesekből származnak. Kutya<sup>78</sup>, nyúl<sup>71, 175</sup> és patkány<sup>184</sup> szívizomsejteken kimutatták, hogy az oxidáló környezet hatására szignifikánsan nőtt az  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitúdója, ezzel szemben tengerimalac sejteken csökkentett<sup>41, 66</sup>. HEK 293 sejtvonalon,

melyen előzőleg a humán L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna  $\alpha_{1C}$  alegységét expresszáltatták, az oxidáló környezet szintén növelte az  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitúdóját<sup>91</sup>, míg egy másik munkacsoport azt tapasztalta, hogy patkány sejteken nem változtatja meg az áram nagyságát<sup>70</sup>. Míg a  $I_{\text{K1}}$  amplitúdóját nem módosította szignifikáns mértékben az oxidáló környezet nyúl<sup>71</sup> és tengerimalac sejteken<sup>41</sup>, addig az  $I_{\text{K-ATP}}$  fokozódását írták le az utóbbi modellben<sup>66, 92</sup>. Amennyiben CHO sejteken expresszálták a  $I_{\text{Kr}}$ -ért felelős humán Ether-à-go-go-related gén (hERG) által kódolt  $\text{K}_{\text{v}11.1}$  csatornát, a  $\text{H}_2\text{O}_2$  fokozta az áram nagyságát<sup>22</sup>. Azonban ezek a megfigyelések nem adnak magyarázatot arra, hogy a  $\text{H}_2\text{O}_2$  jelenlétében miért nőtt olyan jelentős mértékben a SV, ugyanis az  $I_{\text{Ca,L}}$  és a  $I_{\text{Kr}}$  fokozódása *relatív SV* csökkentő, tehát antiaritmiás hatásának bizonyult kísérleteinkben, valamint *in silico* modellekben is<sup>80</sup>. Ugyanakkor, a  $I_{\text{K1}}$  és az  $I_{\text{K-ATP}}$  indifferens áramnak bizonyult. Eredményeink szerint a  $I_{\text{Ks}}$  jelenléte is a SV csökkenését okozza, tengerimalac sejteken azonban a  $\text{H}_2\text{O}_2$  csökkentette az áramot<sup>41</sup>. Ennek ellenére ez sem adhat kompromisszum mentes magyarázatot a tapasztalt SV növekedésre, ugyanis kutya szívműsejteken nyugalomban elhanyagolható a  $I_{\text{Ks}}$  szerepe<sup>161, 164</sup>. Nyúl kamrai miocitákon történt mérések során az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedését tapasztalták  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatására<sup>65, 175</sup>. Ez és a fokozott  $I_{\text{Na}}$  magyarázhatja a SV növekedését. Az ionáramok közül viszont egyedül a  $I_{\text{Na}}$  fokozódása adhat magyarázatot a SV növekedésre. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy az oxidatív szabad gyökök hatására megszűnik a  $I_{\text{Na}}$  gyors inaktivációja, ami fokozottabb, vagy tartósabb  $I_{\text{Na}}$ -hoz vezet<sup>175</sup>. A  $I_{\text{Na}}$  nehézkes mérése miatt azonban nem vizsgálták az oxidatív környezet közvetlen hatását a  $I_{\text{Na}}$ -ra kutya sejteken. Ezt az elméletet támasztja alá az a tény, hogy a magasabb  $[\text{Na}^+]_i$  az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedését vonja maga után. Számos olyan folyamatról leírták – mely redox potenciál változást okoz –, hogy emeli az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t. Többek között fokozza az  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitúdóját<sup>71, 78, 81, 91, 175, 184</sup>, valamint a RYR2 nyitvatartási valószínűségét<sup>8, 81, 185</sup>. Goldhaber és mtsai megfigyelték, hogy reperfüzió során a szabad gyökök hatására nőtt a  $I_{\text{NCX}}$ <sup>65</sup>. Reperfüzió során emelkedik az  $[\text{Na}^+]_i$ , ami kedvez az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedésének, mely végső soron triggerelt aritmiák kialakulásához vezethet. Az itt felsorolt mechanizmusok magyarázhatják az oxidatív stressz SV növelő hatását. Egy újabb tanulmány kimutatta, hogy a peroxinitrit felhalmozódása – mely a szuperoxid és a nitrogén-oxid reakciójának eredménye – növeli a SV-t kutyában, azonban érdekes módon csak a kamrai sejteken, pitvari sejteken nem<sup>27</sup>.

## 7.5. Klinikai vonatkozások

Jelen munkánk hozzájárulhat a beat-to-beat variabilitás jobb megértéséhez. Eredményeink és az irodalmi adatok azt sugallják, hogy az emelkedett beat-to-beat

variabilitás sejszintű, potenciálisan proaritmiás események kombinációit tükrözi. Megállapítottuk, hogy a  $I_{Kr}$ , a  $I_{Ks}$  és az  $I_{Ca,L}$  jelentős rövidtávú variabilitás csökkentő hatással bír. Eredményeink extrapolálása azonban nem egyszerű, ugyanis a III. és IV. osztályba tartozó antiaritmiás szerek ezen áramok gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. A  $I_{Kr}$  gátlószerei a III. osztályba tartoznak (például dofetilid, *d*-sotalol, amiodaron). Növelik a refrakter periódust (repolarizáció, QT-intervallum), hatásukat a  $Na^+$ -csatornák gátlása nélkül fejtik ki, így az intraventriculáris vezetést nem befolyásolják (nem szélesedik ki a QRS-komplexum). A IV. osztályba tartozók szerek az  $I_{Ca,L}$  gátlószerei (például nifedipin, verapamil, diltiazem), növelik az AV-csomóban a refrakter periódus időtartamát, így lassítják az ingerületvezetést. Védik a sejtet a  $Ca^{2+}$ -mal való túltöltődés, így a DAD-k kialakulása ellen. A II. osztályba tartozó antiaritmikumok (a  $\beta$ -receptorok kompetitív antagonistái, például propranolol, pindolol, nebivolol) viszont épp az adrenerg stimuláció *relatív SV* csökkentő hatását gátolhatják, ugyanis kísérleteinkben a 10 nM izoproterenol volt a leghatékonyabb a temporális variabilitás redukálásában. Természetesen a  $\beta$ -adrenerg stimuláció nem minden körülmény mellett antiaritmiás hatású, azonban bizonyos körülmények között ilyen tulajdonságokkal is rendelkezik. A manapság használt antiaritmikumok tehát a kedvező hatásuk ellenére növelhetik a beat-to-beat variabilitást, mely csökkentheti a gyógyszerek hatékonyságát.

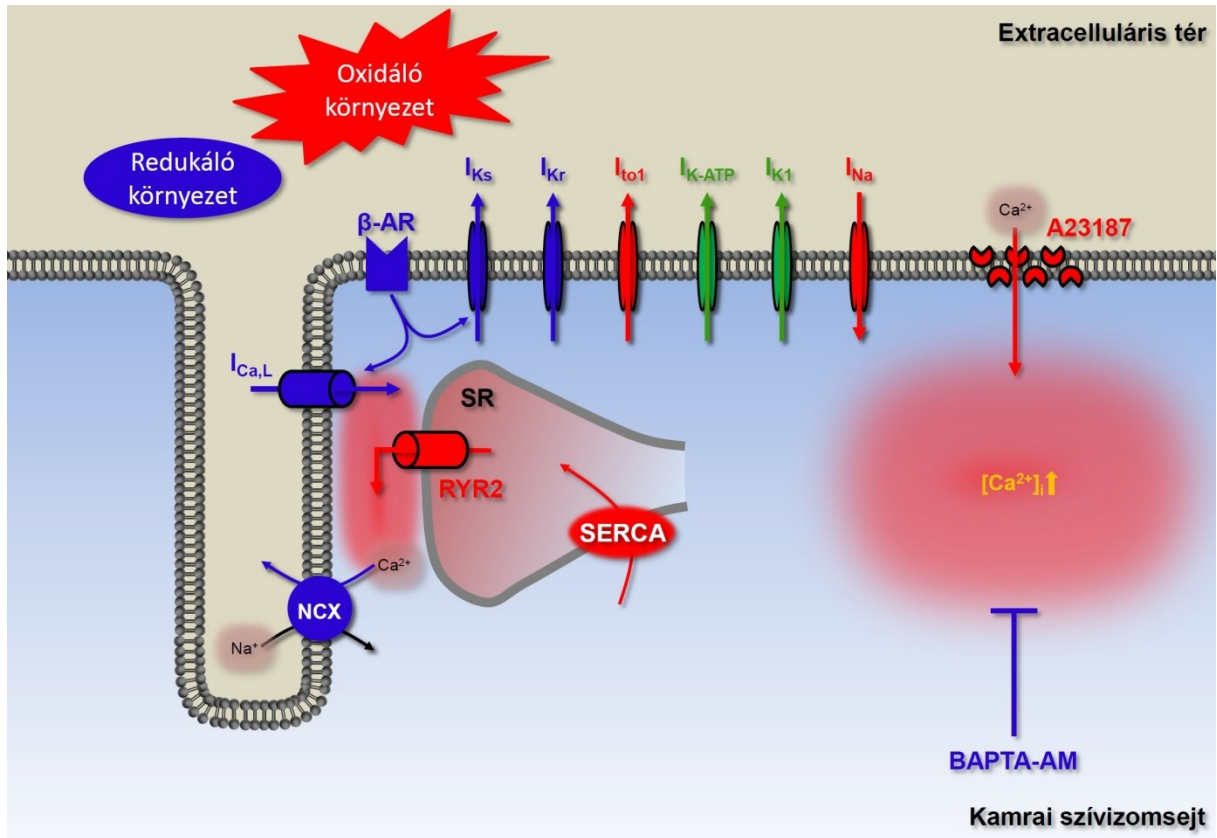
Általánosan elfogadott tény, hogy a magas  $[Ca^{2+}]_i$  proaritmiás hatású. Kétféle mechanizmus vezethet a magas  $[Ca^{2+}]_i$  indukálta szívritmuszavarhoz. Az első esetben az emelkedett  $[Ca^{2+}]_i$  hatására a gap junction kapcsolatok záródnak a szomszédos sejtek között. Ennek következménye a megnövekedett longitudinális ellenállás, lassabb ingerületvezetés, ami végső soron re-entry aritmiát okozhat. Egy másik esetben pedig a magas  $[Ca^{2+}]_i$  a SR túltöltődéséhez vezet, melyből a spontán felszabaduló  $Ca^{2+}$  DAD-k kialakulását okozhatja. Eredményeink alapján egy harmadik mechanizmust is figyelembe kell venni, mégpedig az  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés hatására megnőtt beat-to-beat variabilitást.

Egyes patológiás körülmények között a hosszabb AP során az  $I_{Ca,L}$  (és a  $I_{Na}$ ) újraaktiválódása EAD-t okozhat. Azonban a mi kísérleti körülményeink mellett ezt nem tapasztaltuk, sem az  $I_{Ca,L}$  növelésekor (Bay K8644), sem az áram inaktivációjának csökkentésekor (BAPTA-AM) és 1 Hz ingerlési frekvencia mellett sem. Munkacsoportunk legfrissebb eredményei szerint azonban az ingerlési frekvencia csökkentése és a két szer (Bay K8644 és BAPTA-AM) együttes alkalmazása extrém módon fokozza a EAD-k megjelenését izolált sejteken<sup>89</sup>.

Egy érdekes és újfajta stratégia lehet az antiaritmiás kezelésben a gap junction kapcsolatok modulálása. Számos ágensről kiderült, hogy befolyásolni képes ezen kapcsolatokat. Szívelégtelenség vagy miokardiális iszkémia esetén a gap junction kapcsolatok

záródhatnak, a redox potenciál eltolódhat oxidatív irányba, ami magyarázhatja a beat-to-beat variabilitás növekedését és az aritmia előfordulását. Egészséges egyénekből azonban – fizioológias sejt-sejt kapcsolat esetén – EAD-k nem alakulnak ki és nem terjednek a szomszédos sejtekre, még teljes  $I_{Kr}$  gátlást követően sem<sup>131</sup>.

A beat-to-beat variabilitás egy viszonylag új lehetőség az aritmiák előrejelzésére. A QTVI-et 1997-es első leírása óta (Berger és mtsai) számos betegcsoporton tesztelték a klinikumban<sup>19</sup>. Azonban számos limitáló tényező áll még a módszer útjában, mint például, hogy jelenleg sincs kereskedelemben elérhető megfelelő szoftver a QTVI meghatározására<sup>54</sup>. Jelen munkánk segíthet a beat-to-beat variabilitás háttérében álló folyamatok megértésében. Az elmúlt években egyre nagyobb számban jelentek meg a beat-to-beat variabilitással foglalkozó közlemények, melyek experimentális eredményei a szimulációs adatokkal kiegészítve fontos információkat adhatnak a beat-to-beat variabilitást meghatározó molekuláris háttéréről. A sejtszintű beat-to-beat variabilitás nem egyedüli faktora az *in vivo* QT-intervallum variabilitásnak, fontos azonban, hogy a folyamatokat alapjaiban értsük meg, így a jövőben mindenképp érdemes tovább vizsgálni a beat-to-beat variabilitást akár multicelluláris preparátumokon, akár teljes szíven végzett kísérletekben, vagy akár a páciensekről elvezetett EKG regisztrátumok tanulmányozásával. Ezek értelmezéséhez segítséget adhatnak a sejtszintű vizsgálatok eredményei és remélhetőleg a jövőben új antiaritmias kezelések kifejlesztéséhez járulhatnak hozzá.



**33. ábra: Összefoglaló ábra a jelen tanulmány kereteiben vizsgált folyamatok SV-ra kifejtett hatásáról egy sematikus szívizomsejten.** Az ábrán kék szín jelzi azokat a folyamatokat, amelyek a beat-to-beat variabilitás csökkenését, az akciós potenciál repolarizációjának stabilitását okozzák. Piros szín jelzi azokat a folyamatokat, amelyek a beat-to-beat variabilitást növelik, és zölddel jelöltük a beat-to-beat variabilitás szempontjából indifferens folyamatokat. Az ábrán található rövidítések a következők.  $[Ca^{2+}]_i$ : intracelluláris kalcium koncentráció;  $I_{Ca,L}$ : L-típusú kalciumáram;  $I_{K1}$ : befelé egyenirányító káliumáram;  $I_{K-ATP}$ : ATP-függő káliumáram;  $I_{Kr}$ : késői egyenirányító káliumáram gyors komponense;  $I_{Ks}$ : késői egyenirányító káliumáram lassú komponense;  $I_{Na}$ : nátriumáram;  $I_{to1}$ : tranziens kifelé irányuló káliumáram; NCX:  $Na^+/Ca^{2+}$  cseremechanizmus; RYR2: rianodin receptor; SR: szarkoendoplazmatikus retikulum; SERCA: SR  $Ca^{2+}$ -ATPáz;  $\beta$ -AR:  $\beta$ -adrenerg receptor.

## 8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények

Az izolált bal kamrai szívizomsejtek akciós potenciáljának rövidtávú beat-to-beat variabilitását vizsgálva a következő legfontosabb eredeti megállapításokat tettük:

1. Elsőként vezettük be a *relatív SV* fogalmát. A *relatív SV* – szemben az abszolút SV-sal – hasznosabb információval szolgál az egyes beavatkozások, valamint a különböző szerhatások proaritmiás hatásait tekintve. Az egyes gyógyszerek más és más hatással bírnak az APD-ára, valamint a SV-ra, ezért valamely szer SV-ra kifejtett hatását csak úgy tudjuk megbízhatóan megítélni, ha figyelembe vesszük az APD-ra kifejtett hatását is. Ehhez először egy standard összefüggést állapítottunk meg. Eredményeink alapján leírtuk a kontroll SV-APD és  $\Delta SV - \Delta APD$  összefüggéseket és az ehhez viszonyított változást tekintjük *relatív SV*-nak. Elsőként írtuk le, hogy a SV és az APD értékei között exponenciális a kapcsolat.
2. Kimutattuk, hogy a bal kamra főbb ionáramai közül az  $I_{Ca,L}$  a legfontosabb SV stabilizáló ionáram, ezt követi a  $I_{Kr}$  valamint a  $I_{Ks}$ . Kísérleteink alapján a leginkább SV instabilitást okozó áramnak a  $I_{Na}$  és a  $I_{to1}$  bizonyult. A  $I_{K1}$  és  $I_{K-ATP}$  indifferens a SV szempontjából.
3. Az APD negatív feedback szabályozása egy kulcsfontosságú tényező a SV modulálásában.
4. Megállapítottuk, hogy az  $[Ca^{2+}]_i$  fontos szereppel bír a SV modulálásában. A magasabb  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedett *relatív SV*-sal társul.
5. A SR-ból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulás is jelentősen hozzájárul a SV modulálásához.
6. Az ingerlési ciklushossz emelésével a SV az APD-mal megegyező mértékben változik, a ciklushossz csökkentésekor azonban nő a *relatív SV*.
7. Transzmurális SV különbségeket mutattunk ki az APD-ában a bal kamra falában, nevezetesen a bal kamra legnagyobb részét alkotó MID régióban mérhető a legnagyobb SV.
8. Kimutattuk, hogy a redox potenciál megváltozásának markáns hatása van a SV-ra. Oxidatív környezetben jelentős mértékben nő a *relatív SV*, ezzel szemben a redox potenciál redukzív irányban történő elmozdítása a *relatív SV* csökkenését okozta.

## 9. Összefoglalás

Újabb kutatások szerint az akciós potenciál időtartam (APD) rövidtávú beat-to-beat variabilitása (short term variability, SV) hatékonyan előrejelezheti a proaritmiás állapotokat. Azonban napjainkig sem tisztázott milyen mechanizmusok állhatnak a folyamat hátterében, illetve a már leírt faktorok milyen relatív szereppel bírnak a SV modulálásában.

Jelen tanulmányban célul tűztük ki a SV és az APD közötti összefüggés tanulmányozását, az egyes ionáramok aktiváló- és gátlószerekkel történő vizsgálatát, az ingerlési frekvencia megváltoztatásának hatását a SV-ra, valamint az intracelluláris kalcium koncentráció és a redox potenciál szerepét a SV meghatározásában. Vizsgálni kívántuk továbbá a SV változását a bal kamra különböző régióiból származó sejteken.

Méréseinket konvencionális hegyes mikroelektróda technikával végeztük, kutya szívéből enzimatikusan izolált bal kamrai szívműködő sejteken. Az akciós potenciál méréseket követően a SV kvantitatív jellemzéséhez 50 egymást követő APD felhasználásával Poincaré diagramokat szerkesztettünk.

Kísérleteink zömét midmiokardiális sejteken végeztük, melyek SV-a magasabbnak bizonyult mint a szubepikardiális és a szubendokardiális sejtek esetében. Az elektrotónust alkalmazó kísérleteink során megállapítottuk, hogy a SV értéke függ az APD-tól, a két paraméter közötti összefüggés exponenciális. Így továbbiakban minden eredményünket az ebben a kísérletsorozatban megállapított *standard görbéhez* viszonyítottunk, és az ettől való eltérést *relatív SV*-nek neveztünk. Dofetilid, HMR 1556, nifedipin és veratridin alkalmazása növelte a *relatív SV*-t, míg Bay K8644, tetrodotoxin, lidokain és izoproterenol csökkentette azt. Megállapítottuk, hogy az alacsonyabb ingerlési frekvencia és az emelkedett intracelluláris kalcium koncentráció növelte a *relatív SV*-t, valamint, hogy a szisztolés alatti kalcium felszabadulás egy meghatározó eleme a SV-nak. Kimutattuk, hogy a redox potenciál megváltozása szignifikáns hatással lehet a *relatív SV*-ra, ugyanis redukáló környezetben csökkent, míg oxidáló környezetben nőtt a *relatív SV*.

Elsőként vezettük be a *relatív SV* fogalmát, nevezetesen bármilyen beavatkozás SV-ra kifejtett hatását csak a kontroll SV-APD összefüggés alapján tudjuk értelmezni. Ezek alapján az  $I_{Ca,L}$ , a  $I_{Kr}$  és a  $I_{Ks}$  stabilizálja a SV-t, míg a  $I_{Na}$  és a  $I_{to1}$  növeli a repolarizáció instabilitását. Ezen felül fontos meghatározó eleme a SV-nak az intracelluláris kalcium koncentráció, azon belül is a szarkoendoplazmatikus retikulumból történő kalcium felszabadulás, az ingerlési frekvencia valamint a redox potenciál.

## 10. Summary

Recent studies suggest the short term beat-to-beat variability (SV) of action potential duration (APD) as a novel method for predicting imminent cardiac arrhythmias, although the underlying mechanisms are still not clear.

The goal of our experiments were to determine the role of the major cardiac ion currents, APD, stimulation frequency, redox potential and changes in the intracellular calcium concentration on the magnitude of SV. Our aim was also to study the transmural heterogeneity of SV.

Series of action potentials were recorded from isolated canine ventricular cardiomyocytes using conventional microelectrode technique. SV was quantitatively described by constructing Poincaré plots from 50 consecutive APD-s.

SV was significantly larger on midmyocardial cells compared to subepicardial and subendocardial cells. On midmyocardial cells SV was an exponential function of APD, when APD was modified by current injections. Drug effects were characterized as *relative SV* changes by comparing the drug-induced changes in SV to those in APD according to the exponential function obtained with current pulses. *Relative SV* was increased by dofetilide, HMR 1556, nisoldipine and veratridine, while it was reduced by Bay K8644, tetrodotoxin, lidocaine and isoproterenol. *Relative SV* was also increased by increasing the stimulation frequency and intracellular calcium concentration. Contribution of transient changes of intracellular calcium concentration due to calcium released from the sarcoplasmic reticulum was an important contributor to this process. We found a significant effect of redox potential on SV, since the reductive environment decreased, while the oxidative environment increased the *relative SV*.

We conclude that drug-induced effects on SV should be evaluated in relation with the concomitant changes in APD. In summary, *relative SV* is decreased by ion currents involved in the negative feedback regulation of APD ( $I_{Ca,L}$ ,  $I_{Ks}$  and  $I_{Kr}$ ), while it is increased by  $I_{Na}$  and  $I_{to}$ . It is concluded that elevation of intracellular calcium concentration increases *relative SV* significantly. More importantly, intracellular calcium concentration released from the sarcoplasmic reticulum is an important component of this effect. Stimulation frequency and alterations in the redox potential are also relevant SV modulating factors.

## 11. Irodalomjegyzék

- 1     Abi-Gerges, N., J.P. Valentin és C.E. Pollard: Dog left ventricular midmyocardial myocytes for assessment of drug-induced delayed repolarization: short-term variability and proarrhythmic potential. *Br J Pharmacol.* **2010.** 159: 77-92.
- 2     Abildstrom, S.Z., B.T. Jensen, E. Agner, C. Torp-Pedersen, O. Nyvad, K. Wachtell, M.M. Ottesen, J.K. Kanters és B.S. Group: Heart rate versus heart rate variability in risk prediction after myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2003.** 14: 168-173.
- 3     Acsai, K., A. Kun, A.S. Farkas, F. Fulop, N. Nagy, M. Balazs, N. Szentandrassy, P.P. Nanasi, J.G. Papp, A. Varro és A. Toth: Effect of partial blockade of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger on Ca<sup>2+</sup> handling in isolated rat ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* **2007.** 576: 1-6.
- 4     Anon: Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. The European Agency for the evaluation of medicinal products. *London, November 16, 2000. Reference CPMP/ICH/539/00.* **2005.**
- 5     Anon: ICH S7B Note for guidance on the nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. *London, 25 May. Reference CHMP/ICH/423/02.* **2005.**
- 6     Antzelevitch, C.: Heterogeneity and cardiac arrhythmias: an overview. *Heart Rhythm.* **2007.** 4: 964-972.
- 7     Antzelevitch, C.: Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2007.** 293: H2024-2038.
- 8     Anzai, K., K. Ogawa, T. Ozawa és H. Yamamoto: Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antioxid Redox Signal.* **2000.** 2: 35-40.
- 9     Atiga, W.L., H. Calkins, J.H. Lawrence, G.F. Tomaselli, J.M. Smith és R.D. Berger: Beat-to-beat repolarization lability identifies patients at risk for sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **1998.** 9: 899-908.
- 10    Banyasz, T., L. Fulop, J. Magyar, N. Szentandrassy, A. Varro és P.P. Nanasi: Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. *Cardiovasc Res.* **2003.** 58: 66-75.
- 11    Banyasz, T., B. Horvath, Z. Jian, L.T. Izu és Y. Chen-Izu: Profile of L-type Ca<sup>2+</sup> current and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current during cardiac action potential in ventricular myocytes. *Heart Rhythm.* **2012.** 9: 134-142.
- 12    Banyasz, T., B. Horvath, L. Virag, L. Barandi, N. Szentandrassy, G. Harmati, J. Magyar, S. Marangoni, A. Zaza, A. Varro és P.P. Nanasi: Reverse rate dependency is

- an intrinsic property of canine cardiac preparations. *Cardiovasc Res.* **2009.** 84: 237-244.
- 13 Barandi, L., L. Virag, N. Jost, Z. Horvath, I. Koncz, R. Papp, G. Harmati, B. Horvath, N. Szentandrassy, T. Banyasz, J. Magyar, A. Zaza, A. Varro és P.P. Nanasi: Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations. *Basic Res Cardiol.* **2010.** 105: 315-323.
  - 14 Bardy, G.H., R.M. Ungerleider, W.M. Smith és R.E. Ideker: A mechanism of torsades de pointes in a canine model. *Circulation.* **1983.** 67: 52-59.
  - 15 Barhanin, J., F. Lesage, E. Guillemare, M. Fink, M. Lazdunski és G. Romey: K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I<sub>Ks</sub> cardiac potassium current. *Nature.* **1996.** 384: 78-80.
  - 16 Bass, A., J.P. Valentin, A.A. Fossa és P.G. Volders: Points to consider emerging from a mini-workshop on cardiac safety: assessing torsades de pointes liability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **2007.** 56: 91-94.
  - 17 Bassani, R.A., J.W. Bassani és D.M. Bers: Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. *J Physiol.* **1994.** 476: 295-308.
  - 18 Belardinelli, L., C. Antzelevitch és M.A. Vos: Assessing predictors of drug-induced torsade de pointes. *Trends Pharmacol Sci.* **2003.** 24: 619-625.
  - 19 Berger, R.D., E.K. Kasper, K.L. Baughman, E. Marban, H. Calkins és G.F. Tomaselli: Beat-to-beat QT interval variability: novel evidence for repolarization lability in ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* **1997.** 96: 1557-1565.
  - 20 Bers, D.M.: Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res.* **2000.** 87: 275-281.
  - 21 Bers, D.M., J.H. Bridge és K.W. Spitzer: Intracellular Ca<sup>2+</sup> transients during rapid cooling contractures in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* **1989.** 417: 537-553.
  - 22 Berube, J., D. Caouette és P. Daleau: Hydrogen peroxide modifies the kinetics of HERG channel expressed in a mammalian cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* **2001.** 297: 96-102.
  - 23 Bigger, J.T., Jr., L.M. Rolnitzky, R.C. Steinman és J.L. Fleiss: Predicting mortality after myocardial infarction from the response of RR variability to antiarrhythmic drug therapy. *J Am Coll Cardiol.* **1994.** 23: 733-740.
  - 24 Bilchick, K., M. Viitasalo, L. Oikarinen, B. Fetcs, G. Tomaselli, H. Swan, P.J. Laitinen, H. Vaananen, K. Kontula és R.D. Berger: Temporal repolarization lability differences among genotyped patients with the long QT syndrome. *Am J Cardiol.* **2004.** 94: 1312-1316.
  - 25 Birinyi, P., K. Acsai, T. Banyasz, A. Toth, B. Horvath, L. Virag, N. Szentandrassy, J. Magyar, A. Varro, F. Fulop és P.P. Nanasi: Effects of SEA0400 and KB-R7943 on

- Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current and L-type Ca<sup>2+</sup> current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **2005.** 372: 63-70.
- 26 Birinyi, P., A. Toth, I. Jona, K. Acsai, J. Almassy, N. Nagy, J. Prorok, I. Gherasim, Z. Papp, Z. Hertelendi, N. Szentandrassy, T. Banyasz, F. Fulop, J.G. Papp, A. Varro, P.P. Nanasi és J. Magyar: The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* **2008.** 78: 476-484.
- 27 Bonilla, I.M., A. Sridhar, Y. Nishijima, S. Gyorke, A.J. Cardounel és C.A. Carnes: Differential effects of the peroxynitrite donor, SIN-1, on atrial and ventricular myocyte electrophysiology. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2013.** 61: 401-407.
- 28 Bourgonje, V.J., M.A. Vos, S. Ozdemir, N. Doisne, K. Acsai, A. Varro, A. Sztojkov-Ivanov, I. Zupko, E. Rauch, L. Kattner, V. Bito, M. Houtman, R. van der Nagel, J.D. Beekman, T.A. van Veen, K.R. Sipido és G. Antoons: Combined Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and L-type calcium channel block as a potential strategy to suppress arrhythmias and maintain ventricular function. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* **2013.** 6: 371-379.
- 29 Brahmajothi, M.V., D.L. Campbell, R.L. Rasmusson, M.J. Morales, J.S. Trimmer, J.M. Nerbonne és H.C. Strauss: Distinct transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* **1999.** 113: 581-600.
- 30 Brini, M. és E. Carafoli: The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2011.** 3.
- 31 Bryant, S.M., X. Wan, S.J. Shipsey és G. Hart: Regional differences in the delayed rectifier current (I<sub>Kr</sub> and I<sub>Ks</sub>) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc Res.* **1998.** 40: 322-331.
- 32 Buchanan, L.V., G. Kabell, M.N. Brunden és J.K. Gibson: Comparative assessment of ibutilide, D-sotalol, clofilium, E-4031, and UK-68,798 in a rabbit model of proarrhythmia. *J Cardiovasc Pharmacol.* **1993.** 22: 540-549.
- 33 Carlsson, L., C. Abrahamsson, B. Andersson, G. Duker és G. Schiller-Linhardt: Proarrhythmic effects of the class III agent almokalant: importance of infusion rate, QT dispersion, and early afterdepolarisations. *Cardiovasc Res.* **1993.** 27: 2186-2193.
- 34 Carlsson, L., L. Drews, G. Duker és G. Schiller-Linhardt: Attenuation of proarrhythmias related to delayed repolarization by low-dose lidocaine in the anesthetized rabbit. *J Pharmacol Exp Ther.* **1993.** 267: 1076-1080.
- 35 Carmeliet, E.: Cardiac transmembrane potentials and metabolism. *Circ Res.* **1978.** 42: 577-587.
- 36 Carmeliet, E.: Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch.* **1987.** 408: 18-26.
- 37 Cascio, W.E.: Myocardial ischemia: what factors determine arrhythmogenesis? *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2001.** 12: 726-729.

- 38 Catterall, W.A., A.L. Goldin és S.G. Waxman: International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* **2005.** 57: 397-409.
- 39 Catterall, W.A., E. Perez-Reyes, T.P. Snutch és J. Striessnig: International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* **2005.** 57: 411-425.
- 40 Cavero, I., M. Mestre, J.M. Guillon, E. Heuillet és A.G. Roach: Preclinical in vitro cardiac electrophysiology: a method of predicting arrhythmogenic potential of antihistamines in humans? *Drug Saf.* **1999.** 21 Suppl 1: 19-31; discussion 81-17.
- 41 Cerbai, E., G. Ambrosio, F. Porciatti, M. Chiariello, A. Giotti és A. Mugelli: Cellular electrophysiological basis for oxygen radical-induced arrhythmias. A patch-clamp study in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation.* **1991.** 84: 1773-1782.
- 42 Chiang, C.E. és D.M. Roden: The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J Am Coll Cardiol.* **2000.** 36: 1-12.
- 43 Corrado, D., P. Michieli, C. Basso, M. Schiavon és G. Thiene: How to screen athletes for cardiovascular diseases. *Cardiol Clin.* **2007.** 25: 391-397, v-vi.
- 44 Curran, M.E., I. Splawski, K.W. Timothy, G.M. Vincent, E.D. Green és M.T. Keating: A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell.* **1995.** 80: 795-803.
- 45 Csanady, M. és R. Sepp: [The long QT syndrome from the bedside to molecular genetic laboratory. The history of the first described Hungarian family]. *Orv Hetil.* **2005.** 146: 2011-2016.
- 46 Csato, V., A. Peto, A. Koller, I. Edes, A. Toth és Z. Papp: Hydrogen peroxide elicits constriction of skeletal muscle arterioles by activating the arachidonic acid pathway. *PLoS One.* **2014.** 9: e103858.
- 47 D, N. és R. Y: Models of cardiac ventricular action potentials: iterative interaction between experiment and simulation. *Philos Trans R Soc Lond A.* **2001.** 359: 1127-1142.
- 48 Dangerfield, C.E., E. Pueyo, O.J. Britton, L. Virág, K. Kistamás, N. Szentandrassy, A. Varró, P.P. Nánási, K. Burrage és B. Rodríguez: Experimentally-based computational investigation into beat-to-beat variability in ventricular repolarisation and its response to ionic current inhibition. **2015.**
- 49 Davie, C., J. Pierre-Valentin, C. Pollard, N. Standen, J. Mitcheson, P. Alexander és B. Thong: Comparative pharmacology of guinea pig cardiac myocyte and cloned hERG ( $I_{Kr}$ ) channel. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2004.** 15: 1302-1309.
- 50 De Groot, J.R. és R. Coronel: Acute ischemia-induced gap junctional uncoupling and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* **2004.** 62: 323-334.

- 51 Decker, K.F., J. Heijman, J.R. Silva, T.J. Hund és Y. Rudy: Properties and ionic mechanisms of action potential adaptation, restitution, and accommodation in canine epicardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2009.** 296: H1017-1026.
- 52 Dedkova, E.N. és L.A. Blatter: Calcium signaling in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* **2013.** 58: 125-133.
- 53 Detre, E., M.B. Thomsen, J.D. Beekman, K.U. Petersen és M.A. Vos: Decreasing the infusion rate reduces the proarrhythmic risk of NS-7: confirming the relevance of short-term variability of repolarisation in predicting drug-induced torsades de pointes. *Br J Pharmacol.* **2005.** 145: 397-404.
- 54 Dobson, C.P., A. Kim és M. Haigney: QT Variability Index. *Prog Cardiovasc Dis.* **2013.** 56: 186-194.
- 55 Dobson, C.P., M.T. La Rovere, C. Olsen, M. Berardinangeli, M. Veniani, P. Mida, L. Tavazzi, M. Haigney és G.-H. Investigators: 24-hour QT variability in heart failure. *J Electrocardiol.* **2009.** 42: 500-504.
- 56 Drago, I., D. De Stefani, R. Rizzuto és T. Pozzan: Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> peaks in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012.** 109: 12986-12991.
- 57 Drouin, E., F. Charpentier, C. Gauthier, K. Laurent és H. Le Marec: Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for presence of M cells. *J Am Coll Cardiol.* **1995.** 26: 185-192.
- 58 Fedida, D. és W.R. Giles: Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *J Physiol.* **1991.** 442: 191-209.
- 59 Fenichel, R.R., M. Malik, C. Antzelevitch, M. Sanguinetti, D.M. Roden, S.G. Priori, J.N. Ruskin, R.J. Lipicky, L.R. Cantilena és F. Independent Academic Task: Drug-induced torsades de pointes and implications for drug development. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2004.** 15: 475-495.
- 60 Fill, M. és J.A. Copello: Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* **2002.** 82: 893-922.
- 61 Fitzhugh, R.: Thresholds and plateaus in the Hodgkin-Huxley nerve equations. *J Gen Physiol.* **1960.** 43: 867-896.
- 62 Furukawa, T., S. Kimura, N. Furukawa, A.L. Bassett és R.J. Myerburg: Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res.* **1992.** 70: 91-103.
- 63 Gbadebo, T.D., R.W. Trimble, M.S. Khoo, J. Temple, D.M. Roden és M.E. Anderson: Calmodulin inhibitor W-7 unmasks a novel electrocardiographic parameter that predicts initiation of torsade de pointes. *Circulation.* **2002.** 105: 770-774.

- 64 Ginsburg, K.S., C.R. Weber és D.M. Bers: Cardiac  $\text{Na}^+$  -  $\text{Ca}^{2+}$  exchanger: dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation and deactivation in intact myocytes. *J Physiol.* **2013.** 591: 2067-2086.
- 65 Goldhaber, J.I.: Free radicals enhance  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol.* **1996.** 271: H823-833.
- 66 Goldhaber, J.I. és E. Liu: Excitation-contraction coupling in single guinea-pig ventricular myocytes exposed to hydrogen peroxide. *J Physiol.* **1994.** 477 ( Pt 1): 135-147.
- 67 Goldin, A.L.: Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol.* **2001.** 63: 871-894.
- 68 Goldman, D.E.: Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *J Gen Physiol.* **1943.** 27: 37-60.
- 69 Gralinski, M.R.: The dog's role in the preclinical assessment of QT interval prolongation. *Toxicol Pathol.* **2003.** 31 Suppl: 11-16.
- 70 Greensmith, D.J., D.A. Eisner és M. Nirmalan: The effects of hydrogen peroxide on intracellular calcium handling and contractility in the rat ventricular myocyte. *Cell Calcium.* **2010.** 48: 341-351.
- 71 Guo, J., W.R. Giles és C.A. Ward: Effect of hydrogen peroxide on the membrane currents of sinoatrial node cells from rabbit heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2000.** 279: H992-999.
- 72 Gutman, G.A., K.G. Chandy, J.P. Adelman, J. Aiyar, D.A. Bayliss, D.E. Clapham, M. Covarriubias, G.V. Desir, K. Furuichi, B. Ganetzky, M.L. Garcia, S. Grissmer, L.Y. Jan, A. Karschin, D. Kim, S. Kuperschmidt, Y. Kurachi, M. Lazdunski, F. Lesage, H.A. Lester, D. McKinnon, C.G. Nichols, I. O'Kelly, J. Robbins, G.A. Robertson, B. Rudy, M. Sanguinetti, S. Seino, W. Stuehmer, M.M. Tamkun, C.A. Vandenberg, A. Wei, H. Wulff, R.S. Wymore és P. International Union of: International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev.* **2003.** 55: 583-586.
- 73 Haigney, M.C., W. Zareba, P.J. Gentlesk, R.E. Goldstein, M. Illovsky, S. McNitt, M.L. Andrews, A.J. Moss és I.I.i. Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial: QT interval variability and spontaneous ventricular tachycardia or fibrillation in the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial (MADIT) II patients. *J Am Coll Cardiol.* **2004.** 44: 1481-1487.
- 74 Hamlin, R.L.: Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther.* **2007.** 113: 276-295.
- 75 Hanson, L.A., A.S. Bass, G. Gintant, S. Mittelstadt, D. Rampe és K. Thomas: ILSI-HESI cardiovascular safety subcommittee initiative: evaluation of three non-clinical models of QT prolongation. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **2006.** 54: 116-129.

- 76 Hao, L., J.L. Rigaud és G. Inesi:  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids. *J Biol Chem.* **1994.** 269: 14268-14275.
- 77 Haverkamp, W., G. Breithardt, A.J. Camm, M.J. Janse, M.R. Rosen, C. Antzelevitch, D. Escande, M. Franz, M. Malik, A. Moss és R. Shah: The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* **2000.** 47: 219-233.
- 78 Hegyi, B., I. Komaromi, K. Kistamas, F. Ruzsnavszky, K. Vaczi, B. Horvath, J. Magyar, T. Banyasz, P.P. Nanasi és N. Szentandrassy: Tetrodotoxin blockade on canine cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels depends on pH and redox potential. *Mar Drugs.* **2013.** 11: 2140-2153.
- 79 Heijman, J.: Beat-to-beat Variability of Repolarization Duration Measures for Automated Arrhythmia Prediction and their Relation to Cell Models. **2006.**
- 80 Heijman, J., A. Zaza, D.M. Johnson, Y. Rudy, R.L. Peeters, P.G. Volders és R.L. Westra: Determinants of beat-to-beat variability of repolarization duration in the canine ventricular myocyte: a computational analysis. *PLoS Comput Biol.* **2013.** 9: e1003202.
- 81 Hidalgo, C., R. Bull, M.I. Behrens és P. Donoso: Redox regulation of RyR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release in muscle and neurons. *Biol Res.* **2004.** 37: 539-552.
- 82 Hinterseer, M., M.B. Thomsen, B.M. Beckmann, A. Pfeufer, R. Schimpf, H.E. Wichmann, G. Steinbeck, M.A. Vos és S. Kaab: Beat-to-beat variability of QT intervals is increased in patients with drug-induced long-QT syndrome: a case control pilot study. *Eur Heart J.* **2008.** 29: 185-190.
- 83 Hodgkin, A.L. és B. Katz: The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol.* **1949.** 108: 37-77.
- 84 Hohnloser, S.H., T. Klingenhoben és B.N. Singh: Amiodarone-associated proarrhythmic effects. A review with special reference to torsade de pointes tachycardia. *Ann Intern Med.* **1994.** 121: 529-535.
- 85 Hondeghem, L.M.: Relative contributions of TRIaD and QT to proarrhythmia. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2007.** 18: 655-657.
- 86 Hondeghem, L.M., L. Carlsson és G. Duker: Instability and triangulation of the action potential predict serious proarrhythmia, but action potential duration prolongation is antiarrhythmic. *Circulation.* **2001.** 103: 2004-2013.
- 87 Hondeghem, L.M. és P. Hoffmann: Blinded test in isolated female rabbit heart reliably identifies action potential duration prolongation and proarrhythmic drugs: importance of triangulation, reverse use dependence, and instability. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2003.** 41: 14-24.

- 88 Horvath, B., T. Banyasz, Z. Jian, B. Hegyi, K. Kistamas, P.P. Nanasi, L.T. Izu és Y. Chen-Izu: Dynamics of the late  $\text{Na}^+$  current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations. *J Mol Cell Cardiol.* **2013.** 64: 59-68.
- 89 Horvath, B., B. Hegyi, K. Kistamas, K. Vaczi, T. Banyasz, J. Magyar, N. Szentandrassy és P.P. Nanasi: Cytosolic calcium changes affect the incidence of early afterdepolarizations in canine ventricular myocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* **2015.**
- 90 Horvath, B., J. Magyar, N. Szentandrassy, P. Birinyi, P.P. Nanasi és T. Banyasz: Contribution of  $\text{I}_{\text{Ks}}$  to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflugers Arch.* **2006.** 452: 698-706.
- 91 Hudasek, K., S.T. Brown és I.M. Fearon:  $\text{H}_2\text{O}_2$  regulates recombinant  $\text{Ca}^{2+}$  channel alpha1C subunits but does not mediate their sensitivity to acute hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* **2004.** 318: 135-141.
- 92 Ichinari, K., M. Kakei, T. Matsuoka, H. Nakashima és H. Tanaka: Direct activation of the ATP-sensitive potassium channel by oxygen free radicals in guinea-pig ventricular cells: its potentiation by MgADP. *J Mol Cell Cardiol.* **1996.** 28: 1867-1877.
- 93 Inoue, H., Y. Murakawa, I. Toda, A. Nozaki, H. Matsuo, S. Mashima és T. Sugimoto: Epicardial activation patterns of torsade de pointes in canine hearts with quinidine-induced long QT interval but without myocardial infarction. *Am Heart J.* **1986.** 111: 1080-1087.
- 94 Jeck, C.D. és P.A. Boyden: Age-related appearance of outward currents may contribute to developmental differences in ventricular repolarization. *Circ Res.* **1992.** 71: 1390-1403.
- 95 Jeyaraj, D., S.M. Haldar, X. Wan, M.D. McCauley, J.A. Ripperger, K. Hu, Y. Lu, B.L. Eapen, N. Sharma, E. Ficker, M.J. Cutler, J. Gulick, A. Sanbe, J. Robbins, S. Demolombe, R.V. Kondratov, S.A. Shea, U. Albrecht, X.H. Wehrens, D.S. Rosenbaum és M.K. Jain: Circadian rhythms govern cardiac repolarization and arrhythmogenesis. *Nature.* **2012.** 483: 96-99.
- 96 Johnson, D.M., J. Heijman, E.F. Bode, D.J. Greensmith, H. van der Linde, N. Abi-Gerges, D.A. Eisner, A.W. Trafford és P.G. Volders: Diastolic spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum increases beat-to-beat variability of repolarization in canine ventricular myocytes after beta-adrenergic stimulation. *Circ Res.* **2013.** 112: 246-256.
- 97 Johnson, D.M., J. Heijman, C.E. Pollard, J.P. Valentin, H.J. Crijns, N. Abi-Gerges és P.G. Volders:  $\text{I}_{\text{Ks}}$  restricts excessive beat-to-beat variability of repolarization during beta-adrenergic receptor stimulation. *J Mol Cell Cardiol.* **2010.** 48: 122-130.
- 98 Jones, P.P., D. Jiang, J. Bolstad, D.J. Hunt, L. Zhang, N. Demarex és S.R. Chen: Endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  measurements reveal that the cardiac ryanodine receptor mutations linked to cardiac arrhythmia and sudden death alter the threshold for store-overload-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Biochem J.* **2008.** 412: 171-178.

- 99 Kakei, M., A. Noma és T. Shibasaki: Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol.* **1985.** 363: 441-462.
- 100 Kleber, A.G. és Y. Rudy: Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev.* **2004.** 84: 431-488.
- 101 Kubo, Y., J.P. Adelman, D.E. Clapham, L.Y. Jan, A. Karschin, Y. Kurachi, M. Lazdunski, C.G. Nichols, S. Seino és C.A. Vandenberg: International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev.* **2005.** 57: 509-526.
- 102 Kudat, H., V. Akkaya, A.B. Sozen, S. Salman, S. Demirel, M. Ozcan, D. Atilgan, M.T. Yilmaz és O. Guven: Heart rate variability in diabetes patients. *J Int Med Res.* **2006.** 34: 291-296.
- 103 Lehnart, S.E., X.H. Wehrens és A.R. Marks: Calstabin deficiency, ryanodine receptors, and sudden cardiac death. *Biochem Biophys Res Commun.* **2004.** 322: 1267-1279.
- 104 Lemay, M., E. de Lange és J.P. Kucera: Effects of stochastic channel gating and distribution on the cardiac action potential. *J Theor Biol.* **2011.** 281: 84-96.
- 105 Lengyel, C., A. Varro, K. Tabori, J.G. Papp és I. Baczko: Combined pharmacological block of  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$  increases short-term QT interval variability and provokes torsades de pointes. *Br J Pharmacol.* **2007.** 151: 941-951.
- 106 Lesh, M.D., M. Pring és J.F. Spear: Cellular uncoupling can unmask dispersion of action potential duration in ventricular myocardium. A computer modeling study. *Circ Res.* **1989.** 65: 1426-1440.
- 107 Liu, D.W., G.A. Gintant és C. Antzelevitch: Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res.* **1993.** 72: 671-687.
- 108 Mackiewicz, U. és B. Lewartowski: The effect of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak on contractile activity of guinea pig heart myocytes depends in activity of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase and  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger. *J Physiol Pharmacol.* **2008.** 59: 287-300.
- 109 Magyar, J., T. Banyasz, P. Szigligeti, A. Kortvely, A. Jednakovits és P.P. Nanasi: Electrophysiological effects of bimoclomol in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **2000.** 361: 303-310.
- 110 Magyar, J., A. Jenes, K. Kistamas, F. Ruzsnavszky, P.P. Nanasi, J. Satin, N. Szentandrassy és T. Banyasz: Long term regulation of cardiac L-type calcium channel by small G proteins. *Curr Med Chem.* **2011.** 18: 3714-3719.
- 111 Maltsev, V.A. és A.I. Undrovinas: A multi-modal composition of the late  $Na^{+}$  current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* **2006.** 69: 116-127.

- 112 Martina, M., G. Kilic és E. Cherubini: The effect of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture. *J Membr Biol.* **1994.** 142: 209-216.
- 113 Martonosi, A.N. és S. Pikula: The structure of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochim Pol.* **2003.** 50: 337-365.
- 114 Matsuda, H., A. Saigusa és H. Irisawa: Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal  $\text{Mg}^{2+}$ . *Nature.* **1987.** 325: 156-159.
- 115 Mattioni, T.A., T.A. Zheutlin, J.J. Sarmiento, M. Parker, M. Lesch és R.F. Kehoe: Amiodarone in patients with previous drug-mediated torsade de pointes. Long-term safety and efficacy. *Ann Intern Med.* **1989.** 111: 574-580.
- 116 Mazur, A., D.M. Roden és M.E. Anderson: Systemic administration of calmodulin antagonist W-7 or protein kinase A inhibitor H-8 prevents torsade de pointes in rabbits. *Circulation.* **1999.** 100: 2437-2442.
- 117 Meissner, G.: Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **1986.** 261: 6300-6306.
- 118 Milberg, P., L. Eckardt, H.J. Bruns, J. Biertz, S. Ramtin, N. Reinsch, D. Fleischer, P. Kirchhof, L. Fabritz, G. Breithardt és W. Haverkamp: Divergent proarrhythmic potential of macrolide antibiotics despite similar QT prolongation: fast phase 3 repolarization prevents early afterdepolarizations and torsade de pointes. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002.** 303: 218-225.
- 119 Mohamed, T.M., D. Oceandy, M. Zi, S. Prehar, N. Alatwi, Y. Wang, M.A. Shaheen, R. Abou-Leisa, C. Schelcher, Z. Hegab, F. Baudoin, M. Emerson, M. Mamas, G. Di Benedetto, M. Zaccolo, M. Lei, E.J. Cartwright és L. Neyses: Plasma membrane calcium pump (PMCA4)-neuronal nitric-oxide synthase complex regulates cardiac contractility through modulation of a compartmentalized cyclic nucleotide microdomain. *J Biol Chem.* **2011.** 286: 41520-41529.
- 120 Nattel, S.: New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* **2002.** 415: 219-226.
- 121 Nemeč, J., J.J. Kim, B. Gabris és G. Salama: Calcium oscillations and T-wave lability precede ventricular arrhythmias in acquired long QT type 2. *Heart Rhythm.* **2010.** 7: 1686-1694.
- 122 Nguyen, P.T., M.M. Scheinman és J. Seger: Polymorphous ventricular tachycardia: clinical characterization, therapy, and the QT interval. *Circulation.* **1986.** 74: 340-349.
- 123 Noble, D.: Cardiac action and pacemaker potentials based on the Hodgkin-Huxley equations. *Nature.* **1960.** 188: 495-497.
- 124 Noble, D.: A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials. *J Physiol.* **1962.** 160: 317-352.
- 125 Olshansky, B., J. Martins és S. Hunt: N-acetyl procainamide causing torsades de pointes. *Am J Cardiol.* **1982.** 50: 1439-1441.

- 126 Omata, T., C. Kasai, M. Hashimoto, T. Hombo és K. Yamamoto: QT PRODACT: comparison of non-clinical studies for drug-induced delay in ventricular repolarization and their role in safety evaluation in humans. *J Pharmacol Sci.* **2005.** 99: 531-541.
- 127 Pan, X., J. Liu, T. Nguyen, C. Liu, J. Sun, Y. Teng, M.M. Fergusson, Rovira, II, M. Allen, D.A. Springer, A.M. Aponte, M. Gucek, R.S. Balaban, E. Murphy és T. Finkel: The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol.* **2013.** 15: 1464-1472.
- 128 Peterson, B.Z., J.S. Lee, J.G. Mulle, Y. Wang, M. de Leon és D.T. Yue: Critical determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J.* **2000.** 78: 1906-1920.
- 129 Piccirillo, G., M. Cacciafesta, M. Lionetti, M. Nocco, V. Di Giuseppe, A. Moise, C. Naso és V. Marigliano: Influence of age, the autonomic nervous system and anxiety on QT-interval variability. *Clin Sci (Lond).* **2001.** 101: 429-438.
- 130 Pieske, B., L.S. Maier, D.M. Bers és G. Hasenfuss: Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* **1999.** 85: 38-46.
- 131 Pueyo, E., A. Corrias, L. Virag, N. Jost, T. Szel, A. Varro, N. Szentandrassy, P.P. Nanasi, K. Burrage és B. Rodriguez: A multiscale investigation of repolarization variability and its role in cardiac arrhythmogenesis. *Biophys J.* **2011.** 101: 2892-2902.
- 132 Rasmusson, R.L., M.J. Morales, S. Wang, S. Liu, D.L. Campbell, M.V. Brahmajothi és H.C. Strauss: Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res.* **1998.** 82: 739-750.
- 133 Rosati, B., Z. Pan, S. Lypen, H.S. Wang, I. Cohen, J.E. Dixon és D. McKinnon: Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol.* **2001.** 533: 119-125.
- 134 Ruzsnaszky, F., B. Hegyi, K. Kistamas, K. Vaczi, B. Horvath, N. Szentandrassy, T. Banyasz, P.P. Nanasi és J. Magyar: Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **2014.** 387: 457-467.
- 135 Schneider, J., R. Hauser, J.O. Andreas, K. Linz és U. Jahnel: Differential effects of human ether-a-go-go-related gene (HERG) blocking agents on QT duration variability in conscious dogs. *Eur J Pharmacol.* **2005.** 512: 53-60.
- 136 Schwartz, P.J., S.G. Priori, C. Spazzolini, A.J. Moss, G.M. Vincent, C. Napolitano, I. Denjoy, P. Guicheney, G. Breithardt, M.T. Keating, J.A. Towbin, A.H. Beggs, P. Brink, A.A. Wilde, L. Toivonen, W. Zareba, J.L. Robinson, K.W. Timothy, V. Corfield, D. Wattanasirichaigoon, C. Corbett, W. Haverkamp, E. Schulze-Bahr, M.H. Lehmann, K. Schwartz, P. Coumel és R. Bloise: Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* **2001.** 103: 89-95.

- 137 Seidler, N.W., I. Jona, M. Vegh és A. Martonosi: Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **1989.** 264: 17816-17823.
- 138 Shannon, T.R., K.S. Ginsburg és D.M. Bers: Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration. *Biophys J.* **2000.** 78: 334-343.
- 139 Simko, J., Z. Szabo, K. Barta, D. Ujvarosi, P. Nanasi és I. Lorincz: [Molecular and genetic background of sudden cardiac death]. *Orv Hetil.* **2012.** 153: 1967-1983.
- 140 Smith, W.T.t., W.F. Fleet, T.A. Johnson, C.L. Engle és W.E. Cascio: The Ib phase of ventricular arrhythmias in ischemic in situ porcine heart is related to changes in cell-to-cell electrical coupling. Experimental Cardiology Group, University of North Carolina. *Circulation.* **1995.** 92: 3051-3060.
- 141 Soldatov, N.M.: Genomic structure of human L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Genomics.* **1994.** 22: 77-87.
- 142 Song, L.S., A. Guo és R.Z. Lin: MicroRNA: a toolkit fine-tuning the dyadic "fuzzy space"? *Circ Res.* **2012.** 111: 816-818.
- 143 Spector, P.S., M.E. Curran, A. Zou, M.T. Keating és M.C. Sanguinetti: Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen Physiol.* **1996.** 107: 611-619.
- 144 Stankovicova, T., M. Szilard, I. De Scheerder és K.R. Sipido: M cells and transmural heterogeneity of action potential configuration in myocytes from the left ventricular wall of the pig heart. *Cardiovasc Res.* **2000.** 45: 952-960.
- 145 Szabo, G., N. Szentandrassy, T. Biro, B.I. Toth, G. Czifra, J. Magyar, T. Banyasz, A. Varro, L. Kovacs és P.P. Nanasi: Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Arch.* **2005.** 450: 307-316.
- 146 Szentadrassy, N., T. Banyasz, T. Biro, G. Szabo, B.I. Toth, J. Magyar, J. Lazar, A. Varro, L. Kovacs és P.P. Nanasi: Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res.* **2005.** 65: 851-860.
- 147 Szentandrassy, N., D. Nagy, B. Hegyi, J. Magyar, T. Banyasz és P.P. Nanasi: Class IV Antiarrhythmic Agents: New Compounds using an Old Strategy. *Curr Pharm Des.* **2014.**
- 148 Takahashi, S., Y. Kato, M. Adachi, N. Agata, H. Tanaka és K. Shigenobu: Effects of cyclopiazonic acid on rat myocardium: inhibition of calcium uptake into sarcoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther.* **1995.** 272: 1095-1100.
- 149 Tang, Q., M.W. Jin, J.Z. Xiang, M.Q. Dong, H.Y. Sun, C.P. Lau és G.R. Li: The membrane permeable calcium chelator BAPTA-AM directly blocks human ether a-go-go-related gene potassium channels stably expressed in HEK 293 cells. *Biochem Pharmacol.* **2007.** 74: 1596-1607.

- 150 Tanskanen, A.J., J.L. Greenstein, B. O'Rourke és R.L. Winslow: The role of stochastic and modal gating of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels on early after-depolarizations. *Biophys J.* **2005.** 88: 85-95.
- 151 Terrar, D.A., C.M. Wilson, S.G. Graham, S.M. Bryant és B.M. Heath: Comparison of guinea-pig ventricular myocytes and dog Purkinje fibres for in vitro assessment of drug-induced delayed repolarization. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **2007.** 56: 171-185.
- 152 Thomsen, M.B., M. Truin, J.M. van Opstal, J.D. Beekman, P.G. Volders, M. Stengl és M.A. Vos: Sudden cardiac death in dogs with remodeled hearts is associated with larger beat-to-beat variability of repolarization. *Basic Res Cardiol.* **2005.** 100: 279-287.
- 153 Thomsen, M.B., S.C. Verduyn, M. Stengl, J.D. Beekman, G. de Pater, J. van Opstal, P.G. Volders és M.A. Vos: Increased short-term variability of repolarization predicts d-sotalol-induced torsades de pointes in dogs. *Circulation.* **2004.** 110: 2453-2459.
- 154 Thomsen, M.B., P.G. Volders, J.D. Beekman, J. Matz és M.A. Vos: Beat-to-Beat variability of repolarization determines proarrhythmic outcome in dogs susceptible to drug-induced torsades de pointes. *J Am Coll Cardiol.* **2006.** 48: 1268-1276.
- 155 Thomsen, M.B., P.G. Volders, M. Stengl, R.L. Spatjens, J.D. Beekman, U. Bischoff, M.A. Kall, K. Frederiksen, J. Matz és M.A. Vos: Electrophysiological safety of sertindole in dogs with normal and remodeled hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003.** 307: 776-784.
- 156 Tran, K., N.P. Smith, D.S. Loiselle és E.J. Crampin: A thermodynamic model of the cardiac sarcoplasmic/endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA) pump. *Biophys J.* **2009.** 96: 2029-2042.
- 157 Tsien, R.Y.: New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry.* **1980.** 19: 2396-2404.
- 158 van der Linde, H., A. Van de Water, W. Loots, B. Van Deuren, H.R. Lu, K. Van Ammel, M. Peeters és D.J. Gallacher: A new method to calculate the beat-to-beat instability of QT duration in drug-induced long QT in anesthetized dogs. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **2005.** 52: 168-177.
- 159 van Opstal, J.M., M. Schoenmakers, S.C. Verduyn, S.H. de Groot, J.D. Leunissen, F.F. van Der Hulst, M.M. Molenschot, H.J. Wellens és M.A. Vos: Chronic amiodarone evokes no torsade de pointes arrhythmias despite QT lengthening in an animal model of acquired long-QT syndrome. *Circulation.* **2001.** 104: 2722-2727.
- 160 Varro, A. és I. Baczko: Cardiac ventricular repolarization reserve: a principle for understanding drug-related proarrhythmic risk. *Br J Pharmacol.* **2011.** 164: 14-36.
- 161 Varro, A., B. Balati, N. Iost, J. Takacs, L. Virag, D.A. Lathrop, L. Csaba, L. Talosi és J.G. Papp: The role of the delayed rectifier component  $I_{Ks}$  in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol.* **2000.** 523 Pt 1: 67-81.

- 162 Varro, A. és J.G. Papp: The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. *Cardioscience*. **1992**. 3: 131-144.
- 163 Volders, P.G., A. Kulcsar, M.A. Vos, K.R. Sipido, H.J. Wellens, R. Lazzara és B. Szabo: Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. **1997**. 34: 348-359.
- 164 Volders, P.G., M. Stengl, J.M. van Opstal, U. Gerlach, R.L. Spatjens, J.D. Beekman, K.R. Sipido és M.A. Vos: Probing the contribution of  $I_{Ks}$  to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation*. **2003**. 107: 2753-2760.
- 165 Walmsley, J., G.R. Mirams, J. Pitt-Francis, B. Rodriguez és K. Burrage: Application of stochastic phenomenological modelling to cell-to-cell and beat-to-beat electrophysiological variability in cardiac tissue. *J Theor Biol*. **2015**. 365: 325-336.
- 166 Wang, Q., M.E. Curran, I. Splawski, T.C. Burn, J.M. Millholland, T.J. VanRaay, J. Shen, K.W. Timothy, G.M. Vincent, T. de Jager, P.J. Schwartz, J.A. Towbin, A.J. Moss, D.L. Atkinson, G.M. Landes, T.D. Connors és M.T. Keating: Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*. **1996**. 12: 17-23.
- 167 Wang, X., K. Sada, S. Yanagi, C. Yang, K. Rezaul és H. Yamamura: Intracellular calcium dependent activation of p72syk in platelets. *J Biochem*. **1994**. 116: 858-861.
- 168 Weissenburger, J., J.M. Davy, F. Chezalviel, O. Ertzbischoff, J.M. Poirier, F. Engel, P. Laine, E. Penin, G. Motte és G. Cheymol: Arrhythmogenic activities of antiarrhythmic drugs in conscious hypokalemic dogs with atrioventricular block: comparison between quinidine, lidocaine, flecainide, propranolol and sotalol. *J Pharmacol Exp Ther*. **1991**. 259: 871-883.
- 169 Weisser-Thomas, J., V. Piacentino, 3rd, J.P. Gaughan, K. Margulies és S.R. Houser: Calcium entry via Na/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. **2003**. 57: 974-985.
- 170 Wiesfeld, A.C., H.J. Crijns, T.J. Tobe, O. Almgren, R.H. Bergstrand, J. Aberg, J. Haaksma és K.I. Lie: Electropharmacologic effects and pharmacokinetics of almokalant, a new class III antiarrhythmic, in patients with healed or healing myocardial infarcts and complex ventricular arrhythmias. *Am J Cardiol*. **1992**. 70: 990-996.
- 171 Wilders, R. és H.J. Jongasma: Beating irregularity of single pacemaker cells isolated from the rabbit sinoatrial node. *Biophys J*. **1993**. 65: 2601-2613.
- 172 Williams, G.S., L. Boyman, A.C. Chikando, R.J. Khairallah és W.J. Lederer: Mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2013**. 110: 10479-10486.
- 173 Wolk, R., S.M. Cobbe, M.N. Hicks és K.A. Kane: Functional, structural, and dynamic basis of electrical heterogeneity in healthy and diseased cardiac muscle: implications

- for arrhythmogenesis and anti-arrhythmic drug therapy. *Pharmacol Ther.* **1999.** 84: 207-231.
- 174 Wu, L., J.C. Shryock, Y. Song és L. Belardinelli: An increase in late sodium current potentiates the proarrhythmic activities of low-risk QT-prolonging drugs in female rabbit hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* **2006.** 316: 718-726.
- 175 Xie, L.H., F. Chen, H.S. Karagueuzian és J.N. Weiss: Oxidative-stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling. *Circ Res.* **2009.** 104: 79-86.
- 176 Yang, Y.D., H. Cho, J.Y. Koo, M.H. Tak, Y. Cho, W.S. Shim, S.P. Park, J. Lee, B. Lee, B.M. Kim, R. Raouf, Y.K. Shin és U. Oh: TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature.* **2008.** 455: 1210-1215.
- 177 Yard, N.J., M. Chiesi és H.A. Ball: Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, on the frequency-dependence of the contraction-relaxation cycle of the guinea-pig isolated atrium. *Br J Pharmacol.* **1994.** 113: 1001-1007.
- 178 Yue, L., J. Feng, G.R. Li és S. Nattel: Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol.* **1996.** 270: H2157-2168.
- 179 Zahanich, I., S.G. Sirenko, L.A. Maltseva, Y.S. Tarasova, H.A. Spurgeon, K.R. Boheler, M.D. Stern, E.G. Lakatta és V.A. Maltsev: Rhythmic beating of stem cell-derived cardiac cells requires dynamic coupling of electrophysiology and Ca cycling. *J Mol Cell Cardiol.* **2011.** 50: 66-76.
- 180 Zaniboni, M., A.E. Pollard, L. Yang és K.W. Spitzer: Beat-to-beat repolarization variability in ventricular myocytes and its suppression by electrical coupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2000.** 278: H677-687.
- 181 Zaritsky, J.J., J.B. Redell, B.L. Tempel és T.L. Schwarz: The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying  $\text{K}^+$  current ( $\text{I}_{\text{K1}}$ ) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol.* **2001.** 533: 697-710.
- 182 Zaza, A. és M. Rocchetti: The late  $\text{Na}^+$  current--origin and pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther.* **2013.** 27: 61-68.
- 183 Zhang, M., M. Jiang és G.N. Tseng: minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res.* **2001.** 88: 1012-1019.
- 184 Zhang, R., Y. Sun, H. Tsai, C. Tang, H. Jin és J. Du: Hydrogen sulfide inhibits L-type calcium currents depending upon the protein sulfhydryl state in rat cardiomyocytes. *PLoS One.* **2012.** 7: e37073.
- 185 Zissimopoulos, S. és F.A. Lai: Redox regulation of the ryanodine receptor/calcium release channel. *Biochem Soc Trans.* **2006.** 34: 919-921.

186 Zuhlke, R.D., G.S. Pitt, K. Deisseroth, R.W. Tsien és H. Reuter: Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*. **1999**. 399: 159-162.

## 12. Tárgyszavak

- akciós potenciál időtartam
- elektrofiziológia
- elektrotónus injekció
- intracelluláris kalcium koncentráció
- ionáramok
- kalciumáram
- káliumáram
- kamrai repolarizáció
- kutya kamrai szívműködés
- redox potenciál
- rövidtávú beat-to-beat variabilitás

## 13. Keywords

- action potential duration
- calcium current
- canine cardiomyocyte
- electrophysiology
- electrotonic injection
- intracellular calcium concentration
- ion currents
- potassium current
- redox potential
- short term beat-to-beat variability
- ventricular repolarization

## 14. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, aki az Élettani Intézet igazgatójaként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Magyar Jánosnak az áldozatkész segítségét, bátorítását, elméleti és gyakorlati tanácsait, amelyek nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom a Szívelektrofiziológiai Laboratórium vezetőjének, Prof. Dr. Nánási Péternek a hatékony munkavégzés feltételeinek biztosításáért, a hasznos tanácsokért és a bátorításért, Dr. Bányász Tamásnak, Dr. Szentandrassy Norbertnek és Dr. Horváth Baláznak elméleti és gyakorlati tanácsaikért, amelyekkel felkeltették az érdeklődésemet a szívelektrofiziológia iránt. Hálásan gondolok jelenlegi és volt Ph.D. hallgatótársaimra, Dr. Harmati Gáborra, Dr. Ruzsnavszky Ferencre, Dr. Hegyi Bencére és Dr. Váczi Krisztinára, akikkel megoszthattam a közösen végzett munka felejthetetlen pillanatait, továbbá Dr. Bárándi László Viktorra, aki az elektrofiziológiai technikák elsajátításában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget.

Külön köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Varró Andrásnak, aki hozzájárult az értekezésben bemutatott eredmények elkészítéséhez.

A kísérletek előkészítése során nélkülözhetetlen segítséget nyújtott Sági Éva, Dr. Vighné Horváth Katalin és Orosz József.

Köszönöm az Élettani Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, hogy támogattak és segítettek munkámat. Hálámat fejezném ki Dr. Ruzsnavszky Olgának, a tudományos diákkörös munkámban nyújtott segítségével. Köszönöm Geyer Nikolettnek és Bodnár Dórának a támogatást és a baráti légkör megteremtését.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm barátnőmnek, Csató Viktóriának és családomnak az áldozatkész segítséget és türelmet, mert az ő támogatásuk nélkül a jelen disszertáció nem készülhetett volna el.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, illetve a TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt nyújtott támogatást. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## 15. Függelék

Publikációs lista, valamint az értekezést megalapozó közlemények gyűjteménye.



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

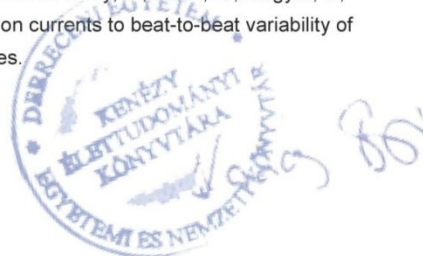


Nyilvántartási szám: DEENK/23/2015.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kistamás Kornél  
Neptun kód: Z6MTFM  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
Mtmnt azonosító: 10037894

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Magyar, J., Bányász, T., Szentandrassy, N., **Kistamás, K.**, Nánási, P.P., Satin, J.: Role of Gap Junction Channel in the Development of Beat-to-Beat Action Potential Repolarization Variability and Arrhythmias.  
*Curr. Pharm. Design.* 21 (8), 1042-1052, 2015.  
IF:3.288 (2013)
2. **Kistamás, K.**, Szentandrassy, N., Hegyi, B., Váczi, K., Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P.P., Magyar, J.: Changes in intracellular calcium concentration influence beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes.  
*J. Physiol. Pharmacol. Epub ahead of print (2015)*  
IF:2.72 (2013)
3. **Kistamás, K.**, Hegyi, B., Váczi, K., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Szentandrassy, N., Nánási, P.P.: Oxidative shift in tissue redox potential increases beat-to-beat variability of action potential duration.  
*Can. J. Physiol. Pharmacol. Epub ahead of print (2015)*  
IF:1.546 (2013)
4. Szentandrassy, N., **Kistamás, K.**, Hegyi, B., Horváth, B., Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P.P.: Contribution of ion currents to beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes.  
*Pflugers Arch. Epub ahead of print (2014)*  
IF:3.073 (2013)



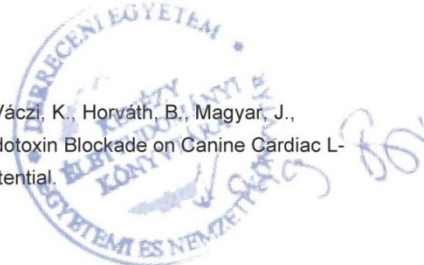
Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443  
E-mail: [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) □ Honlap: [www.lib.unideb.hu](http://www.lib.unideb.hu)



5. **Kistamás, K.**, Szentandrassy, N., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Bárándi, L., Horváth, B., Szebeni, A., Magyar, J., Bányász, T., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of pioglitazone on cardiac ion currents and action potential morphology in canine ventricular myocytes.  
*Eur. J. Pharmacol.* 710 (1-3), 10-19, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.047>  
IF:2.684

### További Közlemények

6. Váczi, K., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., **Kistamás, K.**, Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P.P., Szentandrassy, N., Magyar, J.: 9-Anthracene carboxylic acid is more suitable than DIDS for characterization of calcium-activated chloride current during canine ventricular action potential.  
*Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 388 (1), 87-100, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-1050-9>  
IF:2.36 (2013)
7. Horváth, B., Hegyi, B., **Kistamás, K.**, Váczi, K., Bányász, T., Magyar, J., Szentandrassy, N., Nánási, P.P.: Cytosolic calcium changes affect the incidence of early afterdepolarizations in canine ventricular myocytes.  
*Can. J. Physiol. Pharmacol.* Epub ahead of print (2015)  
IF:1.546 (2013)
8. Ruzsnavszky, F., Hegyi, B., **Kistamás, K.**, Váczi, K., Horváth, B., Szentandrassy, N., Bányász, T., Nánási, P.P., Magyar, J.: Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes.  
*Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 387 (5), 457-467, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-0964-6>  
IF:2.36 (2013)
9. Hegyi, B., Komáromi, I., **Kistamás, K.**, Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P.P., Szentandrassy, N.: Tetrodotoxin Blockade on Canine Cardiac L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Depends on pH and Redox Potential.  
*Mar Drugs.* 11 (6), 2140-2153, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md11062140>  
IF:3.512





10. Horváth, B., Bányász, T., Jian, Z., Hegyi, B., **Kistamás, K.**, Nánási, P.P., Izu, L.T., Chen-Izu, Y.:  
Dynamics of the late Na<sup>+</sup> current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations.  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* 64, 59-68, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.08.010>  
IF:5.218
11. Szabó, L., Szentandrassy, N., **Kistamás, K.**, Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Pál, B., Nánási, P.P.: Effects of tacrolimus on action potential configuration and transmembrane ion currents in canine ventricular cells.  
*Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 386 (3), 239-246, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0823-2>  
IF:2.36
12. **Kistamás, K.**, Ruzsnavszky, O., Telek, A., Kosztka, L., Kovács, I., Dienes, B., Csernoch, L., Józsa, T.: Expression of anti-Mullerian hormone receptor on the appendix testis in connection with urological disorders.  
*Asian J. Androl.* 15 (3), 400-403, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2012.135>  
IF:2.53
13. Magyar, J., Jenes, Á., **Kistamás, K.**, Ruzsnavszky, F., Nánási, P.P., Satin, J., Szentandrassy, N., Bányász, T.: Long term regulation of cardiac L-type calcium channel by small G proteins.  
*Curr. Med. Chem.* 18 (24), 3714-3719, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796642436>  
IF:4.859

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 38,056**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 13,311**

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

Debrecen, 2015.02.06.

