

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A fordított frekvenciafüggés,
mint a szívizom intrinzik tulajdonsága**

Dr. Bárándi László Viktor

**Témavezető:
Prof. Dr. Nánási Péter**



**DEBRECENI EGYETEM
Fogorvostudományi Doktori Iskola**

Debrecen, 2012

A fordított frekvenciafüggés, mint a szívizom intrinzik tulajdonsága

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében,
klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Bárándi László Viktor, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Doktori Iskolájának
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
tagok: Dr. Szűk Tibor Ph.D.
Dr. Tóth András Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2013. február 25.

Az értekezés bírálói:

Dr. Baczkó István Ph.D.
Dr. Fülöp László Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
tagok: Dr. Baczkó István Ph.D.
Dr. Tóth András Ph.D.
Dr. Szűk Tibor Ph.D.
Dr. Fülöp László Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013. február 25.

BEVEZETÉS

A szív munkaizomzatának akciós potenciálja jelen ismereteink szerint legalább tucatnyi ionáram finoman hangolt szinfóniájaként alakul ki. Ezen ionáramok veleszületett vagy szerzett defektusai következtében ingerképzési és/vagy ingerületvezetési zavarok alakulhatnak ki, melyek aritmiákhoz, ezeken keresztül a pumpafunkció erőteljes romlásához, végső soron halálhoz vezethetnek. Az ilyen kóros ingerképzés egyik gyakran előforduló fajtája a korai utódepolarizáció (EAD) kialakulása, mely a repolarizáció elnyúlása következtében jön létre és hosszú-QT szindrómával, következményes torsades de pointes típusú kamrai tachikardiával, majd ennek progressziója esetén kamrafibrillációval jár együtt. Gyakoriak továbbá a késői utódepolarizáció (DAD) következményeként kialakuló ritmuszavarok, melyek a kalciummal való túltelítődés következményei és leggyakrabban miokardiális ischaemia/reperfúziót követően fordulnak elő. Az utódepolarizációs mechanizmusú ingerképzési zavarok könnyen aktiválhatnak reentry típusú ingerületvezetési zavart. A fenti potenciálisan életet veszélyeztető állapotokat, főként a szívizom ioncsatornákra ható farmakonok segítségével igyekszünk megszüntetni ill. megelőzni.

A SWORD (Survival With ORal D-sotalol) tanulmány óta tudjuk, hogy a Vaughan Williams féle osztályozás szerinti III. osztályú antiaritmiás szerek az APD megnyújtásán keresztül fordított frekvenciafüggő módon meghosszabbítják az akciós potenciált. Ez azt jelenti, hogy akciós potenciál nyújtó hatásuk kifejezettebb alacsonyabb frekvenciák esetén, mint magasabbak mellett. Tehát éppen tachikardiában, a kórosan alacsony ciklushosszok esetén nem érvényesül kellőképpen a repolarizációt és effektív refrakter fázist nyújtó hatásuk, mikor arra a legnagyobb szükség lenne. Ugyanakkor bradikardia estén a magasabb ciklushosszok mellett az extrém módon megnyúlt repolarizáció korai utódepolarizációk kialakulásához, ezáltal életveszélyes kamrai tachikardiához vezethet. Mivel a III. osztályú szerek proaritmiás kockázatát az akciós potenciál hosszára kifejtett fordított frekvenciafüggő hatásukkal hozzák összefüggésbe, egy fordított frekvenciafüggést nem mutató III. osztályú vegyület kifejlesztése igen

kívánatos lenne. A repolarizációt megnyújtó III. osztályú szerek fordított frekvenciafüggő természetének hátterében álló pontos elektrofiziológiai mechanizmus korábban nagyrészt tisztázatlan volt. Ugyanakkor a jelenség hátterében álló összefüggések pontos megismerése rendkívül fontos, hiszen ennek ismeretében esetleg lehetőség nyílna a mainál hatékonyabb szívritmus szabályozó gyógyszerek kifejlesztésére.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az antiaritmikum és az ioncsatorna kölcsönhatásának frekvenciafüggése a „modulált receptor teória”, a „védett receptor elmélet” értelmezésében

A modulált receptor elmélet értelmében a csatornafehérje affinitása a gátló hatású antiaritmiás szerhez a függ a csatorna állapotától. Ennek egy speciális esete a védett receptor elmélet, amely szerint az antiaritmiás szer hozzáférése a csatornán lévő kötőhelyéhez változik a csatornán lévő kapuk pozíciójának függvényében. Mindkét esetben a kötött és a szabad kötőhelyek aránya a csatorna aktuális strukturális állapotának függvénye, amely folyamatos változáson megy keresztül a szív ciklus során. Olyan esetet feltételezve, amikor a gátlás kifejlődésének a diasztole kedvez, az akciós potenciál plató fázisa során a szer leválik kötőhelyéről, az akciós potenciál megnyúlásának fordított frekvenciafüggő jellegét eredményezve. Ráadásul a fenti ok miatt a ligand-kötött csatornák aránya exponenciális időkinetikát követ a repetitív ingerlés során, amit a stimulusok közötti időintervallum, a csatorna kapuzási folyamatai, a szer koncentrációja, valamint a kötődési folyamat frekvenciafüggősége határoznak meg.

A modulált receptor teória ellen szól a változatos struktúrájú, de egyaránt fordított frekvenciafüggést mutató szerek nagy száma. Ugyanakkor nem tartható valószínűnek, hogy minden szer kötődése azonos csatorna állapot mellett jönne létre. Azonban az elképzelés nem hanyagolható el, hiszen számos Na^+ - és Ca^{2+} -csatornára ható vegyületről tudjuk, hogy frekvenciafüggő módon (bár nem fordított frekvenciafüggő módon) hatnak.

Az I_{Ks} áram magas ingerlési frekvenciáknál kumulálódik

Jurkiewicz és Sanguinetti 1993-ban beszámoltak arról, hogy a metánszulfonanilid szerkezetű III. osztályú antiaritmiás szerek az akciós potenciálok időtartamát fordított frekvenciafüggő módon nyújtották meg tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken, tehát a hatásuk alacsonyabb ingerlési frekvencia alkalmazásánál kifejezettebb volt, mint magasabb frekvenciák esetén. A szerzők kísérleteikben dofetilidet használtak, amely az általuk alkalmazott koncentrációban ($0,1 \mu\text{M}$) az I_{Kr} szelektív gátlószerének tekinthető, míg az I_{Ks} -re gyakorlatilag hatástalan. Feszültség-clamp körülmények között végezve a vizsgálatot megerősítést nyert, hogy a dofetilid szelektíven gátolja az I_{Kr} -t ($IC_{50}=31,5 \text{ nM}$), ugyanakkor sem az I_{Ks} -re, sem az I_{K1} -re nem volt számottevő hatással. Különböző frekvenciájú ingerlést alkalmazva azt találták, hogy sem az I_{Kr} , sem az I_{K1} amplitúdója nem változott meg, sőt a dofetilid I_{Kr} -re gyakorolt gátló hatása sem függött az ingerlési frekvencia nagyságától. Ezzel szemben azonban az I_{Ks} amplitúdója nőtt az ingerlési frekvencia emelésével, amit az I_{Ks} nem teljes deaktivációjával magyaráztak. Kísérleti eredményeikből arra a következtetésre jutottak, hogy bár dofetilid alkalmazása során az akciós potenciál megnyúlásáért az I_{Kr} gátlás a felelős, a tapasztalt frekvenciafüggésért nem az I_{Kr} -re gyakorolt hatás, hanem az I_{Ks} azon kinetikai sajátága tehető felelőssé, hogy magas frekvenciájú ingerlés alatt deaktivációja nem következik be tökéletesen és ezáltal az áram kumulálódik. Tehát az I_{Ks} magas ingerlési frekvenciánál relatíve nagyobb szerepet játszik a repolarizáció folyamatában, emiatt az I_{Kr} gátlók akciós potenciált nyújtó hatása csökkenhet. Ennek a teóriának gyökeresen ellentmond az a megfigyelés, hogy a fordított frekvenciafüggés az I_{Ks} teljes gátlása során is kimutatható.

Az extracelluláris térben K^+ akkumulálódik magas ingerlési frekvenciánál

Yang és Roden 1996-ban közölt cikkükben az I_{Kr} -t nem szelektíven gátló kinidin és az azt szelektíven gátló dofetilid hatását vizsgálták hERG csatornát expresszáló AT-1 sejteken, ahol az árammérést zavaró egyéb kifelé irányuló áram nem volt jelen. Megállapították, hogy az extracelluláris kálium koncentráció növelése a dózis-hatás görbe nagymértékű jobbra tolódását okozta mindkét szer esetében. Az extracelluláris K^+ koncentráció 1-ről 8 mmol/l-re növelésekor a dofetilid IC_{50} értéke $2,7 \pm 0,9$ -ről 79 ± 32 nmol/l-re nőtt, kinidin esetén $0,4 \pm 0,1$ -ről $3,8 \pm 1,2$ μ mol/l-re. Emelkedett szívfrekvenciánál a sejtek homeosztázisát fenntartó Na^+/K^+ pumpa kompenzáló működése viszonylag lassú, így káliumionok halmozódhatnak fel a sejtmembrán külső oldalán a sejtközi térben (ugyanúgy, mint ischaemia során, amikor a pusztuló sejtekből káliumionok áramlanak ki). Mindezt egybevetve ischaemia vagy magas szívfrekvencia okozta extracelluláris kálium koncentráció emelkedés során az I_{Kr} gátló szerek hatékonysága csökken. Hipokalémia esetén viszont a szerek I_{Kr} gátló hatása kifejezettebbé vált, ami magyarázatul szolgálhat arra a klinikai tapasztalatra, hogy hipokalémia és bradikardia esetén a torsade de pointes típusú kamrai tachikardia gyakoribb kialakulása figyelhető meg. Arra vonatkozóan, hogy az extracelluláris kálium koncentrációjának megváltozása milyen mechanizmussal okozhatja az I_{Kr} gátlásának fordított frekvenciafüggését, a szerzők két lehetséges magyarázatot adnak. Az első szerint az extracelluláris kálium koncentrációjának változása a csatorna konformációjának változását indukálhatja, ezzel megváltoztatva a szer kötődését a csatornán lévő kötőhelyéhez. A másik lehetséges magyarázat az, hogy ezek a szerek feszültségfüggő módon kötődnek a nyitott állapotú csatornához. Ebben az esetben a megnövekedett káliumpermeabilitás ronthatja a gátlószerek kötődését a pórusban található kötőhelyeikhez. E teória ellen is leginkább az szól, hogy nemcsak az I_{Kr} gátlószerei mutatnak fordított frekvenciafüggő hatást.

A káliumáramok kinetikai paramétereinek frekvenciafüggő viselkedése

Rocchetti és mtsai (2001) tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken akciós potenciál-clamp technikával vizsgálták a késői egyenirányító káliumáramok frekvenciafüggését. Azt találták, hogy a rövid ciklushossz (magas szívfrekvencia) mind az I_{Kr} -nek, mind az I_{Ks} -nek az akciós potenciál során korábban történő aktivációját és amplitúdójának emelkedését okozta, ugyanakkor az I_{Kr} és az I_{Ks} hozzájárulása a membránon átfolyó teljes áramhoz a repolarizáció folyamatában változatlan maradt. A ciklushossz rövidülése azonban a két ionáram növekedését egészen eltérő mechanizmussal hozza létre. A diasztole intervallumának rövidítése azonos akciós potenciál időtartam mellett serkentette a I_{Ks} -t, viszont az I_{Kr} -re nem volt hatással, tehát az I_{Ks} nagysága a szisztole és a diasztole arányától függhet. Ezzel szemben az akciós potenciál hosszának csökkentése, változatlan diasztolés intervallum mellett növelte az I_{Kr} -t. Az I_{Ks} növekedéséért a csökkenő diasztolés intervallum során az aktivált állapotú csatornák akkumulációja lehet felelős. A szerzők is megemlítik viszont, hogy ez a magyarázat nem lehet teljes mértékben helytálló más fajokban, úgymint kutya és humán szívizomban, ahol az I_{Ks} deaktivációs kinetikája a tengerimalacéhoz képest lényegesen gyorsabb folyamat. Az I_{Ks} magas szívfrekvenciáknál megfigyelhető növekedése mögött további faktorok hozzájárulását valószínűsítik *in vivo*, ilyen lehet például az I_{Ks} emelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció iránti érzékenysége, valamint a β -adrenerg aktiváció. Az I_{Kr} olyan különleges kapuzási sajátságokkal (pl. ultragyors inaktivációval) rendelkezik, hogy a plató alatti lassú repolarizáció során (amikor a repolarizáció sebessége -1 V/s alatti) az I_{Kr} nagysága csökken, ezzel tovább lassítva a repolarizáció folyamatát. Ellenben a repolarizáció sebességének $-1,5$ V/s felé emelkedése az I_{Kr} jelentős növekedését eredményezi. Ennélfogva az I_{Kr} és a repolarizáció nagysága közötti pozitív visszacsatolás a repolarizációban egyfajta autoregeneratív mechanizmus kialakulását okozza. Ugyanakkor az I_{Kr} nagysága és kinetikai paraméterei az egyes fajok között jelentős eltéréseket mutatnak.

Ezzel kapcsolatban Virág és mtsai (2009) megállapították, hogy az akciós potenciál konfigurációja az I_{Kr} és az I_{K1} kinetikai sajátságain keresztül befolyással lehet az akciós potenciál megnyúlásának fordított frekvenciafüggő jellegére. A repolarizáló hatású kifelé irányuló áramok gátlása, vagy a depolarizációt okozó befelé irányuló áramok serkentése folytán a repolarizációt nyújtó szerek nagy valószínűséggel fordított frekvenciafüggést mutatnak, függetlenül attól, hogy mely áramot módosították. Az I_{K1} az I_{Kr} -hez hasonlóan Rocchetti és mtsai által előzőekben említett különleges kinetikai sajátságokkal rendelkezik. Az I_{Kr} esetében az inaktiváció és az inaktivációból való visszatérés időállandója gyorsabb, mint az aktiváció és a deaktiváció időviszonyai. Az I_{K1} esetében a magnéziumionok és a poliaminok a nyugalmi membránpotenciálnál kevésbé negatív érték esetén gyorsan kötődnek a csatornához, ezáltal gyorsan elzárják a csatorna pórusát, így a csatorna deaktivációját okozzák. Pozitív potenciál értékeknél az I_{Kr} lassan aktiválódik, de gyorsan inaktiválódik. Amikor a repolarizációs folyamat meredeksége megnő, időegység alatt a csatornák nagyobb része tér vissza az inaktivációból, mint amikor a repolarizáció meredeksége alacsony. Fentiek értelmében a repolarizáció meredekségének emelkedése növeli ennek a repolarizáló áramnak a nagyságát, így tovább gyorsítva a repolarizáció folyamatát. A csatorna deaktivációja a repolarizáció során egy lényegesen lassabb folyamat és ez a kialakuló áram mértékét limitálja. Az I_{K1} esetében pozitív potenciál értékeknél a magnéziumionok és a poliaminok okozta gátlás a repolarizáció meredekségének növekedésével gyorsan oldódik, ezzel nagyobb I_{K1} -áramot eredményez a repolarizáció folyamatának elmélyülésekor. Ennélfogva bármely, a repolarizáció meredekségét csökkentő tényező, akár egy káliumcsatorna gátlástól független esemény is, pl. a veratrin alkalmazása után megfigyelhető késői nátriumáram növekedése, vagy a szívelégtelenség okozta megnyúlás, ill. a hosszú QT szindróma 3-as típusa tovább csökkentheti a repolarizációs hajtóerőt. Lényeges, hogy maguk a szerzők is hangsúlyozzák, hogy magas szívfrekvenciáknál nem csupán az I_{Kr} és az I_{K1} kinetikai tulajdonságai tehetők felelőssé a repolarizáció megnyúlásának fordított frekvenciafüggéséért, ugyanakkor felerősíthetik valamely szer által a plató fázis alatt folyó áramokban okozott kisebb változásokat.

CÉLKITŰZÉSEK

A fordított frekvenciafüggés hátterében meghúzódó mechanizmusok feltárására kidolgozott nagyszámú teória ellenére a pontos működési elv mostanáig tisztázatlan maradt. Kutatásaink során tehát célul tűztük ki a fenti elméletek közötti ellentmondások feloldását, az egyezések okának tisztázását, szükség esetén az előző eredményeket magyarázó új elmélet felállítását a kísérletes célokra használt emlősök lehetőség szerint legszélesebb skáláján (patkány, tengerimalac, nyúl, kutya) valamint az emberi szíven elvégzett elektrofiziológiai vizsgálatok eredményeképpen. Bár tudjuk, hogy a humán szív elektromos szempontból eddigi legjobb modelljének a kutya szívizomzatot tekinthetjük, vizsgálatainkat mégis több fajon végeztük el annak érdekében, hogy megtudjuk, hogy az egyes fajok akciós potenciáljai között tapasztalható, néhol markáns különbség (adott ionáramok megléte vagy hiánya) mennyiben befolyásolja az akciós potenciál hosszának változását az ingerlési frekvencia függvényében.

Kutatásaink során lehetőség nyílt annak tisztázására, hogy a különböző antiaritmiás szerek akciós potenciál hosszára kifejtett hatásának frekvenciafüggő természete az ingerlő frekvencia változtatásának közvetlen következménye-e, vagy az akciós potenciál eredeti időtartamának nagyságával van-e inkább kapcsolatban. Továbbá, hogy a vizsgált jelenség csak egyensúlyi körülmények között alakul ki, vagy a ciklushossz hirtelen változtatását követően is megfigyelhető.

A fenti kérdésfelvetések alapján tehát megvizsgáltuk az APD moduláció frekvenciafüggését különféle ionáramokat serkentő és gátló szerek, valamint transzmembrán áram injektálás alkalmazásával. Vizsgáltuk továbbá, hogy az akciós potenciál platója alatt folyó membránáram és az APD közötti kapcsolat milyen mértékben igazolja kísérleti megfigyeléseinket.

METODIKÁK

A preparátumok előkészítése

Kísérleteinket ivarérett, kísérleti célra tenyésztett 10-15 kg súlyú kutyákon, 2-3 kg súlyú házinyulakon, 0,3-0,5 kg súlyú tengerimalacokon, valamint 0,2-0,4 kg súlyú Wistar patkányokon végeztük. A mellkas megnyitását követően a szívet gyorsan kipreparáltuk, majd ezt követően hideg (5 °C-os) Tyrode-oldatba helyeztük.

A kutya bal kamrájából ék alakú darabot metszettünk ki, majd a szövetdarabban futó bal elülső leszálló coronaria artéria ágat (LAD) kanüláltuk, majd anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával enzimatikusan izolált szívizomsejteket nyertünk belőle. Ezzel egy időben történt a jobb ill. bal kamrai papilláris izom, valamint a szabadon futó Purkinje-rostok kipreparálása és Tyrode oldattal történő perfúziója.

A kanülált bal kamrai szegmenst Langendorff apparátus segítségével 5 percen keresztül Ca^{2+} -mentes JMM (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás) oldattal perfundáltuk a szövet Ca^{2+} és vértartalmának eltávolítása céljából. Ezt követően a preparátumot mintegy 30 percen keresztül perfundáltuk kollagenázzal kiegészített JMM oldattal. A sejtizolálás során az oldatokat végig karbogénnel equilibráltuk és a perfúziós oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. Felhasználásig a sejteket 14 °C-os MEM oldatban tároltuk.

Humán kísérleti mintáinkat egészséges szívdonorok mintáiból nyertük. A szervdonorok által felajánlott szervekből a pulmonáris és aorta billentyűk kerültek beültetésre, míg a fennmaradó szövetek kutatási célra hasznosultak. A kiemelést közvetlenül megelőzően a donorok dobutaminon, furosemiden és plazma expandereken kívül más gyógyszeres kezelésben nem részesültek.

Elektrofiziológiai mérések

A kísérletek során a szívizomsejteket 10 ml/perc sebességgel perfundáltuk oxigenizált Tyrode-oldattal 37 °C hőmérsékleten. A membránpotenciál változásait 3 M KCl oldattal töltött 20–40 MΩ ellenállású boroszilikát üvegből készült intracelluláris mikroelektrodákkal regisztráltuk. A frekvenciafüggés

vizsgálatakor az ingerlési ciklushosszt először 5 s-ra állítottuk, majd a 0,3 s-os értékig folyamatosan csökkentettük. A mérések rögzítését megelőzően legalább 100 ciklust vártunk, hogy beálljon az új egyensúlyi állapot. Az áramimpulzusok akciós potenciál hosszára kifejtett hatását vizsgálva, minden 20. AP alatt -40 és +100 pA nagyságú áram injektálást végeztük. A vizsgált paraméterekben az áraminjektálás hatására bekövetkező változásokat az impulzust megelőző 19. AP tulajdonságaival vetettük össze.

A papilláris izmon és Purkinje-rostokon végzett mérések során a preparátumokat a fentiekben ismertetett módon oxigenizált Tyrode-oldattal perfundáltuk 37 °C hőmérsékleten. A szövetek ingerlése platina elektródákkal 5 és 0,3 s közötti ciklushossz alkalmazása mellett történt (Purkinje-rostok esetén a leghosszabb ciklushossz 3 s volt). A vizsgálat során a membránpotenciál változásokat 3 M KCl oldattal töltött 5–20 M Ω ellenállású boroszilikát mikroelektrodákkal regisztráltuk.

Az akciós potenciálok hosszát a repolarizáció 50 %- , illetve 90 %-ánál határoztuk meg (rendre APD₅₀ és APD₉₀). Az izolált sejteken végzett kísérletek során minden vizsgált szert felszálló koncentráció sorban legalább 2-3 percig, a teljes hatás kialakulásáig alkalmaztunk. Multicelluláris preparátumok esetén a szerek alkalmazását követően a várakozási idő általában 30-40 perc volt, csak ezt követően vizsgáltuk a szer hatására bekövetkező frekvenciafüggő változásokat.

Matematikai modellezés

Előzetes kutatási eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a fordított frekvenciafüggés egy olyan alapmechanizmus következménye, ami független az APD változásokat közvetlenül létrehozó hatásoktól. A szimuláció célja, hogy igazolja azon munkahipotézisünket, miszerint ezen alapmechanizmus az akciós potenciál platója alatt folyó nettó membránáram és az akciós potenciál időtartama közötti kapcsolat jellegzetességeiből adódik. A klasszikus AP mérés nem alkalmas sem ennek igazolására, sem megcáfolására, mivel ezen vizsgálat során nem tudunk szelektíven eltekinteni az ioncsatorna kapuzási kinetikájától, mely potenciálisan hozzájárulhat a fordított frekvenciafüggés mechanizmusához. Ennek során előzetesen két különböző ciklushosszon (0,3 s és 5 s) regisztrált kutya kamrai endokardiális

AP-t alkalmaztunk. A szimuláció során az AP-ra mint idő és feszültség mátrixára tekintettünk, melyben az időt monodimenzionális vektorként foghatjuk fel.

Ebből fakadóan a membránon átfolyó áram összmenyisége a teljes AP viszonylatában nullának tekinthető. Emiatt tekinthetjük úgy, hogy a nettó membránáram értéke megegyezik a kapacitív árammal (ellentétes előjellel). A kapacitív áramot a membránpotenciál változás sebességének és a membránkapacitásának szorzataként írhatjuk le ($I_{\text{net}} = -C_m \cdot dV/dt$).

A szívizomsejtek állandó membránkapacitását véve alapul a membránpotenciál- változás sebessége jól korrelál a nettó transzmembrán árammal, melynek alapján becsülhetővé válik a különbség az egyes akciós potenciál profilok között, mivel a nettó membránáram amplitúdójának változása alakítja ki a membránpotenciál különbségek időbeni változását. A kísérlet során a befelé irányuló konstans áram hatását a membránpotenciál értékének időbeli változásából számoltuk. A számítást a $t_{\text{stim}}(i) = t_{\text{kont}}(i-1) + \Delta V_m / V_m'(i)$ egyenlet szerint elvégezhetjük minden egyes feszültségérték mellett, meghatározva az általunk alkalmazott áram injekció idővektorát, ahol t_{kont} a kontroll idővektor, míg a ΔV_m a feszültség változása két egymást követő időpillanat között.

A repolarizáció folyamatát az áram injektálás során a $V_m(t_{\text{stim}})$ értéke adja meg adott ciklushossz mellett, összehasonlítva a kiindulási $V_m(t_{\text{kont}})$ értékével. Az áram-injektálás hatására a repolarizáció idejében bekövetkező változások tehát kalkulálhatók a kiindulási és stimulációt követően kapott idővektorok különbségéből. Ezen változások különbsége szolgál alapul annak megítélésére, hogy hogyan függ az AP hossza a nettó membránáram változástól.

Statisztikai analízis

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

EREDMÉNYEK

Nem kizárólag a III. osztályú antiaritmiás szerek APD nyújtó hatása mutat fordított frekvenciafüggést

A III. osztályú antiaritmiás ismert, hogy akciós potenciál nyújtó hatásuk kifejezettebb alacsonyabb frekvenciák esetén, mint magasabbak mellett. Fentiek értelmében e vizsgált III. osztályú szerek akciós potenciál időtartamot nyújtó hatása fordított frekvenciafüggést mutat. Felmerül a kérdés, hogy vajon ez a jelenség csak a III. osztályú antiaritmikumokra jellemző, vagy esetleg más, az AP hosszát eltérő mechanizmussal nyújtó szerek esetén is megfigyelhető a jelenség. Ennek vizsgálatát először kutya kamrai papilláris izmon végeztük, mivel elektrofiziológiai szempontból ez a preparátum mutatja a legnagyobb hasonlóságot a humán kamrai szívizomhoz.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a window Na^+ -áram aktivátor veratrin (1 $\mu\text{g/ml}$), a Ca^{2+} -csatorna aktivátor BAY K 8644 (1 μM), az I_{Kr} gátló dofetilid (1 μM) és az I_{K1} gátló BaCl_2 (10 μM) az alkalmazott koncentrációkban kivétel nélkül mind fordított frekvenciafüggő módon növelte az akciós potenciál időtartamát, vagyis hatásuk nagyobb ingerlési ciklushosszak mellett egyre kifejezettebbé vált. Ezek az eredmények világosan jelzik, hogy a fordított frekvenciafüggő APD nyújtás nem korlátozódik az I_{Kr} gátló szerekre, amint azt korábban az első klinikai megfigyelésekre támaszkodva feltételezték, hanem bármely, az APD megnyújtására képes szer esetén megfigyelhető.

A fordított frekvenciafüggés nem csak az AP-t nyújtó szerek sajátossága

Kutatásaink e pontján felmerült a kérdés, hogy a fentiek fényében vajon csupán a AP hosszának nyúlása mutat fordított frekvenciafüggést, vagy az AP rövidülése is. Ennek a kérdésnek a megválaszolására több fajban megvizsgáltuk néhány akciós potenciált rövidítő szer hatását.

A Na^+ -csatorna gátló lidokain és az ATP-függő K^+ -csatornát aktiváló nicorandil akciós potenciál időtartamot rövidítő hatása kutya Purkinje-roston

ugyancsak fordított frekvenciafüggést mutatott, akárcsak az AP-t nyújtó korábban vizsgált szerek. Rövid ciklushossz (0,3 s) mellett a lidokain AP-t rövidítő hatása megközelítően a 30 %-a volt a hosszabb ciklushossz (3 s) mellett mért értéknek, hasonlóan nicorandil esetében tapasztaltakhoz. Az utóbbi szerhez hasonló hatásmechanizmusú lemakalim tengerimalac szívizmon ugyancsak kifejezettebb APD csökkenést okozott 3 s, mint 0,3 s ciklushosszokon. Humán szívizom preparátumon a Na⁺-csatornákat gátló mexiletin és tetrodotoxin alkalmazása során szintén azt találtuk, hogy az APD csökkenése it is fordított frekvenciafüggő módon jött létre. Tehát megállapíthatjuk, hogy nemcsak az APD megnyúlását okozó szerek, hanem az azt rövidítők is fordított frekvenciafüggő módon hatnak függetlenül a rövidülést létrehozó mechanizmustól.

Az áraminjektálás hatásának frekvenciafüggése

Fenti eredmények alapján úgy tűnik, hogy az akciós potenciál időtartamának bármely irányú megváltoztatása hosszú ciklushosszaknál markánsabb változásokat eredményez, mint rövideknél. Ezt a következtetést azokra az eddigi kísérleteinkre alapoztuk, amelyekben az AP időtartamát a szívizom ioncsatornáinak farmakológiai módosítása útján befolyásoltuk. Könnyen megszabadulhatunk a szer-csatorna potenciálisan frekvenciafüggő interakciójával kapcsolatos bármely ellenvetéstől, ha az AP időtartamát egyéb módon, kémiai ágensek alkalmazása nélkül változtatjuk meg. Erre kiválóan alkalmas az AP idejét nyújtó depolarizáló konstans áramimpulzusok, ill. az AP időtartamát megrövidítő hiperpolarizáló konstans elektromos impulzusok alkalmazása. Ez az érvelés azért helytálló, mert bármely ioncsatorna aktivátor vagy gátló vegyületre tekinthetünk úgy, mintha egy befelé vagy kifelé irányuló áramot adnánk hozzá az akciós potenciál platója alatt folyó nettó membránáramhoz vagy vonnánk ki abból.

Kísérleteinkben -30 pA amplitúdójú befelé irányuló áramimpulzusokat injektáltunk a szívizomsejtekbe azzal a céllal, hogy az AP-t megnyújtsuk, illetve ennek alternatívájaként +60 pA amplitúdójú kifelé irányuló áramimpulzusokat alkalmaztunk az akciós potenciálok rövidítésére. Mindezen kísérleteket számos ciklushosszon elvégeztük, azt fokozatosan 5 s-ról 0,3 s-ra

változtatva. Azt tapasztaltuk, hogy konstans áramimpulzusok alkalmazásakor is megfigyelhető volt az APD változásának fordított frekvenciafüggő jellege. Az alkalmazott befelé vagy kifelé irányuló áramimpulzusok akciós potenciált nyújtó és rövidítő hatása az ingerlési frekvencia csökkenésekor jelentősen növekedett, tehát azokban az esetben találtunk nagyobb változásokat, amikor az akciós potenciálok *sui generis* hosszabbak voltak. Az így nyert mérési pontok szinte megkülönböztethetetlenek voltak valamely ioncsatorna agonistájával vagy antagonistájával kapott eredményektől.

Az előbbi megállapítást tovább bizonyítja, hogy 10 μM BaCl_2 által kiváltott APD megnyúlás egy egyidejű konstans kifelé irányuló áramimpulzus alkalmazásával (39 ± 3 pA) tökéletesen kiolthatónak bizonyult minden vizsgált ciklushosszon. A BaCl_2 okozta akciós potenciál nyújtás az I_{K1} áram gátlásának következménye. Mivel sem az I_{K1} , sem annak BaCl_2 általi gátlása nem mutat jelentős frekvenciafüggést, ezért ez a kísérlet is kifejezetten alkalmas arra, hogy megvizsgáljunk egy specifikus csatorna- vagy szerhatástól független fordított frekvenciafüggő mechanizmust.

További bizonyítékot szolgáltat a fenti gondolatmenet helyességére a következő kísérlet, melynek során az ingerlés ciklushosszát két ütés között (beat-to-beat) 5 s-ről 0,5 s-ra csökkentettük. A ciklushossz csökkenése által létrehozott APD rövidülést egy befelé irányuló (inward) áram injektálásán keresztül teljes mértékben vissza lehetett fordítani. Csak úgy, mint az ingerlési frekvencia ellentétes irányú változtatása révén (0,5 s-ről 5 s-ra) kialakuló APD nyúlás egy outward (kifelé irányuló) áramimpulzus alkalmazása mellett szintén teljes mértékben elmaradt.

A fordított frekvenciafüggés nem korlátozódik egy adott fajra

Mint ahogy azt a korábbiakban láthattuk, a kutya kamrai papilláris izmon alkalmazott I_{Kr} gátló dofetilid, Na^+ -csatorna aktivátor veratrin, a Ca^{2+} -csatorna aktivátor BAY K 8644 és az I_{K1} gátló BaCl_2 APD nyújtó hatása egyaránt fordított frekvenciafüggést mutatott. A ciklushossz növekedésével az APD változás mértéke monoton növekedett. Hasonló módon, kutya Purkinje-rostokon is az APD-t rövidítő Na^+ -csatorna gátló lidokain és az ATP-függő K^+ -

csatorna aktivátor nicorandil hatása ugyancsak fordított frekvenciafüggést mutatott, és ez a hatás is a ciklushossz növekedésével egyre kifejezettebbé vált. Humán multicelluláris kamrai szívizom preparátumon mind az APD megnyúlását kiváltó szerek, pl. az I_{Kr} -gátló dofetilid (50 nM), d-sotalol (30 μ M), E-4031 (1 μ M), az I_{K1} -gátló $BaCl_2$ (10 μ M), mind az APD-t rövidítő szerek, pl. a I_{Na} -gátló mexiletin (10 μ M) és tetrodotoxin (2 μ M) hatásai fordított frekvenciafüggést mutattak, tehát APD-re kifejtett hatásuk nagyobb ciklushosszaknál volt kifejezettebb. Tengerimalacból izolált multicelluláris kamrai preparátumokon a d-sotalol az összes alkalmazott ingerlési ciklushossz mellett nyújtotta, míg az ATP-szenzitív K^+ -csatorna aktivátor lemakalim minden frekvencián jelentősen rövidítette az akciós potenciál időtartamát. A változások nagysága most is hosszabb ciklushosszok mellett volt markánsabb mindkét szer esetében. Megállapíthatjuk tehát, hogy a vizsgált szerek hatása fordított frekvenciafüggést mutatott tengerimalac kamrai papilláris izmon is, annak ellenére, hogy a tengerimalac szívizomsejteinek akciós potenciálját létrehozó ionáramok profilja jelentős mértékben különbözik a humán és kutya szíven találhatókétól. Mind az expresszált csatornafehérjék típusa, mind az ioncsatornák kinetikai sajátságai és denzitásuk eltérő tengerimalac szíven az előbb említett fajokétól. Fentiek alapján úgy tűnik, hogy a fordított frekvenciafüggés a szívizomsejteknek egy általános tulajdonsága, amely speciesfüggést nem mutat.

A fordított frekvenciafüggés nem jellemző minden fajra

Nyúl kamrai szívizmán az akciós potenciál frekvenciafüggő sajátságai jelentősen eltérnek attól, amit tengerimalac, kutya és humán szívizmon tapasztalhatunk. Nyúlban az APD nyúlás nem mutat monoton ciklushosszfüggést, maximumát egy köztes ciklushossz mellett, valahol 0,5 s és 0,7 s között éri el. Az APD értéke 0,5 s-os ciklushosszig növekszik, majd 0,7 s-os ciklushossz felett újra csökkenni kezd. Ez a tulajdonság egyedülálló lehetőséget kínál annak eldöntésére, hogy valamely szer által kiváltott APD változások az ingerlési frekvencia nagyságától közvetlenül, vagy attól más módon - esetleg áttételesen - függenek.

Nyúl papilláris szívizom preparátumon is a már jól ismert hatású d-sotalolt és lemakalimot használtuk az APD növelésére, illetve csökkentésére. A várakozásoknak megfelelően nyúlban is minden vizsgált frekvencián 20 μM sotalol nyújtotta, míg 15 μM lemakalim rövidítette az akciós potenciált. Lényeges, hogy a szerek alkalmazása után mért APD_{90} értékek is a kontrollhoz hasonló mintázatú frekvenciafüggést mutattak. Amikor a kontrollhoz viszonyított APD_{90} változásokat ábrázoltuk, azt találtuk, hogy a legnagyobb értékek nem a leghosszabb ciklushossznál, hanem 0,5 és 0,7 s-nál voltak mérhetőek. Tehát nyúl papilláris izmon a szer által kiváltott maximális APD változások azon a köztes ciklushosszon jelentek meg, amelynél a kiindulási AP a leghosszabb volt. Megfigyelhető, hogy mind a 30 μM d-sotalol, mind a 15 μM lemakalim maximális APD módosító hatását a leghosszabb (195 ms körüli) kiindulási APD_{90} érték esetében érte el, alacsonyabb kiindulási APD értékeknél a szer hatására bekövetkező változás nagysága csökken. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a szerhatások nagysága inkább a kiindulási APD-től, mintsem az ingerlési frekvenciától függ.

Az APD változás nagysága a kiindulási AP időtartamának függvénye

Ahogy azt az előző kísérletsorozat sejtetni engedi, az APD változás nagysága a kiindulási AP hosszával mutat szoros korrelációt (ellentétben azzal, ahogy azt kezdetben a ciklushosszal kapcsolatban feltételeztük). Amennyiben a kutya papilláris izmon veratrin, BAY K 8644, dofetilid és BaCl_2 által kiváltott APD változások eredményeit a kiindulási APD függvényében ábrázoljuk, egy bizonyos APD tartományon belül a nyúl preparátumokon tapasztalt korrelációhoz nagyon hasonló összefüggéseket kapunk. A humán multicelluláris kamrai preparátumon alkalmazott dofetilid, sotalol, E-4031, BaCl_2 , tetrodotoxin és mexiletin APD-t nyújtó ill. rövidítő hatását a szerek alkalmazása előtt felvett, kiindulási APD függvényében ábrázolva, a szerek hatására bekövetkező APD változások emberi szívizomban is arányosak voltak a kiindulási APD értékekkel. Lényegében hasonló eredményeket kaptunk tengerimalacból izolált multicelluláris kamrai preparátumokon is. Korábban, amikor a szerek által kiváltott változásokat a ciklushossz

függvényében ábrázoltuk, rendszerint egy-egy parabolára emlékeztető görbét kaptunk. Ellenben, mikor a kiindulási APD-k függvényében ábrázoltuk az APD változásait tengerimalacban, akkor azok mindkét szer esetében egy-egy egyenesre illeszkedtek, vagyis lineáris összefüggést mutattak. Tehát az APD változása tengerimalac esetében is jól korrelál a szer alkalmazása előtt mért APD értékekkel.

A korábban bemutatott kísérletek során az alkalmazott befelé (-30 pA) vagy kifelé (+60 pA) irányuló áramimpulzusok akciós potenciált nyújtó és rövidítő hatásai ismét csak a kiindulási APD_{90} értékekkel mutatnak pozitív korrelációt: az összefüggés gyakorlatilag lineáris volt a vizsgált tartományban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az APD változások nagysága kizárólag a kiindulási APD függvénye, de nem függ sem az áram változásának természetétől (hogy elektromos impulzus vagy szerhatás eredményeképpen jön létre), sem a kapuzási kinetikáktól, sem az érintett ionáram profiljától, sem az alkalmazott szer sajátságaitól.

A patkányszívizom frekvenciafüggő viselkedése

A vizsgált fajok közül az embertől filogenetikailag legtávolabb álló patkányszívizom akciós potenciálja több tekintetben is eltér a nagyobb testű emlősök akciós potenciáljától. A patkány kamrai szívizom akciós potenciáljának időtartama közel egy nagyságrenddel rövidebb, mint azon emlősöké, amelyek akciós potenciálja plató fázissal rendelkezik. Ennek hátterében az eltérő ioncsatorna-készlet és eltérő intracelluláris kalcium homeosztázis áll. További lényeges sajátsága a patkány kamrai szívizomsejteknek, hogy akciós potenciáljuk időtartama magasabb szívfrekvenciánál növekszik, amely ellentétes az eddigiekben vizsgált emlősfajokban találtakkal. A fenti különbségeket figyelembe véve kézenfekvőnek tűnt megvizsgálni a patkány szívizom frekvenciafüggő sajátságait. Ráadásul – szemben az eddigi kísérletekkel, ahol a preparátumokat folyamatosan ingereltük konstans ciklushossz mellett – ezekben a kísérletekben APD-restitúciós protokollokat alkalmaztunk, melynek során steady-state körülmények között (pl. 1 Hz frekvenciával) ingereltük a

preparátumot, majd egy-egy korai extraszisztolét váltottunk ki úgy, hogy egyre hosszabb idő (ún. diasztolés intervallum) teljen el az utolsó reguláris AP repolarizációja és az extra AP felszálló szára között. Az extra AP időtartamát a diasztolés intervallum függvényében ábrázolva restitúciós görbéket kapunk, amelyek hűen tükrözik a szerhatások frekvenciafüggő sajátságait nemcsak steady-state körülmények között, hanem egy-egy extraszisztolé során is.

Amikor a diasztolés időintervallumot 50 ms-ról fokozatosan 4 s-ig növeltük, az APD értéke egyenletesen csökkent patkány kamrai szívizmon. Az APD a 60 percig tartó tetraetilammónium és 4-aminopyridin kezeléseket követően megnövekedett. A nifedipin és a $MnCl_2$ a tőle elvárható módon az összes alkalmazott diasztolés intervallum mellett rövidítette az APD-t. A vizsgált szerek által kiváltott APD nyújtás és rövidítés mértéke rövidebb diasztolés intervallumok mellett nagyobb volt, mint a hosszabbak esetében, tehát azokban az esetekben, ahol a kezelést megelőző kontroll APD hosszabb volt. Patkányban tehát az összes szer által kiváltott APD-változás fordítottan volt arányos a diasztolés intervallum nagyságával, ugyanakkor - még e szokatlan kísérleti körülmények között is - sikerült megerősítenünk a korábban talált összefüggést, mely szerint a szerhatások minden körülmények között a kontroll AP időtartamával mutatnak megközelítően egyenes arányosságot.

A nettó membránáram és az APD kapcsolata

Amint az $I_{net} = -C_m \cdot dV/dt$ és $APD = -\Delta V_m \cdot C_m / I_{net}$ egyenletekből következik, az akciós potenciál hossza a nettó membránáram (I_{net}) függvénye. Ezt az összefüggést az APD 50%-ánál mérhető nettó membránáram (amely az aktuális V_m -ből számítható) ábrázolásával vizsgáltuk. Ennek során a különböző ciklushosszakon mérhető, befelé vagy kifelé irányuló áramimpulzusok alkalmazása mellett, ill. gátlószerek jelenlétében vagy azok hiányában rögzített akciós potenciálokat és azok APD értékeit használtunk fel. Eredményeink szerint az I_{net} praktikusán minden körülmények között fordított arányosságot mutatott az APD-vel, azaz az I_{net} értékek egyazon görbére estek tekintet nélkül arra, hogy az APD változást ioncsatorna gátló vagy aktivátor

hatású szer, áraminjektálás (akár kifelé, akár befelé irányuló), vagy esetleg a ciklushossz változása hozta létre.

Az APD változtatásának hatását az előző kísérletek során ismertetett, különböző ionáramokat gátló szerek alkalmazásával teszteltük humán papilláris izmon és kutya kamrai szívizomsejteken. A farmakológiai befolyásolás mellett ($10\ \mu\text{M BaCl}_2$) áramimpulzusok alkalmazásával (-30 és $+60\ \text{pA}$) és az ingerlés ciklushosszájának változtatásával ($0,4$ és $5\ \text{s}$ között) is megvizsgáltuk az I_{net} – APD_{90} összefüggést. Az I_{net} és az APD_{90} közötti összefüggést leíró görbe alakja valamennyi protokoll alkalmazásakor azonos volt, ami azt jelenti, hogy az adott APD_{90} értéknél mérhető I_{net} független az APD befolyásolásának módjától. Az I_{net} értéke kizárólag a kiindulási APD nagyságától függ.

Számítógépes modellezés

Az elvégzett számítógépes szimulációk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy az I_{net} akciós potenciál hosszára kifejtett hatását mennyiben befolyásolja annak repolarizáció alatti időfüggése. Amikor $-0,066\ \text{pA/pF}$ befelé irányuló áramot adtunk hozzá az I_{net} -hez, az APD_{90} $5\ \text{s}$ -os ciklushossznál jobban megnyúlt ($35,4\ \text{ms}$ -mal), mint $0,3\ \text{s}$ -os ciklushossznál ($17,4\ \text{ms}$ -mal), amely az APD változás fordított frekvenciafüggését tükrözi. Ez jó egyezést mutat azokkal kísérleti eredményeinkkel, ahol az APD változások nagysága és fordított frekvenciafüggése szintén kisebb volt kifelé irányuló áram injektálásakor (amikor az APD rövidült), mint amit a befelé irányuló áram injektálásakor tapasztaltunk (amikor az APD növekedett). $-30\ \text{pA}$ áram beinjektálása okozott akkora APD megnyúlást, mint amekkora APD rövidülést $+60\ \text{pA}$ áram alkalmazásával értünk el, vagyis a befelé és kifelé irányuló áram injektálása esetében tapasztalt fordított frekvenciafüggés aszimmetrikus.

A legtöbb ioncsatornán átfolyó áram időfüggő kinetikát mutat, vagyis egy rá jellemző időprofilja van a repolarizáció alatt. A fordított frekvenciafüggés mechanizmusa előre vetíti, hogy az ilyen jellemvonás fontos lehet egy áram megváltoztatására adott APD válasz meghatározásakor. Az analízis azt

jósolja, hogy az APD leginkább azokra az I_m változásokra érzékeny, amelyek a lassúbb repolarizációs fázisokra vannak hatással. Továbbá a repolarizáció spike-and-dome fázisa, annak nem-monoton lefolyása miatt nagyon érzékeny az I_m változásokra. Egy befelé irányuló I_m változás, ha erre a fázisra korlátozódik, paradox módon rövidítheti az APD-t. Az ilyen negatív hányad hosszabb ciklushossznál nagyobbá válik a spike és a dóm közötti mélyebb notch miatt, azonban a spike-and-dome fázis időprofilja a ciklushossztól függetlenül is változhat (pl. a kamrafal heterogenitása miatt), ennél fogva ennek a tulajdonságnak az általánosítása, mint az intrinzik fordított frekvenciafüggés sajátja, nem helytálló.

MEGBESZÉLÉS

A fordított frekvenciafüggés magyarázatára korábban kifejlesztett elméletek nagy száma világosan jelezte, hogy a jelenség pontos mechanizmusa tisztázásra vár. A fordított frekvenciafüggés korábbi magyarázatai az ioncsatorna kinetikai paramétereinek változásaira vagy a szer-csatorna kölcsönhatás tulajdonságaira alapultak. Azonban a szer-csatorna kölcsönhatás a legtöbb esetben direkt módon frekvenciafüggő, ezáltal alkalmatlan arra, hogy a fordított frekvenciafüggést magyarázza. Például az I_{Kr} és I_{Ks} gátlók által okozott APD megnyúlás fordított frekvenciafüggése közötti jelentős különbség a tengerimalac szívműködés egyik sajátja. Kezdetben ezt a tulajdonságot a két áram különböző frekvenciafüggésének tulajdonították. Ezekben a kísérletekben konvencionális voltage-clamp megközelítést használtak, később mások akciós potenciál-clamp alkalmazásával kimutatták, hogy a tengerimalac I_{Kr} és I_{Ks} konduktanciák egyaránt növekedtek gyorsabb ingerlési frekvencián, és hogy hozzájárulásuk aránya a teljes áramhoz nem függ lényegesen az ingerlési frekvenciától. Ezen megfigyelések szerint tehát az I_{Kr} és az I_{Ks} frekvenciafüggése nem alkalmas az APD változások fordított frekvenciafüggésének magyarázatára. Kutya kamrai szívműködésen az I_{Kr} és az I_{K1} járul hozzá leginkább a repolarizációhoz. Ezen ionáramok nem mutatnak frekvenciafüggést, ugyanakkor gátlásuk az APD-t egyértelműen fordított frekvenciafüggő módon befolyásolja. A perzisztens Na^+ -áram intrinzik frekvenciafüggése viszonylag kicsi, ráadásul a lidokain és a veratrin erősebben kötődik a Na^+ -csatornához magasabb, mint alacsonyabb szívfrekvenciák mellett. Ezzel együtt mindkét szer hatása jelentős fordított frekvenciafüggést mutatott. Így annak ellenére, hogy az APD változások fordított frekvenciafüggéséről több különböző teória született, a jelenséget egyik sem képes maradéktalanul megmagyarázni.

Tanulmányunkban olyan elmélet kidolgozását tűztük ki célul, mely minden körülmények között magyarázatot ad a jelenségre. Vizsgálataink során ezért különböző, a szív ionáramait serkentő vagy gátló szereket alkalmazva megvizsgáltuk számos emlősfajon, többek között humán, kutya, nyúl, tengerimalac és patkány szívműködés szövetein az APD változások

frekvenciafüggő sajátságait. Vizsgáltuk továbbá a modulált áram tulajdonságaitól független módon a transzmembrán áraminjektálás hatását izolált szívizomsejteken, így lehetőség nyílt a fordított frekvenciafüggés tanulmányozására a kinetikai paraméterek változásaitól mentes környezetben. Az emberéhez elektrofiziológiai szempontból a legnagyobb hasonlóságot a kutya miokardium mutatja, ezért számos APD-t nyújtó szer frekvenciafüggő hatását először kutya multicelluláris kamrai preparátumokon vizsgáltuk meg. Az I_{Kr} gátló dofetilid, az I_{K1} gátló $BaCl_2$, az I_{CaL} aktiváló BAY K 8644 és az I_{Na} aktiváló veratrin tisztán fordított frekvenciafüggő hatást mutatott, vagyis az APD nyújtás monoton növekedett a stimuláló ciklushossz emelésével, függetlenül az alkalmazott szertől, de az aktivált, illetve gátolt ioncsatornától is. Ez a fordított frekvenciafüggő APD megnyúlás egyaránt kimutatható volt, ha az APD változását abszolút értékben (ms-ban) vagy százalékos formában fejeztük ki. Ezek az eredmények világosan jelzik, hogy a fordított frekvenciafüggő APD nyújtás nem korlátozódik sem az I_{Kr} gátlására, sem a III. osztályú antiaritmiás szerekre, hanem bármely, az APD megnyújtására alkalmas szer esetén megfigyelhető.

Kutya Purkinje-rostokon eltérő támadáspontú, akciós potenciált rövidítő szerek hatását vizsgáltuk. A lidokainról ismert, hogy csökkenti a window Na^+ -áramot, míg a nicorandil gyakorta használják az ATP-érzékeny K^+ -csatornák megnyitására. Ezeknek a szereknek nemcsak az APD-re kifejtett hatása volt hasonló, hanem frekvenciafüggésük is nagyrészt identikusnak adódott: mindkét szer erősebben rövidítette az APD-t hosszabb ciklushosszakon, mint rövidebbeken. Más szóval nemcsak az APD megnyújtása, hanem a rövidítése is fordított frekvenciafüggő sajátságokat mutat.

Hasonló eredményeket találtunk más emlősszív preparátumokon is, többek között tengerimalac és egészséges humán szívből származó papilláris izmokon. Az összes APD nyújtásra (az I_{Kr} gátló dofetilid, sotalol, E-4031 és az I_{K1} gátló $BaCl_2$) vagy rövidítésre (az I_{Na} gátló mexiletin és tetrodotoxin) alkalmazott szer megegyezett a fordított frekvenciafüggő tulajdonságban. Ezen a ponton arra következtethetünk, hogy a szívre ható szerek fordított frekvenciafüggő természete a emlős szívizom szövetnek egy általános, intrinzik tulajdonsága, függetlenül a vizsgált fajtól vagy preparátumtól, a

modifikált ioncsatornától vagy a következményes APD változás irányától – feltéve, hogy a preparátumok direkt APD – ciklushossz összefüggést mutatnak a teljes frekvenciatartományban.

Vizsgálatainkat nyúl szívizomszövetén is elvégeztük, mivel ezen fajban az APD nem mutat monoton ciklushossz függést, maximumát 0,5 és 0,7 s között egy közbeeső értéknél éri el. Ez jelentősen eltér attól, amit kutyaszívben vagy emberi szívben találunk, egyúttal egyedülálló lehetőséget nyújtott arra, hogy elkülönítsük a szer-indukálta APD változások frekvenciafüggését a kontroll APD időtartamától való függéstől. A várakozásoknak megfelelően a sotalol minden frekvencián nyújtotta, míg a lemakalim rövidítette az APD-t nyúl papilláris izmon, de a kutya, humán és tengerimalac preparátumokon kapott eredményekkel szemben, ahol az APD megnyúlása és rövidülése monoton fordított frekvenciafüggést mutatott, nyúl preparátumokon a szer által kiváltott maximális APD változások azon a 0,5 és 0,7 s közötti köztes ciklushossz tartományban jöttek létre, amelynél a kiindulási APD is a leghosszabb volt. Ezen eredmény szerint a szerhatás nagysága úgy tűnik, hogy inkább a kiindulási akciós potenciál időtartamától függ, mint az ingerlés frekvenciájától, ami azt sugallja, hogy a hosszabb akciós potenciálok az aktuális ingerlési frekvenciától függetlenül érzékenyebbek a modulációra, mint a rövidebbek. Fenti hipotézisünket leghatékonyabban patkányból származó kamrai preparátumon tesztelhattuk, mert (1) ioncsatornáinak a készlete feltűnően különbözik más fajokétól, (2) az APD-je egy nagyságrenddel rövidebb, mint ami a platót kialakító nagyobb emlősökre jellemző, és (3) ami a legfontosabb – sok más fajtól eltérően – patkányban az APD magasabb szívfrekvenciánál nő. A K^+ -csatorna gátló 4-aminopyridin és tetraetilammónium APD nyújtó hatását, valamint a Ca^{2+} -csatorna gátló nifedipin és $MnCl_2$ APD rövidítő hatását a diasztolés intervallum függvényében vizsgálva megállapítottuk, hogy valamennyi fentemlített szer indukálta APD változás patkányban is egyenes arányban állt a kiindulási APD hosszával. Ez azt jelzi, hogy bár az APD ciklushossztól vagy diasztolés intervallumtól való függése és annak szer általi befolyásolása között szoros kapcsolat áll fenn, a ciklushossz és a diasztolés intervallum a kiindulási (szer előtti) APD modulátoraként szerepel, míg a kiindulási APD közvetlenül határozza meg a szer okozta változások

nagyságát. Ezt az elképzelést erősíti meg, hogy az alkalmazott ingerlő ciklushossztól vagy diasztolés intervallumtól függetlenül a szer által kiváltott változások minden eddig vizsgált preparátumon (kutya, humán, tengerimalac, nyúl és patkány) arányosak voltak a kiindulási (szer előtti) APD értékével.

Amikor egy ioncsatorna aktivátor vagy gátló vegyület hatását vizsgáljuk az akciós potenciál konfigurációjára, erre a hatásra tekinthetünk úgy is, hogy egy befelé vagy kifelé irányuló áramot adunk hozzá az akciós potenciál platója alatt folyó nettó membránáramhoz vagy veszünk el abból. Ezt a kérdést enzimatikusan izolált kutya kamrai szívműködéseken végzett kísérletek során vizsgáltuk részletesen. Ezekben a kísérletekben -30 pA amplitúdójú befelé irányuló áramimpulzusokat injektáltunk a szívműködésekre azzal a céllal, hogy az APD-t megnyújtsuk. Vagy ennek alternatívjaként +60 pA amplitúdójú kifelé irányuló áramimpulzusokat alkalmaztunk az akciós potenciálok rövidítésére. A kísérleteket számos ciklushosszon elvégezve, azt találtuk, hogy az áraminjektálás APD-re kifejtett hatása fordított frekvenciafüggő volt. Azt is megállapítottuk, hogy a befelé vagy kifelé irányuló áramimpulzusok által kiváltott APD változások egyenesen arányosak voltak az áraminjektálás előtt mért kiindulási APD értékekkel. Az így nyert pontok az $I_{\text{net}} - \text{APD}_{90}$ diagrammon szinte megkülönböztethetetlenek voltak egy ioncsatorna agonistával vagy antagonistával kapott eredményektől, ami arra utal, hogy a kiváltott APD változások nagysága csak a kiindulási APD hosszától függ, de független az áramváltozás okától vagy természetétől (pl. a kapuzási kinetikáktól, az érintett ionáram egyéb tulajdonságaitól) vagy az alkalmazott szer sajátosságaitól. További bizonyíték ebben a vonatkozásban, hogy a BaCl_2 által létrehozott APD-nyúlás minden ciklushossz mellett teljesen kivédhető volt valamely egyidejűleg alkalmazott konstans nagyságú outward áram injektálásával. Mint ismert, a BaCl_2 -dal okozott APD megnyúlás az I_{K1} gátlás következménye. Mivel sem az I_{K1} , sem annak BaCl_2 általi gátlása nem rendelkezik érdemben frekvenciafüggéssel, ezért az általa eredményezett APD megnyúlásra is csupán a kiindulási APD értéke lehet befolyással, amelyet viszont az ingerlési ciklushossz határoz meg. Hasonlóan magyarázható, hogy a ciklushossz hirtelen változtatásával kiváltott APD

változásokat teljes mértékben vissza tudtuk fordítani egy konstans nagyságú, de ellentétes hatású áramimpulzus injektálásával.

Ha bármely APD változás nagysága valóban arányos a kiindulási APD értékével, akkor az APD változás nagyságának összefüggésben kell lennie az akciós potenciál platója alatt folyó nettó membránáram változásával. Az I_{net} -et az akciós potenciál időtartamának felénél a plató meredekségéből határoztuk meg, a következő egyszerű egyenlet felhasználásával: $I_{\text{net}} = -C_m \cdot dV/dt$, ahol a C_m a sejtmembrán kapacitása és a dV/dt a membránpotenciál változásának pillanatnyi sebessége (idő szerinti első deriváltja). Amennyiben az I_{net} -et pA/pF-ban fejezzük ki, annak nagysága az akciós potenciál során bármely pillanatban megegyezik a membránpotenciál-változás negatív meredekségével. Feltételezésünk, hogy az APD változása az I_{net} változásának az érintett specifikus ionáram jellegétől függetlenül volna következménye, megerősítést nyert azáltal, hogy az I_{net} a kiindulási APD függvényében állandónak bizonyult a rendkívül változatos kísérleti körülmények között is: különféle ingerlő ciklushosszoknál, ioncsatorna gátlók és aktiválók alkalmazása előtt és után, befelé vagy kifelé irányuló áramimpulzusok jelenlétében, ill. azok hiányában. Az I_{net} - APD összefüggés egy hiperbolikus függvényt követ, amely alakját az alkalmazott kísérleti körülményektől (szerhatás vagy áram injektálás) és preparátumtól (humán papilláris izom, kutya Purkinje rost, izolált kutya szívműködősejt, stb.) függetlenül megőrzi.

A fenti eredmények azt a nézetet valószínűsítik, hogy a szerhatások során tapasztalt fordított frekvenciafüggés kizárólag magának az APD fordított frekvenciafüggő viselkedésének lenne a következménye, nevezetesen annak, hogy az APD hosszabb magasabb ciklushosszaknál, mint alacsonyabbaknál – legalábbis a nagyobb testű emlősök többségében, ide értve a kutya és a humán kamrai miokardiumot is. Ezzel a fejtegetéssel összhangban van az a megfigyelésünk, hogy patkányban (és nyúlban a 0,7 s-nál hosszabb ciklushossz tartományban) a vizsgált szerek hatása nem fordított, hanem direkt frekvenciafüggést mutatott. Mindezt nemcsak steady-state körülmények között, de az extraszisztolét jobban modellező restitúciós körülmények között is sikerült bizonyítanunk.

Fentiek alapján a fordított frekvenciafüggés magyarázata egészen triviálissá - szinte már-már mechanisztikussá válik. Mivel a plató alatt (mondjuk a plató közepén) folyó I_{net} kisebb egy hosszabb, mint egy rövidebb akciós potenciál esetén, egy adott amplitúdójú hozzáadott vagy kivont áram (akár mint árapulzus, akár gyógyszeres beavatkozás következtében) egy hosszabb kezdeti akciós potenciál esetén várhatóan nagyobb plató alatti relatív áramváltozást (és ennek következtében a plató meredekségében beálló változást) generál, mint egy rövidebb (tehát meredekebb platóval rendelkező) akciós potenciál esetén. Emiatt az első esetben nagyobb, míg az utóbbi esetben kisebb APD változásra számíthatunk. Mindent egybevetve úgy tűnik, hogy a fordított frekvenciafüggés - jóllehet kezdetben az összes szívpreparátum közös tulajdonságának látszott - csak azokra a fajokra korlátozódik, amelyek pozitív APD-ciklushossz összefüggést mutatnak. Ebben az értelemben a szerhatások fordított frekvenciafüggő természete kutya és humán szívizom esetében valóban egy általános intrinzik sajátyságnak tekinthető.

Mivel a szerek által kiváltott APD változások minden vizsgált fajban jól korreláltak a kiindulási APD-vel tekintet nélkül a megváltoztatott ionáramra vagy a használt szerre, az ember arra a következtetésre juthat, hogy a fordított frekvenciafüggés kizárólag az I_{net} és az APD között meglévő fordított arányosság következménye. Ez egybeesik azzal, hogy az APD szerek általi befolyásolása kifejezettebb olyan körülmények között, amikor az akciós potenciál *ab ovo* hosszabb, ezzel szemben az ingerlési frekvencia csak egy a kiindulási APD-t szabályozó tényezők közül. Annak ellenére, hogy az APD és az I_{net} közötti matematikai összefüggés látszólag tökéletesen megmagyarázza a fordított frekvenciafüggő APD változásokat, számos megfigyelés utal arra, hogy további mechanizmusok is befolyással lehetnek a fordított frekvenciafüggő APD változásokra. Például, ha csak egyetlen kizárólagos mechanizmus magyarázná a fordított frekvenciafüggést, akkor azt várnánk, hogy a szer által okozott APD változások és a kiindulási APD közötti kapcsolat minden esetben azonos legyen. Jóllehet ez az összefüggés bizonyos szereknél és bizonyos APD tartományokban majdnem teljesen lineárisnak tűnt, nem mindenütt volt ez a helyzet (lásd pl. a BAY K 8644 hatását

magasabb ciklushosszaknál). Mindez arra utal, hogy az APD változások függése a kiindulási APD-től mégis tartalmazhat olyan komponenseket, amelyek nem magyarázhatók egyetlen mechanizmussal. Továbbá egy, a kiindulási APD-től való intrinzik függés fennállása nem zárja ki más, szintén nyíltan frekvenciafüggő mechanizmusok (pl. a szer-ioncsatorna kapcsolatok vagy ionáramok kinetikájának frekvenciafüggése) hozzájárulását a frekvenciafüggő APD változások nagyságának meghatározásához. A fordított frekvenciafüggés nagysága valóban eltért az egyes vizsgált szerek esetében.

A jelen eredmények legfontosabb üzenete a gyógyszerfejlesztő műhelyek felé egyértelműen az, hogy újabb szelektív I_{Kr} gátlók kifejlesztésével nem csökkenthető az APD fordított frekvenciafüggése, ezért a jól ismert proaritmias kockázatuk sem szüntethető meg, mivel mindez az emberi szívizom elektromos tulajdonságaiból egyenesen következik. Ígéretesebb lehet olyan kombinált hatásmechanizmusú antiaritmikumok fejlesztése, melyek akár egy molekulán belül, akár több ismert molekula kombinációjaként többféle támadásponttal rendelkeznek és így a szokásosnál kisebb fordított frekvenciafüggést produkálnak. Ilyen molekulák már vannak: előbbire legjobb példa az amiodaron, utóbbi kombinációra a mexiletin + d-sotalol együttes alkalmazása.

ÖSSZEFOGLALÁS

A SWORD (Survival With ORal D-sotalol) tanulmány óta tudjuk, hogy a III. osztályú antiaritmiás szerek az akciós potenciál időtartamának (APD) megnyújtásán keresztül fordított frekvenciafüggő módon meghosszabbítják az akciós potenciál refrakter periódusát. Ez azt jelenti, hogy akciós potenciál nyújtó hatásuk kifejezettebb alacsonyabb frekvenciák esetén, mint magasabbak mellett. Tehát éppen a kórosan alacsony ciklushosszok esetén (tachikardiában) nem érvényesül kellőképpen a repolarizációt nyújtó hatásuk, mikor arra a legnagyobb szükség lenne. Ugyanakkor a magasabb ciklushosszok mellett (bradikardiában) az extrém módon megnyúlt repolarizáció korai utódepolarizáció kialakulásához, ezáltal életveszélyes kamrai tachikardiákhoz vezethetnek. Az APD-megnyúlás fordított frekvenciafüggő természetének hátterében álló pontos elektrofiziológiai mechanizmus a jelentős számú eddig kidolgozott teória ellenére eddig tisztázatlan maradt. Ugyanakkor a jelenség hátterében álló mechanizmusok részletes tisztázása rendkívül fontos, hiszen ezek ismeretében lehetőség nyílna a jelenleginél hatékonyabb antiaritmikumok fejlesztésére.

Kutatásaink során elsőként bizonyítottuk, hogy a fordított frekvenciafüggés nem csupán a III. osztályú antiaritmikumok sajátja, valamennyi az akciós potenciál hosszát befolyásoló farmakon rendelkezik ezzel a tulajdonsággal. A fordított frekvenciafüggés egy fajtól, preparátumtól, adott ioncsatornától független intrinzik tulajdonságnak bizonyult, amely pozitív korrelációt mutat a kiindulási APD és a APD változása között. Végző soron, hogy a fordított frekvenciafüggés egyszerűen a plató alatt folyó nettó membránáram és az APD között meglévő összefüggés (fordított arányosság) következménye. Legfontosabb következtetésünk ezek alapján az, hogy szelektív I_{Kr} gátlószerek, mint lehetséges III. osztályú antiaritmiás szerek további kifejlesztése nem célravezető. Ígéretesebb megközelítés lehet az aritmiák kezelésben olyan különböző molekulák kombinációjának vagy egyetlen olyan szernek az alkalmazása, mely kombinált hatásmechanizmussal rendelkezik, ily módon csökkentve a klasszikus antiaritmikumok proaritmiás kockázatát.

Iktatószám: DEENKÉTK/273/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

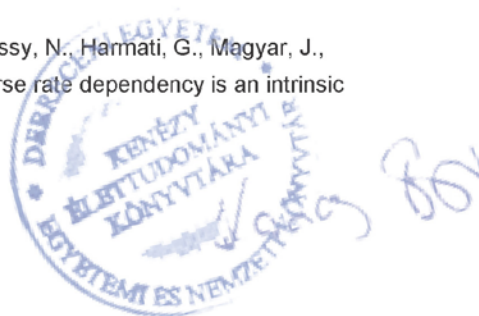
Jelölt: Bárándi László

Neptun kód: PHQ4B9

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

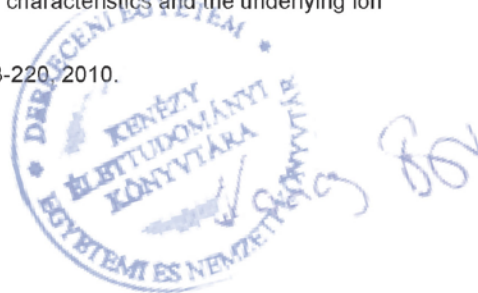
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bányász, T., **Bárándi, L.**, Harmati, G., Virág, L., Szentandrassy, N., Márton, I., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Mechanism of reverse rate-dependent action of cardioactive agents.
Curr. Med. Chem. 18 (24), 3597-3606, 2011.
IF:4.859
2. **Bárándi, L.**, Harmati, G., Horváth, B., Szentandrassy, N., Magyar, J., Varró, A., Nánási, P.P., Bányász, T.: Drug-induced changes in action potential duration are proportional to action potential duration in rat ventricular myocardium.
Gen. Physiol. Biophys. 29 (3), 309-313, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2010_03_309
IF:1.146
3. **Bárándi, L.**, Virág, L., Jost, N., Horváth, Z., Koncz, I., Papp, R., Harmati, G., Horváth, B., Szentandrassy, N., Bányász, T., Magyar, J., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations.
Basic Res. Cardiol. 105 (3), 315-323, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-009-0082-7>
IF:6.128
4. Bányász, T., Horváth, B., Virág, L., **Bárándi, L.**, Szentandrassy, N., Harmati, G., Magyar, J., Marangoni, S., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Reverse rate dependency is an intrinsic property of canine cardiac preparations.
Cardiovasc. Res. 84 (2), 237-244, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp213>
IF:5.801



További Közlemények

5. 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 Ca^{2+} channels in canine ventricular cardiomyocytes.
Pflügers Arch. 464 (2), 167-174, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-012-1114-y>
IF:4.463 (2011)
6. Harmati, G., Papp, F., Szentandrassy, N., **Bárándi, L.**, Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Panyi, G., Krasznai, Z., Nánási, P.P.: Effects of the PKC inhibitors chelerythrine and bisindolylmaleimide I (GF 109203X) on delayed rectifier K^{+} currents.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 383 (2), 141-148, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0584-8>
IF:2.647
7. Harmati, G., Bányász, T., **Bárándi, L.**, Szentandrassy, N., Horváth, B., Szabó, G., Szentmiklósi, J.A., Szénási, G., Nánási, P.P., Magyar, J.: Effects of beta-adrenoceptor stimulation on delayed rectifier K^{+} currents in canine ventricular cardiomyocytes..
Br. J. Pharmacol. 162 (4), 890-896, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01092.x>
IF:4.409
8. Szentandrassy, N., Harmati, G., **Bárándi, L.**, Simkó, J., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Szebeni, A., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of rosiglitazone on the configuration of action potentials and ion currents in canine ventricular cells.
Br. J. Pharmacol. 163 (3), 499-509, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01215.x>
IF:4.409
9. Simkó, J., Szentandrassy, N., Harmati, G., **Bárándi, L.**, Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Nánási, P.P.: Effects of ropinirole on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 382 (3), 213-220, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0538-1>
IF:2.5



Összesített impakt faktor: 36.362

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 17.934

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.09.10

