

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Kistamás Kornél

Témavezető: Prof. Dr. Magyar János



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

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

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

Írta: **Kistamás Kornél** okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Magyar János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Dr. Pórszász Róbert, PhD
Dr. Tóth András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
2.305-306. szoba
2015. március 16. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
Dr. Baczkó István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
Dr. Baczkó István, PhD
Dr. Pórszász Róbert, PhD
Dr. Tóth András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. március 16. 13:00 óra

Bevezetés

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

Újabb kutatások azonban megkérdőjelezzik a megnövekedett QT-intervallum és az aritmiák kialakulása közötti összefüggést. Ismert ugyanis, hogy a különböző szerhatások okozta azonos mértékű QT-időtartam növekedés mellett nem ugyanakkora a TdP incidenciája. Megfigyelték azt is, hogy ugyanazon szer különböző dózisainak proaritmiás hatása független a QT-intervallum időtartamától, sőt a sikeres antiaritmiás kezeléseknél sem feltétlenül következik be QT-időtartam rövidülés.

Kutyán és nyúlön végzett kísérletek azt bizonyítják, hogy a szer-indukálta TdP aritmiák esetében a QT-időtartam beat-to-beat variabilitása hatékonyabban előrejelzi a ritmuszavar kialakulását, mint maga a QT-időtartam növekedése. A kísérleti eredmények alapján feltételezhető, hogy a csökkent beat-to-beat variabilitás antiaritmiás hatású, míg a kritikusan megnövekedett variabilitás a QT-intervallum időtartamától függetlenül kamrai aritmiákra hajlamosít. A QT-intervallum állandó szívfrekvencia esetén tapasztalható ütésről-ütésre (beat-to-beat) történő variabilitása a kamrai repolarizáció véletlenszerű változásainak következménye. Ezért a repolarizáció beat-to-beat variabilitásának kvantitatív meghatározása egy olyan paraméter lehet, ami előrejelezheti a proaritmiás állapotokat. A repolarizáció időbeni változásának meghatározására különböző módszerek használata javasolt, így a klinikumban is használatos QT-intervallum variabilitás index, vagy a kísérletesen alkalmazott akciós potenciál

időtartam (APD) rövidtávú variabilitásának a mérése (rövidtávú variabilitás – short term beat-to-beat variability of action potential duration, SV).

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

Célkitűzések

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

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

Anyagok és módszerek

A kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kutyaszív bal kamrájából izolált szívizomsejteken végeztük. Az általunk alkalmazott protokollok összhangban voltak a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publikációs száma: 85-23., 1996. javított verzió) és a Helsinki Deklaráció 1964-ben lefektetett alapelveivel. A kísérleti

protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (engedély száma: 18/2012/DEMÁB). A szívizomsejteket szegmentperfúziós technikával, kollagenáz emésztéssel izoláltuk. Az életképes sejtek szabályos téglalap alakúak és éles határvonalúak voltak, ép citoplazmával és harántcsíkolattal rendelkeztek.

A szívizomsejtek akciós potenciáljának elvezetése

A membránpotenciál mérésekre Volders és mtsai által az izolált sejtekre kidolgozott nagy ellenállású üveg mikroelektróda technikát alkalmaztuk. A sejtek akciós potenciálját (AP) nagy ellenállású (20-40 M Ω), boroszilikát üveggapilárisból készített mikroelektródákkal vezettük el. A mikroelektródákat 3 M-os KCl-oldattal töltöttük meg. A sejteket impulzusgenerátor segítségével folyamatosan 1-2 ms szélességű négyszögimpulzusokkal stimuláltuk, melyek amplitúdója az ingerküszöb legalább kétszerese volt. A sejtekről elvezetett transzmembrán potenciálváltozásokat Multiclamp 700B erősítő és Digidata 1440A digitalizáló segítségével detektáltuk 200 kHz-es mintavételi frekvenciával.

Az akciós potenciál időtartam változtatása

Egyes kísérleteinkben az APD megváltoztatására törekedtünk, melyet többféle módon értünk el. Ehhez elektrotónust alkalmaztunk, mely során egy konstans befelé irányuló (inward) vagy pedig kifelé irányuló (outward) áram injektálásával növeltük, vagy pedig csökkentettük az AP időtartamát. Az elektrotónus injektálása az AP nulladik fázisát követően kezdődött és 50 milliszekundummal az adott AP repolarizációját követően ért véget. Az APD-ot módosítottuk az ingerlési frekvencia, illetve az ioncsatornákra ható szelektív gátló- vagy aktiválószerrek segítségével is.

A beat-to-beat variabilitás kvantitatív jellemzése

A kamrai szívizomsejt repolarizációjának beat-to-beat variabilitásának jellemzésére úgynevezett Poincaré diagramot szerkesztettünk. Ehhez az egyes APD értékeket az azt megelőző APD értékek függvényében ábrázoljuk. Az így kapott diagramon mérésenként 50 pont található, az 50 regisztrált AP-nak megfelelően. A pontok által lefedett terület nagysága arányos a SV-sal, és egyértelműen jelzi, ha valamilyen körülmény hatására megemelkedik a beat-to-beat variabilitás. A SV kvantitatív meghatározását a következő egyenlet segítségével végeztük:

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

ahol SV a rövidtávú variabilitás, APD_n és APD_{n-1} az n-edik és n-1-edik AP időtartama, n pedig az egymást követő AP-ok számának felel meg (esetünkben n=50).

A sejtrövidülés mérése

A sejtrövidülés mérése során a szívizomsejteket az AP mérésekkel ellentétben téringerléssel stimuláltuk és a rövidülést optikailag detektáluk. Az analóg jeleket Digidata 1440A A/D átalakító segítségével, 240 Hz mintavételi frekvenciával digitalizáltuk. Az adatok kiértékelése során 10 egymást követő sejtrövidülést átlagoltunk és meghatároztuk a paramétereit (alapvonal, csúcsérték, amplitúdó). Eredményeink során a sejtrövidülés mértékét a kontroll körülmények között mért diasztolés sejthossz százalékában fejeztük ki.

Statisztikai analízis

A méréseink során kapott kísérleti eredményekből meghatároztuk a számtani középértéket, valamint a középérték körüli standard mérési hibát (SEM). Az adatok összehasonlítása során egy szempontos varianciaanalízist (ANOVA), Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollos t-próbát alkalmaztunk. A

különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a P értéke kisebb volt, mint 0,05.

Eredmények

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

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

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

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

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

A transzmurális heterogenitást vizsgáló kísérleteink eredményei szerint a SV függ az APD-től is. Ezért a továbbiakban különböző módokon változtattuk az APD-ot. Először elektrotónus alkalmazásával befelé irányuló (inward) vagy kifelé irányuló (outward) áramot injektáltunk a sejtekbe áram-clamp kísérleti elrendezésben, mely segítségével növeltük vagy csökkentettük az APD-ot. Ennek a kísérletsorozatnak a legfontosabb sajátága, hogy az áraminjekcióval – kémiai ágensek alkalmazása nélkül – egy meglehetősen széles skálán tudtuk változtatni az AP időtartamát (20-500 ms). Mindezt úgy tehattuk meg, hogy nem módosítottuk specifikusan egyik ionáramot sem.

Az elektrotónus amplitúdóját -600 és $+70$ pA között változtattuk. Kontrollnak az elektrotónus alkalmazása előtti (0 pA áram) AP-okat tekintettük. -80 pA amplitúdójú anelektrotónus injektálása rövidítette az APD-ot (213 ± 7 ms-ról 138 ± 12 ms-ra; $P < 0,05$) és csökkentette a SV-t ($2,69 \pm 0,16$ ms-ról $1,69 \pm 0,17$ ms-ra; $P < 0,05$), $+40$ pA amplitúdójú katelektrotónus viszont növelte az APD-ot (311 ± 19 ms-ra; $P < 0,05$) és a SV-t is ($7,44 \pm 1,28$ ms-ra; $P < 0,05$).

Az elektrotónus alkalmazásával kapott eredményeink azt mutatták, hogy a SV értéke függ az APD-tól, nevezetesen, a két paraméter közötti összefüggés exponenciális. Ugyanígy exponenciális összefüggést kaptunk amennyiben a kontrollhoz képest számítottuk és ábrázoltuk a SV és az APD változásait (ΔSV , ΔAPD). Ez azt jelenti, hogy bármilyen beavatkozás, ami megváltoztatja az APD-ot, az egyúttal SV változást is okoz, ezért minden szer-indukálta SV változást (ΔSV) csak az azt kísérő APD változás (ΔAPD) tükrében szabad értelmezni. A Krebs mérőoldatban, 1 Hz ingerlési frekvenciával folyamatosan stimulált sejteken az elektrotónus injektálásával regisztrált kontroll SV-APD és ΔSV - ΔAPD

összefüggést leíró exponenciális görbékre a továbbiakban mint *standard görbére* hivatkozom, és az egyes szerek okozta SV változást ehhez viszonyítom, az ettől való eltérést pedig *relatív SV*-nek nevezem. Ennek értelmében, például egy ioncsatorna-gátlószer *relatív SV* növelő hatású, azt jelenti, hogy egységnyi APD változás mellett nagyobb SV növekedést okoz, így a gátlószerhez tartozó SV érték a *standard görbe* fölött helyezkedik.

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

Az AP hosszát nagymértékben befolyásolja az ingerlési frekvencia is, ezért a további kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a SV frekvencia-függő változásai hogyan viszonyulnak az elektrotónussal meghatározott értékekhez. Azt tapasztaltuk, hogy az ingerlési frekvencia csökkentésével nőtt az APD, és vele együtt a SV is (kontroll 1 Hz: APD 244 ± 8 ms, SV $3,50 \pm 0,17$ ms; 0,2 Hz: APD 308 ± 13 ms, SV $6,33 \pm 0,42$ ms; $P < 0,05$, $n=8$). Magasabb ingerlési frekvencia esetén mind a két paraméter értéke csökkent (3,33 Hz: APD 153 ± 5 ms, SV $2,42 \pm 0,19$ ms; $P < 0,05$, $n=8$).

Amennyiben az ingerlési frekvencia változtatása során kapott SV és APD értékeket az elektrotónus alkalmazása során kapott exponenciális görbével együtt ábrázoltuk, azt tapasztaltuk, hogy a pontok közel tökéletesen illeszkednek a *standard görbére*. Ez alól kivétel a 2 Hz-nél nagyobb frekvenciák, amikor is a SV értékek nagyobbak bizonyultak, mint azt az SV-APD összefüggésből várhatnánk. Ez alapján feltételezzük, hogy valamely más – APD-től független – faktor is befolyásolhatja a SV-t.

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

Az AP kialakításában részt vevő ionáramok közül elsőként az outward áramok szerepét vizsgáltuk a SV modulálásában. Ehhez a különböző áramok legszelektívebbnek vélt aktiváló- ill. gátlószereit alkalmaztuk. Az outward áramok közül az öt releváns káliumáramot vizsgáltuk. Dofetiliddel gátoltuk a késői káliumáram gyors komponensét (I_{Kr}), HMR 1556-tal a késői káliumáram lassú komponensét (I_{Ks}), chromanol 293B-vel (HMR 1556 jelenlétében) a I_{to1} -ot és végül $BaCl_2$ -dal a befelé egyenirányító káliumáramot (I_{K1}). Az ATP-függő káliumáramot (I_{K-ATP}) pedig lemakalimmal aktiváltuk.

Megállapítottuk, hogy a dofetilid mind a négy alkalmazott koncentrációja szignifikánsan növelte a SV-t és az APD-ot. A dofetilid okozta SV növekedés nagyobb mértékű volt, mint ami az APD növelés alapján várható lenne, azaz a *relatív SV* növekedett. Hasonló eredményt kaptunk az 500 nM HMR 1556 esetében is, a markáns SV növekedés csak kismértékű APD növekedéssel társult. A I_{to1} -blokkoló chromanol 293B-t (100 μ M) a HMR 1556 jelenlétében alkalmazva, az APD kismértékben, míg a SV szignifikánsan csökkent. Ezek a hatások nagyban hasonlítottak azokra az eredményeinkre, amikor az EPI sejteken a I_{to1} -ot 4-aminopiridinnel gátoltuk. Ez esetben a I_{Ks} gátlószereit is perfundáltuk, így a kapott adathalmaz szintén a *standard görbe* fölött található. Az I_{K-ATP} aktiválószer lemakalim minden alkalmazott koncentrációja csökkentette a SV-t és ezzel együtt az APD-ot is olyan mértékben csökkentette, hogy mind a négy mérési pont a *standard görbén* helyezkedik el, ezért az aktivált I_{K-ATP} feltehetőleg nincs specifikus hatással a SV-ra. A $BaCl_2$ perfúziót követően a nagyon jelentős APD mellett csak kisebb mértékű SV növekedést tapasztaltunk. A I_{K1} gátlásakor kapott pontok ábrázolásából kiderül, hogy a SV növelő hatás elmaradt a kontroll SV-APD összefüggés során megállapítottól, ami azt sugallja, hogy a I_{K1} egy *relatív SV* növelő áram.

Az inward áramok közül a nátriumáram (I_{Na}) és az L-típusú kalciumáram ($I_{Ca,L}$) szerepét tanulmányoztuk. A I_{Na} -ot tetrodotoxinnal vagy lidokainnal gátoltuk, míg aktiválására veratridint alkalmaztunk.

A veratridin koncentráció-függő módon, markánsan növelte mind az APD-ot, mind a SV-t. Tetrodotoxin és lidokain jelenlétében ezzel ellentétben mind az APD, mind a SV csökkent. A Na-csatorna gátlás okozta SV csökkenés, valamint ellenkező esetben a veratridin hatására létrejött SV emelkedés is nagyobbak bizonyult mint azt a kontroll SV-APD összefüggésből várhatnánk (a kapott pontok a *standard görbe* fölött helyezkedtek el). Ebből arra következtetünk, hogy a I_{Na} *relatív SV* növelő hatással bír. Az $I_{Ca,L}$ szerepének tanulmányozása során is egy gátlószert (nizoldipin) illetve egy aktiválószert (Bay K8644) alkalmaztunk. 1 μ M nizoldipin rendkívül jelentősen rövidítette az APD-ot (220 ± 6 ms-ról 116 ± 7 ms-ra; $P < 0,05$, $n=19$), ezzel együtt növelte a SV-t ($2,44 \pm 0,20$ ms-ról $2,96 \pm 0,27$ ms-ra; $P < 0,05$, $n=19$). A Bay K8644 kétféle koncentrációban került alkalmazásra. Mindkét koncentráció növelte az APD-ot, ugyanakkor a SV-ra kifejtett hatásuk eltérő volt. A 20 nM Bay K8644 nem változtatta meg a SV-t, míg 200 nM szignifikánsan növelte azt. Ha a kapott SV és APD értékeket és változásokat a kontroll SV-APD összefüggéshez hasonlítjuk, akkor a Bay K8644 perfundálásakor kapott pontok a *standard görbe* alatt helyezkednek el, így *relatív SV* csökkenést tapasztalunk, míg az $I_{Ca,L}$ gátlása *relatív SV* növelő hatású. Ezek alapján megállapítottuk, hogy az $I_{Ca,L}$ jelentősen csökkenti a SV-t.

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

Annak érdekében, hogy valamely ionáram specifikus SV módosító szerepét elkülönítsük az APD módosító hatásától, a megváltozott AP időtartamot minél precízebben a kontroll AP időtartamnak megfelelően kompenzáltuk elektrotónussal vagy pedig farmakológiai úton (tűréshatár: ± 5 ms a kontroll APD-hoz képest). Először 100 nM dofetilid, 5 μ M $BaCl_2$, 100 nM veratridin és 200 nM Bay K8644

jelenlétében egy konstans, pontosan meghatározott amplitúdójú outward áramot injektáltunk a sejtekbe úgy, hogy az APD a kontrollnak megfelelő legyen, míg 3 μ M tetrodotoxin és 1 μ M nizoldipin esetén azonos metodikával alkalmazott inward áramot injektáltunk.

Megállapítottuk, hogy dofetilid kezelést követően az elektrotónus injektálás ellenére is – tehát a kiindulási AP időtartam mellett – magasabb maradt a SV (kontroll: $2,37 \pm 0,19$ ms; dofetilid+tónus: $2,68 \pm 0,29$ ms; $P < 0,05$, $n=7$). Ezzel ellentétben BaCl_2 esetében az APD változás kompenzálása után a SV szignifikánsan kisebbnek bizonyult a kontrollhoz képest (kontroll: $2,31 \pm 0,20$ ms; BaCl_2 +tónus: $1,97 \pm 0,16$ ms; $P < 0,05$, $n=8$). Veratridin jelenlétében is magasabb SV értéket (kontroll: $2,25 \pm 0,19$ ms; veratridin+tónus: $3,95 \pm 0,24$ ms; $P < 0,05$, $n=14$) kaptunk, amikor az elektrotónus segítségével a kontroll APD-mal megegyező időtartamot állítottunk be. Outward áram adása Bay K8644 perfúziót követően a kiindulási érték alá csökkentette a SV-t (kontroll: $2,18 \pm 0,19$ ms; Bay K8644+tónus: $1,71 \pm 0,16$ ms; $P < 0,05$, $n=10$). A I_{Na} blokkolását követően (tetrodotoxin) az APD kompenzálása csökkent SV-sal járt együtt (kontroll: $2,75 \pm 0,29$ ms; tetrodotoxin+tónus: $2,17 \pm 0,28$ ms; $P < 0,05$, $n=8$), míg az $I_{\text{Ca,L}}$ gátlás esetén (nizoldipin) ez az érték még tovább emelkedett az inward áram injektálás hatására (kontroll: $2,68 \pm 0,20$ ms; nizoldipin+tónus: $5,38 \pm 0,59$ ms; $P < 0,05$, $n=10$).

Mivel a pontos APD kompenzációt lehetővé tevő elektrotónus injektálása elmozdíthatja a nyugalmi membránpotenciált a pozitívabb vagy pedig a negatívabb tartományok felé (ami hatással lehet az AP paramétereire), ezért megismételtük kísérleteinket úgy, hogy az elektrotónus alkalmazása helyett farmakológiai kompenzációt alkalmaztunk. Ehhez ki kellett választanunk két olyan, a *relatív SV* szempontjából indifferens szert, amelyik növeli vagy csökkenti az APD-ot. Az APD növelésére BaCl_2 -ot, míg rövidítésére lemakalimot alkalmaztunk. Az APD kompenzálásához a két szer koncentrációjának nagyon pontos titrálására volt szükség. A dofetilid és a veratridin APD növelő hatását lemakalim adásával

kompenzáltuk, míg tetrodotoxin és nizoldipin esetén BaCl_2 -ot alkalmaztunk. A kiindulásival megegyező APD-ok mellett továbbra is emelkedett SV-t tapasztaltunk dofetilid (kontroll: $3,04 \pm 0,22$ ms; dofetilid+lemakalim: $4,35 \pm 0,28$ ms; $P < 0,05$, $n=5$) és veratridin (kontroll: $2,87 \pm 0,13$ ms; veratridin+lemakalim: $4,65 \pm 0,52$ ms; $P < 0,05$, $n=8$) jelenlétében. Tetrodotoxin esetén ez az érték a kontroll SV alá csökkent (kontroll: $2,36 \pm 0,10$ ms; tetrodotoxin+ BaCl_2 : $2,10 \pm 0,09$ ms; $P < 0,05$, $n=6$), végül pedig nizoldipin hatására a SV még tovább emelkedett (kontroll: $2,06 \pm 0,26$ ms; nizoldipin+ BaCl_2 : $5,38 \pm 0,68$ ms; $P < 0,05$, $n=7$). A két különböző metódussal (elektrotónussal illetve farmakológiai módszerrel) történő APD kompenzáció eredményei tehát hasonlóan bizonyultak, nevezetesen, hogy a I_{Kr} és az $I_{\text{Ca,L}}$ specifikusan SV csökkentő hatású, míg a I_{Na} növeli azt. Azt azonban mindenképp érdemes kiemelni, hogy a legmarkánsabb hatást azon kísérleteinkben tapasztaltunk – függetlenül attól, hogy melyik metódussal végeztük a kompenzációt – ahol nizoldipint alkalmaztunk. Ez ismételtelen kiemeli az $I_{\text{Ca,L}}$ fontos szerepét a SV szabályozásában.

Az intracelluláris kalcium homeosztázis befolyásolásának hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

Az intracelluláris kalcium koncentráció változásának hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

Kísérleteink során az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növelésére a nagy Ca^{2+} -szelektivitású A23187 nevű, antibiotikus tulajdonsággal is bíró Ca^{2+} ionofór molekulát alkalmaztuk, mely stabil 2:1 komplexet képes alkotni divalens kationokkal. Jelenlétében a Ca^{2+} képes átjutni a sejtmembránon. 1 μM A23187 25 percig történő inkubálása után az emelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hatására APD rövidülést tapasztaltunk (207 ± 4 ms-ról 170 ± 5 ms-ra; $P < 0,05$, $n=14$) míg az abszolút SV értékét csak a kísérlet kezdetén változtatta meg. Összességében az APD rövidüléshez nem társult SV csökkenés.

További vizsgálataink során a Ca^{2+} kelátor BAPTA-t (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) alkalmaztuk. A

sejteket a BAPTA acetoximetilészter formájával inkubáltuk (BAPTA-AM), amely képes átlépni a sejtmembránon, majd az intracelluláris nem specifikus észterázok lehasítják az észter csoportot, és az így keletkezett aktív forma már képes a Ca^{2+} megkötésére. 5 μM BAPTA-AM hatására az AP időtartama fokozatosan nőtt (218 ± 8 ms-ról 297 ± 15 ms-ra; $P < 0,05$, $n=17$), azonban a SV értéke vagy nem változott, vagy csökkent. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció emelkedése a *relatív SV* növekedését okozza.

Következő kísérletsorozatunkban a BAPTA-AM kezelést és az elektrotónus injekcióját kombináltuk. A BAPTA-AM hatás stabilizálódása után mért AP-okat tekintettük kontrollnak (0 pA). Az egyre nagyobb amplitúdójú inward áram injektálása tovább növelte az APD-ot, míg az outward áram az AP rövidülését okozta. Az injektált elektrotónusok amplitúdójában különbség tapasztalható ($-600 - +45$ pA) a korábbi, csak elektrotónussal végzett kísérleteinkhez képest. Ezt az magyarázza, hogy BAPTA-AM jelenlétében eleve hosszabbak az AP-ok, így a pozitív elektrotónus hatására a EAD-k incidenciája megnőtt. A SV-t ábrázolva az APD függvényében azt tapasztaltuk, hogy BAPTA-AM jelenlétében az elektrotónussal előidézett APD változás kisebb mértékű SV növekedést okozott, mint amit BAPTA-AM kezelés nélkül láttunk.

Az intracelluláris kalcium koncentráció fázisos változásainak szerepe az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitásában

Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ befolyásolásának egy következő módszere, a SR-ból történő Ca^{2+} felszabadulás megváltoztatása. Ehhez rianodint és ciklopiazonsavat használtunk. A rianodin a RYR2 gátlásán keresztül megakadályozza a Ca^{2+} SR-ból történő felszabadulását. A ciklopiazonsav pedig a SERCA pumpa szelektív inhibitora, melynek hatására a SR-ból felszabadulni képes Ca^{2+} mennyisége csökken. A 10 μM rianodin 15 perc alatt átmenetileg $2,92 \pm 0,12$ ms-ról $2,37 \pm 0,19$ ms-ra ($P < 0,05$, $n=8$) csökkentette a SV-t, míg az APD-ot nem befolyásolta (kontroll: 222 ± 7 ms; 15. perc rianodin: 224 ± 15 ms; $n=8$). 1 μM ciklopiazonsav hatására a

SV 15 perc alatt $3,87 \pm 0,29$ ms-ról $3,29 \pm 0,29$ ms-ra csökkent ($P < 0,05$, $n=9$), míg az AP időtartamát szignifikánsan nem befolyásolta (kontroll: 239 ± 7 ms; 15. perc ciklopiazonsav: 229 ± 7 ms; $n=9$). Megállapítottuk, hogy mindkét szer hatékonyan csökkentette a *relatív SV*-t, vagyis a szisztolé alatti Ca^{2+} felszabadulás egy meghatározó eleme a SV-nak.

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra is, hogyan befolyásolja a SV-t a Na^+/Ca^{2+} cseremechanizmust (NCX), mely szintén fontos szereppel bír a szívműködés Ca^{2+} -homeosztázisában. A NCX gátlásához a szelektívnek vélt SEA0400-at alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy a 300 nM SEA0400 25 percig tartó inkubálása az APD rövidítő hatás ellenére (235 ± 10 ms-ról 206 ± 13 ms-ra; $P < 0,05$, $n=7$) szignifikánsan növelte mind az abszolút SV-t ($2,53 \pm 0,16$ ms-ról $2,77 \pm 0,14$ ms-ra; $P < 0,05$, $n=7$), mind a *relatív SV*-t.

A kalcium homeosztázist befolyásoló szerek hatása a sejtrövidülés mértékére

Az $[Ca^{2+}]_i$ változás indikátoraként – egy indirekt módszert –, a rögzítetlen miociták rövidülésének (shortening) mérését használtuk. Mind a négy vizsgált szer (5 μ M BAPTA-AM, 1 μ M A23187, 10 μ M rianodin és 1 μ M ciklopiazonsav) csökkentette a rövidülés mértékét, azonban eltérő mértékben és eltérő kinetikával. Megállapítottuk, hogy a BAPTA-AM, a rianodin, és az A23187 gátolta a sejtek rövidülését. Az említett három szer hatásának kialakulása gyors volt. A ciklopiazonsav csökkentette ugyan a rövidülések amplitúdóját, azonban teljes gátlást még 15 perc inkubálás után sem okozott. A BAPTA-AM, a rianodin és a ciklopiazonsav hatására a diasztolés sejthossz nem változott szignifikáns mértékben, míg a szisztolés sejthossz nőtt, jelezve a csökkent Ca^{2+} felszabadulást. Az A23187 esetén a szisztolés sejthossz változatlan maradt, azonban a diasztolés érték jelentősen csökkent. Az a megfigyelés, hogy a Ca^{2+} ionofór alkalmazásával a szívműködés kevésbé relaxál, összhangban áll azzal a feltevessel, miszerint a Ca^{2+} ionofór hatására akkumulálódik a Ca^{2+} a sejten belül.

A β -adrenerg stimuláció hatása az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitására

Az eddigi eredményeink azt bizonyítják, hogy a I_{Ks} és az $I_{Ca,L}$ hatékonyan csökkenti a *relatív SV*-t. Ezért megvizsgáltuk, hogy a β -adrenerg stimuláció milyen hatással van a SV-ra, ugyanis hatására nő a I_{Ks} és az $I_{Ca,L}$ amplitúdója, valamint az $[Ca^{2+}]_i$. Kísérleteink során a β -adrenerg stimuláció modellezésére egy nem specifikus agonistát, az izoproterenolt alkalmaztunk. 10 nM izoproterenol kismértékben ugyan, de szignifikánsan rövidítette az AP időtartamát (219 ± 6 ms-ról 195 ± 7 ms-ra; $P < 0,05$, $n=13$), ezzel együtt jelentősen csökkentette a SV-t is ($2,31 \pm 0,12$ ms-ról $1,43 \pm 0,11$ ms-ra; $P < 0,05$, $n=13$). Ez a SV csökkenés nagyobb mértékű volt, mint amit a kontroll SV-APD összefüggésből várhatnánk. Ha a sejteken BAPTA-AM előkezelést követően vizsgáltuk az izoproterenol hatását, azt tapasztaltuk, hogy a BAPTA-AM nélküli állapotokhoz hasonló mértékben csökkentette mind az APD-ot, mind a SV-t. Nem tapasztaltunk különbséget az izoproterenol *relatív SV*-ra kifejtett hatásában BAPTA-AM jelenlétében vagy hiányában. Ez arra enged következtetni, hogy az izoproterenol SV módosító hatását nem az $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változások okozzák, ez feltehetőleg a I_{Ks} és az $I_{Ca,L}$ növelés eredménye.

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

A sejtek közvetlen környezetében végbemenő szöveti redox potenciál megváltozása markáns hatással bír a szövet elektrofiziológiai tulajdonságaira. A redukáló környezet modellezésére redukálószerekből, 1 mM DL-dithiothreitolból, 1 mM L-glutathionból és 1 mM L-askorbinsavból álló koktélt alkalmaztunk. A redukáló koktél alig volt hatással az AP alakjára, az APD-ot nem befolyásolta, viszont a SV-t szignifikáns mértékben csökkentette (kontroll: $2,81 \pm 0,30$ ms; 9. perc redukáló koktélban: $2,12 \pm 0,15$ ms; $P < 0,05$, $n=12$). A hatás kifejlődéséhez körülbelül 6 percre volt szükség. Amennyiben a kontroll SV-APD összefüggéshez

hasonlítjuk a redukáló koktél alkalmazása során kapott eredményeinket, láthatjuk, hogy az a *relatív SV*-t csökkentette, ugyanis a pontok a *standard görbe* alatt találhatóak, mivel a nem számottevő AP rövidüléshez képest szignifikánsan csökkent a *SV*.

A redukáló környezettel ellentétben az oxidáció markáns hatással volt az AP alakjára. Az oxidáló környezet modellezésére 10 μM hidrogén-peroxidot (H_2O_2) alkalmaztunk, ami fokozatosan növelte az APD-ot, valamint a *SV*-t is. Jellemzően 10-15 perccel a szer perfundálását követően – valamennyi vizsgált sejt esetében – EAD-k alakultak ki. A méréseink azon szakaszában, ahol a EAD-k kialakultak, az APD akár 600-800 ms hosszú is lehetett, amivel párhuzamosan a *SV* értéke magától értetődő módon extrém mértékben nőtt (akár 50-100 ms különbség két egymást követő APD között), azonban a méréseink első 9 percében tapasztalt *SV* emelkedés nem áll összefüggésben a EAD-k kialakulásával. Összességében a H_2O_2 kezelés nagymértékben növelte a *relatív SV*-t.

Annak tisztázására, hogy a drasztikus H_2O_2 hatás valóban a redox potenciálban történő változás eredménye, megismételtük az előző kísérleteinket úgy, hogy a sejteket a redukáló koktéllal előkezeltük, majd ezt követte a redukáló koktél+oxidáló oldat (H_2O_2) perfundálása. A 10 μM H_2O_2 , a redukáló koktéllal való előkezelés ellenére is növelte mind az APD-ot (redukáló koktélban: 203 ± 11 ms; 9. perc H_2O_2 +redukáló koktélban: 231 ± 13 ms; $n=6$), mind a *SV*-t (redukáló koktélban: $2,37 \pm 0,15$ ms; 9. perc H_2O_2 +redukáló koktélban: $3,14 \pm 0,36$ ms; $P < 0,05$, $n=6$). Ez esetben azonban a H_2O_2 hatásai nem voltak olyan kifejezetten, a kísérletek egyikében sem jelentkezett EAD, mint ahogy azt az előzőekben részletezett kísérletek során tapasztaltuk. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a redukáló környezet sikeresen ellensúlyozta a H_2O_2 *relatív SV* növelő hatását, az összes mérési pont a *standard görbén* helyezkedik el.

Megbeszélés

Fontos feladat feltárni mindazon eseményeket és az azok háttérében álló mechanizmusokat melyek súlyos szívritmuszavarokat, például a hirtelen szívhalálhoz vezető kamrafibrillációt okozhatnak. Az elmúlt évek kutatómunkája alapján bebizonyosodott, hogy önmagában a QT-intervallum mérése nem minden esetben jelzi előre pontosan az életveszélyes aritmiák kialakulását, valamint a sikeres antiaritmiás kezelés során nem feltétlenül szükséges a QT-intervallum csökkentése. Ezért a kutatócsoportok arra törekednek, hogy olyan prediktorokat találjanak, melyek megbízhatóan előrejelezhetik az aritmiák kialakulását a gyakorló orvosok számára. Ilyen paraméter lehet például az akciós potenciál időtartam rövidtávú beat-to-beat variabilitása (SV).

Az akciós potenciál időtartam szerepe a rövidtávú beat-to-beat variabilitásban

Munkánk célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy milyen mechanizmusok állhatnak a SV háttérében, valamint annak kiderítése, hogy milyen mértékben függ a SV az APD-ától. Az elektrotónust injektáló kísérleteink során specifikus ioncsatorna hatás nélkül tudtuk változtatni az APD-át. Megállapítottuk, hogy a SV-APD közötti összefüggés exponenciális. A későbbiekben minden eredményünket ezen összefüggéshez (*standard görbe*) hasonlítottunk, az ettől való eltéréseket pedig *relatív SV*-nak neveztünk. Úgy gondoljuk, hogy az egyes SV módosító hatásokat csak ennek ismeretében tudjuk értelmezni.

A SV kialakításának háttérében többek között az ioncsatornák kapuzásának sztochasztikus viselkedése állhat. A SV-ban történő változásokat azonban az APD negatív visszacsatolású (negative feedback) szabályzása is magyarázhatja. Nevezetesen, egy inward áram fokozott aktiválódása nyomán nő az AP időtartam, ennek hatására repolarizációt segítő ionáramok – I_{Kr} és I_{Ks} – aktiválódnak, ezáltal rövidítve az APD-ot. Eredményeink azt mutatják, hogy az $I_{Ca,L}$, a I_{Kr} és a I_{Ks}

csökkentik a SV-t, gátlásuk értelemszerűen növeli azt. Érdekes módon a két, egyaránt befelé irányuló áram – az $I_{Ca,L}$ és a késői I_{Na} – ellenkező hatással volt a SV-ra, annak ellenére, hogy mindkettő növeli az AP időtartamát. A különbséget a két inward áram között az magyarázhatja, hogy az $I_{Ca,L}$ a plató fázis kezdetén aktív, míg a késői I_{Na} a plató fázis későbbi szakaszán a legaktívabb. Az $I_{Ca,L}$ hatására megemelkedett platópotenciál nagyobb mértékben képes aktiválni a I_{Kr} -ét és a I_{Ks} -ét, míg a I_{Na} időben későbbi megjelenése miatt már nem képes erre. Az AP platófázisa alatt nagy a membrán impedanciája, így az Ohm törvény értelmében ilyenkor a nettó membránáramban történő kis változások is viszonylag nagy membránpotenciál és APD változást eredményeznek. Vélhetően ez magyarázza a I_{Na} SV növelő hatását.

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

A β -adrenerg stimulációt szimuláló kísérleteinkben az izoproterenol hatása is frekvencia-függőnek bizonyult. Az izoproterenol *relatív SV* csökkentő hatása az ingerlési frekvencia csökkentéssel kifejezettebbé vált. Ez jellemző volt a humán szívfrekvencia tartománynak megfelelő 0,5-1 sec széles ciklushosszak esetén is.

Hasonló eredményt kaptunk amikor az izoproterenolt BAPTA-AM jelenlétében alkalmaztuk, tehát az $I_{Ca,L}$ és a I_{Ks} fokozódása domináns az $[Ca^{2+}]_i$ változásával szemben. 300 ms-os ciklushossz esetén azonban az izoproterenol érdemben nem befolyásolta a *relatív SV*-t, vagyis a gyors frekvencián történő Ca^{2+} akkumulálódás ellensúlyozhatta az izoproterenol hatását.

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

Az ionáramok szerepe a beat-to-beat variabilitásban

Az ioncsatorna modulátorokkal végzett kísérleteink eredményeit az elektrotónusos kísérletek során megállapított kontroll SV-APD összefüggéshez viszonyítottuk, mert úgy véljük, hogy ez az összefüggés adhat valós képet az egyes ionáramok relatív szerepéről. Ez alapján legfőbb megállapításunk, hogy az $I_{Ca,L}$, a I_{Kr} és a I_{Ks} stabilizálja az APD-ot, míg a I_{Na} és a I_{to1} az APD labilitását okozza.

Korábban számos ioncsatornára ható szerről leírták, hogy befolyásolja a beat-to-beat variabilitást, azonban egyik tanulmány sem vizsgálta a SV AP időtartamtól való függését. Eredményeink megerősítik, hogy a I_{Na} és a I_{Kr} jelentős hatással bír a SV-ra. Kísérleteink során 1 Hz-es ingerlési frekvencia mellett I_{Kr} gátlószerek jelenlétében sem tapasztaltunk EAD-k megjelenését, szemben

Abi-Gerges és mtsaival, akik szintén egészséges, kontroll kutyák szívéből származó bal kamrai szívizomsejtekkel dolgoztak. A kezdeti vizsgálatok eredményei alapján is az úgymond APD stabilizáló áramok közé sorolható a I_{Ks} . A mi munkánk is ezt mutatta, jóllehet, a különbségek csak a ΔSV - ΔAPD összefüggések vizsgálatakor váltak nyilvánvalóvá, mivel a HMR 1556 önmagában csak kismértékű APD növekedést okozott. Pueyo és mtsai által készített szimulációs kísérletben meghatározó tényezőnek adódott a I_{Ks} csatornák száma. MID sejteken alacsonyabb I_{Ks} csatornaszámot (és nagyobb SV-t) figyeltek meg mint ENDO és EPI sejteken, ami összhangban áll a mi eredményeinkkel is. A I_{Kr} és a I_{Ks} vizsgálata során kapott eredményeink és az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a repolarizációs rezerv fordítottan arányos a SV-sal. Különbség adódott azonban az $I_{Ca,L}$ vizsgálatakor kapott eredményeinkben az irodalmi adatokhoz képest. A megelőző publikációk stabilizáló áramnak titulálták az $I_{Ca,L}$ -ot, a mi kísérleteinkben viszont messze a legfontosabb ionáramnak bizonyult a SV modulálásban. Ezt a nizoldipin és Bay K8644 szerekkel kapott eredményeink bizonyítják, miszerint a publikált SV-ra kifejtett mérsékelt hatásokkal szemben az $I_{Ca,L}$ gátlásakor jelentős mértékben nőtt a *relatív SV*, míg annak fokozásakor a *relatív SV* csökkent. Megemlítendő, hogy egy újabb, kutya szívizomsejteken mért eredményeken alapuló – még nem publikált – *in silico* tanulmány szerint a I_{to1} a legfontosabb SV moduláló ionáram, ezt követi sorrendben a I_{Kr} , az $I_{Ca,L}$, és a I_{Ks} .

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

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

Az intracelluláris kalcium szerepe a beat-to-beat variabilitásban

Az $[Ca^{2+}]_i$ lehetséges szerepének vizsgálatára a Ca^{2+} kelátor BAPTA-AM-et, illetve a Ca^{2+} ionofór A23187-et használtuk. Ezzel a módszerrel lehetőségünk volt a sejt teljes $[Ca^{2+}]_i$ változásának hatását megítélni a SV-ra, azonban a szív ciklushoz kapcsolódó fázisos változások tanulmányozására ez a módszer alkalmatlan. Megállapítottuk, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése növeli a *relatív SV*-t, míg ellenkező esetben a *relatív SV* csökkenését tapasztaltuk. A BAPTA-AM csökkentette a *relatív SV*-t akkor is, ha az AP időtartamát megelőzőleg szignifikáns mértékben növeltük. Legjobb példa erre a I_{Kr} gátlást (dofetilid, E-4031) követő *relatív SV* csökkenés BAPTA-AM jelenlétében. A BAPTA-AM önmagában is szignifikáns mértékben növeli az APD-ot, melyet magyarázhat az $I_{Ca,L}$ Ca^{2+} -függő inaktivációjának hiánya. Ezen felül egy újabb közlemény rámutatott arra, hogy a BAPTA-AM közvetlen gátló hatással bír a I_{Kr} -ére HEK 293 sejtvonalon. Az alacsonyabb $[Ca^{2+}]_i$ csökkentette a *relatív SV*-t abban az esetben is, ha Bay K8644 vagy veratridin alkalmazásával tovább aktiváltuk az $I_{Ca,L}$ -ot és a I_{Na} -ot. A gyors ingerlési frekvenciák esetén tapasztalt SV növekedés létrejöhetett a pozitív lépcsőjelenség következtében is.

A kardiomiocitákban az egyik legfontosabb Ca^{2+} eltávolító mechanizmus a NCX. Amennyiben SEA0400 alkalmazásával gátoltuk a NCX-t, a *relatív SV* markánsan nőtt. Patkány szívből származó sejteken leírták, hogy a NCX gátlás hatására emelkedik a szubsarkolemmális Ca^{2+} koncentráció. Ezzel ellentétben munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatják, hogy kutya miocitákon a SEA0400 nincs szignifikáns hatással az $[Ca^{2+}]_i$ -ra, így vélhetően a SEA0400 ezekben a sejtekben is csak a közvetlen membrán alatti terület Ca^{2+} koncentrációját változtatja meg. A NCX gátlószerek különböző kísérleti feltételek mellett akár más hatással is bírhatnak. Hipertrofiás, remodeláció során strukturálisan és

elektromosan átépült sejtek esetén például 1 μM SEA0400 a dofetilid hatására megnövelt SV-t csökkentette, valamint a EAD incidenciát is megakadályozta, ezzel együtt a megnöött Ca^{2+} tranziens amplitúdót is sikeresen csökkentette.

A szívciklushoz kapcsolódó, fázisos változások tanulmányozására két olyan szert alkalmaztunk, mely vagy a Ca^{2+} SR raktárba történő felvételét, vagy a SR raktárból történő Ca^{2+} felszabadulását gátolja. A SR Ca^{2+} tartalmának kiürítéséhez ciklopiazonsavat, a RYR2 gátlásához pedig rianodint használtunk. Megállapítottuk, hogy mindkét szer csökkentette a sejtrövidülés mértékét (a rianodin nagyobb mértékben), mely összhangban áll azokkal a megfigyelésekkel, mely szerint a ciklopiazonsav és a rianodin csökkenti az intracelluláris Ca^{2+} tranziens amplitúdóját. Bár a két szer hatása között adódtak időbeli különbségek, mindkettő hatékonyan csökkentette a *relatív SV*-t.

A SR-ból történő fázisos Ca^{2+} felszabadulásnak tehát jelentős szerepe van a SV befolyásolásában. Ezt feltehetőleg az magyarázza, hogy a felszíni membránban elhelyezkedő Ca^{2+} -függő ioncsatornák közvetlenül érzékelik a szubsarkolemmális térben történő Ca^{2+} koncentráció változásokat, melyeket a Ca^{2+} tranziensek befolyásolnak. Heijman és mtsai szintén azt tapasztalták, hogy a SV nem csak az APD-ától függ, hanem az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban történő lokális változásoktól is.

A redox potenciál szerepe a beat-to-beat variabilitásban

A SV-t a sejtek redox állapota is befolyásolja. Ennek vizsgálatára háromféle kísérleti elrendezést alakítottunk ki. Oxidáló közegnek 10 μM H_2O_2 -ot alkalmaztunk, a redukáló közeg modellezésére pedig 1 mM DL-dithiotheritoltól, 1 mM redukált L-glutationból és 1 mM L-aszkorbinsavból álló redukáló koktélt használtunk. Végül a két módszert kombináltuk, előbb adva a redukáló koktélt, majd az oxidáló H_2O_2 -ot. Az alkalmazott redukálószer koncentrációk megfelelő puffer kapacitással bírtak, mellyel a H_2O_2 hatását is sikerült biztonságosan ellensúlyozni. Megállapítottuk, hogy a redukáló közeg alkalmazása (5-10 perc redukáló koktél) hatékonyan csökkentette a *relatív SV*-t. Ezzel ellentétben az

oxidáló környezetben (10-15 perc H_2O_2 perfúzió) markánsan nőtt az APD valamint a *relatív SV* is, mindezek mellett az összes vizsgált sejt esetében EAD-k jelentek meg. Amennyiben a sejteket előzőleg a redukáló koktélban inkubáltuk 5 percig, a H_2O_2 nem volt képes EAD generálásra, vagyis a H_2O_2 hatása valóban a redox potenciál oxidatív irányban történő elmozdításán keresztül jött létre. Egyes patológiás esetekben, ahol oxidatív stressz alakul ki a szívizomzatban – mint például az iszkémia/reperfúzió indukálta károsodások, hipertenzió, diabétesz vagy ateroszklerózis esetében –, a redox potenciál és vele együtt a SV megváltozása magyarázhatja az ilyen betegségekben kialakuló szívritmuszavarok gyakoribb előfordulását.

Klinikai vonatkozások

Jelen munkánk hozzájárulhat a beat-to-beat variabilitás jobb megértéséhez. Eredményeink és az irodalmi adatok azt sugallják, hogy az emelkedett beat-to-beat variabilitás sejtszintű, potenciálisan proaritmiás események kombinációit tükrözi. Megállapítottuk, hogy az $I_{Ca,L}$, a I_{Kr} és a I_{Ks} jelentős SV csökkentő hatással bír. Eredményeink extrapolálása azonban nem egyszerű, ugyanis a III. és IV. osztályba tartozó antiaritmiás szerek ezen áramok gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. A I_{Kr} gátlószerei például a III. osztályba tartoznak (dofetilid, *d*-sotalol, amiodaron), növelik a refrakter periódust (repolarizáció, QT-intervallum), hatásukat a Na^+ -csatornák gátlása nélkül fejtik ki, így az intraventrikuláris vezetést nem befolyásolják (nem szélesedik ki a QRS-komplexum). A IV. osztályba tartozók szerek az $I_{Ca,L}$ gátlószerei (például nifedipin, verapamil, diltiazem), növelik az AV-csomóban a refrakter periódus időtartamát, így lassítják az ingerületvezetést. Védik a sejtet a Ca^{2+} -mal való túltöltődés, így a DAD-k kialakulása ellen. A II. osztályba tartozó antiaritmikumok (a β -receptorok kompetitív antagonistái, például propranolol, pindolol, nebivolol) viszont épp az adrenerg stimuláció *relatív SV* csökkentő hatását gátolhatják, ugyanis kísérleteinkben a 10 nM izoproterenol volt a leghatékonyabb a temporális variabilitás redukálásában. Természetesen a

β -adrenerg stimuláció nem minden körülmény mellett antiaritmiás hatású, azonban bizonyos körülmények között ilyen tulajdonságokkal is rendelkezik. A manapság használt antiaritmikumok tehát a kedvező hatásuk ellenére növelhetik a beat-to-beat variabilitást, mely csökkentheti a gyógyszerek hatékonyságát.

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

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

Összefoglalás

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

Jelen tanulmányban célul tűztük ki a SV és az APD közötti összefüggés tanulmányozását, az egyes ionáramok aktiváló- és gátlószerekkel történő

vizsgálatát, az ingerlési frekvencia megváltoztatásának hatását a SV-ra, valamint az intracelluláris kalcium koncentráció és a redox potenciál szerepét a SV meghatározásában. Vizsgálni kívántuk továbbá a SV változását a bal kamra különböző régióiból származó sejteken.

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

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

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



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

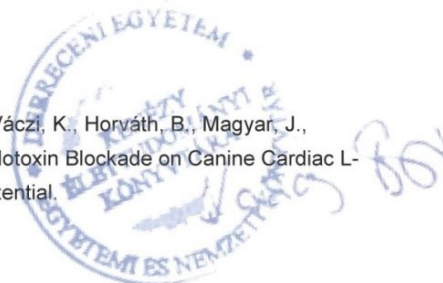




5. **Kistamás, K.**, Szentandrásy, N., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Bárándi, L., Horváth, B., Szebeni, A., Magyar, J., Bányász, T., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of pioglitazone on cardiac ion currents and action potential morphology in canine ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.*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

További Közlemények

6. Váczi, K., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., **Kistamás, K.**, Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P.P., Szentandrásy, N., Magyar, J.: 9-Anthracene carboxylic acid is more suitable than DIDS for characterization of calcium-activated chloride current during canine ventricular action potential. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 388 (1), 87-100, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-1050-9>
IF:2.36 (2013)
7. Horváth, B., Hegyi, B., **Kistamás, K.**, Váczi, K., Bányász, T., Magyar, J., Szentandrásy, N., Nánási, P.P.: Cytosolic calcium changes affect the incidence of early afterdepolarizations in canine ventricular myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol. Epub ahead of print (2015)*
IF:1.546 (2013)
8. Ruzsnavszky, F., Hegyi, B., **Kistamás, K.**, Váczi, K., Horváth, B., Szentandrásy, N., Bányász, T., Nánási, P.P., Magyar, J.: Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 387 (5), 457-467, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-0964-6>
IF:2.36 (2013)
9. Hegyi, B., Komáromi, I., **Kistamás, K.**, Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P.P., Szentandrásy, N.: Tetrodotoxin Blockade on Canine Cardiac L-Type Ca²⁺ Channels Depends on pH and Redox Potential. *Mar Drugs.* 11 (6), 2140-2153, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md11062140>
IF:3.512





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 38,056

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

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

Debrecen, 2015.02.06.

