

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A szívizom L-típusú kalciumcsatornájának tetrodotoxin-érzékenysége

Dr. Hegyi Bence

Témavezető: Dr. Szentandrassy Norbert



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	5
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. Feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák	7
3.1.1. Feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák felépítése, típusai.....	7
3.1.2. Az L-típusú Ca^{2+} áram jellemzői szívműködéseken.....	10
3.1.3. Az L-típusú Ca^{2+} csatornák molekuláris farmakológiája.....	14
3.2. Feszültségfüggő Na^{+} csatornák	15
3.2.1. Feszültségfüggő Na^{+} csatornák felépítése, típusai.....	16
3.2.2. A Na^{+} áram jellemzői szívműködéseken	18
3.2.3. A Na^{+} csatornák molekuláris farmakológiája	20
3.3. A tetrodotoxin és saxitoxin hatása a feszültségfüggő Na^{+} csatornákon.....	22
3.4. Áttekintés az eddig leírt tetrodotoxin-érzékeny Ca^{2+} áramokról.....	23
3.5. Tetrodotoxin mérgezés	28
3.6. A szív feszültségfüggő Na^{+} és Ca^{2+} csatornáin ható szerek mérsékelt szelektivitása.	31
4. Célkitűzés	34
5. Anyagok és módszerek.....	35
5.1. Kutya bal kamrai szívműködése enzimatikus izolálása	35
5.2. Ionáram mérés konvencionális feszültség-clamp technikával szívműködéseken.....	36
5.3. Ionáram mérés akciós potenciál-clamp technika alkalmazásával szívműködéseken...	38
5.4. Ionáram mérés HEK tsA-201 sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornákon.....	38
5.5. Mérésekhez használt oldatok összetétele	39
5.5.1. Kutya bal kamrából izolált szívműködéseken esetén	39
5.5.2. HEK tsA-201 sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák esetén.....	39
5.6. A TTX kötődésének modellezése a $\text{Ca}_v1.2$ és $\text{Na}_v1.5$ csatornákhöz	40
5.7. Az analízis során felhasznált matematikai formulák.....	42
5.8. Statisztikai elemzés	42

6. Eredmények	44
6.1. A TTX gátolja az $I_{Ca,L}$ -ot.....	44
6.1.1. A gátlás koncentrációfüggése és reverzibilitása	44
6.1.2. A TTX hatása az $I_{Ca,L}$ feszültségfüggésére	47
6.1.3. A TTX hatása az $I_{Ca,L}$ inaktivációs kinetikájára.....	48
6.1.4. Nizoldipin alkalmazása az áram eredetének igazolására	48
6.1.5. TTX-érzékeny áram az akciós potenciál alatt (AP-clamp eredmények)	50
6.2. A TTX okozta $I_{Ca,L}$ gátlás használatfüggő (use-dependens) jellege.....	52
6.3. Az $I_{Ca,L}$ modulációjának hatása a TTX gátló potenciáljára	55
6.3.1. Ioncsatorna foszforiláció hatása a TTX gátlásra.....	55
6.3.2. Extracelluláris pH-függés	56
6.3.3. Redoxpotenciál változtatása.....	57
6.4. A TTX kötődésének modellezése a $Na_v1.5$ és $Ca_v1.2$ csatornákhöz	59
6.5. A TTX nem gátolja a HEK sejteken expresszált $Ca_v1.2$ csatornák áramát.....	62
7. Megbeszélés.....	64
7.1. A tetrodoxin L-típusú Ca^{2+} csatorna gátlásának jelentősége szíven	64
7.2. A tetrodotoxin és az L-típusú Ca^{2+} csatorna kölcsönhatásának molekuláris determinánsai, a pH- és redoxpotenciál-változások hatásának értelmezése	65
7.3. A tetrodotoxin hatástalanságának lehetséges okai HEK tsA-201 sejteken expresszált $Ca_v1.2$ csatornákon.....	68
7.4. A feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornákon ható szerek korlátozott szelektivitása ...	69
8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények	71
9. Összefoglalás	72
10. Summary	73
10. Irodalomjegyzék	74
11. Tárgyszavak	83
12. Keywords.....	84
13. Köszönetnyilvánítás	85
14. Függelék	86

1. Rövidítések jegyzéke

AC	adenilát-cikláz
AP	akciós potenciál (action potential)
APD	akciós potenciál időtartam (action potential duration)
APVC	akciós potenciál feszültség-clamp (action potential voltage clamp)
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
$[Ca^{2+}]_i$	intracelluláris Ca^{2+} koncentráció
CaMKII	Ca^{2+} -kalmodulin-függő protein-kináz II
$Ca_v1.2$	a fő feszültségfüggő kalciumcsatorna típus kamrai szívizomsejteken
DEKA	aszpartát-glutamát-lizin-alanin, a Na^+ csatornák szelektivitási filterének aminosav szekvenciája
EEXX	glutamát-glutamát-X-X, a Ca^{2+} csatornák szelektivitási filterének aminosav szekvenciája, ahol az X lehet glutamát (E) vagy aszpartát (D)
EPAC	cAMP aktivált GTP cserét elősegítő fehérje (Exchange Protein directly Activated by cAMP)
HEK	humán embrionális vese sejtvonala (human embryonic kidney)
$I_{Ca,L}$	L-típusú Ca^{2+} áram
$I_{Ca,T}$	T-típusú Ca^{2+} áram
$I_{Ca(TTX)}$	TTX-érzékeny Ca^{2+} áram
I_{Na}	gyors, feszültségfüggő Na^+ áram
$I_{Na,T}$	az I_{Na} tranziens, nagy amplitúdójú komponense
$I_{Na,L}$	az I_{Na} késői, kis amplitúdójú komponense (late Na^+ current)
IC_{50}	félmaximális gátláshoz szükséges koncentráció
$Na_v1.5$	a fő gyors, feszültségfüggő Na^+ csatorna típus kamrai szívizomsejteken
PKA	protein-kináz A
PDE	foszfodiészteráz
SR	szarkoplazmatikus retikulum
STX	saxitoxin
TTX	tetrodotoxin
V_{max}	az akciós potenciál depolarizációjának legnagyobb sebessége (V/s)

2. Bevezetés

Általánosan elfogadott nézet, hogy az egyes tengeri élőlényekben előforduló, guanidin csoportot tartalmazó tetrodotoxin (TTX), hasonlóan a saxitoxinhoz (STX), a feszültségfüggő Na^+ csatornák igen szelektív gátlószere az emlősök ingerlékeny szöveteiben. Valóban ez a helyzet vázizom és idegszövetben, ahol a TTX nanomólos koncentrációban gátolja a nátriumáramot (I_{Na}) (a félmaximális gátláshoz szükséges koncentráció (IC_{50}) $\sim 10 \text{ nM}$) (Catterall és mtsai., 2005a). Azonban szívizmon a TTX csak mikromólos koncentrációban fejt ki hatékony Na^+ áram gátló hatást (Baer és mtsai., 1976, Gellens és mtsai., 1992). Ennek következtében a I_{Na} teljes gátlásának eléréséhez a TTX-t akár $30 \mu\text{M}$ -os koncentrációban kell alkalmaznunk az emlős szívizomsejteken (Brown és mtsai., 1981).

TTX-érzékeny Ca^{2+} áram komponensét már korábban azonosították szívizomszövetben olyan patológiás állapotokban, mint például a hipertrófiás tengerimalac szívizom (Chorvatova és mtsai., 2004) és infarktuson átesett patkány szív (Alvarez és mtsai., 2004) esetén. Továbbá számos szívizomszövetben, többek között ember (Lemaire és mtsai., 1995), tengerimalac (Cole és mtsai., 1997; Heubach és mtsai., 2000) és patkány (Aggarwal és mtsai., 1997) miokardiumban is leírták már egy olyan TTX-érzékeny áram jelenlétét, amelyet extracelluláris Na^+ hiányában Ca^{2+} közvetít. Ezekből a kísérletekből arra lehet következtetni, hogy valószínűleg a Ca^{2+} a töltéshordozó ionja ennek a Na^+ -mentes külső környezetben a Na^+ csatornákon keresztül folyó áramnak (Santana és mtsai., 1998). Az előbb említett vizsgálatoknak megfelelően (vagyis Na^+ -mentes körülmények között) szíven a T-típusú Ca^{2+} áramot közvetítő legfontosabb izoformák ($\text{Ca}_v3.1$ és $\text{Ca}_v3.2$) TTX-rezisztensnek bizonyultak (Sun és mtsai., 2008). Másrésről azonban kevés információval rendelkezünk a TTX hatásáról az L-típusú Ca^{2+} csatorna esetén, egy egereken végzett vizsgálat kivételével, ahol azonban a TTX hatástalannak bizonyult (Su és mtsai., 2004). A kérdés tisztázása végett célul tűztük ki, hogy újra megvizsgáljuk a TTX L-típusú Ca^{2+} áramra ($I_{\text{Ca,L}}$) kifejtett hatását kutya bal kamrából izolált szívizomsejteken. Azért választottuk ezt a preparátumot, mivel ennek az elektrofiziológiai paramétereiről tudjuk, hogy a transzmembrán ionáramok megoszlásának és kinetikai sajátosságainak tekintetében leginkább hasonlít a humánhoz (Szabó és mtsai., 2005; Szentandrassy és mtsai., 2005).

Azért, hogy részleteiben megértsük, miként gátolja a TTX a feszültségfüggő $\text{Ca}_v1.2$ csatornákat, kísérleti úton nyert atomi felbontású 3D struktúrákból származó információval kellene rendelkezünk azok szelektivitási filterének térszerkezetéről. Ezen információ hiányában egy elméleti modellt fejlesztettük ki a TTX $\text{Ca}_v1.2$ csatornához való kötődésének

magyarázatára. Ez a modell a $\text{Na}_v1.4$ csatorna szelektivitási filter régiójának a TTX molekulával alkotott komplexén és a $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$ és $\text{Ca}_v1.2$ csatornák közötti ismert homológián alapszik (Tikhonov és Zhorov, 2005 és 2011). Nemrégiben publikálták a vad típusú és mutáns Na_vAb csatornák kristálystruktúráját, beleértve a leginkább kritikus szelektivitási filter régiókat is (Payendah és mtsai., 2011 és 2012). Tikhonov és Zhorov közleményükben (2012) a szekvencia egyezés alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a pontmutáción átesett bakteriális Na_vAb csatorna Payendah és mtsai. által meghatározásra került röntgenstruktúrája egy ígéretes alapul szolgálhat a kalciumcsatornák modelljéhez.

A TTX és a STX mérsékelt szelektivitása továbbá rávilágíthat arra, hogy szívizom feszültségfüggő ioncsatornáit gátló szerek kutatásban való és terápiás alkalmazása esetén óhatatlanul számolnunk kell keresztreakciókkal.

3. Irodalmi áttekintés

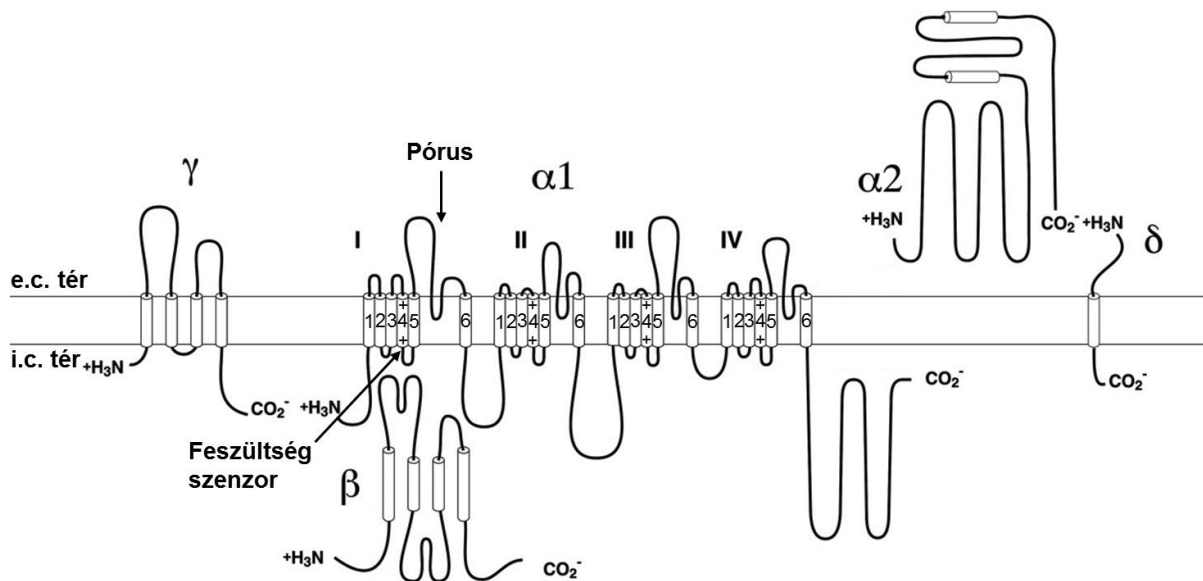
3.1. Feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák

A sejt felszíni membránban elhelyezkedő feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák a fő közvetítői a membrán depolarizáció lokális intracelluláris Ca^{2+} tranziensekké alakításának, amely számos élettani jelenség kiindulópontját képezi. A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák a membrán depolarizációra megnyílnak, ekkor rajtuk keresztül Ca^{2+} beáramlás történik, amely sokféle különböző sejt típusban olyan intracelluláris folyamatokat szabályoz, mint például az izomkontrakció, a szekréció, a neurotranszmisszió, a génexpressziós folyamatok és számos enzim aktivitása (Catterall és mtsai., 2005b).

3.1.1. Feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák felépítése, típusai

A Ca^{2+} csatornák 4 vagy 5 alegységből felépülő komplex fehérjék, amelyek kódolásában relatíve sok gén vesz részt (Catterall, 2000). Az alegységek közül a 190-250 kDa közötti α_1 a legnagyobb, amely magában foglalja a csatorna pórusát, a feszültség szenzort, a kapuzási apparátust és a csatorna szabályozásában szerepet játszó legtöbb kötőhelyet, amelyekhez másodlagos hírvivők, gyógyszerek, valamint bizonyos toxinok kötődhetnek. A Na^+ csatornák α alegységéhez hasonlóan a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák α_1 alegysége is négy homológ doménből (I-IV) épül fel, amelyek mindegyike hat transzmembrán szegmenst (S1-S6) tartalmaz (Catterall és mtsai., 2005b). Feszültségérzékelőként itt is az S4 szegmens szolgál, valamint az S5 és S6 transzmembrán szegmensek közötti pórusformáló hurok határozza meg az ionszelektivitást és konduktanciát. A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák szelektivitási filterét kialakító aminosav szekvencia a glutamát-glutamát-X-X (ún. EEXX gyűrű) (Heinemann és mtsai., 1994; Perez-Reyes, 2003). A teljes egészében intracellulárisan elhelyezkedő β alegységek ($\beta_1 - \beta_4$) a csatorna kifejeződését közel tízszeresére növelik és gyorsítják az aktivációs és inaktivációs kinetikát (Grant, 2009). A transzmembrán helyzetű, diszulfid híddal kapcsolt α_2/δ alegység is szerepet játszik a legtöbb Ca^{2+} csatorna felépítésében. A γ alegység típusosan a vázizom Ca^{2+} csatornáiban található meg, míg hasonló alegységek az agyban és a szívben ugyancsak kifejeződésre kerülnek. Jóllehet ezek a járulékos alegységek befolyásolják a csatorna tulajdonságait, a Ca^{2+} csatornák farmakológiai és elektrofiziológiai sokfélesége elsősorban a különböző α_1 alegységek jelenlétéből fakad (Hofmann és mtsai., 1999). A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák vázlatos struktúrája az 1. ábrán

látható. A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák családjának 10 tagját írták már le emlősökben, amelyek a sejtszintű jelátviteli folyamatokban különböző szerepet töltenek be.



1. ábra: A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák szerkezete és alegység összetétele. Catterall és mtsai. közleménye alapján (2005b), módosítva.

A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák (Ca_v) gyors, meglehetősen szelektív Ca^{2+} beáramlást közvetítenek a sejtekbe még a jóval nagyobb extracelluláris Na^+ koncentráció mellett is. A Ca^{2+} ionok $\sim 10^6$ ion/s sebességgel jutnak át a Ca_v csatornákon, míg a Ca^{2+} csatornák Na^+ -ra vonatkoztatott vezetőképessége több mint 500-szor alacsonyabb (Tang és mtsai., 2014). A Na^+ extracelluláris koncentrációja közel 70-szer magasabb a Ca^{2+} -énál (ha csak az ionizált Ca^{2+} -ot vesszük számításba, akkor pedig még magasabb ez az arány), viszont a Ca^{2+} által szabályozott esszenciális biológiai funkciók azt igénylik, hogy a Ca_v csatornák nagy mértékben szelektívek legyenek a Ca^{2+} -ra a Na^+ ellenében, még úgy is, hogy a Ca^{2+} és Na^+ közel azonos átmérővel rendelkezik ($\sim 2 \text{ \AA}$) (Tang és mtsai., 2014).

A csatorna 3 dimenziós térszerkezetét vizsgáló kutatások felderítették, hogy a hidratált Ca^{2+} kölcsönhatásba lép két nagy affinitású Ca^{2+} -kötőhellyel, és egy harmadik alacsonyabb affinitású hellyel, amelyek koordinálják/irányítják a Ca^{2+} -ot befelé történő mozgása során. A szelektivitási filter 'bejáratánál' az első nagy affinitású kötőhelyet 4 karboxil oldallánc alkotja, amelynek kritikus szerepe van a Ca^{2+} szelektivitás meghatározásában. További 4 karboxil-csoport és 4 strukturális vázat alkotó karbonil-csoport hozza létre a második nagy affinitású kötőhelyet, amely a csatornát gátló kationok (Cd^{2+} , Mn^{2+}) célpontja. Ezen kationok egyszerűen elfoglalhatják ezt a lényeges pozíciót a Ca^{2+} előtt. Az alacsonyabb affinitású

harmadik kötőhelyet pusztán 4 karbonil-csoport váza alakítja ki, amely a Ca^{2+} központi üreg felé való kijutását közvetíti. Ez a pórus architektúra egy olyan vezetési útvonalat feltételez, amely magába foglalja az átmenetet két fő állapot között egy vagy két Ca^{2+} ion kötődésével a szelektivitási filterben és az ion átlépés kilökődési (ún. knock-off) mechanizmusát támogatja egy lépcsőzetes kötődési folyamaton keresztül (Tang és mtsai., 2014).

A különféle Ca^{2+} csatornák eltérő biofizikai, fiziológiai és farmakológiai sajátságokkal rendelkeznek, amelyeket alapul véve alakult ki az eltérő Ca^{2+} áram típusok alfabetikus nevezéktana is (Tsien és mtsai., 1995). Az L-típusú kalciumáram jellegzetessége, hogy aktivációjához nagy depolarizáció szükséges, a létrejövő ionáram a többi kalciumáram típushoz képest nagy amplitúdójú és hosszan fennmarad. Továbbá szerves L-típusú Ca^{2+} csatorna antagonisták gátolják ezen csatornákat. Ide tartoznak a dihidropiridinek (ez alapján gyakran dihidropiridin receptorként említik őket), valamint a fenilalkilaminok és a benzotiazepinek. Izomszövetekben és endokrin sejtekben ez a legfőbb kalciumáram, ahol a kontrakció és szekréció megindulásában játszik szerepet. Alacsonyabb feszültségértékeken aktiválódó L-típusú Ca^{2+} áramokat is leírtak már, amelyek főként neuronokban és szív pacemaker sejtekben fordulnak elő. Az N-, a P/Q- és az R-típusú kalciumáram szintén nagy depolarizációt igényelnek az aktivációhoz. Ezek viszonylag érzéketlenek az L-típusú kalciumcsatorna antagonistá szerekre, de egyes csiga és pók mérgekben található specifikus polipeptid toxinok képesek gátolni azokat. Elsősorban neuronokban fordulnak elő, ahol a neurotranszmisszióban játszanak szerepet. A T-típusú kalciumcsatornákat már kismértékű depolarizáció is aktiválni képes és a csatorna megnyílása az L-típusú kalciumcsatornákhöz képest jóval rövidebb ideig tart (transziens). A T-típusú áramot létrehozó kalciumcsatornák rezisztensek mind a már említett organikus kalciumcsatorna gátlószerekre, mind az N- és P/Q-típusú kalciumáramok elkülönítésére használt csiga és pók toxinokra. A sejtípusok széles skáláján megtalálhatóak, részt vesznek az akciós potenciál kialakításában és a repetitív tüzelési mintázat szabályozásában (Catterall és mtsai., 2005b).

Az emlős Ca^{2+} csatorna α_1 alegységet legalább 10 különböző gén kódolja. Az elmúlt évtizedekben számos névvel illették a megfelelő gének termékeit, amely eltérő és néhol zavaros nevezéktanokhoz vezetett. 1994-ben egy egységes, bár önkényesen kialakított nevezéktant vezettek be, amely az α_1 alegységek osztályozásán alapult. Az α_{1S} az eredeti vázizom izoformát jelöli, míg α_{1A} -tól α_{1E} -ig pedig a felfedezés sorrendjében nevezték el az egyes izoformákat (Birnbaumer és mtsai., 1994). 2000-ben aztán a már jól definiált káliumcsatorna nevezéktant alapul véve egy racionálisabb nevezéktant alakítottak ki (Ertel és mtsai., 2000). Ennek megfelelően a Ca^{2+} csatornák elnevezésekor a legfontosabb áthaladó ion

kémiai jelét (Ca) használták a fő élettani szabályozó elem (voltage, vagyis feszültség) megjelöléssel (Ca_v). Az azonosító szám a Ca_v csatorna α_1 alegység gén alcsaládjának (jelenleg 1-től 3-ig) és az alcsaládon belül az α_1 alegység felfedezési sorrendjének (1-től n-ig) felel meg. Ezen nevezéktannak megfelelően a Ca_v1 alcsalád ($\text{Ca}_v1.1 - \text{Ca}_v1.4$) magában foglalja az α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} és α_{1F} alegységeket tartalmazó csatornákat, amelyek az L-típusú kalciumáramot hozzák létre. A Ca_v2 alcsaládhhoz ($\text{Ca}_v2.1 - \text{Ca}_v2.3$) tartoznak az α_{1A} , α_{1B} és α_{1E} alegységet tartalmazó csatornák, amelyek a P/Q-, az N- és az R-típusú Ca^{2+} áramokat közvetítik, döntően az idegi struktúrákon. A Ca_v3 alcsalád ($\text{Ca}_v3.1 - \text{Ca}_v3.3$) az α_{1G} -t, az α_{1H} -t és az α_{1I} -t tartalmazó csatornákból áll, amelyek a T-típusú Ca^{2+} áramokat hozzák létre (Catterall és mtsai., 2005b). Egészséges felnőtt emberek szívében a T-típusú Ca^{2+} áramot létrehozó csatornák csak a nodális, pitvari és Purkinje sejteken fejeződnek ki nagyobb mértékben (Rosati és mtsai., 2007; Grant, 2009).

Az α_1 alegységek teljes aminosav szekvenciája egy alcsaládon belül több mint 70 %-ban megegyezik, ugyanakkor a három alcsalád között kevesebb mint 40 %-os az egyezés mértéke. A kalciumcsatornák szétválása erre a három családra már a törzsfajlás egy korai szakaszában megtörténhetett, mivel egy fonálféreg faj, a *Caenorhabditis elegans* genomjában már mindháromnak a képviselője megtalálható. Következésképpen a különböző α_1 alegységek génjei jelentősen szétszóródtak az emlős fajok genomjában, még a család legközelebb álló tagjai sem kapcsolódnak egyazon kromoszómához (Catterall és mtsai., 2005b).

3.1.2. Az L-típusú Ca^{2+} áram szívműködéseken

Az L-típusú Ca^{2+} csatornák kamrai szívműködéseken főként a szarkolemmában találhatók, mégpedig legnagyobb számban a T-tubulusoknak a szarkoplazmatikus retikulum (SR) felé eső felszínén. A $\text{Ca}_v1.2$ csatornák megnyílása közvetítette Ca^{2+} beáramlás az SR-ből történő Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulási mechanizmus legfontosabb élettani kiváltó tényezője. Az $I_{\text{Ca,L}}$ fontos szerepet játszik az excitáció-kontrakció csatolásban, befolyásolja az akciós potenciál alakját és kóros működése szívritmuszavarok kialakulásához vezethet (Benitah és mtsai., 2010).

A L-típusú Ca^{2+} csatorna pórusformáló α_1 alegysége a szívműködésben proteolitikus hasításon megy keresztül az 1800-as alaninnál, amely során a csatorna C-terminális része lehasad. A disztális C-terminus autoinhibíciót fejt ki és csökkenti a feszültség-szenzor elmozdulása és a pórus nyitása közötti kapcsolat hatékonyságát, míg a hasítás növeli a $\text{Ca}_v1.2$ csatorna aktivitását (Crump és mtsai., 2013). Ráadásul a lehasadt C-terminus a Ca^{2+} csatorna

transzkripciójára is hatással van (Satin és mtsai., 2011). Ugyanakkor a lehasadt disztális C terminus azonban nem kovalensen kötött formában a csatornához asszociált marad és az A-kinase anchoring protein 15-tel (AKAP15) együtt egy jelátviteli komplexet képeznek, amely elengedhetetlen a $\text{Ca}_v1.2$ csatorna PKA-általi foszforiláción keresztül lejátszódó szabályozásához (Fuller és mtsai., 2010).

Ezen felül humán $\text{Ca}_v1.2$ csatornáknak legalább 40 hasítási (splice) változata létezik, amelyek számos jellemvonásban különböznek egymástól, úgymint az antagonistaezékenység, protein-kinázok általi szabályozás, áramdenzitás és kinetikai sajátságok (pl. az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggése) (Tang és mtsai., 2004).

Az L-típusú Ca^{2+} csatornákat -40 mV-nál pozitívabb feszültségértékek aktiválják, az áram 0 és $+10$ mV között éri el maximális amplitúdóját, tehát egy U alakú áram-feszültség összefüggéssel rendelkezik. Kinetikáját tekintve aktivációja gyors, inaktivációja viszonylag lassú. Az áram inaktivációjának időviszonyait egy gyors és egy lassú időkonstans összegeként lehet legjobban leírni. Az aktivációs időállandója nagyságrendileg $2-3$ ms, míg az inaktiváció gyors és lassú komponensének időállandói a 10 és a 100 ms-os tartományba esnek (Bers és Perez-Reyes, 1999). Az $I_{\text{Ca,L}}$ időfüggő inaktivációja mind Ca^{2+} -, mind feszültségfüggő. A Ca^{2+} -függő inaktiváció relatív hozzájárulása a teljes inaktivációhoz negatív feszültségértékeken nagyobb, ahol a feszültségfüggő inaktiváció mértéke csekély. β -adrenerg stimuláció során is a Ca^{2+} -függő inaktiváció válik a meghatározó mechanizmussá, egyrészt a megnövekvő szisztolés ic. Ca^{2+} koncentráció, másrészt a feszültségfüggő inaktiváció lassulása következtében (Findlay és mtsai., 2008). A Ca^{2+} -függő inaktiváció a Ca^{2+} belépés szabályozásában egyfajta negatív visszacsatolási folyamatként szolgál és ezáltal egy élettani védelmi mechanizmust képezhet a sejtek veszélyes Ca^{2+} -túltöltődése ellen. Ezt az inaktiváció típust a csatorna C-terminusához kihorgonyozott kalmodulin közvetíti egy klasszikus IQ doménen keresztül (Benitah és mtsai., 2010).

Szívizmokban az L-típusú Ca^{2+} áram amplitúdójának jellegzetes frekvenciafüggő változása (pozitív lépcső jelenség) a $\text{Ca}_v1.2$ β -alegység 498-as treoninjának Ca^{2+} -kalmodulin kináz II (CaMKII) által létrejövő foszforilációján keresztül valósul meg (Bers és Perez-Reyes, 1999).

Az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggése szigmoid görbével írható le, ahol az aktivációs tartomány -40 -tól $+10$ mV-ig terjed (a félaktivációs feszültség -15 mV), míg a félinaktivációs feszültség közel -35 mV. Ezen egyensúlyi feszültségfüggő aktivációs és inaktivációs összefüggések átfedése egy feszültségablakot határoz meg, amely az akciós potenciál plató fázisában mérhető feszültségértékekhez közel esik. Ekkor a nyitott és a zárt

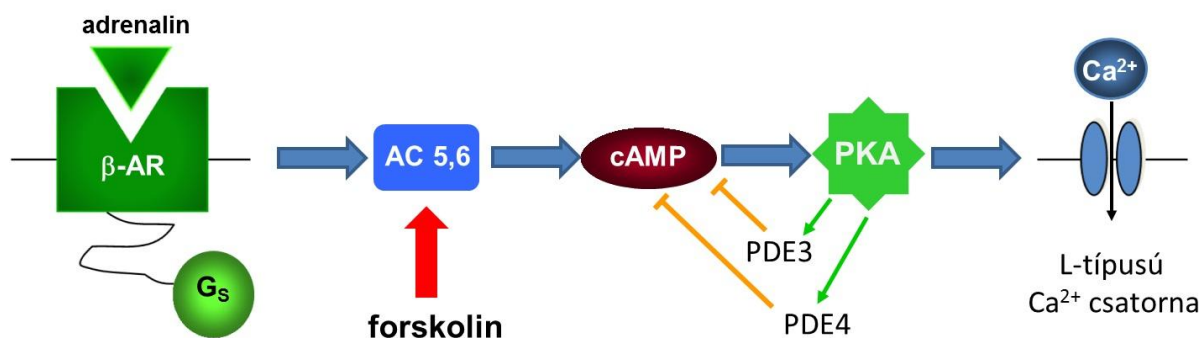
csatornaállapotok között átmenetek valósulhatnak meg, amely egyrészt az akciós potenciál repolarizációjában vehet részt (nyitott→zárt átmenet), másrészt központi szerepet tölthet be a korai utódepolarizációk (EAD) kialakulásában is (zárt→nyitott átmenet) (Benitah és mtsai., 2010).

A β -adrenerg stimuláció során fellépő protein-kináz A (PKA) által közvetített foszforiláció képezi az L-típusú Ca^{2+} csatorna fiziológias szabályozásának egyik fő mechanizmusát (2. ábra). Ennek során az áramsűrűség növekedése mellett az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ feszültségfüggésének negatívabb membránpotenciálok felé történő eltolódását találták (Farkas és mtsai., 2012).

Szívizomban a jelenleg ismert β -adrenerg receptorok mindegyikét kimutatták már, jóllehet a β_1 -receptorok szerepe tűnik a leginkább meghatározónak. A β_2 -receptorok aktiválása szintén növeli az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ot, míg a β_3 -receptorok szerepe kamrai szívműködéseken igen mérsékelt (Ruzsnavszky és mtsai., 2014). A β_1 -és β_2 -receptorok ligandkötése heterotrimer G_s fehérjéken keresztül adenilát-cikláz 5-ös és 6-os típusának aktiválását váltja ki, amely a cAMP szintjének emelkedéséhez, ezáltal protein-kináz A aktiváláshoz és csatorna foszforilációhoz vezet.

A kísérleti kutatások során gyakorta alkalmazásra kerülő forskolinról ismert, hogy tartósan aktiválja az adenilát-cikláz, amely a cAMP szint kifejezett emelkedését okozva a PKA-t serkenti, így alkalmazásával a maximális β -adrenerg stimulációhoz hasonló választ kapunk (Hartzell és Fischmeister, 1987).

A cAMP szint emelkedése azonban a PKA-n kívül más célfehérjék működését is képes befolyásolni. Ilyen fehérje például az EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP) (Bos, 2003). Az EPAC egy, a monomer G-fehérjék GTP kötését fokozó GEF (Guanine Nucleotide Exchange) fehérje, ami segíti a monomer G-fehérjék aktivációját. Az EPAC-nak eddig két izoformáját írták le, az EPAC1-et és EPAC2-t, amely közül a szívműködésben döntően az EPAC1 fordul elő (Kawasaki és mtsai., 1998). A sejten belül az EPAC fehérjék vagy a sejtmembránhoz kötötten, vagy a mikrotubulus rendszerhez asszociáltnak találhatók. A fő funkciójuk az R-Ras és Rap1/RhoA aktivációja, ezen keresztül a migrációban, a sejtpolaritás kialakításában, az integrinek működésében, így a sejtadhézióban és a sejtalak változtatásában vesznek részt. Az EPAC fehérjék ezen felül befolyásolhatják az excitációs-kontrakciós kapcsolatot, valamint az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázist is, mivel közvetlen aktiváló hatást fejtenek ki az SR rianodin receptorán és a SERCA pumpán is (Pereira és mtsai., 2007).



2. ábra: A β -adrenerg stimuláció során aktiválódó cAMP/PKA jelátviteli útvonal egyszerűsített vázlata. A szívizomsejtek membránjának β_1 -adrenerg receptorai az ún. 7-TM receptorok közé tartoznak, amelyek a ligand kötésekor G_s -fehérjéken keresztül adenilát-cikláz (AC) aktiválnak, így növelik a sejt cAMP szintjét. A cAMP közvetlen ioncsatorna hatásai mellett, protein kináz A-t (PKA) aktivál. A PKA membránkötött formában, vagy AKAP (A-kinase anchoring protein) segítségével a célmolekulájához asszociáltan található, így tudja azt specifikusan foszforilálni. A cAMP elbomlását, így PKA aktivitásának megszűnését a sejt foszfodiészteráz (PDE) molekulái biztosítják.

A PKA-függő foszforilációs szignált végül a konstitutívan jelen lévő, illetve ekkor méginkább aktiválódó foszfodiészterázok (PDE3, PDE4) állítják le, a cAMP szint csökkentésével (Hove-Madsen és mtsai., 1996).

Meg kell jegyezni azonban, hogy a β -adrenerg receptorok tartós stimulációja az akut hatásoktól eltérő funkcionális következményekkel bír. A fenntartott β -adrenerg aktiváció a receptorok internalizációját váltja ki, amely folyamatban a β -arrestin és különböző G fehérjéhez kapcsolt kinázok közvetítik ezen makromolekuláris receptor komplex klatrin borítású vezikulákba történő csomagolását (Benitah és mtsai., 2010).

A $Ca_v1.2$ csatorna bazális aktivitását az 1700-as pozícióban lévő szerinnek a PKA-n keresztüli és az 1704-es treoninnek a kazein kináz II általi foszforilációja szabályozza. Azonban a β -adrenerg aktiváció során a csatorna aktivitását döntően a 1700-as szerin PKA-n keresztüli foszforilációja befolyásolja (Fuller és mtsai., 2010). Jóllehet a 1928-as szerin foszforilációját is leírták már β -adrenerg stimulációt követően, de ennek közvetlen csatorna-aktiváló szerepét eddig nem sikerült bizonyítani (Ganesan és mtsai., 2006). További lehetséges foszforilációs helyeket is azonosítottak már az α_{1C} alegységen, mégpedig az N-terminális 124-es szerin és C-terminális 1575, 1627 és 1848-as pozíciókban elhelyezkedő aminosavakon, de szerepüket eddig nem sikerült igazolni (van der Heyden és mtsai., 2005). Az L-típusú Ca^{2+} csatorna β_2 -alegység PKA-közvetített foszforilációját is leírták már, mégpedig a 459-es, 478-as és 479-es pozíciójú szerin aminosavakon, amelyek közül az utóbbi kettő szerepe tűnik meghatározónak (Gerhardstein és mtsai., 1999). A további alegységeken,

például az $\alpha_2\delta$ -n ugyanakkor eddig még nem mutattak ki foszforilációs változásokat (Kamp és Hell, 2000).

Az L-típusú Ca^{2+} áram tulajdonságai acidózis hatására jelentős változásokon mennek keresztül. A pH csökkenésének hatása az L-típusú Ca^{2+} áramra azért is bír kiemelt jelentőséggel, mivel számos kórállapotban (pl. szívizom ischaemia és reperfúzió esetén) kialakuló szívritmuszavarok egyik fontos tényezője az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ megváltozása (Said és mtsai., 2011).

Az intra- és extracelluláris pH változása komplex hatást fejt a szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisára. Az extracelluláris acidózis kismértékben csökkenti az SR Ca^{2+} tartalmát, míg az intracelluláris és kombinált acidózis növeli azt. Az extracelluláris acidózis majd minden feszültségértéken csökkenti az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóját, valamint az áram-feszültség összefüggést a feszültség tengely mentén jobbra tolja. Ezzel szemben az intracelluláris acidózis az áram-feszültség görbét balra tolja el, 0 mV-nál negatívabb feszültségértékeken növeli az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ot, míg pozitív feszültségértékeken csökkenti azt. Kombinált acidózis hatására az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ amplitúdója 0 mV alatt a kontrollnak megfelelő, míg pozitívabb membránpotenciáloknál a kontroll alatt marad (Saegusa és mtsai., 2011).

Az extracelluláris acidózis az aktiváció és inaktiváció feszültségfüggésének értékeit egyaránt jobbra tolja el. Ezzel szemben az intracelluláris acidózis mindkét görbét balra tolja. A kombinált acidózis azonban nem befolyásolja ezen paramétereket. Az extracelluláris acidózis kismértékben felgyorsítja az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ inaktivációját, azonban ez a statisztikai szignifikanciát csak a pozitívabb feszültségértékek esetén éri el. Ezzel szemben az intracelluláris és kombinált acidózis szinte minden feszültségértéken lassítja az inaktivációt (Saegusa és mtsai., 2011).

3.1.3. Az L-típusú Ca^{2+} csatornák molekuláris farmakológiája

A Ca_v1 csatornák a kardiovaszkuláris betegségekben széleskörűen alkalmazott szerves Ca^{2+} csatorna gátlók molekuláris célpontjai. Ezekről a szerekről úgy tudjuk, hogy három különböző, de alloszterikusan kapcsolt receptor helyen fejtik ki hatásukat. A fenilalkilaminok intracelluláris pórus gátlók, mégpedig a L-típusú Ca^{2+} csatorna citoplazma felőli oldalán lépnek be a pórusba. A fenilalkilaminok receptor helyét a III-as és IV-es domén S6 szegmenseinek aminosav oldalláncai alakítják ki, amely szoros analógiát mutat a helyi érzéstelenítők receptor helyével a nátriumcsatornákon (Hockerman és mtsai., 1997). A dihidropiridinek képesek a csatornát mind aktiválni, mind pedig gátolni, ezért úgy

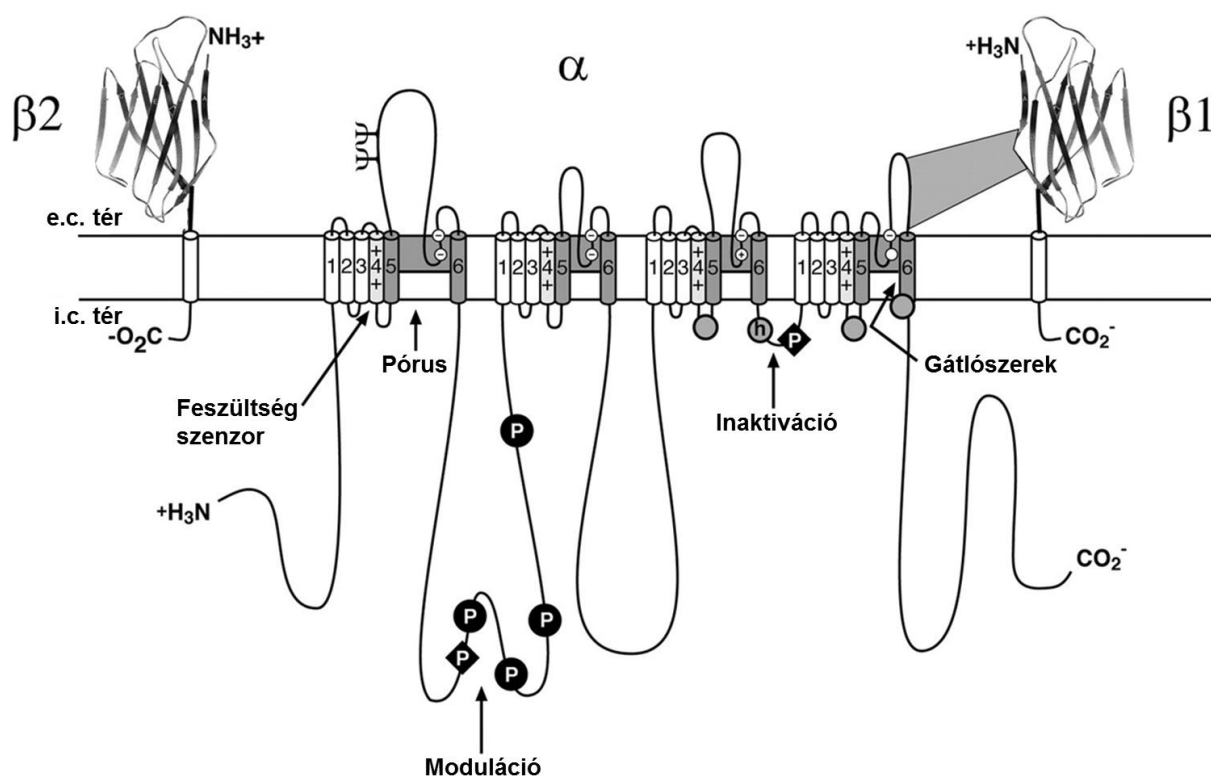
gondolják, hogy hatásukat a csatorna állapotát alloszterikusan a nyitott vagy zárt állapot felé eltolva fejtik ki, mintsem hogy a pórust tömítenék el. A dihidropiridinek receptorának helyét a III-as és IV-es domén S6 szegmenseinek és a III-as domén S5 szegmensének aminosav oldalláncai alkotják. Valószínűleg ezek az aminosavak a nagy affinitású dihidropiridin kötésért felelősek (Catterall és mtsai, 2005b). Gátló hatású dihidropiridinek esetén feltehetően ezek felelősek az inaktivált csatorna gátlásáért (Sanguinetti és Kass, 1984), míg az I. domén S6 szegmense a dihidropiridinekkel való alacsony affinitású kölcsönhatással áll kapcsolatban, amely a nyugalmi állapotban megfigyelhető gátlást eredményezi (Welling és mtsai., 1997). Azonban a szívizom és a simaizom L-típusú Ca^{2+} csatornák közötti dihidropiridinek iránti érzékenységbeli különbségek – legalábbis részben – az α_{1C} gén expressziója során az I-es doménben található transzmembrán S6 szegmensének szövetspecifikus alternatív hasításával magyarázhatóak. A dihidropiridinek szívizom α_{1C} -n nem mutatnak nyugalmi állapotú gátlást, viszont kifejezetten gátolják a csatorna inaktivációból való visszatérését. Ellenben a vaszkuláris simaizom α_{1C} alegysége a dihidropiridinek alacsonyabb koncentrációjával frekvenciafüggetlen módon gátolható, amely azt sugallja, hogy a szer nem kizárólag csak az inaktivált csatornához tud kötődni (Welling és mtsai., 1997). A dihidropiridin receptorhely szorosan a fenilalkilamin receptorhely mellett helyezkedik el, és néhány közös aminosav oldalláncon osztoznak is. A diltiazemről és egyéb rokon benzotiazepinekről úgy tudjuk, hogy egy harmadik receptorhelyhez kötődnek, viszont a kötődésükhöz szükséges aminosav oldalláncok alaposan átfednek a fenilalkilaminok kötődéséhez szükségesekkel (Hofmann és mtsai., 1999). A fenilalkilaminok és a benzotiazepinek a nyitott és inaktivált állapotú Ca^{2+} csatornához képesek kötődni, így kifejezett használatfüggő (use-dependens) gátlást okoznak (Lee és Tsien, 1983; Grant, 2009).

3.2. Feszültségfüggő Na^+ csatornák

A feszültségfüggő nátriumcsatorna család 9 tagját jellemezték eddig emlősökben ($\text{Na}_v1.1 - \text{Na}_v1.9$), a 10. tagról pedig felismerték már, hogy az valójában egy kapcsoló fehérje. Ezek a különféle nátriumcsatornák hasonló szerkezeti és funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek, de különböző sejttípusokban váltanak ki akciós potenciált, továbbá eltérő szabályozó és farmakológiai sajátosságokkal bírnak (Catterall és mtsai., 2005a).

3.2.1. Feszültségfüggő Na^+ csatornák felépítése, típusai

A nátriumcsatornák egy jelentős poszttranszlációs módosuláson áteső, hozzávetőlegesen 260 kDa nagyságú α alegységet tartalmaznak, amely járulékos β alegységekkel asszociál (3. ábra). A Na^+ csatornák a felnőttek központi idegrendszerében és szívében $\beta_1 - \beta_4$ alegységeket tartalmaznak, míg a felnőtt vázizomban csak a β_1 alegység fordul elő. A pórusformáló α alegység elegendő a csatorna funkcionális kifejeződéséhez, ám a csatorna kapuzásának kinetikáját, feszültségfüggését és expresszióját a β alegységek képesek módosítani. A járulékos alegységek szerepet játszanak a csatorna lokalizációjában is, sőt kölcsönhatásba lépnek a sejtadhéziós molekulákkal, az extracelluláris mátrixszal és az intracelluláris citoszkeletonnal is. Az α alegységek 4 homológ doménből (I-IV) épülnek fel, amelyek mindegyike 6 transzmembrán α hélixet tartalmaz (S1-S6) és egy további pórus hurkot az S5 és S6 szegmensek között. A pórus hurkok a pórus külső, szűk bemeneténél húzódnak, míg az S5 és S6 szegmensek a pórus belső, szélesebb kijáratánál helyezkednek el. Minden doménben az S5 és S6 transzmembrán szegmensek közötti pórusformáló hurok határozza meg az ionszelektivitást és konduktanciát. Ismert, hogy mindössze 3 aminosav cseréje a pórusformáló hurok területén az I-es, III-as és IV-es doménben a nátriumcsatornát kalciumra szelektívvé változtatja (Heinemann és mtsai., 1992). A III-as doménben egy lizin aminosav pedig a K^+ -mal szembeni Na^+ szelektivitásért felel (Grant, 2009). A szelektivitási filtert kialakító aminosav szekvencia aszpartát-glutamát-lizin-alanin (ún. DEKA gyűrű) a Na^+ csatornák esetén (Heinemann és mtsai., 1994). Az S5 és S6 szegmensek közötti P-hurok felszálló szára a szelektivitási filtertől 3 vagy 4 pozíció távolságra szintén tartalmaz karboxil-oldalláncokat, amelyek kölcsönhatásba léphetnek a csatorna működését módosító szerekkel (pl. a TTX-nal vagy a μ -conotoxinnal) (Tikhonov és Zhorov, 2011). A szelektivitási filter és a környező terület számos, egymástól egészen eltérő faj esetén is kivételesen konzervált aminosavakat tartalmaz, a régió csatornafunkcióban betöltött kritikus szerepét hangsúlyozva (Tikhonov és Zhorov, 2011). Az S4 szegmensek minden egyes doménben minden harmadik pozícióban pozitívan töltött aminosavakat tartalmaznak. Ezek az aminosavak kapuzási töltésként szolgálnak és a csatorna aktivációját közvetítik a membrán depolarizációra adott válaszként. A III-as és IV-es homológ domént összekötő rövid intracelluláris hurok inaktivációs kapuként működik, belehajlik a csatorna struktúrájába és fenntartott membránde polarizáció során belülről blokkolja a pórust (Catterall és mtsai., 2005a).



3. ábra: A feszültségfüggő Na^+ csatornák szerkezete. Catterall és mtsai. közleménye alapján (2005a), módosítva.

A feszültségfüggő Na^+ csatornák családja emlősökben kilenc különböző α alegységet tartalmaz (Catterall, 2005a). Na^+ csatorna géneket négy kromoszómán is találunk, és ezek homoeobox (Hox) gén klaszterekhez kapcsolódnak (Lopreato és mtsai., 2001). A leginkább elfogadott feltételezés szerint egy közös ősrünknek négy különböző feszültségfüggő Na^+ csatornája volt, amely szám az egymás utáni gén duplikációk során kilencre emelkedett (Haverinen és mtsai., 2007). A $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ és $\text{Na}_v1.7$ csatornák a leginkább hasonlóak egymáshoz szekvencia homológia tekintetében, ezek jelentősen tetrodotoxin-érzékenyek (nanomólos koncentrációjú TTX már gátolja őket) és neuronokon kiterjedten expresszálódnak. A génjeik egyaránt a humán 2q23-24 kromoszóma régióban helyezkednek el, a közös evolúciós eredetnek megfelelően. A $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ és $\text{Na}_v1.9$ szintén közeli kapcsolatban áll egymással, és az aminosav szekvenciájuk több mint 60%-ban megegyezik a 2-es kromoszómán kódolt 4 nátriumcsatornáéval. Ezek a nátriumcsatornák változó fokban tetrodotoxin-rezisztensek (esetükben a TTX IC_{50} értéke $>1 \mu\text{M}$) az aminosav szekvenciájukban bekövetkező egyetlen aminosav cseréje következtében az I-es doménben. A szívben valamint a hátsó gyöki ganglionok neuronjaiban fejeződnek ki ezen csatornák jelentős mértékben (Fozzard és Hanck., 1996, Vornanen és mtsai., 2011). Génjeik a humán 3p21-24 kromoszóma régióban találhatóak, amely egybevág a közös evolúciós eredettel.

A tengeri guanidin csoportot tartalmazó toxinok iránti alacsony affinitás a csatorna szelektivitási filterének felépítésében részt vevő és a környező területeken lévő, TTX kötésért felelős aminosavakban bekövetkező mutációk következménye. (Geffeney és mtsai., 2005). A legjellegzetesebb tényező egy aromás aminosav cseréje az I-es doménban szerinre vagy ciszteinre a szív fő Na^+ csatorna típusában ($\text{Na}_v1.5$) a TTX-érzékeny Na^+ csatorna típusokhoz képest (Satin és mtsai., 1992). A $\text{Na}_v1.4$ izoforma, amely főleg a vázizomban fejeződik ki, és a főként központi idegrendszerben expresszáldó $\text{Na}_v1.6$ elkülönül a nátriumcsatorna gének két közeli rokonságban lévő csoportjától. Ez utóbbi két Na^+ csatorna génje a 17q23-25, illetve a 12q13 kromoszóma régióban helyezkedik el (Catterall és mtsai., 2005a).

3.2.2. A Na^+ áram jellemzői szívizomsejteken

Az akciós potenciál kialakulása során a feszültségfüggő Na^+ csatornák megnyílása Na^+ beáramláshoz és további depolarizációhoz vezet (Hodgkin-ciklus, pozitív visszacsatolási mechanizmus). Ezt követően a membrán depolarizációja a Na^+ csatornák gyors, feszültségfüggő inaktivációját előidézve kikapcsolja ezt az önerősítő kört és gyakorlatilag nullára csökkenti a csatorna áramát. Ennek során egy tranziens, nagy amplitúdójú Na^+ áramot ($I_{\text{Na,T}}$) figyelhetünk meg, amely a kamrai szívizomsejteken főként az akciós potenciál felszálló száráért, illetve az ingerületvezető rendszerben az akciós potenciál tovaterjedéséért felelős. Azonban a szívizomsejtek Na^+ áramának egy másik komponensét is leírták már, amely az akciós potenciál teljes hossza alatt megfigyelhető, és mivel a tranziens áramot követi, ezért késői Na^+ áramnak (late I_{Na} , továbbiakban $I_{\text{Na,L}}$) nevezték el (Moreno és Clancy, 2012). Jóllehet ezen késői komponens amplitúdója elenyészőnek tűnik a gyors komponenséhez képest (a $I_{\text{Na,T}}$ kevesebb mint 1 %-a a $I_{\text{Na,L}}$ amplitúdója), mivel az akciós potenciál relatíve alacsony konduktanciával jellemezhető plató fázisa alatt végig jelen van, nagyban hozzájárul az akciós potenciál időtartamának és plató magasságának kialakításához (Coraboeuf és mtsai., 1979; Maltsev és Undrovinas, 2006). Az is leírásra került már, hogy ezen áramok eltérő időbeli fennállása következtében a $I_{\text{Na,L}}$ közel ugyanakkora nettó töltésmennyiség szállítását végzi, mint a $I_{\text{Na,T}}$, tehát a szívizomsejtek Na^+ homeosztázisában is jelentős szereppel bír (Noble és Noble, 2006). Továbbá a késői Na^+ áram nagyságának növekedéséről számoltak be számos kórállapotban, mint pl. szívelégtelenségben (Valdivia és mtsai., 2005), szívizom infarktust követően (Huang és mtsai., 2001), veleszületett hosszú QT-szindróma 3-as típusában (Ruan és mtsai., 2009) és Brugada-szindrómában is (Bébarová, 2013). A megnövekedett $I_{\text{Na,L}}$ egyrészt megváltoztatja a szívizomsejtek Na^+ homeosztázisát (Zaza és

Rocchetti, 2013), másrészt megzavarja a normál repolarizáció folyamatát és szívritmuszavarok kialakulásához vezethet (Horvath és mtsai., 2013).

A késői nátriumáram létrejöttének leírására többféle magyarázat is született:

1, Az aktiváció és inaktiváció feszültségfüggésének átfedéséből eredő áram (window current)
Létezik a szívizom feszültségfüggő Na^+ csatornák esetén egy olyan feszültségtartomány, ahol az áram egyensúlyi (steady-state) aktivációs és inaktivációs görbéje átfed egymással, vagyis a korábbiakban inaktivációt szenvedett csatornák reaktiválódhatnak és újból megnyílhatnak (Zaza és mtsai., 2008).

2, Különböző kapuzási módok jelenléte

Kamrai szívizomsejteken Maltsev és Udovinas (2006) a Na^+ áram 3 különböző fázisát különítette el: egy korai (tranziens), egy átmeneti és egy késői áramot. Továbbá három különböző kapuzási módot is regisztráltak: átmeneti (tranziens), robbanásszerű (burst) és késői szórványos (late scattered) megnyílást. A Na^+ áram időbeli megjelenésének legkorábbi fázisa (<40 ms) során mindhárom kapuzási mód érintett, míg az átmeneti fázisban (40-300 ms) csak a késői szórványos és a robbanásszerű megnyílási módok vesznek részt. Az átmeneti fázisban az áram nagysága fordított arányban áll a depolarizáció és kisülés mértékével. Végül az áram késői (>300 ms) fázisában már csak a késői szórványos megnyílási mód játszik szerepet. Megjegyzendő azonban, hogy ezek a mérések szobahőmérsékleten történtek. Clancy és mtsai. (2002) megerősítették az eltérő kapuzási módok kórélettani szerepét és kimutatták, hogy a robbanásszerű megnyílási mód lehet felelős a $I_{\text{Na,L}}$ létrejöttéért.

3, Nem-egyensúlyi kapuzási mód (non-equilibrium gating)

A csatorna állapotok közötti átmeneteket befolyásolja, hogy a csatorna milyen feszültségértékeknek volt korábban kitéve (Clancy és mtsai., 2003). Vagyis a Na^+ csatorna inaktivációból való visszatérését módosítja az akciós potenciál alatt dinamikusán változó feszültségérték. A kísérleti eredmények alátámasztják, hogy a $I_{\text{Na,L}}$ nagyobb amikor egy repolarizáló feszültség rámpával vagy egy akciós potenciál alakú feszültségparanccsal váltjuk ki, mint amikor hagyományos négyszögpulzusokat vagy modell szimulációkat alkalmazunk (Clancy és mtsai., 2003; Magyar és mtsai., 2004; Horvath és mtsai., 2013).

4, A $\text{Na}_v1.5$ -től eltérő nátriumcsatornák jelenléte a szívizomban

Biet és mtsai. (2012) vizsgálatukban azt találták, hogy a nem $\text{Na}_v1.5$ típusú feszültségfüggő Na^+ csatornák hozzájárulása a $I_{\text{Na,L}}$ -hez 44 %. Míg Yang és mtsai. (2012) arról számoltak be, hogy a $\text{Na}_v1.8$ a késői nátriumáram 38 %-át teszi ki.

5, Különböző fiziológias modulátorok (Ca^{2+} , kalmodulin, foszforiláció, reaktív oxigéngyökök) megváltoztatják a kapuzást

Korábban megállapították, hogy a reaktív oxigéngyökök termelése és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése a Ca^{2+} -kalmodulin kináz II aktiválásán keresztül a $I_{\text{Na,L}}$ növekedését képes előidézni (Zaza és Rocchetti, 2013).

Mindezen mechanizmusok együttesen is jelen lehetnek és hozzájárulhatnak a nátriumáram akciós potenciál alatti lefutásának kialakításához. Az $I_{\text{Na,L}}$ farmakológiai befolyásolhatósága a $\text{Na}_v1.5$ -höz hasonló, a STX és a TTX gátlása egy kötőhely meglétét feltételezi a $\text{Na}_v1.5$ -re jellemző affinitással, és érzékeny a Cd^{2+} -ra (ez jellegzetes a szívizom Na^+ csatorna izoformára, de a neuronálisakra nem). Végül az SCN5A gén csendesítése siRNS-sel 75%-kal csökkentette a $I_{\text{Na,L}}$ -t, szignifikánsan rövidítette az APD-t és csökkentette annak variabilitását kutya szívelégtelenség modellekben. Ennélfogva ezek a bizonyítékok arra utalnak, hogy valószínűleg a $\text{Na}_v1.5$ a $I_{\text{Na,L}}$ fő meghatározója mind egészséges és mind szívelégtelen kamrai kardiomiocitákban (Maltsev és Udovinas, 2006). Ugyanakkor a különböző kapuzási módok gátlószér érzékenysége eltérő lehet, és a I_{Na} multimodális összetétele lehetővé teszi az adott kapuzási módra specifikus farmakológiai befolyásolást (McNulty és Hanck, 2004; Moreno és Clancy, 2012).

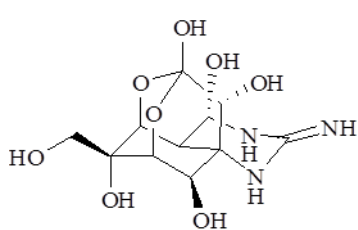
3.2.3. A Na^+ csatornák molekuláris farmakológiája

Az eddig azonosított összes feszültségfüggő Na^+ csatornára ható farmakológiai ágensnek az α alegységen van a receptora. A neurotoxinoknak legalább 6 különböző receptor helyét azonosították már, míg a lokálanesztikumoknak és a hozzájuk kapcsolódó szereknek további egyet (Catterall és mtsai., 2005a). Az 1-es neurotoxin receptorhely a nem peptid szerkezetű pórusblokkoló tetrodotoxint és saxitoxint, valamint a pórusblokkoló peptid μ -conotoxint köti. Ezeknek a toxinoknak a receptorhelyét a pórus hurkokban és a pórus külső részén, közvetlenül a pórushurkok extracelluláris oldalán elhelyezkedő aminosavak alakítják ki (Fozzard és Hanck, 1996). A 2-es neurotoxin receptorhely a lipidoldékony toxinok egy családját köti, ide tartozik pl. a batrachotoxin, a veratridin, az akonitin és a grayanotoxin, amelyek serkentik a nátriumcsatornák aktivációját. A fotoaffinitás jelölés és a mutagenézis vizsgálatok a batrachotoxin receptorhelye tekintetében az I-es és IV-es domén S6 transzmembrán szegmenseinek érintettségét jelzik (Cestèle és Catterall, 2000). A 3-as neurotoxin receptorhely az α -skorpiótoxinokat és a tengeri csalánozók (sea anemone) toxinokat köti, amelyek lassítják a nátriumcsatornák aktivációból inaktivációba történő

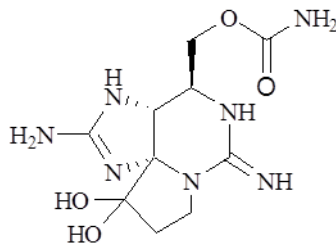
átmenetét. Ezek a peptid toxinok egy összetett receptorhelyhez kötődnek, amely tartalmazza az S3-S4 hurkot a IV-es domén S4 szegmensének extracelluláris végén. A 4-es neurotoxin kötőhely a β -skorpiótoxinokat köti, amelyek a csatorna aktivációját serkentik. A β -skorpiótoxinok receptorhelye magában foglalja a II-es domén feszültségérzékelő S4 szegmensének extracelluláris végén lévő S3-S4 hurkot. Az 5-ös neurotoxin receptorhely az összetett poliéter toxinokat, mint a brevetoxint és a ciguatoxint köti, amelyeket a dinoflagelláták termelnek és a meleg óceánok vizének toxikus vörös szökőárját okozzák. A 6-os neurotoxin receptorhely a δ -conotoxinokat köti, amelyek az α -skorpió toxinokhoz hasonlóan lassítják az inaktiváció ütemét (Cestèle és Catterall, 2000), ugyanakkor ezen receptor elhelyezkedése még nem ismert. Végül a helyi érzéstelenítők és a rokon antiepileptikumok, valamint a Vaughan Williams (1984) klasszifikáció szerinti I. osztályú antiaritmiás szerek a nátriumcsatorna pórusának belső üregében elhelyezkedő átfedő receptorhelyhez kötődnek. A négy doménből legalább három S6 szegmensének aminosavai is hozzájárulnak ehhez a komplex kötőhely kialakításához, amelyben a domináns szerepet a IV-es domén S6 szegmens játssza (Catterall, 2000; Scholz, 2002). Egy egész csapatnyi aminosav oldallánc érintettségét leírták már az előbb említett szerek kötődésében a III-as és IV-es domén S6 szegmenséhez, többek között a IV-es domén F1759 és Y1766 és a III-as domén L1461 aminosavai vesznek részt ebben (a Na_v1.5 számozás alapján), amelyek közül különösen a fenilalanin tűnik létfontosságúnak (Sheets és mtsai., 2010). Ezek közül két aminosav oldallánccról erősítették meg, hogy jelentős fontosságú a helyi érzéstelenítők és a batrachotoxin kötésében (a IV-es domén fenilalaninja és tirozinja), és egy további aminosav (aszparagin) bír kitüntetett szereppel a IV-es domén S6 szegmensének 406. pozíciójában (Wasserstrom és mtsai., 1993; Xiao és mtsai., 2001). Ugyanakkor pl. a lidokain közel 30%-a található töltetlen formában fiziológiás pH érték mellett, szemben pl. a flekainiddal (amelynek csupán kb. 1%-a töltetlen). Ennek következtében a flekainid a kötőhelyet inkább a csatorna nyitott állapotában tudja megközelíteni, míg a lidokain sokkal könnyebben belép a zárt állapotú csatornába (Sunami és mtsai., 1991; Sheets és mtsai., 2010).

3.3. A tetrodotoxin és saxitoxin hatása a feszültségfüggő Na⁺ csatornákon

A guanidin csoportot tartalmazó tengeri toxinokat, mint pl. a tetrodotoxint és a saxitoxint (STX) széleskörűen használják a gyors Na⁺ csatornák gátlására a kísérleti kutatásokban. Kémiai szerkezetük a 4. ábrán látható. A feszültségfüggő Na⁺ csatornák szinte minden altípusát kimutatták már az emlős szív különböző régióiban, jóllehet az emlős kamrai miokardiumban túlnyomórészt a Na_v1.5 altípus van jelen (Haufe és mtsai., 2007). A vázizommal és idegszövettel ellentétben, ahol a fő feszültségfüggő Na⁺ csatorna altípusok TTX-érzékenyek (nanomólos nagyságrendű a IC₅₀ értéke), a Na_v1.5 csatorna viszonylag rezisztens a TTX-ra (mikromólos nagyságrendű a IC₅₀ értéke) (Catterall és mtsai., 2005a; Zimmer, 2010; Andavan és Lemmens-Gruber, 2011). Az előbb említett TTX-érzékenységbeli különbségek következtében, közel százszor vagy ezerszer magasabb koncentrációjú TTX-ra vagy STX-ra van szükség a szív gyors Na⁺ csatornájának gátlására, mint vázizom vagy idegi preparátumok esetében. Számos vizsgálat számolt már be azonban a Ca²⁺-áram egy TTX vagy STX által gátolható részéről ((I_{Ca}(TTX) és I_{Ca}(STX)) is, amikor a toxinokat ilyen magas (mikromólos) koncentrációban alkalmazták (bővebben lásd a 3.4. fejezetben).



tetrodotoxin



saxitoxin

4. ábra: A tetrodotoxin és a saxitoxin szerkezeti képlete.

Tetrodotoxin: [4R-(4 α ,4 α ,5 α ,7 α ,9 α ,10 α ,10 α ,11S*,12S*)]-octahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9:7,10a-dimethano-10aH-[1,3]dioxocino[6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol.

Saxitoxin: (3aS-(3a- α ,4- α ,10aR*)))-2,6-diamino-4-(((amino-carbonyl)oxy)methyl)-3a,4,8,9-tetrahydro-1H,10H-pyrrolo(1,2-c)purine-10,10-diol.

Továbbá jelentős fajfüggő különbségek is megfigyelhetők a TTX-érzékenységekben, pl. a Na_v1.4 csatornán (vázizomra jellemző fő altípus) a TTX IC₅₀ értéke patkányban 5 nM-os (Trimmer és mtsai., 1989), emberben viszont 25 nM-os (Chahine és mtsai., 1994), míg a Na_v1.5 csatornán a TTX IC₅₀ értéke emberben megközelítőleg 1 μ M (Satin és mtsai., 1992), és 0,5-től 6 μ M-ig terjedően változik kutya szívben az egyes tanulmányok által közölt érték (Baer és mtsai., 1976; Brown és mtsai., 1981).

A STX esetében meghatározott IC_{50} érték idegi Na^+ csatornákon kevesebb, mint 20 nM, vázizom Na^+ csatornán 4,1 nM (Penzotti és mtsai., 2001), míg a szívizom Na^+ csatornán mikromólos nagyságrendű (Gellens és mtsai., 1992; Hille, 2001). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a nagyobb emlősök szívének TTX- és STX-érzékenysége még kisebb, mint a rágcsáló fajoké.

A tetrodotoxin és a saxitoxin a guanidin csoportjuk következtében fiziológiás pH mellett pozitív töltésűek (Fozzard és Lipkind, 2010). Hille (2001) leírása alapján a TTX és a STX 1:1 sztöchiometriával kötődik a Na^+ csatornához, a kötődés a csatorna külső csarnokában történik és a csatorna pórusának teljes záródását okozza. Lipkind és Fozzard (1994) kimutatták, hogy a guanidin csoport és két hidroxil csoport (C9- és C10-helyzetben) játszik szerepet a TTX megkötésében sóhidak és hidrogénkötések kialakításával a Na^+ csatorna pórusánában a D384, az E387, az E942 és az E945 pozíciókban lévő aminosavak karboxil csoportjaival (az rBrII számozási rendszernek megfelelően). Az összes TTX-érzékeny Na^+ csatorna altípusban (úgy mint az agyi és a vázizom Na_v csatornák) egy további hidrofób kölcsönhatás jön létre a fenilalanin vagy a tirozin aromás gyűrűje következtében, amely hiányzik a szív izoformánál ($Na_v1.5$), ahol ezt a helyet egy cisztein tölti be. Ez a tirozin vagy fenilalanin aromás gyűrű π -kationos kölcsönhatást alakít ki TTX guanidin csoportjával, amely stabilizálja a kötődést a TTX-érzékeny Na^+ csatornában (Tikhonov és Zhorov, 2011). A STX Na_v csatornához való kötődésének legkritikusabb meghatározói feltételezhetően a 7,8,9-guanidin csoport és két C12-es pozíciójú hidroxil csoport, míg a STX másik 1,2,3-guanidin csoportja egy további kölcsönhatást hozhat létre a IV-es domén D1717 karboxiljával (Favre és mtsai., 1995).

3.4. Áttekintés az eddig leírt tetrodotoxin-érzékeny Ca^{2+} áramokról

TTX-érzékeny Ca^{2+} áram komponensét számos fajban leírtak már, többek között szívárványos pisztráng (Haverinen és mtsai., 2007), egér (Su és mtsai., 2004), patkány (Aggarwal és mtsai., 1997; Chen-Izu és mtsai., 2001; Alvarez és mtsai., 2004), tengerimalac (Heubach és mtsai., 2000), kutya (Sun és mtsai., 2008) és emberi (Gaughan és mtsai., 1999; Lemaire és mtsai., 1995) szívizomsejtekben is. Továbbá heterológ transzfektált sejtekben is kimutatták már: *Xenopus laevis* oocitákban expresszált humán $Na_v1.5$ α - és β_2/α_1 -alegységek esetén (Alvarez és mtsai., 2004), HEK-293 sejtekbe kotranszfektált szív Na^+ csatorna (SCN5A) α - és β_1 -, valamint β_2 -alegységek esetén (Guatimosim és mtsai., 2001) és az L-

típusú Ca^{2+} csatorna három alegységével (nyúl α_{1C} , patkány β_{2a} és α_2/δ) (Su és mtsai., 2004) vagy három T-típusú Ca^{2+} csatorna alegységgel (hCa_v3.1, hCa_v3.2 és hCa_v3.3) (Sun és mtsai., 2008) tranziensen kotranszfektált tsA-201 sejtekben. A tengeri toxinok szívre kifejtett hatásait összefoglaló közleményeken (Balke és mtsai., 1998; Nargeot, 2000; Zimmer, 2010) kívül a TTX-érzékeny Ca^{2+} áram jelenlétét idegi preparátumokon is régen leírták már, mint pl. tintahal óriás axonon (Watanabe és mtsai., 1967; Baker és mtsai., 1971; Meves és Vogel, 1973) és a patkányok hippocampális CA1 régiójának sejtjein (Akaike és Takahashi, 1992). Egészen az utóbbi évekig a ciklikus guanidin csoporttal rendelkező tengeri toxinokat a feszültségfüggő Na^+ csatornák legszelektívebb gátlószereinek tekintették. Habár a TTX-által gátolható Ca^{2+} áramot már sok évvel ezelőtt felismerték, azt gondolták, hogy feltehetően Na^+ csatornák közvetítik azt. A tetrodotoxinnal gátolható kalciumáram eredete még most sem teljesen világos, azonban 2 alternatív elmélet alakult ki a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ eredetének magyarázatára. Ennek megfelelően (1) a klasszikus gyors Na^+ csatornák kapuzási tulajdonságai változnak meg speciális körülmények között az ionszelektivitás csökkenését eredményezve, vagy (2) a Na^+ csatornák egy külön populációját feltételezi már fiziológias körülmények között is bizonyos fajokban. Annak a ténye, hogy a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ már fiziológias ionkörnyezetben is kimutatható volt (Aggarwal és mtsai., 1997; Chen-Izu és mtsai., 2001) a második magyarázattal van összhangban, bár ezen ellentmondások mezején nehéz kiigazodni.

Az első lehetőséget tekintve arra lehet következtetni, hogy a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ csak speciális körülmények között fordul elő, mint pl. külső Na^+ -hiányában (Alvarez és mtsai., 2004; Cole és mtsai., 1997), a β -adrenerg útvonal izoproterenollal vagy cAMP-vel kiváltott aktivációja során, vagy kardiotónias szteroidok, mint pl. ouabain és digoxin alkalmazását követően (Santana és mtsai., 1998). Ezen első hipotézis szerint a Ca^{2+} a klasszikus szív Na^+ csatornákon ($\text{Na}_v1.5$) keresztül folyik Na^+ -mentes külső oldat esetén az ion szelektivitást reverzibilisen módosítva. Tengerimalac kamrai szívizomsejtekben ez az áram a gyors Na^+ csatornákéhoz hasonló feszültségfüggést mutatott, -45 mV-os aktivációs küszöbvel és -30 mV-nál mérhető csúcserővel (Cole és mtsai., 1997). A magas kétvegyértékű kation koncentráció (pl. 10 mM külső Ca^{2+}) által okozott felületi töltésváltozás figyelembe vételével a fent említett feszültségfüggés megegyezik a klasszikus I_{Na} ismert tulajdonságaival. Ebben a vizsgálatban a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ az extracelluláris Ca^{2+} eltávolítását (Mg^{2+} -ot használtak a Ca^{2+} lecserélésére) követően eltűnt, dihidropiridinekre és Ni^{2+} -re nem volt érzékeny, míg azt 10-50 μM veratridin jelentősen módosítani tudta. Az áramot a TTX dózisfüggő módon gátolta 2,4 μM -os IC_{50} értékkel, ami jól illeszkedik a TTX $\text{Na}_v1.5$ csatornán mért IC_{50} értékéhez. Érdekesség, hogy az extracelluláris Na^+ összetett módon hatott a TTX-érzékeny áramra. Amikor 1 μM -t adtak

hozzá a Na^+ -mentes extracelluláris folyadékhoz, akkor nem volt hatása, viszont már 10 vagy 50 μM Na^+ csökkentette a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ -ot, feltételezhetően a csatorna pórusában a Na^+ és a Ca^{2+} közötti kompetitív kölcsönhatás következtében, míg 200 μM extracelluláris Na^+ az áram mérsékelt növekedését okozta. A külső Na^+ -mal való versengés alapján, valamint a hasonló feszültségfüggés és farmakológiai befolyásolhatósággal együttesen a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy ezt az áramot a klasszikus Na^+ csatornák alakíthatják ki (Cole és mtsai., 1997). Meglepő módon ők a kísérleteikben nem találtak $I_{\text{Ca,T}}$ -t tengerimalac kamrai szívizomsejteken, miközben Heubach és mtsai. (2000) kimutatták, hogy a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ és a $I_{\text{Ca,T}}$ együttesen van jelen tengerimalac szíven, míg patkányszívben csak a Ca^{2+} áram TTX-nal gátlható frakciója volt megfigyelhető. Mások is megerősítették, hogy Na^+ -mentes körülmények között a Ca^{2+} át tud lépni a Na^+ csatornákon patkányszívben, és ez az áram akkor is megfigyelhető volt, amikor HEK-293 sejtekben expresszáltak szívizomban előforduló Na^+ csatornákat (Alvarez és mtsai., 2004; Guatimosim és mtsai., 2001). Az utóbbi vizsgálatban Guatimosim és mtsai. (2001) azt találták, hogy az extracelluláris Na^+ jelenléte már mikromólos koncentrációban is csökkentette az áramot. Mivel az áramot egészséges patkányszíven mutatták ki, arra következtettek, hogy a Ca^{2+} átmegy a klasszikus Na^+ csatornákon. Ezzel szemben más kutatócsoportok nem észlelték ezt az alacsony-küszöbű TTX-érzékeny áramot sem közönséges patkány szívizomsejteken sem *Xenopus laevis* oocitákban expresszált humán $\text{Na}_v1.5$ csatorna alegységek esetén. Alvarez és mtsai. (2004) azt találták, hogy kizárólag szívinfarktust követő remodeláció esetén jelent meg a $I_{\text{Ca(TTX)}}$, valószínűleg az ioncsatorna expresszió megváltozása folytán, amely egy különböző Na^+ csatorna típus megjelenését eredményezheti.

Santana és mtsai. (1998) a szívizom kontrakcióját és a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ átmeneti emelkedését észlelték még viszonylag magas koncentrációjú Ca^{2+} csatorna gátlók jelenlétében (5-40 μM nifedipin, vagy 100 μM Cd^{2+}), pozitív membránpotenciáloknál (+80 mV), de még az extra- és intracelluláris Na^+ együttes eltávolítását követően is. Ezek a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranziensek az extracelluláris Ca^{2+} eltávolításával (Ba^{2+} -mal helyettesítve) vagy 10 μM TTX alkalmazásával eltűntek. Ráadásul a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranziensekre kifejtett TTX gátlás IC_{50} értéke 10-szer alacsonyabb volt, mint a I_{Na} esetén (0,1 μM és 1,0 μM). Az ő magyarázatuk szerint a klasszikus Na^+ csatornák foszforiláció (β -adrenerg aktiváció következtében) vagy nanomólos koncentrációjú kardiotóniás szteroid hatására „promiszkussá” válnak, lehetővé téve a Ca^{2+} átlépését is a megváltozott csatornán. A csatornaállapot e tulajdonságát a leírói „csúszó állapotú vezetőképességnek” (slip-mode conductance) nevezték el. Ugyanakkor az izoproterenol alkalmazásáról kimutatták már azt is, hogy nagymértékben megváltoztatja a szerves Ca^{2+}

csatorna gátlószerek hatékonyságát (Farkas és mtsai., 2012), amely tény nem lehet figyelmen kívül hagyni, amikor a lehetséges alternatívákat tárgyaljuk.

A második hipotézisnek megfelelően, Aggarwal és mtsai. (1997) valamint Chen-Izu és mtsai. (2001) felvetették, hogy a $I_{Ca(TTX)}$ -ot a klasszikus szívizom Na^+ csatornáktól ($Na_v1.5$) különböző, új Na^+ csatorna fehérje hozza létre. Ezt a feltevést számos tény támasztja alá. (1) Eltérő kinetikai tulajdonságokat észleltek: a $I_{Ca(TTX)}$ lassabban aktiválódik és inaktiválódik, mint a klasszikus szív Na^+ áram. Ez az inaktiváció extracelluláris Na^+ és Ca^{2+} együttes jelenlétében két exponenciális összegével illeszthető meg. Ugyanabban a kísérleti elrendezésben az egyensúlyi („steady-state”) aktivációt és inaktivációt leíró görbék két különböző Boltzmann függvény összegével állíthatók elő, az egyik a klasszikus I_{Na} -ból, a másik a $I_{Ca(TTX)}$ -ból ered. Amennyiben csak Ca^{2+} van jelen extracellulárisan, akkor csak a lassabb komponens ($I_{Ca(TTX)}$) detektálható. (2) A $I_{Ca(TTX)}$ aktivációjának és inaktivációjának feszültségfüggése a negatívabb membránpotenciálok irányába tolódott. (3) Különböző permeabilitási sajátságok: a $Na_v1.5$ csatornák nagyon csekély permeabilitást mutatnak Ca^{2+} -ra és Cs^+ -ra, míg a $I_{Ca(TTX)}$ -ért felelős csatornák lényegesen nagyobb permeabilitással rendelkeznek ezen kationokra. (4) A TTX-érzékenység is valamelyest különböző, a $I_{Ca(TTX)}$ esetén magasabb az IC_{50} érték. (5) Az áram amplitúdója (és következésképpen a csatorna denzitása) jóval alacsonyabb a $I_{Ca(TTX)}$ esetén. Azonban a $I_{Ca(TTX)}$ -ot létrehozó csatornák mégis Na^+ csatornák, mert még magas extracelluláris Ca^{2+} koncentrációknál is nagyobb Na^+ permeabilitással bírnak, és farmakológiai profiljuk is a Na^+ csatornákéval vág egybe, mivel az áramot a nifedipin, a La^{3+} vagy a Ni^{2+} nem befolyásolja, míg a skorpió toxinokra és a veratridinre nagy érzékenységet mutatnak. Heubach és mtsai. (2000) beszámoltak a $I_{Ca(TTX)}$ modulációjáról a főként T-típusú Ca^{2+} csatorna gátló mibefradil által, viszont a mibefradil I_{Na} gátlását is kimutatták már (McNulty és Hanck, 2004).

Azt már korábban bebizonyították, hogy a nagy koncentrációjú STX gátolja a Ca^{2+} csatornákat, és ez a felismerés némileg csorbította a heterociklikus guanidin csoportot tartalmazó tengeri toxinok kiemelkedő csatorna szelektivitását. Sun és mtsai. (2008) arról számoltak be, hogy a TTX önmagában nem volt hatással a T-típusú Ca^{2+} csatornákra kutya pitvari szívizomsejteken, de csökkentette a Ni^{2+} -által előidézett gátlást, amikor a Ni^{2+} -t követően alkalmazták. A TTX-nal szemben a STX önmagában is a T-típusú Ca^{2+} csatornák gátlását okozta 185 nM-os IC_{50} érték mellett. Többé-kevésbé hasonló eredményeket kaptak, amikor $Ca_v3.1$ -gyel, $Ca_v3.2$ -vel vagy $Ca_v3.3$ -mal transzfektált HEK-293 sejtekben vizsgálták a TTX és STX hatását. A TTX részlegesen feloldotta a Ni^{2+} -által kiváltott gátlást a $Ca_v3.1$ és $Ca_v3.2$ csatornákon, vagyis a szív T-típusú Ca^{2+} áramának fő izoformáin (Perez-Reyes, 2003;

Vassort és mtsai., 2006). Ráadásul a $\text{Ca}_v3.3$ közvetítette áramot direkt módon gátolta, 30 μM TTX jelenlétében több mint 50 %-kal csökkent az áram amplitúdója. Mindemellett a STX dózisfüggő gátló hatást fejtett ki a T-típusú Ca^{2+} áramot létrehozó mindhárom csatorna altípuson (Sun és mtsai., 2008). Su és mtsai. (2004) kimutatták, hogy a STX gátolja az L-típusú Ca^{2+} csatornát egér kamrai szívizomsejteken és a három Ca^{2+} csatorna alegységgel (nyúl α_{1C} , patkány β_{2a} és α_2/δ) tranziensen kotranszfektált tsA-201 sejteken. A I_{Na} teljes gátlása mellett 10 μM STX az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot is 39 %-kal csökkentette egér kamrai miocitákon. A STX dózisfüggő módon gátolta a transzfektált tsA-201 sejtek Ca^{2+} áramát és a gátlás feszültség-független volt. 60 μM TTX alkalmazásakor a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranziens enyhe, jóllehet szignifikáns csökkenése ellenére nem jegyezték fel $I_{\text{Ca,L}}$ -ra kifejtett hatást. Meg kell jegyezni azonban, hogy a legnagyobb $I_{\text{Ca,L}}$ gátlás 10 μM STX alkalmazásával ebben a kísérletben csak részleges (49 %-os) volt, szemben a Sun és mtsai. (2008) által megfigyelt teljes gátlással kutya szívizomsejteken, ahol a STX az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot 1,6 μM IC_{50} -val, dózisfüggően gátolta. A STX IC_{50} értéke az $I_{\text{Ca,L}}$ -on hasonló, mint amit a szív Na^+ csatornákon mértek, míg az $I_{\text{Ca,T}}$ STX-érzékenysége még kifejezetten magasabb.

Egészen mostanáig csak néhány kísérletben számoltak be a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ -ról nagyobb emlősök (mint pl. kutya és ember) szívében. Ezek közül egyet szívelégtelenségben szenvedő humán preparátumon (Gaughan és mtsai., 1999), kettőt pedig pitvari miocitákon (Lemaire és mtsai., 1995; Gaughan és mtsai., 1999) végeztek. Szívelégtelenségben azonban a miokardiális sejtek eléggé különböző ioncsatorna expressziós mintázatot mutatnak az egészségesekhez képest (Nattel és mtsai., 2007; Valdivia és mtsai., 2005, Jost és mtsai., 2011). Továbbá nemcsak a szarkolemmális ioncsatorna mintázat, hanem a Ca^{2+} felszabadító és eltávolító mechanizmusok összessége is megváltozik szívelégtelenségben (Yoo és mtsai., 2012). Fiziológiai körülmények között nagyobb emlősök szívében a Na^+ csatornák által létrehozott $I_{\text{Ca(TTX)}}$ -ot még nem írták le, ezek a csatornák úgy tűnik a rácsálók sajátosságai, mint pl. a patkány, az egér és a tengerimalac, illetve patológiai szívben is megfigyelhetőek miokardiális remodelláció után.

További érdekesség, hogy a saxitoxin gátolni képes a HEK sejteken heterológ expresszált hERG K^+ csatornákat is (+50 mV-nál a $\text{IC}_{50} = 5,6 \mu\text{M}$), viszont ez a gátlás a Na^+ és Ca^{2+} csatornák esetén megfigyelttől teljesen eltérő módon valósul meg (Wang és mtsai., 2003). A saxitoxin a hERG csatornákon az áram számos kinetikai tulajdonságát befolyásolva a csatorna kapuzási paramétereit módosító szerként fejt ki hatását, amelyek közül legkiemelkedőbb a csatorna aktiváció feszültségfüggésének pozitívabb membránpotenciálok

felé történő eltolása. Ezen felül a Hill koefficiens egynél nagyobb értéke azt sugallja, hogy a saxitoxin a K^+ csatornához több helyen tud kötődni, szemben a Na^+ és Ca^{2+} csatornákon kifejtett pórúsgátló hatásával és egyetlen kötőhelyével a szelektivitási filter területén (Wang és mtsai., 2003). Azonban meg kell jegyezni, hogy a pontos kötődési mechanizmus még nem teljesen tisztázott.

3.5. Tetrodotoxin mérgezés

A TTX egyike a legerősebb, nem fehérje szerkezetű emberi mérgeknek (Moczydlowski, 2013). A tetrodotoxin név a *Tetraodontiformes*-ből ered, azonban a TTX-t nem csupán egyes gömbhal fajokban lehet kimutatni, hanem számos más állatfajban is, mint pl. a kékgyűrűs polip, egyes tarajos gőtéek, béka, hernyó, tengericsillag fajok, gébfélék, törffarkú rákfélék, haslábúak és számos tengeri mikroorganizmusban, amelyek termelik és tárolják is a toxint (Noguchi és Arakawa, 2008). A gömbhalak testében a TTX koncentrációja és megoszlása fajfüggő. Rendszerint az ovárium, a máj és a bőr tartalmazza a TTX-t a legmagasabb koncentrációban (Hwang és Noguchi, 2007). Habár a tetrodotoxint az előbbieken említett állatokban fedezték fel, valójában bizonyos szimbiózisban élő baktériumok, mint például a *Pseudoalteromonas tetraodonis*, valamint egyes *Pseudomonas* és *Vibrio* fajok termelik azt (Zimmer, 2010).

Tetrodotoxinnal történő mérgezéses esetekről a távol-keleti országok szegény régióiban és Dél-Amerikában számolnak be legnagyobb gyakorisággal. Tehát Japánban, Bangladesben, Tajvanon, Kínában és Brazíliában történik a mérgezések döntő hányada. Emellett szórványosan Izraelből és Ausztráliából is jelentenek eseteket. A legtöbb TTX mérgezés az emberi tudatlanság számlájára írható, hiszen sok halász és családjuk esik áldozatul elsősorban a halak szakszerűtlen feldolgozása miatt. Az Európai Parlament és az Európa Tanács 853/2004/EK számú rendelete „az állati eredetű élelmiszerek különleges higiéniai szabályainak megállapításáról” rendelkezik a gömbhalak forgalomba hozatalának tiltásáról az Európai Unió területén. Ennek ellenére érdekesség és ugyanakkor a mérgezés ismeretének fontosságát jelzi, hogy a Földközi-tengerben már kimutattak tetrodotoxin tartalmú halakat (Katikou és mtsai., 2009), illetve Spanyolországban már az első európai TTX mérgezésekről is beszámoltak kürtös csigafajok (*Charonia sauliae*, illetve *Charonia lampas*) fogyasztását követően (Rodriguez és mtsai., 2008; Fernández-Ortega és mtsai., 2010). Feltehetően a klímaváltozás és az emelkedő vízhőmérséklet kedvez a toxint termelő baktériumok és az azokat hordozó élőlények terjedésének, így már Európa mediterrán

régióiban is az intenzív terápiás és sürgősségi ellátást végző orvosoknak ajánlatos tisztában lenniük a TTX mérgezés jellemző tüneteivel (Zimmer, 2010).

A TTX súlyos toxicitása ellenére, vagy talán éppen azért a gömbhal Japánban egy különleges fogás. A fugu néven ismert halat normál esetben szakképzett, annak elkészítésére engedéllyel rendelkező fugu séfek dolgozzák fel, akik a meglehetősen drága étkezést egy kulináris kalanddá teszik, mintsem egy veszélyes orosz ruletté (ennek kapcsán a fugu fogyasztását gyakorta „japán rulett”-ként is említik). Azonban a gömbhal mérgezés vagy tetrodotoxikáció még mindig az egyik leggyakoribb ételmérgezés Ázsia partjai mentén. A mérgező hal fogyasztása lehet szándékos vagy véletlen esemény következménye. Japánban ez leginkább a saját maguk által kifogott gömbhalakból házilag készített májételek fogyasztása kapcsán történhet meg. Bangladesben számos alkalommal halmozódó TTX mérgezésről számolnak be áldozatok tucatjaival, amelyek azután történtek, hogy a gömbhalak nagyon olcsón elérhetővé váltak a helyi piacokon (Zimmer, 2010).

A TTX mérgezéses eseteknek már hosszú története van. Az első európaiak, akik súlyos TTX mérgezést szenvedtek Cook kapitány és természetbúvár barátai, Johann és Georg Forster voltak. Ők élvezettel elfogyasztottak egy gömbhalból készült fogást, szerencsésen túléltek, majd részletesen leírták a tüneteiket (Forster, 1777). Az egyik leghíresebb mérgezéses eset az elmúlt évszázadban Mitsugoro Bando híres kabukiszínész nevéhez kötődik, aki 1975. január 16-án egy elegáns Kobe-ban található étteremben 4 fugu máját ette meg, amelyet követően 7 óra múlva elhunyt. Mivel egy igen nagyra becsült ember kívánságáról volt szó, az étterem szakácsa nem utasíthatta vissza a „nemzet színészének” kérését. Jóllehet az esetet követően természetesen az étterem engedélyét bevonták (Lohr, 1981).

Számos esetismertetésről tudunk, mígnem 1941-ben Fukuda és Tani kidolgozta a TTX mérgezés súlyosságának klinikai osztályozását (1. táblázat). Ez a négyfokozatú beosztás a tüneteken és azok kifejlődésének progresszióján alapszik, és máig ezt használjuk a klinikai gyakorlatban. A mérgezés foka tulajdonképpen három tényezőtől függ: az elfogyasztott TTX mennyiségétől, a sürgősségi ellátást végző intézetbe való felvételig eltelt időtől és a már korábban meglévő társbetegségek fennállásától. Az első és másodfokú esetek viszonylag enyhe tetrodotoxikációt jelentenek. Ekkor néhány neuromuszkuláris és idegrendszeri funkció csökkenésével vagy kiesésével állunk szemben, ugyanakkor a reflexműködés még ép. A harmadik fokozatot már súlyosabb eltérések jellemzik, mint az ataxia, a kiterjedt bénulás, a kifejezett reflexcsökkenés, a vérnyomás csökkenése, fixált/dilatált pupillák, cianózis és légzésszavarok (pl. nehézlégzés, csökkent vitálkapacitás és erőltetett kilégzési térfogat).

A testhőmérséklet csökkenése szintén fellép, amikor a vázizom kontrakció és az idegrostok vezetése fokozatosan gátoltta válik. A negyedik fokozatú mérgezéses esetek már igen súlyos mérgezett áldozatok, akiknél légzésleállás, csökkent artériás pO_2 , eszméletlenség, bradikardia és hipotenzió áll fenn. Komoly szívérintettség, úgymint vezetési blokk vagy kamrai aszisztólia akkor jelentkezik, amikor extrém magas TTX mennyiség fogyasztása történt és ez a negyedfokú mérgezés késői jele (Fukuda és Tani, 1941).

Fokozat	Tünetek
Első	Periorális zsibbadás vagy paresztézia, néha gasztrointesztinális tünetekkel (hányinger ^a) kísérvé
Második	Az arc és más területek zsibbadása, fokozódó paresztézia, a végtagok motoros bénulása, koordinációs zavarok, elmosódott beszéd, de még normál reflexek
Harmadik	Teljes izombénulás, afónia, diszfágia, diszpnoe, cianózis, vérnyomás csökkenés, fixált/dilatált pupillák, mellkasi fájdalom, de az áldozatok még eszméletüknél vannak
Negyedik	Súlyos légzési elégtelenség és hipoxia, súlyos hipotenzió, bradikardia, szívritmuszavar, még egy rövid ideig van szívverés

1. táblázat: A tetrodotoxin mérgezés klinikai osztályozása.

Fukuda és Tani közleménye (1941) alapján.

^a A TTX-t az egyik legerősebb hányást keltő anyagnak tekintik, amely a nyúltvelőben direkt módon hat a kemoreceptor trigger zónára (Sims és Ostman, 1986).

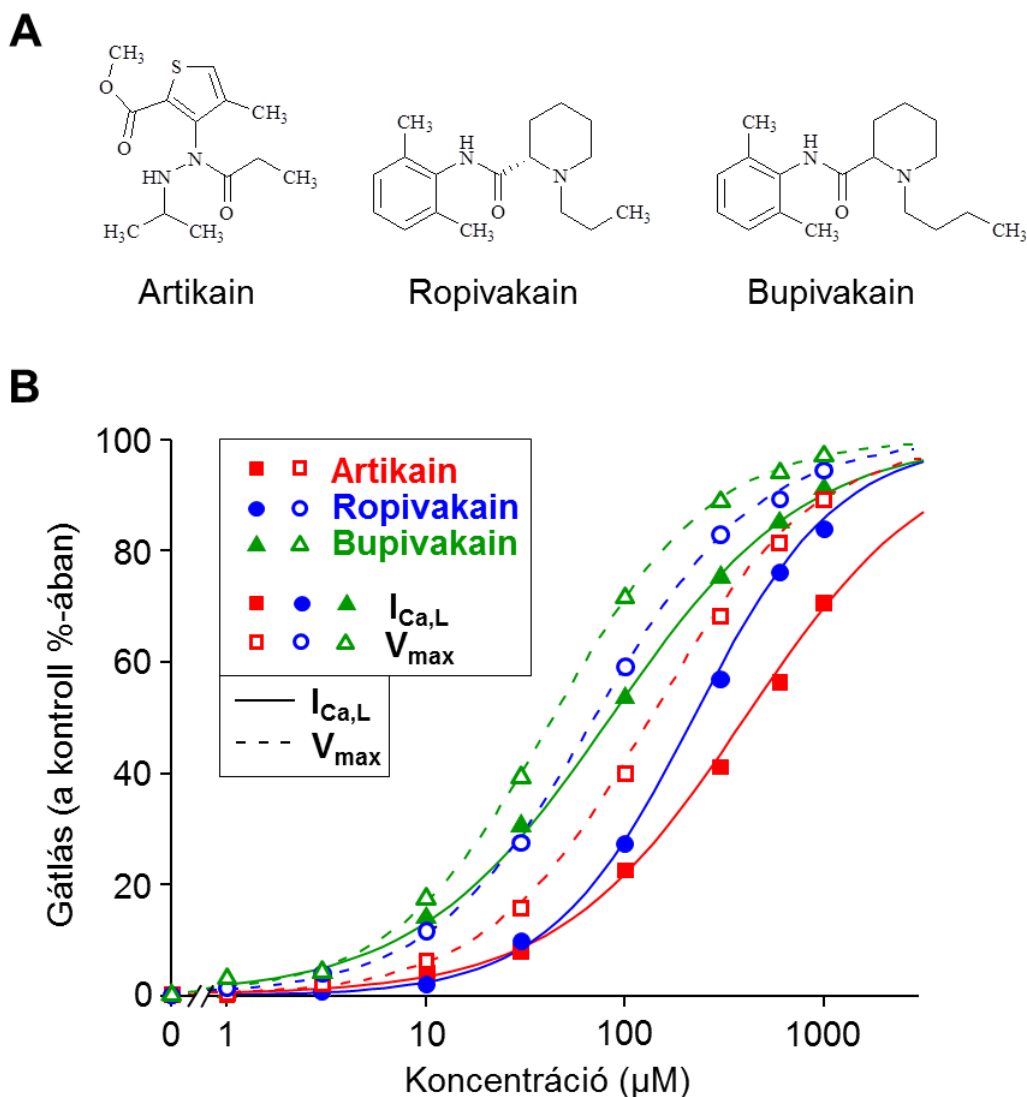
A tetrodotoxin mérgezés sajnos gyorsan végzetes kimenetelű lehet, ugyanakkor ellenszere nem létezik. A halál akár 17 perccel a toxin fogyasztását követően is felléphet (Zimmer, 2010). Az emberi halálos dózist 1-2 mg-nak határozták meg (Hwang és Nokuchi, 2007). A kezelés teljes egészében szupportív és magában foglalja a mechanikus lélegeztetést az oxigén ellátás biztosítására, fiziológiás sóoldat infúzióját az intravaszkuláris térfogat növelésére, a gyomortartalom ürítését elősegítő beavatkozásokat, aktív szén beadását, atropin alkalmazását vagy dopamin adását. Kolinészteráz gátlókat és egyéb szereket is ajánlottak, de ezeket megfelelő módon még nem vizsgálták (Sims és Ostman, 1986; Field, 1998). Jó a prognózis, ha a beteg a sürgősségi ellátást végző intézménybe érkezéskor eszméleténél van és még ez a légzésleállás előtt történik, valamint ha a beteg túléli az első 24 órát. A tünetek elmúlása 24 órától 5 napig tartó periódusban történik (Chowdhury és mtsai., 2007; Fernández-Ortega, 2009). A korai diagnózis és az azonnali klinikai kezelés alapvetően hozzájárul a halálozás csökkentéséhez. Japánban a halálozási ráta a múlt század elején mért 80 %-ról, évente több mint 100 halálessettel az 1990-es évekre közel 6 %-ra esett vissza (Hwang és Noguchi, 2007; Noguchi és Arakawa, 2008). Más ázsiai országokban az elmúlt időszakban 2-22 % közötti halálozási arányról számoltak be (Chowdhury és mtsai., 2007).

Az in vitro vizsgálatokkal és az in vivo állatkísérletekkel szemben, ahol kristályos TTX-t használtak, a humán tetrodotoxin mérgezések TTX-tartalmú étel fogyasztása folytán történnek. Lehetséges, hogy ez a nyers vagy vegyes összetételű TTX jóval könnyebben felszívódik az emésztő traktusból (Zimmer, 2010). Egyes tengerben élő állatfajok képesek szintetizálni és felhalmozni egyéb TTX analógokat vagy más mérgező vegyületeket is, így a tünetek nem mindig csupán a TTX mérkezésnek felelnek meg (Rodriguez és mtsai., 2008).

3.6. A szív feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornáin ható szerek mérsékelt szelektivitása

A feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatorna gátlószereit kiterjedten alkalmazzák a mindennapi gyakorlatban szinte az összes orvosi szakterületen és az orvosbiológiai kutatásokban is. Ezen szerek között olyan gyakori gyógyszer csoportok találhatók, mint pl. a helyi érzéstelenítők, antiaritmiás szerek, antiepileptikumok, antidepresszánsok és egyes vérnyomáscsökkentők. A szív feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornáin ható szerek esetén azonban gyakorta számolnak be keresztreakcióról a szerkezetileg hasonló, viszont nem elsődlegesen érintett csatorna típussal (pl. Ca^{2+} csatorna gátlók a Na^+ csatornákra is hatnak és fordítva). Ez a kölcsönhatás általában nem előnyös, különösképp kísérleti körülmények között, amikor egy adott ioncsatorna áramát önmagában akarjuk megmérni, de a klinikai gyakorlatban is jelentős mellékhatásokat okozhat. Ez a jelenség jóval gyakoribb, mintsem hogy az csupán egy váratlan, nem kívánt esemény következménye lenne. Másrészt a keresztreakció elméletileg néhány speciális esetben akár hasznos is lehet, ideértve az olyan antiaritmiás szereket, mint pl. a lidokain és a verapamil, jóllehet a proaritmiás tulajdonságuk ezáltal szintén növekedhet. A Na^+ és Ca^{2+} csatorna gátlók kiterjedt klinikai alkalmazását tekintve valószínűnek tűnik, hogy a korlátozott szelektivitás nem jelent szükségszerűen hátrányt, mivel az ezen szerekkel végzett kezelés gyakran nagyon hatásos. A molekuláris hasonlóságok alapján a feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornák egy közös őst feltételezik, így a jelenség a négy doménnel rendelkező csatornák evolúciójára vezethető vissza. A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák a feszültségfüggő Na^+ és egyes feszültségfüggő K^+ csatornákkal együtt egy ioncsatorna szupercsalád tagjai.

A mindennapi orvosi gyakorlatban kiterjedten alkalmazott helyi érzéstelenítők ennek a csupán mérsékeltén szelektív Na^+ csatorna gátló hatásnak egy eklatáns példáját képezik (5. ábra).



5. ábra: A helyi érzéstelenítők Na^+ és Ca^{2+} csatornákon kifejtett koncentrációfüggő hatása. (A) A mindennapi orvosi gyakorlatban kiterjedten használt helyi érzéstelenítők kémiai struktúrája. (B) Egymásra vetített dózis-hatás görbék demonstrálják a helyi érzéstelenítők kutya kamrai szívmusclejének akciós potenciál felszálló szárának meredekségére (V_{max}) és L-típusú Ca^{2+} áramára ($I_{\text{Ca,L}}$) kifejtett gátló hatását. A folyamatos és szaggatott vonalak a V_{max} -re és az $I_{\text{Ca,L}}$ -ra kapott eredmények Hill egyenlettel való illesztését jelölik. A háromszögek, négyzetek és körök az egyes szerek esetében mért eredmények átlagát szimbolizálják. Szabó és mtsai. (2007 és 2008), valamint Szentandrassy és mtsai. (2010) közleménye alapján, módosítva.

Jóllehet a bupivakain alacsony koncentrációban ($1 \mu\text{M}$) nem befolyásolja az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot, magasabb koncentrációban ($10 \mu\text{M}$) azonban már szignifikáns $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdó csökkenést okoz. Ezzel összhangban $30 \mu\text{M}$ bupivakain jelenlétében szignifikáns $I_{\text{Ca,L}}$ gátlást figyeltek meg akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között is. Az összehasonlíthatóság kedvéért ugyanebben a vizsgálatban a bupivakain $47 \mu\text{M}$ -os IC_{50} értékkel csökkentette az akciós potenciál felszálló szárának meredekségét, a V_{max} -t, amely paraméterről úgy tartjuk,

hogy szoros korrelációt mutat a $I_{Na,T}$ nagyságával (Szabó és mtsai., 2008; Moller és Covino, 1990).

A ropivakain hatása a bupivakainénál szelektívebbnek bizonyult, amint az az 5. ábrán is megfigyelhető, mivel kutya kamrai sejteken reverzibilis és koncentrációfüggő $I_{Ca,L}$ gátlást írtak le 263 μM -os IC_{50} értékkel, azonban a V_{max} -t már 10 μM ropivakain csökkentette és a V_{max} gátlás tekintetében 81 μM -os IC_{50} értékkel rendelkezik (Szabó és mtsai., 2008). A ropivakain V_{max} csökkentő hatása direkt frekvenciafüggő volt, míg az APD_{90} rövidítő hatás fordított frekvenciafüggő sajátságot mutatott kutyaszíven. A ropivakain dózisfüggő módon csökkentette a $[Ca^{2+}]_i$ tranziens amplitúdóját ($IC_{50}=99 \mu\text{M}$) kutya kamrai szívimsejtekben, amely egybevághat a kamrai trabekulán megfigyelt kontraktilitás csökkenéssel ($IC_{50}=73 \mu\text{M}$) (Szentandrassy és mtsai., 2010).

Az artikain a várakozásoknak megfelelően szintén koncentrációfüggő módon csökkentette a V_{max} -t izolált kutya kamrai miocitákban. A V_{max} gátlás IC_{50} értéke 162 μM -nak adódott Hill egyenlettel történő illesztést követően. A gátlás ugyancsak direkt frekvenciafüggést mutatott, vagyis magasabb szívfrekvencián kifejezettebbé vált, hasonlóan a többi helyi érzéstelenítő hatásához. Ugyanakkor az artikain az $I_{Ca,L}$ -ot szintén gátolta, bár csak magasabb koncentrációban, mint ami a ropivakainnál megfigyelhető volt. Az $I_{Ca,L}$ gátlás IC_{50} értéke 471 μM volt. A Hill koefficiens értéke közel egy, amely a csatornán egy kötőhely jelenlétét valószínűsíti (Szabó és mtsai., 2007). Továbbá az artikain még kifejezettebb dózisfüggő $[Ca^{2+}]_i$ tranziens amplitúdó és kontraktilitás csökkenést okozó hatásáról (87 μM -os és 74 μM -os IC_{50} értékkel) számoltak be kutya kamrai miokardiumban (Szentandrassy és mtsai., 2010).

4. Célkitűzés

Számos munkacsoport vizsgálta már a TTX által gátolt Ca^{2+} áram sajátosságait különböző ingerelhető szövetekben, köztük szívizmon is. A közölt adatok fajfüggőek és egymásnak részben ellentmondóak, ezért célkitűzéseink a következők voltak:

1. A TTX koncentrációfüggő hatásának vizsgálata kutya kamrai szívizomsejtek L-típusú Ca^{2+} áramának amplitúdójára, feszültségfüggésére és inaktivációs kinetikájára.
2. A TTX gátlás használatfüggő tulajdonságának vizsgálata az L-típusú Ca^{2+} csatornán.
3. A TTX L-típusú Ca^{2+} csatornához való kötődésének befolyásolása a csatorna foszforilálása, a pH és a redoxpotenciál megváltoztatása által és ezen behatások eredményének részletes elemzése kötődési modell felhasználásával.
4. A TTX lehetséges kötődési helyének számítógépes modellezése a szívizom gyors, feszültségfüggő Na^+ - ($\text{Na}_v1.5$) és L-típusú Ca^{2+} csatornáján ($\text{Ca}_v1.2$).
5. A TTX hatásának vizsgálata HEK tsA-201 sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornákon.

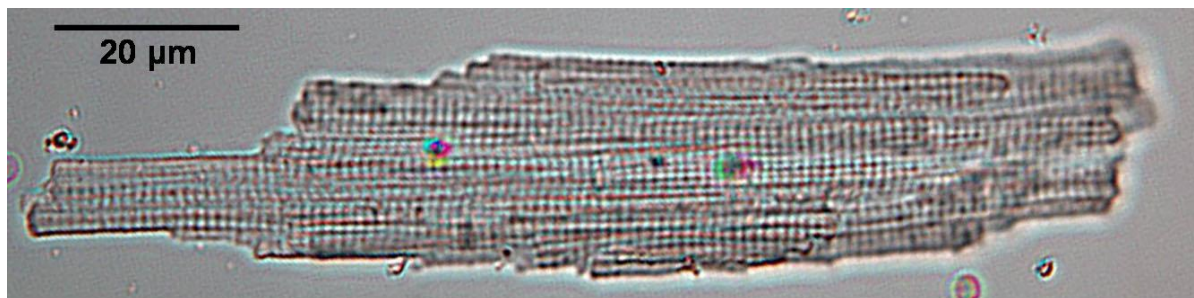
5. Anyagok és módszerek

5.1. Kutya bal kamrai szívizomsejtek enzimatisz izolálása

Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából enzimatisz izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket vegyes nemű, ivarérett, kísérleti célra tenyésztett beagle kutyák szívéből nyertük az ún. anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával (Magyar és mtsai., 2000; Bányász és mtsai., 2001). A 14-20 kg-os állatokat 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország) és 1 mg/kg xylazin-hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV, Bladel, Hollandia) alkalmazásával altattuk. A mellkas megnyitása után a szívet gyorsan kiemeltük, a bal elülső leszálló artéria koronária ágat kanüláltuk és ezen artéria vérellátási területének megfelelően Langendorff-apparátusz segítségével perfundáltuk a miokardiumot. A perfúzió első 5 percében nominálisan Ca^{2+} -mentes JMM oldatot (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, termékszám: M0518; gyártó: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) alkalmaztunk a szövet Ca^{2+} és vértartalmának eltávolítása céljából, amelyet taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l), NaH_2PO_4 -tal (200 mg/l) és NaHCO_3 -tal (1,3 g/l) egészítettünk ki. Az oldatot folyamatosan 5 V/V % O_2 -t és 95 V/V % CO_2 -ot tartalmazó gázkeverékkel (karbogén) ekvilibráltuk a kívánt 6,8-as pH elérése céljából. A pH célérték elérését a hozzáadott NaHCO_3 segítette elő ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ pufferrendszer).

Ezt követően a preparátumot mintegy 30 percig perfundáltuk ugyanezzel a JMM alapoldattal, amelyhez még kollagenázt (1 g/l, Type II., 230 U/mg; Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA), borjú albumint (2 g/l, Fraction V.; Sigma-Aldrich Co.) és CaCl_2 -ot (50 μM) adtunk. A sejtizolálás során az oldatokat végig karbogénnel ekvilibráltuk és a perfúziós oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. A kollagenázt is tartalmazó oldattal történő perfúzió hatására az adott (artéria) koronária ellátási területéhez tartozó szívizom elfolyósodott, sejtjeire esett szét. Az emésztési folyamat végén a bal kamra falának midmiokardiális rétegében vezetett, a szív csúcsa felé eső U alakú metszéssel tettük szabaddá a sejteket/szövetdarabokat és 50 μM Ca^{2+} -ot tartalmazó módosított JMM oldatban szuszpendáltuk őket. A sejtszuspenziót többször ülepítettük, szűrtük és mostuk egyre növekvő Ca^{2+} koncentrációjú módosított JMM oldattal. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on tároltuk 2,5 mM Ca^{2+} koncentrációjú Minimum Essential Medium Eagle (MEM, termékszám: M0643, Sigma-Aldrich Co.) oldatban, amelyet a JMM oldathoz hasonlóan taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l), NaH_2PO_4 -tal (200 mg/l)

és NaHCO_3 -tal (2 g/l) egészítettünk ki. Az oldatot felhasználásig folyamatosan 5 V/V % O_2 -t és 95 V/V % CO_2 -ot tartalmazó gázkeverékkel ekvibráltuk a kívánt 7,3-as pH eléréséhez. A sejtizolálás befejezése után két-három órával kezdtük meg a méréseket. Az említett feltételek lehetővé tették, hogy a sejteket 1-2 napig használjuk az izolálás után. Az izolálások során kapott szuszpenziókban a sejtek átlagosan 30–60 %-a volt szabályos téglalap alakú, ép harántcsíkolatú, éles szélű és tiszta citoplazmával rendelkező (6. ábra). Az ilyen tulajdonságú sejteket használtuk a kísérleteink során.



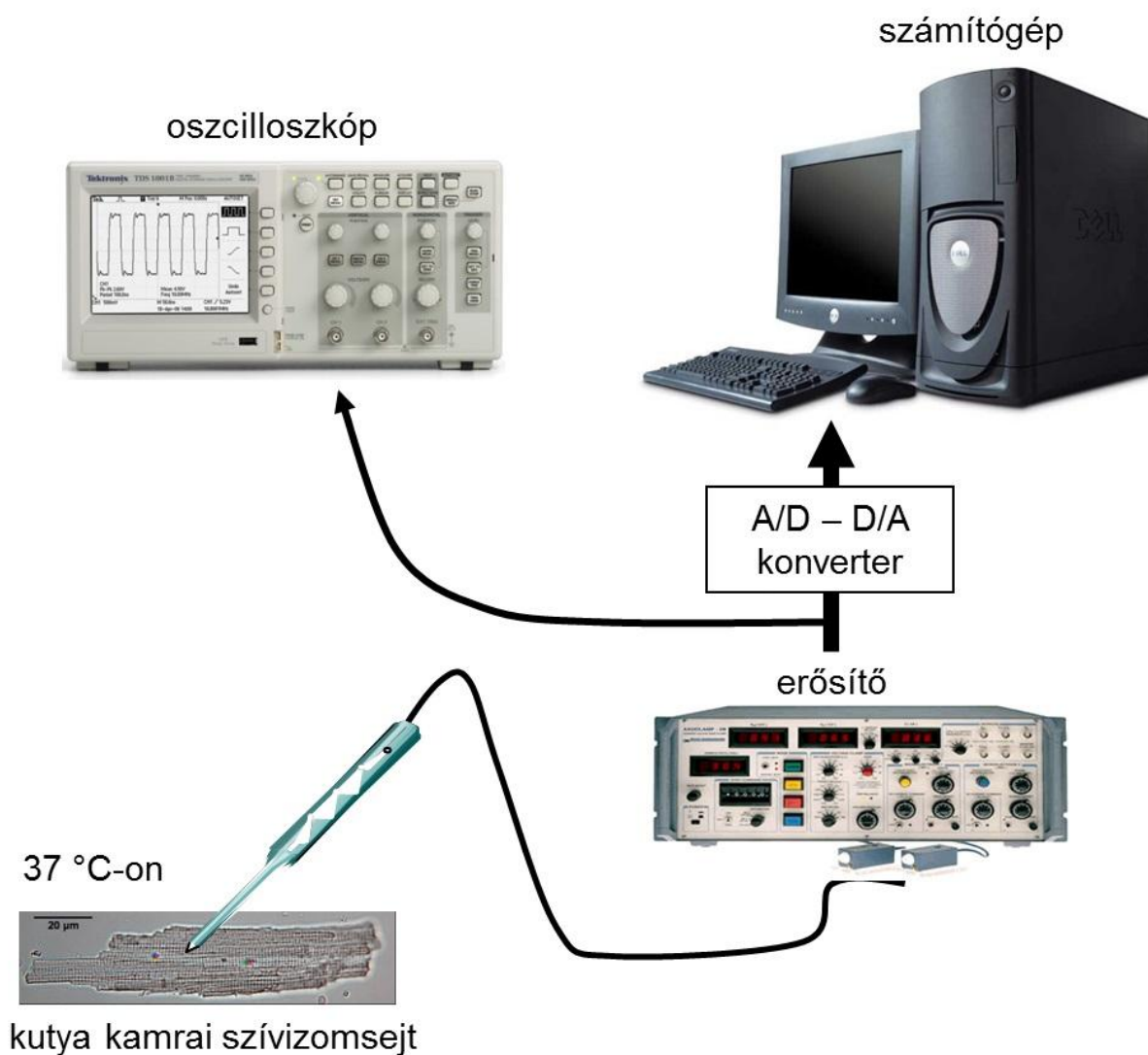
6. ábra: A mérésekhez használt kutyaszív bal kamrából származó izolált szívizomsejt képe. Tisztán látható a szívizomsejtekre jellemző harántcsíkolat.

5.2. Ionáram mérés konvencionális feszültség-clamp technikával szívizomsejteken

Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában (Hamill és mtsai., 1981), feszültség-clamp körülmények között rögzítettük. A mérésekhez használt 2-3 $\text{M}\Omega$ ellenállású mikroelektrodákat (patch pipetta) boroszilikát GC100F-15 üvegapillárisból (Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) készítettük P-2000 típusú mikropipetta húzó használatával (Sutter Instrument, Novato, CA, USA). A MEM-oldatban tárolt izolált szívizomsejteket tartalmazó szuszpenziót Nikon Eclipse TE2000-U invertált mikroszkóp (Nikon Corporation, Tokyo, Japán) tárgyasztalába helyezett plexi mérőkádba cseppentettük, majd néhány perc ülepítést követően folyamatosan perfundáltuk oxigenizált Tyrode-oldattal, amelyet a kalciumáram mérésekor 3 mM 4-aminopiridinnel egészítettünk ki. A folyamatos perfúziót a közlekedő edények elvén működő gravitáció-vezérelt perfúziós rendszerrel értük el. A méréseink során a mechanikai és elektromágneses rezgésektől rezgésmentes asztal (Newport Corporation, Irvine, CA, USA), illetve általunk készített Faraday-kalitka alkalmazásával védekeztünk.

Miután a sejtek felszínét a mikropipettával megérintettük, enyhe szívást alkalmaztunk, amely segítségével egy nagy ellenállású kapcsolat (1-10 $\text{G}\Omega$) jött létre. Ezt követően további szívás vagy néhány 1 ms hosszúságú, 1,5 V-os elektromos impulzus alkalmazásával beszakítottuk az elektróda csúcsi része alá eső sejtmembránt. A mérések során a soros

ellenállás rendszerint 4-8 M Ω volt, amelyet 50-80 %-ban kompenzáltunk. Amennyiben a soros ellenállás ennél nagyobb volt vagy a mérés során jelentősen emelkedett (20 %-ot meghaladóan), akkor azt a mérést elvetettük. A kapott áramjeleket AxoClamp-2B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA), illetve MultiClamp 700B erősítő (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) segítségével regisztráltuk. A kimenő jeleket Digidata 1440A készülékkel (Molecular Devices) végzett analóg-digitális átalakítás után 100 kHz-es mintavételezési gyakorisággal rögzítettük szoftveres kontroll mellett (pClamp 6.0 és 10.0, Axon Instruments Inc.). Az előzőekben ismertetett elektrofiziológiai mérőrendszer vázlata a 7. ábrán látható. Az ionáramokat minden esetben a sejt kapacitására normalizáltunk, amelyet egy rövid -10 mV-ról -20 mV-ra történő hiperpolarizáló pulzus segítségével határoztunk meg. Az elektrofiziológiai méréseket kivétel nélkül 37 °C-on végeztük. Az adatokat számítógépen tároltuk a későbbi elemzés céljából.



7. ábra: A kísérletek során használt elektrofiziológiai mérőrendszer vázlata.

5.3. Ionáram mérés akciós potenciál-clamp technika alkalmazásával szívizomsejteken

A Tyrode oldattal perfundált szívizomsejtek akciós potenciálját a patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében áram-clamp üzemmódban rögzítettük. A sejteket a mérő elektródán keresztül folyamatosan 1 Hz-es frekvenciával ingereltük 1 ms szélességű négyszögimpulzusok alkalmazásával, melyek amplitúdóját az ingerküszöb 110–120 %-ára állítottuk. Ezáltal az ingerlő jel és az akciós potenciál felszálló szára 1-2 ms-ra elvált egymástól. Minden sejten 10 egymást követő akciós potenciált vettünk fel, amelyeket közvetlenül ezután elemeztünk is. Ezt követően az erősítőt feszültség-clamp módba kapcsolva azt az egy akciós potenciált alkalmazzuk azonos frekvencián feszültségparancsként, amelynek az APD_{90} értéke legközelebb volt a tíz rögzített akciós potenciál átlagához. Az ezen körülmények között nyert áramjel egy zero áramamplitúdó szintjén futó vízszintes vonal, kivéve az ingerlési artefaktum és az akciós potenciál felszálló szára alatt mérhető rövid szakaszt (Doerr és mtsai., 1989 és 1990). A TTX-érzékeny áram profilját úgy kaphatjuk meg, hogy a szer alkalmazása után rögzített görbét kivonjuk a szer előtt felvett áramjelből. Az ábrákon ennek megfelelően a TTX-érzékeny áram egy befelé irányuló (inward) áramként van feltüntetve.

5.4. Ionáram mérés HEK tsA-201 sejteken expresszált $Ca_v1.2$ csatornákon

A HEK tsA-201 sejteket 37 °C-on, 5 % CO_2 -ot tartalmazó légkörben, magas glükóz tartalmú Dulbecco's Minimal Essential Medium (Sigma-Aldrich Co.) közegben tenyésztettük, amelyet FBS-sel (10 %), L-glutaminnal (2 mM), penicillin-G-vel (100 U/ml) és streptomycinnel (Invitrogen, 100 µg/ml) egészítettünk ki. A sejteket hetente kétszer passzáltuk 7 perces 0,2 g/l EDTA-t tartalmazó PBS oldatban történő inkubációt követően. A $Ca_v1.2$ csatornát kódoló CACNA1C gént tartalmazó plazmidot (Prof. Dr. Charles Antzelevitch ajándéka) a zöld fluoreszcens proteint (EGFP) kódoló plazmiddal együtt HEK tsA-201 sejtekbe kotranszfektáltuk. A transzfekciót Lipofectamine 2000 reagenst használva 1:10-hez EGFP:ioncsatorna DNS molaránnyal végeztük a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) protokollját alkalmazva, majd a sejteket standard körülmények között növesztettük. Az áramokat 24 órával a transzfekciót követően rögzítettük. Az EGFP pozitív transzfektált sejteket Nikon TE2000-U fluoreszcens mikroszkóp segítségével azonosítottuk. Az EGFP pozitív sejtek több mint 70 %-án fejeződött ki a $Ca_v1.2$ ioncsatorna. A teljes-sejtes elrendezésben rögzített ionáramokat MultiClamp 700B (Molecular Devices) és Axopatch 200A (Axon Instruments Inc.) erősítők segítségével mértük, amelyeket Digidata 1440 és 1320

(Molecular Devices) használatával végzett analóg-digitális átalakítást követően számítógéppel kötöttük össze és regisztráltunk. A mérések során a soros ellenállást 70 %-ban kompenzáltuk a feszültség-hibák minimalizálása és a jó feszültség-clamp elérése céljából. A pipettákat GF150F-15 boroszilikát üvegkapillárisokból öt lépcsőben húztuk, amely folyamat végeredményeként a mérőkádban 4-6 M Ω ellenállású elektródokat kaptunk.

A Ca_v1.2 csatornákon folyó áramot -100 mV-os tartófeszültségről 0 mV-ra történő, 100 ms hosszú tesztimpulzusok alkalmazásával rögzítettük. A tesztimpulzusokat 15 másodperces időközönként ismételtük. Az adatgyűjtésre és analízisre pClamp 9 és 10 szoftvercsomagokat (Molecular Devices) használtunk. Az áramjeleket 10 kHz-es mintavételezési frekvenciával rögzítettük, és az erősítő analóg négypólusú Bessel filterének használatával szűrtük.

5.5. Mérésekhez használt oldatok összetétele

5.5.1. Kutya bal kamrából izolált szívműsejteken végzett ionáram mérések során használt külső- és pipettabelső oldatok összetétele

A Tyrode-oldat összetétele: 144 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM MgCl₂; 5 mM HEPES és 11 mM glükóz (pH=7,4).

A kalciumáram mérések során a pipetták feltöltésére az alábbi összetételű oldatot használtuk: 110 mM KCl; 40 mM KOH; 10 mM HEPES; 10 mM EGTA; 20 mM TEACl és 3 mM K₂-ATP (pH=7,2).

Az akciós potenciál feszültség-clamp mérések során használt pipettaoldat összetétele: 100 mM K-aszpartát; 45 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; 10 mM EGTA és 3 mM K₂-ATP (pH=7,2).

5.5.2. HEK tsA-201 sejteken expresszált Ca_v1.2 csatornáknak ionáramának mérése során használt külső- és pipettabelső oldatok összetétele

A kádban levő sejteket folyamatosan az alábbi összetételű oldattal perfundáltuk: 145 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 2,5 mM CaCl₂; 5,5 mM glükóz és 10 mM HEPES (pH=7,35). Kalciummentes külső oldat esetén a MgCl₂ koncentrációját 3,5 mM-ra növeltük, és az oldatot 1 mM EGTA-val egészítettük ki.

A pipettaoldat tartalma: 140 mM KF, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA (pH=7,22) volt.

Az oldatok pH-ját megfelelő mennyiségű HCl és NaOH (extracelluláris oldatok esetén) vagy KOH (intracelluláris oldatok esetén) hozzáadásával Orion 3 Star (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) pH mérő készülék segítségével állítottuk be a kívánt értékre. Az oldatok ozmotikus nyomását Vapro 5520 ozmométer (Wescor Inc., Logan, UT, USA) segítségével 290-300 mOsm-ra állítottuk be.

A kísérletek során felhasznált vegyszereket a Sigma-Aldrich Co.-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

5.6. A TTX kötődésének modellezése a Ca_v1.2 és Na_v1.5 csatornákhöz

A feszültségfüggő Na_v1.4 csatorna szelektivitási filter régiójának a tetrodotoxinnal alkotott komplexéről egy teoretikus struktúrát már korábban publikáltak (Tikhonov és Zhorov, 2005), amelynek geometriáját kiindulópontnak tekintettük a humán Na_v1.5 és Ca_v1.2 csatornáknak a TTX-nal alkotott komplexéről készített modellünk tervezésekor. A Na_v1.4 és Na_v1.5 szekvenciája közötti egyezés részletekbe menően ismert már (Sun és mtsai., 2008; Tikhonov és Zhorov, 2011). A Na_v1.4 és Ca_v1.2 közötti egyezés Tikhonov és Zhorov közleményében (2005) szintén leírásra került, amelyet módosítás nélkül átvettünk. Ezen modellekben a Na⁺ csatornák meglehetősen konzervált DEKA gyűrűje megfelel a Ca²⁺ csatornák konzervált EEXX gyűrűjének. A DEKA gyűrű tényleges helyzete a Na⁺ csatornában a D372, E898, K1419 és A1711-es pozícióknak felel meg a Na_v1.5 csatorna esetében, míg a D406, E761, K1244 és A1536-os helyzetű aminosavaknak a Na_v1.4 csatornában, igazolva az előzőekben említett egyezést (Tikhonov és Zhorov, 2011). Nemrégiben ismertté vált a bakteriális a Na_vAb (*Arcobacter butzleri*-ből) és a Na_vRh (amely a NaChBac egy ortológja, a tengeri α -proteobaktérium HIMB114-ből) feszültségfüggő Na⁺ csatornák háromdimenziós röntgenstruktúrája (Payandeh és mtsai., 2011 és 2012; Zhang és mtsai., 2012). Ezek a csatornák, a Na_v1.4 csatorna modelljének konstrukciójához használt K⁺ csatornához hasonlóan, négy alegységből felépülő homo- vagy heterotetramerek (Jiang és mtsai., 2002; Tikhonov és Zhorov, 2005). A TTX kötődésének szerkezeti részletei azonban még a kezdeti, Na_v1.4 elméleti struktúrára alapuló modellünkből származnak. A YASARA programcsomaggal végeztük a Na_v1.4 átalakítását Na_v1.5-té és Ca_v1.2-vé, a megfelelő módosítások végrehajtásával. Ugyanezen szoftver szolgált a TTX-Na_v1.5 és a TTX-Ca_v1.2 által alkotott komplexek kötődési energiáinak minimalizálására. A komplexek geometriájának

grafikai ábrázolására a szoftvercsomag CHIMERA alkalmazását használtuk (Pettersen és mtsai., 2004). A Na_v1.5 és Ca_v1.2 modellek aminosav-sorrendjének számozása megegyezik a humán és patkány szívizom ioncsatornáinál használttal.

A tetrodotoxin pozitív töltésű (protonált guanidin csoporttal és disszociálatlan C-10-es OH-csoporttal) és semleges töltésű (protonált guanidin csoporttal és a C-10-es OH-csoportról egy proton disszociációjával keletkező O⁻-csoporttal) formájának az L-típusú kalciumcsatornához való kötődési modellezésekor a bakteriális Na_vAb csatorna szelektivitási filter régiójának röntgenstruktúrája (Payandeh és mtsai., 2012), továbbá a Na_vAb és a Ca_v1.2 csatornák között meglévő homológia alapján készítettük el a humán Ca_v1.2 csatorna szelektivitási filter régióját. A Na_vAb és a Ca_v1.2 közötti egyezést korábban leírták már, amelyet módosítás nélkül felhasználtunk (Tikhonov és Zhorov, 2012). Az EEEE gyűrű, vagyis az E363, E706, E1135 és E1464 pozícióban elhelyezkedő aminosavak tulajdonképpeni helyzete alátámasztja az említett egyezést (Tikhonov és Zhorov, 2011). A Na_vAb Ca_v1.2-vé alakításához szükséges módosításokat a MODELER program (Sali és Blundell, 1993) segítségével végeztük és a CHIMERA alkalmazást (Pettersen és mtsai., 2004) használtuk a grafikai ábrázoláshoz. A TTX molekula kötődését a csatornafehérje modelljéhez az Autodock4 szoftver alkalmazásával végeztük és az „MGL tools” alkalmazás segítségével tettük grafikailag láthatóvá (Morris és mtsai., 2009). A kötődési számításokhoz a flexibilis ligand (elforgatható OH-csoportok) – merev receptor modellt használtuk fejlődési algoritmusokkal (Morris és mtsai., 1998). Ennek során megvizsgáltuk a TTX-nak mind a pozitívan töltött, mind a neutrális (deprotonált oxigénnel rendelkező) formájában történő kötődését a Ca_v1.2 modellünk szelektivitási filteréhez. A komplexek stabilitásának meghatározására a kötődés során kapott geometriából kiindulva molekuláris dinamikai modellezéseket végeztünk. A szelektivitási filter és a TTX molekula kölcsönhatásának modellezése során AMBER99SB és GAFF erőter alkalmazására került sor (Wang és mtsai., 2004; Hornak és mtsai., 2006). Mivel a számításokban csak a Ca_v1.2 szelektivitási filter régióját vettük figyelembe, az egyes ismétlődő szekvenciárészletekben az N- és C-terminális pozícióban elhelyezkedő aminosavak és a filter régió külső részét felépítő helikális struktúrák vázát képező atomok (a megfelelő ismétlődő szekvenciárészletek N-terminális része) a TTX molekulával nem léptek közvetlen kölcsönhatásba. Minden más atom és funkciós csoport szabadon mozoghatott a modellezés során. A rövid, konstans részecskeszámú, konstans nyomású és hőmérsékletű molekuláris dinamikai (NPT) egyensúlyt követte a konstans térfogatú (NVT) szimuláció. A számítások során periodikus határköörülményeket alkalmaztunk (Jorgensen és mtsai., 1983). A hosszú távolságú elektrosztatikus

kölcsönhatásokat Ewald-féle részecske háló módszerrel kalkuláltuk (Darden és mtsai., 1993). 2 fs-os időlépcsők alkalmazásával a NPT és NVT szimulációk teljes hossza 2 ns és 65 ns volt. A szimulációs környezetben Na^+ és Cl^- ionok hozzáadásával az ionerősséget 150 mM-nak állítottuk be. A szimulációkat az AMBER 12 szoftvercsomag (University of California, San Francisco, CA, USA, 2012) használatával hajtottuk végre, míg a megjelenítést a vizuális molekuláris dinamikai (VMD) programcsomag (Humphrey és mtsai., 1996) alkalmazásával végeztük.

5.7. Az analízis során felhasznált matematikai formulák

$$I_{norm} = \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{C} \right)^n} \quad 1. \text{ egyenlet}$$

Ahol:

IC_{50} a félmaximális gátláshoz szükséges koncentráció ($I_{norm} = 0,5$),

C a vizsgált anyag koncentrációja,

n a görbe meredeksége, a Hill koefficiens.

$$I = \sum_{i=1}^n A_i e^{(-t/\tau_i)} + A_0 \quad 2. \text{ egyenlet}$$

Ahol:

A_1 és A_2 a gyors és lassú komponensek amplitúdói,

τ_1 és τ_2 a gyors és lassú komponensek időállandói,

A_0 a nem inaktiválódó áramkomponens amplitúdója.

5.8. Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei $\pm$ a középérték körüli standard hiba (amely az ábraszövegekben az angol terminológia, vagyis a „standard error of the mean” kifejezés rövidítéseként mint „SEM” szerepel). A csoportok összehasonlítása során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollós t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdésnek megfelelően. Az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Minden elvégzett vizsgálat összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publikációs száma: 85-23., 1996-ban revideált változat) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta.

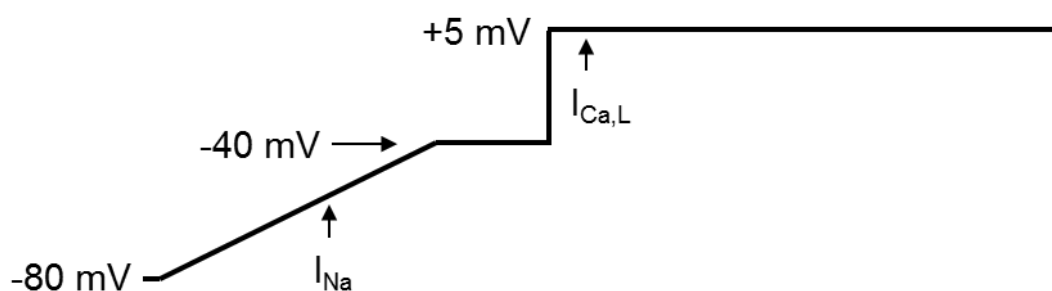
6. Eredmények

6.1. A TTX gátolja $I_{Ca,L}$ -ot

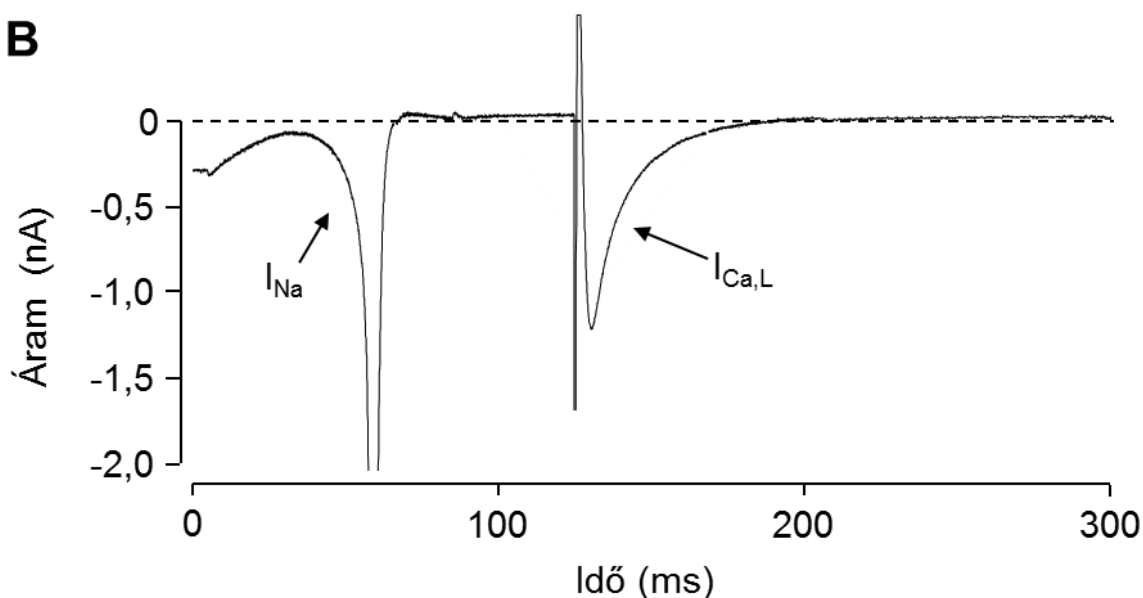
6.1.1. A gátlás koncentrációfüggése és reverzibilitása

A tetrodotoxin hatását először úgy kívántuk meghatározni, hogy a már jól ismert nátriumáram gátlást és az L-típusú kalciumáramra kifejtett esetleges hatást egyszerre, szimultán módon vizsgáljuk. Így törekedtünk csökkenteni annak lehetőségét is, hogy nátriumárammal szennyezett kalciumáram mérése történjen. Abból a célból tehát, hogy a I_{Na} -ot és az $I_{Ca,L}$ -ot egyszerre regisztrálni tudjuk, egy 80 ms időtartamú -80 mV-ról -40 mV-ig emelkedő feszültség rámpát alkalmaztunk a konvencionális $I_{Ca,L}$ mérési protokoll (200 ms időtartamú +5 mV-ra történő depolarizáló feszültséglépcső) kezdetét megelőzően (8. ábra).

A

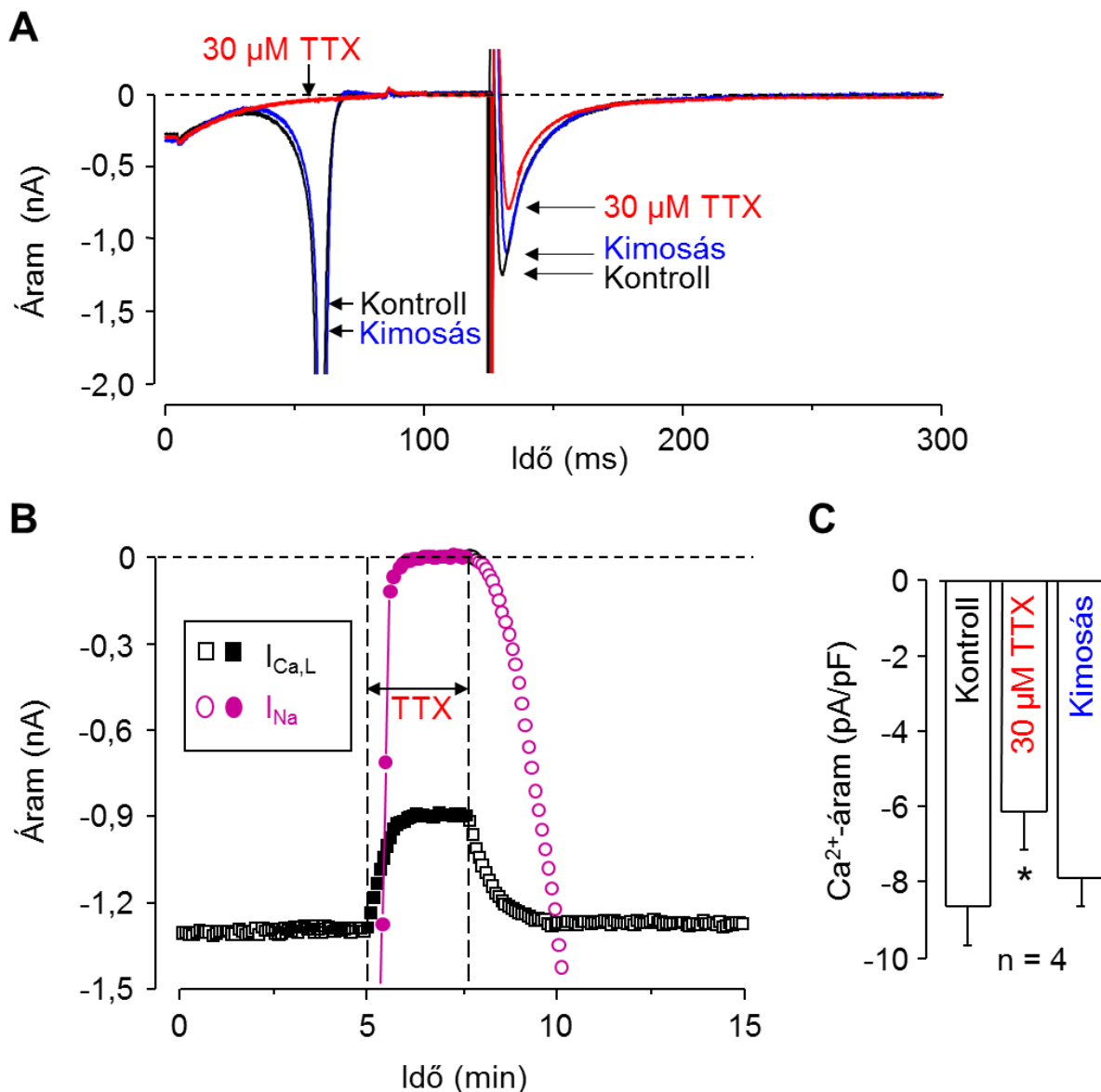


B



8. ábra: A I_{Na} és az $I_{Ca,L}$ szimultán regisztrálása. **(A)** A mérés során egy -80 mV-ról -40 mV-ig tartó feszültség rámpa előzte meg a konvencionális $I_{Ca,L}$ protokollt. **(B)** Egy reprezentatív kontroll kísérlet szemlélteti az egymást követően aktiválódó I_{Na} -ot és $I_{Ca,L}$ -ot. A I_{Na} csúcsértéke kontroll esetben kívül esett a mérési tartományon.

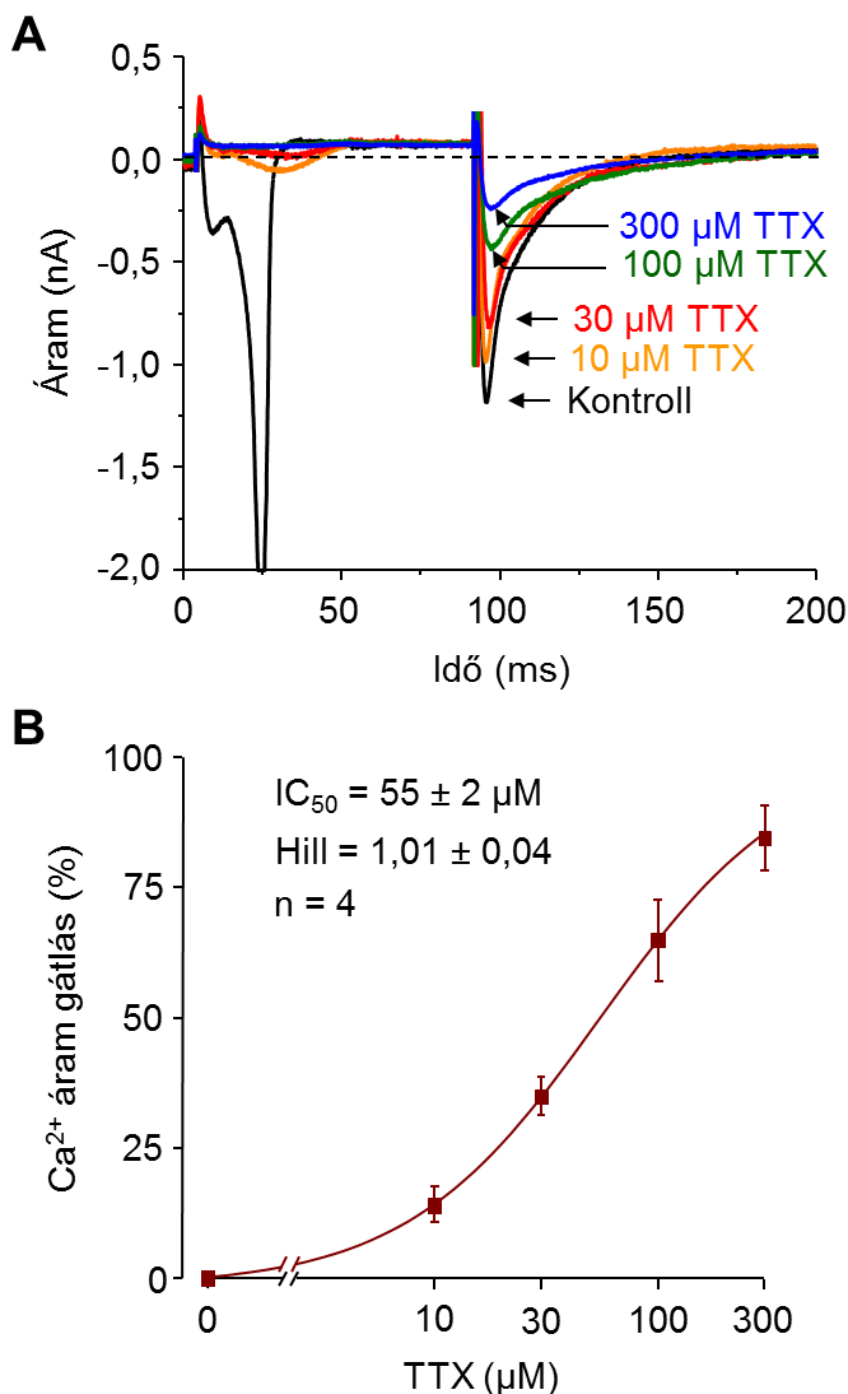
A gyors, feszültségfüggő nátriumcsatornák -40 mV-on inaktiválódnak, így nem zavarják az $I_{Ca,L}$ mérést. Természetesen a I_{Na} csúcsértékét az $I_{Ca,L}$ minél pontosabb rögzítéséhez beállított kísérleti elrendezésünkben nem tudtunk megfelelően meghatározni, de a I_{Na} és az $I_{Ca,L}$ gátlás időviszonyai jól követhetőek voltak ezen feszültségprotokoll alkalmazásakor.



9. ábra: 30 μ M TTX hatása az $I_{Ca,L}$ -ra és a I_{Na} -ra, a hatások időbelisége és reverzibilitása. **(A)** Reprezentatív regisztrátum mutatja 30 μ M TTX hatását a szimultán módon felvett $I_{Ca,L}$ -ra és I_{Na} -ra, valamint a hatás reverzibilis voltát a kimosás után. **(B)** A TTX okozta áramgátlások időbeli kialakulása és megszűnése. Az üres szimbólumok Tyrode oldatban, a teli szimbólumok 30 μ M TTX-ban rögzített áramamplitúdóknak felelnek meg. **(C)** Az oszlopok az $I_{Ca,L}$ amplitúdó négy sejten mért értékét fejezik ki (átlag $\pm$ SEM). Csillaggal a szignifikáns változást jelöltük.

Először a TTX hatását egy olyan viszonylag magas koncentrációban (30 μ M) vizsgáltuk, amennyit ugyanakkor gyakorta használnak különböző vizsgálatokban a szív nátriumáramának teljes gátlására. Amint azt a 9. ábra mutatja, 30 μ M TTX gyakorlatilag

nullára csökkentette a I_{Na} -ot, azonban az $I_{Ca,L}$ -ot is szignifikáns módon gátolta. Ezen események időben teljesen szinkron történtek hasonlóan a I_{Na} és az $I_{Ca,L}$ visszatéréséhez a TTX kimosása során.

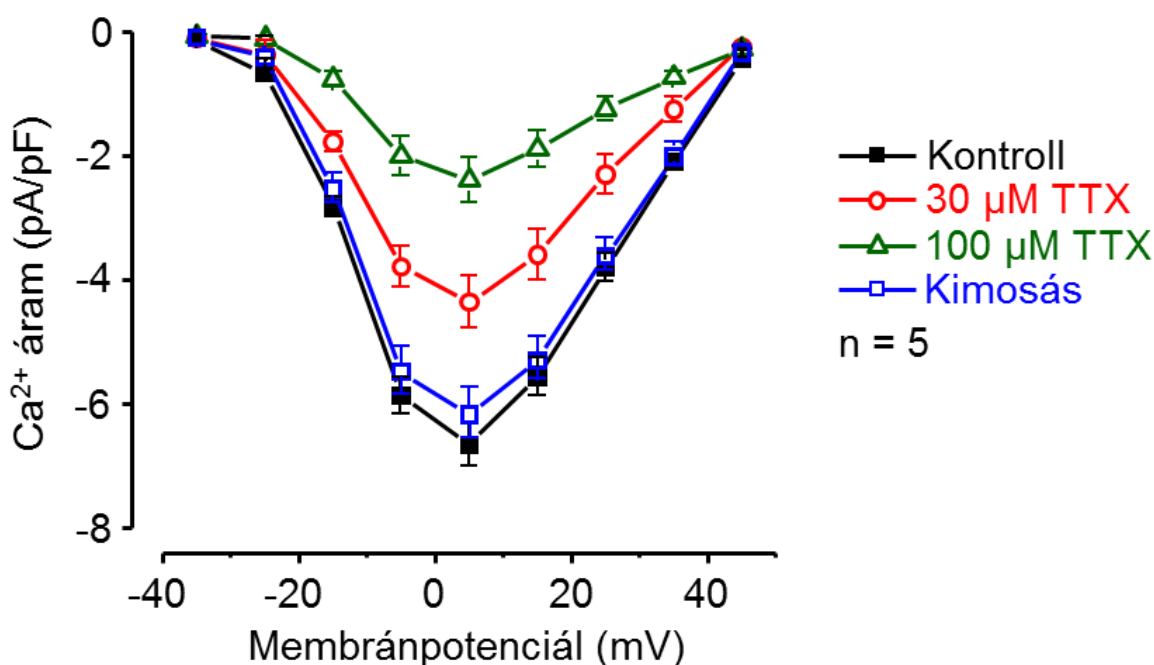


10. ábra: A TTX kumulatív koncentrációfüggő hatása az $I_{Ca,L}$ -ra. **(A)** Reprezentatív áramgörbék Tyrode oldatban és a TTX növekvő koncentrációjának (10 μ M-től 300 μ M-ig) jelenlétében. Szaggatott vonallal a nulla áramot jelöltem. **(B)** Az $I_{Ca,L}$ amplitúdójára kifejtett TTX hatás négy szívizomsejten mért értékének átlaga. A folytonos vonal a Hill egyenlettel való illesztés, amelynek eredményei, azaz a IC_{50} érték és a Hill koefficiens feltüntetésre kerültek az ábrán. A szimbólumok és sávok az átlag $\pm$ SEM értékét mutatják.

Az $I_{Ca,L}$ amplitúdója a kontroll $8,61 \pm 1,09$ pA/pF értékről $30 \mu\text{M}$ TTX perfúzióját követően $6,08 \pm 1,05$ pA/pF-ra csökkent ($n=4$, $p<0,01$). Ugyanakkor fontos azt hangsúlyozni, hogy a TTX által kiváltott $I_{Ca,L}$ gátlás szinte teljesen reverzibilisnek bizonyult minden alkalommal. A TTX-t emelkedő koncentrációban alkalmazva izolált kamrai szívizomsejteken, a TTX progresszívan gátolta az $I_{Ca,L}$ -ot, amint az a 10. ábrán szerepel. Amikor négy sejten mért értékek átlagát Hill egyenlettel (1. egyenlet) illesztettük, a IC_{50} értékre $55 \pm 2 \mu\text{M}$ -t kaptunk. A Hill koefficiens megközelítőleg 1-es értéke ($1,01 \pm 0,04$) a TTX egy kötőhelyét sugallja a Ca^{2+} csatornán.

6.1.2. A TTX hatása az $I_{Ca,L}$ feszültségfüggésére

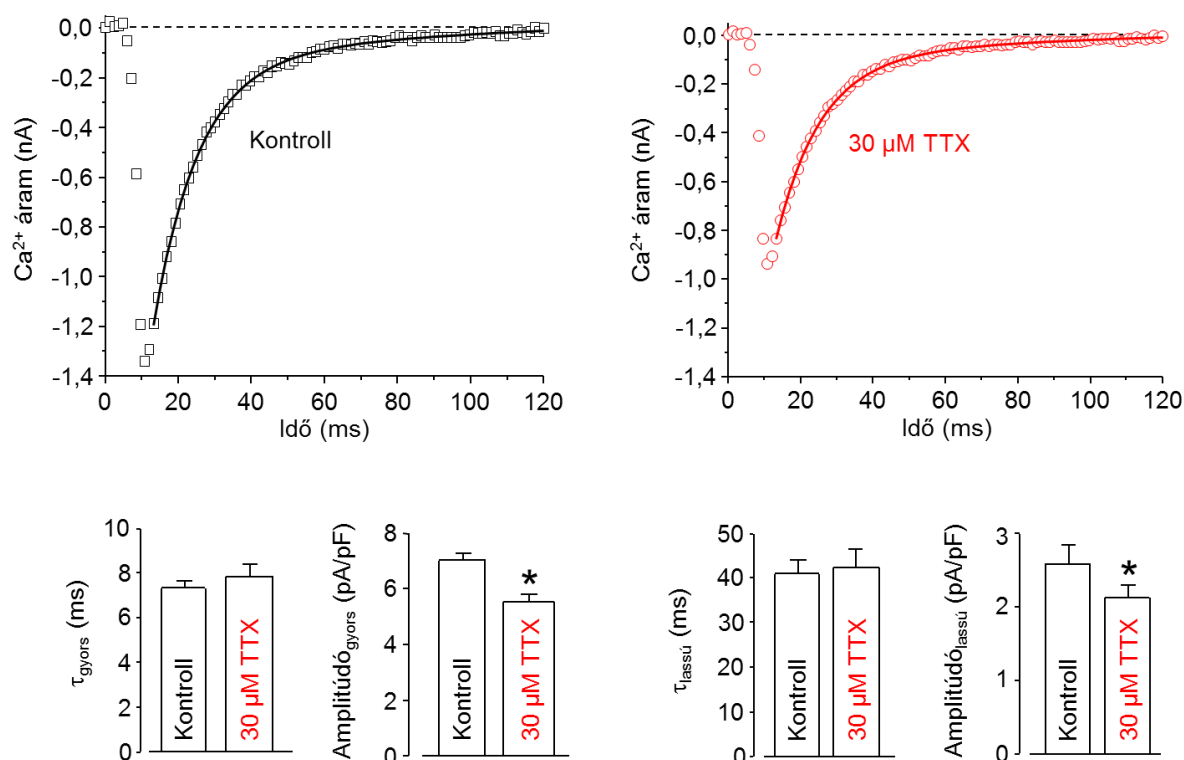
Mivel számos gátlószer úgy fejt ki hatását, hogy a csatornán folyó áram feszültségfüggését pozitívabb membránpotenciálok felé tolja el, ezért megvizsgáltuk a TTX hatását az L-típusú kalciumáram feszültségfüggésére. A TTX szignifikánsan csökkentette a csatornán átfolyó áram amplitúdóját a vizsgált potenciálértékeken (-35 mV-tól $+45$ mV-ig, 10 mV-os feszültséglépcsőkkel), azonban annak áram-feszültség karakterisztikáját nem változtatta meg, tehát a maximális áramamplitúdó a kontroll viszonyokhoz hasonlóan $+5$ mV-nál volt mérhető (11. ábra).



11. ábra: A TTX hatása az L-típusú kalciumcsatornák áram-feszültség karakterisztikájára. A szívizomsejteken mért áramamplitúdók a megfelelő feszültségérték függvényében ábrázolva kontroll körülmények között, 30 és $100 \mu\text{M}$ TTX jelenlétében, valamint a TTX kimosását követően normál Tyrode oldatban (átlag $\pm$ SEM).

6.1.3. A TTX hatása az $I_{Ca,L}$ inaktivációs kinetikájára

Az $I_{Ca,L}$ inaktivációja az irodalmi adatoknak megfelelően biexponenciális kinetikát követett, ennek megfelelően a szer $I_{Ca,L}$ inaktivációjának időfüggésére kifejtett hatását az áram biexponenciális illesztésével jellemeztük (2. egyenlet). Az inaktiváció időkonstansainak értékében nem volt megfigyelhető változás, azonban 30 μ M TTX szignifikánsan csökkentette mind a gyors, mind a lassú komponens amplitúdóját (12. ábra).



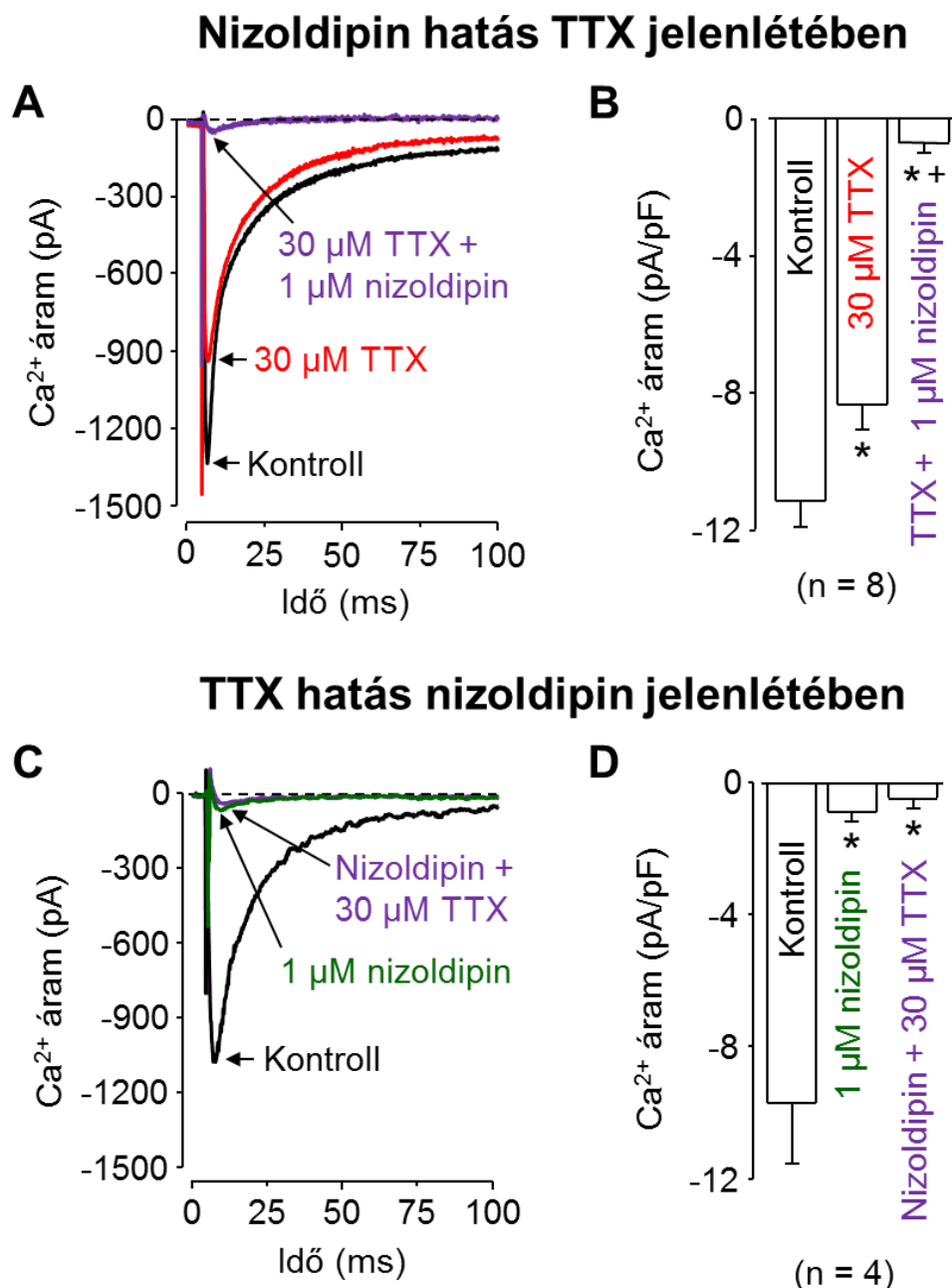
12. ábra: Az $I_{Ca,L}$ inaktivációja két exponenciális komponens összegeként került illesztésre. Az oszlopok és a sávok az átlag $\pm$ SEM-et, míg a csillagok a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ($p<0,05$) változást jelölik ($n=7$).

Az inaktiváció gyors és lassú komponensének időállandója kontroll esetben $7,41\pm0,45$ ms és $40,21\pm4,26$ ms volt, míg 30 μ M TTX perfúzióját követően $7,74\pm0,65$ ms-ot és $42,30\pm6,36$ ms-ot kaptunk ($n=7$, N.S.). Ugyanakkor ezen komponensek amplitúdói a kontroll esetben mért $6,94\pm0,44$ pA/pF és $2,58\pm0,58$ pA/pF-ről 30 μ M TTX alkalmazását követően $5,74\pm0,36$ pA/pF és $2,09\pm0,48$ pA/pF-ra csökkentek ($n=7$, $p<0,05$).

6.1.4. Nizoldipin alkalmazása az áram eredetének igazolására

Lényegbevágó annak ismerete, hogy a kísérleti körülmények között regisztrált áram valóban L-típusú Ca^{2+} áram. Ennek bebizonyítására 30 μ M TTX hatását a potens és kiemelkedő szelektivitású $I_{Ca,L}$ gátló nizoldipin (Sanguinetti és Kass, 1984) jelenlétében

vizsgáltuk. Az $I_{Ca,L}$ részleges ($30\ \mu\text{M}$) TTX általi gátlása után fennmaradó áramot $1\ \mu\text{M}$ nizoldipin szinte teljes mértékben gátolta (13. ábra A és B). Egy másik kísérletsorozatban a nizoldipin ($1\ \mu\text{M}$) az $I_{Ca,L}$ 93 %-át gátolta, és a TTX nizoldipin jelenlétében már nem változtatta meg szignifikánsan az áram amplitúdóját (13. ábra C és D).

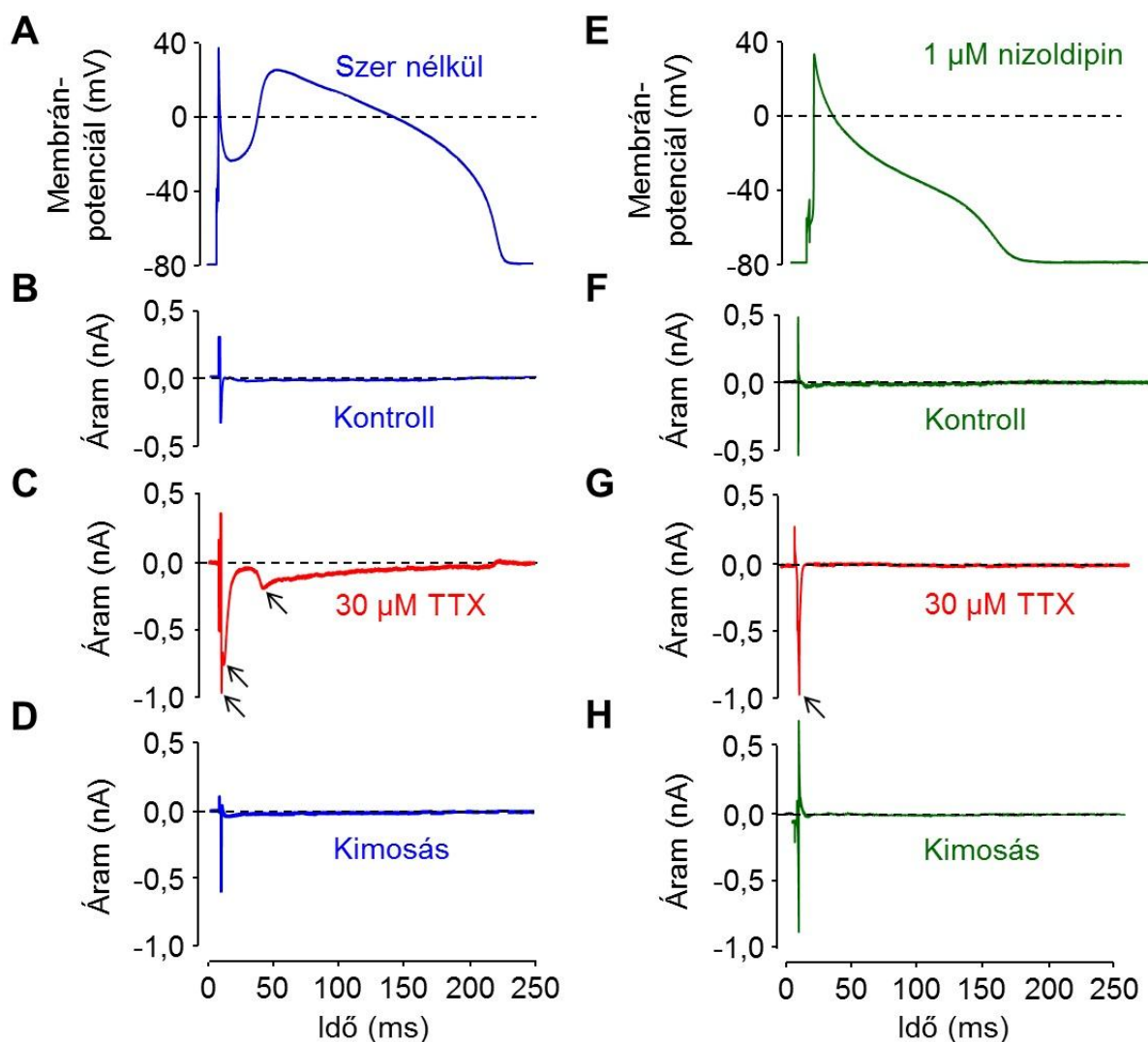


13. ábra: Nizoldipin ($1\ \mu\text{M}$) és TTX ($30\ \mu\text{M}$) gátló hatása az $I_{Ca,L}$ -ra. Az ábrán egymásra vetített $I_{Ca,L}$ regisztrátumok (A, C) és átlagolt adatok (B, D) szerepelnek. Az (A) és (B) panelen szereplő kísérletek során először TTX-t alkalmaztunk, majd a fennmaradó áramot nizoldipinnel gátoltuk, míg a (C) és (D) panelen bemutatott kísérletekben a TTX-t nizoldipin előkezelés után alkalmaztunk. Az oszlopok és a sávok az átlag $\pm$ SEM-et, míg a csillagok a kontrollhoz viszonyított szignifikáns ($p < 0,05$) változást jelölik. A plusz jel a $30\ \mu\text{M}$ TTX jelenlétében mért $I_{Ca,L}$ amplitúdóhoz viszonyított szignifikáns eltérést mutatja.

6.1.5. TTX-érzékeny áram az akciós potenciál alatt (AP-clamp eredmények)

Egy ionáram profilja feltűnően különbözhet, amikor azt konvencionális feszültség-clamp és akciós potenciál-clamp körülmények között összehasonlítjuk (Linz és Meyer, 2000). Az akciós potenciál feszültség-clamp technika egyik előnye, hogy lehetővé teszi számunkra egy adott szívműködési sejtben a saját akciós potenciálja alatt folyó valódi áramprofil rögzítését.

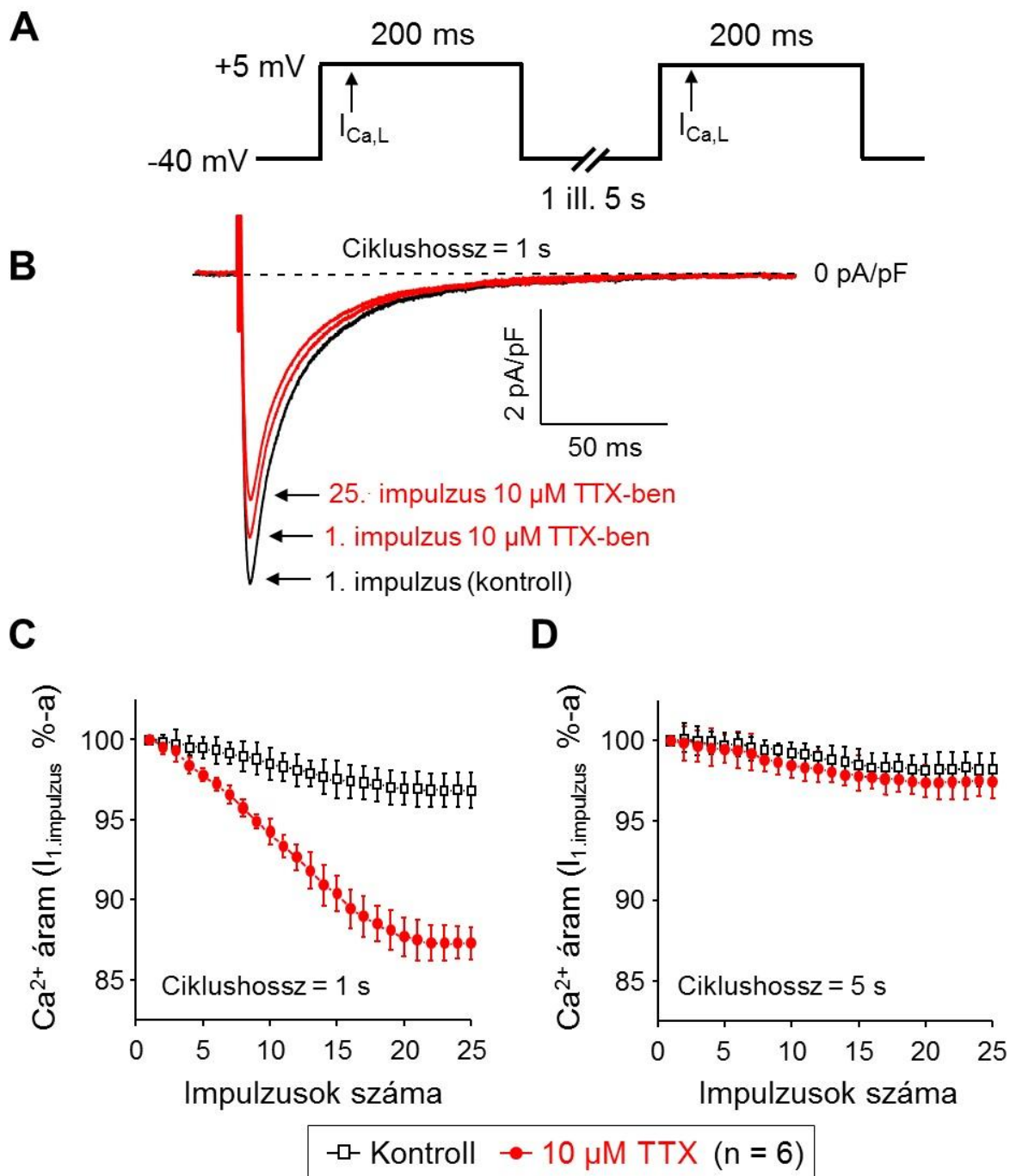
Az akciós potenciál-clamp technikával végrehajtott mérés során először áram-clamp módban rögzítettük egy szubepikardiális szívműködési sejt akciós potenciálját (14. ábra A), majd feszültség-clamp módba váltva ezt alkalmaztuk feszültségparancsként. Ennek során a kontroll görbén az ingerlési artefaktum kivételével egy megközelítőleg nulla amplitúdójú áramot kaptunk (14. ábra B), tehát semmilyen áramra nem volt szükség ahhoz, hogy a sejt fenntartsa saját akciós potenciálját. A 30 μM TTX alkalmazásakor kapott áramgörbén két befelé irányuló (inward) áramcsúcsot figyelhetünk meg (14. ábra C). Az első befelé irányuló áramcsúcsnak további 2 komponensét lehetett elkülöníteni: az egyik a gyors nátriumcsatornák gátlásának a következménye, a másik pedig az L-típusú kalciumcsatorna gátlására jellemző mintázatot mutat. Az akciós potenciál plató fázisára eső második áramcsúcs létrejöttében ugyanakkor kizárólag az L-típusú kalciumcsatorna játszhat szerepet. A munkacsoportunk korábban megállapította, hogy a kétesúcsú kalciumáram a szubepikardiális kamrai szívműködési sejtek jellemző tulajdonsága (Bányász és mtsai., 2003). A TTX kimosását követően mindkét befelé irányuló áramcsúcs eltűnt, tehát amint az a konvencionális feszültség-clamp kísérletek során már látható volt (9. ábra), a TTX ezen hatása teljesen reverzibilis (14. ábra D). Ezt követően megismételtük a kísérletet az $I_{\text{Ca,L}}$ egyik legszelektívebb gátlószerének tartott nifedipin (1 μM) jelenlétében, az ekkor rögzített akciós potenciál az 14. ábra E részén látható. Ezt alkalmazva parancsjelként ugyancsak nulla áramjelet kaptunk (14. ábra F). Majd 30 μM TTX alkalmazásakor csak egy igen keskeny befelé irányuló áramot figyelhetünk meg, amely a nátriumáram gátlásának felel meg (14. ábra G). A TTX hatása ekkor is kimoshatónak bizonyult (14. ábra H). Ezen eredmények határozottan alátámasztják azon feltételezésünket, hogy a kutya kamrai sejtekben talált TTX-érzékeny áram ténylegesen tartalmaz $I_{\text{Ca,L}}$ komponenst is.



14. ábra: 30 μM TTX hatása a nettó membránáramra akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között kontroll esetben (A-D) és 1 μM nifedipin jelenlétében (E-H). Reprezentatív akciós potenciál parancsjelek (A és E), azok alkalmazása során kapott áramjelek a TTX perfúziója előtt (kontroll, B és F), a TTX perfúziója során (C és G), valamint a TTX kimosását követően (D és H). Mivel az ionáramot ugyanazon sejten mértük, amely a parancsjelként alkalmazott akciós potenciált is szolgáltatta, a szer előtti (kontroll) áramgörbék egy 0 értékű vízszintes vonalban helyezkedtek el. Az ábrákon a szaggatott vonal a nulla áramértéket jelöli, kivéve az akciós potenciál regisztrátumokat, ahol a nulla feszültségértéket.

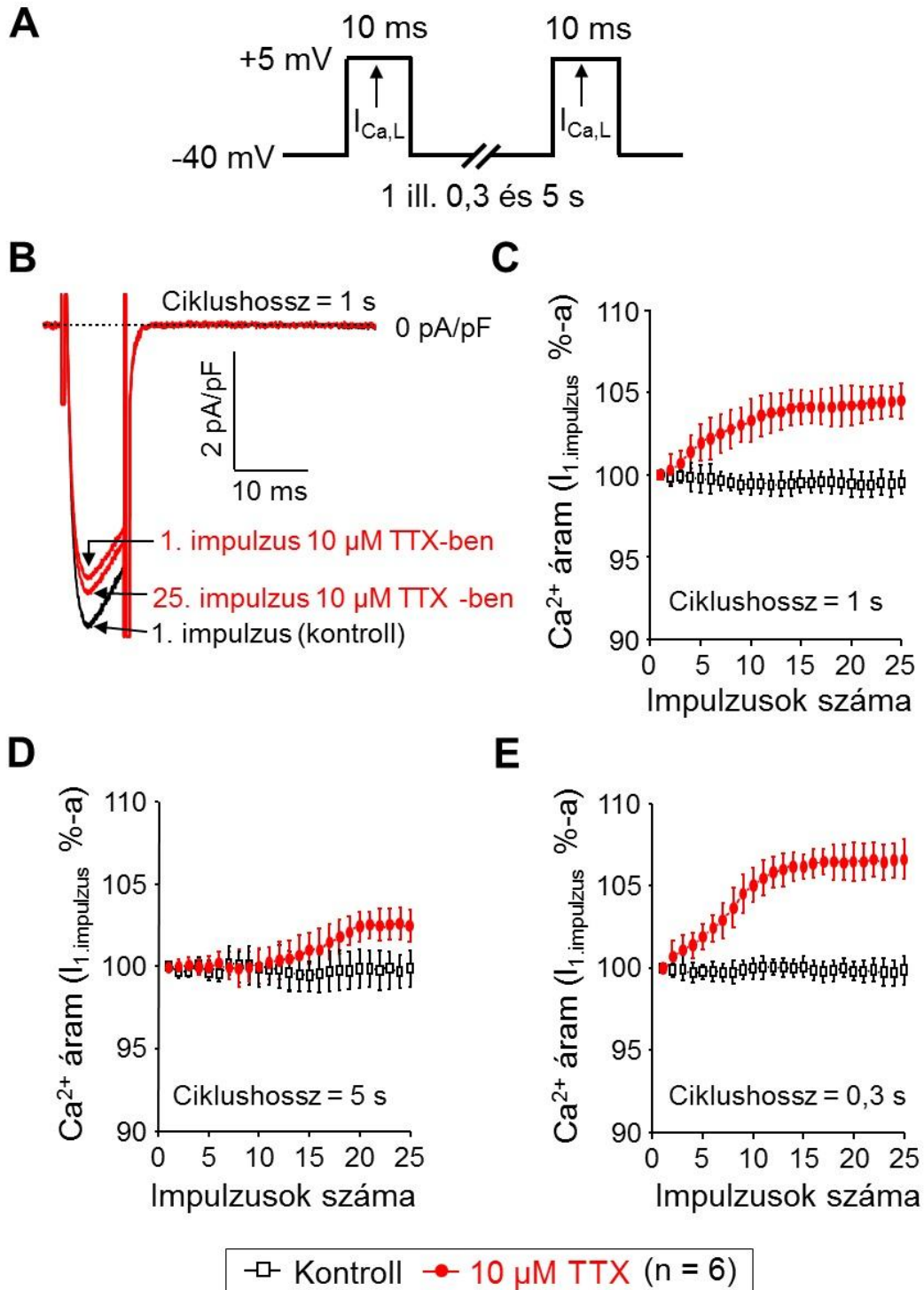
6.2. A TTX okozta $I_{Ca,L}$ gátlás használatfüggő (use-dependens) jellege

Az eddigi kísérletek során az $I_{Ca,L}$ -ot 200 ms hosszú depolarizáló impulzussal váltottuk ki 0,2 Hz-es frekvencián. Más szóval a stimulusok ismétlődése között eltelt idő 5 másodperc volt. Ez elég hosszú időintervallum ahhoz, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatornák inaktivációból aktiválható állapotba való visszatérése teljes legyen, ezért a TTX ezen körülmények között megfigyelt hatását úgy tekinthetjük, mint a tónusos gátlás nagyságát. Ennek megfelelően, ezen az alacsony frekvencián az $I_{Ca,L}$ amplitúdó lényegében nem változott az 1 perces ingerlésmentes periódust követően alkalmazott első 25 impulzus során kontroll körülmények között, illetve TTX jelenlétében ($2,0 \pm 1,0$ % és $2,8 \pm 1,1$ % csökkenés, $n=6$, nem szignifikáns eltérés), amint azt a 15. ábra D része is mutatja. Azonban amikor az ingerlési ciklushosszat 1 másodpercre csökkentettük, egy szignifikáns frekvenciafüggő gátlás alakult ki a kezdeti 25 impulzus során $10 \mu M$ TTX jelenlétében. A frekvenciafüggő gátlás nagysága $12,7 \pm 1,0$ % volt szemben a TTX alkalmazása nélkül megfigyelhető $4,3 \pm 1,1$ %-os $I_{Ca,L}$ amplitúdó csökkenéssel (15. ábra C, $p < 0,05$, $n=6$). Az ekkor alkalmazott 200 ms hosszúságú impulzusok nem tették lehetővé a TTX hatásának vizsgálatát nagyobb ingerlési frekvenciák mellett, ezért arra rövid, csupán 10 ms hosszúságú depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk kontroll körülmények között és TTX jelenlétében. Meglepetésre, e rövid impulzusok $10 \mu M$ TTX jelenlétében $I_{Ca,L}$ frekvenciafüggő növekedését okozták, viszont kontroll körülmények között semmiféle változás nem volt megfigyelhető (16. ábra C-E). Az $I_{Ca,L}$ amplitúdó növekedése nagyobb volt magasabb ingerlési frekvenciáknál: 5 s, 1 s és 0,3 s ciklushosszak alkalmazásakor sorrendben $2,1 \pm 1,1$ %-ot, $3,9 \pm 1,2$ %-ot és $6,3 \pm 1,2$ %-ot ért el. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TTX a tónusos gátláson felül egy frekvenciafüggő gátlást is kivált, jöllehet, ennek a gátlásnak a nagysága a tónusos komponenshez képest viszonylag mérsékelt volt. Még fontosabb, hogy a TTX által kiváltott $I_{Ca,L}$ gátlás úgy tűnik, hogy a nyugalmi és inaktivált csatornaállapotokra korlátozódik, mivel a csatorna gyakori nyitása (magas frekvenciájú rövid depolarizáló impulzusok alkalmazásával) a gátlás csökkenését eredményezte. Ez arra utal, hogy a TTX affinitása a nyitott csatorna állapot iránt feltűnően alacsonyabb.



15. ábra: A TTX $I_{Ca,L}$ -ra kifejtett hatásának frekvenciafüggése (használatfüggő gátlás).

(A) Az ingerlő feszültség impulzusokat 1 perces nyugalmi (ingerlésmentes) periódust követően különböző ciklushosszak mellett alkalmaztuk, amint az a megfelelő ábrarészekben is szerepel. Az impulzus szélesség 200 ms volt a kísérletek során. (B) Egymásra vetített, reprezentatív $I_{Ca,L}$ regisztrátumok 1 Hz-es ingerlési frekvencián. A (C) és (D) paneleken az első 25 pulzus során mért $I_{Ca,L}$ amplitúdókat tüntettük fel kontroll körülmények között (fekete üres négyzetek) és 10 μ M TTX perfúzióját követően (piros teli körök) 1 Hz-es (C) és 0,2 Hz-es (D) ingerlési frekvencián. Az $I_{Ca,L}$ nagyságát az első pulzus során mért áram amplitúdójának százalékában fejeztük ki.

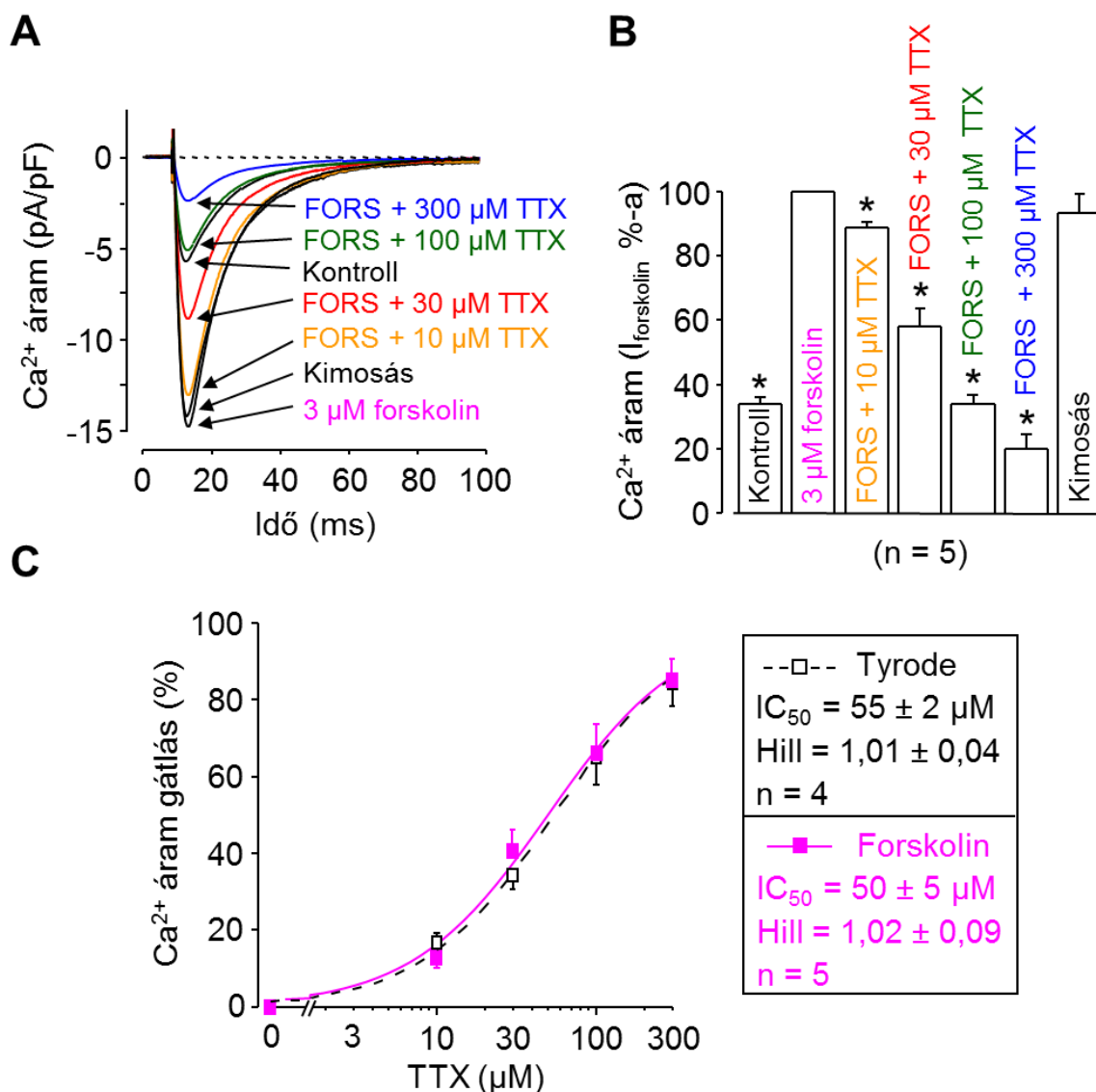


16. ábra: A TTX $I_{Ca,L}$ -ra kifejtett használatfüggő (use-dependens) gátlása rövid ingerlő impulzusok (10 ms) alkalmazásával. (A) Az ingerlő feszültség impulzusokat 1 perces nyugalmi (ingerlésmentes) periódust követően különböző ciklushosszak mellett alkalmaztuk, amint az az egyes ábrarészekben is szerepel. Az impulzus szélesség 10 ms volt a kísérletek során. (B) Egymásra vetített, reprezentatív $I_{Ca,L}$ regisztrátumok 1 Hz ingerlési frekvencián. Az első 25 pulzus során mért $I_{Ca,L}$ amplitúdókat tüntettük fel kontroll körülmények között (fekete üres négyzetek) és 10 μ M TTX perfúzióját követően (piros teli körök) 1 Hz-es (C), 0,2 Hz-es (D) és 3,33 Hz-es (E) ingerlési frekvencián. Az $I_{Ca,L}$ nagyságát az első pulzus során mért áram amplitúdójának százalékában fejeztük ki.

6.3. Az $I_{Ca,L}$ modulációjának hatása a TTX általi áramgátlásra

6.3.1. Ioncsatorna foszforiláció hatása a TTX gátlásra

Mivel a csatorna foszforilációja az $I_{Ca,L}$ szabályozásának egyik leghatékonyabb módja számos ingerlékeny és nem-ingerlékeny szövetben, ezért összehasonlítottuk a TTX gátló hatását natív- és protein-kináz A (PKA) által foszforilált kalciumcsatornákon.



17. ábra: Az L-típusú kalciumcsatorna foszforilációjának hatása a TTX által okozott gátlásra. **(A)** Egyásra vetített reprezentatív $I_{Ca,L}$ regisztrátumok vannak feltüntetve a kumulatív növekvő koncentrációban alkalmazott TTX jelenlétében mérve és végül a TTX kimosása a hatás reverzibilitását bizonyítja. A kísérleteket 3 μ M forskolin jelenlétében végeztük. **(B)** A TTX alkalmazásával nyert eredmények átlaga szerepel öt forskolinnal kezelt szívizomsejten. Az $I_{Ca,L}$ maximális amplitúdóját a TTX első alkalmazását megelőzően mért értékre normalizáltuk. Az oszlopok és sávok az átlag $\pm$ SEM értékét, míg a csillagok a TTX-t megelőző kontrollhoz (forskolin) viszonyított szignifikáns különbséget jelölik. **(C)** Kumulatív dózis-hatás görbék mutatják a TTX gátló hatását Tyrode-oldatban (üres négyzet, szaggatott vonal) és forskolin jelenlétében (teli négyzet, folytonos vonal). Az adatokat Hill egyenlettel illesztve határoztuk meg az IC_{50} és a Hill koefficiens értékeit.

A forskolinról ismert, hogy az adenilát-cikláz stabil aktivációját váltja ki, amely a cAMP szint kifejezett emelkedését okozva aktiválja a PKA-t. A PKA felelős a kalciumcsatorna pórusformáló α_1 és a járulékos β alegység foszforilációjáért. Ez a foszforiláció – allosztérikus kölcsönhatásokon keresztül – jelentősen növeli a pórusformáló α_1 csatorna alegység nyitási valószínűségét, míg a szelektivitási filteren kifejtett hatása csekély.

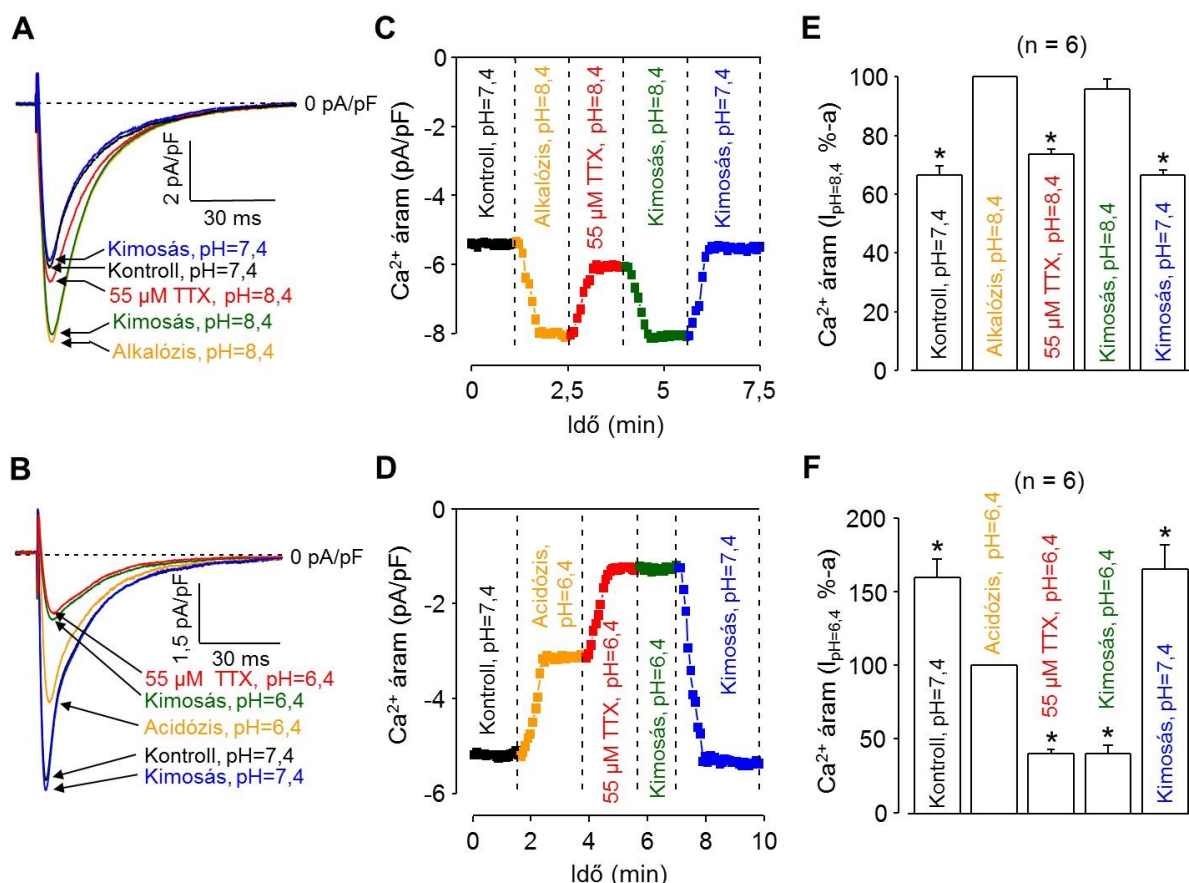
Amint az 17. ábrán látható, 3 μM forskolin szignifikánsan növelte az $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóját ($5,5 \pm 0,4$ pA/pF-ról $16,3 \pm 0,8$ pA/pF-ra, $n=5$). A TTX koncentrációfüggően és reverzibilisen gátolta az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot mind natív, mind forskolinnal kezelt kardiomiocitákon. Az adatokat Hill-egyenlettel (1. egyenlet) illesztve nagyon hasonló IC_{50} értékeket kaptunk: 55 ± 2 μM -t kontroll körülmények között ($n=4$), illetve 50 ± 5 μM -t forskolinban ($n=5$). A Hill-koefficiens értéke mindkét esetben közel 1 volt ($1,01 \pm 0,04$ kontroll állapotban és $1,02 \pm 0,09$ forskolin jelenlétében).

6.3.2. Extracelluláris pH-függés

A kalciumcsatorna TTX-érzékenységeinek bemutatására konstruált modellünk azt vetíti előre, hogy a TTX a csatorna szelektivitási filteréhez kötődik. Pontosabban ez a kapcsolat a csatorna negatívan töltött szelektivitási filter régiója (fiziológiás tartományhoz közeli pH értéken) és a toxin pozitívan töltött guanidin csoportja között jön létre. Következésképpen az elektrosztatikus interakció erősségének változtatása a protonált állapot növelésével vagy csökkentésével a csatorna szelektivitási filter régiójában vagy magában a TTX-ban vélhetően módosítja a TTX által kiváltott gátlás mértékét.

Amint az a 18. ábrán szerepel, az 55 μM TTX által okozott $I_{\text{Ca,L}}$ gátlást (amely a fiziológiás 7,4-es pH érték mellett a dózis-hatás görbe alapján pontosan 50 %) az alkalózis szignifikánsan csökkentette (26 ± 2 %-ra pH=8,4 esetén, $n=6$), míg az acidózis növelte (60 ± 2 %-ra pH=6,4 esetén, $n=6$).

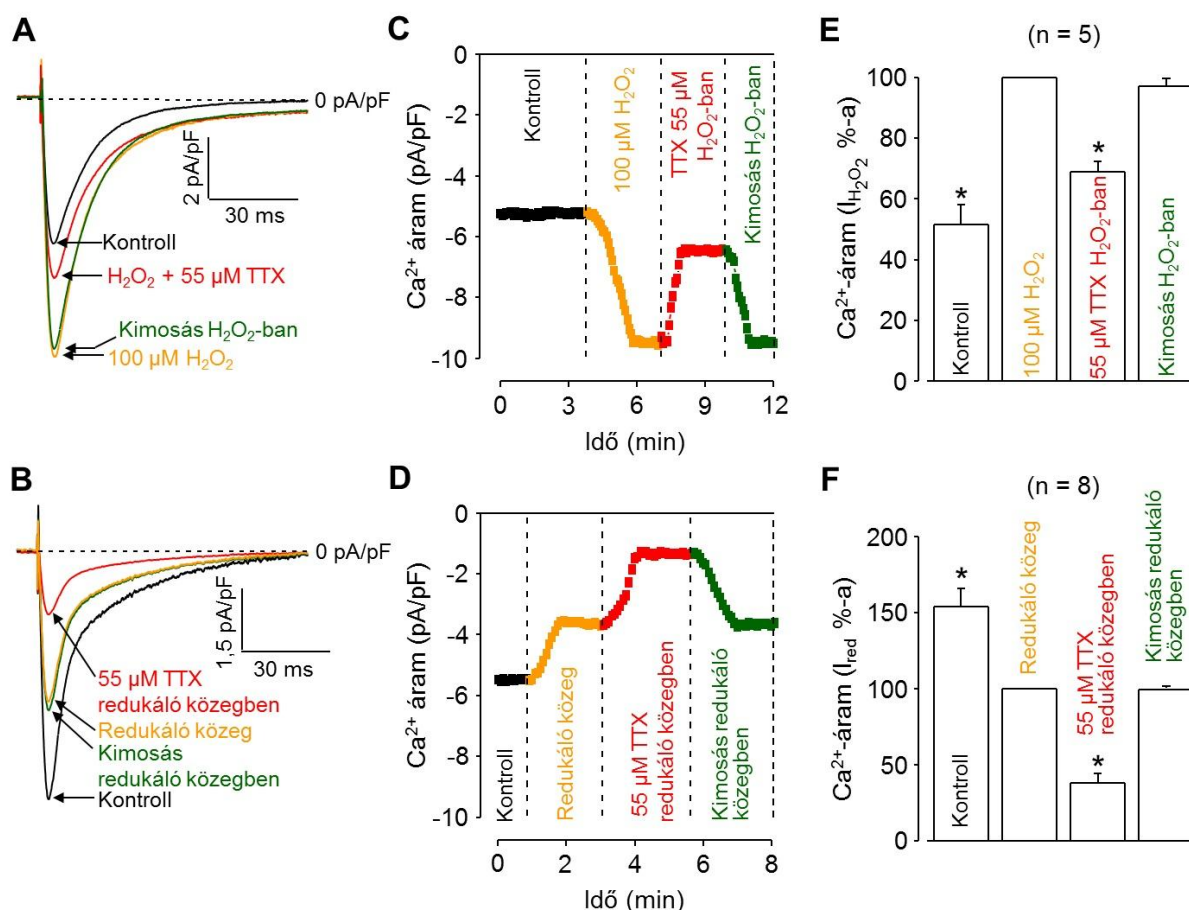
Azt is érdemes megjegyezni, hogy a TTX hatását savas pH mellett nem lehetett kimosni, amely a toxin ilyen körülmények közötti kifejezetten erős kötődését sugallja. Ugyanakkor a gátlás teljes mértékű feloldását eredményezve a TTX eltávolítható volt a csatornáról, amikor a TTX-mentes Tyrode oldat pH-ját végül 7,4-re állítottuk vissza (lásd a 18. ábra D és F részén).



18. ábra: Az extracelluláris alkalózis és acidózis hatása a TTX által kiváltott $I_{Ca,L}$ gátlásra. Egymásra vetített reprezentatív $I_{Ca,L}$ regisztrátumokat (**A**, **B**), az $I_{Ca,L}$ amplitúdójának sejtkapacitásra normalizált időfüggő változását (**C**, **D**) és a TTX alkalmazása előtti körülmény alatt mért amplitúdóra normalizált $I_{Ca,L}$ értékek átlagát (**E**, **F**) tüntettük fel az ábrán. Először Tyrode oldatban 7,4-es pH mellett rögzítettük az áramot, majd a pH-t lúgos vagy savas irányba toltuk el (pH=8,4 illetve pH=6,4), ezt követte az 55 μ M TTX alkalmazása. Végül a TTX-t kimostuk, és a következő lépésben a pH-t a kontroll 7,4-es értékre állítottuk vissza. Az oszlopok és sávok az átlag $\pm$ SEM értékét, míg a csillagok a TTX-t megelőző kontrollhoz (alkalózis illetve acidózis) viszonyított szignifikáns különbséget jelölik.

6.3.3. Redoxpotenciál változtatása

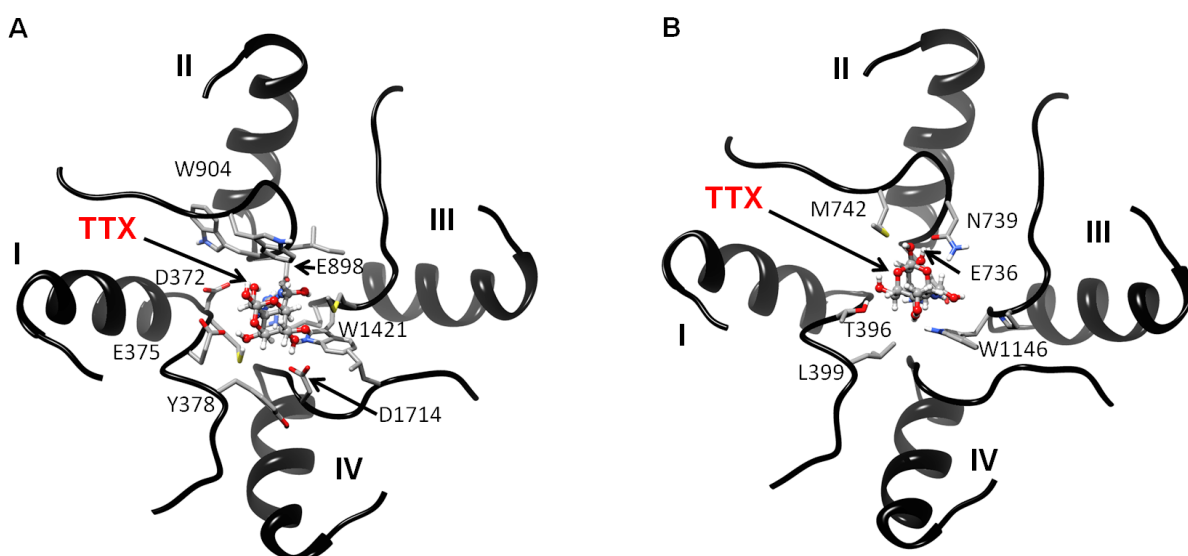
A redoxpotenciál változtatások hatása nagyon hasonló volt ahhoz, ami a pH változtatásánál bemutatásra került, amint a 19. ábrán is megfigyelhető. Ennek megfelelően a 100 μ M H_2O_2 alkalmazásával létrehozott erősen oxidáló környezetben 55 μ M TTX csak 31 ± 3 %-ban gátolta az $I_{Ca,L}$ -ot (19. ábra E, n=5), ellentétben a redukáló környezetben (1 mM redukált glutation + 1 mM aszkorbinsav + 1 mM ditiotritol) megfigyelt 62 ± 6 %-os $I_{Ca,L}$ gátlással (19. ábra F, n=8).



19. ábra: Oxidáló és redukáló külső környezet hatása a TTX által kiváltott $I_{Ca,L}$ gátlásra. Az ábrán egymásra vetített reprezentatív $I_{Ca,L}$ regisztrátumok (**A**, **B**), az $I_{Ca,L}$ amplitúdójának sejtkapacitásra normalizált időfüggő változásai (**C**, **D**) és a TTX alkalmazását megelőző körülmény alatt mért amplitúdóra normalizált $I_{Ca,L}$ értékek átlagai (**E**, **F**) szerepelnek. Először Tyrode oldatban rögzítettük az adatokat, majd oxidálószer (100 μM H_2O_2) vagy redukáló szerek (glutathion+aszorbinsav+ditiotritol, mindegyik 1 mM koncentrációban) jelenlétében. Ezt követte az 55 μM TTX alkalmazása ezen oldatokban. Végül a TTX kimosásra került. Az oszlopok és sávok az átlag $\pm$ SEM értékét, míg a csillagok a TTX-t megelőző kontrollhoz (H_2O_2 illetve redukáló közeg) viszonyított szignifikáns eltérést jelölik.

6.4. A TTX kötődésének modellezése a Na_v1.5 és Ca_v1.2 csatornákhöz

Abból a célból, hogy részleteiben megértsük a feszültségfüggő Ca_v1.2 és Na_v1.5 csatornák TTX általi gátlását, elengedhetetlen információval rendelkezünk a szelektivitási filterük szerkezetéről. Az eredetileg Na_v1.4 csatornákra kidolgozott elméleti modell alapján terveztük meg a TTX-nak a szívizomban leginkább előforduló feszültségfüggő Na⁺ és Ca²⁺ csatorna típusokhoz (Na_v1.5 és Ca_v1.2) való kötődését leíró modelljét. A TTX-Na_v1.5 és a TTX-Ca_v1.2 komplexek szelektivitási filter régiójának geometriája a 20. és 21. ábrán látható horizontális és vertikális metszeti képeken. Bár a TTX Na_v1.5-ben fennálló helyzete némileg eltér attól, amit Tikhonov és Zhorov (2005) a TTX esetén meghatározott a Na_v1.4-ben, a kötődésben kulcsszerepet játszó aminosavak tekintetében mégis jelentős hasonlóság áll fenn köztük. Kötődési modellünkben a TTX guanidin csoportja – a Na_v1.4 csatornákhöz hasonlóan – a Na_v1.5 csatorna szelektivitási filterének D (aszpartát) és E (glutamát) aminosavaihoz kötődik az I-es és II-es doménben (20. ábra A és 21. ábra A).

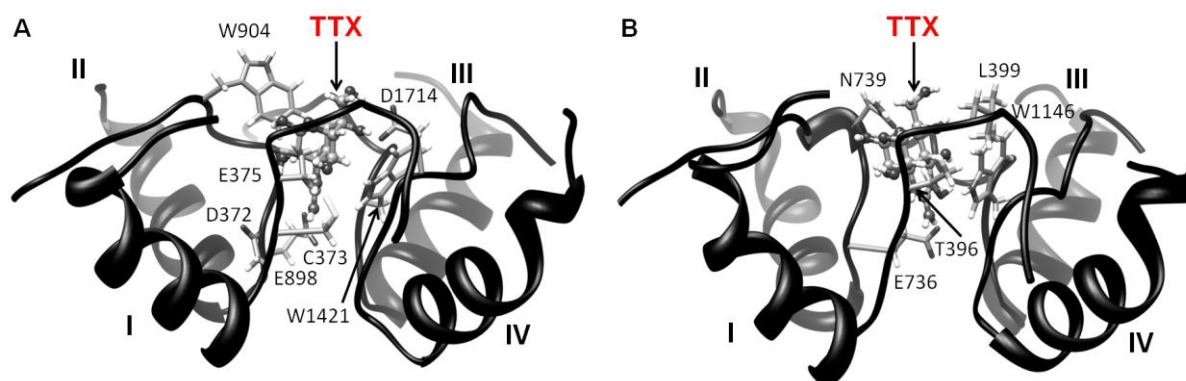


20. ábra: A TTX és a Na_v1.5 (A), valamint Ca_v1.2 (B) feszültségfüggő ioncsatornák szelektivitási filter régiójának szerkezeti struktúrája felülnézeti képen. Az ábrán csak a P-hurok domének (spirál ábrázolásban), a P-hurok domének TTX-kötésben részt vevő aminosav oldalláncai (pálcika ábrázolásban) és maga a TTX molekula (gömb és pálcika ábrázolásban) került feltüntetésre. Az oldalláncok számozása megfelel a metioninnal kezdődő aminosav szekvenciabeli sorszámnak.

A szelektivitási filter régió további savas aminosavai szintén hozzájárulhatnak a ligand megkötéséhez direkt vagy indirekt módon, amint az a 20. ábrán szerepel. Ez a kapcsolat a ligand kötődés üregében egy negatív elektrosztatikus potenciál képződésével valósul meg. A TTX hidrofób oldala a triptofán oldalláncával kerül kölcsönhatásba, amely triptofán

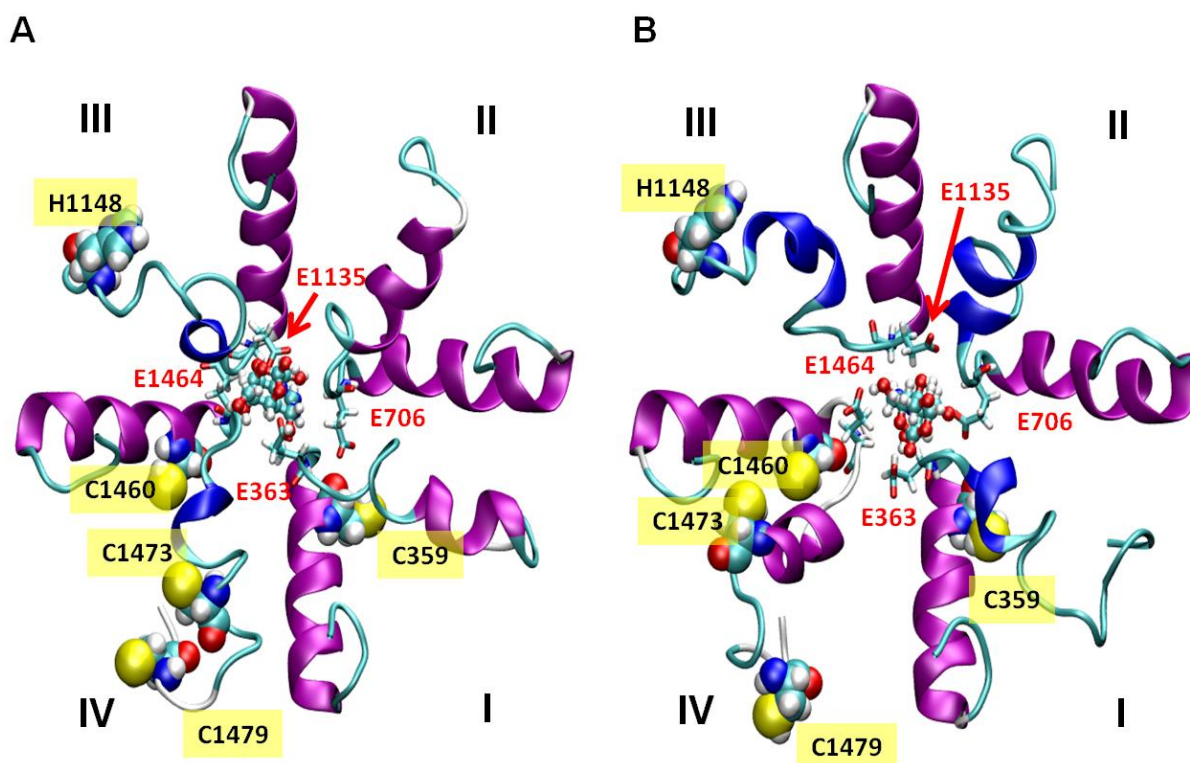
aminosavak (W904, W1421) feltételezhetően az ion áthaladásban is szerepet játszanak (20. ábra A és 21. ábra A).

Annak ellenére, hogy a $\text{Ca}_v1.2$ szelektivitási filter régiójának erősen konzervált EEEE gyűrűje még inkább savi karakterű, csak egy E (glutamát) képes sóhidat kialakítani a TTX-nal (E736), amikor az a $\text{Ca}_v1.2$ -höz kötődik (20. ábra B és 21. ábra B). Ezen kívül még egy, a már említett glutamátot követő aszpartát oldallánc (mindkettő a II-es doménben) járulhat hozzá a TTX megkötéséhez. Néhány további aminosav is részt vehet a TTX receptorhelyének kialakításában, azonban az ő hozzájárulásuk kevésbé tűnik fontosnak. Meg kell említeni azt is, hogy a konzervált triptofán aminosavaknak (W1145, W1146) nem elhanyagolható szerepük lehet a ligand kötődési üreg kialakításában és/vagy a ligand kötésének lipofil kölcsönhatásában (20. és 21. ábra). A modellünk szerint az is nyilvánvaló, hogy a TTX molekulával direkt kapcsolatba kerülő funkciós csoportok száma a $\text{Ca}_v1.2$ esetén kisebb, mint a $\text{Na}_v1.5$ -nél. Ezen eredmények egy gyengébb kölcsönhatást jósolnak a $\text{Ca}_v1.2$ és a TTX között, mint a $\text{Na}_v1.5$ és a TTX komplexében, amely végső soron a TTX $\text{Ca}_v1.2$ -vel szembeni csökkent gátló hatékonyságát eredményezi.



21. ábra: A TTX és a $\text{Na}_v1.5$ (A), valamint $\text{Ca}_v1.2$ (B) feszültségfüggő ioncsatornák szelektivitási filter régiójának szerkezeti struktúrája oldalnézeti képen. Az ábrán csak a P-hurok domének (spirál ábrázolásban), a P-hurok domének TTX-kötésben részt vevő aminosav oldalláncai (pálcika ábrázolásban) és maga a TTX molekula (gömb és pálcika ábrázolásban) került feltüntetésre. Az oldalláncok számozása megfelel a metioninnal kezdődő aminosav szekvenciabeli sorszámnak.

Mivel a TTX molekula leginkább savi karakterű OH-csoportjának pK_a értéke (8,7) viszonylag közel esik a kísérleteink során alkalmazott 6,4 – 8,4-es pH tartományhoz, így a TTX-nak mind a protonált formáját (azaz a protonált guanidin csoportja és a C-10-es pozíciójű semleges OH-csoportja következtében pozitív töltésű alakját), mind a semleges formáját (a TTX guanidin csoportja még protonált, viszont a C-10-es pozíciójű OH-csoport deprotonált $[-\text{O}^-]$) figyelembe vettük a számítások során (22. ábra).

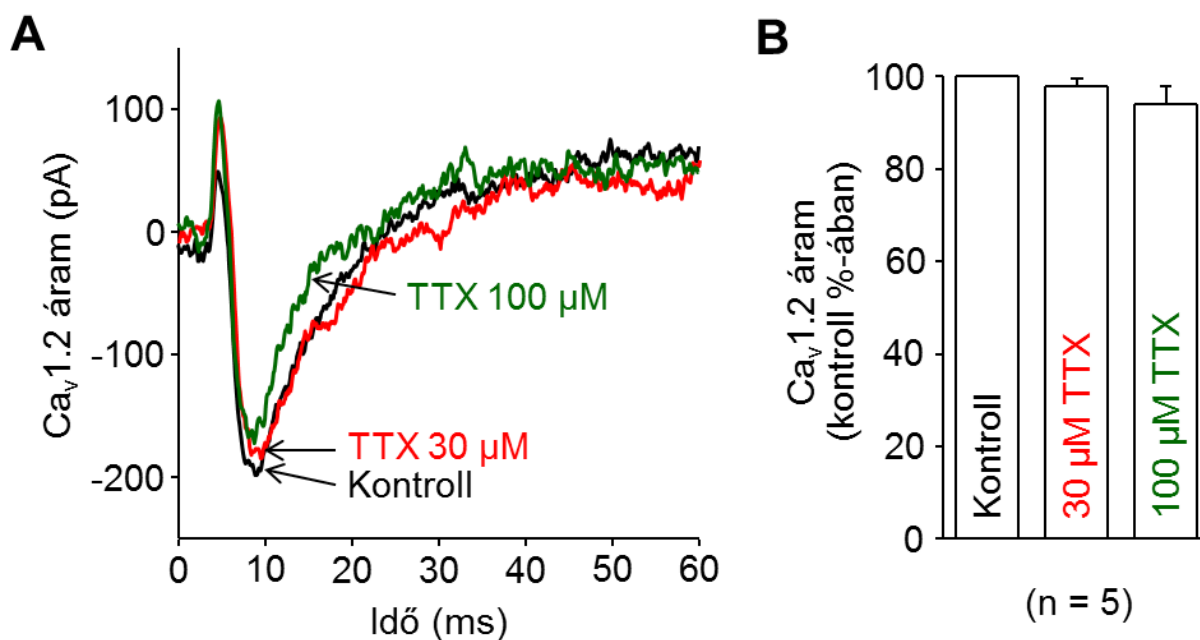


22. ábra: Az L-típusú Ca^{2+} csatorna szelektivitási filter régiójának és a TTX pozitív töltésű és neutrális formájának kapcsolatáról készült szimulációs modell reprezentatív szerkezeti felvételei. A TTX pozitív töltésű alakjában (A) a guanidin csoport protonált és a C-10-es pozíciójú OH-csoport nem disszociált, míg a neutrális formában (B) a guanidin csoport ugyancsak protonált, viszont a C-10-es pozíciójú OH-csoport hidrogénje disszociált, O^- -t eredményezve. A doméneket római számokkal jelöltük. A szelektivitási filter EEEE gyűrűje és a TTX molekula gömb és pálcika bemutatásban szerepel. A His és Cys aminosavak helyzetét ezen aminosavakat felépítő atomok van der Waals szférája jelöli. Az aminosavak számozása az UNIPROT adatbázisból nyert humán L-típusú $\text{Ca}_v1.2$ csatorna szekvenciáján alapszik.

A dokkolási kísérletek felderítették, hogy a TTX mindkét állapotában a szelektivitási filterhez kötődik, azonban a kötés erősebb (8,22 kcal/mol vs. 7,55 kcal/mol), amikor a TTX pozitívan töltött, vagyis amikor a proton nem disszociált a C-10-es pozíciójú OH-csoportról. Ez a dominánsan negatív töltésű szelektivitási filter következtében jöhet létre. A dokkolt konformációkból indított molekuláris dinamikai szimulációk megerősítik a dokkolás során kapott eredményeket, mivel a komplexek stabilak maradtak a 65 ns-os szimulációs periódus alatt.

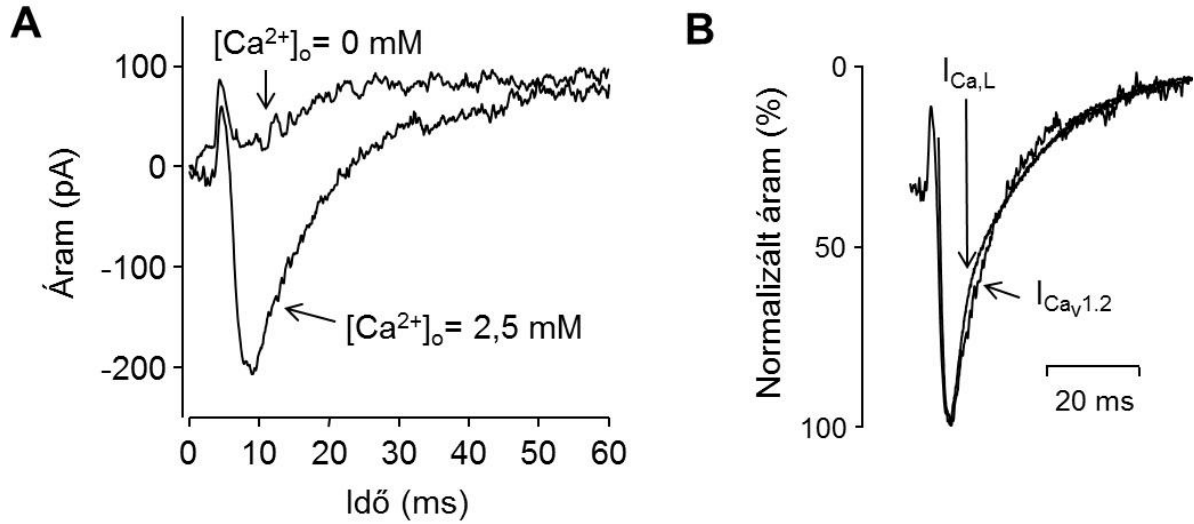
6.5. A TTX nem gátolja a HEK sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák áramát

Meglepő módon, amint az a 23. ábrán is megfigyelhető, a TTX nem váltott ki semmiféle gátló hatást CACNA1C génnel transzfektált, $\text{Ca}_v1.2$ csatornákat expresszáló HEK tsA-201 sejteken, amely egy új szint hoz a már eddig is változatos palettába. A $\text{Ca}_v1.2$ áram 30 és 100 μM TTX perfúzióját követően a kontroll érték $97,81 \pm 1,75\%$ -a és $94,06 \pm 3,87\%$ -a volt (nem szignifikáns eltérés, $n=5$).



23. ábra: A TTX hatása HEK tsA-201 sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák áramára. **(A)** $\text{Ca}_v1.2$ csatorna pórusformáló α_1 alegységet expresszáló HEK tsA-201 sejten rögzített, egymásra vetített reprezentatív áramgörbék kontroll körülmények között, valamint 30 μM és 100 μM TTX jelenlétében. **(B)** Átlagolt $\text{Ca}_v1.2$ áram amplitúdók TTX alkalmazásakor a transzfektált HEK tsA-201 sejteken. A TTX nem gátolta a $\text{Ca}_v1.2$ áramot még 100 μM -os koncentrációban sem ($n=5$). Az oszlopok és a hibásávok az átlag $\pm$ SEM értékét mutatják. A változások nem voltak statisztikailag szignifikánsak.

A vizsgált áram L-típusú kalciumáram eredetét erősíti meg, hogy az áram valóban Ca^{2+} ionok mozgása következtében jött létre, mivel a Ca^{2+} külső oldatból való eltávolítását követően az áram nagysága nagymértékben csökkent (24. ábra A). Továbbá a natív szívizomsejteken mérhető $I_{\text{Ca,L}}$ és a $\text{Ca}_v1.2$ áram kinetikájának összehasonlításakor az áram amplitúdók normalizálását követően meglehetősen jó átfedést kaptunk (24. ábra B). Ez azt sugallja, hogy a transzfektált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák áramának sok tulajdonsága azonos vagy legalábbis nagyon hasonló a natív $I_{\text{Ca,L}}$ -hoz, annak ellenére, hogy az előbbi esetében számos járulékos alegység (α_2 , β és δ) hiányzik. Tehát az egyetlen pórusformáló alegység (α_1) által létrehozott áram a natív áramhoz hasonló sajátságokat mutat – a TTX-érzékenység kivételével.



24. ábra: A HEK tsA-201 sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák kalciumáramának jellemzői. **(A)** Egymásra vetített $\text{Ca}_v1.2$ áram regisztrátumok 2,5 mM-os extracelluláris Ca^{2+} koncentráció jelenlétében és a Ca^{2+} extracelluláris oldatból való eltávolítását követően bizonyítják a csatorna Ca^{2+} ionokra vonatkozó vezetőképességét. **(B)** Egymásra vetített reprezentatív kutya kamrai szívizomsejteken mért $I_{\text{Ca,L}}$ és HEK tsA-201 sejteken rögzített $\text{Ca}_v1.2$ áram regisztrátumok demonstrálják a kalciumáramok kinetikai hasonlóságát. A jobb összehasonlíthatóság kedvéért az áramok amplitúdóját egységnyire normalizáltuk az eredeti időbeli felbontás megtartásával.

7. Megbeszélés

7.1. A tetrodotoxin L-típusú Ca^{2+} csatorna gátlásának jelentősége szíven

Jóllehet a TTX és a STX tengeri eredetű toxinok tekintetében általánosan elfogadott álláspont, hogy a gyors, feszültségfüggő Na^+ csatornák szelektív gátlószerei, az egyre halmozódó irodalmi adatok azt jelzik, hogy valójában nem egészen ez a helyzet. Például az utóbbi időben mindkét toxinról kimutatták, hogy hatnak a natív vagy klónozott T-típusú Ca^{2+} csatornákra (Sun és mtsai., 2008), míg a STX-ről leírták már azt is, hogy gátolni képes a L-típusú Ca^{2+} csatornát (Su és mtsai., 2004). Ugyanakkor az ezen disszertációban bemutatott kísérletek képezik az első beszámolót, ami bizonyítja a TTX szívizom $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ gátló hatását. Korábban a TTX és a STX hatását az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ra csak rágcslók szívizomszövetében vizsgálták (Su és mtsai., 2004). Abban a vizsgálatban a STX hatásosan gátolta az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ot, viszont a TTX nem. Mivel nem fedezhető fel feltűnő különbség a két vizsgálat (vagyis Su és mtsai.-nak közleménye és a jelen munka) kísérleti elrendezése között, ez az eltérés a rágcsló és a kutya Ca^{2+} csatornák e tulajdonságában valószínűleg a fajok közötti különbség számlájára írható.

A szívizom fő Na^+ csatornája ($\text{Na}_v1.5$), a vázizom és idegszöveti Na^+ csatornák túlnyomó többségéhez képest viszonylag érzéketlen a TTX iránt (Baer és mtsai., 1976; Brown és mtsai., 1981). Tehát akár 30 μM -os TTX koncentráció alkalmazása is szükségessé válhat a I_{Na} teljes gátlására kamrai szívizomsejtekben. Mivel egy ilyen magas TTX koncentráció 35 %-os $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ gátlást okozott a kutya kamrai szívizomsejtjeinkben, így ez súlyos értelmezési hibákhoz vezethet a kísérleti körülményektől függően. A probléma különösen hangsúlyossá válik akkor, amikor az ún. késői Na^+ áramot igyekszünk TTX használatával vizsgálni akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között. Ezen áram amplitúdója néhány tíz pikoamperes tartományban van egészséges szívizomsejtekben és 200 pA-ig emelkedhet hipertrófiás szívben (Chorvatova és mtsai., 2004). Könnyű elképzelni a bekövetkező hiba nagyságát, ha a TTX az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ csak egy kis hányadát is gátolja. Hasonlóképpen, az említett késői Na^+ áramban bekövetkező hipertrófia-indukált változások komolyan szennyeződhetnek a TTX által létrejövő $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ gátlással.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a natív $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ TTX-érzékenységet mutatott kutya kamrai szívizomsejteken, hasonlóan az egerekben a STX-nal megfigyelt eredményekhez (Su és mtsai., 2004). Mivel azonban e toxinok még így is viszonylag szelektívebbnek tűnnek a I_{Na} -ra, mint az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ra, így továbbra is széleskörűen alkalmazzák őket az orvosbiológiai kutatásokban. Viszont a kísérleti körülményektől függően külön figyelmet igényel az, amikor ezeket a szereket a I_{Na} szelektív gátlására használjuk.

Az L-típusú Ca^{2+} csatorna TTX-érzékenységeinek konkrét klinikai jelentőségét ugyanakkor erősen limitálja az a tény, hogy a súlyos TTX mérgezéses esetekben is csak 40–164 nM-os TTX koncentrációt mértek a betegek vérében. Jóllehet a súlyos mérgezések során néhány esetben beszámoltak a kardiovaszkuláris rendszer érintettségéről is, úgymint hipotenzió, bradikardia, kamrai aktivitás csökkenése, AV-csomó vezetési zavar, szárblokk kialakulása. A jelenség hátterében azonban még nem is a $\text{Na}_v1.5$ csatornák részleges gátlásának szerepét feltételezik, hanem egyrészt a szívben előforduló más, nagyobb TTX-érzékenységet mutató Na^+ csatornákon ($\text{Na}_v1.1$ – $\text{Na}_v1.4$) kifejtett gátlást, másrészt a légzésdepresszió miatt kialakuló pO_2 csökkenést, ami a TTX közvetett hatása (Zimmer, 2010).

7.2. A tetrodotoxin és az L-típusú Ca^{2+} csatorna kölcsönhatásának molekuláris determinánsai, a pH- és redoxpotenciál-változások hatásának értelmezése

A TTX 55 μM -os IC_{50} értéke az L-típusú kalciumcsatornán relatíve magas, még akkor is, ha figyelembe vesszük, hogy a szív fő Na^+ csatorna izoformája ($\text{Na}_v1.5$) jóval kisebb affinitással bír a TTX iránt, mint a neuronális ($\text{Na}_v1.1$ -1.3) vagy vázizom ($\text{Na}_v1.4$) Na^+ csatornák. A DEKA gyűrűt követő Asp aminosav aromás gyűrűjéről úgy gondolják, hogy kritikus jelentőségű a TTX-ioncsatorna interakcióban, és annak cseréje (pl. Cys-re a $\text{Na}_v1.5$ esetében) lehet a csökkent affinitás fő oka (Satin és mtsai., 1992; Fozzard és Lipkind, 2010). A Tikhonov és Zhorov (2012) által javasolt szekvencia egyezés alapján, amelyet a modellünk kidolgozására használtunk a jelen tanulmányban, egy Gly aminosav található ebben a kulcspozícióban. Ez a tény kézenfekvő magyarázatot ad arra, hogy a TTX miért kötődik jelentősen kisebb affinitással a $\text{Ca}_v1.2$ -höz, mint a neuronális vagy vázizom Na^+ csatornához.

A pH változásnak a kalciumáram amplitúdójára kifejtett hatását tekintve egy nagyon egyszerű értelmezés adható. Ha figyelembe vesszük a csatorna pórusánál elhelyezkedő hisztidin aminosavak közel 6,5-ös pK_a értékét (Stryer, 1995), akkor azok imidazol oldalláncai még enyhén savas közegben is protonáltak lehetnek. Azonban meg kell jegyezni, hogy az aktuális pK_a erősen függ a kémiai környezettől is. Ennek megfelelően a csatorna konduktív szakaszán (amely természetesen magában foglalja a szelektivitási filtert is) elhelyezkedő hisztidin aminosavak legalább részlegesen protonáltak a 6,4-es savas pH mellett, amely egy pozitív töltésű ion áthaladása számára egy kevésbé kedvező környezetet teremt. Továbbá a csatorna erősen negatív töltésű EEEE gyűrűjének egy (vagy több) glutamát oldallánca szintén

protonált lehet, amely tovább csökkenti a kation áram nagyságát. Az eredményeinkkel összhangban korábbi közleményekben is a I_{Na} és az $I_{Ca,L}$ csökkenését írták le savas közegben (Tombaugh és Somjen, 1996; Saegusa és mtsai., 2011). Másrésről a TTX szinte teljes mértékben pozitívan töltött formában van jelen 6,4-es pH mellett, mivel a leginkább savi karakterűnek tekinthető C10-es pozíciójú hidroxil csoport pK_a értéke 8,7-hez közeli (Moczydlowski, 2013). Tehát a pozitívan töltött TTX molekula várhatóan növeli a TTX kötődésének mértékét a negatívan töltött szelektivitási filter régióhoz (a TTX neutrális ikerion formájához képest, amely a kifejezetten alkalikus pH tartományban dominál, de részlegesen jelen van 8,4-es pH-nál és kismértékben 7,4-es pH esetén is), ezáltal a kalciumcsatorna erősebb gátlását eredményezi. Továbbá az elektrosztatikus kölcsönhatás erősségének csökkenése következtében (amely érvényes mind a kétszeresen töltött Ca^{2+} -ra, mind –jóllehet kisebb mértékben– a protonált TTX molekulára, annak egyszeres pozitív töltése miatt) a nem-ionos hidofil és hidrofób kölcsönhatások relatív hozzájárulása a TTX és a csatorna szelektivitási filterének kapcsolatához valószínűleg megnő. Mindezen hatások az L-típusú kalciumáram csökkenését eredményezik savas közegben, amely áramot ekkor a TTX még kifejezettebben képes gátolni. Ezzel szemben 8,4-es bázikus pH-n a legtöbb hisztidin oldallánc neutrális, és a cisztein szabad SH-csoportjainak nagyjából fele deprotonált, mivel az azoknak megfelelő pK_a érték 8,5 (Stryer, 1995). Ez bizonyára egy jóval kedvezőbb környezetet teremt (még a semleges állapothoz, vagyis a 7,4-es pH-hoz képest is) a pozitív töltésű Ca^{2+} ionok csatornához való vonzásához és kötődéséhez, következésképp a csatornán keresztüli ion fluxus megnőhet. Az enyhén bázikus pH értéken a C10-es pozíciójú OH-csoport deprotonálódása következtében a TTX részlegesen neutrális formában lehet jelen, amely a TTX és a szelektivitási filter között gyengébb elektrosztatikus vonzás kifejlődéséhez vezet. Bázikus közegben az erősebb Ca^{2+} csatorna kölcsönhatás egy gyengébb TTX és csatornafehérje közötti kölcsönhatással összeadódva szükségszerűen a TTX kisebb $I_{Ca,L}$ gátlásához vezet.

Az alkalikus környezetben megfigyelt nagyobb amplitúdójú kalciumáram és kisebb TTX általi gátlás könnyen megmagyarázható a fentiekben áttekintett egyszerűsített elektrosztatikus modell és a TTX ikerion protonáltsági egyensúlya alapján, amely jól egyezik a TTX-gátlás Na^+ csatornákon megfigyelt pH-függésével (Ulbricht és Wagner, 1975; Strickholm, 1981). A TTX nagyobb gátló hatása savas pH mellett mégis úgy tűnik, hogy ellentmond a korábbi eredményeknek, amelyek alacsony pH értékek mellett csökkent TTX gátlást vetítenek előre (Ulbricht és Wagner, 1975). Ezen eltérés oka nem teljesen tisztázott, azonban figyelembe kell venni, hogy a korlátozott szekvencia azonosság folytán a Na^+ és Ca^{2+}

csatornák szerkezete különbözik egymástól és azt, hogy a Na^+ csatornák esetében megfigyelt hatás nem igazán kifejezett semleges vagy kissé savas pH tartományban. Lehetséges, hogy a Ca^{2+} csatorna szelektivitási filter régiójának konformációja 6,4-es pH-n oly módon változik meg, hogy még inkább alkalmassá válik a TTX bekötődésére. Ezenfelül 7,4-es pH-n a TTX 3-5 %-nak becsült nem-hatásos (ikerion) frakciója kation formává alakul 6,4-es pH-n, amely szintén hozzájárulhat a TTX által okozott gátlás növekedéséhez.

A redoxpotenciál szerepének értelmezése az $I_{\text{Ca,L}}$ nagyságának megváltozásában és annak TTX általi gátlásában azonban kicsit több erőfeszítést igényel. Megfigyeléseinkkel összhangban számos emlős szívizomszövetében kimutatták, hogy a hidrogén-peroxid növeli az $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóját (Guo és mtsai., 2000; Xie és mtsai., 2009; Madhvani és mtsai., 2011), míg redukáló közegben az áram csökken (Zhang és mtsai., 2012). Mivel a H_2O_2 egy relatíve erős oxidáló ágens, a szabad szulfhidril-csoportokat diszulfid-kötéssé oxidálja. Ellenben a redukáló környezet képes lehet megelőzni a diszulfid-hidak képződését vagy lebontani őket, ha már egyszer kialakultak. Ezen diszulfid-hidak úgy tűnik egy TTX-kötődésre viszonylag rezisztens struktúrát stabilizálnak; ily módon a TTX $I_{\text{Ca,L}}$ -ra kifejtett gátló hatása megnő redukáló környezetben, míg H_2O_2 jelenlétében csökken. Egy további magyarázat is felmerül, amikor arra gondolunk, hogy az $I_{\text{Ca,L}}$ nagysága jól korrelál a Ca^{2+} csatornák β alegységeinek oligomerizációjával (Lao és mtsai., 2010). Feltételezve, hogy a H_2O_2 diszulfidhidak képzésével stabilizálni tudja az oligomer állapotot, mind a nagyobb $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdó, mind a gyengébb TTX általi gátlás magyarázhatóvá válik.

Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a redukáló környezet $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóra és annak TTX-nal való gátolhatóságára kifejtett hatása nagyon hasonlít ahhoz, amit savas pH-jú környezet esetén figyelhattunk meg. Ez határozottan arra utal, hogy egy redukáló szer alkalmazása a rendszer nagy puffertkapacitása ellenére is elősegítheti néhány érzékeny csoport protonálódását. Ez magyarázhatja a TTX által okozott $I_{\text{Ca,L}}$ gátlás során megfigyelt jelentős egybeesést, a savas és bázikus pH, illetve a redukáló és oxidáló környezet összehasonlításakor.

A forskolin alkalmazásakor nyert eredmények azt sugallják, hogy az α_1 alegység struktúrájában a protein-kináz A közvetített foszforiláció által kiváltott allosztérikus változások jöllehet komoly következményekkel járnak a csatorna kapuzásának tekintetében (Benitah és mtsai., 2010), azonban a TTX kötődésére csak csekély behatással lehetnek. A Hill-koefficiens értéke kontroll körülmények között és a csatorna foszforilációját követően is megközelítőleg 1, ami megfelel annak, hogy az α_1 alegységen 1 TTX-kötőhely található.

7.3. A tetrodotoxin hatástalanságának lehetséges okai HEK tsA-201 sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornákon

Az a jelenség, hogy a TTX nem gátolja az expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák áramát valóban ellentétes azzal, amit a natív kutya szívműsejteken nyert eredmények alapján várnánk. Ezen paradox tényállás magyarázatára számos egyéb faktort is tekintetbe kell venni, amelyek hatással vannak a Ca^{2+} csatornák struktúrájára és funkciójára. A legkézenfekvőbb magyarázat az lenne, hogy a TTX a L-típusú kalciumcsatorna valamelyik járulékos alegységéhez kötődik. Azonban a csatorna pH- és redoxpotenciál-változás, valamint a PKA-közvetített foszforiláció függvényében részletesen elemzett TTX-érzékenységen és az ez alapján készített 3D-s csatorna térszerkezeti modellen alapuló korábbi eredmények egyértelműen kimutatták, hogy a TTX kötőhelye mind a Ca^{2+} , mind a Na^+ csatornákon hasonló helyen található, amely a csatorna pórus szelektivitási filterének szerves részét képezi (Fozzard és Lipkind, 2010). Természetesen annak lehetőségét nem lehet teljes mértékben kizárni, hogy a TTX az egyik járulékos alegységhez kötődik (ebből a szempontból az extracelluláris elhelyezkedése folytán az α_2 alegység lehet a leginkább kézenfekvő jelölt), de ebben az esetben a feltételezett kötőhely kémiai környezetének nagyon hasonlónak kellene lennie a szelektivitási filteréhez, jóllehet éppen ezért ez a lehetőség elég valószínűtlennek tűnik. Sokkal inkább elfogadható azt feltételezni, hogy a TTX a csatorna pórusformáló α_{1C} alegységhez kötődik, de csak egy vagy több járulékos alegység jelenlétében. Mivel a natív sejteken további járulékos alegységek is jelen vannak, ezek allosztérikus kölcsönhatások következtében módosíthatják a csatorna struktúra végső összeszerelődését. Továbbá az α_1 alegységek számos, adott sejt típusra specifikus hasítási terméke (splice variánsa) ismert és ezek eltérő antagonist-érzékenységgel bírhatnak (Tang és mtsai., 2004).

Emellett az is lehetséges, hogy az expressziós rendszer önmaga felelős a megfigyelt kalciumcsatorna gátló hatás elmaradásáért a TTX alkalmazásakor, mivel nem kivételes eset, hogy a Ca^{2+} áramon egy jól dokumentált hatást nem lehet reprodukálni egy expressziós rendszerben (Salamaneh és mtsai., 2010). Ebben az esetben az elméleti lehetőségek skálája széles, ideértve a lipid környezet különbségeit, a belső elektrolit összetétel eltéréseit, a Ca^{2+} -kalmodulin-függő protein-kináz II (CaMKII) lehetséges szerepét, valamint olyan fontos másodlagos hírvivő molekulák jelenlétét vagy hiányát, mint a cAMP, a cGMP vagy a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Hofer, 2012), amely tényezők szintén módosíthatják a csatorna funkcióját, ily módon eltérő TTX-érzékenységet eredményezve. Ennélfogva amíg nem találunk kielégítő magyarázatot a HEK sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák TTX-érzékenysége hiányára, addig külön

óvatosságot igényel az expressziós rendszerekben végzett elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatok eredményeinek értelmezése. Mindazonáltal a TTX tovább növeli azon szerek számát, amelyek a már jól ismert, rá jellemző specifikus hatáson felül Ca^{2+} csatorna gátló potenciállal is rendelkeznek (Baylie és mtsai., 2010; Rybczynska és mtsai., 2010).

7.4. A feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornákon ható szerek korlátozott szelektivitása

Nem rendkívüli esemény, hogy egy szelektívnek gondolt I_{Na} -ra ható szer kötődik és így módosít más transzmembrán ioncsatornát, így pl. az L-típusú Ca^{2+} csatornát. A „szelektív” Na^+ csatorna aktiváló alkaloid veratridinről kimutatták, hogy béka vázizomban gátolja a Ca^{2+} csatornákat (Nánási és mtsai., 1994). Ezek a keresztreakciók jól magyarázhatók a Na^+ és Ca^{2+} csatornák struktúrájában meglévő ismert hasonlósággal (Hille, 2001). Mindkét csatornatípus pórusformáló alegysége 4 ismétlődő lineáris szekvenciát tartalmaz, amelyek 6 transzmembrán doménből épülnek fel. A pozitív töltésű aminosavakban gazdag negyedik transzmembrán szegmens feszültség érzékelőként működik, míg az ötödik és hatodik szegmens közötti hurok hozza létre a szelektivitási filterrel kezdődő tényleges permeabilitási útvonalat. A Na^+ és Ca^{2+} csatornák aminosav szekvenciájának részletes elemzése további hasonlóságokra derített fényt, feltehetően e csatornák közös evolúciós eredete folytán (Heinemann és mtsai., 1992).

A TTX-nal és STX-nal kapott eredmények azt mutatják, hogy néhány tíz nanomólos koncentrációjú IC_{50} értékük van idegi és vázizom Na_v csatornákon, körülbelül százszor-ezerszer magasabb a IC_{50} értékük a szív $\text{Na}_v1.5$ csatornán és ehhez nagyon hasonló a T-típusú Ca^{2+} csatornákon. A szívben túlnyomórészt jelen lévő Na^+ csatornához viszonyítva azonban 10-50-szer magasabb a IC_{50} -juk az L-típusú Ca^{2+} csatornákon. Tehát ezen guanidin csoportot tartalmazó ciklikus tengeri toxinokkal végzett vizsgálatok a közös őstől származó négy homológ domént tartalmazó feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornák evolúciójával egybevágó eredményeket szolgáltatottak. A korábbiakban említett adatok alátámasztják a tényt, hogy a klasszikus szívizom Na^+ csatornák pórus régiója közelebbi hasonlóságot mutat a T-típusú Ca^{2+} csatornákéhoz, mint az L-típusú Ca^{2+} csatornákéhoz (Hille, 2001).

Tehát egy általános, intrinzik tulajdonságnak tűnik, hogy csaknem minden Na^+ - és Ca^{2+} csatornán ható szer befolyásolja a másik, strukturálisan homológ csatorna típust is. E jelenség magyarázata az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ot, az $\text{I}_{\text{Ca,T}}$ -ot és a I_{Na} -ot létrehozó csatornák szerkezetében és aminosav szekvenciájában megfigyelhető hasonlóságban rejlik.

Mindezek fényében elmondható, hogy a négy homológ doménnel rendelkező feszültségfüggő ioncsatornák közötti keresztreakciók elkerülhetetlennek tűnnek, ezért ennek figyelembe vétele elengedhetetlen a jövőbeli gyógyszerfejlesztésben, orvosi terápiában és kísérleti vizsgálatokban. Ennek a tulajdonságnak az ismerete nemcsak a szívre ható szerek alkalmazásakor lehet hasznos, hanem más célszervre ható szerek esetében is, mint pl. antiepileptikumok, antidepresszánsok, és a neurodegeneratív betegségek vagy a krónikus fájdalom gyógyszerei.

8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények

A szívizom Ca^{2+} csatornájának tetrodotoxin-érzékenységét vizsgálva az alábbi eredeti megállapításokat tettük:

1. Elsőként írtuk le, hogy a TTX gátolja az L-típusú Ca^{2+} csatornákat kutya kamrai szívizomsejteken. A dózis-hatás görbe alapján a TTX IC_{50} értéke $55 \mu\text{M}$ -nak adódott, míg a Hill koefficiens értékére 1-et kaptunk. A hatás gyorsan kialakult és teljesen reverzibilis volt.
2. Kimutattuk, hogy a TTX nem befolyásolja az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ inaktivációs kinetikáját és feszültségfüggését.
3. Nizoldipin és akciós potenciál-clamp technika alkalmazásával bizonyítottuk, hogy a tetrodotoxin által gátolt áram az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -nak felel meg.
4. Megállapítottuk, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatorna protein-kináz A által megvalósuló foszforilációja nem befolyásolja a TTX által kiváltott gátlás mértékét. Ugyanakkor az alkalózis és az oxidáló környezet csökkenti a TTX $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ot gátló potenciálját, míg az acidózis és a redukáló környezet növeli azt.
5. Kimutattuk, hogy a TTX a tónusos gátláson felül használatfüggő gátlást is kivált. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a TTX kötődésének az L-típusú Ca^{2+} csatorna zárt és inaktív állapotához kedvez, míg a csatorna nyitott állapota a toxin leválását eredményezheti.
6. Számítógépes modellezési kísérleteink igazolták, hogy a TTX az L-típusú Ca^{2+} csatorna pórusában, a szelektivitási filter területéhez kötődik.
7. HEK tsA-201 sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornákon a TTX nem fejtett ki gátló hatást még $100 \mu\text{M}$ -os koncentrációban sem.

9. Összefoglalás

Bevezetés: A tetrodotoxint (TTX) a gyors, feszültségfüggő Na^+ csatornák legszelektívebb gátlószerének tekintik ingerelhető szövetekben, tehát ideg, váz- és szívizom szövetben, habár ez utóbbi TTX-érzékenysége legalább három nagyságrenddel kisebb az előzőekénél.

Anyagok és módszerek: Jelen vizsgálatban az L-típusú Ca^{2+} áram ($I_{\text{Ca,L}}$) TTX-érzékenységét tanulmányoztuk konvencionális feszültség-clamp és akciós potenciál-clamp technikával kutya bal kamrából izolált szívizomsejteken, 37 °C hőmérsékleten.

Eredmények: Az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot a TTX dózisfüggő és reverzibilis módon gátolta, az áram inaktivációs kinetikájának megváltoztatása nélkül. Az áramgátlás mértékét Hill-egyenlettel illesztve a IC_{50} értékre $55 \pm 2 \mu\text{M}$ -t, míg a Hill koefficiensre $1,0 \pm 0,04$ -et kaptunk. A TTX már $30 \mu\text{M}$ -os koncentrációban $8,61 \pm 1,09 \text{ pA/pF}$ -ről $6,08 \pm 1,05 \text{ pA/pF}$ -ra csökkentette az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot ($n=4$; $p<0,01$). Nizoldipin ($1 \mu\text{M}$) gátolta az áramot, megerősítve azt, hogy az valóban az $I_{\text{Ca,L}}$ volt. Akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között a TTX-érzékeny áram az $I_{\text{Ca,L}}$ -hoz hasonló mintázatot mutatott, amely nizoldipin jelenlétében hiányzott.

A csatorna foszforilációja nem befolyásolta a TTX gátló potenciálját, $3 \mu\text{M}$ forskolin jelenlétében $50 \pm 4 \mu\text{M}$ IC_{50} értéket kaptunk. $55 \mu\text{M}$ TTX (fiziológiás körülmények között a IC_{50} érték) savas közegben ($\text{pH}=6,4$) $60 \pm 2 \%$ -os $I_{\text{Ca,L}}$ gátlást okozott, míg lúgos közegben ($\text{pH}=8,4$) csak $26 \pm 2 \%$ -os gátlást figyeltünk meg. Hasonlóképpen, $55 \mu\text{M}$ TTX redukáló közegben (glutathion+aszorbinsav+ditiotritol, mindegyik 1 mM -os koncentrációban) $62 \pm 6 \%$ -kal csökkentette az $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóját, ezzel szemben erős oxidálószer jelenlétében ($100 \mu\text{M}$ H_2O_2) $31 \pm 3 \%$ gátlást kaptunk. Ezen eredmények jó összhangban vannak a kötődési modellünk előrejelzésével, miszerint a TTX valóban a szív L-típusú Ca^{2+} csatornáinak szelektivitási filteréhez kötődik.

Következtetések: Munkacsoportunk elsőként számolt be arról, hogy a TTX gátolja az L-típusú kalciumcsatornát szívizmon. Ezt a toxint azonban továbbra is széleskörűen alkalmazzák a kutatásban, mivel még mindig szelektívebb a Na^+ áramra (I_{Na}) mint az $I_{\text{Ca,L}}$ -ra. A kísérleti körülményektől függően viszont a TTX-nak a I_{Na} szelektív gátlására történő alkalmazása fokozott körültekintést igényel. A feszültségfüggő Ca^{2+} és Na^+ csatornák egy közös evolúciós őstől származnak, ezáltal az ezen csatornákon ható szerek csekély szelektivitása a receptoraik intrinzik tulajdonságát jelzi, amelyet figyelembe kell venni a jövőben új, szívre ható gyógyszerek kifejlesztésekor akár az orvosi gyakorlatban, akár a kísérleti kutatásban.

10. Summary

Background: Tetrodotoxin (TTX) is believed to be the most selective inhibitor of voltage-gated fast Na^+ channels in excitable tissues, including nerve, skeletal muscle, and heart, although TTX-sensitivity of the latter is lower than that of the formers by at least three orders of magnitude.

Experimental approach: In the present study the TTX sensitivity of L-type Ca^{2+} current ($I_{\text{Ca,L}}$) was studied in isolated canine ventricular cells using conventional voltage-clamp and action potential-clamp techniques, at 37 °C.

Results: TTX was found to block $I_{\text{Ca,L}}$ in a dose-dependent and reversible manner without altering its inactivation kinetics. Fitting results to the Hill equation an IC_{50} value of $55 \pm 2 \mu\text{M}$ was obtained with a Hill coefficient of 1.0 ± 0.04 . $I_{\text{Ca,L}}$ changed from $8.61 \pm 1.09 \text{ pA/pF}$ to $6.08 \pm 1.05 \text{ pA/pF}$ in the presence of $30 \mu\text{M}$ TTX ($n=4$; $p<0.01$). The current was fully abolished by $1 \mu\text{M}$ nisoldipine indicating that it was indeed $I_{\text{Ca,L}}$. Under action potential voltage clamp conditions the TTX-sensitive current displayed a fingerprint of $I_{\text{Ca,L}}$, which was absent in the presence of nisoldipine. Phosphorylation of the channel protein (induced by forskolin) failed to modify the inhibitory potency of TTX, an IC_{50} value of $50 \pm 4 \mu\text{M}$ was found in the presence of $3 \mu\text{M}$ forskolin. TTX in $55 \mu\text{M}$ concentration (IC_{50} value obtained under physiological conditions) caused $60 \pm 2 \%$ inhibition of $I_{\text{Ca,L}}$ in acidic ($\text{pH}=6.4$), while only a $26 \pm 2 \%$ block in alkaline ($\text{pH}=8.4$) milieu. Similarly, the same concentration of TTX induced $62 \pm 6 \%$ suppression of $I_{\text{Ca,L}}$ in a reductant milieu (containing glutathione + ascorbic acid + dithiothreitol, 1 mM each), in contrast to the $31 \pm 3 \%$ blockade obtained in the presence of a strong oxidant ($100 \mu\text{M}$ H_2O_2). These results are in a good accordance with the predictions of our model, indicating that TTX binds, in fact, to the selectivity filter of cardiac L-type Ca^{2+} channels.

Conclusions: This is the first report demonstrating that TTX inhibits L-type calcium current in the heart. Since this toxin still appears to be more selective to Na^+ current (I_{Na}) than $I_{\text{Ca,L}}$, it is widely applied in the biomedical research. However, extra care must be taken when using this agent to block I_{Na} selectively, depending on the experimental conditions. Since voltage-gated Ca^{2+} and Na^+ channels derive from an evolutionary common ancestor, the poor selectivity of agents acting on these channels indicates an intrinsic property of drug receptors, which has to be taken into account when designing new cardioactive compounds for either medical therapy or experimental research in the future.

11. Irodalomjegyzék

1. Aggarwal, R.; Shorofsky, S.R.; Goldman, L.; Balke, C.W. Tetrodotoxin-blockable calcium currents in rat ventricular myocytes; a third type of cardiac cell sodium current. *J. Physiol.*, 1997, 505(Pt 2), 353-369.
2. Akaike, N.; Takahashi, K. Tetrodotoxin-sensitive calcium-conducting channels in the rat hippocampal CA1 region. *J. Physiol.*, 1992, 450, 529-546.
3. Alvarez, J.L.; Salinas-Stefanon, E.; Orta, G.; Ferrer, T.; Talavera, K.; Galán, L.; Vassort, G. Occurrence of a tetrodotoxin-sensitive calcium current in rat ventricular myocytes after long-term myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, 2004, 63, 653-661.
4. AMBER, version 12; University of California: San Francisco, CA, USA, 2012.
5. Andavan, G.S.; Lemmens-Gruber, R. Voltage-gated sodium channels: mutations, channelopathies and targets. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18(3), 377-397.
6. Baer, M.; Best, P.M.; Reuter, H. Voltage-dependent action of tetrodotoxin in mammalian cardiac muscle. *Nature*, 1976, 263, 344-345.
7. Baker, P.F.; Hodgkin, A.L.; Ridgway, E.B. Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol.*, 1971, 218(3), 709-755.
8. Balke, C.W.; Shorofsky, S.R. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.*, 1998, 37(2), 290-299.
9. Bányász, T.; Fülöp, L.; Magyar, J.; Szentandrassy, N.; Varró, A.; Nánási, P.P. 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.
10. Bányász, T.; Magyar, J.; Körtvély, Á.; Szigeti, G.y.; Szigligeti, P.; Papp, Z.; Mohácsi, A.; Kovács, L.; Nánási, P.P. Different effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in canine ventricular cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2001, 363, 383-390.
11. Baylie, R.L.; Cheng, H.; Langton, P.D.; James, A.F. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010, 61(5), 543-550.
12. Bébarová, M. Arrhythmogenesis in Brugada syndrome: impact and constraints of current concepts. *Int. J. Cardiol.*, 2013, 167(5), 1760-1771.
13. Benitah, J.P.; Alvarez, J.L.; Gómez, A.M. L-type Ca^{2+} current in ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2010, 48(1), 26-36.
14. Bers, D.M.; Perez-Reyes, E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc. Res.*, 1999, 42(2), 339-360.
15. Biet, M.; Barajas-Martínez, H.; Ton, A.T.; Delabre, J.F.; Morin, N.; Dumaine, R. About half of the late sodium current in cardiac myocytes from dog ventricle is due to non-cardiac-type Na^{+} channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2012, 53(5), 593-598.
16. Bilir, A.; Yelken, B.; Kaygisiz, Z.; Senturk, Y. The effects of dexmedetomidine in bupivacaine and ropivacaine induced cardiotoxicity in isolated rat heart. *Saudi Med. J.*, 2006, 27(8), 1194-1198.
17. Birnbaumer, L.; Campbell, K.P.; Catterall, W.A.; Harpold, M.M.; Hofmann, F.; Horne, W.A.; Mori, Y.; Schwartz, A.; Snutch, T.P.; Tanabe, T.; Tsien, R.W. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 1994, 13(3), 505-506.
18. Bos, J.L. Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003, 4(9), 733-738.
19. Brown, A.M.; Lee, K.S.; Powell, T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J. Physiol.*, 1981, 318, 479-500.
20. Catterall, W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 2000, 26(1), 13-25.

21. Catterall, W.A.; Goldin, A.L.; Waxman, S.G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.*, 2005a, 57(4), 397-409.
22. Catterall, W.A.; Perez-Reyes, E.; Snutch, T.P.; Striessnig, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.*, 2005b, 57(4), 411-425.
23. Cestèle, S.; Catterall, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 2000, 82(9-10), 883-892.
24. Chahine, M.; Bennett, P.B.; George, A.L. Jr.; Horn, R. Functional expression and properties of the human skeletal muscle sodium channel. *Pflügers Arch.*, 1994, 427(1-2), 136-142.
25. Chen-Izu, Y.; Sha, Q.; Shorofsky, S.R.; Robinson, S.W.; Wier, W.G.; Goldman, L.; Balke, C.W. ICa(TTX) channels are distinct from those generating the classical cardiac Na⁺ current. *Biophys. J.*, 2001, 81(5), 2647-2659.
26. Chorvatova, A.; Snowdon, R.; Hart, G.; Hussain, M. Effects of pressure overload-induced hypertrophy on TTX-sensitive inward currents in guinea pig left ventricle. *Mol. Cell. Biochem.*, 2004, 261(1-2), 217-226.
27. Chowdhury, F.R.; Nazmul Ahasan, H.A.; Mamunur Rashid, A.K.; Al Mamun, A.; Khaliduzzaman, S.M. Tetrodotoxin poisoning: a clinical analysis, role of neostigmine and shortterm outcome of 53 cases. *Singapore Med. J.*, 2007, 48(9), 830-833.
28. Clancy, C.E.; Tateyama, M.; Kass, R.S. Insights into the molecular mechanisms of bradycardia-triggered arrhythmias in long QT-3 syndrome. *J. Clin. Invest.*, 2002, 110(9), 1251-1262.
29. Clancy, C.E.; Tateyama, M.; Liu, H.; Wehrens, X.H.; Kass, R.S. Non-equilibrium gating in cardiac Na⁺ channels: an original mechanism of arrhythmia. *Circulation*, 2003, 107(17), 2233-2237.
30. Cole, W.C.; Chartier, D.; Martin, M.; Leblanc, N. Ca²⁺ permeation through Na⁺ channels in guinea pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, 1997, 273(1 Pt 2), H128-137.
31. Coraboeuf, E.; Deroubaix, E.; Coulombe, A. Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. *Am. J. Physiol.*, 1979, 236(4), H561-H567.
32. Crump, S.M.; Andres, D.A.; Sievert, G.; Satin, J. The cardiac L-type calcium channel distal carboxy terminus autoinhibition is regulated by calcium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2013, 304(3), H455-464.
33. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald-an NlogN method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 1993, 98, 10089-10092.
34. Doerr, T.; Denger, R.; Trautwein, W. Calcium currents in single SA nodal cells of the rabbit heart studied with action potential clamp. *Pflügers Arch.*, 1989, 413, 599-603.
35. Doerr, T.; Denger, R.; Doerr, A.; Trautwein, W. Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the guinea pig studied with action potential clamp. *Pflügers Arch.*, 1990, 416, 230-237.
36. Ertel, E.A.; Campbell, K.P.; Harpold, M.M.; Hofmann, F.; Mori, Y.; Perez-Reyes, E.; Schwartz, A.; Snutch, T.P.; Tanabe, T.; Birnbaumer, L.; Tsien, R.W.; Catterall, W.A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 2000, 25(3), 533-535.
37. Farkas, V.; Szentandrassy, N.; Bárándi, L.; Hegyi, B.; Ruzsnavszky, F.; Ruzsnavszky, O.; Horváth, B.; Bányász, T.; Magyar, J.; Márton, I.; Nánási, P.P. Interaction between Ca²⁺ channel blockers and isoproterenol on L-type Ca²⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes. *Acta Physiol. (Oxf.)*, 2012, 206, 42-50.

38. Favre, I.; Moczydlowski, E.; Schild, L. Specificity for block by saxitoxin and divalent cations at a residue which determines sensitivity of sodium channel subtypes to guanidinium toxins. *J. Gen. Physiol.*, 1995, 106, 203–229.
39. Fernández-Ortega, J.F.; Morales-de los Santos, J.M.; Herrera-Gutiérrez, M.E.; Fernández-Sánchez, V.; Rodríguez Loureo, P.; Rancaño, A.A.; Téllez-Andrade, A. Seafood intoxication by tetrodotoxin: first case in Europe. *J. Emerg. Med.*, 2010, 39(5), 612–617.
40. Field, J. Puffer fish poisoning. *J. Accid. Emerg. Med.*, 1998, 15, 334–336.
41. Findlay, I.; Suzuki, S.; Murakami, S.; Kurachi, Y. Physiological modulation of voltage-dependent inactivation in the cardiac muscle L-type calcium channel: a modelling study. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2008, 96(1-3), 482–498.
42. Forster, G. A Voyage Round the World. London, UK, 1777, 2, 403–424.
43. Fozzard, H.A.; Lipkind, G.M. The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Mar. Drugs*, 2010, 8(2), 219–234.
44. Fozzard, H.A.; Hanck, D.A. Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol. Rev.*, 1996, 76(3), 887–926.
45. Fukuda, A.; Tani, A. Records of puffer poisonings. Report 3. *Nippon Igaku Oyobi Kenko Hoken*, 1941, 3528, 7–13.
46. Fuller, M.D.; Emrick, M.A.; Sadilek, M.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci. Signal.*, 2010, 3(141), ra70.
47. Ganesan, A.N.; Maack, C.; Johns, D.C.; Sidor, A.; O'Rourke, B. β -adrenergic stimulation of L-type Ca^{2+} channels in cardiac myocytes requires the distal carboxyl terminus of α_{1C} but not serine 1928. *Circ. Res.*, 2006, 98(2), e11–18.
48. Gaughan, J.P.; Furukawa, S.; Houser, S.R. Tetrodotoxin-sensitive calcium current, induces contraction in failed human ventricular myocytes. *Circulation*, 1999, 100, I-422.
49. Geffeney, S.L.; Fujimoto, E.; Brodie, E.D. 3rd; Brodie, E.D. Jr.; Ruben, P.C. Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction. *Nature*, 2005, 434(7034), 759–763.
50. Gellens, M.E.; George, A.L. Jr.; Chen, L.Q.; Chahine, M.; Horn, R.; Barchi, R.L.; Kallen, R.G. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992, 89(2), 554–558.
51. Gerhardstein, B.L.; Puri, T.S.; Chien, A.J.; Hosey, M.M. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*, 1999, 38(32), 10361–10370.
52. Grant, A.O. Cardiac ion channels. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.*, 2009, 2(2), 185–194.
53. Guatimosim, S.; Sobie, E.A.; dos Santos Cruz, J.; Martin, L.A.; Lederer, W.J. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca^{2+} current. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2001, 280(5), C1327–1339.
54. Guo, J.; Giles, W.R.; Ward, C.A. Effect of hydrogen peroxide on the membrane currents in sinoatrial node cells from rabbit heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000, 279, H992–H999.
55. Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, 1981, 391, 85–100.
56. Haufe, V.; Chamberland, C.; Dumaine, R. The promiscuous nature of the cardiac sodium current. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2007, 42(3), 469–477.

57. Hartzell, H.C.; Fischmeister, R. Effect of forskolin and acetylcholine on calcium current in single isolated cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.*, 1987, 32(5), 639-645.
58. Haverinen, J.; Hassinen, M.; Vornanen, M. Fish cardiac sodium channels are tetrodotoxin sensitive. *Acta Physiol. (Oxf)*, 2007, 191(3), 197-204.
59. Heinemann, S.H.; Schlieff, T.; Mori, Y.; Imoto, K. Molecular pore structure of voltage-gated sodium and calcium channels. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1994, 27(12), 2781-2802.
60. Heinemann, S.H.; Terlau, H.; Stühmer, W.; Imoto, K.; Numa, S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 1992, 356, 441-443.
61. Heubach, J.F.; Köhler, A.; Wettwer, E.; Ravens, U. T-Type and tetrodotoxin-sensitive Ca^{2+} currents coexist in guinea pig ventricular myocytes and are both blocked by mibefradil. *Circ. Res.*, 2000, 86(6), 628-635.
62. Hille, B. Ion channels of excitable membranes. 3rd ed.; Sinauer Associates Inc., Sunderland, 2001.
63. Hockerman, G.H.; Peterson, B.Z.; Johnson, B.D.; Catterall, W.A. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997, 37, 361-396.
64. Hofer, A.M. Interactions between calcium and cAMP signaling. *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19(34), 5768-5773.
65. Hofmann, F.; Lacinová, L.; Klugbauer, N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1999, 139, 33-87.
66. Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*, 2006, 65, 712-725.
67. Horvath, B.; Banyasz, T.; Jian, Z.; Hegyi, B.; Kistamas, K.; Nanasi, P.P.; Izu, L.T.; Chen-Izu, Y. Dynamics of the late Na^{+} current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2013, 64, 59-68.
68. Hove-Madsen, L.; Méry, P.F.; Jurevicius, J.; Skeberdis, A.V.; Fischmeister, R. Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. *Basic Res. Cardiol.*, 1996, 91 (Suppl. 2), 1-8.
69. Huang, B.; El-Sherif, T.; Gidh-Jain, M.; Qin, D.; El-Sherif, N. Alterations of sodium channel kinetics and gene expression in the postinfarction remodeled myocardium. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 2001, 12(2), 218-225.
70. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD—Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*, 1996, 14, 33-38.
71. Hwang, D.F.; Noguchi T. Tetrodotoxin poisoning. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2007, 52, 142-236.
72. Iijima, T.; Yanagisawa, T.; Taira, N. Increase in the slow inward current by intracellularly applied nifedipine and nicardipine in single ventricular cells of the guinea-pig heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1984, 16(12), 1173-1177.
73. Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Cadene, M.; Chait, B.T.; MacKinnon, R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 2002, 417(6888), 523-526.
74. Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 1983, 79, 926-935.
75. Jost, N.; Kohajda, Z.; Kristóf, A.; Kovács, P.P.; Husti, Z.; Juhász, V.; Kiss, L.; Varró, A.; Virág, L.; Baczkó, I. Atrial remodeling and novel pharmacological strategies for antiarrhythmic therapy in atrial fibrillation. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18(24), 3675-3694.
76. Kamp, T.J.; Hell, J.W. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ. Res.*, 2000, 87(12), 1095-1102.

77. Katikou, P.; Georgantelis, D.; Sinouris, N.; Petsi, A.; Fotaras, T. First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece). *Toxicon*, 2009, 54(1), 50-55.
78. Kawasaki, H.; Springett, G.M.; Mochizuki, N.; Toki, S.; Nakaya, M.; Matsuda, M.; Housman, D.E.; Graybiel, A.M. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, 1998, 282(5397), 2275-2279.
79. Lao, Q.Z.; Kobrinsky, E.; Liu, Z.; Soldatov, N.M. oligomerization of $\text{Ca}_v\beta$ subunits is essential correlate of Ca^{2+} channel activity. *FASEB J.*, 2010, 24, 5013–5023.
80. Lee, K.S.; Tsien, R.W. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature*, 1983, 302(5911), 790-794.
81. Lemaire, S.; Piot, C.; Seguin, J.; Nargeot, J.; Richard, S. Tetrodotoxin-sensitive Ca^{2+} and Ba^{2+} currents in human atrial cells. *Receptors Channels*, 1995, 3(2), 71-81.
82. Linz, K.W.; Meyer, R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflügers Arch.*, 2000, 439, 588-599.
83. Lipkind, G.M.; Fozzard, H.A. A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na^+ channel. *Biophys. J.*, 1994, 66(1), 1-13.
84. Lohr, S. One Man's fugu is another's poison. *The New York Times*, New York, USA, 1981.
85. Lopreato, G.F.; Lu, Y.; Southwell, A.; Atkinson, N.S.; Hillis, D.M.; Wilcox, T.P.; Zakon, H.H. Evolution and divergence of sodium channel genes in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98(13), 7588-7592.
86. Madhvani, R.V.; Xie, Y.; Pantazis, A.; Garfinkel, A.; Qu, Z.; Weiss, J.N.; Olcese, R.J. Shaping a new Ca^{2+} conductance to suppress early afterdepolarizations in cardiac myocytes. *J. Physiol.*, 2011, 589, 6081–6092.
87. Magyar, J.; Bányász, T.; Szigligeti, P.; Körtvély, Á.; Jednákovits, A.; Nánási, P.P. Electrophysiological effects of bimoclomol in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2000, 361, 303–310.
88. Magyar, J.; Kiper, C.E.; Dumaine, R.; Burgess, D.E.; Bányász, T.; Satin, J. Divergent action potential morphologies reveal nonequilibrium properties of human cardiac Na channels. *Cardiovasc. Res.*, 2004, 64(3), 477-487.
89. Maltsev, V.A.; Undrovinas, A.I. A multi-modal composition of the late Na^+ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.*, 2006, 69(1), 116-127.
90. McNulty, M.M.; Hanck, D.A. State-dependent mibefradil block of Na^+ channels. *Mol. Pharmacol.*, 2004, 66(6), 1652-1661.
91. Meves, H.; Vogel, W. Calcium inward currents in internally perfused giant axons. *J. Physiol.*, 1973, 235(1), 225-265.
92. Moczydlowski, E. The molecular mystique of tetrodotoxin. *Toxicon*, 2013, 63, 711–722.
93. Moller, R.; Covino, B.G. Cardiac electrophysiologic properties of bupivacaine and lidocaine compared with those of ropivacaine, a new amide local anesthetic. *Anesthesiology*, 1990, 72(2), 322-329.
94. Moreno, J.D.; Clancy, C.E. Pathophysiology of the cardiac late Na current and its potential as a drug target. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2012, 52(3), 608-619.
95. Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, 1998, 19, 1639–1662.

96. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 2009, 30, 2785–2791.
97. Nánási, P.P.; Varró, A.; Lathrop, D.A.; Bryant, S.H. Effects of veratridine on Na and Ca currents in frog skeletal muscle. *Gen. Pharmacol.*, 1994, 25, 1661-1666.
98. Nargeot, J. A tale of two (Calcium) channels. *Circ. Res.*, 2000, 86(6), 613-615.
99. Nattel, S.; Maguy, A.; Le Bouter, S.; Yeh, Y.H. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol. Rev.*, 2007, 87(2), 425-456.
100. Noble, D.; Noble, P.J. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart*, 2006, 92(Suppl 4), iv1-iv5.
101. Noguchi, T.; Arakawa, O. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Mar. Drugs*, 2008, 6(2), 220–242.
102. Payandeh, J.; Gamal El-Din T.M.; Scheuer, T.; Zheng, N.; Catterall, W.A. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature*, 2012, 486, 135-139.
103. Payandeh, J.; Scheuer, T.; Zheng, N.; Catterall, W.A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 2011, 475, 353–358.
104. Penzotti, J.L.; Lipkind, G.; Fozzard, H.A.; Dudley, S.C. Jr. Specific neosaxitoxin interactions with the Na⁺ channel outer vestibule determined by mutant cycle analysis. *Biophys. J.*, 2001, 80(2), 698-706.
105. Pereira Pereira, L.; Métrich, M.; Fernández-Velasco, M.; Lucas, A.; Leroy, J.; Perrier, R.; Morel, E.; Fischmeister, R.; Richard, S.; Bénitah, J.P.; Lezoualc'h, F.; Gómez, A.M. The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.*, 2007, 583(Pt 2):685-694.
106. Perez-Reyes, E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.*, 2003, 83(1), 117-161.
107. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 2004, 25, 1605-1612.
108. Rodriguez, P.; Alfonso, A.; Vale, C.; Alfonso, C.; Vale, P.; Tellez, A.; Botana, L.M. First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-trideoxyTTX in the trumpet shell *Charonia lampas lampas* in Europe. *Anal. Chem.*, 2008, 80(14), 5622-5629.
109. Rosati, B.; Dun, W.; Hirose, M.; Boyden, P.A.; McKinnon, D. Molecular basis of the T- and L-type Ca²⁺ currents in canine Purkinje fibres. *J. Physiol.*, 2007, 579(Pt 2), 465-471.
110. Ruan, Y.; Liu, N.; Priori, S.G. Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2009, 6(5), 337-348.
111. 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 Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2014, 387(5), 457-467.
112. Rybczynska, A.; Jurska-Jasko, A.; Boblewski, K.; Lehmann, A.; Orlewska, C. Blockade of calcium channels and AT1 receptor prevents the hypertensive effect of calcilytic NPS 2143 in rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010, 61(2), 163-170.
113. Saegusa, N.; Moorhouse, E.; Vaughan-Jones, R.D.; Spitzer, K.W. Influence of pH on Ca²⁺ current and its control of electrical and Ca²⁺ signaling in ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.*, 2011, 138, 537–559.
114. Said, M.; Becerra, R.; Valverde, C.A.; Kaetzel, M.A.; Dedman, J.R.; Mundiña-Weilenmann, C.; Wehrens, X.H.; Vittone, L.; Mattiazzi, A. Calcium-calmodulin

- dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2011, 51(6), 936-944.
115. Salameh, A.; Dhein, S.; Fleischmann, B.; Grohe, C.; Hescheler, J.; Linz, K.W.; Meyer, R. The aging heart: changes in the pharmacodynamic electrophysiological response to verapamil in aged rabbit hearts. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010, 61(2), 141-151.
 116. Sali, A.; Blundell, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 1993, 234, 779-815.
 117. Sanguinetti, M.C.; Kass, R.S. Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circ. Res.*, 1984, 55(3), 336-348.
 118. Santana, L.F.; Gómez, A.M.; Lederer, W.J. Ca^{2+} flux through promiscuous cardiac Na^+ channels: slip-mode conductance. *Science*, 1998, 279, 1027-1033.
 119. Satin, J.; Kyle, J.W.; Chen, M.; Bell, P.; Cribbs, L.L.; Fozzard, H.A.; Rogart, R.B. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*, 1992, 256, 1202-1205.
 120. Satin, J.; Schroder, E.A.; Crump, S.M. L-type calcium channel auto-regulation of transcription. *Cell Calcium*, 2011, 49(5), 306-313.
 121. Scholz, A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br. J. Anaesth.*, 2002, 89(1), 52-61.
 122. Sheets, M.F.; Fozzard, H.A.; Lipkind, G.M.; Hanck, D.A. Sodium channel molecular conformations and antiarrhythmic drug affinity. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2010, 20(1), 16-21.
 123. Sims, J.K.; Ostman, D.C. Pufferfish poisoning: Emergency diagnosis and management of mild human tetrodotoxin. *Ann. Emerg. Med.*, 1986, 15(9), 1094-1098.
 124. Strickholm, A. Ionic permeability of K, Na, and Cl in potassium-depolarized nerve. Dependency on pH, cooperative effects, and action of tetrodotoxin. *Biophys. J.*, 1981, 35, 677-697.
 125. Stryer, L. *Biochemistry*, 4th ed.; V.H. Freeman and Company: New York, NY, USA, 1995, p. 23.
 126. Su, Z.; Sheets, M.; Ishida, H.; Li, F.; Barry, W.H. Saxitoxin blocks L-type I_{Ca} . *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, 308(1), 324-329.
 127. Sun, H.; Varela, D.; Chartier, D.; Ruben, P.C.; Nattel, S.; Zamponi, G.W.; Leblanc N. Differential interactions of Na^+ channel toxins with T-type Ca^{2+} channels. *J. Gen. Physiol.*, 2008, 132(1), 101-113.
 128. Sunami, A.; Fan, Z.; Nitta, J.; Hiraoka, M. Two components of use-dependent block of Na^+ current by disopyramide and lidocaine in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 1991, 68(3), 653-661.
 129. Szabó, A.; Szentandrassy, N.; Birinyi, P.; Horváth, B.; Szabó, G.; Bányász, T.; Márton, I.; Magyar, J.; Nánási, P.P. Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Anesthesiology*, 2008, 108(4), 693-702.
 130. Szabó, A.; Szentandrassy, N.; Birinyi, P.; Horváth, B.; Szabó, G.; Bányász, T.; Márton, I.; Nánási, P.P.; Magyar, J. Effects of articaine on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. *Br. J. Anaesth.*, 2007, 99(5), 726-733.
 131. Szabó, G.; Szentandrassy, N.; Bíró, T.; Tóth, I.B.; Czifra, G.; Magyar, J.; Bányász, T.; Varró, A.; Kovács, L.; Nánási, P.P. Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left ventricular wall: Epicardium versus midmyocardium. *Pflügers Arch.*, 2005, 450, 307-316.

132. Szentandrassy, N.; Bányász, T.; Bíró, T.; Szabó, G.; Tóth, I.B.; Magyar, J.; Lázár, J.; Varró, A.; Kovács, L.; Nánási, P.P. Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc. Res.*, 2005, 65, 851-860.
133. Szentandrassy, N.; Szabó, A.; Almássy, J.; Jóna, I.; Horváth, B.; Szabó, G.; Bányász, T.; Márton, I.; Nánási, P.P.; Magyar, J. Effects of articaine and ropivacaine on calcium handling and contractility in canine ventricular myocardium. *Eur. J. Anaesthesiol.*, 2010, 27(2), 153-161.
134. Tang, L.; Gamal El-Din, T.M.; Payandeh, J.; Martinez, G.Q.; Heard, T.M.; Scheuer, T.; Zheng, N.; Catterall, W.A. Structure basis for Ca^{2+} selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature*, 2014, 505, 56-61.
135. Tang, Z.Z.; Liang, M.C.; Lu, S.; Yu, D.; Yu, C.Y.; Yue, D.T.; Soong, T.W. Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human L-type voltage-gated calcium channel, $\text{Ca}_v1.2$ $\alpha 1$ subunit. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(43), 44335-44343.
136. Tikhonov, D.B.; Zhorov, B.S. Architecture and pore block of eukaryotic voltage-gated sodium channels in view of NavAb bacterial sodium channel structure. *Mol. Pharmacol.*, 2012, 82, 97-104.
137. Tikhonov, D.B.; Zhorov, B.S. Modeling P-loops domain of sodium channel: homology with potassium channels and interaction with ligands. *Biophys. J.*, 2005, 88(1), 184-197.
138. Tikhonov, D.B.; Zhorov, B.S. Possible roles of exceptionally conserved residues around the selectivity filters of sodium and calcium channels. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(4), 2998-3006.
139. Tombaugh, G.C.; Somjen, G.G. Effects of extracellular pH on voltage-gated Na^+ , K^+ and Ca^{2+} currents in isolated rat CA1 neurons. *J. Physiol.*, 1996, 493, 719-732.
140. Trimmer, J.S.; Cooperman, S.S.; Tomiko, S.A.; Zhou, J.Y.; Crean, S.M.; Boyle, M.B.; Kallen, R.G.; Sheng, Z.H.; Barchi, R.L.; Sigworth, F.J.; Goodman, R.H.; Agnew, W.S.; Mendel, G. Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron*, 1989, 3(1), 33-49.
141. Tsien, R.W.; Lipscombe, D.; Madison, D.; Bley, K.; Fox, A. Reflections on Ca^{2+} -channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci.*, 1995, 18(2), 52-54.
142. Ulbricht, W.; Wagner, H.H. The influence of pH on equilibrium effects of tetrodotoxin on myelinated nerve fibres of *Rana esculenta*. *J. Physiol.*, 1975, 252, 159-184.
143. Valdivia, C.R.; Chu, W.W.; Pu, J.; Foell, J.D.; Haworth, R.A.; Wolff, M.R.; Kamp, T.J.; Makielski, J.C. Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2005, 38(3), 475-483.
144. van der Heyden, M.A.; Wijnhoven, T.J.; Opthof, T. Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Cardiovasc. Res.*, 2005, 65(1), 28-39.
145. Vassort, G.; Talavera, K.; Alvarez, J.L. Role of T-type Ca^{2+} channels in the heart. *Cell Calcium*, 2006, 40(2), 205-220.
146. Vaughan Williams, E.M. Subgroups of class 1 antiarrhythmic drugs. *Eur. Heart. J.*, 1984, 5(2), 96-98.
147. Vornanen, M.; Hassinen, M.; Haverinen, J. Tetrodotoxin sensitivity of the vertebrate cardiac Na^+ current. *Mar. Drugs*, 2011, 9(11), 2409-2422.
148. Wang, J.; Salata, J.J.; Bennett, P.B. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K^+ channels. *J. Gen. Physiol.*, 2003, 121(6), 583-598.
149. Wang, J.M.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.*, 2004, 25, 1157-1174.
150. Wasserstrom, J.A.; Liberty, K.; Kelly, J.; Santucci, P.; Myers, M. Modification of cardiac Na^+ channels by batrachotoxin: effects on gating, kinetics, and local anesthetic binding. *Biophys. J.*, 1993, 65(1), 386-395.

151. Watanabe, A; Tasaki, I.; Singer, I., Lerman, L. Effects of tetrodotoxin on excitability of squid giant axons in sodium-free media. *Science*, 1967, 155(3758), 95-97.
152. Welling, A.; Ludwig, A.; Zimmer, S.; Klugbauer, N.; Flockerzi, V.; Hofmann, F. Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca^{2+} channels. *Circ. Res.*, 1997, 81(4), 526-532.
153. Woods, J.P.; West, T.C. Frequency-dependence of V_{max} in K-depolarized guinea pig ventricle: effects of nifedipine and verapamil. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1985, 7(1), 197-204.
154. Xiao, Y.F.; Ke, Q.; Wang, S.Y.; Yang, Y.; Wang, G.K.; Morgan, J.P.; Leaf, A. Point mutations in alpha subunit of human cardiac Na^{+} channels alter Na^{+} current kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 281(1), 45-52.
155. Xie, L.H.; Chen, F.; Karagueuzian, H.S.; Weiss, J.N. Oxidative-stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling. *Circ. Res.*, 2009, 104, 79–86.
156. Yang, T.; Attack, T.C.; Stroud, D.M.; Zhang, W.; Hall, L.; Roden, D.M. Blocking *Scn10a* channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ. Res.*, 2012, 111(3), 322-332.
157. Yoo, S.H. Chromogranins and inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent $\text{Ca}(2+)$ -signaling in cardiomyopathy and heart failure. *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19(24), 4068-4073.
158. Zaza, A.; Belardinelli, L.; Shryock, J.C. Pathophysiology and pharmacology of the cardiac 'late sodium current'. *Pharmacol. Ther.*, 2008, 119(3), 326-339.
159. Zaza, A.; Rocchetti, M. The late Na^{+} current--origin and pathophysiological relevance. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 2013, 27(1):61-68.
160. Zhang, R.; Sun, Y.; Tsai, H.; Tang, C.; Jin, H.; Du, J. Hydrogen sulfide inhibits L-type calcium currents depending upon the protein sulfhydryl state in rat cardiomyocytes. *PLoS One*, 2012, 7, e37073.
161. Zhang, X.; Ren, W.; DeCaen, P.; Yan, C.; Tao, X.; Tang, L.; Wang, J.; Hasegawa, K.; Kumasaka, T.; He, J.; Clapham, D.E.; Yan, N. Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature*, 2012, 486, 130-134.
162. Zimmer, T. Effects of tetrodotoxin on the mammalian cardiovascular system. *Mar. Drugs*, 2010, 8(3), 741-762.

12. Tárgyszavak

Kalciumcsatorna
Tetrodotoxin
Nátriumcsatorna
Kutya szív
Feszültség-clamp
Kalciumáram
pH függés
Redox potenciál
Ionszelektivitás
Szívre ható szerek
Csatorna szerkezet

13. Keywords

Calcium channels
Tetrodotoxin
Sodium channels
Canine heart
Voltage clamp
Calcium current
pH dependence
Redox potential
Ion selectivity
Cardioactive drugs
Channel structures

14. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szentandrassy Norbertnek az áldozatkész segítségét, bátorítását, elméleti és gyakorlati tanácsait, baráti támogatását, amelyek nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, aki a Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola vezetőjeként és az Élettani Intézet igazgatójaként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Köszönettel tartozom a Szívelektrofiziológiai Laboratórium vezetőjének, Prof. Dr. Nánási Péternek a hatékony munkavégzés feltételeinek biztosításáért, a hasznos tanácsokért és a bátorításért, továbbá Prof. Dr. Magyar Jánosnak és Dr. Bányász Tamásnak, hogy bevezettek az elektrofiziológia rejtelseibe és azóta is folyamatosan navigálnak abban.

Köszönöm hajdani gyakorlatvezetőmnek, Dr. Horváth Baláznak, hogy felkeltette és mindmáig fenntartja érdeklődésemet a szívelektrofiziológia iránt.

Hálásan gondolok jelenlegi és volt PhD hallgatótársaimra, Dr. Váczi Krisztinára, Dr. Szabó Gergelyre, Dr. Harmati Gáborra, Dr. Bárándi László Viktorra, Dr. Ruzsnavszky Ferencre és Kistamás Kornélra, akikkel megoszthattam a közösen végzett munka felejthetetlen pillanatait.

Külön köszönetemet fejezem ki Dr. Komáromi Istvánnak, Dr. Krasznai Zoltánnak, Dr. Papp Ferencnek és Bartók Ádámnak, akik nélkülözhetetlen munkájukkal hozzájárultak az értekezésben bemutatott eredmények elkészítéséhez.

A kísérletek előkészítése során nélkülözhetetlen segítséget nyújtott és derűs légkört teremtett Sági Éva, Dr. Víghné Horváth Katalin és Orosz József.

Köszönöm az Élettani Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, hogy támogattak és segítettek munkámat.

Végül, de nem utolsósorban családomnak és barátaimnak köszönöm a türelmet és a támogatást.

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



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK

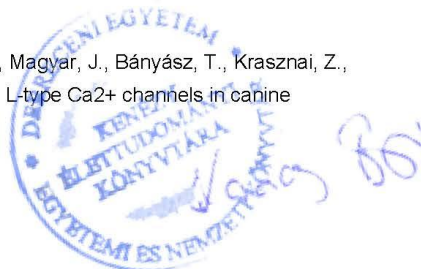


Iktatószám: DEENKÉTK/235/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hegyi Bence
Neptun kód: JEYC4Y
MTMT azonosító: 10032565
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szentandrassy, N., Papp, F., **Hegyi, B.**, Bartók, Á., Krasznai, Z., Nánási, P.P.: Tetrodotoxin blocks native cardiac L-type calcium channels but not CaV1.2 channels expressed in HEK cells.
J. Physiol Pharmacol. 64 (6), 807-810, 2013.
IF:2.72
2. **Hegyi, B.**, Komáromi, I., Nánási, P.P., Szentandrassy, N.: Selectivity problems with drugs acting on cardiac Na⁺ and Ca²⁺ channels.
Curr. Med. Chem. 20 (20), 2552-2571, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/09298673113209990123>
IF:3.715
3. **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 Ca²⁺ 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
4. **Hegyi, B.**, Bárándi, L., Komáromi, I., Papp, F., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Krasznai, Z., Szentandrassy, N., Nánási, P.P.: Tetrodotoxin blocks L-type Ca²⁺ channels in canine ventricular cardiomyocytes.
Pflügers Arch. 464 (2), 167-174, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-012-1114-y>
IF:4.866



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu



További Közlemények

5. 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's Arch. Pharmacol. 387 (5), 457-467, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-0964-6>
IF:2.36 (2013)
6. Bodnár, D., Geyer, N., Ruzsnavszky, O., Oláh, T., **Hegyi, B.**, Sztretye, M., Fodor, J., Dienes, B., Balogh, Á., Papp, Z., Szabó, L., Müller, G., Csernoch, L., Szentesi, P.: Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signaling.
J. Physiol.-London. 592 (6), 1353-1365, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261958>
IF:4.544 (2013)
7. 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
8. Horváth, B., Bányász, T., Jian, Z., **Hegyi, B.**, Kistamás, K., Nánási, P.P., Izu, L.T., Chen-Izu, Y.: Dynamics of the late Na⁺ 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
9. 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-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 386 (3), 239-246, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0823-2>
IF:2.36



10. Szentandrassy, N., Farkas, V., Bárándi, L., **Hegyi, B.**, Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Márton, I., Nánási, P.P.: Role of action potential configuration and the contribution of Ca²⁺ and K⁺ currents to isoprenaline-induced changes in canine ventricular cells.
Br. J. Pharmacol. 167 (3), 599-611, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02015.x>
IF:5.067
11. Farkas, V., Szentandrassy, N., Bárándi, L., **Hegyi, B.**, Ruzsnavszky, F., Ruzsnavszky, O., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Márton, I., Nánási, P.P.: Interaction between Ca²⁺ channel blockers and isoproterenol on L-type Ca²⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes.
Acta Physiol. 206 (1), 42-50, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02448.x>
IF:4.382
12. Szentandrassy, N., Harmati, G., Farkas, V., Horváth, B., **Hegyi, B.**, Magyar, J., Szénási, G., Márton, I., Nánási, P.P.: Modified cAMP derivatives: Powerful tools in heart research.
Curr. Med. Chem. 18 (24), 3729-3736, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796642445>
IF:4.859

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 46,287

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 14,813

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, 2014.09.05.

