DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A késői nátriumáram szerepe a bal kamrai szívizomsejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak kialakításában

Dr. Hézső Tamás

Témavezető: Dr. Horváth Balázs

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék **2**

Rövidítések jegyzéke **4**

1. Bevezetés **7**

1.1 Absztrakt *7*

1.2. A feszültségfüggő nátriumcsatornák *8*

1.3. A feszültségfüggő nátriumcsatornák szerkezete *9*

2. Irodalmi áttekintés **12**

2.1. A $I_{Na,késői}$ elektrofiziológiai azonosítása *12*

2.2. A késői nátriumáram tulajdonságai *12*

2.3. A késői nátriumáram különböző kapuzási módjai *13*

2.4. Az „ablak nátriumáram” *15*

2.5. „Nem egyensúlyi csatorna kapuzás” *15*

2.6. Egyéb típusú nátriumcsatorna izoformák a szívben *15*

2.7. A késői nátriumáram szerepe a szív fiziológiájában *16*

2.8. A $I_{Na,késői}$ szerepe a szívizomsejtek nátrium-homeosztázisában *16*

2.9. A Na^+ és a Ca^{2+} homeosztázis kapcsolata a szívizomsejtekben *17*

2.9.1. A Na^+ és a Ca^{2+} homeosztázis közötti közvetlen kapcsolat: a Na^+/Ca^{2+} -cseremechanizmus 17

2.9.2. A $I_{Na,késői}$ elősegíti a Ca^{2+} beáramlást az L–típusú kalcium csatornán keresztül 17

2.9.3. A szívfrekvencia és az AP időtartama befolyásolja a $I_{Na,késői}$–ot 18

2.10. A $I_{Na,késői}$ modulációja *18*

2.11. Nátrium csatornák, Ca^{2+} és CaM *18*

2.12.Ca^{2+}-CaM-függő proteinkináz II (CaMKII) *19*

2.13.Komplex moduláció β-adrenerg stimulációval *19*

2.14. Metabolitok a sejtben *19*

2.15. Késői nátriumáram szerepe a szívbetegségekben *19*

2.16. A nátrium homeosztázis és az emelkedett $I_{Na,késői}$ szerepe a szívritmuszavarokban *20*

2.17. A $I_{Na,késői}$ hozzájárulhat a megemelkedett $[Na^+]_i$ értékhez *21*

2.18. A CaMKII-$I_{Na,késői}$-$[Na^+]_i$-$[Ca^{2+}]_i$-CaMKII ördögi köre *22*

2.19. Kalcium- és nátrium-homeosztázis *22*

2.20. A megnövekedett $I_{Na,késői}$ és $[Na^+]_i$ aritmogén következményei *28*

2.21. Klinikai vizsgálatok - antiaritmiás gyógyszerfejlesztés *29*

2.22. $I_{Na,késői}$, mint antiaritmiás terápiás célpont *29*

2.22.1. Nátriumcsatorna-gátlók 29

2.22.2. Szelektív $I_{Na,késői}$ gátlók 29

2.22.3. A nem-szív nátriumcsatorna-gátlók, mint potenciális antiaritmiás szerek 30

2.23. Ranolazin *30*

2.24. Eleklazin (GS-6615) *32*

3. Célkitűzés **34**

4. Anyagok és módszerek **35**

4.1. Felhasznált preparátumok *35*
4.1.1 Szívizomsejtek izolálása 35

4.2. Elektrofiziológiai mérések *36*
4.2.1. Patch-clamp technika 37
4.2.2 Akciós potenciálok elvezetése egyedi szívizomsejtekről 39
4.2.3. Akciós potenciál feszültség-clamp 39
4.2.4. Hagyományos feszültség-clamp kísérletek 40
4.2.5. Akciós potenciálok elvezetése multicelluláris preparátumokból 41

4.3. Az APD rövidtávú beat-to-beat variabilitásának meghatározása izolált szívizomsejtekben *42*

4.4. Statisztikai elemzés *42*

4.5 A kísérletek során használt egyéb vegyületek *42*

5. Eredmények **44**

5.1. Az optimális TTX-koncentráció meghatározása *44*

5.2 A kutya és tengerimalac kamrai sejtekben rögzített $I_{Na,késői}$ valódi profiljai saját APVC körülmények között. *45*

5.3 A parancsfeszültség alakjának hatása a $I_{Na,késői}$ profiljára kutya szívizomsejtekben *47*

5.4 Az ATX-II által indukált TTX-érzékeny áramprofil tengerimalac és kutya kamrai sejtekben *48*

5.5 A humán, kutya és tengerimalac szívizomsejtekből felvett $I_{Na,késői}$ tulajdonságainak összehasonlítása *50*

5.6 A tetrodotoxin hatása az APD_{90}-re multicelluláris humán, kutya és tengerimalac kamrai preparátumokban *52*

5.2. A GS967 és a mexiletin hatása akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között *53*

5.3. A GS967 és a mexiletin hatása az APD beat-to-beat variabilitására *55*

6. Megbeszélés **57**

7. Az értekezésben szereplő új kutatási eredmények **61**

8. Összefoglalás **62**

9. Summary **63**

10. Köszönetnyilvánítás **64**

11. Irodalomjegyzék **65**

12. Kulcsszavak **86**

13. Keywords **86**

14. Függelék **86**

Rövidítések jegyzéke

$[Ca^{2+}]_i$	intracelluláris kalciumion koncentráció
$[Na^{+}]_i$	intracelluláris nátriumion koncentráció
ACS	akut koronária szindróma
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
AP	akciós potenciál
APD	akciós potenciál időtartam
APD_{90}	akciós potenciál időtartama, mely az akciós potenciál amplitúdójához képes mért 90%-os repolarizációig telt el
APVC	akciós potenciál feszültség-clamp
ATX-II	anemone toxin II
BAPTA	1,2-bisz(2-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav
BAY K8644	1,4-dihidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-(2-[trifluorometil]fenil)piridin-3-karbonsav -metilészter
BM	burst mód
BTy	bikarbonátot is tartalmazó Tyrode oldat
CaM	kalmodulin
CaMKII	kalcium/kalmodulinfüggő protein kináz II
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
cAPVC	kanonikus akciós potenciál feszültség clamp
CARISA	Combination Assessment of Ranolazine In Stable Angina
CAST	Cardiac Arrhythmia Suppression Trial
CICR	kalcium indukált kalcium felszabadulás (calcium-induced calcium release)
CL	ciklushossz (cycle length)
CPVT	katekolaminerg polimorf kamrai tachycardia
DAD	késői utódepolarizáció (delayed afterdepolarization)
EAD	korai utódepolarizáció (early afterdepolarization)
ERICA	Efficacy of Ranolazine in Chronic Angina
HARMONY	Combined Ranolazine and Dronedarone in the Management of Paroxysmal Atrial Fibrillation
$I_{Ca,L}$	L-típusú kalciumáram (L-type calcium current)
ICD	beültethető kardioverter defibrillátor

ID	interdomén rész
I_{K1}	befelé egyenirányító káliumáram (inward rectifier potassium current)
I_{Kr}	késői egyenirányító káliumáram gyors komponense (rapid component of delayed rectifier potassium current)
I_{Ks}	késői egyenirányító káliumáram lassú komponense (slow component of delayed rectifier potassium current)
$I_{Na,késői}$	késői nátriumáram
$I_{Na,korai}$	feszültségfüggő nátriumáram korai komponense (korai nátriumáram)
I_{NCX}	Na^+/Ca^{2+}-cserélő (exchanger) áram
I_{to1}	tranziens kifelé irányuló káliumáram (transient outward potassium current)
JMM	Joklik által módosított Minimum Essential Medium oldat
LAD	bal elülső leszálló koronária ág
LIBERTY-HCM	Late Sodium Current Inhibition on Exercise Capacity in Subjects with Symptomatic Hypertrophic Cardiomyopathy
LSM	késői elszórt mód (late scattered mode)
LQTS	hosszú QT szindróma (long QT syndrome)
MARISA	Monotherapy Assessment of Ranolazine In Stable Angina
MCU	mitokondriális kalciumion uniporter
MERLIN-TIMI	Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes
Na_v	feszültségfüggő nátriumcsatorna
NCX	Na^+/Ca^{2+}-cseremechanizmus
NHE	Na^+/H^+-cseremechanizmus
NMDA	N-metil-d-aszparaginsav
NKP	Na^+/K^+-pumpa
mNCX	mitokondriális Na^+/Ca^{2+}-cseremechanizmus
PF	pitvarfibrilláció
PKA	protein-kináz A
PLN	foszfolambán
PMCA	plazmamembrán Ca^{2+}-ATPáz
RAFFAELLO	Ranolazine in Atrial Fibrillation Following An ELectricaL CardiOversion
RAID	Ranolazine Implantable Cardioverter-Defibrillator

RAND-CFR	Effects of Ranolazine on Coronary Flow Reserve in Symptomatic Diabetic Patients and CAD
RMP	nyugalmi membránpoteniál (resting membrane potential)
ROS	reaktív oxigéngyök
RSV	relatív rövidtávú variabilitás
RyR	ryanodin receptor
sAPVC	saját akciós potenciál feszültség-clamp
SEM	középérték közepes hibája (standard error of the mean)
SERCA	szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+}-ATPáz
SR	szarkoplazmatikus retikulum
SV	rövidtávú variabilitás (short term beat-to-beat variability of APD)
SWORD	Survival With Oral d-Sotalol
SZE	szívelégtelenség
TdP	Torsade de Pointes aritmia
TEMPO	Effect of Eleclazine on Ventricular Arrhythmia
TM	tranziens mód
TTX	tetrodotoxin
VF	kamrafibrilláció
VT	kamrai tachycardia

1. Bevezetés

1.1 Absztrakt

A feszültségfüggő nátriumcsatornák (Na_v) kulcsszerepet játszanak a szívizomsejtek aktiválódásában és az elektromos jelek szívizmon belüli terjedésében. A kamrai szívizomsejtek Na_v-i hozzák létre az akciós potenciál (AP) felszálló szárát (1). A membránpotenciál és a Na_v-k közötti pozitív visszacsatolás néhány milliszekundumon belül a csatornák zárt állapotból nyitott állapotba való jutását eredményezi, amelyet gyors inaktiváció követ. Ennek köszönhetően 3-5 milliszekundummal az AP felszálló szárának kialakulása után a Na_v-k 99 %-a inaktiválódott, nem vezető állapotba kerül (2). Az áramnak ezt a keskeny kiugrását korai nátriumáramnak ($I_{Na,korai}$) nevezzük. Ennek ellenére a csatornák egy kis hányada nem inaktiválódik, és az AP plató fázisa alatt tartós áramot tart fenn, amelyet késői nátriumáramnak ($I_{Na,késői}$) nevezünk (3). Még most sem ismerjük pontosan a nem inaktiválódott csatornák működésének pontos részleteit és a szakirodalomban pedig a jelenség magyarázatára többféle mechanizmust javasolnak.

A $I_{Na,késői}$ kis amplitúdójú, de a teljes plató fázis alatt folyik, így befolyásolja a szív AP-ok repolarizációját, továbbá részt vesz a szívizomsejtek nátrium és kalcium homeosztázisában is. Egyre növekvő mennyiségű adat bizonyítja azt, hogy a megnövekedett $I_{Na,késői}$ jelentős patofiziológiai szereppel bír több szerzett szívizombetegségben, például a szívizomzat iszkémiájában (4) vagy a szívelégtelenségben (SZE) is (5,6). A megnövekedett $I_{Na,késői}$ megnyújtja a repolarizációt és megnöveli a szívizomsejtek intracelluláris nátriumion koncentrációját ($[Na^+]_i$), így szívritmuszavarokat okozhat (7), csökkentheti a szívizomzat kontraktilitását (8), és károsíthatja a szívizomsejt energiaháztartását is (9).

A $I_{Na,késői}$-ra vonatkozó jelenlegi ismereteink többnyire az egyszerűsített körülmények között nyert feszültség-clamp adatokon nyugszanak. Az így nyert eredményeket a korábbi tanulmányok során modellszimulációkban használták a $I_{Na,késői}$ AP alatti dinamikus profiljának rekonstruálására azzal a céllal, hogy megértsék szerepét az AP kialakításában. Bár e megközelítés is értékes ismeretekkel járult hozzá a $I_{Na,késői}$ tanulmányozásához, ez önmagában nem alkalmas a $I_{Na,késői}$ fiziológiás körülmények közötti tulajdonságainak vizsgálatára. A fő ok a Na_v-k különleges biofizikai jellemzője, az úgynevezett nem egyensúlyi kapuzás (10).

1.2. A feszültségfüggő nátriumcsatornák

A szakirodalomban közölt különböző $I_{Na,késői}$ profilok rávilágítanak a Na_v-k kapuzásának bonyolultságára. Eddigi ismereteink szerint a $I_{Na,korai}$-ot döntően az $Na_v1.5$ alakítja ki (11). Mivel az AP során a membránpotenciál dinamikus változásai jelentősen befolyásolják a $I_{Na,késői}$-ot, szükségesnek láttuk, hogy az áramot közvetlenül rögzítsük AP feszültség-clamp (APVC) körülmények között (12), melyet a disszertáció 4. fejezetében részletesen tárgyalok.

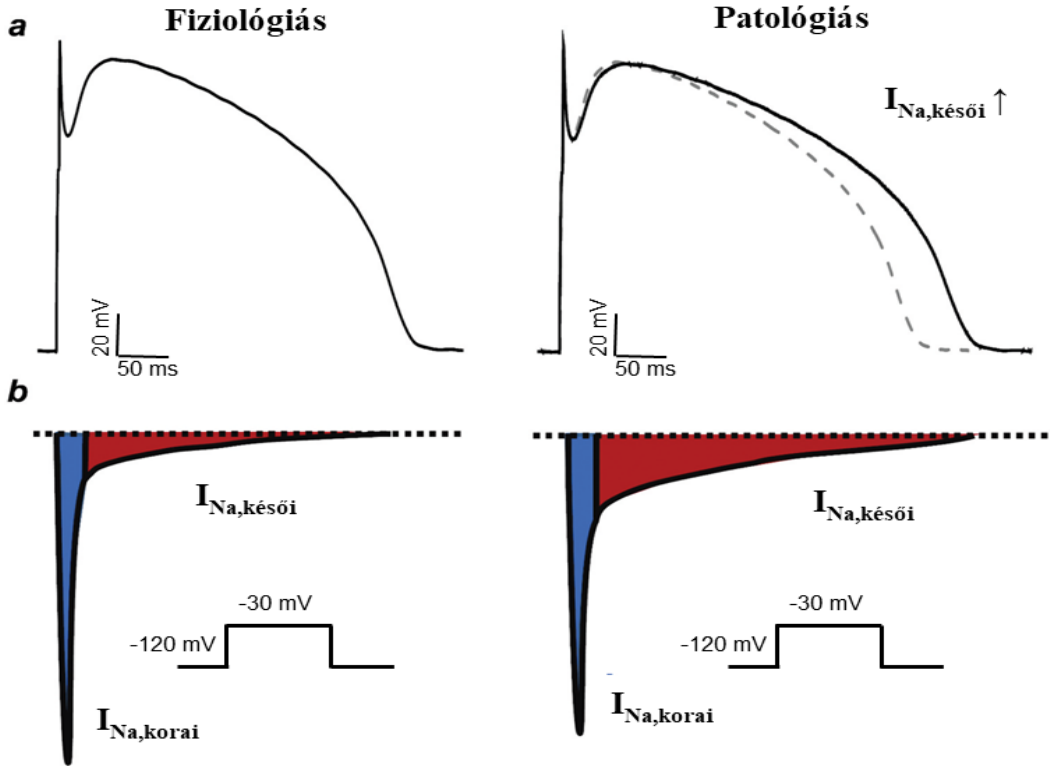
A Na_v-ról továbbá ismert, hogy a Ca^{2+}, a kalmodulin (CaM) és a Ca^{2+}/CaM-függő proteinkináz II (CaMKII) által is szabályozott; e molekulák mindegyike külön-külön és együttesen is modulálja a $I_{Na,késői}$ -ot (13,14). Az említett komplex szabályozás egyes elemeit feltáró korábbi tanulmányok ellentmondásos eredményekről számoltak be. Egyes eredmények alapján azt feltételezték, hogy a Ca^{2+} a C-terminusban lévő EF-kéz motívumhoz való közvetlen kötődéssel modulálja a Na^+ áramot (15), ám további tanulmányok bizonyítékokat szolgáltattak ez ellen az elképzelés ellen (16). A jelenlegi konszenzus szerint a Ca^{2+}-CaM-CaMKII jelátvitel megnöveli a szív $[Na^+]_i$-ját. A hagyományos feszültség-clamp kísérletekben alkalmazott egyszerűsített körülmények azonban jelentősen megnehezítik a Ca^{2+}-CaM-CaMKII jelátviteli útvonal nátriumáramra gyakorolt integrált hatásainak meghatározását az AP alatt. Korábbi vizsgálatokban hagyományos feszültség-clamp módszert használtak négyszög alakú impulzus protokollokkal, azonban a Na_v nem egyensúlyi kapuzását nem vizsgálták ezekben a kísérletekben.(17)

A Na_v-ra ható, Vaughan-Williams osztályozásban az I. osztályba sorolt antiaritmiás gyógyszerek közül több a $I_{Na,késői}$-ot is gátolja a feszültségfüggő nátriumáram korai komponense ($I_{Na,korai}$) mellett (18–23). Ez utóbbi hatásról sokáig úgy vélték, hogy fokozza a ritmuszavarok kockázatát és következésképpen a hirtelen szívhalál előfordulását (24). Ezen irodalmi adatok alapján egy $I_{Na,késői}$ szelektív gátlására szolgáló szer felkutatása jó fejlesztési irány lehet (25–29). Az egyik ilyen szer a GS-458967 néven ismert 6-(4-(trifluormetoxi)fenil)-3-(trifluormetil)-[l,2,4]triazolo[4,3-a]piridin (a továbbiakban GS967) nyúl kamrai sejtekben tesztelve különösen szelektív jelöltnek bizonyult (26).

Azt is kimutatták, hogy az egyes szívizom preparátumok elektrofiziológiai tulajdonságaiban jelentős fajok közötti eltérések vannak (30). Mind a jelen munkában bemutatott, mind korábban közölt adatok alapján a kutya kamrai szívizomsejtek a humán kamrai sejtek viszonylag jó modelljének tekinthetőek bizonyos ionáramok tekintetében (31–36).

A Na^+ áram viselkedése időben nem monoton. Amikor a membránpotenciál eléri a Na_v-k küszöbértékét, akkor jelentős Na^+ beáramlás depolarizálja a membránt, így létrehozza az AP felszálló szárát. Ez a gyors, korai Na^+-áram csúcs ($I_{Na,korai}$) azonban gyorsan inaktiválódik, ami a $I_{Na,korai}$ gyors lecsengését okozza (37,38). Bizonyos körülmények között a Na_v-k visszatérhetnek az inaktivációból és újra megnyílhatnak az AP platófázisa alatt (39), ami további depolarizáló Na^+ beáramlást eredményez, amit késői Na^+ áramnak ($I_{Na,késői}$) nevezünk. Mivel a $I_{Na,korai}$ növeli az intracelluláris Na^+-koncentrációt ($[Na^+]_i$) az AP felszálló száránál, ezért a Na^+/Ca^{2+}-cseremechanizmus (NCX) átvált reverz üzemmódba, és az intracelluláris Ca^{2+}-terhelés rovására eltávolítja a Na^+-t a sejtből. Ez a reverz üzemmód csak nagyon rövid ideig áll fenn, és a NCX az AP fennmaradó részében „forward" üzemmódban működik, ami leggyakrabban szarkolemmális Ca^{2+} extrúziót okoz (40,41). A $I_{Na,késői}$ egy apró, de tartós befelé

irányuló áram, amely egészséges szívizomsejtekben sokkal kisebb amplitúdójú, mint a $I_{Na,korai}$. Bizonyos patofiziológiai körülmények között azonban a $I_{Na,késői}$ sokkal nagyobb lehet, és Na^+ vagy Ca^{2+} túlterhelést okozhat, ami szívritmuszavarok kialakulásához vezethet (1. ábra).



1. ábra: *A fiziológiás és a patológiás $I_{Na,késői}$ összehasonlítása kamrai szívizomsejtekben.* <u>*a panel:*</u> *Egész séges és beteg kutya szívből rögzített kamrai akciós potenciál görbék. A beteg szív esetében a $I_{Na,késői}$ megnövekedett, ami hosszabb akciós potenciálhoz vezet. A szaggatott vonal a kontroll akciós potenciált mutatja.* <u>*b panel:*</u> *A nátriumáram reprezentatív elektrofiziológiai felvételei egészséges és beteg szívizomsejtekben. Kékkel a feszültségfüggő nátriumáram korai komponensét ($I_{Na,korai}$), míg pirossal az áram tartós, késői komponensét ($I_{Na,késői}$) jelöltük.*

1.3. A feszültségfüggő nátriumcsatornák szerkezete

A Na_v-k egy nagy pórusképző pszeudotetramer α alegységből, járulékos β alegységekből és állványfehérjékből állnak (2. ábra a panel). Eddig 9 különböző α alegységet azonosítottak ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$), amelyeket 9 különböző gén (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN8A, SCN9A, SCN10A, SCN11A) kódol. Amint olvashatjuk, a felsorolásból hiányzik az SCN6A és az SCN7A. Ennek az az oka, hogy az SCN6A elnevezést már nem használjuk, mivel ezt a gént korábban ortológnak találták az egér SCN7A génnel (42). Az SCN7A gént pedig Na_x-nek nevezik a szakirodalomban, mivel nem feszültségfüggő. Ez egy atipikus, nem inaktiválódó nátriumcsatorna, amelynek expressziója a szenzoros cirkumventrikuláris szervekben

elengedhetetlen a test folyadékháztartásának fenntartásához (43). Az Na_x-et homeosztatikus effektor neuronokban is kimutatták, például a vazopresszint kibocsátó magnocelluláris neuroszekretoros sejtekben, amelyek hipertónia és hipernatrémia hatására vazopresszint választanak ki a véráramba és fontos szerepet töltenek be az ozmoregulációban (44).

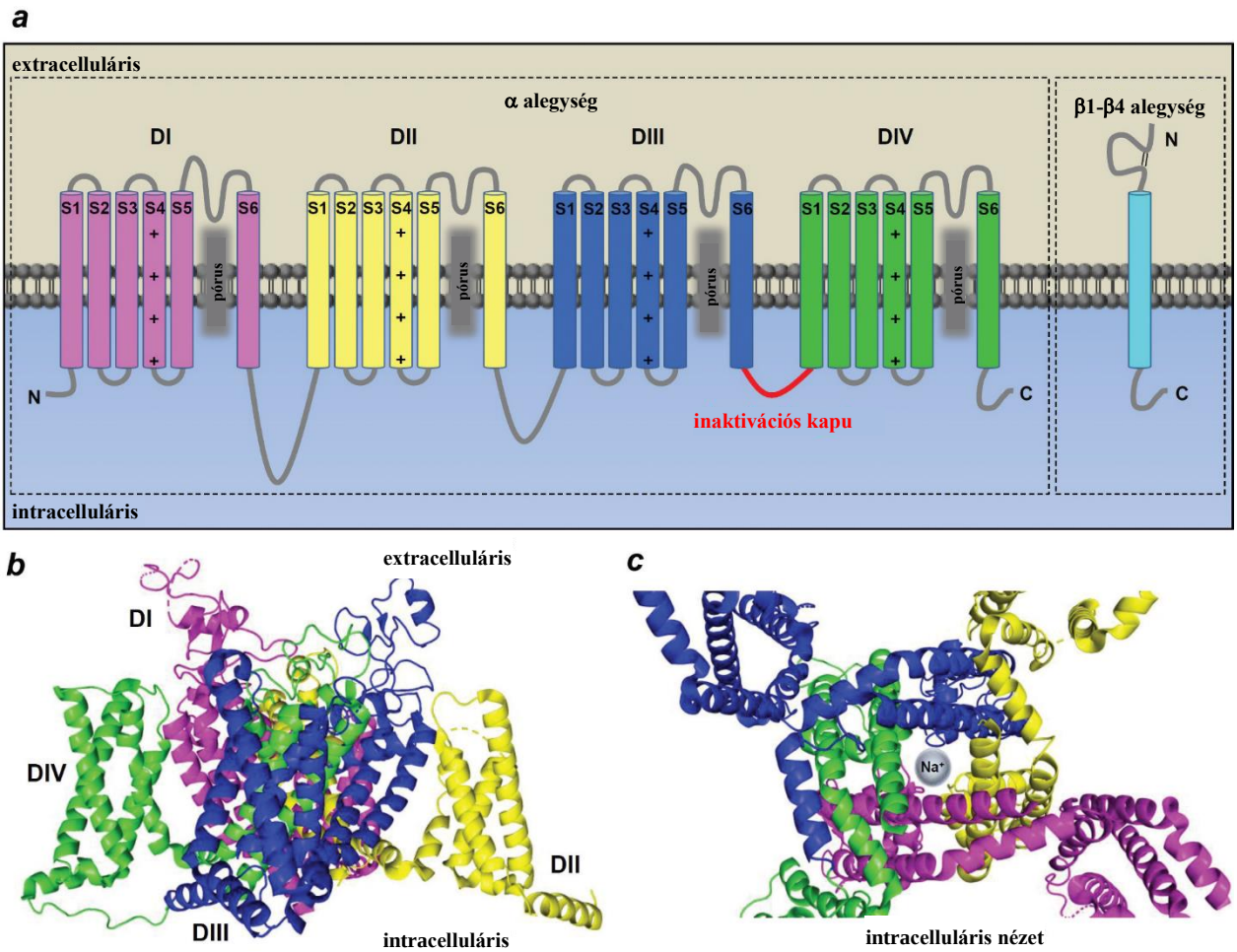
Az összes izoforma közül a $Na_v1.5$-öt tartják a domináns szív izoformának (45,46). A $Na_v1.5$ viszonylag érzéketlen a tetrodotoxinnal (TTX) szemben (45,47–49), amely tulajdonság még a későbbiekben szerephez jut a disszertációban. Ugyanakkor más TTX-érzékeny altípusok (a $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ és $Na_v1.8$) kifejeződéséről is beszámoltak a szívben (4,50–53). A 6 lehetséges β alegységet (β1, β1A, β1B, β2, β3, β4) négy gén (SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B) kódolja (54–57). Az α alegység önmagában elegendő a funkcionális csatorna kialakításához; a kiegészítő β alegységek azonban szükségesek a szabályos csatorna kinetika kialakításához és a sejtfelszíni expresszióhoz (55). A β alegységek modulálják a sejtfelszínen elérhető csatornák számát és szerepet játszanak a csúcsáramsűrűség szabályozásában (55). Továbbá a β alegységek a feszültségtartomány megváltoztatásával szabályozzák az aktiválódást, az inaktivációt és az inaktivációból való visszatérést (58,59).

A Na_v α alegységei körülbelül 2000 aminosavból állnak és négy domént (DI-DII-DII-DIII-DIV) alkotnak (2. ábra a és b panel). Mindegyik domén hat transzmembrán szegmensből (S1-S6) áll. Az 1-4. szegmensek (S1-S4) a csatorna feszültségérzékelő doménjeként működnek. Ez a domén érzékeli a membrán depolarizációját, ami a csatorna aktiválódásához vezet. Az S1-S4 egy intracelluláris csatlakozón keresztül kapcsolódik a csatorna pórusképző doménjéhez, az S5-S6-hoz (2. ábra c panel). A szelektivitási szűrő szintén a pórusdoménben helyezkedik el. Ez a nyitott pórus legszűkebb része, amelyet az áthaladó ionnal specifikusan kölcsönhatásba lépő fehérje-ligandumok bélelnek. Kulcsszerepet játszik a csatorna szelektivitásának szabályozásában, mivel szerkezetének/összetételének megváltoztatása a szelektivitás jelentős vagy teljes elvesztését eredményezi. Krisztallográfiás, mutagenezis és csatorna-blokkoló kötődésvizsgálatokkal feltárták számos nátriumcsatorna szelektivitási szűrő oligomer szerkezetét, összetételét és pórusméretét (60,61). A csatorna szelektivitási szűrőjét a négy domén S5 és S6 szegmensei közötti pórushurkok együttesen alakítják ki, az összes domén hozzájárul aminosav oldallánccal a DEKA szekvenciájú szűrőhöz. A pórus többi részét az S6 szegmensek veszik körül, és ezek alakítják ki a pórus intracelluláris oldalán az aktivációs kaput (60).

A Na_v küszöbértékéhez képest negatívabb membránpotenciálokon a csatorna nyitási valószínűsége alacsony. Depolarizáció hatására azonban az α alegység feszültségérzékelő S1-S4 doménjének konformációja megváltozik, ami az aktiválódási kapu és a Na_v gyors megnyílásához vezet (62). Ennek hatására a csatornán Na^+-ok áramlanak keresztül, mely a szívizomsejt membránjának további depolarizációját okozza, létrehozva az AP felszálló szárát. Néhány milliszekundummal később az inaktivációs kapu lezárja a csatorna pórusdoménjét, így nem vezető állapotot eredményez, a csatorna tehát gyorsan inaktiválódik (63,64).

A homológ domének intracelluláris doménközi hurkokkal (IDI/II, IDII/III és IDIII/IV) kapcsolódnak egymáshoz. Az inaktivációs kaput a legkisebb intracelluláris interdomén hurok (IDIII/IV) alkotja, mely „fedőként" funkcionál. Inaktivációkor lezárja a pórust, ahogy ezt az a korábbi kutatások során már leírták (65–69). Ezt a gyors inaktivációt a három aminosavból álló IFM motívum hozza létre a pórus intracelluláris oldalához bekötődve és elzárva az ionáramlás útját (67).

A csatorna gyors inaktivációja megakadályozza a túlzott depolarizációt, és hozzájárul a repolarizációhoz. Egyes szerzők szerint az inaktivációs kapu molekuláris komplexként alakul ki és stabilizálódik, amelyet az IDIII/IV és az α alegység C-terminálisánál elhelyezkedő hurok együttesen alkot (70). Az AP repolarizációja során a Na_v fokozatosan visszatérnek az inaktiválódott állapotukból, készen arra, hogy újra aktiválódjanak (71).



2. ábra: *A szív $Na_v1.5$ szerkezete. a panel: A szív Na_v izoformájának alfa és béta alegységei. Ezen az ábrán látható az alfa alegység négy doménje (DI-DIV) és az egyes domének hat transzmembrán szegmense (S1-S6), valamint a segéd béta alegységek. A szürke zóna a pórusképző domént mutatja. Pirossal a DIII és a DIV közötti inaktivációs kapu (IDIII/IV) látható. b panel: A patkány $Na_v1.5$ α alegység krio-EM szerkezetének oldalsó nézete, ahol a doméneket különböző színekkel jelöltük. A csatorna Protein Adat Bankban (PDB) szereplő azonosító kódja: 6UZ3* (60) *Az adatbázisban szereplő háromdimenziós struktúrát PyMol szoftverrel újra generáltuk. c panel: A patkány $Na_v1.5$ α alegység krio-EM szerkezetének a felső (intracelluláris) nézete.*

Szívizomsejtekben a nagyobb $I_{Na,késői}$ akadályozza a repolarizációt és nagyobb nátrium belépést okoz, így növeli az intracelluláris nátriumion koncentrációt ($[Na^+]_i$). A megnövekedett $[Na^+]_i$ viszont nagyobb intracelluláris kalciumion koncentrációhoz ($[Ca^{2+}]_i$) vezet. Ezek a tényezők együttesen kontraktilis diszfunkciót (8), zavart szívizom-energetikát (9) és szívritmuszavarokat (7) okozhatnak.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A $I_{Na,késői}$ elektrofiziológiai azonosítása

Az emlősök szívizomsejtjei a Na_v izoformák széles skáláját expresszálják, amelyek egységnyi vezetőképességben, feszültségérzékenységben, kinetikában és gyógyszerérzékenységben is különböznek. A szívizomzatban a pórusképző alegység domináns izoformája a $Na_v1.5$, amely viszonylag érzéketlen a tetrodotoxin (TTX) hatására (45,47). A TTX-érzékeny („nem szív eredetű") Na_v-k ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$ és $Na_v1.6$) közül többről is kimutatták, hogy a szívizomzatban is jelen van (49–53). A sinuscsomó sejtjeiben az $Na_v1.5$ mellett az $Na_v1.1$ fejeződik ki a mérhető mennyiségben. Az $Na_v1.5$ többnyire a nagyobb sejtekben és azok perifériáján helyezkedik el, ezzel szemben az $Na_v1.1$ eloszlása egyenletes a sejten belül és a kisebb sejtekben is megtalálható (72). A pórusképző alegység mellett négy járulékos alegység (ß1, ß2, ß3 és ß4) és bizonyos állványfehérjék (scaffold) is részt vesznek a teljes komplex felépítésében, amely ezáltal a citoszkeletonhoz is képes kötődni. Ezek a molekulák kölcsönhatásba léphetnek egymással, és módosíthatják a tényleges csatorna kinetikáját és feszültségfüggését (73).

A későbbiekben (2.3-2.6. fejezet) tárgyalt mechanizmusok hozzájárulhatnak a $I_{Na,késői}$ AP alatti profiljához. E mechanizmusok jobb megértése hasznos lehet a $I_{Na,késői}$ csatornát célzó új antiaritmiás terápiás stratégiák kifejlesztésében.

2.2. A késői nátriumáram tulajdonságai

A $I_{Na,késői}$ általában egy kicsi, de perzisztens áram (1. ábra). A szív AP platófázisában aktív, ezért az áram jelentős szerepet játszhat az AP időtartamának és alakjának (1. ábra b panel) meghatározásában (3,74,75). Ennek az ellentmondásnak (azaz, hogy egy apró áram nagy hatást gyakorol az AP-ra) egyik lehetséges magyarázatát a nettó membránáram adja. Az AP plató fázisában a sejtmembrán impedanciája magas (76), és Ohm törvénye szerint ebben a szakaszban a nettó membránáram kis változásai viszonylag nagy változásokat eredményeznek a membránpotenciálban és ennek következtében az AP időtartamában (APD) is (77,78).

A $Na_v1.5$ három különböző kapuzási módját írták le (3. ábra) kamrai szívizomsejtekben (79). A tranziens mód (TM) a $I_{Na,korai}$ fő kapuzási módja. A burst mód (BM) és a késői elszórt mód (LSM) felelős a $I_{Na,késői}$-ért; azonban a BM nyitások száma gyorsan lecsökken, így a LSM lesz a $I_{Na,késői}$ fő kapuzási módja a plató fázis alatt. A különböző kapuzási módokat a 2.3. fejezetben részletesen is tárgyaljuk. Ezenkívül egyes szerzők több inaktivációs folyamatot javasoltak, amelyek mindegyike az APD-t, a Na_v egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését és a sejt nátrium áramlási mérlegét szabályozza (80). A gyors inaktiváció csak az első milliszekundumokban zajlik, és a csatorna negatív membránpotenciáloknál kb. 5-10 ms alatt helyreáll. Ezt követi az intermedier inaktiváció, amely a gyors inaktivációhoz képest lassabban regenerálódik. A lassú inaktiváció a nyitott állapotból több száz milliszekundum alatt következik be, majd ezután az ultralassú inaktiváció másodpercekig is eltarthat (80,81).

Az „ablak nátriumáram” a Na_v jól ismert jelensége. Az állandósult állapotú aktiválódási és inaktivációs görbék közötti átfedés („potenciálok ablaka”) miatt a Na_v-k egy része képes az inaktivációból felépülni és újra megnyílni. Figyelembe véve azonban ennek az ablakáramnak a feszültségtartományát, messze az AP fiziológiás platópotenciálja alatt van, így nem valószínű, hogy jelentős szerepet játszik a $I_{Na,késői}$ kialakításában (75,82–84). Az ablak nátriumáramról részletesebben a 2.4. fejezetben teszünk említést.

A $I_{Na,késői}$ profiljában markáns fajok közötti különbségek észlelhetőek. Az egyik gyakorlati különbség az AP alakja és időtartama, ami eltérő $I_{Na,késői}$ profilokat eredményez. Horváth és munkatársai, valamint Hegyi és munkatársai arról számoltak be korábban, hogy a $I_{Na,késői}$ áramsűrűsége tengerimalac és nyúl szívizomsejtekben hasonló mértékű a fő repolarizáló K^+–áramokhoz (35,85). Nyulakban ezen kívül nagyobb volt a $I_{Na,késői}$ pitvari áramsűrűsége, összehasonlítva a kamrákban mért adatokkal (86).

A $I_{Na,késői}$ fordított frekvenciafüggő tulajdonságokat mutat, azaz minél nagyobb az ingerlési frekvencia (szívfrekvencia), annál kisebb az áramsűrűség (78,87,88). A korai és a késői komponenseknél azonban eltérő változásokat tapasztaltak a korábban elvégzett kísérletek során. A mérések alapján a nagy frekvencián megfigyelhető magasabb $[Na^+]_i$–t elsősorban a korai komponens határozza meg, mivel a $I_{Na,késői}$ gyors ingerlés esetén lassan regenerálódik az inaktivációból (89). Emellett magasabb frekvenciáknál az APD általában lerövidül, így kevesebb idő áll rendelkezésre a $I_{Na,késői}$ aktiválódására. Ez az jelenti, hogy minél rövidebb az APD, annál kisebb a $I_{Na,késői}$ és a Na^+ beáramlás. Ezzel szemben bradikardia során az APD hosszabb és ebben az esetben nagyobb rövidtávú beat-to-beat variabilitást (SV) mutat (90). Ezekből az eredményekből arra lehet következtetni, hogy a bradikardia (amely fokozott $I_{Na,késői}$–mal jár együtt) erősen proaritmiás hatású lehet (5,35,91). Mivel a szívfrekvencia és az APD tekintetében jelentős fajok közötti különbségek vannak, a hosszú AP–lal rendelkező fajokban (pl. ember, kutya, tengerimalac) várhatóan nagyobb a $I_{Na,késői}$ és a Na^+–beáramlás, mint a rövidebb AP–lal rendelkező fajoknál (pl. patkány, egér).

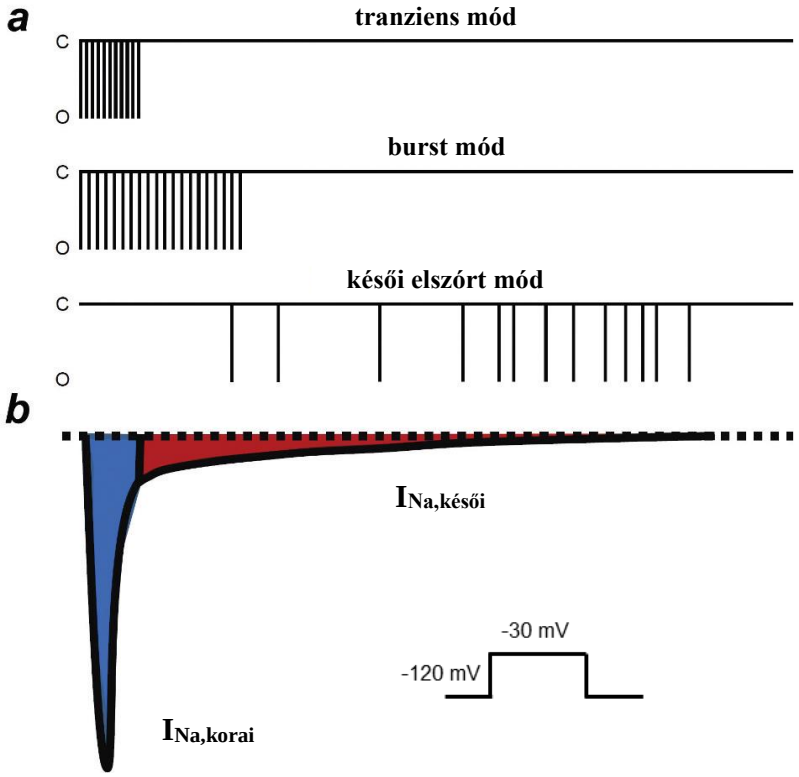
2.3. A késői nátriumáram különböző kapuzási módjai

Nyugalmi membránpotenciálon (RMP) a $Na_v1.5$–k túlnyomó többsége zárt állapotban van. Depolarizáció hatására a $Na_v1.5$–k 1–2 ms alatt megnyílnak, majd gyorsan inaktiválódnak (37,38). Ez az áram hozza létre a $I_{Na,korai}$-t és az ingert nem keltő szívizomsejtek AP-jának felszálló szárát. Tartós depolarizáció során a $Na_v1.5$ ioncsatornák kis valószínűséggel újra megnyílhatnak. Kamrai szívizomsejtekben a $Na_v1.5$ aktiválódásnak három módját jellemezték egycsatornás kísérletekben, melyek a TM, a BM és a LSM. A $I_{Na,korai}$ főként a TM aktiválódás eredménye, míg a BM és a LSM a tartós nátriumáramért, a $I_{Na,késői}$–ért felelős (3. ábra a panel). A tartós áramkomponens nagysága a depolarizáló impulzus kezdete után 50 ms–mal mért $I_{Na,korai}$–nak csak kb. 0,5–1%–a (79), ahogyan ezt a 3. ábra b paneljénél is láthatjuk. A tartós depolarizáció során a BM megnyílások gyorsan csökkennek az első néhány tíz milliszekundumban, így a platófázis vége felé az LSM lesz a fő kapuzási mód, amely elsősorban a $I_{Na,késői}$–ért felelős, ahogy ezt a 3. ábra a paneljének 3. sorában is láthatjuk.

A csatornafehérje mutációi és bizonyos betegségek megváltoztathatják a különböző $Na_v1.5$ aktiválódási mintázatok hozzájárulását a makroszkopikus áramhoz, így növelve a $I_{Na,késői}$-ot (52,91–99). Ezt az 1. ábra B paneljén szemléltettük. Úgy tűnik, hogy minden egyes kapuzási

mód külön gyógyszerérzékenységgel és gyógyszeraffinitással is rendelkezik (100–102). A gyors disszociációs kinetikájú gyógyszerek (például a lidokain) hatékonyak lesznek a korai extraszisztolék ellen és döntően a tranziens kapuzási módnál hatnak. Ezzel szemben a lassú disszociációs kinetikájú gyógyszerek (például a flekainid) a diasztolé végén is jelentősen gátolnak. Ez az elhúzódó gátlás a szívfrekvencia növekedésével fokozódik, mely kisebb mértékben a burst módot és jelentősebb mértékben a késői elszórt módot befolyásolja (101).

Ennek alapján bizonyos kapuzási módok szelektív farmakológiai célzása potenciális antiaritmiás vagy kardioprotektív hatással bírhat (102–104). A $I_{Na,késői}$ valódi kapuzási mechanizmusának jellemzése szintén közelebb vihet egy hatékonyabb terápiás protokoll kialakításához.



3. ábra: *A $I_{Na,korai}$ és $I_{Na,késői}$–ot meghatározó különböző kapuzási módok. a panel: A három $Na_v1.5$ kapuzási mód sematikus ábrázolása. A $I_{Na,korai}$–ot a TM határozza meg döntően. A burst mód és a késői elszórt mód együttesen felelős a $I_{Na,késői}$-ért, azonban a késői szórt mód a fő $I_{Na,késői}$-ot kialakító kapuzási mód. C a zárt (closed) és O a nyitott (opened) állapotot szemlélteti. b panel: A I_{Na} reprezentatív elektrofiziológiai felvétele. A kék jelölés a korai nátriumáram csúcskomponensét ($I_{Na,korai}$) mutatja, míg a piros az áram tartós, késői nátriumáram komponensét mutatja ($I_{Na,késői}$).*

2.4. Az „ablak nátriumáram”

Ahogy ezt a 2.2. fejezetben már említettük, a legtöbb Na_v állandósult állapotú aktiválódásának és inaktivációjának feszültségfüggése átfedésben van egymással (39). Ez az átfedés egy olyan feszültségtartományt („ablakot”) biztosít, ahol az inaktiválódott Na_v–k képesek az inaktivációból kilépni, majd esetleg újra kinyílni. Amikor a tényleges membránpotenciál ebbe az átfedési „ablakba” esik, akkor tartós áram keletkezik. Fiziológiás körülmények között ez az ablak nátriumáram valószínűleg korlátozott szerepet játszik a $I_{Na,késői}$-ban, mivel a $Na_v1.5$ feszültségablaka -70 mV körül van, ami elég messze esik az AP platónál észlelt feszültség értékektől. Ráadásul az ablak feszültségtartományban az áramsűrűség kevesebb, mint 5%-a az egészséges szívizomsejtekben mért maximális áramsűrűségnek (75,82,83). Ebből következik, hogy az ablak nátriumáram valószínűleg nem a $I_{Na,késői}$ fő meghatározója az egészséges szívizomsejtekben. Azonban a megváltozott szabályozás bizonyos betegségekben (a 2.15. fejezetben erről részletesebben is említést teszek) vagy az egyes csatornafehérjék mutációi eltolhatják a Na_v–k egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggését, ezáltal jelentősen módosítva ezt a feszültségablakot, így megnövelve a $I_{Na,késői}$-ot ezen kóros körülmények között (105,106). A hosszú QT szindróma (LQTS) 3-as típusánál eddig három különböző mutációt azonosítottak. Ezek közé tartozik három aminosav deléciója (Lys-1505, Pro-1506 és Glu-1507, ΔKPQ), valamint két pontmutáció, az N1325S (Asp-1325 Szerinné alakul) és az R1644H (Arg-1644 Hisztidinné alakul) is (107,108).

2.5. „Nem egyensúlyi csatorna kapuzás”

A szívizomsejtek AP-ja során a membránpotenciál folyamatosan változik. A Na_v–k beépülnek ebbe a dinamikus rendszerbe. Clancy és munkatársai 2003-ban leírták, hogy a membránpotenciál változások előzménye modulálja a Na_v kapuzási állapotok közötti átmeneteket, amit „nem egyensúlyi kapuzásnak” neveztek el (10). Ennek eredményeképpen az inaktivációból való visszatérést is a feszültségváltozás dinamikája modulálja. Az elméletet kísérleti adatok támasztják alá, amelyek azt mutatják, hogy a repolarizáló feszültség rámpák vagy AP alakú feszültség parancsok alkalmazása nagyobb $I_{Na,késői}$-t idéz elő a hagyományos négyszög alakú impulzusokhoz vagy olyan modellszimulációkhoz képest, ahol a nem egyensúlyi kapuzás nem része a numerikus modellnek (35).

2.6. Egyéb típusú nátriumcsatorna izoformák a szívben

Ahogyan ez ismeretes az epilepszia (109,110) és bizonyos vázizombetegségek (111,112) kóros EKG-felvételekkel társulhatnak. Ezen vizsgálatok alapján felmerült a kérdés, hogy a nem szív eredetű Na_v mutációk okozhatnak-e elektromos elváltozásokat a szívben. A feltételezések alapján később a $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$ és $Na_v1.8$ izoformákat is azonosították a szívizomszövetben (49–52,113). Biet és munkatársai eredményei alapján a $I_{Na,késői}$ akár 44%-át is a nem szíveredetű Na_v-k adják a kutya kamrai szívizomsejtekben (51). Továbbá Yang és munkatársai kimutatták, hogy egerekben és nyúlban a TTX-rezisztens $Na_v1.8$ alkotja a $I_{Na,késői}$

jelentős részét (50). E kísérleti adatok alapján az izoforma specifikus Na_v modulátorok jó megközelítést jelenthetnek a későbbiekben az antiaritmiás terápia során.

2.7. A késői nátriumáram szerepe a szív fiziológiájában

Mivel a szív AP platófázisát kicsiny befelé és kifelé irányuló áramok közötti kényes egyensúly alakítja ki, ezért az ezekben az áramokban bekövetkező enyhe változás is jelentősen megváltoztathatja az AP időtartamát (114). A $I_{Na,késői}$ gátlása jelentősen lerövidíti a szív AP-t konduktív rendszerben (74) és kamrai sejtekben is (3), ami arra utal, hogy a $I_{Na,késői}$ jelentősen hozzájárul az AP időtartamának létrehozásában.

A tartós nátriumáram szintén fontos szerephez jut a szinuszcsomóban található sejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak kialakításában (48,72). Az 1 μM-nál alacsonyabb koncentrációban alkalmazott tetrodotoxin csökkenti a spontán depolarizáció sebességét a szinoatriális sejtekben (115), ami egyértelműen jelzi, hogy a TTX-érzékeny $Na_v1.1$ izoforma is hozzájárul a szív ingerképzéséhez, azonban ezzel kapcsolatos százalékos eloszlást a szakirodalomban eddig nem találtunk.

A gyors válasz idejű AP-lal rendelkező szívizomsejtek között a szív Purkinje sejtjeinek van a legnagyobb AP időtartam (APD) frekvenciafüggése. A Purkinje sejtek AP-ja alacsonyabb stimulációs frekvencián hosszabb, míg magasabb frekvencián rövidebb, mint a kamrai sejtek AP-ja, amely tulajdonsághoz a $I_{Na,késői}$ is hozzájárul. Ennek eredményeként a Purkinje sejtek $I_{Na,késői}$ értéke alacsony szívfrekvencián jelentősen nagyobb, míg magas szívfrekvencián kisebb a kamrai sejtekhez képest. Ez az egyedülálló tulajdonság hajlamosítja a Purkinje sejteket arra, hogy triggerként szolgáljanak az aritmiák generálásában (116).

A $I_{Na,késői}$ szerepet játszik a pitvari AP kialakításában is (86,117). A $I_{Na,késői}$ várhatóan nagyobb a pitvarokban, mint a kamrákban, mivel a $I_{Na,korai}$ áramsűrűsége nagyobb a pitvari sejtekben hasonló körülmények között, ami arra utal, hogy a pitvari sejtekben nagyobb a Na_v-k expressziója (118,119). Másrészt a pitvari sejtekben az összességében pozitívabb membránpotenciál és a nátriumáram negatívabb állandósult inaktivációs feszültsége csökkenti a Na_v-k elérhetőségét (120). Luo és munkatársai egyik kísérletsorozatában a maximális $I_{Na,késői}$ áramsűrűség nagyobbnak bizonyult a nyúl bal pitvari szívizom sejtjeiben, mint a kamrai sejtekben (86). Egy másik vizsgálatban ezzel szemben a két sejttípus hasonlóan viselkedett (117,121), tehát nincs egyértelmű magyarázat ebben a kérdéskörben.

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

A $[Na^+]_i$-t a sejtbe beáramló Na^+ és az intersticiális térbe távozó Na^+ dinamikus egyensúlya határozza meg. Az ingert nem keltő kamrai szívizomsejtek $[Na^+]_i$ értéke 4-8 mM körül van tengerimalacban, nyúlban és kutyában; patkányban és egérben pedig körülbelül kétszer ilyen magas (9-14 mM) ez az érték (122). Az ingert nem keltő emberi szívizomsejtekben a $[Na^+]_i$ feltehetően 4-10 mM tartományban van.

A Na^+ a Na_v–kon, a NCX-on és a Na^+/H^+–cseremechanizmuson (NHE) keresztül juthat be a sejtbe. A Na^+ elsősorban a Na^+/K^+ pumpa (NKP) révén távozik a sejtből, de a szív AP első néhány milliszekundumában a reverz módú NCX is felelős a mérsékelt Na^+ kiáramlásért. Továbbá a Na^+/HCO_3^-kotranszport, a Na^+/Mg^{2+} cseremechanizmus és a $Na^+/K^+/2Cl$–

kotranszport is kis mértékben szerepet játszhat a szívizomsejtek nátrium homeosztázisában (122). Ezen kívül azt is meg kell említeni, hogy a citoszol és az intracelluláris sejtszervecskék közötti Na^+ koncentrációk folyamatosan egyensúlyban vannak.

Ingerlés hatására a $[Na^+]_i$ egyenesen arányosan emelkedik az ingerlési frekvencia növelésével, amit a Na_v–on és az NCX–on keresztül történő nagyobb Na^+ beáramlás okoz. Az ingerelt szívizomsejtekben körülbelül 25 %–a Na_v–on keresztül történő Na^+ bejutás (122). A Na_v–on keresztül történő Na^+ beáramlás körülbelül egyenlő mértékben $I_{Na,korai}$ és $I_{Na,késői}$ között oszlik meg (39,122–124), azonban ez az eloszlás függ a szívfrekvenciától (részletesebben a 2.9.3. fejezetben teszek erről említést). A nagyobb Na^+ beáramlás az ingerelt sejtekbe egyidejűleg egy megnövekedett kiáramlással jár együtt az NKP fokozott működésén keresztül. Ezt főként a megnövekedett $[Na^+]_i$ okozza, de nitrogén–oxid–, és foszfolemmán–függő mechanizmusok is hozzájárulhatnak ehhez a hatáshoz (122).

2.9. A Na^+ és a Ca^{2+} homeosztázis kapcsolata a szívizomsejtekben

2.9.1. A Na^+ és a Ca^{2+} homeosztázis közötti közvetlen kapcsolat: a Na^+/Ca^{2+} - cseremechanizmus

A NCX egy másodlagosan aktív transzporter, amely 1 Ca^{2+}–ot és 3 Na^+–ot szállít egyszerre, egymással ellentétes irányba (122,125,126). A NCX funkcióját a pillanatnyi membránfeszültség, a Ca^{2+} és Na^+ elektrokémiai gradienseinek eredője határozza meg.

A NCX fő szerepe a Ca^{2+} eltávolítása a sejtekből a nátriumgradiens formájában jelenlévő potenciális energia felhasználásával („forward mód”). E mód mellett az AP első néhány milliszekundumában a NCX a sejtből Na^+–ot távolít el („reverz mód”) és egyúttal a citoszolba Ca^{2+}–ot juttat (127,128).

2.9.2. A $I_{Na,késői}$ elősegíti a Ca^{2+} beáramlást az L–típusú kalcium csatornán keresztül

Befelé irányuló áram lévén a $I_{Na,késői}$ depolarizálja a sejtmembránt, ami növeli a plató fázis során a membránpotenciált és hosszabb AP–t eredményez. Minél hosszabb időt tölt a membrán depolarizált állapotban, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy az L-típusú kalciumcsatornák újra megnyílnak. Ez jól dokumentálható az APVC technikával, ahol látható, hogy az $I_{Ca,L}$ az AP egész platófázisa alatt folyik (129–132). Ebből az következik, hogy minél hosszabb az AP, annál nagyobb a szívizomsejtbe történő Ca^{2+} belépés mértéke(133).

2.9.3. A szívfrekvencia és az AP időtartama befolyásolja a $I_{Na,késői}$–ot

A szívfrekvencia befolyásolja a $I_{Na,késői}$ nagyságát, mivel a $I_{Na,késői}$ nagysága is fordított frekvenciafüggő, mint a szívizomsejtek számos más elektrofiziológiai jellemzője (78). Ez azt jelenti, hogy minél gyorsabb az ingerlés, annál kisebb a $I_{Na,késői}$ áramsűrűsége (87,88). A pulzusszám növekedésével azonban a $I_{Na,korai}$ áramsűrűsége és az AP felszálló szára alatt mérhető maximális depolarizációs sebesség (V_{max}; a $I_{Na,korai}$ által meghatározott AP paraméter) nem csökken olyan mértékben (88). Ennek az az oka, hogy a $I_{Na,késői}$ inaktiváció utáni visszatérése sokkal lassabb, mint a $I_{Na,korai}$-é (89). A két nátriumáram komponensnek ez a jellemzője azt is eredményezi, hogy nagyobb szívfrekvencián a $I_{Na,késői}$ kisebb mértékben járul hozzá a teljes Na^+-beáramláshoz. Ilyen körülmények között a gyakrabban kiváltott AP-ok miatt a Na^+ bejutás nagyobb része történik a $I_{Na,korai}$-n keresztül, és a nagyon lassú $I_{Na,késői}$ helyreállítási kinetika miatt csökken a $I_{Na,késői}$ áramsűrűsége. Ezenkívül az AP hosszának frekvenciafüggő változásai is befolyásolják a Na^+ beáramlást. Magas szívfrekvencián az AP-ok rövidebbek, ezért a $I_{Na,késői}$ rövidebb ideig aktív, ami a Na^+ beáramlás további csökkenéséhez vezet. Ugyanakkor a pulzusszám emelkedésével a Na^+/K^+-pumpa (NKP) általi Na^+ eltávolítás csökken (122), ami az izolált sejtekben frekvenciafüggő $[Na^+]_i$ terheléshez vezet. Ezt a jelenséget azonban β-adrenerg stimuláció során nagymértékben ellensúlyozza a NKP aktivitásának foszfolemmánon keresztüli fokozása (134).

2.10. A $I_{Na,késői}$ modulációja

A Ca^{2+} a szívizomsejtek excitációs-kontrakciós kapcsolásának kulcsszereplője, ezenkívül számos más sejtfunkciót is szabályoz, beleértve a szarkolemmális transzportmechanizmusokat. A Na_v-t a Ca^{2+}, a kalmodulin (CaM) és a Ca^{2+}-CaM függő fehérje kináz II (CaMKII) egyéni és kooperatív hatása is szabályozza (14,135,136). A Ca^{2+}-CaM-CaMKII útvonalon keresztül történő jelátvitelről feltételezik, hogy növeli a nátriumáramot, különösen tekintettel a $I_{Na,késői}$-ra (96,135,137).

2.11. Nátrium csatornák, Ca^{2+} és CaM

A $Na_v1.5$ szerkezetében jelen vannak a Ca^{2+}-kötő (EF kéz), valamint CaM-kötő (IQ) motívumok. Korábban kimutatták, hogy a Ca^{2+} önmagában képes szabályozni a Na_v-kat (15), míg más eredmények azt támasztják alá, hogy a Ca^{2+} nem képes közvetlenül szabályozni a Na_v-kat és a szabályozás kizárólag a Ca^{2+}-CaM komplexen keresztül történik (138,139). A pontos szabályozási mechanizmust érintő viták mellett általános egyetértés van abban, hogy Ca^{2+} emelkedés esetén az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése pozitívabb feszültségek felé tolódik el (140), bár ez a hatás fiziológiailag releváns Ca^{2+} koncentrációknál és a vad típusú csatornáknál nagyrészt elhanyagolható. Olyan körülmények között azonban, amikor a Ca^{2+} vagy CaM érzékelő régiók mutálódnak, vagy amikor a Na_v-k Ca^{2+} érzékenysége jelentősen megváltozik, különféle funkcionális zavarok léphetnek fel, amelyek megnövekedett $I_{Na,késői}$-hoz vezethetnek.

2.12.Ca^{2+}-CaM-függő proteinkináz II (CaMKII)

A Na_v közvetlen szabályozása mellett a Ca^{2+}-CaM komplex aktiválja a CaMKIIδC-t, amely szintén modulálja ezeket a csatornákat (135,141,142). Az aktiválódott CaMKII egy Ser/Thr kináz, amely képes foszforilálni a $Na_v1.5$-kat (13). Az egyes foszforilációs helyeknek a csatorna kapuzásában betöltött pontos szerepe még nem tisztázott, abban azonban minden tanulmány egyetért, hogy a CaMKII aktiválódása növeli a $I_{Na,késői}$-ot.

2.13.Komplex moduláció β-adrenerg stimulációval

Hegyi és munkatársai aprólékos APVC kísérletsorozatban mutatták ki, hogy a β-adrenerg jelátviteli útvonal különböző elemei hogyan szabályozzák a $I_{Na,késői}$-ot nyúl kamrai szívizomsejtekben. A protein-kináz A, a CaMKII, az Epac, a nitroziláció, valamint a reaktív oxigéngyökök (ROS-ök) mind hozzájárulnak a $I_{Na,késői}$ szabályozásához a kamrai AP különböző fázisaiban (34).

2.14. Metabolitok a sejtben

A ROS és a hidrogén-peroxid növeli a $I_{Na,késői}$-ot (143–145). Egyes eredmények arra utalnak, hogy a CaMKII is részt vesz a $I_{Na,késői}$ oxigén szabadgyökök jelenlétében megfigyelhető növelésében (146), mivel ROS is aktiválhatja a CaMKII-t (147,148).

Az acidózis szintén csökkenti a Na_v-t is (149–152). Az acidózis jobbra tolta az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését, de az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését szignifikánsan nem befolyásolta izolált kutya bal kamrai szívizomsejtekben, ezért csökkentette a $I_{Na,késői}$-ot (149).

Számos tanulmány megállapította, hogy a hipoxia növeli a $I_{Na,késői}$-ot (153–157). A 15 perces hipoxiás periódust követően Wang és munkatársai fokozott BM csatorna aktiválódásról számoltak be, ami a megnövekedett $I_{Na,késői}$ következtében jöhetett létre (158).

Egyes lipid-metabolitokról kimutatták, hogy növelik a $I_{Na,késői}$ értéket. A lizofoszfatidil-kolinnal kezelt Na_v-k tartós BM csatorna aktiválódást mutattak (159,160), míg a palmitoil-karnitin lassan inaktiválódó nátriumáramot indukált (161). Újabb mérések szerint a többszörösen telítetlen zsírsavak (dokozahexaénsav és eikozapentaénsav) mind a $I_{Na,korai}$, mind a $I_{Na,késői}$ nagyságát csökkentik (162). A szerzők szerint a csökkenést az egyensúlyi aktiváció és inaktivációfeszültség függése közötti átfedés csökkenése okozza, vagyis csökkenti az ablak Na^+-áramot.

A nitrogén-monoxid (NO) bizonyítottan fokozza a $I_{Na,késői}$ szintjét (163). A neurális NO-szintáz (nNOS) a Nav1.5 hatalmas makromolekuláris komplexéhez tartozik, néhány további fehérje mellett, mint például a caveolin-3 és az α1-szintrofin (164).

2.15. Késői nátriumáram szerepe a szívbetegségekben

Egészséges szívizomsejtekben a $I_{Na,késői}$ amplitúdója kevesebb, mint 0,1%-a a $I_{Na,korai}$ csúcsértékének (165,166). Azonban az áram perzisztens, 100-400 ms-ig tart, ezért a $I_{Na,késői}$ által szállított befelé irányuló töltés összehasonlítható az 1-2 ms alatt létrejövő $I_{Na,korai}$ -mal

(124,167). Az irodalomban egyes tanulmányok ezt „endogén” $I_{Na,késői}$-nak nevezik, és úgy gondolják, hogy nincs aritmiás tulajdonsága (165,168). A $I_{Na,késői}$ azonban megnövekedhet számos patofiziológiás állapot, például szívelégtelenség (SZE) (5,6), hipertrófiás kardiomiopátia, öröklött LQTS 3-as típusa (5,52,75,145,169), oxidatív stressz vagy pitvarfibrilláció (PF) esetén (170). Ezenkívül az alacsony pulzusszám vagy a különböző farmakológiai intervenciók is megnövelhetik a $I_{Na,késői}$-ot (171). A $I_{Na,késői}$ fokozódik a szívizom iszkémiás-reperfúziós károsodásában (4,170) és az iszkémia jellegzetes komponenseinek (pl. hipoxia, iszkémiás metabolitok, hidrogén-peroxid) jelenlétében is, amint azt a különböző feszültség-clampes kísérletek során dokumentálták (144,157,160,172).

A megnövekedett $I_{Na,késői}$ AP megnyújtó hatása SZE-ben is megfigyelhető (173). A megnövekedett $I_{Na,késői}$ Na^+ túlterhelést eredményez, ami az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) emelkedéséhez vezet, ahogyan ezt korábban a NCX kapcsán említettem. Az ezzel együtt járó kóros ingerületvezetés hirtelen halált okozhat a SZE-ben szenvedő betegekben. A vezetési sebességet a Na_v működése is meghatározza (174). A kamrai vezetőrendszerben (Purkinje rostok) – a kamrai szívizommal ellentétben – a lassú ingerlés nagyobb, míg a gyors ingerlés szignifikánsan kisebb $I_{Na,késői}$-ot eredményez. Ez a transzmurális inhomogenitás a szívritmuszavarok kiváltó oka lehet (116). Mindezek a mechanizmusok komplex kóros elektromos és mechanikai állapotokhoz vezethetnek, például kontraktilis diszfunkcióhoz (8), zavart szívizom-energetikához (9) és ritmuszavarokhoz (7). A megnövekedett $I_{Na,késői}$ azokban az esetekben a leginkább aritmogén, amikor a repolarizációs rezerv már veszélyeztetett, például I_{Kr}-gátlókkal való kezelés során (168) vagy a remodellált szívizomban.

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

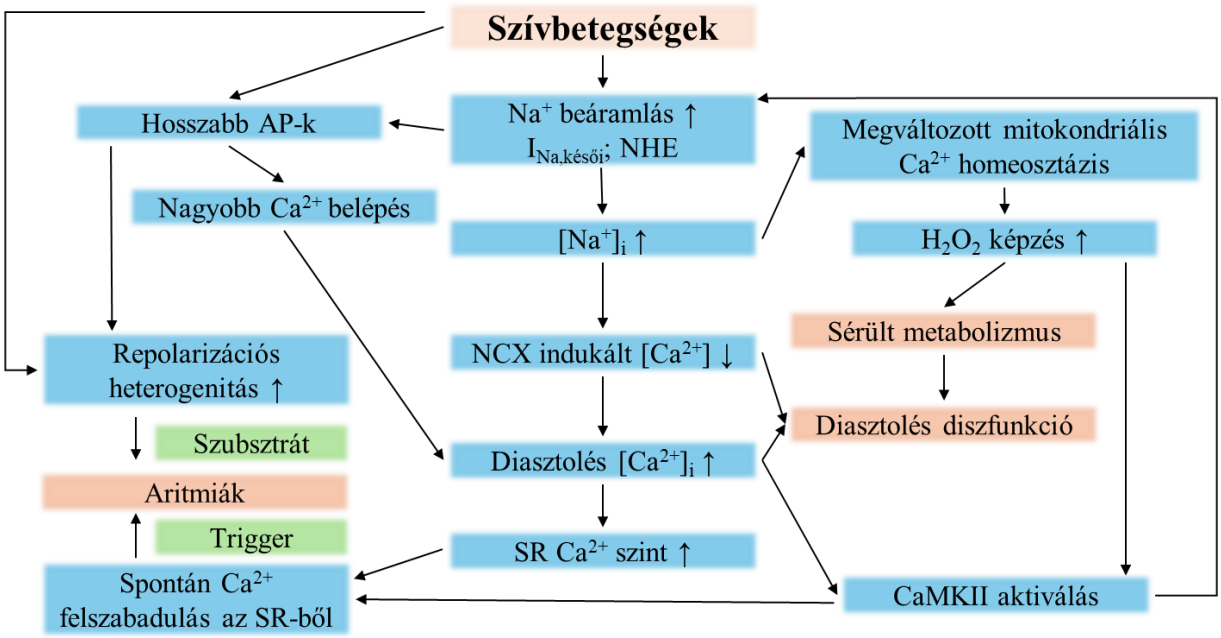
A szívritmuszavarok patofiziológiája az általánosan elfogadott elmélet szerint egy proaritmiás szubsztrát, egy trigger és a vegetatív idegrendszer moduláló hatásának kombinációjából tevődik össze (175). A szívritmuszavarokat befolyásolják ezen kívül még a kardiális betegségek, egyéb társbetegségek és etiológiai tényezők is. A kóros $[Na^+]_i$ homeosztázis szerepet játszhat az aritmiára hajlamos szubsztrát létrehozásában, valamint a ritmuszavar generálásában. A szívelégtelen kísérletes modellek szívizomsejtjeiben a $[Na^+]_i$ körülbelül 2-6 mM-mal nagyobb, mint fiziológiás körülmények között (176–179). Egy nyomás- és térfogattúlterheléses nyúl SZE modellben Despa és munkatársai megnövekedett TTX-érzékeny Na^+ beáramlást találtak (177). Érdekes módon ez a nagyobb beáramlás nem csak az elektromosan stimulált szívizomsejtekben volt jelen, hanem a**z** ingert nem keltő munkaizomsejtekben is. Az ingerképző sejtekben a megnövekedett TTX-érzékeny Na^+-beáramlás legnagyobb valószínűséggel a $I_{Na,korai}$–nak köszönhető. Ennek a beáramlásnak a mögöttes mechanizmusa azonban még nem teljesen tisztázott a szívizomsejtekben.

2.17. A $I_{Na,késői}$ hozzájárulhat a megemelkedett $[Na^+]_i$ értékhez

Számos szívbetegség fokozott $I_{Na,késői}$-mal jár együtt. Korábbi cikkek leírták ezt végstádiumú szívelégtelenségből (75,94) és szívinfarktus utáni preparátumokból származó szívizomsejteknél (180), valamint állati modelleken végzett vizsgálatokon keresztül (52,94).

A nagyobb $I_{Na,késői}$-ot több patofiziológiai tényező okozhatja, többek között az oxidatív stressz [ROS (144,145) és NO (163)] elsősorban a $Na_v1.5$-k S-nitrozilációja révén (164)], hipoxia (154,157), mechanikai stressz (181) és bizonyos iszkémiás metabolitok, például az oxidált lipidek (159). Az egyedi $Na_v1.5$-k kapuzási módozatait vizsgálva, a fokozott $I_{Na,késői}$ mögött valószínűleg a BM és LSM megnyílások megnövekedett száma áll (79,182) SZE-ben.

A Ca^{2+}-CaM-CaMKII jelátviteli útvonal működése SZE-ben fokozódik (183), és ez az útvonal bizonyítottan növeli a $I_{Na,késői}$-ot (138,184–186). Az oxidáció aktiválja a CaMKII-t (146) és konstitutívan aktivált állapotban is tartja. A fokozott CaMKII által közvetített $Na_v1.5$ foszforiláció tehát minden bizonnyal részt vesz a $I_{Na,késői}$ oxidatív stressz alatti növelésében. A legújabb vizsgálatok szerint a $Na_v1.8$ expressziója jelentősen megnövekszik, míg a $Na_v1.5$ expressziója csökken humán bal kamrai hipertrófiában (187) és SZE-ben (188).



4. ábra: *A szívbetegségek által indukált aritmiák sematikus ábrája.*
AP: akciós potenciál; NHE: Na^+/H^+-cseremechanizmus; $[Na^+]_i$: intracelluláris nátriumion koncentráció; NCX: Na^+/Ca^{2+}-cseremechanizmus; $[Ca^{2+}]_i$: intracelluláris kalciumion koncentráció; SR: szarkoplazmatikus retikulum; CaMKII: kalcium-kalmodulinfüggő kalcium-koncentráció. protein kináz II.

2.18. A CaMKII-$I_{Na,késői}$-$[Na^+]_i$-$[Ca^{2+}]_i$-CaMKII ördögi köre

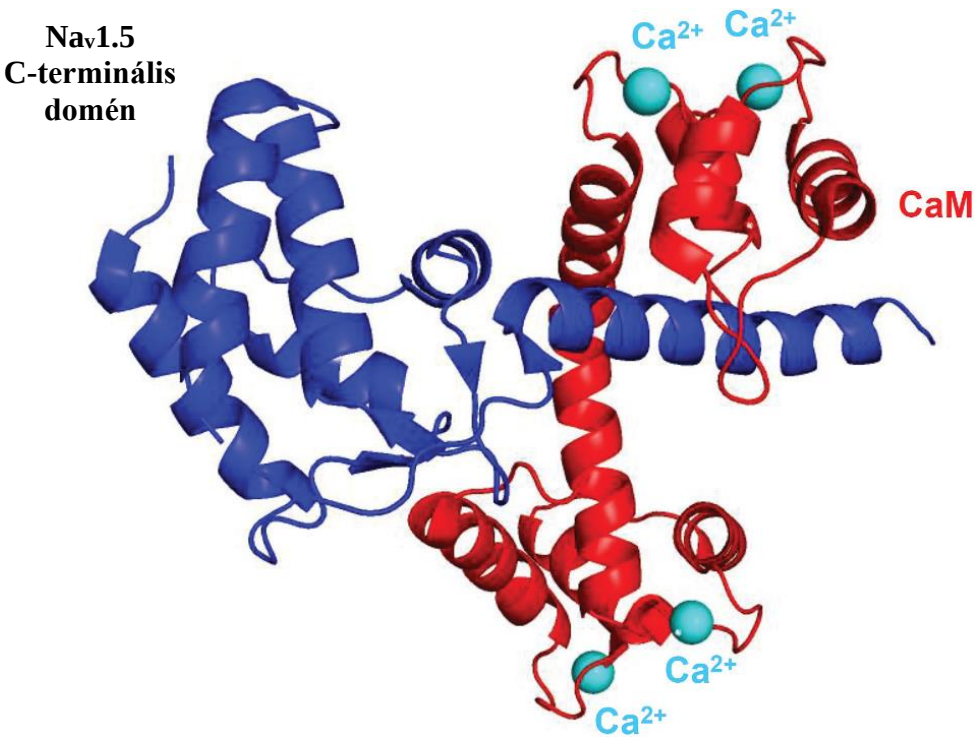
Ha a $[Na^+]_i$ megemelkedik, akkor a NCX forward módja energetikailag kedvezőtlenebbé válik, ezért kisebb mennyiségű Ca^{2+} hagyja el a sejtet a NCX-on keresztül. Ez megnövekedett $[Ca^{2+}]_i$ terhelést okoz, ezért nő a CaMKII aktivitása, ami a CaMKII célpontok, például a $Na_v1.5$ fokozott foszforilációjához vezet. Ez azonban növeli a $I_{Na,késői}$-ot, ami tovább emeli a $[Na^+]_i$-t, végül egy aritmogén ördögi kört hoz létre (13). A $I_{Na,késői}$ növelését ezáltal a $[Na^+]_i$ terhelést Yao és munkatársai leírták a LQT3 mutáción, valamint farmakológiai (anemone toxin-II, ATX-II) vizsgálatokon keresztül (169). Ezek a körülmények a fent leírt ördögi körhöz vezetnek, és ennek eredményeképpen a foszfolambán és a RyR-ok CaMKII-függő foszforilációjának növekedése miatt aritmiák jöhetnek létre.

2.19. Kalcium- és nátrium-homeosztázis

A szarkolemmán keresztüli Na^+ beáramlás növekedése esetén a $[Na^+]_i$ is magasabb lesz. Ez az $[Ca^{2+}]_i$ egyidejű emelkedését okozza, amit aritmogénnek tartanak (189). Továbbá, a magas Ca^{2+} a CaMKII és a protein kináz C (PKC) útvonalon keresztül tovább növelheti a $I_{Na,késői}$–ot, ami elindítja az előzőekben említett ördögi kört. Ez a Ca^{2+} tranziensek térbeli heterogenitását eredményezi, amely hajlamosít szívritmuszavarok kialakulására (189). Ezért rendkívül fontos az emelkedett $I_{Na,késői}$ Na^+ és Ca^{2+} homeosztázisra gyakorolt hatásainak jobb megértése.

Az egészséges szívizomsejtben a Na^+ beáramlás és a Na^+ kiáramlás egyensúlyban áll egymással. Az extracelluláris térből történő Na^+-beáramlás fő forrásai a Na_v-k, a „forward" módú NCX és a NHE. A Na^+, a NKP és a „reverz" üzemmódban működő NCX révén távozik a sejtből. A Na^+ ionok kb. 25%-a a Na_v-kon keresztül jut a sejtbe, míg a NCX a teljes Na^+-beáramlás kb. 60%-át biztosítja (189). Emellett kisebb mértékben egyéb útvonalak is hozzájárulhatnak a Na^+-beáramláshoz. Tekintettel arra, hogy a Na^+ és a Ca^{2+}-homeosztázis szigorúan kapcsolt folyamat (189), ezért a megemelkedett intracelluláris Na^+ NCX általi Ca^{2+}-ra történő kicserélésén túl könnyen elképzelhető, hogy a megnövekedett $I_{Na,késői}$ miatt -40 mV feletti tartós depolarizáció megnövelheti az L-típusú Ca^{2+} csatornák nyitási valószínűségét. Más szóval, a hosszabb AP nagyobb Ca^{2+} beáramlást és Ca^{2+} terhelést okoz (189).

A $I_{Na,késői}$-ot fokozza a Ca^{2+}-CaM-CaMKII útvonal. A CaM és a CaMKII külön-külön és kooperatív módon is szabályozhatja a csatornát (189). A CaM úgy modulálja a Na_v működését, hogy a csatorna fehérje C-terminálisán lévő IQ doménhez kötődve (5. ábra) fokozza a lassú inaktivációt (189). A CaM csökkenti a tartós $I_{Na,késői}$-ot depolarizáció során, ezért csökkenti az aritmiák kockázatát (189). A közelmúltig a Na_v-k és a CaM kapcsolatának megértése korlátozott volt, mivel a legtöbb tanulmány a kalciummentes CaM-t, az apokalmodulint alkalmazta (16). Wang és munkatársai azonban nemrégiben kimutatták, hogy a Ca^{2+} a CaM-ben konformációváltást indukál, amelyben a CaM N-lebenye a Na_v C-terminális doménjének disztális IQ-motívumával érintkezik, míg a CaM (Ca^{2+} szabad) C-lebenye az IQ-motívumhoz rögzül, és ez a hatás izoforma-specifikus (189).

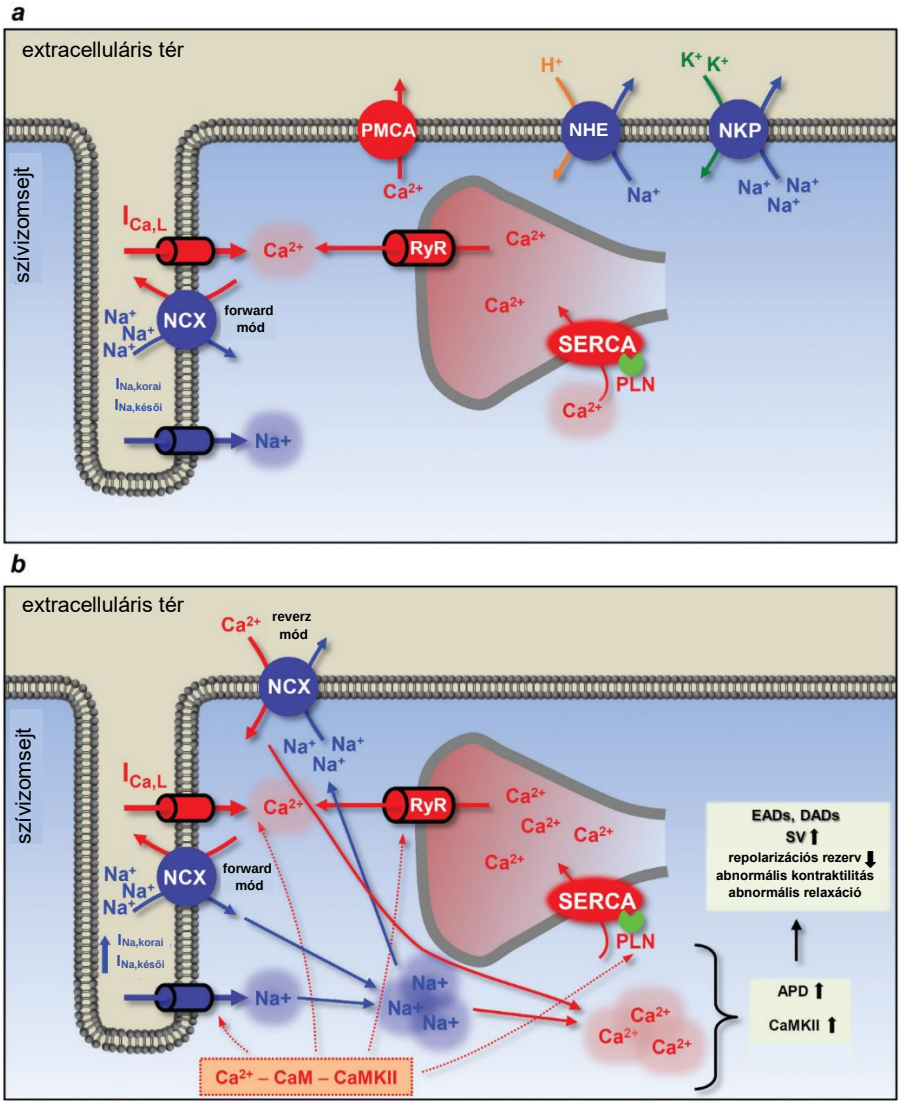


5. ábra: *A kalciumon ion-kalmodulin komplex kapcsolata a nátriumcsatornával. A kristályszerkezet a humán Na_v - Ca^{2+}/CaM komplexet mutatja. A csatorna Protein Adat Bankban (PDB) szereplő azonosító kódja: 6MUD* (16). *Az adatbázisban szereplő háromdimenziós struktúrát PyMol szoftverrel újra generáltuk. Kékkel a $Na_v1.5$ α alegységének C-terminális régiója látható, míg a piros a kalmodulint (CaM) mutatja. A ciánkék gyöngy pedig a CaM-hoz kötött 4 Ca^{2+} -t reprezentálja.*

Ellentmondásos tanulmányok vannak arról, hogy a Ca^{2+} önmagában képes-e szabályozni a Na_v-kat (189). Gardill és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy az EF-kéz domén pozíciója szabályozza a csatornák Ca^{2+}-függő inaktivációját (16). A diffrakciós vizsgálatok ezzel szemben inkább a CaM Ca^{2+}-szenzor szerepét helyezték előtérbe (189). A CaMKIIδ – a szívben domináns izoforma – szintén megváltoztathatja a Na_v-k inaktivációs tulajdonságait. A Ca^{2+}-CaM komplex aktiválja a CaMKII-t, amely foszforilálja a Na_v-t és fokozza a $I_{Na,késői}$-ot . A CaMKII növeli a köztes inaktivációt és lassítja az inaktivációból való visszatérést (189). Ez lassítja a $I_{Na,korai}$ nyitott állapotú inaktivációját és növeli a $I_{Na,késői}$ inaktivációt, ami végső soron növeli a $[Na^+]_i$-t (189). A Na_v CaMKII általi szabályozása a csatornához való asszociációval és a csatorna fehérjéinek foszforilációjával is történhet (184). Nyulakban a Na_v-k endogén CaMKII általi foszforilációja már fiziológiás Ca^{2+} szintek mellett is előfordul (184). A Na_v-kra gyakorolt hatásokon kívül a CaMKII általi foszforiláció fokozza a protein-kináz A (PKA), az $I_{Ca,L}$ és a szarkoendoplazmatikus retikulum Ca-ATPáz (SERCA) működését, és aktiválja a RyR-t ahogy ezt a 6. ábra B paneljén is láthatjuk (189). A megnövekedett $I_{Na,késői}$ által okozott tartós depolarizáció szintén hozzájárul a sejtek Ca^{2+}-gyarapodásához. Ezek összességében növelik a szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+}-tartalmát és a RyR nyitási valószínűségét, így spontán Ca^{2+}-felszabadulást eredményezhetnek (189).

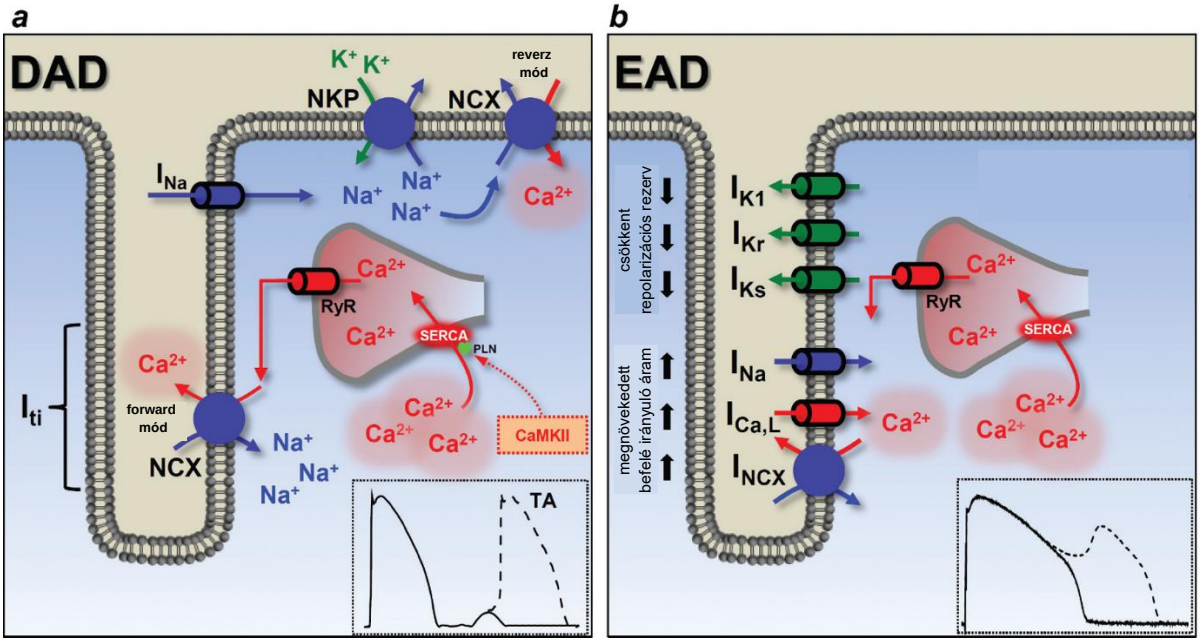
Szívelégtelenségben (mind a humán SZE, mind a SZE állatmodelljében) a CaMKII expressziója és aktivitása megnövekszik, ami proaritmogén lehet (189). Továbbá kimutatták korábban, hogy a citoszolikus CaMKII transzgenikus túltermelése SZE-et indukálhat (189). A CaMKII akut túltermelése fokozza a $I_{Na,késői}$-t és növeli a $[Na^+]_i$-t, lassítja a $I_{Na,korai}$ inaktivációját

és az inaktivációból való visszatérést, miközben az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését Ca^{2+}-függő módon negatívabb membránpotenciálok felé tolja el (184). A CaMKII akut túltermelésének mindezen hatásai a CaMKII gátlásával akadályozhatóak. Wei és munkatársai kimutatták, hogy a CaMKII foszforilációja és a $Na_v1.5$ fehérje expressziója jelentősen megemelkedett a bal kamrában az 1,4-dihidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-(2-[trifluorometil]fenil)piridin-3-karbonsav-metilészter (Bay K8644, Ca^{2+} csatorna aktivátor), és a zöld viaszrózsa (*Anemonia sulcata*) Na_v aktivátor toxinjával („anemone toxin-II", ATX-II) történő kezelés hatására. Ezek a hatások TTX alkalmazásával könnyen visszafordíthatók voltak (189). A Bay K 8644 és az ATX-II egyidejű alkalmazása erőteljesebben növelte az APD-t, és nagy gyakorisággal okozott VT-t (189). Ez a magas $[Ca^{2+}]_i$ és magas $[Na^+]_i$ potenciál közötti szinergikus kapcsolat, amely aritmogén hatású lehet.



6. ábra: *Megnövekedett $I_{Na,késői}$ esetén a ritmuszavarokhoz vezető fiziológiai és patofiziológiai folyamatok vázlatos ábrázolása. a panel: Egészséges szívizomsejtben az excitáció-kontrakció kapcsolata az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció periodikus növelésével és csökkentésével szabályozódik b panel: Ha a $I_{Na,késői}$ megemelkedik, akkor az intracelluláris Na^+ és az ezzel együtt járó Ca^{2+}-túlterhelés aritmiához vezethet. A magas intracelluláris Na^+-koncentráció aktiválhatja a reverz módú NCX-et, hogy tovább töltse a sejtet Ca^{2+}-nal. A Ca^{2+}-túlterhelés és a hosszabb akciós potenciál időtartam proaritmiás eseményekre hajlamosítja a sejtet. A piros nyilak a Ca^{2+}-hoz, míg a kék nyilak a Na^+-hoz kapcsolódó folyamatokat mutatják. A szaggatott vonalak a Ca^{2+}-CaM-CaMKII útvonal foszforilációs célpontjait jelzik.*

Rövidítések: APD: akciós potenciál időtartam; CaM: kalmodulin; CaMKII: kalcium-kalmodulinfüggő protein kináz II; DAD: késői utódepolarizáció; EAD: korai utódepolarizáció; $I_{Ca,L}$: L-típusú Ca^{2+}-áram; $I_{Na,korai}$: Na^+-áram gyors, korai komponense; $I_{Na,késői}$: Na^+-áram perzisztens, késői komponense; NCX: Na^+/Ca^{2+}-cseremechanizmus; NHE: Na^+/H^+-cseremechanizmus; NKP: Na^+/K^+-pumpa; PLN: foszfolambán; PMCA: plazmamembrán Ca^{2+}- ATPáz; RyR: ryanodin receptor; SERCA: szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+}-ATPáz; SV: az akciós potenciál időtartamának rövidtávú beat-to-beat variabilitása.



7. ábra: *A korai és késői utódepolarizáció alapvető mechanizmusai. <u>a panel:</u> A késői utódepolarizáció (DAD) kialakulásában szerepet játszó tényezők. A megnövekedett $[Na^+]_i$ megemeli az $[Ca^{2+}]_i$-t (és a SR Ca^{2+}-tartalmát) a NCX reverz üzemmódba kapcsolásával, ha a NKP funkcionális tartalékát elérte. A CaMKII foszforilálja a foszfolambánt, ami szintén növeli a SR Ca^{2+}-tartalmát. A magas SR Ca^{2+} szint a ryanodin receptorokon keresztül spontán Ca^{2+} felszabadulást okoz. Ez az abnormális Ca^{2+} jelátvitel a NCX-t forward üzemmódba kapcsolja, így létrehozva egy tranziens befelé irányuló áramot, mely a felszíni membránt depolarizálva egy kiváltott aktivitáshoz (TA) vezethet. Ez általában nagy frekvenciánál és a diasztolé alatt történik. A membránpotenciál felvétel a jobb alsó sarokban egy tipikus DAD-ot mutat, a szaggatott vonal pedig a DAD következtében egy kiváltott aktivitást (TA) jelöl. <u>b panel:</u> Korai utódepolarizáció (EAD) akkor következik be, amikor a kifelé irányuló áramok csökkennek (csökkent repolarizációs rezerv) és/vagy a befelé irányuló áramok fokozódnak. A $I_{Na,késői}$ elősegíti a EAD keletkezését a platófázis alatti $I_{Ca,L}$ reaktiválása, a NCX aktiválódása és a SR Ca^{2+} túlterhelése során. A membránpotenciál felvétel szaggatott vonallal egy tipikus EAD-ot mutat a jobb alsó sarokban.*

<u>Rövidítések:</u> EAD: korai utódepolarizáció; DAD: késői utódepolarizáció; $I_{Ca,L}$: L-típusú Ca^{2+}-áram; I_{K1}: befelé egyenirányító K^+-áram; I_{Kr}: késői egyenirányító K^+-áram gyors komponense; I_{Ks}: késői egyenirányító K^+-áram lassú komponense; I_{Na}: Na^+-áram; I_{NCX}: Na^+/Ca2 $^+$-cserélő áram; I_{to}: tranziens kifelé irányuló áram; NKP: Na^+/K^+-pumpa; RyR: ryanodin receptor; SR: szarkoplazmatikus retikulum; SERCA: szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+}-ATPáz; TA: kiváltott aktivitás.

A DAD-k mellett korai utódepolarizációk (EAD) is létrejöhetnek abnormális Na_v működés esetén (7. ábra b panel). A $I_{Na,korai}$ lassabb inaktivációja esetén az APD meghosszabbodik, ami hajlamosítja a sejtet EAD-k keletkezésére. EAD-knak több altípusa létezik (2. fázisú, 3. fázisú és késői 3. fázisú EAD), de általában a terminális repolarizáció előtt jelentkeznek. A legtöbb esetben egy hosszabb AP (a késői 3. fázisú EAD kivételével) lehetővé teszi az $I_{Ca,L}$ számára, hogy az inaktivációból visszatérjen, ami pozitív visszacsatolási hurkot generál, ami további

AP-okat vált ki . Fontos megjegyezni, hogy a CaMKII aktiválódása is hozzájárulhat az $I_{Ca,L}$ újra aktiválódásához (189). Kimutatták azonban, hogy az SR Ca^{2+} terhelése és az ezzel együtt járó spontán Ca^{2+} felszabadulás, az NCX által szállított befelé irányuló depolarizáló áram és a reaktiválódott I_{Na} is felelős az EAD-k generálásáért (189). Két lehetséges mechanizmust javasoltak a $I_{Na,késői}$ által generált EAD magyarázatára: az egyik a SR Ca^{2+} túlterhelése, a másik az AP plató fázisa alatt történő $I_{Ca,L}$ újra aktiválódása (171). Tengerimalac szívizomsejteken végzett kísérleteink azt mutatták, hogy a $I_{Na,késői}$ által kiváltott EAD-kat spontán SR Ca^{2+} felszabadulás közvetíti, mivel az EAD első előfordulása megelőzi az $I_{Ca,L}$ ablakáram feszültségtartományát, ezért az $I_{Ca,L}$ reaktiválódása kevésbé valószínű (35).

LQTS-3 betegeknél kimutatták, hogy az SCN5A egy funkciónyeréses mutációja a $I_{Na,késői}$ megnagyobbodását eredményezte (189). A mutáció a $I_{Na,késői}$ növekedése mellett a $[Na^+]_i$ és a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedését is okozta, ami a NCX forward módjának csökkenésével és a reverz mód aktivitásának növekedésével járt együtt (189). Más vizsgálatok magas SR Ca^{2+}-tartalmat és spontán diasztolés Ca^{2+}-tranzienseket mutattak ki LQTS-2 mutáns egerek izolált szívizomsejtjeiben (189).

Korábban kutatócsoportunk létrehozta az APD relatív rövidtávú beat-to-beat variabilitásának (RSV) fogalmát, amely új megközelítés lehet az aritmiák előrejelzésére (189). Ezekben a kísérleti elrendezésekben a magasabb RSV-t aritmogénebbnek tekinthetjük. Kísérleteink azt mutatták, hogy a Na^+-áram növekedése az APD nagyobb ingadozását okozza, ami összhangban van a $I_{Na,késői}$ proaritmiás szerepével. A SV hasonló növekedését figyelték meg Ca^{2+}-túlterheléses körülmények között és olyan helyzetekben, amikor a repolarizációs rezerv sérült (90).

A $I_{Na,késői}$ közvetlenül vagy közvetve szabályozható Ca^{2+}, CaM és CaMKII által. Általában a magasabb $[Ca^{2+}]_i$ eltolja a Na^+ áram egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését pozitívabb feszültségek felé, és növeli a csatornák ingerelhetőségét pozitívabb potenciálokon (15,35,140). Következésképpen a $[Ca^{2+}]_i$ pufferelésének csökkentenie kell a $I_{Na,késői}$-t. Kutatócsoportunk kísérletei azonban azt mutatták, hogy a $I_{Na,késői}$-t inkább az AP alakja és feszültségprofilja befolyásolja, mint maga a Ca^{2+} (35). Másrészt a CaMKII gátlása sikeresen megakadályozta a katekolamin által kiváltott spontán Ca^{2+} hullámokat, DAD-kat és EAD-kat, miközben javította a kontraktilis funkciót több kísérletsorozatban is (189). Sajnos a CaMKII célzott modulációja antiaritmiás lehetőségként meglehetősen nehéz, figyelembe véve a rendkívül összetett jelátviteli hálózatát.

Nemrégiben kimutatták, hogy a cAMP által közvetlenül aktivált cserefehérje (Epac) gátlása EAD-kat indukálhat (189). A mechanizmus magában foglalja a CaMKII oxidatív aktiválódását, amely a celluláris reaktív oxigén gyökök (ROS) és a $I_{Na,késői}$ növekedéséhez továbbá az APD meghosszabbodásához vezet. A CaMKII ROS általi aktiválódása foszforilálja a RyR-t és a $Na_v1.5$-t, ami a SR Ca^{2+}-szivárgáshoz vezet a RyR-on keresztül és a $I_{Na,késői}$ fokozódik (189).

Több kutatócsoport is felhívta a figyelmet arra, hogy a $I_{Na,késői}$ szuppressziója akadályozza a Ca^{2+}-túlterhelést (189). A $I_{Na,késői}$ gátlása a $[Na^+]_i$ és a következményes $[Ca^{2+}]_i$ csökkentése révén gátolta a Ca^{2+}-függő triggerelt aktiválódást. A $I_{Na,késői}$ gátlása helyreállíthatja továbbá a depolarizáló és repolarizáló áramok közötti megbomlott egyensúlyt is (165).

2.20. A megnövekedett $I_{Na,késői}$ és $[Na^+]_i$ aritmogén következményei

Számos öröklött és szerzett betegség vezethet a kamrai repolarizáció megnyúlásához, amelyet hosszú QT-szindrómaként (LQT) ismerünk (190,191). Az öröklött LQT3 szindrómát sokkal lassabban inaktiválódó $Na_v1.5$-k miatt a megnövekedett $I_{Na,késői}$ okozza. A szerzett LQT-szindrómák közé tartozik például a szívelégtelenség (5,75,94), a szívizom iszkémiája és az infarktus utáni állapot (180,192), valamint a 2-es típusú cukorbetegség (193).

Fiziológiás körülmények között finom egyensúly van a befelé és kifelé irányuló áramok között az AP platófázisa alatt. A platófázis alatt a membrán impedanciája nagy, ezért a kényes egyensúlyban bekövetkező kis változás is az AP időtartamának jelentős változásához vezethet. A megnövekedett $I_{Na,késői}$ megnyújtja az AP-t (35,194), valamint a hosszabb AP alatt a $I_{Na,késői}$ nagyobb Na^+ beáramlást fog generálni. Még normális szívben is az APD és a $I_{Na,késői}$ nagyobb a Purkinje rostokban és az "M" sejtekben a szívizom többi részével összehasonlítva, ami hozzájárul a repolarizáció fiziológiás heterogenitásához. Az LQT-szindrómák mind a repolarizáció térbeli heterogenitását (94), mind a repolarizáció időbeli változékonyságát (190) növelik, ezért aritmogén szubsztrátot jelenthetnek. Ezt tovább fokozhatja a bradikardia, ahol az AP-ok már hosszúak, és nagyobb heterogenitással rendelkeznek (90). Szívbetegségek is biztosíthatják a proaritmiás szubsztrátot, „repolarizációs alternáns" formájában (195,196), amely jelenség pedig tachycardia esetén még kifejezettebb.

A trigger szintén erősen függ a kamrai frekvenciától. Alacsony szívfrekvencián, ahol a szív AP-ok már fiziológiás körülmények között is hosszúak, a megnövekedett $I_{Na,késői}$ tovább hosszabbíthatja a repolarizációt, ezért növeli a EAD-ok valószínűségét és a halálos kimenetelű kamrai aritmiák kockázatát (105,107,197–201). A súlyos bradikardia, a fokozott $I_{Na,késői}$ és a hosszú APD együttesen szintén elősegítheti a késői utódepolarizáció (DAD) hatását (5,35,91). Úgy tűnik, hogy ezek a hatások erősen függenek a megnövekedett $[Ca^{2+}]_i$-tól.

Ahogy korábban leírtuk, a megnövekedett $[Na^+]_i$ az NCX-on keresztül csökkenti a Ca^{2+} eltávolítását a citoszolból (40,122,202). Ez megemeli a diasztolés $[Ca^{2+}]_i$-ot és ezáltal növeli az SR Ca^{2+}-tartalmát; ami spontán Ca^{2+} felszabaduláshoz vezet a Ca^{2+}-al túlterhelt SR-ból (203). Ez DAD-kat generálhat, ezzel szívritmuszavarokat kiváltva. Magas szívfrekvencián ezt tovább súlyosbíthatja a CaMKII-t érintő visszacsatolási hurok, ami a RyR2 CaMKII által közvetített fokozott foszforilációját eredményezi, így növelve a spontán SR Ca^{2+} felszabadulás valószínűségét. In vivo a szívfrekvencia emelkedését a β-adrenerg stimuláció biztosítja. Az adrenerg stimuláció egyrészt tovább aktiválja a CaMKII-t (34), másrészt a NKP aktivitásának fokozásával csökkenti a sejtek $[Na^+]_i$ terhelését (134). Ez kérdésessé teszi a $I_{Na,késői}$ szerepét a DAD által közvetített, magas szívfrekvencián fellépő ritmuszavarokban.

A beteg szívben azonban a $I_{Na,késői}$ és a $[Na^+]_i$ frekvenciafüggő tulajdonságai korábban kevéssé vizsgálták. Magas frekvencián az LQT3 ΔKPQ mutáns sejtekben a $I_{Na,késői}$ csökken (88), továbbá egy másik kísérletsorozat során megnövekedett $[Na^+]_i$ terhelést találtak hipertrófiás macskasejtekben (204), valamint a szívelégtelenségből származó humán szívizomsejtekben (176).

2.21. Klinikai vizsgálatok - antiaritmiás gyógyszerfejlesztés

Mivel a $I_{Na,késői}$, a $[Na^+]_i$ és a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése aritmogén, ezért ilyen körülmények között hatékony antiaritmiás kezelésre van szükség. Kézenfekvő cél lehet a Na_v-k gátlása. A CAST és SWORD vizsgálatok kiábrándító eredményei azonban egyértelművé tették, hogy egyetlen ioncsatorna specifikus gátlása önmagában váratlan káros hatásokat eredményezhet. Az utóbbi időben inkább olyan szelektív inhibitorok iránti igény merült fel, amelyek képesek a $I_{Na,késői}$-ot gátolni anélkül, hogy a $I_{Na,korai}$-ra jelentős hatásuk lenne. A szelektivitás rendkívül fontos, mivel az áram korai komponensének blokkolása a vezetési sebesség csökkenéséhez, így vezetési blokkhoz és „reentry aritmiákhoz" vezethet (205–207).
Eddig számos inhibitort fejlesztettek ki, többek között ranolazint, eleklazint (GS-6615), lidokaint, GS-458967, GS-462808 és F15845-öt, azonban legtöbb kísérleti és klinikai vizsgálathoz elsősorban ranolazint használtak. Ezekkel az inhibitorral az a fő probléma, hogy feszültségfüggő módon működnek, szelektív $I_{Na,késői}$ gátló hatásukat főként a fiziológiásnál alacsonyabb membránpotenciálon fejtik ki és gátló hatásuk függ az ingerlési frekvenciától. Mivel a nátriumáram gátlása az ingerlési frekvenciával együtt nő, így ezek a szerek kisebb hatást gyakorolnak a $I_{Na,késői}$-ra bradikardiában, amikor a $I_{Na,késői}$ feltételezhetően jelentősen nagyobb (208), mint tachykardiában.

2.22. $I_{Na,késői}$, mint antiaritmiás terápiás célpont

2.22.1. Nátriumcsatorna-gátlók

Többféle peptid és nem peptid szerkezetű természetes vegyület gátolhatja a Na_v-kat, bár ezek terápiás jelentősége elhanyagolható. A klinikailag releváns kismolekulájú Na_v-gátlók közé tartoznak a helyi érzéstelenítők, a görcsoldók és az antiaritmiás szerek, mint például a lidokain, a karbamazepin, a fenitoin, a lamotrigin és a mexiletin. Ezek a kismolekulájú inhibitorok a Na_v-k úgynevezett "helyi érzéstelenítő kötőhelyéhez" kötődnek, ahol az aminosav oldalláncok nagyon hasonlóak a különböző Na_v-altípusokban (46). Emiatt a "klasszikus" Na_v-blokkolók nem altípus-specifikusak, bizonyos mértékig minden altípust gátolnak. Emellett ezek a vegyületek némileg gátolják mind a $I_{Na,korai}$, mind a $I_{Na,késői}$-t, általában a $I_{Na,késői}$-ra gyakorolnak nagyobb gátló hatást. Ezért a legtöbb Na_v-blokkoló az ingerlékenységet és az impulzus terjedését (a $I_{Na,korai}$ -hoz kapcsolódó paraméterek) a plató nátriumárammal ($I_{Na,késői}$) együtt csökkenti.

2.22.2. Szelektív $I_{Na,késői}$ gátlók

Néhány Na_v-blokkoló különbözik a "klasszikus" gátlóktól, mivel a $I_{Na,késői}$-ot hatásosabban gátolják, mint a $I_{Na,korai}$ -ot. A specifikus $I_{Na,késői}$ gátlás molekuláris mechanizmusa még mindig nem teljesen tisztázott. Bár a legtöbb kísérletes és klinikai vizsgálatban ranolazint használtak, más szelektív $I_{Na,késői}$ gátlók is léteznek, mint például a GS-458967, a GS-462808, az F15845 és a GS-6615 (eleklazin). Ezen inhibitorok késői és korai nátriumáram-komponensre vonatkozó félmaximális gátló koncentrációjának (IC_{50}) értékeit az 1. táblázat foglalja össze.

Anyag	IC_{50} érték		Referencia
	$I_{Na,késői}$	$I_{Na,korai}$	
Lidokain	6 μM	294 μM	Antzelevitch és mtsai., 2014 (209)
Ranolazin	17 μM	1329 μM	Belardinelli és mtsai., 2013 (26)
	6,46 μM	244 μM	Undrovinas és mtsai., 2006 (25)
GS-458967	333 nM	<15 % blokk	Koltun és mtsai., 2016 (210)
	130 nM	7,5 % redukció 10 μM-nál	Belardinelli és mtsai., 2013 (26)
GS-462808	1,9 μM	10 % redukció 10 μM-nál	Koltun és mtsai., 2016 (211)
GS-6615	0,62 μM	51 μM	Zablocki és mtsai., 2016 (212)
F15845	3,25 μM	23 % redukció 10 μM-nál	Vacher és mtsai., 2009 (213)

1.táblázat: *Nátriumcsatorna blokkolók fél maximális gátló koncentrációja (*IC_{50}*) a feszültségfüggő nátriumáram késői és korai komponenseinél.*

Ezeknek a specifikus $I_{Na,késői}$ gátlóknak a szelektivitása általában feszültségfüggő, negatívabb (meglehetősen afiziológiás, például -120 mV) tartófeszültségen alig van hatásuk a $I_{Na,korai}$ -ra. Ahogy a tartófeszültség egyre közelebb kerül a fiziológiás RMP-hoz, e vegyületek szelektivitása csökken, egyre inkább gátolják a $I_{Na,korai}$ -ot is. Emellett a legtöbb inhibitor a Na_v-kat frekvenciafüggő módon blokkolja; minél gyorsabb az ingerlési frekvencia, annál hatékonyabbak. Ennek az az oka, hogy a legtöbb gátlószer inkább a nyitott és/vagy inaktiválódott csatornákhoz kötődik és a zárt csatornához kevésbé. Ez a hatás különösen erős a gyors asszociációs és disszociációs kinetikával rendelkező Na_v-blokkolóknál, például a Vaughan-Williams I.B osztályú szereknél (208).

2.22.3. A nem-szív nátriumcsatorna-gátlók, mint potenciális antiaritmiás szerek

A riluzolról kimutatták, hogy gátolja sérült neuronoknál a TTX-érzékeny Na_v-kat (214), továbbá közvetlenül gátolja a kainát- és N-metil-d-aszparaginsav (NMDA) receptorokat is (215), valamint serkenti a $GABA_A$-receptorokat (216). Korábbi kísérletekben az altatott sertésekben a koszorúér-elzáródás által kiváltott szívizomkárosodást és az aritmiát is csökkentette (217). A riluzol antiiszkémiás és antiaritmiás hatásúnak bizonyult az akut miokardiális infarktus sertésmodelljében is (218).

A $Na_v1.8$ specifikus inhibitorokkal történő célzott kezelése a jövőben potenciális új megközelítést jelenthet az antiaritmiás gyógyszeres terápiában, mivel a közelmúltban végzett vizsgálatok szerint a $Na_v1.8$ expressziója jelentősen megnő humán bal kamrai hipertrófiában (187) és SZE-ben (188). $Na_v1.8$-specifikus blokkolók (30 nM A-803467 vagy 1 μM PF-01247324) alkalmazásával sikerült csökkenteniük a $I_{Na,késői}$-ot és rövidíteni az AP-t (187,188).

2.23. Ranolazin

A legkiterjedtebben vizsgált szelektív $I_{Na,késői}$ gátló a ranolazin. A ranolazin a $I_{Na,késői}$ gátlásával csökkenti a Na^+-függő Ca^{2+}-túlterhelést (219). Ez a vegyület gátolja a késői egyenirányító K^+ áram gyors komponensét (I_{Kr}), az $I_{Ca,L}$ -ot és a NCX reverz módját (7,102,220) is. Az $I_{Ca,L}$–ra és az NCX-re gyakorolt hatások azonban főként a gyógyszer terápiás tartományán kívül esnek. A ranolazin gyenge β-adrenerg agonista is (221), míg a vérnyomásra

és a szívfrekvenciára minimális hatást gyakorol (222). Továbbá a ranolazin csökkenti a SV-t (25). A ranolazin kifejezettebben gátolja a $I_{Na,korai}$-ot részlegesen depolarizált membrán esetén, illetve magasabb ingerlési frekvencián (223,224). Alacsony ingerlő frekvenciáknál a $I_{Na,késői}$ gátlása sikeresen csökkentette az aritmiás eseményeket, például a EAD-kat, a DAD-kat vagy a TdP-t a különböző kísérleti elrendezésekben (5,26,35,143,220,225,226). A ranolazin csökkentette a repolarizáció diszperzióját (227), a EAD és a TdP előfordulását (143,228) más kísérleti elrendezésben. A repolarizáció diszperzióját a midmiokardiális sejtek APD-ának rövidülése okozza, ebben a $I_{Na,késői}$-nak van az egyik legjelentősebb szerepe. LQT3 szindrómás betegekben a ranolazin csökkentette (229), míg egy másik vizsgálatban az I_{Kr}-blokád miatt növelte a QT-intervallumot (230).

A ranolazin szintén feszültség-, és használatfüggő módon gátolta a Na_v-kat, ráadásul ez a gátlás is szignifikánsan nagyobb volt a pitvarokban, mint a kamrákban (223). 50 ms hosszú depolarizáló impulzusok és 250 ms diasztolés intervallumok (3,33 Hz-en) esetén a ranolazin által okozott használatfüggő blokk -120 mV-nál 21% volt a kamrai, míg 32% a pitvari sejtekben, míg -100 mV-nál a blokk 47%-ra, illetve 56%-ra változott. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a frekvenciafüggés nagyon kifejezett a $I_{Na,korai}$ gátlás esetén, de sokkal kisebb a $I_{Na,késői}$ gátlás esetén. A $I_{Na,korai}$ és a $I_{Na,késői}$ frekvenciafüggő élettani és farmakológiai jellemzői alapján a $I_{Na,késői}$ meglehetősen szelektív gátlását lehet elérni lassú szívfrekvencián és hosszú AP-ok esetén, de gyors szívfrekvencián és rövid AP hossz esetén a Na_v-blokkolók hasonlóan gátolják mind a $I_{Na,korai}$, mind a $I_{Na,késői}$ működését.

A ranolazinnal kapcsolatban az 1990-es években publikálták az első biztató eredményeket a fázis 2 klinikai vizsgálatokból (231,232). A MARISA (233), CARISA (234) és ERICA (235) vizsgálatok eredményeit követően 2006-ban az Amerikai Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet a ranolazint angina ellenes szerként engedélyezte.

A MERLIN TIMI-36 vizsgálatban (236) 6500, nem ST-elevációval járó akut koronária szindrómában szenvedő betegnél vizsgálták a ranolazin terápia klinikai kimenetelre és biztonságosságra gyakorolt hatását. Bár a kardiovaszkuláris halálozást és a miokardiális infarktust nem csökkentette szignifikánsan a standard terápiához képest; de a visszatérő iszkémia (236) és az aritmiák előfordulása (237) szignifikánsan alacsonyabb volt a ranolazinos csoportban. A ranolazinnal történő kezelés a ritmuszavarok szignifikánsan alacsonyabb előfordulását eredményezte a placebó csoporthoz képest.

A kettős vak HARMONY (ClinicalTrials.gov ID: NCT01522651) 2. fázisú vizsgálatba (238) paroxizmális PF-ban szenvedő, beültetett pacemakerrel rendelkező betegeket vontak be, így a PF súlyosságát folyamatosan nyomon lehetett követni a 12 hetes kezelési időszak alatt. A betegeket 4 randomizált csoportra osztották az első csoport placebo-t kapott, a második csoport 750 mg ranolazin-t naponta kétszer, a harmadik csoport 225 mg dronedaront és a negyedik csoport 750 mg ranolazint 225 mg dronedaronnal kombinálva. A kombináció lényege az volt, hogy a ranolazin adagolása mellett csökkenteni lehessen a dronedaron dózisát, és ezáltal a dronedaronhoz társuló negatív inotróp hatást. A placebo vagy a gyógyszerek önmagukban nem csökkentették szignifikánsan az PFT-t. A kombinációs terápia azonban 59%-kal csökkentette az PFT-t a placebóval szemben.

A RAFFAELLO 2. fázisú vizsgálatba (239) perzisztens PF-ban szenvedő (legalább 7 napja és legfeljebb 6 hónapja) betegeket vontak be. Két órával a sikeres elektromos kardioverziót követően a résztvevők vagy placebót vagy 375 mg, 500 mg, illetve 750 mg ranolazint kaptak

randomizált módon. A betegeket naponta monitorozták transztelefonos EKG-val. Az elsődleges végpont a legújabb PF megjelenéséig eltelt idő volt. A ranolazin egyik dózisa sem növelte meg szignifikánsan a PF kiújulásáig eltelt időt a placebóhoz képest. A placebo csoportba tartozó betegek 56,4%-ában újult ki a PF. Ez 56,9% volt a 375 mg ranolazinos csoportban, 41,7% az 500 mg ranolazinos, míg 39,7% volt 750 mg ranolazinos csoportban.

A RAID klinikai vizsgálat (NCT01534962) olyan nagy kockázatú kardiomiopátiás betegeket vizsgált, akik beültethető kardioverter-defibrillátort (ICD) kaptak (240). Az alanyok vagy ranolazint (1000 mg naponta kétszer) vagy placebót kaptak. Az elsődleges végpont az ICD sokkot igénylő VT vagy VF volt vagy a halál bekövetkezte. Az 1012 ICD-os beteg körében a ranolazin és a placebo közötti kockázati arány 0,84 (95%-os konfidenciaintervallum: 0,67-1,05; p=0,117) volt az elsődleges végpont tekintetében. A ranolazin kezelés egyéb hatásai azonban nem voltak szignifikánsak. Ezek közé tartoztak az elsődleges végpont egyes komponensei: az életminőség, a kardiológiai kórházi kezelések és a nem megfelelő ICD-sokkok is.

A RAND-CFR vizsgálat (NCT01754259) egy kisebb csoportjában diffúz ateroszklerózissal és/vagy mikrovaszkuláris diszfunkcióval rendelkező cukorbetegek vettek részt (241). Itt a ranolazin T-hullám heterogenitásra gyakorolt hatását vizsgálták. Fizikai nyugalomban a ranolazin csoportban a T-hullám heterogenitás 28%-kal kisebb volt. Terhelés során azonban a ranolazin adás alatt mért értékek szignifikánsan nem különböztek a placebo csoporttól. A vizsgálat arra is rávilágított, hogy a repolarizációs eltérések csökkenése látszólag független volt a szívizom véráramlásában bekövetkező változásoktól.

Nyolc randomizált klinikai vizsgálat metaanalízisében Gong és munkatársai megállapították, hogy a ranolazin szignifikánsan csökkenti a PF előfordulását különböző klinikai körülmények között (242), például akut koronária szindróma (ACS), szívműtét és a PF elektromos kardioverzióját követően (relatív kockázat=0,67, 95%-os konfidenciaintervallum: 0,52-0,87, p=0,002). Továbbá a ranolazin és az amiodaron együttes alkalmazása egyrészt 1,23-szor magasabb PF-konverziós arányt mutatott, valamint szignifikánsan, mintegy 10 órával rövidebb konverziós időt eredményezett a kizárólag amiodaron alkalmazásához képest.

A fenti bizonyítékok alapján a ranolazinnak terápiás szerepe lehet a pitvari és kamrai eredetű szívritmuszavarok kezelésében. További 3. fázisú klinikai vizsgálatokra van szükség a gyógyszerben rejlő lehetőségek további kihasználására.

2.24. Eleklazin (GS-6615)

A ranolazin mellett eddig az eleklazin volt az egyetlen szelektív $I_{Na,késői}$ gátló gyógyszerjelölt, amely eljutott a 3. fázisú klinikai vizsgálatokig. Az első vizsgálatban az eleklazin biztonságosságát, tolerálhatóságát és a QT-intervallum rövidülésre gyakorolt hatását vizsgálták LQT3-szindrómás betegeknél. 24 hét elteltével a naponta átlagolt korrigált QT-intervallum szignifikánsan (8,5 ms) rövidebb volt, mint a kiindulási érték. A vizsgált populációban csak egy betegnél fordult elő súlyos mellékhatás vesekövesség formájában. Kimutatták, hogy az eleklazin gyors kinetikával kötődik a Na_v-khoz, minimális hatással van más ionáramokra és kedvezőtlen mellékhatások nélkül blokkolja a $I_{Na,késői}$-ot (243). Az eleklazin rövidítette az APD-t és a QT-intervallumot, csökkentette a repolarizáció térbeli és időbeli eloszlását és elnyomta az adrenalin által kiváltott VT-t (244).

A másik vizsgálat (LIBERTY-HCM) hipertrófiás kardiomiopátiában szenvedő betegeket célzott meg, ahol az eleklazin fizikai terhelhetőségre gyakorolt hatását vizsgálták. Ebben a vizsgálatban az eleklazin nem bizonyult jobbnak a placebóhoz képest (245). Az eleklazin legutolsó tesztelése a 2. fázisú TEMPO vizsgálat során történt. A vizsgálatban VT/VF-ban szenvedő és ICD-ral rendelkező alanyok vettek részt. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy az ICD-sokkok aránya magasabb volt az eleklazinos csoportban a placebó csoporthoz képest. 2016 végén az eleklazin további fejlesztését minden indikációra vonatkozóan leállították.

3. Célkitűzés

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

1. Mivel a kutya kamrai szívizomsejteket általában a humán kamrai sejtek jó modelljének tartják elektrofiziológiai szempontból (52,75,94,149,227), ezért szerettük volna rögzíteni és összehasonlítani a $I_{Na,késői}$ AP alatti profilját kutya-, tengerimalac- és nem beteg emberi szívből nyert kamrai sejtekben. Ezzel egy lépést szerettünk volna tenni a kísérletes kardiológia azon célja felé, hogy keressünk egy olyan állatmodellt, amely helyettesítheti az igen korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló humán kamrai szövetmintákat.
2. A jelen disszertációban bemutatott kísérletek során APVC technikát használtunk a $I_{Na,késői}$ profiljának közvetlen rögzítésére az AP alatt a sejtek normál Ca^{2+} homeosztázisa során. Ezáltal meg szerettük volna jobban érteni a késői nátriumáram bal kamrai szívizomsejtek elektrofiziológiai tulajdonságainak kialakításában játszott szerepét.
3. Vizsgálni szerettük volna továbbá, hogy a Na_v-k inaktivációját megakadályozó Anemone toxin II (ATX-II) hogyan változtatja meg a $I_{Na,késői}$ AP alatti profilját.
4. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a $I_{Na,késői}$ milyen szerepet tölthet be szívritmuszavarok kialakításában.
5. Meg szerettük volna vizsgálni, hogy a $I_{Na,késői}$ gátlása megvalósítható-e a $I_{Na,korai}$-tól teljesen függetlenül.
6. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy élesen különbözik-e a szelektívnek mondott $I_{Na,késői}$ gátlószerek, illetve az „általános” I/B osztályú Na_v gátlószerek esetén leírt frekvenciafüggő $I_{Na,késői}$ gátlás.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált preparátumok

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

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

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

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

4.1.1 Szívizomsejtek izolálása

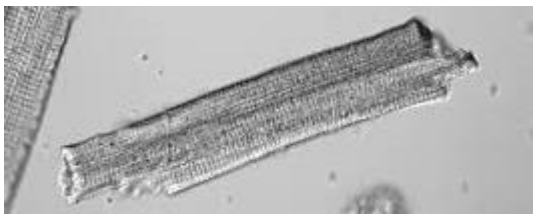
A kutyák mellkasának megnyitását követően a szívet gyorsan eltávolítottuk, majd ezt követően a bal elülső leszálló koronária ágat (LAD) kanüláltuk, és ezen keresztül perfundáltuk a szívizomzatot Langendorff apparátus alkalmazásával. Az emberi sejtizolálás során is az úgynevezett anterográd szegmens-perfúziós technikát alkalmaztuk (246,247).

A perfúziót megkezdve 5 percig Ca^{2+}–mentes, taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l) és NaH_2PO_4-tal (200 mg/l) Joklik által módosított oldatot (JMM, Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, termékszám: M0518; Sigma) alkalmaztunk, amellyel a szövet Ca^{2+} és vértartalmát távolítottuk el.

Ezután a preparátumot nagyjából 30 percig perfundáltuk ismét a JMM alapoldattal. Ezt az oldatot kiegészítettük még kollagenázzal (660 mg/l, 325 U/mg, Type II.), borjú albuminnal

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

A sejtizolálás végezte után két-három órával kezdtük el a méréseket. Felhasználásig a sejteket 14-16 °C-on tároltuk, Minimum Essential Medium Eagle oldatban (pH=7,4).
A tengerimalacok szívét az aortánál fogva Langendorff apparátusra rögzítettük, majd Tyrode oldattal (NaCl 135 mM, KCl 5.4 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, NaH_2PO_4 0.3 mM, HEPES 10 mM, glükóz 10 mM; pH=7.2 [NaOH]) 3-5 percig átmostuk. Ezt követően kalciummentes, 0,05 mM EGTA-val kiegészített Tyrode oldattal perfundáltuk a szívet 3 percig. Végül 25-30 percig kollagenázt (600 mg/l, 298 U/mg, Type II.) és proteázt (50 mg/l, Type XIV) tartalmazó, kalciummentes Tyrode oldattal történő perfúzió következett enzimatikus emésztés céljából. Ennek végeztével a bal kamrát apró darabokra vágtuk, majd a legutóbb leírt, kollagenázt és proteázt is tartalmazó oldatban inkubáltuk további 40, 60, illetve 80 percig 37 °C-on, hogy megkapjuk a 8. ábrán szemléltetett izolált bal kamrai szívizomsejteket. Az inkubációs periódus végeztével a sejtszuszpenziót átmostuk és módosított, bikarbonátot is tartalmazó Tyrode oldatba (121 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,3 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM glükóz; pH=7,35; továbbiakban: BTy) helyeztük. A BTy oldat ozmolalitása 300±3 mOsm volt. A sejtszuszpenziót felhasználásig szintén 14-16 °C-on tároltuk.



8. ábra: *Izolált kutyából származó bal kamrai szívizomsejt az emésztési és szűrési protokollt követően, mikroszkóp alatt vizsgálva. A kísérletekre legmegfelelőbb sejt éles szélű, téglalap alakú, tiszta citoplazmát és ép harántcsíkolatot mutat.*

4.2. Elektrofiziológiai mérések

Valamennyi kísérletünk kezdetekor a szívizomsejteket (vagy multicelluláris preparátumokat) megfelelő 0,5 ml térfogatú plexiüveg mérőkádba helyeztük, melyet egy invertált mikroszkóp (Nikon Eclipse TE2000-U vagy Diaphot 300) tárgyasztalába építettünk. A mikroszkópot egy rezgésmentes asztallal és Faraday-kalitkával együtt használtuk. A mérőkádat folyamatos 1-2 ml/perc sebességgel BTy oldattal perfundáltuk gravitáció-vezérelt perfúziós rendszerrel a mérések közben. Az ettől eltérő összetételű oldatokat az egyes fejezetekben külön említem. A mérőkádban levő oldatok hőmérsékletét egy

hőmérsékletszabályzó (Cell MicroControls) segítségével állandó 37 °C hőmérsékleten tartottuk. Ennek az oldatnak az ozmolalitása 300 ± 3 mOsm volt. Ezt gőznyomásos ozmométerrel (Vapro 5520) ellenőriztük. Az oldatok pH-ját megfelelő mennyiségű HCl és NaOH (extracelluláris oldatok esetén) vagy KOH (intracelluláris oldatok esetén) hozzáadásával Orion 3 Star pH mérő készülék segítségével állítottuk be a kívánt értékre. BTy esetében a pH:7,35 volt, míg az intracelluláris oldatok esetében a pH-t 7,3 és 7,2-re állítottuk. Az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez legtöbbször Multiclamp 700A és 700B erősítőket használtunk a 9. ábrán feltüntetett elrendezésben. Ettől eltérő esetben a mérőműszert külön részletezve említem a szövegben. A számítógépes vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 10.0 szoftvert alkalmaztunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot Digidata 1440A vagy 1332 analóg-digitális jelátalakító teremtette meg.

4.2.1. Patch-clamp technika

A mérésekhez 2-3 MΩ ellenállású boroszilikát mikroelektródákat (patch pipetta) használtunk. A patch pipettákat és a hegyes mikroeletródákat egyaránt a P-2000 típusú pipettahúzó segítségével készítettük el. Működési elvüket tekintve a piacon a platina vagy nikkel-króm filamenttel, illetve CO_2 lézerrel működő termékek kaphatóak. A P-2000-es típus lézerrel működik, ezért boroszilikát és kvarcüveg megmunkálására is képes. A piacon ez az egyik legkisebb hegyet előállító készülék, ezért esett erre a választásunk. A hegyes elektródáról és a patch-pipettáról készült képeket a 9. ábrán tüntettük fel.

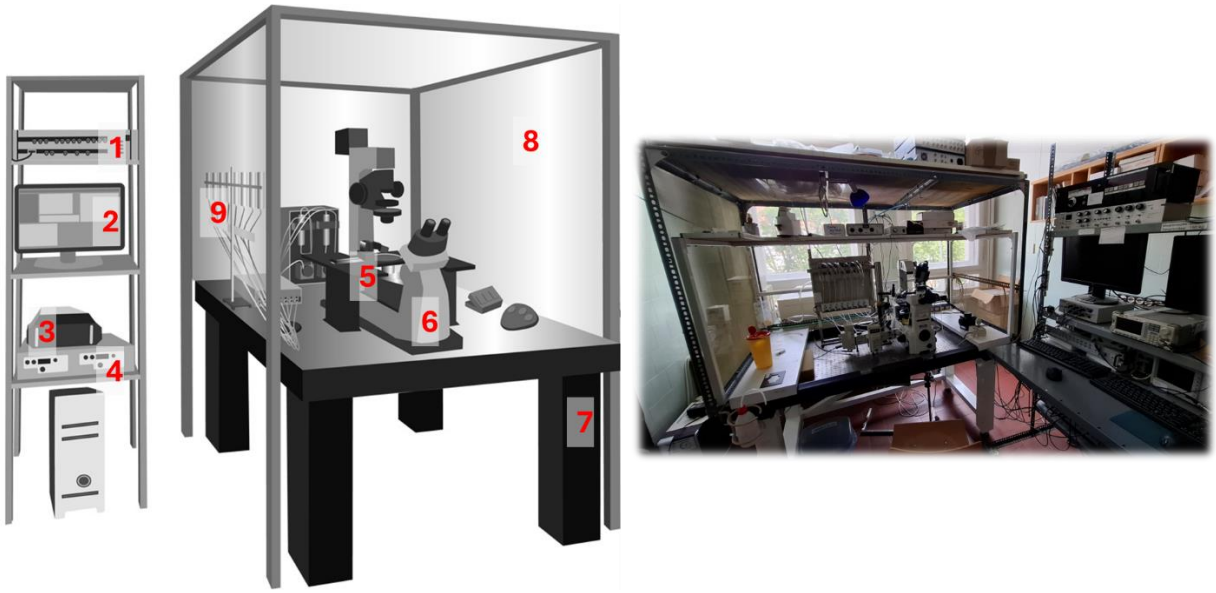
9. ábra *A CO_2 lézerrel működő pipettahúzó ábrázolása, jobb felül egy patch pipetta, míg jobb alul egy hegyes mikroelektróda az elkészítést követően.*

Az általánosan használt pipettában levő belső oldatunk az alábbi anyagokat tartalmazta: 120 mM K-aszpartát, 30 mM KCl, 3 mM MgATP, 10 mM HEPES, 3 mM Na_2-foszfokreatin, 0,01 mM EGTA, 0,002 mM cAMP, 10 mM KOH; pH=7,3. Az intracelluláris oldatok ozmolaritása: 285 ± 3 mOsm volt. Amely kísérleteknél az eredeti oldat módosítását alkalmaztunk, ott ezt külön feltüntetem a szövegben. A legtöbb kísérletnél nem, vagy csak minimális mennyiségben használtunk kalcium-kelátort. Szerettünk volna a fiziológiáshoz minél közelebbi állapotot elérni és szükségünk volt a sejtek folyamatos összehúzódásának

biztosítására. Ezért használtunk az intracelluláris oldatban az ATP-t és a foszfokreatint is. A sejtek in vivo működését szerettünk volna leutánozni a lehető legmegfelelőbben. Az ATP-nek számottevő hatása van a feszültségfüggő áramok amplitúdójára és kinetikájára, ezért szerettük volna ezt standardizálni (248). Ezen kívül az ATP-függő K+-áramot is befolyásolhatja az ATP (249).

A pipetta hegyét a sejt felszínéhez érintve enyhe szívást alkalmaztunk, ezáltal egy nagyellenállású kapcsolat (2–8 GΩ; úgynevezett „gigaseal") alakulhatott ki. A gigaseal kialakulása után további szívással, vagy 1–5 ms hosszú 1,5 V nagyságú elektromos impulzusok használatával törtük át a pipetta hegye alatti membrándarabot, hogy elérjük az egészsejtes elrendezést (250). A sejtek membránfelületének kapacitását minden kísérlet előtt 10 ms hosszú, −10 mV-ról −20 mV-ra történő hiperpolarizáció segítségével mértük meg, és az ionáramokat az így kapott sejtkapacitásra vonatkoztattuk. A mérési elrendezés teljes soros ellenállása átlagosan 3-8 MΩ volt, melyet 50–80 %-ban kompenzáltunk szükség esetén.

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



10. ábra: *Az APVC méréseknél alkalmazott kísérleti elrendezés sematikus ábrája. A sejteket plexiüveg mérőkádba helyeztük (5), melyet egy invertált mikroszkóp (6) tárgyasztalába építettünk. A mikroszkópot egy rezgésmentes asztallal (7) és Faraday-kalitkával (8) együtt használtuk. A szívizomsejtekből elvezetett áramjelet egy erősítő (1), majd egy analóg-digitális jelátalakító (4) továbbítja a számítógéphez (2). A munkát a gravitáció-vezérelt perfúziós rendszer (9) és a hőmérsékletszabályzó (3) is segítette. A jobb oldali fotó a laborunkban készült.*

4.2.2 Akciós potenciálok elvezetése egyedi szívizomsejtekről

A patch-clamp technika teljes sejtes elrendezésében, áram-clamp üzemmódban a sejteket folyamatosan 2 ms szélességű négyszög alakú impulzusok alkalmazásával ingereltük. Az áramimpulzusok amplitúdóját a küszöbinger 150 %-ára állítottuk, hogy az ingerlő jel és az AP felszálló szára jól elkülönüljön egymástól. Az AP-okat 100 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk és tároltuk a későbbi értékelésig.

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

4.2.3. Akciós potenciál feszültség-clamp

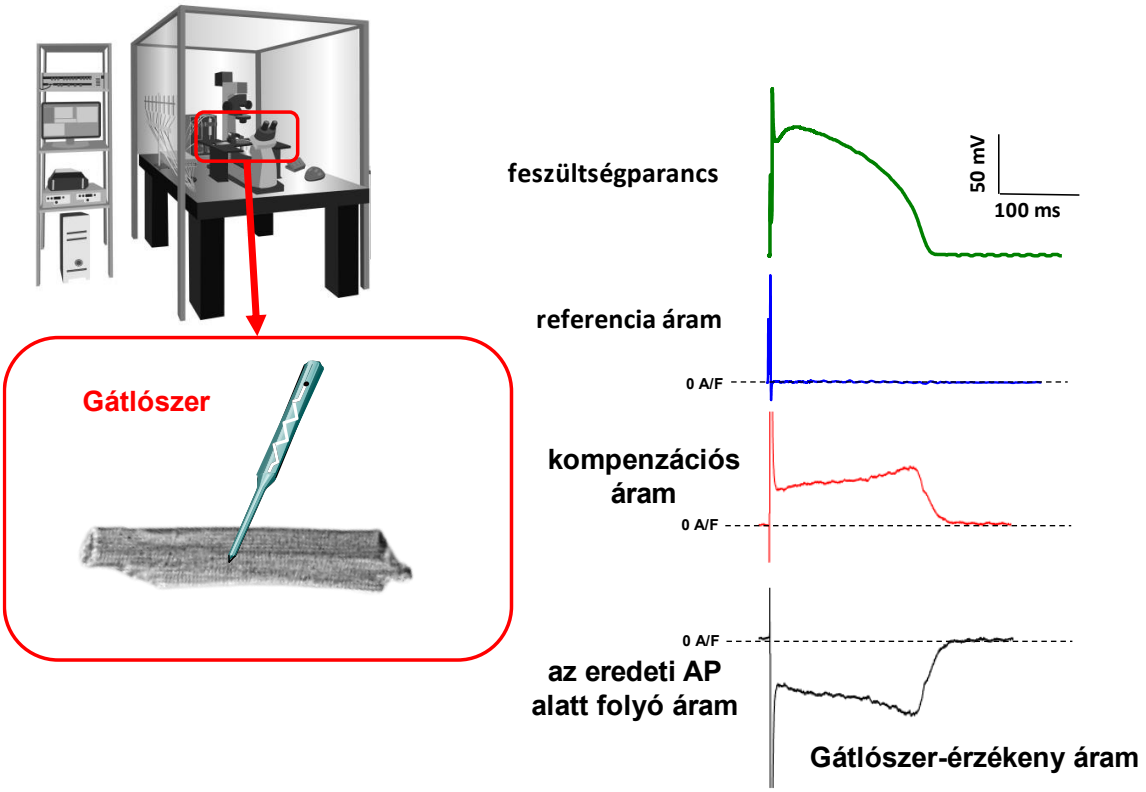
Méréseink során a patch-clamp technika teljes sejt konfigurációjában, a feszültség-clamp speciális, úgynevezett „akciós potenciál feszültség-clamp" (APVC) módszer két változatát alkalmaztuk tengerimalac, kutya és humán szívizomsejteken. Az egyik a sejt saját AP-ját használja feszültségparancsként (ún. „saját APVC" – sAPVC), ahogy ezt a 11. ábra jobb felső első sorában láthatjuk, míg a másik technikával egy korábban rögzített, „kanonikus" midmiokardiális AP-t használunk parancsjelként (ún. „kanonikus" APVC – cAPVC) (131,251).

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

Az áramjeleket mindkét APVC technika esetén az ún. „szekvenciális ionáramelkülönítés" módszerével (252) rögzítettük. Ennek lényege, hogy az egyes ionáramokat specifikus gátlószereik megfelelő szekvenciában történő alkalmazásával meghatározhatjuk ugyanarról a sejtről. A feszültségparancs folyamatos alkalmazása során, a háttéráram ($I_{háttér}$) rögzítése után hozzáadjuk a perfúziós oldathoz az első vizsgálni kívánt áram specifikus gátlószerét, mely kimetszi a neki megfelelő áramot a háttéráramból (I_{szer1}). Ebből meghatározható az eredeti AP alatt folyó első áram profilja ($I_1 = I_{háttér} - I_{szer1}$). Ezt követően a további ionáramok szelektív

gátlószereit alkalmazva meghatározhatóak az eredeti AP alatt folyó áramok (Az n-edik ionáram: $I_n = I_{szer(n-1)} - I_{szer(n)}$). Minden egyes szerrel legalább 5 percig perfundáltuk a sejteket, hogy a hatások teljesen kifejlődjenek.

Vizsgálataink az alábbi három jelentős tényező miatt nagyon jól közelítik az élettani körülményeket. A sejt saját AP-ját, vagy egy ahhoz nagyon hasonló „kanonikus" AP-t használunk feszültségparancsként. Az intra-, és extracelluláris oldatokban élettani, vagy ahhoz nagyon hasonló folyadékösszetételeket alkalmaztunk. Továbbá nem avatkoztunk be exogén Ca^{2+}-pufferekkel a sejt saját kalciumháztartásába.



11. ábra: *Az APVC technika elve a TTX szenzitív áram ($I_{Na,késői}$) példáján keresztül. A zöld színű analóg görbe a feszültségparancsként alkalmazott saját AP-t, a kék szín a feszültségparancs alkalmazására kialakuló referencia áramot jelöli. A kompenzációs áramot piros színnel jelöltük. Az ábrán a szaggatott vonalak a nulla vonalat jelölik. A referencia áram (kék) és a kompenzációs áram (piros) különbségének megfelelő valódi (AP alatti) hatóanyagszenzitív ionáram fekete színnel van feltüntetve. Részletes magyarázat a szövegben.*

4.2.4. Hagyományos feszültség-clamp kísérletek

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

Ebben az esetben külső oldatként HEPES-t tartalmazó Tyrode oldatot használtunk, amely az alábbiakat tartalmazta (mM-ban): NaCl 144, NaH_2PO_4 0,4, KCl 4,0, $CaCl_2$ 1,8, $MgSO_4$ 0,53, glükóz 5,5 és HEPES 5,0; pH=7,4). Ezt az alapoldatot a kísérletek során 1 µM nizoldipinnel,

0,5 µM HMR-1556-tal és 0,1 µM dofetiliddel egészítettük ki a Ca^{2+}-, és K^{+}-áramok gátlása céljából. A pipettaoldat összetétele a következő volt (mM-ban): CsCl 125, TEACl 20, MgATP 5, EGTA 10, HEPES 10, pH=7,2).

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

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

4.2.5. Akciós potenciálok elvezetése multicelluláris preparátumokból

Az AP-ok rögzítéséhez azért választottuk a multicelluláris preparátumokat (kutya-, tengerimalac-, és humán bal kamrai trabekulákat, illetve kutya jobb kamrai papilláris izmokat), hogy elkerüljük az izolált szívizomsejtek vizsgálatainak korlátait (például a sejtek közötti kapcsolatok hiánya vagy a csatornafehérjék esetleges károsodása). Ebben a kísérleti elrendezésben bizonyos szempontok szerint jobban helyettesíthetjük az in vivo körülményeket (90). A transzmembrán potenciálokat 3 M KCl-dal töltött üveg mikroelektródákkal rögzítettük, amelyek ellenállása 10-20 MΩ között volt. Ezeket az elektródákat egy nagy impedanciájú elektrométer (MDE GmbH, Heidelberg, Németország) bemenetéhez csatlakoztattuk. A preparátumokat egy platina elektródapárral 1 ms széles, a küszöbérték kétszeresének megfelelő amplitúdójú négyszög alakú impulzusokkal ingereltük 37 °C-on. A kísérletek megkezdése előtt a preparátumokat 1 s CL-on ingereltük legalább 60 percen keresztül.

Az 1 s CL-on történő ingerlést követően az ingerlés CL-át szekvenciálisan változtattuk 0,3-5 s között. Minden egyes CL-on a 25. AP-t rögzítettük, majd változtattuk a CL-t, így összességében egy egyensúlyi frekvenciafüggést rögzítettünk, viszonylag rövid idő alatt. Az AP-kat egy ADA 3300 adatgyűjtő kártyával (Real Time Devices Inc.) 100 kHz-es frekvencián digitalizáltuk, majd a későbbi elemzésig tároltuk. Miután valamennyi CL-on rögzítettük a kontroll körülmények közötti adatokat, a preparátumokat 20 percig 2 µM TTX-nal (kutya, tengerimalac és humán bal kamrai trabekulák esetén), illetve 1 µM GS967-gyel vagy 40 µM mexiletinnel (kutya jobb kamrai papilláris izmok) perfundáltuk, majd megismételtük a CL váltási protokollt. Törekedtünk arra, hogy minden egyes kísérlet során fenntartsuk az eredeti elektróda pozíciót. Amennyiben az elektróda kimozdult a preparátumból, megkíséreltük az elektródát újra pozícionálni. Azonban, ha az újra pozícionálást követően rögzített AP paraméterei több mint 5%-kal eltértek a korábbi paraméterekhez képest, a kísérletet elvetettük.

4.3. Az APD rövidtávú beat-to-beat variabilitásának meghatározása izolált szívizomsejtekben

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

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

ahol SV a rövidtávú variabilitás, az APD_i és az APD_{i+1} az i-edik, illetve az i+1-edik AP időtartamát jelöli a repolarizáció 90%-os szintjén, az $n_{ütés}$ pedig az elemzett egymást követő ütések számát (253). A SV változásait Poincaré-ábrák formájában mutatjuk be, ahol 50 egymást követő APD-értéket ábrázolunk, mindegyiket az előző AP időtartamával összehasonlítva.

4.4. Statisztikai elemzés

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

4.5 A kísérletek során használt egyéb vegyületek

Az egyes kísérleti elrendezésekben (amelyet egyenként az adott kísérletsorozatnál említeni is fogok a disszertáció további részében) különböző gátlószerek alkalmazására volt szükség, hogy kizárjuk az adott specifikus áramokat.

A kísérletekben használtunk nizoldipint, dofetilidet, E-4031-et,HMR-1556-ot, chromanol-293B-t és ATX-II-t is. Ezeknek az anyagoknak a hatásait a . táblázat foglalja össze. Próbáltunk olyan koncentrációértékeket választani, melyek az esetleges zavaró ionáramokat megfelelő mértékben gátolják. Azért ezeket a vegyületeket választottuk, mert ezek specifikus gátlószernek tekinthetőek és laborunkban korábban már számos alkalommal felhasználásra kerültek egyéb kísérletek kapcsán.

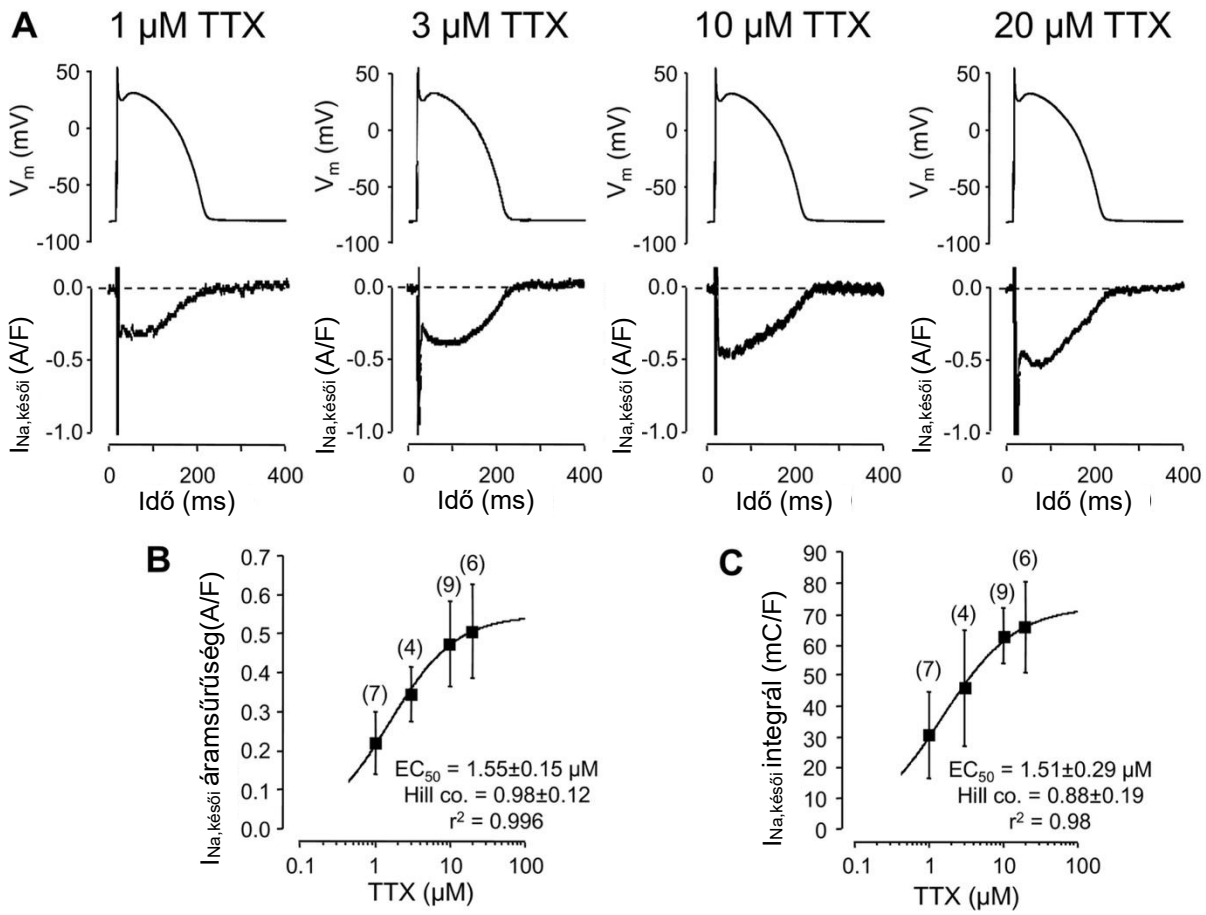
Gátlószer	Gátolt ionáram	Kísérleteknél használt koncentráció	IC_{50} érték
Nizoldipin	$I_{Ca,L}$	1 μM	10 nM
Dofetilid	I_{Kr}	0,1 μM	31,5 nM
E-4031	I_{Kr}	1 μM	10 nM
HMR-1556	I_{Ks}	0,5 μM	10,5 nM
Chromanol-293B	$I_{Ks} + I_{to}$	100 μM	1,8 μM
Indukálószer	**Indukált ionáram**	**Kísérleteknél használt koncentráció**	**EC_{50} érték**
ATX-II	I_{Na}	1 és 10 nM	7 nM

2. táblázat *A kísérletek során használt gátló és indukálószerek és tulajdonságaik felsorolása (gátolt ionáram, Kísérleteknél használt koncentráció, maximális hatás felét létrehozó dózis: IC_{50}/EC_{50})*

5. Eredmények

5.1. Az optimális TTX-koncentráció meghatározása

Először a $I_{Na,késői}$ elemzéséhez szükséges optimális TTX-koncentrációt határoztuk meg kutya kamrai szívizomsejtekben. Olyan TTX koncentrációt szerettünk volna használni, amely alkalmas a $I_{Na,késői}$ kellően nagy részének gátlására, lehetővé téve az áram valódi profiljának megjelenítését. A 12. ábra felső sorában feltüntetett reprezentatív mérések azt mutatják, hogy a TTX hatása 10 μM-os koncentrációnál szaturálódik. Az adatok Hill-egyenlethez való illesztésével kapott koncentráció-áramsűrűség görbék alapján (12. ábra B és C panel) a 10 μM TTX az áram körülbelül 87% -os gátlását okozta. Ezért 10 μM TTX-t választottunk a $I_{Na,késői}$ vizsgálatára a későbbi feszültség-clamp kísérletekhez. Fontos megjegyezni, hogy ez a megközelítés valószínűleg kissé alábecsüli a $I_{Na,késői}$ áramsűrűségét és integrálját. Ennek megfelelően a magas TTX-affinitású „neuronális" Na_V-k működését nem monitoroztuk, és az alacsonyabb (nanomoláris) TTX-koncentrációk hatásait sem vizsgáltuk. Ez némileg torzíthatja a 12. ábra B és C paneljeinél feltüntetett a TTX-ra kapott fél maximális effektív koncentráció (EC_{50}) értékeket. Ezeket a méréseket 1 μM nizoldipin jelenlétében hajtottuk végre, hogy gátoljuk az L-típusú Ca^{2+} áramot, mivel a magas TTX koncentráció gátolja a Ca^{2+} áramot is korábbi kutatások szerint (254,255).

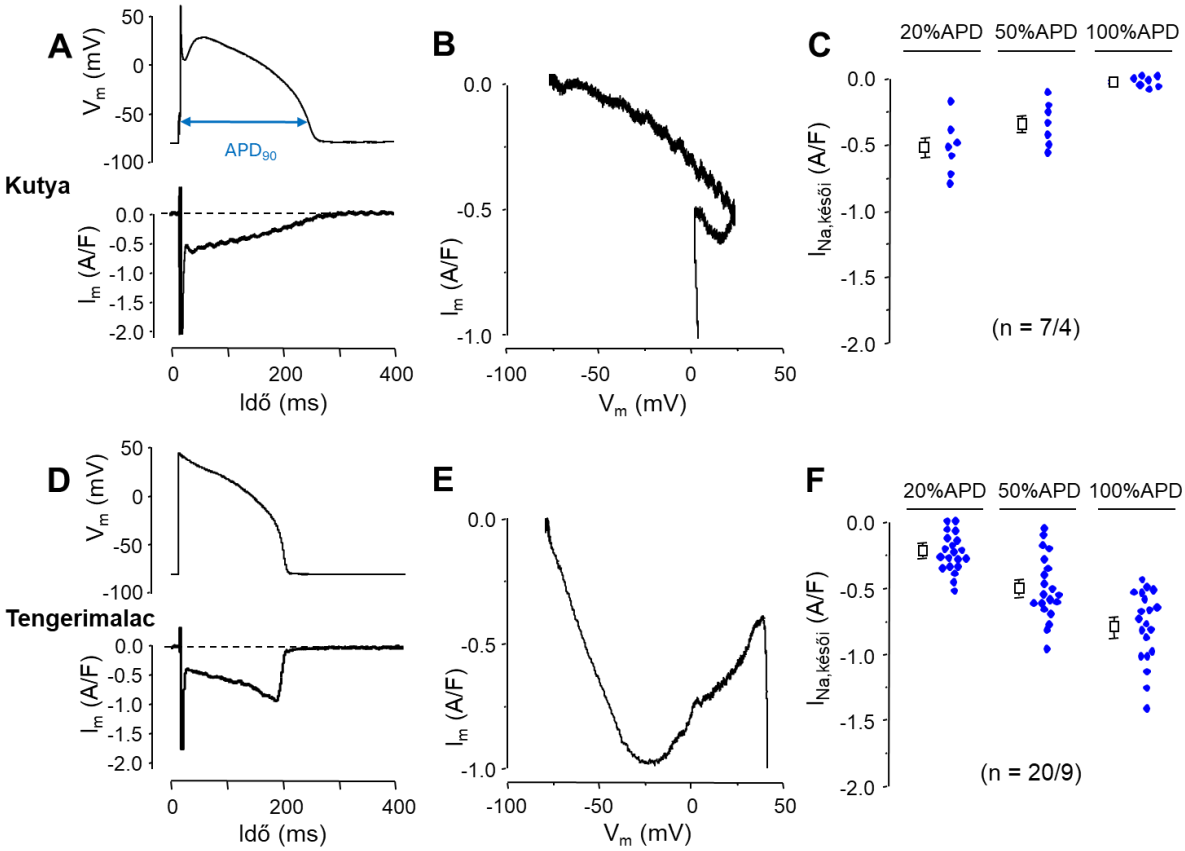


12. ábra: *A tetrodotoxin (TTX) koncentrációfüggő hatása izolált kutya kamrai szívizomsejtekben APVC körülmények között. A jobb összehasonlíthatóság érdekében a kanonikus AP-okat használtuk parancsjelként (A panel felső sora). Továbbá, hogy kizárjuk az* $I_{Ca,L}$ *zavaró hatását, ezeket a kísérleteket 1 μM nizoldipin jelenlétében végeztük el. Az A panel második sorában a TTX által gátolt* $I_{Na,késői}$ *reprezentatív felvételei láthatóak, melyeket a sejtkapacitásra normalizáltuk. A TTX-expozíció minden esetben 5 percig tartott. B panel: A* $I_{Na,késői}$ *legnagyobb áramsűrűségére vonatkozó koncentráció-áramsűrűség görbe. Az akciós potenciál csúcsától számított első 15 ms-ot kizártuk az analízisből. Az integrált és a csúcsértéket is az ezután mért értékekből határoztuk meg. C panel: A* $I_{Na,késői}$ *által szállított töltésre (az áram integráljára) vonatkozó görbe. B és C panelen látható görbéket az adatok Hill-egyenlethez való illesztésével kaptuk. A szimbólumok és a sávok az átlag ± SEM értékeket jelölik, a zárójelben lévő számok jelzik az 5 állatból származó vizsgált sejtek számát.*

5.2 A kutya és tengerimalac kamrai sejtekben rögzített $I_{Na,késői}$ *valódi profiljai saját APVC körülmények között*

Amint a 12. ábrán (kanonikus APVC nizoldipin jelenlétében) és 13. ábra A paneljén (saját APVC nizoldipin nélkül) is láthatjuk; a kutya $I_{Na,késői}$ –nál megjelent egy „decrescendo” profil, tehát az AP időbeli lefolyása alatt az amplitúdó monoton csökkent. Ezzel szemben a tengerimalac kamrai szívizomsejteknél az áram amplitúdója a plató fázis alatt nőtt, és csak a

terminális repolarizáció során csökkent nullára (13. ábra D panel), tehát egy „crescendo” profilt mutatott. Ezeket a különbségeket tükrözik a kutya- és tengerimalac sejtekben kapott áram-feszültség görbék, ahogy ezt a 13. ábra B és E paneljeinél is láthatjuk. További kvantitatív mérésekkel vizsgáltuk a $I_{Na,késői}$ alakját, ezért meghatároztuk a TTX-érzékeny áramsűrűségét az APD_{90} 20%-ánál , 50%-ánál és 100%-ánál, ahol az APD_{90} a 90 %-os repolarizációnál mért AP hosszat jelenti. Ennek megfelelően a $I_{Na,késői}$ áramsűrűsége az APD_{90} 20%-ánál -0,52 ± 0,09 A/F volt a kutya sejtekben, míg -0,21 ± 0,05 A/F a tengerimalac sejtekben (p <0,05). Ezzel szemben az APD_{90}-nál a $I_{Na,késői}$ áramsűrűsége nagyobb volt a tengerimalac sejtekben (- 0,78 ± 0,07 A/F), a kutya sejtekhez képest (- 0,03 ± 0,02 A/F, p <0,05). Az APD_{90} 50%-ánál mért áramsűrűség nem különbözött szignifikánsan a két faj között. Bár a szállított össztöltés magasabb volt a tengerimalac sejtekben (86,2 ± 10,8 mC/F, n = 20/9) a kutya sejtekkel (67,1 ± 9,2 mC/F, n=7/4, p <0,05) összehasonlítva, azonban az áramintegrálok hasonló tartományba estek.



13. ábra: *A kutya (A-C panel) és tengerimalac (D-F panel) kamrai sejtekben rögzített $I_{Na,késői}$ valódi profiljai saját APVC körülmények között. Az áramokat 10 µM TTX felhasználásával nyertük. A és D panel: Reprezentatív $I_{Na,késői}$ profilok. A parancsjelként használt AP-ok a panel felső részén láthatóak. B és E panel: Ugyanezen mérésekből nyert áram-feszültség görbék. C és F panel: Az APD_{90} 20%-ánál, 50%-ánál és 100%-ánál mért $I_{Na,késői}$ áramsűrűségek (APD_{90}: a 90%-os repolarizációhoz tartozó AP hossz). A konfidencia intervallumok az átlag ± SEM értékeket, a fekete pontok egyedi adatokat jelölnek, a zárójelben lévő számok pedig a vizsgált szívizomsejtek / a vizsgált állatok számát jelzik.*

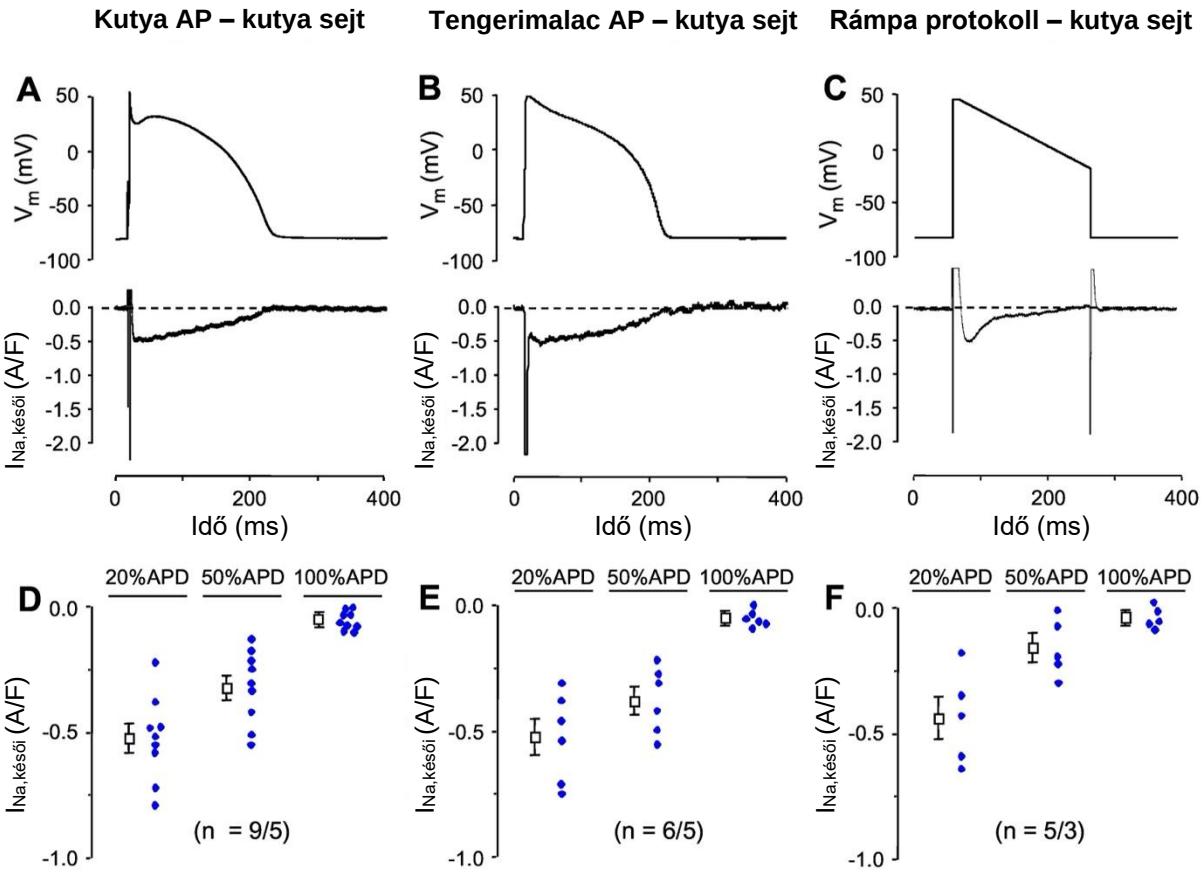
		Kutya (n=7)	Tengerimalac (n=19)	p érték
TTX szenzitív ionáramok	APD90 20%-ánál (A/F) ± SEM	-0,52 ± 0,09	-0,21 ± 0,05	$2{,}45 \times 10^{-2}$
	APD90 50%-ánál (A/F) ± SEM	-0,34 ± 0,06	-0,25 ± 0,04	$8{,}97 \times 10^{-2}$
	APD_{90} 100%-ánál (A/F) ± SEM	-0,03 ± 0,02	-0,78 ± 0,07	$9{,}13 \times 10^{-3}$
Szállított össztöltés (C/F)		0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	$1{,}21 \times 10^{-2}$

3. táblázat: *A TTX szenzitív ionáramok és a szállított össztöltés a 13. ábrán részletezett kísérleti elrendezésben.*

5.3 A parancsfeszültség alakjának hatása a $I_{Na,késői}$ profiljára kutya szívizomsejtekben

Ahogyan korábban említettük, a $I_{Na,késői}$ profilját kutya szívizomsejteken határoztuk meg APVC körülmények között, két eltérő kísérleti csoportban. Az első csoportnál kanonikus APVC-et használtunk, és a $I_{Na,késői}$-ot 1 μM nizoldipin (12. ábra , n=9/5) jelenlétében határoztuk meg. A második csoportban saját APVC-et használtunk nizoldipin jelenléte nélkül (13. ábra A és C panel, n=7/4). Bár az áramdenzitás értékek valamivel kisebbek voltak nizoldipin jelenlétében, mégsem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között az APD_{90} 20%, 50% vagy 100%-ánál (-0,48 ± 0,08 versus - 0,52 ± 0,09 A/F, -0,30 ± -0,06 versus - 0,34 ± 0,06 A/F, és - 0,06 ± 0,02 versus a - 0,03 ± 0,02 A/F). Az integrálok hasonlóan alakultak (63,1 ± 9,2 mC/pF, n=9/5 versus a 67,1 ± 9,2 mC/pF, n=7/4).

Mivel az AP konfigurációról korábban kimutatták, hogy az APVC körülmények között befolyásolja az áramprofilokat (131,251), megvizsgáltuk, hogy a „decrescendo” típusú kutya $I_{Na,késői}$ megváltozik-e, ha kutya sejteken tengerimalac szívizomsejtekre jellemző feszültségparancsokat alkalmazunk. A kutya AP időtartamához illesztett kanonikus tengerimalac AP-okat (14. ábra B és E panel) és egy átlagos tengerimalac AP plató fázisára emlékeztető feszültség rámpa protokollt alkalmaztunk a következő kísérletsorozatban (14. ábra C és F panel). A rámpa - 80 mV-ról indult, 10 ms-ot töltött + 40 mV-on, és 200 ms alatt - 20 mV-ra csökkent. Egyik változtatás sem volt képes a kutya „decrescendo” áramprofiljának átalakítására „crescendo”, tengerimalacszerű $I_{Na,késői}$ profilra. Az áramintegrálok is hasonlóan alakultak a kutyasejtekben, függetlenül attól, hogy a parancs AP kutya vagy tengerimalac eredetű volt-e (63,1±9,2 mC/F, n=9/5 versus 65,4±10,7 mC/F, n=6/5).



14. ábra: *A parancsfeszültség alakjának hatása a $I_{Na,késői}$ profiljára kutya szívizomsejtekben.* <u>*A-C panel*</u>*: A parancsfeszültség protokollokat (felső sor) és a 10 μM TTX-nal 1 μM nizoldipin jelenlétében gátolt $I_{Na,késői}$-profilokat (alsó sor) megjelenítő reprezentatív felvételsorozatok melyeket a sejtkapacitásra normalizáltuk. Az A panelnél kanonikus kutya AP-t, a B panelnél kanonikus tengerimalac AP-t, míg a C panelnél egy csökkenő feszültség rámpa protokollt használtunk parancsjelként a kutya szívizomsejtek ingerléséhez.* <u>*D-F panel*</u>*: Az APD_{90} 20%-ánál, 50%-ánál és 100%-ánál (100%=APD_{90}) mért $I_{Na,késői}$ áramsűrűség értékek az A-C panelekben bemutatott körülmények között. A konfidencia intervallumok az átlag ± SEM értékeket, a kék pontok egyedi adatokat jelölnek, a zárójelben lévő számok a vizsgált szívizomsejtek/állatok számát jelzik.*

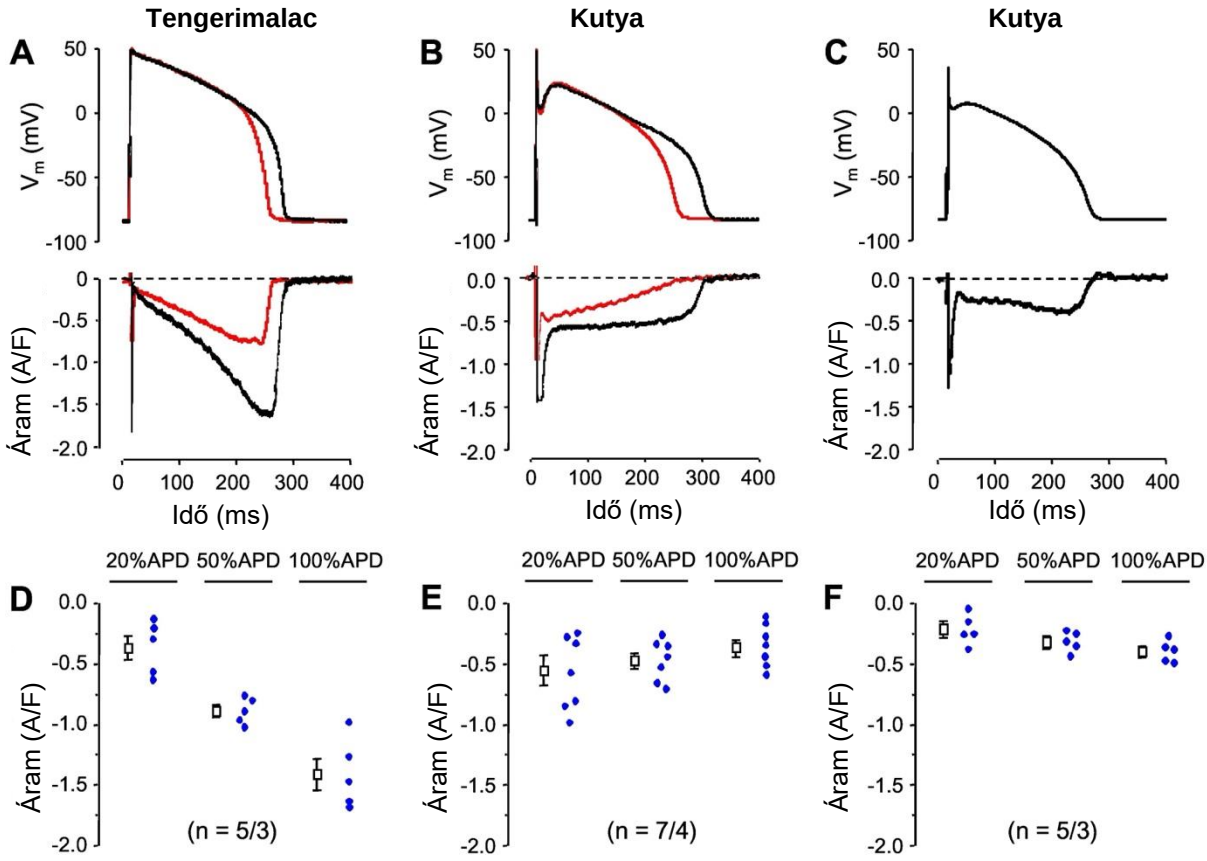
5.4 Az ATX-II által indukált TTX-érzékeny áramprofil tengerimalac és kutya kamrai sejtekben

Korábbi kutatások alapján a zöld viaszrózsa (*Anemonia sulcata*) egyik toxinja (Anemone toxin II; ATX-II) a Na_v-k gyors inaktivációjának gátlása során a szívizomsejtekben a $I_{Na,késői}$-hoz hasonló áramot váltott ki (256). Tengerimalac szívizomsejtekben a TTX-érzékeny áram profilja hasonló volt 10 nM ATX-II hiányában és jelenlétében is (15. ábra A panel), bár az áram amplitúdóját jelentősen megnövelte az ATX-II (a 14. D és 12. F paneleket összehasonlítva), azaz az áram mindkét esetben „crescendo” profilt mutatott. Ezzel szemben a

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

		Kutya (n=7/4)	**Tengerimalac (n=20/9)**
TTX érzékeny áramintegrál (mC/F)	Kontroll	67±9	86±11
	ATX-II indukció után	102±13	145±19
	p érték:	$9,19x10^{-3}$	$8,62x10^{-3}$
APD_{90} (ms)	Kontroll	214±13	192±15
	ATX-II indukció után	257±17	212±20
	p érték:	$1,84x10^{-2}$	$2,94x10^{-2}$

4. táblázat: *A TTX szenzitív áramintegrál és az APD_{90} értékek a 15. ábrán részletezett kísérleti elrendezésben kutya és tengerimalac szívizomsejteket vizsgálva.*

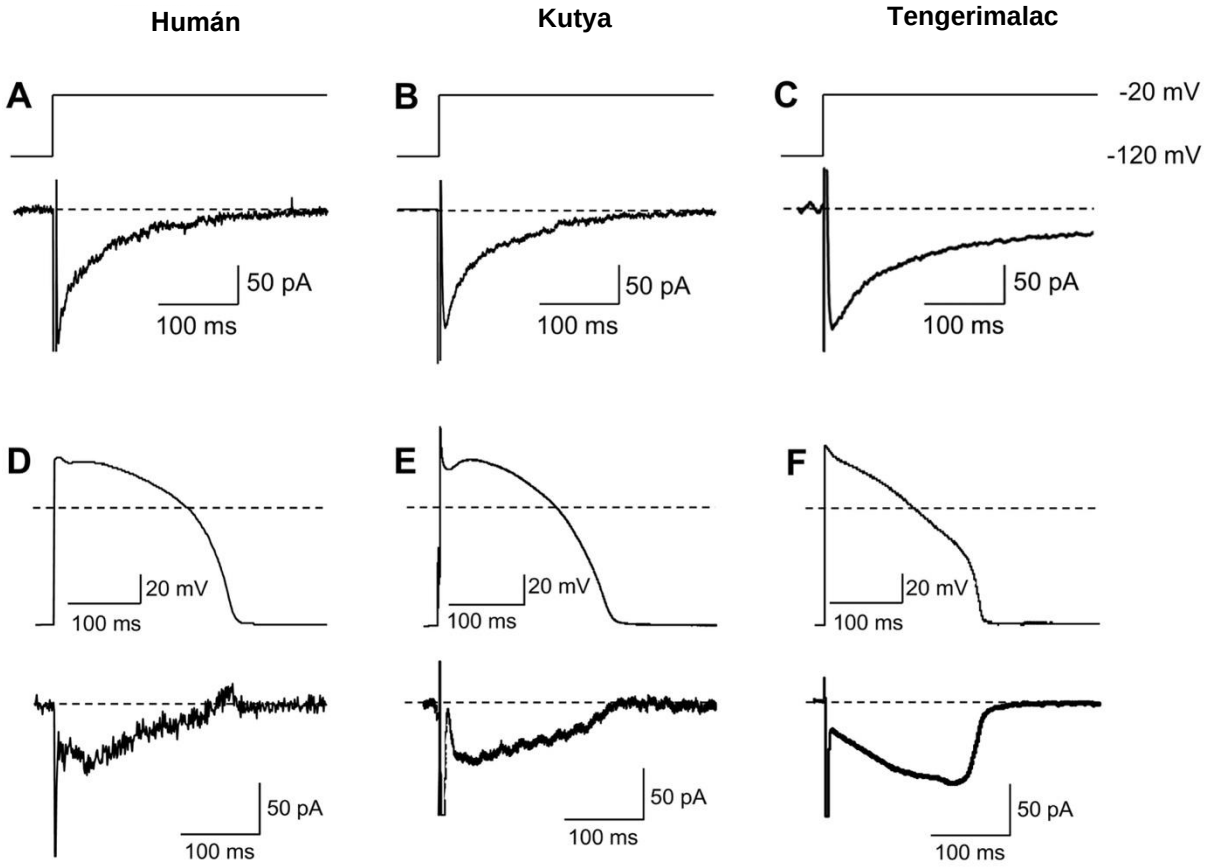


15. ábra: *Az ATX-II indukált TTX-érzékeny áramprofilok tengerimalac és kutya kamrai sejtekben. A panel: Tengerimalac szívizomsejtekben a TTX-érzékeny áramprofil hasonló volt („crescendo" profil) 10 nM ATX-II előkezelés hiányában (piros görbék) és jelenlétében (fekete görbék). A megjelenített áramprofilokat a sejtkapacitásra normalizáltuk. B panel: Kutya szívizomsejtekben a TTX-érzékeny áramprofil 1 nM ATX-II hatására módosult. A kontroll TTX-érzékeny áramprofilok (piros) különböző sejtekből származnak, melyeket kizárólag a jobb összehasonlíthatóság kedvéért tüntettük fel az ábrán.*
C panel: Kutya szívizomsejtekben mért ATX-II által indukált áramprofil. Az alsó panelek a Na^+-áramsűrűség értékeket mutatják, ahol ATX-II jelenlétében TTX érzékeny (D és E panel) és az ATX-II által indukált áramot (F) vizsgáltunk az APD_{90} 20%-ánál, 50%-ánál és 100%-ánál. Az átlag ± SEM értékeket, a kék pontok az egyedi adatokat jelölik, a zárójelben lévő számok a vizsgált szívizomsejtek számát/állatok számát jelzik.

5.5 A humán, kutya és tengerimalac szívizomsejtekből felvett $I_{Na,késői}$ tulajdonságainak összehasonlítása

A következő kísérletsorozatban a $I_{Na,késői}$ profilját (saját APVC körülmények között) és kinetikai tulajdonságait (hagyományos feszültség-clamp technikával) hasonlítottuk össze kutya-, emberi és tengerimalac kamrai szívizomsejtekben (16. ábra). A 20 µM TTX-érzékeny ionáramok hasonlóan alakultak az összes szívizomsejt típusban, amikor a membránpotenciált a -120 mV-os tartófeszültségről a -20 mV-os potenciálra változtattuk 1 µM nizoldipin, 0,1 µM dofetilid és 0,5 µM HMR-1556 jelenlétében (16. ábra A, B és C panel). Amikor a TTX-

érzékeny áram változását monoexponenciális függvényre illesztettük (a kezdeti 50 ms-os periódus kivételével), az inaktivációs időállandó átlagosan 60±3 ms (n=13/7) volt a kutya, 67±5 ms (n=5/3) a humán és 155±16 ms (n=5/3) a tengerimalac szívizomsejtekben. A $I_{Na,késői}$ inaktivációjának időbeli lefolyása tehát hasonló volt a humán és a kutya szívizomsejtekben, de szignifikánsan ($p<0,05$) lassabban következett be a tengerimalac szívizomsejtekben. A megfelelő átlagos áramsűrűség (amelyeket szintén monoexponenciális illesztési eljárással kaptunk) -0,56±0,04 A/F volt a kutya, -0,47±0,05 A/F a humán és -0,54±0,14 A/F a tengerimalac szívizomsejtekben. Ezek az értékek nem különböztek szignifikánsan egymástól. A 16. ábra D, E és F paneljein reprezentatív $I_{Na,késői}$ profilokat mutatunk be, amelyeket kutya, humán és tengerimalac szívizomsejtekből rögzítettünk saját APVC körülmények között. Ezek az áramprofilok szintén nagyon hasonlóak voltak a kutya- és humán sejtekben (mindkettő „decrescendo" karakterisztikájú), míg a tengerimalacban a „crescendo" típus jelent meg.



16. ábra: *A humán (A és D panel), kutya (B és E panel) és tengerimalac (C és F panel) szívizomsejtekből felvett $I_{Na,késői}$ tulajdonságainak összehasonlítása. Az A, B és C paneleken a 20 μM TTX-érzékeny áramokat tüntettük fel, amelyeket -120 mV-os tartófeszültségről -20 mV-ra négyszög alakú impulzusokkal aktiváltuk 1 μM nizoldipin, 0,1 μM dofetilid és 0,5 μM HMR-1556 jelenlétében, míg a D-F paneleken a TTX-et használtunk a $I_{Na,késői}$ gátlására saját APVC körülmények között (nizoldipin, dofetilid és HMR-1556 nélkül).*

	Humán (n=5/3)	Kutya (n=13/7)	Tengerimalac (n=5/3)
Inaktivációs időállandó (τ, ms)	67±5	60±3	155±16
Átlagos áramsűrűség (A/F)	-0,47±0,05	-0,56±0,04	-0,54±0,14

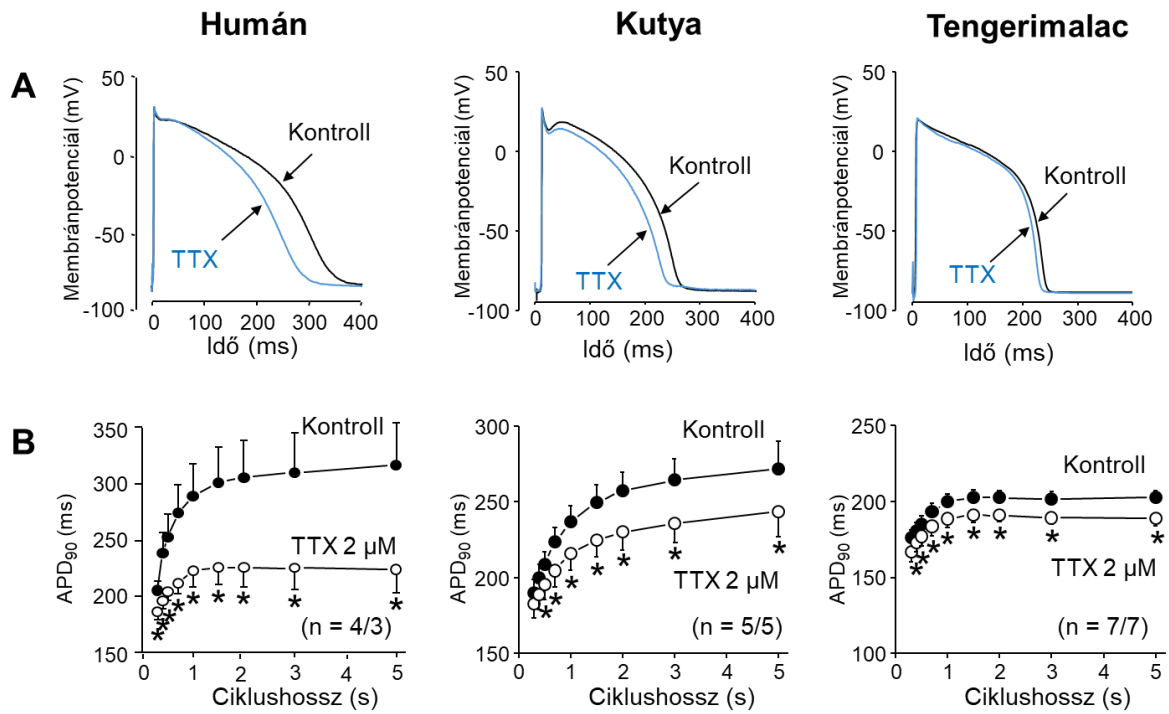
5. táblázat: *Az inaktivációs időállandó és az átlagos áramsűrűség értékek a 16. ábrán részletezett kísérleti elrendezésben humán, kutya és tengerimalac szívizomsejtekben.*

5.6 A tetrodotoxin hatása az APD_{90}-re multicelluláris humán, kutya és tengerimalac kamrai preparátumokban

A TTX frekvenciafüggő hatását az AP morfológiájára a három fajból nyert multicelluláris kamrai preparátumokban a 17. ábra mutatja be. Minden preparátumot 2 μM TTX-nal perfundáltunk, és a méréseket a hatás beállta után végeztük. A TTX az összes ciklushosszon rövidítette az APD_{90}-t. Az 1 s CL-on mért TTX-indukált rövidülés a legnagyobb volt a humán (67±16 ms, n=4/3), közepes a kutya (21±4 ms, n=5/5) és a legkisebb a tengerimalac (11±3, n=7/7) preparátumokban. A TTX 2 μM-os koncentrációja nem okozott szignifikáns változásokat a RMP-ban és az AP amplitúdójában. A depolarizáció maximális sebessége (dV/dt_{max}) humán szívizom preparátumokban 310±48 V/s-os értékről 259±24 V/s-os értékre, kutya szívizom preparátumokban 231±40 V/s-os értékről 169±33 V/s-os értékre, míg tengerimalac szívizom preparátumok esetében 226±32 V/s-os értékről 176±21 V/s-os értékre változott. Egyedül a kutya szívizom preparátumokon végzett méréseknél találtunk szignifikáns különbséget a kontroll csoportot és a 2 μM-os TTX-nal kezelt csoportot összehasonlítva.

		Humán (n=4/3)	Kutya (n=5/5)	Tengerimalac (n=7/7)
TTX- indukált rövidülés (ms)		67±16	21±4	11±3
depolarizáció maximális sebessége (dV/dt_{max}; V/s)	**kontroll**	310±48	231±40	226±32
	TTX-indukált	259±24	169±33	176±21
	p érték (kontroll-TTX)	0,21	0,02	0,09

6. táblázat: *A TTX indukált rövidülés és a depolarizáció maximális sebessége a 17. ábrán részletezett kísérleti elrendezésben humán, kutya és tengerimalac szívizomsejtekben.*



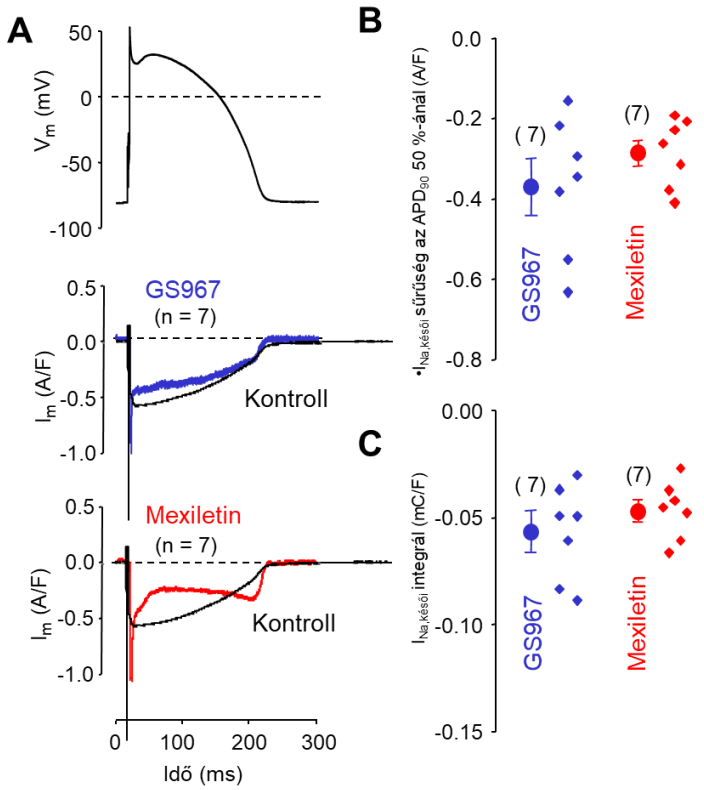
17. ábra: *A 2 μM TTX hatása az APD_{90}-re multicelluláris humán, kutya és tengerimalac kamrai preparátumokban. A kísérleteket frekvenciafüggő módon végeztük, ahol a CL fokozatosan változott 0,3 és 5 s között. Az 1 s CL-szal rögzített reprezentatív AP-párokat ábrázoltunk a felső sorokban (A panel), kékkel a TTX hatás beállta utáni AP-okat, míg feketével a kontroll AP-okat. A B panelen a 2 μM TTX CL-függő hatását láthatjuk az APD_{90}-re vonatkoztatva. A konfidencia intervallumok az átlag ± SEM értékeket, a csillagok a kontroll és a TTX-nal kezelt csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik, amelyeket egyirányú ANOVA, majd Student- féle t-próba segítségével határoztunk meg. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük, ha a $p<0,05$ volt. A zárójelben lévő számok a preparátumok számát / a vizsgált állatok számát jelölik.*

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

Clancy és munkatársai „nem egyensúlyi kapuzási elmélete” alapján a Na_v kapuzását szorosan befolyásolja az alkalmazott feszültségprotokoll alakja (10). Ennek kapcsán a GS967 és a mexiletin $I_{Na,késői}$-ra gyakorolt hatását akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között is vizsgáltuk kanonikus midmiokardiális AP-okat használva parancsjelként. Az 1 μM GS967 és a 40 μM mexiletin befelé irányuló $I_{Na,késői}$ profilokat hozott létre, amelyeknek az áramsűrűsége (az APD_{90} 50%-ánál mérve) -0,37 ± 0,07 és -0,28 ± 0,03 A/F, az áramintegráljai pedig -56,7 ± 9,1 és -46,6 ± 5,5 mC/F értékűek voltak. Mivel a Ca^{2+} és a K^+ áramokat a kísérlet megkezdése előtt blokkoltuk, a rögzített áramprofilokat a GS967 és a mexiletin által gátolt $I_{Na,késői}$-nak tekintjük a szabályos kamrai AP alatt (18. ábra A, B és C panel).

A $I_{Na,késői}$ teljes áramsűrűségét és integrálját a kutya-izomsejtekben a referencia vegyületként alkalmazott TTX-nal kapott koncentráció-válasz görbék segítségével becsültük meg. A Hill-egyenlet maximális értéke adta a $I_{Na,késői}$ teljes nagyságát (12. ábra B és C panel). Az 1 μM

GS967 és 40 µM mexiletin által gátolt megfelelő áramsűrűségeket és integrálokat összehasonlítva ezekkel a TTX-nal kapott maximális értékekkel, a GS967 és a mexiletin gátló hatásait lehetett kifejezni százalékos formában. Ennek megfelelően a GS967 a teljes $I_{Na,késői}$-áramsűrűség 88%-át és a teljes $I_{Na,késői}$ -integrál 78%-át, míg a mexiletin a teljes $I_{Na,késői}$-áramsűrűség 67%-át, illetve a teljes $I_{Na,késői}$ -integrál 64%-át blokkolta. Ennél is fontosabb, hogy a GS967 és a mexiletin által gátolt áramprofilok eltérő alakúak voltak. A GS967-érzékeny áram monoton csökkent az AP során, hasonlóan a TTX-érzékeny áramhoz, míg a mexiletin érzékeny áram nyeregszerű profilt mutatott. Ez a különbség valószínűleg a GS967 háromszor gyorsabb disszociációjának tulajdonítható a mexiletinhez képest.



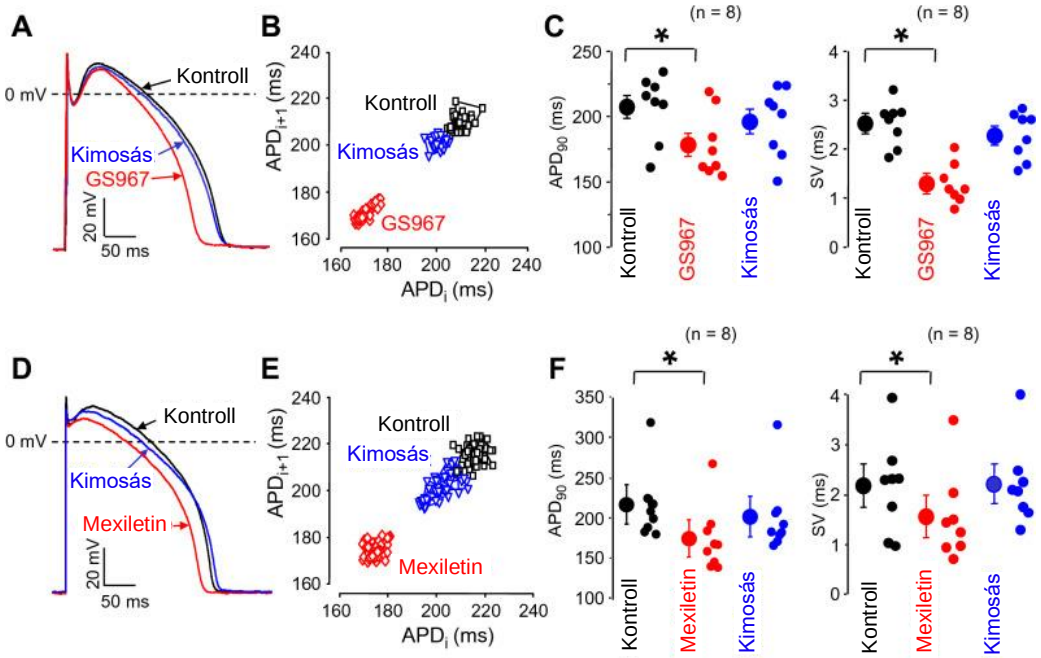
18. ábra: *A GS967 és a mexiletin hatásai izolált kutya kamrai szívizomsejtekben akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között. <u>A panel:</u> 1 µM GS967 és 40 µM mexiletin (mindkét esetben 7 szívizomsejtben) által gátolt átlagos membránáramprofilok 1 µM nizoldipin + 1 µM E4031 + 100 µM chromanol-293B jelenlétében. Az áramprofilokat a sejtkapacitásra normalizáltuk és feketével egy másik sejtből származó TTX által gátolt áramprofilt jelöltük a jobb összehasonlíthatóság kedvéért. A legfelső sorban tüntettük fel a parancs AP-t a szenzitív ionáramok felett. <u>B panel:</u> Az áramsűrűség értékek az APD_{90} 50%-os időtartamánál mérve. <u>C panel:</u> Az áramintegrál értékek, amelyeknél a kezdeti 20 ms-os időszakot nem vettük figyelembe. A hibasávok az átlag ± SEM értékeket, a kék és piros pontok egyedi adatokat mutatnak, a számok a zárójelben a vizsgált szívizomsejtek számát mutatják.*

		GS (n=7)	Mexiletin (n=7)
áramsűrűség	APD90 50%-ánál (A/F)	-0,37 ± 0,07	-0,28 ± 0,03
	TTX gátláshoz viszonyítva (%)	88	67
áramintegrál	(mC/F)	-56,7 ± 9,1	-46,6 ± 5,5
	TTX gátláshoz viszonyítva (%)	78	64

7. táblázat: *Az áramsűrűség és áramintegrál értékek a 18. ábrán részletezett kísérleti elrendezésben kutya szívizomsejtekben.*

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

Az emelkedett beat-to-beat QT intervallum variabilitás a kamrai aritmia jó előjelzője lehet a betegek széles körében, míg az egyes sejtek szintjén az APD beat-to-beat variabilitása használható (más néven rövidtávú variabilitás, SV). Mindkét paramétert az aritmia kockázat indikátorának tekintik (257–260). A többsejtes preparátumokkal ellentétben, ahol a szomszédos sejtek hatékonyan kiegyenlíthetik az APD egyéni különbségeit, a SV az egyes sejtekben sokkal kifejezettebb, ezért a GS967 és a mexiletin SV-ra gyakorolt hatását izolált kamrai szívizomsejtekben vizsgáltuk, amelyeket 1 s-os állandó CL-szal ingereltünk. Ilyen körülmények között a SV-t 1 μM GS967 és 40 μM mexiletin is szignifikánsan csökkentette (GS967 esetében az SV csökkenés: 1,01 ± 0,19 vagy 42,1 ± 6,5%, p: 0,00137; Mexiletin esetében az SV csökkenés: 0,63 ± 0,2 ms vagy 24,6 ± 12,8%, p: 0,021, n=8). Az APD mérsékelten 32,5 ± 6,9 ms-mal az egyik, míg 41,4 ± 4,1 ms-mal rövidült meg a másik esetben (mindegyik $p<0,05$ és n=8). Mindezek a hatások nagyrészt reverzibilisek voltak kimosáskor (19. ábra). Mivel maga az APD is ismert, hogy befolyásolja a SV nagyságát, bevezettük a relatív SV (RSV) kifejezést (90,261). Ennek megfelelően RSV = dSV / dAPD, azaz a SV változását az APD változásához normalizáltuk. A RSV értéke szignifikánsan magasabb volt a GS967 esetében, mint a mexiletinnél (0,039 ± 0,007, p:0,0111 n=8 versus 0,015 ± 0,007, p:0,041 n=8). Ez a GS967 jobb antiaritmiás hatékonyságát jelezheti a mexiletinhez képest.



19. ábra: *A GS967 (A-C panel) és a mexiletin (D-F panel) reverzibilis hatása a rövidtávú variabilitására izolált kutya bal kamrai szívizomsejtekben. A és D panel: Szuperponált akciós potenciálok (feketével a kontroll, pirossal az 1 µM GS967 vagy mexiletin hatásra kialakult és kékkel a szer kimosása utáni állapot). B és E panel: Az AP-k ábrázolása Poincaré-diagrammokon. Feketével a kontroll, pirossal az 1 µM GS967 vagy mexiletin hatásra kialakult és kékkel a szer kimosása utáni állapotot jelöltük. C és F panel: APD$_{90}$-re és SV-ra gyakorolt átlagos hatásokat tüntettük fel. Feketével a kontroll, pirossal az 1 µM GS967 vagy mexiletin hatásra kialakult és kékkel a szer kimosása utáni állapotot jelöltük. A konfidencia intervallumok az átlag ± SEM értékeket, a kis fekete, piros és kék pontok egyedi adatokat jelölnek, míg a zárójelben lévő számok a vizsgált szívizomsejtek számát jelzik. A csillagok a gyógyszer előtti kontroll és a GS967-tel vagy mexiletinnel kezelt csoportok adatai közötti szignifikáns különbségeket mutatják.*

	GS (n=8)	**Mexiletin (n=8)**
SV csökkenés (ms)	1,01 ± 0,19	0,63 ± 0,2
SV csökkenés (%)	42,1 ± 6,5	24,6 ± 12,8
p érték	$1{,}37\text{x}10^{-3}$	$2{,}10\text{x}10^{-3}$
APD rövidülés (ms)	32,5 ± 6,9	41,4 ± 4,1
p érték	$3{,}11\text{x}10^{-3}$	$1{,}32\text{x}10^{-4}$
RSV (dSV/dAPD)	0,039 ± 0,007	0,015 ± 0,007
p érték	$1{,}11\text{x}10^{-2}$	$4{,}11\text{x}10^{-3}$

8. táblázat: *A rövidtávú variabilitás, az APD rövidülés és a relatív rövidtávú variabilitás a 19. ábrán részletezett kísérleti elrendezésben kutya szívizomsejtekben.*

6. Megbeszélés

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

Ahogyan azt a korábbiakban bemutattuk ebben a tanulmányban összehasonlítottuk a humán és kutya kamrai szívizomsejtek $I_{Na,késői}$ profilját saját APVC körülmények között. Ebből a szempontból eredményeink összhangban vannak Murphy és munkatársai (149) eredményeivel, akik a kutya $I_{Na,késői}$ profilját mutatták be kanonikus AP-ok alkalmazásával. A legfontosabb eredményünk annak bizonyítása volt, hogy a kutyai szívizomsejtek viszonylag jó modellként használhatók a humán $I_{Na,késői}$ vizsgálatára - ellentétben a más emlősökből, köztük tengerimalacból, nyúlból és sertésből származó szívizomsejtekkel, mivel ez utóbbi fajok mindegyikében az áram „crescendo" profilt mutat (34–36). Ennek a fajok közötti különbségnek fontos következménye, hogy a $I_{Na,késői}$ relatív hozzájárulása az akciós potenciálok morfológiájához (az ezzel együtt járó Na^+ és Ca^{2+} terhelés, ami fokozott aritmia hajlamot eredményez) növekszik az APD megnyúlásával a „crescendo" csoportban, szemben a „decrescendo" csoporttal. Valószínűsíthető, hogy rövidebb APD esetén viszonylag kisebb a relatív szerepe. Érthetőbben, a $I_{Na,késői}$ amplitúdója a terminális repolarizáció idején a „crescendo" típusú fajokban a legnagyobb, következésképpen az APD meghosszabbodása (pl. HERG-csatorna gátló alkalmazása miatt) várhatóan nagyobb befelé irányuló $I_{Na,késői}$ áramot okoz (nagyobb Na^+ és Ca^{2+} terheléssel együtt). Ez a folyamat felnagyíthatja a K^+-csatorna gátlók APD-t meghosszabbító hatását. Mivel a $I_{Na,késői}$ gyakorlatilag inaktiválódik ebben az időben a „decrescendo" típusú preparátumokban, az APD megváltozása alig fogja módosítani a $I_{Na,késői}$-on keresztül történő Na^+-beáramlás nagyságát. Hasonló érvelés alapján a $I_{Na,késői}$ gátlók terápiás hatása (beleértve az APD rövidülését és a sejtek Na^+ és Ca^{2+} tartalmának csökkenését) várhatóan kevésbé lesz kifejezett a kutya és humán szívizomban, mint a tengerimalacból, nyúlból és sertésből származó hasonló preparátumokban. Ezt figyelembe kell venni, amikor a $I_{Na,késői}$ gátlószerekkel vagy módosító anyagokkal végzett farmakológiai vizsgálatok eredményeit értelmezik vagy extrapolálják emberi populációra, mivel néhány ilyen vegyülettel végzett vizsgálatot olyan fajokon végeztek, amelyek crescendo $I_{Na,késői}$ profilt mutatnak (75–77). A jelen eredmények alapján kutya kamrai szövetek vagy szívizomsejtek javasoltak a $I_{Na,késői}$-mal kölcsönhatásba lépő gyógyszerekkel végzett farmakológiai vizsgálatokhoz.

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

utóbbi esetben az inaktiváció kellően lassú volt ahhoz, hogy a Na_v-k jelentős része nyitva maradjon a terminális repolarizáció idejére. Következésképpen a Na^+ -okra ható növekvő befelé irányuló hajtóerő növelhette a $I_{Na,késői}$ amplitúdóját a lassú repolarizáció során tengerimalacban (és valószínűleg nyúlban és sertésben is). A tengerimalacban jól ismert „crescendo" $I_{Na,késői}$ profilt eredetileg Clancy és munkatársai (78) „nem egyensúlyi kapuzás" elméletével magyarázták. Ez a modell a $I_{Na,késői}$ növekedését valószínűsíti a plató fázis alatt a tengerimalac rámpaszerű konfigurációjának következményeként. A tengerimalac AP-ok, valamint a repolarizációs rámpák parancsjelként való alkalmazása azonban nem tudta a kutyasejtek „decrescendo" $I_{Na,késői}$ profilját „crescendo" profillá alakítani, ami arra utal, hogy nem az AP konfiguráció, hanem a hagyományos feszültség-clamp kísérletek által feltárt 2,5-szer lassabb inaktivációs kinetika felelős a tengerimalac „crescendo" $I_{Na,késői}$ profiljáért. Mivel a $I_{Na,késői}$ egy részét a kutyaszívben a nem-kardiális Na_v-k működésének tulajdonítják (79) lehetséges, hogy ezen TTX-érzékeny csatornák relatív hozzájárulása, illetve szabályozó alegységeik eltérései eltérőek a kutyában (és az emberben) a tengerimalachoz (és a sertéshez vagy nyúlhoz) képest. A $I_{Na,késői}$ különböző fajok közötti eltérő inaktivációs kinetikája azonban további vizsgálatokat igényel.

Itt kell megemlíteni, hogy az LQT3 szindrómáért felelős SCN5 mutációk széles skálája létezik, a mutáció helyétől és típusától függően a Na_v kapuzásának számos paramétere megváltozhat, mint például az inaktiváció és a visszatérés sebessége, az aktiválódás és az inaktiváció feszültségfüggése. Kijelenthetjük, hogy a $I_{Na,késői}$ szint emelkedése minden esetben kritikus és közös jellemző (80). Mivel a teljes Na_v populációnak csak nagyon kis hányada járulhat hozzá a $I_{Na,késői}$ generálásához (hasonlítsuk össze a $I_{Na,késői}$ néhány tíz pA-es amplitúdóját a Na^+ csúcsáram több nA-es amplitúdójával), a nátriumáram kapuzás makroszkopikus változásai patofiziológiai szempontból kevésbé relevánsak, mint a $I_{Na,késői}$ tényleges nagysága.

A jelen tanulmányban rávilágítottunk arra, hogy a kutyasejtekben APVC körülmények között rögzített ATX-II-indukált áram profilja jelentősen eltér a natív kutyai $I_{Na,késői}$ alakjától, mivel az ATX-II-indukált áram mindkét fajban „crescendo" profilt mutatott - hasonlóan a tengerimalac-, nyúl- és sertésszívek natív $I_{Na,késői}$-ához, de eltér a kutyai szívizomsejtekből rögzített natív $I_{Na,késői}$-tól. Ez összefügghet azzal a jól ismert ténnyel, hogy az ATXII lassítja a Na_v-k inaktivációját (74). Az ATX-II-t széles körben használják a fokozott $I_{Na,késői}$ következményeinek farmakológiai utánzására, ami gyakran patológiás körülmények között figyelhető meg (38). A kutya szívizomsejtekben (vagyis azokban a sejtekben, amelyek a legjobb modellnek tűnnek a humán $I_{Na,késői}$ tanulmányozására) azonban ez a megközelítés félrevezető lehet a natív $I_{Na,késői}$ és az ATX-II által kiváltott áramprofilok között megfigyelt különbségek miatt. Ennek következtében az ATX-II-vel módosított Na_v-k a gyógyszerérzékenységükben is különbözhetnek a natív csatornáktól, ami megnehezíti az ATX-II jelenlétében kapott eredmények értelmezését.

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

(262,263), amely a humán szívizomsejteknél a legkisebb, a kutyában közepes erősségű, és a jelentős mértékű I_{Ks} mellett a tengerimalac kamrai szívizomban a legnagyobb (30,264). Ez egy további érv amellett, hogy kutya szívizomsejteket használjunk modellként a későbbiekben. Ez a repolarizációs tartalékban mutatkozó fajok közötti különbség (a kutya és a tengerimalac közötti) magyarázhatja a kutya magasabb ATX-II-érzékenységét is a tengerimalachoz képest. A kutya szívizomsejtekben 1 nM ATX-II kétszer nagyobb AP-megnyúlást okozott, mint 10 nM ATX-II a tengerimalac szívizomsejtek esetében. Amikor 10 nM ATX-II-t alkalmaztunk kutya szívizomsejteknél, akkor EAD-k kialakulását észleltük.

Az ezt követő kísérletsorozatunkban a GS967 (1 μM) és az I/B osztályú antiaritmiás gyógyszer (40 μM mexiletin) $I_{Na,késői}$-ra és $I_{Na,korai}$-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze kutya kamrai szívizomsejteknél a hagyományos mikroelektródás és akciós potenciál feszültség-clampes technikák kombinálásával. Megállapítottuk, hogy a $I_{Na,késői}$ szelektív blokkolójának tartott GS967 (26) a $I_{Na,korai}$-ot is gátolja. Ez a gátlás hasonló a mexiletinéhez, de nagyobb hatékonyságú. A GS967-et feltételezett szelektív $I_{Na,késői}$-blokkoló jellege alapján korábban új VI. osztályú antiaritmiás szerként említették (265). A szelektív $I_{Na,késői}$-gátlás elméleti lehetőségének megkérdőjelezése nélkül azonban egy alternatív megközelítést is figyelembe kell venni. Érdekes és még mindig megoldatlan kérdés az, hogy a $I_{Na,késői}$ szelektíven blokkolható-e. Bizonyítékok utalnak arra, hogy a szívizomszövetben a Na^+ áramot a szívspecifikus $Na_v1.5$-kon kívül más Na_v-k is vezethetik, amelyekről feltételezték, hogy mind a $I_{Na,korai}$-hoz, mind a $I_{Na,késői}$-hoz hozzájárulnak. Szerepükre vonatkozóan azonban még mindig nincs megfelelő funkcionális bizonyíték, miközben jelentős fajközi különbségeket figyeltek meg (49,51,53,113,187,266–269). Ha ezek a csatornák a $I_{Na,késői}$-ban szerepet játszanak, de a $I_{Na,korai}$-ban nem, akkor farmakológiai gátlásuk szelektív $I_{Na,késői}$-blokádot eredményezhet. A GS967-ről azonban nem mutatták ki, hogy gátolja az ilyen típusú Na_v-kat, de arról beszámoltak, hogy gátolja a szív típusú $Na_v1.5$-kat (18,19). Ebből kifolyólag nehéz megbecsülni a neuronális típusú Na_v-k relatív hozzájárulását a GS967-érzékeny áramhoz.

A jelen eredményeket és az irodalmi adatokat összevetve valószínűsíthető, hogy egy, a GS967-hez hasonló kinetikai tulajdonságokkal rendelkező vegyület nagyon ígéretes antiaritmiás szer lehetne, mivel számos in vitro (26–29,270–275) és in vivo (195,272) vizsgálat alátámasztja a GS967 erős antiaritmiás hatását. Jobb kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a mexiletin (amint azt ez a tanulmány is mutatja) és a ranolazin (18), amelyről ismert, hogy elnyomja a $I_{Na,késői}$-ot. A GS967 nagy agyi penetrációval rendelkezik (210), amely tulajdonsága miatt a későbbiekben potenciálisan új antiepileptikus vegyületként lehetne használni (276). Jelenleg nem teljesen tisztázott, hogy a GS967 idegrendszerre gyakorolt hatásai kizárják-e a hatóanyag antiaritmiás szerként való alkalmazását, azonban egy olyan új szer, amely a GS967-tel megegyező kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, de nem mutat központi idegrendszeri mellékhatásokat, ígéretes jelöltnek bizonyulhat a jövőbeli fejlesztéshez.

A $Na_v1.5$-knak többféle nyitott és zárt állapota is lehet (80) különböző gyógyszer-kötési tulajdonságokkal, amelyek az aktiválódott, az inaktiválódott és a nyugalmi csatornaállapotokat szabályozzák. Ennek megfelelően a csatornák kötőhelyeivel kölcsönhatásba lépő gyógyszerek a csatornák tényleges nyitott vagy zárt állapotától függően változó hatást gyakorolhatnak a $I_{Na,korai}$-ra és a $I_{Na,késői}$-ra. Ha egy gyógyszer gyorsan és nagy affinitással kötődik a nyitott és inaktiválódott csatornaállapotokhoz, és gyorsan disszociál a zárt nyugalmi csatornaállapotokból, akkor nagy valószínűséggel nem a $I_{Na,korai}$-ot, hanem a $I_{Na,késői}$-ot gátolja.

Ennek az az oka, hogy a csatorna zárt állapotában a gyógyszer teljesen disszociál a kötőhelyről, kivéve, ha a frekvencia nagyon magas vagy a CL rövidebb, mint a csatornáról való disszociáció. Következésképpen az, hogy egy gyógyszer szelektíven gátolja-e a $I_{Na,korai}$-ot vagy a $I_{Na,késői}$-ot, vagy mindkettőt, nagyban függ a stimulációs protokolltól, de kevésbé a meglévő specifikus $I_{Na,korai}$ vagy $I_{Na,késői}$ kötőhelyektől. A jelenlegi eredmények és a nemrégiben publikált adatok (18,19) összhangban vannak ezzel a feltételezéssel, és nem támasztják alá azt a mechanizmust, amely a specifikus $I_{Na,késői}$-gátláson alapul, amely határozottan különbözik az olyan gyógyszerek, mint a mexiletin (23,80), lidokain (18,19,23), amiodaron (20) és ranolazin (224) esetében leírt I/B osztályú antiaritmiás hatásoktól. Ez a megközelítés összhangban van a ranolazin magas (38-szoros) szelektivitásával is a $I_{Na,késői}$-ra a $I_{Na,korai}$-mal szemben (25), amely az amiodaron esetében 13-szoros (277), a flekainid esetében pedig sokkal alacsonyabbnak (csak háromszoros) bizonyult (278).

A jelen és más eredmények alapján egyértelmű, hogy a GS967 erősen sebesség- és mérsékelten fajfüggő módon hat a $I_{Na,korai}$-ra. A GS967 számos preparátumban, többek között patkány (272,273), egér (270), nyúl (26,274) és humán (275) kamrai szívizomsejtekben széles koncentrációtartományban (0,1-1 μM) rövidítette az APD-át. A megnyúlt APD GS967-tel történő rövidülése a fokozott diszperzió és a repolarizáció rövidtávú változékonyságának csökkentését eredményezheti, amely változások gyakran megelőzhetik a Torsade de Pointes aritmiák kialakulását (258–260).

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

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

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

7. Az értekezésben szereplő új kutatási eredmények

- Ez az első olyan tanulmány, amely bemutatja a humán és kutya kamrai $I_{Na,késői}$ profilját saját APVC körülmények között.
- A nem beteg humán kamrai sejtek tekintetében ez az első APVC technikát alkalmazó megfigyelés.
- Először bizonyítottuk, hogy a $I_{Na,késői}$-gátlók terápiás hatása (beleértve az APD rövidülését és a sejtek Na^+ és Ca^{2+} tartalmának csökkenését) várhatóan kevésbé lesz kifejezett a kutya és humán szívizomban, mint a tengerimalacból, nyúlból és sertésből származó hasonló preparátumokban. Ezt figyelembe kell venni, amikor a $I_{Na,késői}$ gátlószerekkel vagy módosító anyagokkal végzett farmakológiai vizsgálatok eredményeit értelmezik vagy extrapolálják emberi populációra, mivel néhány ilyen vegyülettel végzett vizsgálatot olyan fajokon végeztek, amelyek crescendo $I_{Na,késői}$ profilt mutattak (75–77).
- A jelen eredmények alapján a kutya kamrai szövetek vagy szívizomsejtek javasoltak a $I_{Na,késői}$-mal kölcsönhatásba lépő gyógyszerekkel végzett farmakológiai vizsgálatokhoz.
-A legfontosabb eredményünk annak bizonyítása volt, hogy a kutyai szívizomsejtek viszonylag jó modellként használhatók a humán $I_{Na,késői}$ vizsgálatára - ellentétben az irodalomban korábban leközölt más emlősökből, köztük a tengerimalacból, nyúlból és sertésből származó szívizomsejtekkel (34–36).
- Azt is elsőként feltártuk, hogy miért növekszik a tengerimalac $I_{Na,késői}$ az AP plató alatt, míg a kutya és a humán $I_{Na,késői}$ csökken az AP időbeli lefolyása alatt.
- Jelen vizsgálatok további fontos eredménye az volt, hogy kimutattuk, hogy a kutyasejtekben APVC körülmények között rögzített ATX-II-indukált áram profilja jelentősen eltér a natív kutyai $I_{Na,késői}$ alakjától.
- Az ATX-II-indukált áram a kutya és tengerimalac fajokban „crescendo” profilt mutatott (hasonlóan a tengerimalac-, nyúl- és sertés-szívizomsejtek natív $I_{Na,késői}$-ához) , de eltért a kutyai szívizomsejtekből rögzített natív $I_{Na,késői}$-tól. Ez összefügghet azzal a jól ismert ténnyel, hogy az ATX-II lassítja a Na_v-k inaktivációját.
- Megállapítottuk, hogy a $I_{Na,késői}$ szelektív blokkolójának tartott GS967 a $I_{Na,korai}$-ot is gátolja. Ez a gátlás hasonló a mexiletinéhez, de nagyobb hatékonyságú.
-Először bizonyítottuk, hogy a GS967 – a mexiletinhez hasonlóan – gátolta a Na^+-áram korai és késői komponensét, továbbá csökkentette az APD rövidtávú variabilitását.
- Kijelenthető, hogy a $I_{Na,késői}$ gátlása nem valósítható meg a $I_{Na,korai}$-tól teljesen függetlenül.
- Nem különbözik lényegesen a szelektívnek mondott $I_{Na,késői}$ gátlószerek, illetve az „általános” I/B osztályú Na_v gátlószerek esetén leírt frekvenciafüggő $I_{Na,késői}$ gátlás.

8. Összefoglalás

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

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

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

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

9. Summary

Although late sodium current ($I_{Na,late}$) has long been known to contribute to plateau formation of cardiac action potentials, lately it was considered as possible target for antiarrhythmic drugs. However, many aspects of this current are still poorly understood. The present work was designed to study the true profile of $I_{Na,late}$ in canine and guinea pig ventricular cells and compare them to $I_{Na,late}$ recorded in undiseased human hearts. $I_{Na,late}$ was defined as a tetrodotoxin-sensitive current, recorded under action potential voltage clamp conditions using either canonic- or self-action potentials as command signals. Under action potential voltage clamp conditions, the amplitude of canine and human $I_{Na,late}$ monotonically decreased during the plateau (decrescendo-profile), in contrast to guinea pig, where its amplitude increased during the plateau (crescendo profile). The decrescendo-profile of canine $I_{Na,late}$ could not be converted to a crescendo-morphology by application of ramp-like command voltages or command action potentials recorded from guinea pig cells. Conventional voltage clamp experiments revealed that the crescendo $I_{Na,late}$ profile in guinea pig was due to the slower decay of $I_{Na,late}$ in this species. When action potentials were recorded from multicellular ventricular preparations with sharp microelectrode, action potentials were shortened by tetrodotoxin, which effect was the largest in human, while smaller in canine, and the smallest in guinea pig preparations. It is concluded that important interspecies differences exist in the behavior of $I_{Na,late}$. At present canine myocytes seem to represent the best model of human ventricular cells regarding the properties of $I_{Na,late}$.

Another aim of the present work was to investigate the effects of GS967 on $I_{Na,late}$ and action potential (AP) morphology in canine ventricular myocytes by using action potential voltage clamp and sharp microelectrode techniques. The effects of GS967 (1 μM) were compared to those of the class I/B antiarrhythmic compound mexiletine (40 μM). It is concluded that the electrophysiological effects of GS967 are like those of mexiletine. In addition, beat-to-beat variability was significantly decreased by both GS967 and mexiletine.
These results should be considered when pharmacological studies with $I_{Na\text{-}late}$ are interpreted and extrapolated to human. Accordingly, canine ventricular tissues or myocytes are suggested for pharmacological studies with $I_{Na\text{-}late}$ inhibitors or modifiers. Incorporation of present data to human action potential models may yield a better understanding of the role of $I_{Na\text{-}late}$ in action potential morphology, arrhythmogenesis, and intracellular calcium dynamics.

The late sodium current plays a key role in the electrical and mechanical function of the heart. The medical relevance of the late sodium current in the pathophysiology and treatment of many cardiovascular diseases is prominent. This includes the previously mentioned cardiac arrhythmias in relation to prolonged action potentials and triggered activity. One can mention its role in heart failure in relation to calcium overload and energy consumption (more ATP is needed to maintain ionic balance). It is also important to mention the ischaemia-reperfusion injury in ischaemic heart disease. At present, no other agent than ranolazine is used in clinical practice, so further research is ongoing to develop new drugs that target late sodium current reduction, improving the prognosis of various cardiac diseases. Accordingly, inhibition of late sodium current may be a promising therapeutic strategy for the treatment of these conditions.

10. Köszönetnyilvánítás

Ez a dolgozat nem készülhetett volna el a szerzőt támogató személyek munkája nélkül. A legnagyobb köszönet dr. Horváth Balázs Docens Urat illeti, aki folyamatosan támogatott szakmailag és emberileg és bármikor számíthattam rá, ha nehézségem adódott a PhD képzésem során.

Köszönet illeti dr. Nánási Péter Professzor Urat, illetve dr. Szentandrássy Norbert Dékánhelyettes Urat, akik a kísérletek megtervezésében és a cikk véglegesítésében lendítették előre a munkámat. Szakmai segítségükre és baráti tanácsaikra mindig számíthattam. A bátorításért dr. Bányász Tamás Professzor Úrnak és dr. Magyar János Professzor Úrnak fejezem ki hálámat.

Hálával tartozom a munkacsoportunk korábbi dolgozóinak, dr. Kistamás Kornélnak, dr. Veress Rolandnak, akik tanácsokkal láttak el az évek során és munkájukkal segítettek a cikkek megvalósulásában.

Köszönettel tartozom dr. Kiss Dénesnek, dr. Dienes Csabának és dr. Kovács Zsigmondnak a mérésekben nyújtott segítségért és a csapatmunkáért. A kísérletek előkészítése során szintén sok segítséget nyújtott Sági Éva.

Külön köszönettel tartozom dr. Csernoch László Professzor Úrnak, aki a Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola vezetőjeként és az Élettani Intézet igazgatójaként lehetővé tette számomra a munka elvégzését.

Köszönöm az Élettani Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, hogy támogattak és segítették munkámat. Végül, de nem utolsósorban szüleimnek mondok köszönetet. Jelen dolgozat megírását és PhD tanulmányaimat az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-2 és ÚNKP-21-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja, valamint az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-0009 című projekt támogatta.

11. Irodalomjegyzék

1. Reuter H, Beeler GW. Sodium Current in Ventricular Myocardial Fibers. Science (1979). 1969 Jan 24;163(3865):397–9.
2. Horváth B, Szentandrássy N, Almássy J, Dienes C, Kovács ZM, Nánási PP, et al. Late Sodium Current of the Heart: Where Do We Stand and Where Are We Going? Pharmaceuticals. 2022 Feb 15;15(2):231.
3. Kiyosue T, Arita M. Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes. Circ Res. 1989;64(2):389–97.
4. Maier LS, Sossalla S. The late Na current as a therapeutic target: Where are we? J Mol Cell Cardiol. 2013 Aug;61:44–50.
5. Coppini R, Ferrantini C, Yao L, Fan P, Del Lungo M, Stillitano F, et al. Late sodium current inhibition reverses electromechanical dysfunction in human hypertrophic cardiomyopathy. Circulation. 2013 Feb 5;127(5):575–84.
6. Pourrier M, Williams S, Mcafee D, Belardinelli L, Fedida D. CrossTalk proposal: The late sodium current is an important player in the development of diastolic heart failure (heart failure with a preserved ejection fraction). Journal of Physiology. 2014 Feb;592(3):411–4.
7. Antzelevitch C, Nesterenko V, Shryock JC, Rajamani S, Song Y, Belardinelli L. The role of late ina in development of cardiac arrhythmias. Handb Exp Pharmacol. 2014;221:137–68.
8. Sossalla S, Maurer U, Schotola H, Hartmann N, Didié M, Zimmermann WH, et al. Diastolic dysfunction and arrhythmias caused by overexpression of CaMKIIδC can be reversed by inhibition of late Na+ current. Basic Res Cardiol. 2011 Mar;106(2):263–72.
9. Liu T, Rourke BO. Enhancing mitochondrial Ca2+ uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. Circ Res. 2008 Aug 1;103(3):279–88.
10. Clancy CE, Tateyama M, Liu H, Wehrens XHT, Kass RS. Non-equilibrium gating in cardiac Na+ channels: An original mechanism of arrhythmia. Circulation. 2003 May 6;107(17):2233–7.
11. Song W, Shou W. Cardiac sodium channel Nav1.5 mutations and cardiac arrhythmia. Pediatr Cardiol. 2012 Aug;33(6):943–9.
12. Szentandrassy N, Nagy D, Ruzsnavszky F, Harmati G, Banyasz T, Magyar J, et al. Powerful Technique to Test Selectivity of Agents Acting on Cardiac Ion Channels: The Action Potential Voltage-Clamp. Curr Med Chem. 2011 Aug 1;18(24):3737–56.
13. Grandi E, Herren AW. CaMKII-dependent regulation of cardiac Na+ homeostasis. Front Pharmacol. 2014;5 MAR.
14. Maier LS. CaMKII regulation of voltage-gated sodium channels and cell excitability. Heart Rhythm. 2011 Mar;8(3):474–7.
15. Wingo TL, Shah VN, Anderson ME, Lybrand TP, Chazin WJ, Balser JR. An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):219–25.
16. Gardill BR, Rivera-Acevedo RE, Tung CC, Van Petegem F. Crystal structures of Ca^{2+}–calmodulin bound to Na_V C-terminal regions suggest role for EF-hand domain in

binding and inactivation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019 May 28;116(22):10763–72.
17. Poulet C, Wettwer E, Grunnet M, Jespersen T, Fabritz L, Matschke K, et al. Late sodium current in human atrial cardiomyocytes from patients in sinus rhythm and atrial fibrillation. PLoS One. 2015 Jun 29;10(6).
18. Potet F, Vanoye CG, George AL. Use-dependent block of human cardiac sodium channels by GS967. Mol Pharmacol. 2016 Jul 1;90(1):52–60.
19. Potet F, Egecioglu DE, Burridge PW, George AL. GS-967 and eleclazine block sodium channels in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Mol Pharmacol. 2020 Nov 1;98(5):540–7.
20. Ghovanloo MR, Abdelsayed M, Ruben PC. Effects of amiodarone and N-desethylamiodarone on cardiac voltage-gated sodium channels. Front Pharmacol. 2016 Mar 1;7(MAR).
21. Salvage SC, Chandrasekharan KH, Jeevaratnam K, Dulhunty AF, Thompson AJ, Jackson AP, et al. Multiple targets for flecainide action: implications for cardiac arrhythmogenesis. Br J Pharmacol. 2018 Apr 1;175(8):1260–78.
22. Varro A, Elharrar V, Surawicz B. Frequency-dependent effects of several class I antiarrhythmic drugs on Vmax of action potential upstroke in canine cardiac purkinje fibers. J Cardiovasc Pharmacol. 1985;7(3):482–92.
23. Varro A, Nakaya Y, Elharrar V, Surawicz B. Effect of antiarrhythmic drugs on the cycle length-dependent action potential duration in dog purkinje and ventricular muscle fibers. J Cardiovasc Pharmacol. 1986;8(1):178–85.
24. Preliminary Report: Effect of Encainide and Flecainide on Mortality in a Randomized Trial of Arrhythmia Suppression after Myocardial Infarction. New England Journal of Medicine. 1989 Aug 10;321(6):406–12.
25. UNDROVINAS AI, BELARDINELLI L, UNDROVINAS NA, SABBAH HN. Ranolazine Improves Abnormal Repolarization and Contraction in Left Ventricular Myocytes of Dogs with Heart Failure by Inhibiting Late Sodium Current. J Cardiovasc Electrophysiol. 2006 May 21;17(s1).
26. Belardinelli L, Liu G, Smith-Maxwell C, Wang WQ, El-Bizri N, Hirakawa R, et al. A novel, potent, and selective inhibitor of cardiac late sodium current suppresses experimental arrhythmias. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2013 Jan;344(1):23–32.
27. Azam MA, Zamiri N, Massé S, Kusha M, Lai PFH, Nair GK, et al. Effects of late sodium current blockade on ventricular refibrillation in a rabbit model. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2017 Mar 1;10(3).
28. del Canto I, Santamaría L, Genovés P, Such-Miquel L, Arias-Mutis O, Zarzoso M, et al. Effects of the Inhibition of Late Sodium Current by GS967 on Stretch-Induced Changes in Cardiac Electrophysiology. Cardiovasc Drugs Ther. 2018 Oct 1;32(5):413–25.
29. Bossu A, Houtman MJC, Meijborg VMF, Varkevisser R, Beekman HDM, Dunnink A, et al. Selective late sodium current inhibitor GS-458967 suppresses Torsades de Pointes by mostly affecting perpetuation but not initiation of the arrhythmia. Br J Pharmacol. 2018 Jun 1;175(12):2470–82.
30. Jost N, Virág L, Comtois P, Ördög B, Szuts V, Seprényi G, et al. Ionic mechanisms limiting cardiac repolarization reserve in humans compared to dogs. Journal of Physiology. 2013 Sep;591(17):4189–206.

31. Szabó G, Szentandrássy N, Bíró T, Tóth BI, Czifra G, Magyar J, et al. Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: Epicardium versus midmyocardium. Pflugers Arch. 2005 Aug;450(5):307–16.
32. Szentadrassy N, Banyasz T, Biro T, Szabo G, Toth BI, Magyar J, et al. Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. Cardiovasc Res. 2005 Mar 1;65(4):851–60.
33. Jost N, Acsai K, Horváth B, Bányász T, Baczkó I, Bitay M, et al. Contribution of IKr and IK1 to ventricular repolarization in canine and human myocytes: Is there any influence of action potential duration? Basic Res Cardiol. 2009;104(1):33–41.
34. Hegyi B, Bányász T, Izu LT, Belardinelli L, Bers DM, Chen-Izu Y. β-adrenergic regulation of late Na+ current during cardiac action potential is mediated by both PKA and CaMKII. J Mol Cell Cardiol. 2018 Oct 1;123:168–79.
35. Horvath B, Banyasz T, Jian Z, Hegyi B, Kistamas K, Nanasi PP, et al. Dynamics of the late Na+ current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations. J Mol Cell Cardiol. 2013 Nov;64:59–68.
36. Hegyi B, Bossuyt J, Griffiths LG, Shimkunas R, Coulibaly Z, Jian Z, et al. Complex electrophysiological remodeling in postinfarction ischemic heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Mar 27;115(13):E3036–44.
37. Mitsuiye T, Noma A. Inactivation of cardiac Na+ channel simply through open states as revealed by single-channel analysis in guinea pig ventricular myocytes. Japanese Journal of Physiology. 2002 Oct;52(5):457–69.
38. Scanley BE, Hanck DA, Chay T, Fozzard HA. Kinetic analysis of single sodium channels from canine cardiac purkinje cells. Journal of General Physiology. 1990 Mar 1;95(3):411–37.
39. Zaza A, Rocchetti M. The late Na+ current - Origin and pathophysiological relevance. Cardiovasc Drugs Ther. 2013 Feb;27(1):61–8.
40. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002 Jan 10;415(6868):198–205.
41. Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low Efficiency of Ca^{2+} Entry Through the Na^{+}-Ca^{2+} Exchanger as Trigger for Ca^{2+} Release From the Sarcoplasmic Reticulum. Circ Res. 1997 Dec;81(6):1034–44.
42. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, et al. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. Neuron. 2000 Nov;28(2):365–8.
43. Salgado-Mozo S, Thirouin ZS, Wyrosdic JC, García-Hernández U, Bourque CW. Na_X Channel Is a Physiological $[Na^{+}]$ Detector in Oxytocin- and Vasopressin-Releasing Magnocellular Neurosecretory Cells of the Rat Supraoptic Nucleus. The Journal of Neuroscience. 2023 Dec 6;43(49):8306–16.
44. Huang W, Lee SL, Sjoquist M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 1995 Mar 1;268(3):R634–40.
45. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. Pharmacol Rev. 2005 Dec;57(4):397–409.
46. De Lera Ruiz M, Kraus RL. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. J Med Chem. 2015 Sep 24;58(18):7093–118.
47. Gellens ME, George AL, Chen L, Chahine M, Horn R, Barchi RL, et al. 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):554–8.

48. Maier SKG, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA, et al. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 18;100(6):3507–12.
49. Maier SKG, Westenbroek RE, Schenkman KA, Feigl EO, Scheuer T, Catterall WA. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):4073–8.
50. Yang T, Atack TC, Stroud DM, Zhang W, Hall L, Roden DM. Blocking Scn10a channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. Circ Res. 2012 Jul 20;111(3):322–32.
51. Biet M, Barajas-Martínez H, Ton AT, Delabre JF, 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 Nov;53(5):593–8.
52. Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, et al. Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. J Mol Cell Cardiol. 2005;38(3):475–83.
53. Haufe V, Cordeiro JM, Zimmer T, Wu YS, Schiccitano S, Benndorf K, et al. Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current I Na is greater in dog heart Purkinje fibers than in ventricles. Cardiovasc Res. 2005 Jan 1;65(1):117–27.
54. Cusdin FS, Clare JJ, Jackson AP. Trafficking and Cellular Distribution of Voltage-Gated Sodium Channels. Traffic. 2008 Jan;9(1):17–26.
55. Brackenbury WJ, Isom LL. Na+ Channel ? Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. Front Pharmacol. 2011;2.
56. Kazen-Gillespie KA, Ragsdale DS, D'Andrea MR, Mattei LN, Rogers KE, Isom LL. Cloning, Localization, and Functional Expression of Sodium Channel β1A Subunits. Journal of Biological Chemistry. 2000 Jan;275(2):1079–88.
57. Qin N, D'Andrea MR, Lubin ML, Shafaee N, Codd EE, Correa AM. Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel β_{1B} subunit, a novel splicing variant of the β_1 subunit. Eur J Biochem. 2003 Dec;270(23):4762–70.
58. Chen C, Cannon SC. Modulation of Na+channel inactivation by the ?1 subunit: A deletion analysis. Pfl&#xfffd;gers Archiv European Journal of Physiology. 1995 Dec;431(2):186–95.
59. Yu EJ, Ko SH, Lenkowski PW, Pance A, Patel MK, Jackson AP. Distinct domains of the sodium channel β3-subunit modulate channel-gating kinetics and subcellular location. Biochemical Journal. 2005 Dec 15;392(3):519–26.
60. Jiang D, Shi H, Tonggu L, Gamal El-Din TM, Lenaeus MJ, Zhao Y, et al. Structure of the Cardiac Sodium Channel. Cell. 2020 Jan;180(1):122-134.e10.
61. Sunami A, Dudley SC, Fozzard HA. Sodium channel selectivity filter regulates antiarrhythmic drug binding. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997 Dec 9;94(25):14126–31.
62. Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. Nature. 2011 Jul 10;475(7356):353–8.
63. Yarov-Yarovoy V, DeCaen P. The Sodium Channel Voltage Sensor Slides to Rest. Trends Pharmacol Sci. 2019 Oct;40(10):718–20.
64. Smith MR, Goldin AL. Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. Biophys J. 1997 Oct;73(4):1885–95.

65. Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms. Neuron. 2000 Apr;26(1):13–25.
66. Kellenberger S, Scheuer T, Catterall WA. Movement of the Na+ Channel Inactivation Gate during Inactivation. Journal of Biological Chemistry. 1996 Nov;271(48):30971–9.
67. West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992 Nov 15;89(22):10910–4.
68. Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL. Amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992 Nov 15;89(22):10905–9.
69. Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, et al. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature. 1989 Jun;339(6226):597–603.
70. Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na+ Channel Inactivation Gate Is a Molecular Complex. J Gen Physiol. 2004 Feb 1;123(2):155–65.
71. Armstrong CM. Na channel inactivation from open and closed states. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006 Nov 21;103(47):17991–6.
72. Lei M, Jones SA, Liu J, Lancaster MK, Fung SSM, Dobrzynski H, et al. Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. Journal of Physiology. 2004 Sep 15;559(3):835–48.
73. Malhotra JD, Chen C, Rivolta I, Abriel H, Malhotra R, Mattei LN, et al. Characterization of sodium channel α- and β-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. Circulation. 2001 Mar 6;103(9):1303–10.
74. Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A. Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1979;5(4).
75. Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RSD, Silverman N, Lesch M, Undrovinas AI. Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. Circulation. 1998 Dec 8;98(23):2545–52.
76. Zaniboni M, Pollard AE, Yang L, Spitzer KW. Beat-to-beat repolarization variability in ventricular myocytes and its suppression by electrical coupling. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2000 Mar 1;278(3):H677–87.
77. Bárándi L, Virág L, Jost N, Horváth Z, Koncz I, Papp R, et al. Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations. Basic Res Cardiol. 2010 May 3;105(3):315–23.
78. Bányász T, Horváth B, Virág L, Bárándi L, Szentandrássy N, Harmati G, et al. Reverse rate dependency is an intrinsic property of canine cardiac preparations. Cardiovasc Res. 2009 Nov;84(2):237–44.
79. Maltsev VA, Undrovinas AI. A multi-modal composition of the late Na+ current in human ventricular cardiomyocytes. Cardiovasc Res. 2006 Jan;69(1):116–27.
80. Mangold KE, Brumback BD, Angsutararux P, Voelker TL, Zhu W, Kang PW, et al. Mechanisms and models of cardiac sodium channel inactivation. Channels. 2017 Nov 2;11(6):517–33.
81. Goldin AL. Mechanisms of sodium channel inactivation. Curr Opin Neurobiol. 2003 Jun;13(3):284–90.
82. Liu H, Sun HY, Lau CP, Li GR. Regulation of voltage-gated cardiac sodium current by epidermal growth factor receptor kinase in guinea pig ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2007 Apr;42(4):760–8.

83. Wang DW, Viswanathan PC, Balser JR, George AL, Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. Circulation. 2002 Jan 22;105(3):341–6.
84. Noble D. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. Heart. 2006 Jul 1;92(suppl_4):iv1–5.
85. Hegyi B, Bányász T, Izu LT, Belardinelli L, Bers DM, Chen-Izu Y. β-adrenergic regulation of late Na+ current during cardiac action potential is mediated by both PKA and CaMKII. J Mol Cell Cardiol. 2018 Oct 1;123:168–79.
86. Luo A, Ma J, Song Y, Qian C, Wu Y, Zhang P, et al. Larger late sodium current density as well as greater sensitivities to ATX II and ranolazine in rabbit left atrial than left ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014 Feb 1;306(3).
87. Wu L, Ma J, Li H, Wang C, Grandi E, Zhang P, et al. Late sodium current contributes to the reverse rate-dependent effect of IKr inhibition on ventricular repolarization. Circulation. 2011 Apr 26;123(16):1713–20.
88. Nagatomo T, January CT, Ye B, Abe H, Nakashima Y, Makielski JC. Rate-dependent QT shortening mechanism for the LQT3 ΔKPQ mutant. Cardiovasc Res. 2002;54(3):624–9.
89. Carmeliet E. Action potential duration, rate of stimulation, and intracellular sodium. J Cardiovasc Electrophysiol. 2006 May;17(SUPPL. 1).
90. Szentandrássy N, Kistamás K, Hegyi B, Horváth B, Ruzsnavszky F, Váczi K, et al. Contribution of ion currents to beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes. Pflugers Arch. 2015 Jul 13;467(7):1431–43.
91. Song Y, Shryock JC, Belardinelli L. An increase of late sodium current induces delayed afterdepolarizations and sustained triggered activity in atrial myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 May;294(5).
92. Bezzina C, Veldkamp MW, Van Den Berg MP, Postma A V., Rook MB, Viersma JW, et al. A single Na+ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. Circ Res. 1999 Dec 3;85(12):1206–13.
93. Wu L, Shryock JC, Song Y, Belardinelli L. An increase in late sodium current potentiates the proarrhythmic activities of low-risk QT-prolonging drugs in female rabbit hearts. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006 Feb;316(2):718–26.
94. Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: Implications for repolarization variability. Eur J Heart Fail. 2007 Mar;9(3):219–27.
95. Maltsev VA, Undrovinas A. Late sodium current in failing heart: Friend or foe? Prog Biophys Mol Biol. 2008 Jan;96(1–3):421–51.
96. Maltsev VA, Kyle JW, Undrovinas A. Late Na+ current produced by human cardiac Na+ channel isoform Nav1.5 is modulated by its β1 subunit. Journal of Physiological Sciences. 2009 May;59(3):217–25.
97. Xi Y, Wu G, Yang L, Han K, Du Y, Wang T, et al. Increased late sodium currents are related to transcription of neuronal isoforms in a pressure-overload model. Eur J Heart Fail. 2009;11(8):749–57.
98. Guo D, Young L, Wu Y, Belardinelli L, Kowey PR, Yan GX. Increased late sodium current in left atrial myocytes of rabbits with left ventricular hypertrophy: Its role in the genesis of atrial arrhythmias. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 May;298(5).

99. Trenor B, Cardona K, Gomez JF, Rajamani S, Ferrero JM, Belardinelli L, et al. Simulation and mechanistic investigation of the arrhythmogenic role of the late sodium current in human heart failure. PLoS One. 2012 Mar 12;7(3).
100. Belardinellia L. Inhibition of late (sustained/persistent) sodium current: a potential drug target to reduce intracellular sodium-dependent calcium overload and its detrimental effects on cardiomyocyte function. European Heart Journal Supplements. 2004 Dec 1;6(Suppl I):i3–7.
101. Ravens U, Wettwer E, Hála O. Pharmacological modulation of ion channels and transporters. Cell Calcium. 2004;35(6):575–82.
102. Belardinelli L, Shryock JC, Fraser H. Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: Effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. Heart. 2006 Jul;92(SUPPL. 4).
103. Hoyer K, Song Y, Wang D, Phan D, Balschi J, Ingwall JS, et al. Reducing the late sodium current improves cardiac function during sodium pump inhibition by ouabain. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2011 May;337(2):513–23.
104. Morita N, Lee JH, Xie Y, Sovari A, Qu Z, Weiss JN, et al. Suppression of re-entrant and multifocal ventricular fibrillation by the late sodium current blocker ranolazine. J Am Coll Cardiol. 2011 Jan 18;57(3):366–75.
105. Wang DW, Yazawa K, George AL, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na+ channel mutations in the congenital long QT syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 12;93(23):13200–5.
106. Ruan Y, Liu N, Priori SG. Sodium channel mutations and arrhythmias. Nat Rev Cardiol. 2009;6(5):337–48.
107. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. Cell. 1995 Mar 10;80(5):805–11.
108. Wang Q, Shen J, Li Z, Timothy K, Vincent GM, Priori SG, et al. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. Hum Mol Genet. 1995;4(9):1603–7.
109. Alekov AK, Rahman MM, Mitrovic N, Lehmannhorn F, Lerche H. A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. Journal of Physiology. 2000 Dec 15;529(3):533–40.
110. Akalin F, Tirtir A, Yilmaz Y. Increased QT dispersion in epileptic children. Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics. 2003 Aug 1;92(8):916–20.
111. Komajda M, Frank R, Vedel J, Fontaine G, Petitot JC, Grosgogeat Y. Intracardiac conduction defects in dystrophia myotonica. Electrophysiological study of 12 cases. Br Heart J. 1980;43(3):315–20.
112. Péréon Y, Lande G, Demolombe S, Nguyen The Tich S, Sternberg D, Le Marec H, et al. Paramyotonia congenita with an SCN4A mutation affecting cardiac repolarization. Neurology. 2003 Jan 28;60(2):340–2.
113. Haufe V, Camacho JA, Dumaine R, Günther B, Bollensdorff C, von Banchet GS, et al. Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na+ channels in the developing mouse heart. Journal of Physiology. 2005 May 1;564(3):683–96.
114. Horváth B, Magyar J, Szentandrássy N, Birinyi P, Nánási PP, Bányász T. Contribution of IKs to ventricular repolarization in canine myocytes. Pflugers Arch. 2006 Sep;452(6):698–706.

115. Huang X, Du Y, Yang P, Lin S, Xi Y, Yang Z, et al. Age-dependent alterations of voltage-gated Na+ channel isoforms in rat sinoatrial node. Mech Ageing Dev. 2015 Dec 1;152:80–90.
116. Li W, Yu Y, Hou JW, Zhou ZW, Guo K, Zhang PP, et al. Larger rate dependence of late sodium current in cardiac Purkinje cells: A potential link to arrhythmogenesis. Heart Rhythm. 2017 Mar 1;14(3):422–31.
117. Burashnikov A, Antzelevitch C. Role of late sodium channel current block in the management of atrial fibrillation. Cardiovasc Drugs Ther. 2013 Feb;27(1):79–89.
118. Li GR, Lau CP, Shrier A. Heterogeneity of Sodium Current in Atrial vs Epicardial Ventricular Myocytes of Adult Guinea Pig Hearts. J Mol Cell Cardiol. 2002 Sep;34(9):1185–94.
119. Burashnikov A, Di Diego JM, Zygmunt AC, Belardinelli L, Antzelevitch C. Atrium-selective sodium channel block as a strategy for suppression of atrial fibrillation: Differences in sodium channel inactivation between atria and ventricles and the role of ranolazine. Circulation. 2007 Oct;116(13):1449–57.
120. Burashnikov A, Antzelevitch C. Atrial-selective sodium channel blockers: Do they exist? J Cardiovasc Pharmacol. 2008 Aug;52(2):121–8.
121. Persson F, Andersson B, Duker G, Jacobson I, Carlsson L. Functional effects of the late sodium current inhibition by AZD7009 and lidocaine in rabbit isolated atrial and ventricular tissue and Purkinje fibre. Eur J Pharmacol. 2007 Mar 8;558(1–3):133–43.
122. Despa S, Bers DM. Na+ transport in the normal and failing heart - Remember the balance. J Mol Cell Cardiol. 2013 Aug;61:2–10.
123. Makielski JC, Farley AL. Na+ current in human ventricle: Implications for sodium loading and homeostasis. J Cardiovasc Electrophysiol. 2006 May;17(SUPPL. 1).
124. Shryock JC, Song Y, Rajamani S, Antzelevitch C, Belardinelli L. The arrhythmogenic consequences of increasing late INa in the cardiomyocyte. Cardiovasc Res. 2013 Sep 1;99(4):600–11.
125. Janvier NC, Boyett MR. The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. Cardiovasc Res. 1996 Jul 1;32(1):69–84.
126. SIPIDO KR, BITO V, ANTOONS G, VOLDERS PG, VOS MA. Na/Ca Exchange and Cardiac Ventricular Arrhythmias. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar 13;1099(1):339–48.
127. Ginsburg KS, Weber CR, Bers DM. Cardiac Na+-Ca2+ exchanger: Dynamics of Ca2+-dependent activation and deactivation in intact myocytes. Journal of Physiology. 2013 Apr;591(8):2067–86.
128. Fujioka Y, Hiroe K, Matsuoka S. Regulation kinetics of Na+-Ca2+ exchange current in guinea-pig ventricular myocytes. Journal of Physiology. 2000 Dec 15;529(3):611–23.
129. Linz KW, Meyer R. Control of L-type calcium current during the action potential of guinea-pig ventricular myocytes. Journal of Physiology. 1998 Dec 1;513(2):425–42.
130. Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. Pflugers Arch. 2000;439(5):588–99.
131. Bányász T, Fülöp L, Magyar J, Szentandrássy N, Varró A, Nánási PP. Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. Cardiovasc Res. 2003 May 1;58(1):66–75.
132. Fülöp L, Bányász T, Magyar J, Szentandrássy N, Varró A, Nánási PP. Reopening of L-type calcium channels in human ventricular myocytes during applied epicardial action potentials. Acta Physiol Scand. 2004 Jan;180(1):39–47.

133. Banyasz T, Horvath B, Jian Z, Izu LT, Ye CI. Profile of L-type Ca 2+ current and Na +/Ca 2+ exchange current during cardiac action potential in ventricular myocytes. Heart Rhythm. 2012 Jan;9(1):134–42.
134. Cheung JY, Zhang XQ, Song J, Gao E, Rabinowitz JE, Chan TO, et al. Phospholemman: A novel cardiac stress protein. Clin Transl Sci. 2010 Aug;3(4):189–96.
135. Bers DM, Grandi E. Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. J Cardiovasc Pharmacol. 2009 Sep;54(3):180–7.
136. Scheuer T. Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. Semin Cell Dev Biol. 2011;22(2):160–5.
137. Maltsev VA, Reznikov V, Undrovinas NA, Sabbah HN, Undrovinas A. Modulation of late sodium current by Ca2+, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: Similarities and differences. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 Apr;294(4).
138. Tan HL, Kupershmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AAM, et al. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. Nature. 2002 Jan 24;415(6870):442–7.
139. Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass RS, Pitt GS. Calmodulin mediates Ca2+ sensitivity of sodium channels. Journal of Biological Chemistry. 2004 Oct 22;279(43):45004–12.
140. Sarhan MF, Tung CC, Van Petegem F, Ahern CA. Crystallographic basis for calcium regulation of sodium channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 28;109(9):3558–63.
141. Zhang T, Brown JH. Role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. Cardiovasc Res. 2004 Aug 15;63(3):476–86.
142. Anderson ME. Calmodulin kinase signaling in heart: An intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. Pharmacol Ther. 2005;106(1):39–55.
143. Song Y, Shryock JC, Wu L, Belardinelli L. Antagonism by ranolazine of the pro-arrhythmic effects of increasing late INa in guinea pig ventricular myocytes. J Cardiovasc Pharmacol. 2004 Aug;44(2):192–9.
144. Song Y, Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L. Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006;318(1):214–22.
145. Sossalla S, Wagner S, Rasenack ECL, Ruff H, Weber SL, Schöndube FA, et al. Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts - Role of late sodium current and intracellular ion accumulation. J Mol Cell Cardiol. 2008 Jul;45(1):32–43.
146. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, et al. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase IIδ is required for late INa augmentation leading to cellular Na and Ca overload. Circ Res. 2011 Mar 4;108(5):555–65.
147. Erickson JR, Joiner M ling A, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis C V., et al. A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. Cell. 2008 May 2;133(3):462–74.
148. Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox regulation of sodium and calcium handling. Antioxid Redox Signal. 2013 Mar 20;18(9):1063–77.

149. Murphy L, Renodin D, Antzelevitch C, di Diego JM, Cordeiro JM. Extracellular proton depression of peak and late Na+ current in the canine left ventricle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Sep;301(3).
150. Jones DK, Peters CH, Tolhurst SA, Claydon TW, Ruben PC. Extracellular proton modulation of the cardiac voltage-gated sodium channel, NaV1.5. Biophys J. 2011;101(9):2147–56.
151. Jones DK, Claydon TW, Ruben PC. Extracellular protons inhibit charge immobilization in the cardiac voltage-gated sodium channel. Biophys J. 2013 Jul 2;105(1):101–7.
152. Jones DK, Peters CH, Allard CR, Claydon TW, Ruben PC. Proton sensors in the pore domain of the cardiac voltage-gated sodium channel. Journal of Biological Chemistry. 2013 Feb 15;288(7):4782–91.
153. Ju YK, Saint DA, Gage PW. Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. Journal of Physiology. 1996;497(2):337–47.
154. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: From channels to arrhythmias. Physiol Rev. 1999;79(3):917–1017.
155. Hammarström AKM, Gage PW. Hypoxia and persistent sodium current. European Biophysics Journal. 2002 Sep;31(5):323–30.
156. Shimoda LA, Polak J. Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function. Am J Physiol Cell Physiol. 2011 May;300(5).
157. Tang Q, Ma J, Zhang P, Wan W, Kong L, Wu L. Persistent sodium current and Na +/H + exchange contributes to the augmentation of the reverse Na +/Ca 2+ exchange during hypoxia or acute ischemia in ventricular myocytes. Pflugers Arch. 2012 Apr;463(4):513–22.
158. Wang W, Ma J, Zhang P, Luo A. Redox reaction modulates transient and persistent sodium current during hypoxia in guinea pig ventricular myocytes. Pflugers Arch. 2007 Jun;454(3):461–75.
159. Burnashev NA, Undrovinas AI, Fleidervish IA, Makielski JC, Rosenshtraukh L V. Modulation of cardiac sodium channel gating by lysophosphatidylcholine. J Mol Cell Cardiol. 1991;23(SUPPL. 1):23–30.
160. Undrovinas AI, Fleidervish IA, Makielski JC. Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. Circ Res. 1992;71(5):1231–41.
161. Wu J, Corr PB. Palmitoyl carnitine modifies sodium currents and induces transient inward current in ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1994;266(3 35-3).
162. Pignier C, Revenaz C, Rauly-Lestienne I, Cussac D, Delhon A, Gardette J, et al. Direct protective effects of poly-unsaturated fatty acids, DHA and EPA, against activation of cardiac late sodium current: A mechanism for ischemia selectivity. Basic Res Cardiol. 2007 Nov;102(6):553–64.
163. Ahern GP, Hsu SF, Klyachko VA, Jackson MB. Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. Journal of Biological Chemistry. 2000 Sep 15;275(37):28810–5.
164. Cheng J, Valdivia CR, Vaidyanathan R, Balijepalli RC, Ackerman MJ, Makielski JC. Caveolin-3 suppresses late sodium current by inhibiting nNOS-dependent S-nitrosylation of SCN5A. J Mol Cell Cardiol. 2013 Aug;61:102–10.
165. Burashnikov A. Late INa Inhibition as an Antiarrhythmic Strategy. J Cardiovasc Pharmacol. 2017 Sep;70(3):159–67.

166. Clancy CE, Tateyama M, Kass RS. Insights into the molecular mechanisms of bradycardia-triggered arrhythmias in long QT-3 syndrome. Journal of Clinical Investigation. 2002 Nov 1;110(9):1251–62.
167. Undrovinas A, Maltsev V. Late Sodium Current is a New Therapeutic Target to Improve Contractility and Rhythm in Failing Heart. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2008 Oct 1;6(4):348–59.
168. Wu L, Rajamani S, Li H, January CT, Shryock JC, Belardinelli L. Reduction of repolarization reserve unmasks the proarrhythmic role of endogenous late Na^+ current in the heart. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2009 Sep;297(3):H1048–57.
169. Yao L, Fan P, Jiang Z, Viatchenko-Karpinski S, Wu Y, Kornyeyev D, et al. Na_v 1.5-dependent persistent Na^+ influx activates CaMKII in rat ventricular myocytes and N_{1325} S mice. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2011 Sep;301(3):C577–86.
170. Nattel S, Harada M. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation. J Am Coll Cardiol. 2014 Jun;63(22):2335–45.
171. Zaza A, Belardinelli L, Shryock JC. Pathophysiology and pharmacology of the cardiac “late sodium current.” Pharmacol Ther. 2008 Sep;119(3):326–39.
172. Ma J, Song Y, Shryock JC, Hu L, Wang W, Yan X, et al. Ranolazine Attenuates Hypoxia- and Hydrogen Peroxide-induced Increases in Sodium Channel Late Openings in Ventricular Myocytes. J Cardiovasc Pharmacol. 2014 Jul;64(1):60–8.
173. Undrovinas AI, Maltsev VA, Sabbah HN. Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. Cell Mol Life Sci. 1999 Mar 1;55(3):494–505.
174. Tomaselli GF, Zipes DP. What Causes Sudden Death in Heart Failure? Circ Res. 2004 Oct 15;95(8):754–63.
175. Merchant FM, Armoundas AA. Role of substrate and triggers in the genesis of cardiac alternans, from the myocyte to the whole heart: Implications for therapy. Circulation. 2012 Jan 24;125(3):539–49.
176. Pieske B, Maier LS, Piacentino V, Weisser J, Hasenfuss G, Houser S. Rate dependence of [Na+]i and contractility in nonfailing and failing human myocardium. Circulation. 2002 Jul 23;106(4):447–53.
177. Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM, Bers DM. Intracellular Na+ concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. Circulation. 2002 May 28;105(21):2543–8.
178. Schillinger W, Teucher N, Christians C, Kohlhaas M, Sossalla S, Van Nguyen P, et al. High intracellular Na+ preserves myocardial function at low heart rates in isolated myocardium from failing hearts. Eur J Heart Fail. 2006 Nov;8(7):673–80.
179. Louch WE, Hougen K, Mørk HK, Swift F, Aronsen JM, Sjaastad I, et al. Sodium accumulation promotes diastolic dysfunction in end-stage heart failure following Serca2 knockout. Journal of Physiology. 2010 Feb;588(3):465–78.
180. 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):218–25.
181. Beyder A, Strege PR, Reyes S, Bernard CE, Terzic A, Makielski J, et al. Ranolazine decreases mechanosensitivity of the voltage-gated sodium ion channel NaV1.5: A novel mechanism of drug action. Circulation. 2012 Jun 5;125(22):2698–706.

182. Undrovinas AI, Maltsev VA, Kyle JW, Silverman N, Sabbah HN. Gating of the late Na+ channel in normal and failing human myocardium. J Mol Cell Cardiol. 2002 Nov 1;34(11):1477–89.
183. Bers DM. CaMKII inhibition in heart failure makes jump to human. Circ Res. 2010 Oct 29;107(9):1044–6.
184. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, et al. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na+ channels. Journal of Clinical Investigation. 2006 Dec 1;116(12):3127–38.
185. Ashpole NM, Herren AW, Ginsburg KS, Brogan JD, Johnson DE, Cummins TR, et al. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. Journal of Biological Chemistry. 2012 Jun 8;287(24):19856–69.
186. Ma J, Luo A, Wu L, Wan W, Zhang P, Ren Z, et al. Calmodulin kinase II and protein kinase C mediate the effect of increased intracellular calcium to augment late sodium current in rabbit ventricular myocytes. Am J Physiol Cell Physiol. 2012 Apr 15;302(8).
187. Ahmad S, Tirilomis P, Pabel S, Dybkova N, Hartmann N, Molina CE, et al. The functional consequences of sodium channel NaV1.8 in human left ventricular hypertrophy. ESC Heart Fail. 2019 Feb 1;6(1):154–63.
188. Dybkova N, Ahmad S, Pabel S, Tirilomis P, Hartmann N, Fischer TH, et al. Differential regulation of sodium channels as a novel proarrhythmic mechanism in the human failing heart. Cardiovasc Res. 2018 Nov 1;114(13):1728–37.
189. Kistamás K, Hézső T, Horváth B, Nánási PP. Late sodium current and calcium homeostasis in arrhythmogenesis. Channels. 2021 Jan 1;15(1):1–19.
190. El-Sherif N, Turitto G, Boutjdir M. Acquired Long QT Syndrome and Electrophysiology of Torsade de Pointes. Arrhythm Electrophysiol Rev. 2019 May 2;8(2):122–30.
191. Locati ET, Bagliani G, Cecchi F, Johny H, Lunati M, Pappone C. Arrhythmias due to Inherited and Acquired Abnormalities of Ventricular Repolarization. Card Electrophysiol Clin. 2019 Jun 1;11(2):345–62.
192. Rivera-Fernandez R, Arias-Verdu MD, Garcia-Paredes T, Delgado-Rodriguez M, Arboleda-Sanchez JA, Aguilar-Alonso E, et al. Prolonged QT interval in ST-elevation myocardial infarction and mortality: New prognostic scale with QT, Killip and age. Journal of Cardiovascular Medicine. 2016;17(1):11–9.
193. Ninkovic VM, Ninkovic SM, Miloradovic V, Stanojevic D, Babic M, Giga V, et al. Prevalence and risk factors for prolonged QT interval and QT dispersion in patients with type 2 diabetes. Acta Diabetol. 2016 Oct 1;53(5):737–44.
194. Studenik CR, Zhou Z, January CT. Differences in action potential and early afterdepolarization properties in LQT2 and LQT3 models of long QT syndrome. Br J Pharmacol. 2001;132(1):85–92.
195. Bonatti R, Silva AFG, Batatinha JAP, Sobrado LF, Machado AD, Varone BB, et al. Selective late sodium current blockade with GS-458967 markedly reduces ischemia-induced atrial and ventricular repolarization alternans and ECG heterogeneity. Heart Rhythm. 2014 Oct 1;11(10):1827–35.
196. Justo F, Fuller H, Nearing BD, Rajamani S, Belardinelli L, Verrier RL. Inhibition of the cardiac late sodium current with eleclazine protects against ischemia-induced vulnerability to atrial fibrillation and reduces atrial and ventricular repolarization abnormalities in the absence and presence of concurrent adrenergic stimulation. Heart Rhythm. 2016 Sep 1;13(9):1860–7.

197. Makita N, Horie M, Nakamura T, Ai T, Sasaki K, Yokoi H, et al. Drug-induced long-QT syndrome associated with a subclinical SCN5A mutation. Circulation. 2002 Sep 3;106(10):1269–74.
198. Hedley PL, Jørgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, et al. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: A mutation update. Hum Mutat. 2009 Nov;30(11):1486–511.
199. Cardona K, Trenor B, Rajamani S, Romero L, Ferrero JM, Saiz J. Effects of late sodium current enhancement during LQT-related arrhythmias. A simulation study. 2010 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC'10. 2010;3237–40.
200. Yamamura K, Muneuchi J, Uike K, Ikeda K, Inoue H, Takahata Y, et al. A novel SCN5A mutation associated with the linker between III and IV domains of Nav1.5 in a neonate with fatal long QT syndrome. Int J Cardiol. 2010 Nov 5;145(1):61–4.
201. Lowe JS, Stroud DM, Yang T, Hall L, Atack TC, Roden DM. Increased late sodium current contributes to long QT-related arrhythmia susceptibility in female mice. Cardiovasc Res. 2012;95(3):300–7.
202. Nagy ZA, Virág L, Tóth A, Biliczki P, Acsai K, Bányász T, et al. Selective inhibition of sodium-calcium exchanger by SEA-0400 decreases early and delayed afterdepolarization in canine heart. Br J Pharmacol. 2004 Dec;143(7):827–31.
203. Györke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. Cardiovasc Res. 2008 Jan;77(2):245–55.
204. Mills GD, Harris DM, Chen X, Houser SR. Intracellular sodium determines frequency-dependent alterations in contractility in hypertrophied feline ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Feb;292(2).
205. Kistamás K, Veress R, Horváth B, Bányász T, Nánási PP, Eisner DA. Calcium Handling Defects and Cardiac Arrhythmia Syndromes. Front Pharmacol. 2020;11:72.
206. Moreno JD, Zhu ZI, Yang PC, Bankston JR, Jeng MT, Kang C, et al. A Computational Model to Predict the Effects of Class I Anti-Arrhythmic Drugs on Ventricular Rhythms. Sci Transl Med. 2011 Aug 31;3(98).
207. Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Barker AH, et al. Mortality and Morbidity in Patients Receiving Encainide, Flecainide, or Placebo. New England Journal of Medicine. 1991 Mar 21;324(12):781–8.
208. Pless SA, Galpin JD, Frankel A, Ahern CA. Molecular basis for class Ib anti-arrhythmic inhibition of cardiac sodium channels. Nat Commun. 2011 Jun 14;2(1):351.
209. Antzelevitch C, Belardinelli L. The role of sodium channel current in modulating transmural dispersion of repolarization and arrhythmogenesis. J Cardiovasc Electrophysiol. 2006 May;17(SUPPL. 1).
210. Koltun DO, Parkhill EQ, Elzein E, Kobayashi T, Notte GT, Kalla R, et al. Discovery of triazolopyridine GS-458967, a late sodium current inhibitor (Late INai) of the cardiac NaV 1.5 channel with improved efficacy and potency relative to ranolazine. Bioorg Med Chem Lett. 2016 Jul 1;26(13):3202–6.
211. Koltun DO, Parkhill EQ, Elzein E, Kobayashi T, Jiang RH, Li X, et al. Discovery of triazolopyridinone GS-462808, a late sodium current inhibitor (Late INai) of the cardiac Nav1.5 channel with improved efficacy and potency relative to ranolazine. Bioorg Med Chem Lett. 2016 Jul 1;26(13):3207–11.
212. Zablocki JA, Elzein E, Li X, Koltun DO, Parkhill EQ, Kobayashi T, et al. Discovery of Dihydrobenzoxazepinone (GS-6615) Late Sodium Current Inhibitor (Late INai), a

Phase II Agent with Demonstrated Preclinical Anti-Ischemic and Antiarrhythmic Properties. J Med Chem. 2016 Oct 13;59(19):9005–17.
213. Vacher B, Pignier C, Létienne R, Verscheure Y, Le Grand B. F 15845 inhibits persistent sodium current in the heart and prevents angina in animal models. Br J Pharmacol. 2009 Jan;156(2):214–25.
214. Song JH, Huang CS, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T. Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. J Pharmacol Exp Ther. 1997 Aug;282(2):707–14.
215. Debono MW, Le Guern J, Canton T, Doble A, Pradier L. Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in Xenopus oocytes. Eur J Pharmacol. 1993 Apr 28;235(2–3):283–9.
216. He Y, Benz A, Fu T, Wang M, Covey DF, Zorumski CF, et al. Neuroprotective agent riluzole potentiates postsynaptic GABA(A) receptor function. Neuropharmacology. 2002 Feb;42(2):199–209.
217. Weiss SM, Dahlstrom JE, Saint DA. Riluzole reduces arrhythmias and myocardial damage induced by coronary occlusion in anaesthetized pigs. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2013 Dec;40(12):856–63.
218. Weiss SM, Saint DA. The Persistent Sodium Current Blocker Riluzole Is Antiarrhythmic and Anti-Ischaemic in a Pig Model of Acute Myocardial Infarction. PLoS One. 2010;5(11).
219. Chaitman BR. Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. Circulation. 2006 May;113(20):2462–72.
220. Rajamani S, Shryock JC, Belardinelli L. Rapid Kinetic Interactions of Ranolazine With HERG K+ Current. J Cardiovasc Pharmacol. 2008 Jun;51(6):581–9.
221. Létienne R, Vié B, Puech A, Vieu S, Le Grand B, John GW. Evidence that ranolazine behaves as a weak β 1 - and β 2 -adrenoceptor antagonist in the rat cardiovascular system. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2001 Mar 15;363(4):464–71.
222. Doshi D, Morrow JP. Potential application of late sodium current blockade in the treatment of heart failure and atrial fibrillation. Rev Cardiovasc Med. 2009;10 Suppl 1:S46-52.
223. Zygmunt AC, Nesterenko V V., Rajamani S, Hu D, Barajas-Martinez H, Belardinelli L, et al. Mechanisms of atrial-selective block of Na + channels by ranolazine: I. experimental analysis of the use-dependent block. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Oct;301(4).
224. Szél T, Koncz I, Jost N, Baczkó I, Husti Z, Virág L, et al. Class I/B antiarrhythmic property of ranolazine, a novel antianginal agent, in dog and human cardiac preparations. Eur J Pharmacol. 2011 Jul 15;662(1–3):31–9.
225. Shimizu W, Antzelevitch C. Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade de pointes in LQT2 and LQT3 models of the long-QT syndrome. Circulation. 1997 Sep 16;96(6):2038–47.
226. Rajamani S, Liu G, El-Bizri N, Guo D, Li C, Chen XL, et al. The novel late Na+current inhibitor, GS-6615 (eleclazine) and its anti-arrhythmic effects in rabbit isolated heart preparations. Br J Pharmacol. 2016;3088–98.
227. Zygmunt AC, Eddlestone GT, Thomas GP, Nesterenko V V., Antzelevitch C. Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;281(2 50-2).

228. Baartscheer A. Increased Na+/H+-exchange activity is the cause of increased [Na+]i and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. Cardiovasc Res. 2003 Mar 15;57(4):1015–24.
229. MOSS AJ, ZAREBA W, SCHWARZ KQ, ROSERO S, MCNITT S, ROBINSON JL. Ranolazine Shortens Repolarization in Patients with Sustained Inward Sodium Current Due to Type-3 Long-QT Syndrome. J Cardiovasc Electrophysiol. 2008 Dec;19(12):1289–93.
230. Wilson SR, Scirica BM, Braunwald E, Murphy SA, Karwatowska-Prokopczuk E, Buros JL, et al. Efficacy of Ranolazine in Patients With Chronic Angina. J Am Coll Cardiol. 2009 Apr;53(17):1510–6.
231. Cocco G, Rousseau MF, Bouvy T, Cheron P, Williams G, Detry JM, et al. Effects of a new metabolic modulator, ranolazine, on exercise tolerance in angina pectoris patients treated with beta-blocker or diltiazem. J Cardiovasc Pharmacol. 1992 Jul;20(1):131–8.
232. Thadani U, Ezekowitz M, Fenney L, Chiang YK. Double-blind efficacy and safety study of a novel anti-ischemic agent, ranolazine, versus placebo in patients with chronic stable angina pectoris. Circulation. 1994;90(2):726–34.
233. Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley P, Meluzin J, Kuch J, et al. Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. J Am Coll Cardiol. 2004 Apr 21;43(8):1375–82.
234. Chaitman BR, Pepine CJ, Parker JO, Skopal J, Chumakova G, Kuch J, et al. Effects of Ranolazine with Atenolol, Amlodipine, or Diltiazem on Exercise Tolerance and Angina Frequency in Patients with Severe Chronic Angina: A Randomized Controlled Trial. JAMA. 2004 Jan 21;291(3):309–16.
235. Stone PH, Gratsiansky NA, Blokhin A, Huang IZ, Meng L. Antianginal Efficacy of Ranolazine When Added to Treatment With Amlodipine. The ERICA (Efficacy of Ranolazine in Chronic Angina) Trial. J Am Coll Cardiol. 2006 Aug 1;48(3):566–75.
236. Morrow DA, Scirica BM, Karwatowska-Prokopczuk E, Murphy SA, Budaj A, Varshavsky S, et al. Effects of ranolazine on recurrent cardiovascular events in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: The MERLIN-TIMI 36 randomized trial. JAMA. 2007 Apr 25;297(16):1775–83.
237. Scirica BM, Morrow DA, Hod H, Murphy SA, Belardinelli L, Hedgepeth CM, et al. Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndrome: Results from the metabolic efficiency with ranolazine for less ischemia in non-ST-elevation acute coronary syndrome-thrombolysis in myocardial infarction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial. Circulation. 2007 Oct;116(15):1647–52.
238. Reiffel JA, Camm AJ, Belardinelli L, Zeng D, Karwatowska-Prokopczuk E, Olmsted A, et al. The HARMONY Trial: Combined Ranolazine and Dronedarone in the Management of Paroxysmal Atrial Fibrillation: Mechanistic and Therapeutic Synergism. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2015 Oct 1;8(5):1048–56.
239. De Ferrari GM, Maier LS, Mont L, Schwartz PJ, Simonis G, Leschke M, et al. Ranolazine in the treatment of atrial fibrillation: Results of the dose-ranging RAFFAELLO (ranolazine in atrial fibrillation following an electrical cardioversion) study. Heart Rhythm. 2015 May 1;12(5):872–8.

240. Zareba W, Daubert JP, Beck CA, Huang DT, Alexis JD, Brown MW, et al. Ranolazine in High-Risk Patients With Implanted Cardioverter-Defibrillators: The RAID Trial. J Am Coll Cardiol. 2018 Aug 7;72(6):636–45.
241. Evaristo E, Stocco FG, Shah NR, Cheezum MK, Hainer J, Foster C, et al. Ranolazine reduces repolarization heterogeneity in symptomatic patients with diabetes and non–flow-limiting coronary artery stenosis. Annals of Noninvasive Electrocardiology. 2018 Jan 1;23(1).
242. Gong M, Zhang Z, Fragakis N, Korantzopoulos P, Letsas KP, Li G, et al. Role of ranolazine in the prevention and treatment of atrial fibrillation: A meta-analysis of randomized clinical trials. Heart Rhythm. 2017 Jan 1;14(1):3–11.
243. Bacic D, Carneiro JS, Bento AA, Nearing BD, Rajamani S, Belardinelli L, et al. Eleclazine, an inhibitor of the cardiac late sodium current, is superior to flecainide in suppressing catecholamine-induced ventricular tachycardia and T-wave alternans in an intact porcine model. Heart Rhythm. 2017 Mar 1;14(3):448–54.
244. Fuller H, Justo F, Nearing BD, Kahlig KM, Rajamani S, Belardinelli L, et al. Eleclazine, a new selective cardiac late sodium current inhibitor, confers concurrent protection against autonomically induced atrial premature beats, repolarization alternans and heterogeneity, and atrial fibrillation in an intact porcine model. Heart Rhythm. 2016 Aug;13(8):1679–86.
245. Olivotto I, Hellawell JL, Farzaneh-Far R, Blair C, Coppini R, Myers J, et al. Novel Approach Targeting the Complex Pathophysiology of Hypertrophic Cardiomyopathy. Circ Heart Fail. 2016 Mar;9(3).
246. Hegyi B, Horváth B, Váczi K, Gönczi M, Kistamás K, Ruzsnavszky F, et al. Ca2 +-activated Cl− current is antiarrhythmic by reducing both spatial and temporal heterogeneity of cardiac repolarization. J Mol Cell Cardiol. 2017 Aug 1;109:27–37.
247. Magyar J, Bányász T, Szigligeti P, Körtvély Å, Jednákovits A, Nánási PP. Electrophysiological effects of bimoclomol in canine ventricular myocytes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000 Mar;361(3):303–10.
248. Scamps F, Vassort G. Effect of extracellular ATP on the Na+ current in rat ventricular myocytes. Circ Res. 1994 Apr;74(4):710–7.
249. Abramochkin D V., Vornanen M. Inhibition of the cardiac ATP-dependent potassium current by KB-R7943. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2014 Sep;175:38–45.
250. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch. 1981 Aug;391(2):85–100.
251. Bányász T, Magyar J, Szentandrássy N, Horváth B, Birinyi P, Szentmiklósi J, et al. Action potential clamp fingerprints of K+ currents in canine cardiomyocytes: Their role in ventricular repolarization. Acta Physiologica. 2007 Jul;190(3):189–98.
252. Banyasz T, Horvath B, Jian Z, Izu LT, Chen-Izu Y. Sequential dissection of multiple ionic currents in single cardiac myocytes under action potential-clamp. J Mol Cell Cardiol. 2011 Mar;50(3):578–81.
253. Magyar J, Kistamás K, Váczi K, Hegyi B, Horváth B, Bányász T, et al. Concept of relative variability of cardiac action potential duration and its test under various experimental conditions. Gen Physiol Biophys. 2016 Jan;35(1):55–62.
254. Hegyi B, Bárándi L, Komáromi I, Papp F, Horváth B, Magyar J, et al. Tetrodotoxin blocks L-type Ca 2+ channels in canine ventricular cardiomyocytes. Pflugers Arch. 2012 Aug;464(2):167–74.

255. Hegyi B, Komáromi I, Kistamás K, Ruzsnavszky F, Váczi K, Horváth B, et al. Tetrodotoxin blockade on canine cardiac L-type Ca2+ channels depends on pH and redox potential. Mar Drugs. 2013;11(6):2140–53.
256. Catterall WA. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1980;20:15–43.
257. Abi-Gerges N, Valentin JP, Pollard CE. Dog left ventricular midmyocardial myocytes for assessment of drug-induced delayed repolarization: Short-term variability and proarrhythmic potential. Br J Pharmacol. 2010 Jan;159(1):77–92.
258. Hinterseer M, Beckmann BM, Thomsen MB, Pfeufer A, Ulbrich M, Sinner MF, et al. Usefulness of short-term variability of QT intervals as a predictor for electrical remodeling and proarrhythmia in patients with nonischemic heart failure. American Journal of Cardiology. 2010 Jul 15;106(2):216–20.
259. Tereshchenko LG, Han L, Cheng A, Marine JE, Spragg DD, Sinha S, et al. Beat-to-beat three-dimensional ECG variability predicts ventricular arrhythmia in ICD recipients. Heart Rhythm. 2010 Nov;7(11):1606–13.
260. Thomsen MB, Verduyn SC, Stengl M, Beekman JDM, De Pater G, Van Opstal J, et al. Increased short-term variability of repolarization predicts d-sotalol-induced torsades de pointes in dogs. Circulation. 2004 Oct 19;110(16):2453–9.
261. Nánási PP, Magyar J, Varró A, Ördög B. Beat-to-beat variability of cardiac action potential duration: underlying mechanism and clinical implications. Can J Physiol Pharmacol. 2017 Oct;95(10):1230–5.
262. Roden DM. Long QT syndrome: Reduced repolarization reserve and the genetic link. J Intern Med. 2006 Jan;259(1):59–69.
263. Varró A, Baczkó I. Cardiac ventricular repolarization reserve: A principle for understanding drug-related proarrhythmic risk. Br J Pharmacol. 2011 Sep;164(1):14–36.
264. Zicha S, Moss I, Allen B, Varro A, Papp J, Dumaine R, et al. Molecular basis of species-specific expression of repolarizing K + currents in the heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Oct 1;285(4 54-4).
265. Karagueuzian HS, Pezhouman A, Angelini M, Olcese R. Enhanced late Na and Ca currents as effective antiarrhythmic drug targets. Front Pharmacol. 2017 Feb 6;8(FEB).
266. Rougier JS, Abriel H. Role of “non-cardiac” voltage-gated sodium channels in cardiac cells. J Mol Cell Cardiol. 2012 Nov;53(5):589–90.
267. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, et al. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. Journal of Physiology. 2007;582(2):675–93.
268. Noujaim SF, Kaur K, Milstein M, Jones JM, Furspan P, Jiang D, et al. A null mutation of the neuronal sodium channel Na V 1.6 disrupts action potential propagation and excitation-contraction coupling in the mouse heart . The FASEB Journal. 2012 Jan;26(1):63–72.
269. Brette F, Orchard CH. Density and sub-cellular distribution of cardiac and neuronal sodium channel isoforms in rat ventricular myocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Sep 29;348(3):1163–6.
270. Portero V, Casini S, Hoekstra M, Verkerk AO, Mengarelli I, Belardinelli L, et al. Anti-arrhythmic potential of the late sodium current inhibitor GS-458967 in murine Scn5a-1798insD+/- and human SCN5A-1795insD+/- iPSC-derived cardiomyocytes. Cardiovasc Res. 2017 Jun 1;113(7):829–38.

271. Sicouri S, Belardinelli L, Antzelevitch C. Antiarrhythmic effects of the highly selective late sodium channel current blocker GS-458967. Heart Rhythm. 2013 Jul;10(7):1036–43.
272. Chi L, Belardinelli L, Zeng A, Hirakawa R, Rajamani S, Ling H, et al. Inhibition of late na+ current, a novel target to improve diastolic function and electrical abnormalities in dahl salt-sensitive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016 May 1;310(10):H1313–20.
273. Pezhouman A, Madahian S, Stepanyan H, Ghukasyan H, Qu Z, Belardinelli L, et al. Selective inhibition of late sodium current suppresses ventricular tachycardia and fibrillation in intact rat hearts. Heart Rhythm. 2014 Mar;11(3):492–501.
274. El-Bizri N, Li CH, Liu GI, Rajamani S, Belardinelli L. Selective inhibition of physiological late Na+ current stabilizes ventricular repolarization. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2018 Feb 1;314(2):H236–45.
275. Ferrantini C, Pioner JM, Mazzoni L, Gentile F, Tosi B, Rossi A, et al. Late sodium current inhibitors to treat exercise-induced obstruction in hypertrophic cardiomyopathy: an in vitro study in human myocardium. Br J Pharmacol. 2018 Jul 1;175(13):2635–52.
276. Anderson LL, Hawkins NA, Thompson CH, Kearney JA, George AL. Unexpected Efficacy of a Novel Sodium Channel Modulator in Dravet Syndrome. Sci Rep. 2017 Dec 1;7(1).
277. Maltsev VA, Sabbah HN, Undrovinas AI. Late sodium current is a novel target for amiodarone: Studies in failing human myocardium. J Mol Cell Cardiol. 2001;33(5):923–32.
278. Nagatomo T, January CT, Makielski JC. Preferential block of late sodium current in the LQT3 DeltaKPQ mutant by the class I(C) antiarrhythmic flecainide. Mol Pharmacol. 2000 Jan;57(1):101–7.

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

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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

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

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

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

További közlemények

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

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

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

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

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

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

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

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

Debrecen, 2022.12.07.

DEBRECENI EGYETEM * Egyetemi és Nemzeti Könyvtár *

12. Kulcsszavak

késői nátriumáram
repolarizáció rövidtávú variabilitása
akciós potenciál időtartam
kanonikus APVC
tetrodotoxin
ATX-II
GS967
mexiletin
kamrai repolarizáció
akciós potenciál feszültség-clamp
kutya kamrai szívizomsejtek

13. Keywords

late sodium current
short-term variability of repolarization
action potential duration
canonic APVC
tetrodotoxin
ATX-II
GS967
mexiletine
ventricular repolarization
action potential voltage clamp
canine ventricular myocytes

14. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények