

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

AZ EMLŐS SZÍVIZOM FREKVENCIA-FÜGGŐ SAJÁTSÁGAI

DR SZIGLIGETI PÉTER

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN 2000**

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
Célkitűzések.....	6
Módszerek.....	7
Akcións potenciál elvezetése és a kontraktilitás vizsgálata multicelluláris preparátumokon....	7
Restitúciós kinetika meghatározása multicelluláris preparátumokon.....	8
Elektrofiziológiai vizsgálatok kutyából, nyúlból és tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken	8
Elektrofiziológiai vizsgálatok patkányból izolált kamrai szívizomsejteken	9
Intracelluláris kalciumtranziensek vizsgálata izolált szívizomsejteken	10
Vegyszerek	11
Eredmények.....	12
A kontrakciós erő frekvencia-függésének vizsgálata emlős kamrai preparátumokon	12
A patkány kamrai szívizom restitutionós kinetikájának vizsgálata.....	17
Az elektromos restitutionó vizsgálata nyúl, kutya és tengerimalac kamrai preparátumokon ..	24
Az elektromos restitutionó vizsgálata humán kamrai és pitvari szívizomban	31
Megbeszélés.....	33
A kontrakciós erő frekvencia-függése	33
A szívizom elektromos restitutionója.....	36
Irodalomjegyzék.....	45
Köszönetnyilvánítás	52
A téziseket megalapozó in extenso közlemények jegyzéke	53

Bevezetés

Ellentétben a neuronok vagy a vázizomrostok membránján tovaterjedő akciós potenciálokkal, amelyek élettani szerepüket tekintve kizárólag a frekvenciakódolt jeltovábbítás szolgálatában állnak, a kardiális akciós potenciálok paraméterei fontos "analóg" információt is hordoznak. A depolarizáció sebessége például az ingerületvezetés sebességét, a repolarizáció sebessége a refrakter periódus hosszát determinálja. Az akciós potenciál időtartama és platójának magassága a sejtbe belépő kalcium mennyiségét, és ezen keresztül, a szívösszehúzódások erejét szabályozza. Az intracelluláris kalcium koncentrációjának változásai ugyanakkor a felszíni membrán elektromos folyamataira visszahatva mélyreható változásokat okoznak az ingerképzés és ingerületvezetés folyamatában, amelyek ismét az akciós potenciálok alakváltozásaiban tükröződnek.

A kardiális akciós potenciál – mint analóg jel – egyik legfontosabb paramétere annak szokatlanul hosszú időtartama. Szívizomsejteken ugyanis a gyors depolarizációt nem követi a nyugalmi membránpotenciálra történő repolarizáció, hanem egy elnyújtott depolarizált állapot, az akciós potenciál platófázisa alakul ki, amelyet csak 200-300 ms múlva követ a teljes repolarizáció. Ennek a kizárólag szívizomra jellemző tulajdonságnak a háttérben számos ioncsatorna (nátrium, kalcium, kálium és klorid csatornák) összerendezett működése áll. Ezen ioncsatornák hormonális kontroll alatt állnak, feszültség- és idő-függő kapuzó mechanizmusokkal rendelkeznek, és számos kardiális támadáspontú gyógyszer célpontjait képezik.

A különböző kardiális preparátumok alapvető sajátága, hogy akciós potenciáljuk időtartama jellegzetes frekvencia-függést mutat (Gibbs és Johnson 1971, Miller és mtsai 1971). Ez részben azt jelenti, hogy a változatlan ingerlőfrekvencia mellett elvezetett akciós potenciálok időtartama az ingerlési frekvencia függvényében változik (steady-state frekvencia-függés). Ezen túlmenően, az akciós potenciál időtartama függ az azt megelőző diasztolés intervallum hosszától változatlan ingerlőfrekvencia esetén is. Az akciós potenciál időtartamának diasztolés intervallumtól való függését elektromos restitúciónak nevezzük (Bass 1975), amelynek sajátosságait a plató alatt folyó ionáramok feszültség- és idő-függő kinetikai tulajdonságai együttesen szabják meg (Carmeliet 1977, Boyett és Jewell 1978, Elharrar és Surawicz 1983, Robinson és mtsai 1987, Litovsky és Antzelevitch 1989). Annak

megfelelően, hogy a különböző emlősfajok ioncsatornáinak típusai, denzitásuk és kinetikai sajátságaik jelentős különbségeket mutatnak, az emlősök és ember miocitáinak restitúciós kinetikájában is jelentős diverzitás mutatható ki.

Bár az elektromos restitúció mechanizmusának tisztázását kutya-szívből izolált Purkinje rostokon korábban megkísérelték (Elharrar és Surawicz 1983, Elharrar 1984), a probléma megoldását nehezítette, hogy a Purkinje rost akciós potenciáljának plátófázisa alatt számos, kis intenzitású ionáram folyik párhuzamosan (Noble és Tsien 1969, Boyett és Fedida 1988), tehát ezen a preparátumon a restitúció várhatóan igen komplex kinetikával rendelkezik. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy két exponenssel illetve a Purkinje rost restitúciós görbáját, az alkalmazott ioncsatorna gátlószerek csak az egyes komponensek időállandóit változtatták meg, ami lehetetlenné tette a komponensek azonosítását (Colatsky és Hogan 1980, Elharrar 1984, Varró és mtsai 1985).

A fentiek ismeretében az emlős és humán szívizom restitúciós sajátságainak háttérben komplex elektrofiziológiai változások állnak, amelyek ismerete klinikai szempontból is jelentős. A humán medicinában az életet veszélyeztető szívritmuszavarok egyik legfontosabb kiváltó oka a szívizomsejtek akciós potenciál időtartamának megnövekvő diszperziója. Kamrai vagy pitvari extraszisztolét követően az extrainger időpontjának függvényében fokozódhat az akciós potenciál repolarizációjának heterogenitása, ami újabb malignus ritmuszavar forrása lehet. Bár az emlős miokardium restitúciós sajátságait többen vizsgálták, a humán szívizom restitúciós kinetikáját eddig csak in vivo körülmények között tanulmányozták, ahol multicelluláris preparátumok monofázisos akciós potenciálját vezették el (Franz és mtsai 1983, Seed és mtsai 1987, Franz és mtsai 1988, Endresen és Amlie 1989, Morgan és mtsai 1992). Ezek a kísérletek számos új ismerettel gazdagították a humán szívizom működésének frekvencia-függő sajátságairól kialakult elképzeléseket, de technikai okok miatt azokról jól értelmezhető és pontos adatokkal nem szolgáltak. Ilyen technikai akadályt jelentett, hogy limitált volt a vizsgálható diasztolés intervallumok hossza és száma, nem volt megfelelő a vizsgálatok időbeli felbontása és nehézkes volt az ingerületvezetési késés okozta eltérések korrekciója. További problémát okozott, hogy a normális szív működés frekvenciájánál lassúbb frekvenciával történő in vivo vizsgálatok kivitelezése meglehetősen bonyolult. Később részletezett kísérleteinkben ezért izolált kamrai és pitvari

szívizompreparátumokon vizsgáltuk a humán miokardium restitúciós sajátságait, mely lehetővé tette az előbb említett nehézségek kiküszöbölését.

Említettük, hogy a miokardium restitúciós sajátságainak hátterében a különböző ionáramok kinetikai tulajdonságai állnak. Mivel ezen ionáramok egy része kalcium-függő, így a szív ciklus alatt folyamatosan változó intracelluláris kalciumszint is befolyásolhatja a sejtek akciós potenciáljának időtartamát (Eisner és Lederer 1985, Noble és mtsai 1991, Zygmunt és Gibbons 1992, Shimon 1981, Lee és mtsai 1985) és a restitúció kinetikáját. Ez utóbbi szabályozási lehetőség részleteit eddig nem derítették fel.

A patkány szívizomsejtjeinek sajátságai összehasonlítva a többi emlőssével számos egyéni jellegzetességet mutatnak. Ilyen a negatív erő-frekvencia összefüggés, a szokatlanul rövid akciós potenciál időtartam és a viszonylag magas intracelluláris nátriumkoncentráció (Cohen és mtsai 1982). Mindemellett jól ismert, hogy patkány szívizomsejtjeiben a szarkoplazmatikus retikulum igen jól fejlett, így az intracelluláris kalcium fő forrása a szarkoplazmatikus retikulum (Bers 1991). Ezek a tulajdonságok különösen alkalmassá teszik a patkány szívizomsejteket az intracelluláris kalciumszint restitúciós folyamatra gyakorolt szabályozó szerepének vizsgálatára.

Emlősök kamrai szívizma a fent említett akciós potenciál időtartam frekvencia-függésén túl jellegzetes kontrakciós erő frekvencia-függést is mutat. A legtöbb emlős species (tengerimalac, nyúl, kutya, macska) valamint az ember kamrai szívizmának kontraktilitása az ingerlési frekvencia növelésekor nő (pozitív erő-frekvencia összefüggés). Ezzel éles ellentétben, patkányban negatív erő-frekvencia összefüggést írtak le, tehát az ingerlési frekvencia növelése (a ciklushossz csökkentése) a kontrakciós erő progresszív csökkenésével járt együtt (Jahnel és mtsai 1994). A pozitív erő-frekvencia összefüggést mutató speciesek akciós potenciáljának időtartama hosszú (átlagosan 200 ms), míg patkány esetében ez az érték jóval alacsonyabb (kb. 20-40 ms). Mindez arra utal, hogy az akciós potenciál időtartama önmagában is egyik fontos meghatározója a kontrakciós erő nagyságának (Morad és Trautwein 1968). A hosszabb akciós potenciál nagyobb mértékű kalciumbeáramlást tesz lehetővé az L-típusú kalciumcsatornákon keresztül, megnöveli a nátrium és kalcium "window" áramokat (Cohen és mtsai 1982, Attwell és mtsai 1979, Hirano és mtsai 1992) és csökkenti az intracelluláris kalcium kipumpálásában jelentős szerepet játszó nátrium-kalcium cserediffúzió hatékonyságát (Sutro és mtsai 1986). A szívizomsejtek kalciumháztartásának

ugyanis lényeges tényezője az intracelluláris nátriumkoncentráció alakulása, amelynek nagysága a nátrium-kalcium cserén keresztül meghatározza a kalcium kiáramlás hajtóerejét, ezáltal a kontrakciós erő egyik fontos modulátora (Sutko és mtsai 1986). Mivel a patkány szívműködésében az intracelluláris nátriumkoncentráció magasabb, mint a többi vizsgált speciesben, felvetődött a lehetőség, hogy a patkányra jellemző fordított erő-frekvencia összefüggés a magas intracelluláris nátriumtartalom és a rövid akciós potenciál időtartam kombinációjának következménye (Jahnel és mtsai 1994).

Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki az emlős és humán szívműködés frekvencia-függő sajátosságainak vizsgálatát a következő szempontok szerint:

1. Vizsgáltam a kamrai szívműködés kontrakciós erejének és akciós potenciál időtartamának steady-state frekvencia-függését különböző speciesekben és megpróbáltam magyarázatot találni a patkány valamint a többi emlős szívére jellemző eltérő frekvencia-függés mechanizmusára.
2. A szívműködés akciós potenciál időtartamának frekvencia-függő sajátosságait vizsgáltam különös hangsúlyt helyezve az akciós potenciál időtartam restitúciós kinetikájának tanulmányozására. Kísérleteim során kutya, nyúl, tengerimalac, patkány és humán preparátumok restitúciós kinetikáját tanulmányoztam és megkíséreltem magyarázatot adni a restitúciós kinetika háttérében álló fontosabb mechanizmusokra és a fellelhető interspecies különbségekre.

Módszerek

Akciós potenciál elvezetése és a kontraktilitás vizsgálata multicelluláris preparátumokon

A multicelluláris preparátumokon végzett kísérleteink során vegyes nemű tengerimalacokat, nyulakat, patkányokat és kutyákat használtunk. A patkányokat és tengerimalacokat tarkóütéssel megöltük, a nyulakat és kutyákat 50 mg/tskg pentobarbitállal elaltattuk, majd a mellkas megnyitása után a szívet gyorsan eltávolítottuk. A humán preparátumok vizsgálata során bal kamrai papilláris izmot és jobb pitvari trabekulákat használtunk, amelyeket nyitott szívműtéten áteső betegek szívéből távolítottak el. Vékony (0.2-0.5 mm átmérőjű) papilláris izomkötegeket preparáltunk ki mindkét kamrából (és humán minták esetén a pitvarból), majd azokat egy plexiüveg kádban rögzítve Tyrode oldattal folyamatosan perfundáltunk. A Tyrode oldat összetétele a következő volt NaCl: 153; KCl: 5.4; CaCl₂: 2.7; MgCl₂:1.05; HEPES: 5.4; glükóz: 11 mmol/l. Az oldat pH-ja 7.4±0.05, hőmérséklete 37 °C volt. Az oldatokat tiszta oxigénnel folyamatosan áramoltattuk át.

A preparátumokat 1 ms időtartamú, az ingerküszöb kétszeresének megfelelő amplitúdójú négyszögimpulzusokkal ingereltük egy platina elektródpáron keresztül. A membránpotenciált konvencionális mikroelektróda technika segítségével mértük. A módszer lényege, hogy a multicelluláris preparátum valamely sejtjébe egy vékony 3 mol/l koncentrációjú KCl oldattal töltött üvegkapillárist vezetünk mikromanipulátor segítségével és mérjük a mikroelektróda belseje és az extracelluláris tér között kialakuló potenciálkülönbséget. A mikroelektródák ellenállása 10 és 20 MOhm között változott. A mikroelektródákat egy nagy bemenő impedanciájú kapacitás-neutralizált elektrométer bemenetével kötöttük össze. A kontrakciós erő nagyságát a preparátum végéhez rögzített kapacitív elektro-mechanikus transzducerrel mértük izometriás körülmények között. A preparátumokat annyira feszítettük meg, hogy az erő kifejtés maximális legyen. Megfelelő erősítés után az elektromos és mechanikai válaszokat egy többcsatornás oszcilloszkóp képernyőjén jelenítettük meg. Az adatok rögzítéséhez és feldolgozásához a kimenő jeleket egy 12 bit felbontású A/D konverterrel 100 kHz-en digitalizáltuk. Az analízist személyi számítógépen végeztük egy házilag kifejlesztett algoritmus felhasználásával.

Restitúciós kinetika meghatározása multicelluláris preparátumokon

A restitutionós kinetikát a következő módon vizsgáltuk. A preparátumokat egy 20 vagy 30 impulzusból álló kondicionáló sorozattal ingereltük, amelynek ciklushossza 750, 1000 vagy 5000 ms volt, majd az utolsó impulzust követte egy megfelelően időzített extraimpulzus. Ezt követően a kondicionáló impulzussorozat újra indult, amit egy újabb extraimpulzus követett egyre hosszabb diasztolés időtartammal. A diasztolés időtartamot az extrastimulust megelőző utolsó akciós potenciál 90%-os repolarizációs idejétől számítottuk. A restitutionós görbéket úgy nyertük, hogy az extrastimulus által kiváltott akciós potenciál időtartamát (az akciós potenciál repolarizációjának 50 (APD₅₀), 75 (APD₇₅) vagy 90 (APD₉₀) százalékos értékéhez tartozó időtartamot ábrázoltuk a diasztolés intervallum függvényében. A kapott görbéket 1, 2, 3 vagy esetenként 4 exponenciális komponens összegeként illesztettük az alábbi egyenletek valamelyike szerint:

$$APD = APD_p * (1 - (A_1 * \exp(-x/Tau_1)))$$

$$APD = APD_p * (1 - (A_1 * \exp(-x/Tau_1)) - (A_2 * \exp(-x/Tau_2)))$$

$$APD = APD_p * (1 - (A_1 * \exp(-x/Tau_1)) - (A_2 * \exp(-x/Tau_2)) - (A_3 * \exp(-x/Tau_3)))$$

$$APD = APD_p * (1 - (A_1 * \exp(-x/Tau_1)) - (A_2 * \exp(-x/Tau_2)) - (A_3 * \exp(-x/Tau_3)) - (A_4 * \exp(-x/Tau_4)))$$

ahol APD azt az APD₅₀, APD₇₅, vagy APD₉₀ értéket jelenti, amit x diasztolés intervallum (DI) esetén mértünk, APD_p a különböző APD értékek aszimptotikus értékét jelenti végtelen hosszú DI értékre extrapolálva, a Tau értékek az egyes exponenciális komponensek időállandóinak felelnek meg, az A értékek az egyes komponensek relatív amplitúdóit jelentik az APD_p hányadaként kifejezve. A regressziós koeficiens minden esetben 0.99 felett volt.

Elektrofiziológiai vizsgálatok kutyából, nyúlból és tengerimalacból izolált kamrai szívműködéseken

A nyúlból, kutyából és tengerimalacból izolált kamrai szívműködések restitutionós kinetikájának vizsgálatához és a kalciumáram reaktivációjának meghatározásához módosított koronária perfúziós eljárással előállított kamrai szívműködéseket használtunk (Varró és mtsai

1991). Az izolált sejteket Tyrode oldatban szuszpendáltuk, majd a méréseket patch-clamp technika segítségével whole-cell konfigurációban áram- és feszültség-clamp üzemmódban (Hamill és mtsai 1981) végeztük szobahőmérsékleten. A patch pipetták belső oldatának összetétele: KCl: 140; $MgCl_2$:1.0; Na_2ATP : 5.0; EGTA: 1 mmol/l; pH= 7.2; a pipetták soros ellenállása 2-4 MOhm volt. Kalciumáram mérések során a pipetta töltésére használt oldat 120 mmol/l K-glutamátot és 20 mmol/l cézium-kloridot, míg a külső oldat 3 mmol/l 4-aminopyridint tartalmazott a káliumáramok gátlása céljából. Az elektródpotenciált a nagy ellenállású seal kialakítása előtt nullára kompenzáltuk. Az akciós potenciálokat az ingerküszöb kétszeresének megfelelő amplitúdójú impulzusokkal váltottuk ki áram-clamp üzemmódban. Az erősítő kimenetén mérhető jelet egy 100 kHz-es A/D konverterrel digitalizáltuk, majd az eredményeket pClamp5.03 program segítségével analizáltuk. Izolált szívizomsejteken a restitúciós kinetikát és a kalciumáram reaktivációját egyaránt páros impulzusprotokollal határoztuk meg. Mindkét esetben az extrastimulus által kiváltott akciós potenciál időtartamát (APD_t) az alap-ingerlés által kiváltott akciós potenciál időtartamára (APD_b) normalizáltuk, majd a diasztolés időtartam függvényében ábrázoltuk. A kalciumáram reaktivációs kinetikájának vizsgálatakor két -50 mV holding potenciálról kiinduló és $+10$ mV feszültségű depolarizáló impulzust fokozatosan növekvő diasztolés időtartamokkal választottunk el. A kalciumáram reaktivációját a második és az első impulzus alatt mért csúcsáramok hányadosaként jellemeztük és a diasztolés időtartam függvényében ábrázoltuk.

Elektrofiziológiai vizsgálatok patkányból izolált kamrai szívizomsejteken

Patkányból izolált kamrai szívizomsejtek akciós potenciáljainak és ionáramainak vizsgálatához kollagenázzal és proteázzal emésztett sejteket használtunk (O'Neill és mtsai 1990). Az izolált sejteket Tyrode oldatban szuszpendáltuk, majd a méréseket patch-clamp technika segítségével whole-cell konfigurációban áram- vagy feszültség-clamp körülmények között végeztük szobahőmérsékleten. A patch pipetták belső oldatának összetétele: K-glutamát: 140; NaCl: 7.0; $MgCl_2$:5.0; HEPES: 3.0; K_2ATP : 5.0; EGTA: 0.1 mmol/l; pH=7.2 volt. A nátrium-kalcium csereáram mérése során a pipettaoldat 120 mmol/l K-glutamátot és 30 mmol/l cézium-kloridot, míg a külső oldat 5 mmol/l 4-aminopyridint és 0.1 mmol/l bárium-kloridot tartalmazott a káliumáramok gátlása céljából. Az elektróda diffúziós

potenciálját a nagy ellenállású seal kialakítása előtt nullára kompenzáltuk. Az akciós potenciálokat az 1-2 nA amplitúdójú depolarizáló impulzusokkal váltottuk ki áram-clamp üzemmódban. Az erősítő kimenőjelét egy 100 kHz-es A/D konverterrel digitalizáltuk, majd az eredményeket Clampex 5.5 programmal analizáltuk. A nátrium-kalcium csereáram amplitúdóját egy 50 ms hosszú 0 mV-ra történő depolarizációt követő farokáramként mértük -40 mV membránpotenciálon.

Intracelluláris kalciumtranziensek vizsgálata izolált szívműködéseken

Nyúlból izolált kamrai szívműködéseket akciós potenciáljait és intracelluláris kalciumtranzienseit regisztráltuk az 1 perces ingerlés-mentes periódust követő 5000 ms ciklushosszon alkalmazott első nyolc stimulus során. Az akciós potenciálokat áram-clamp üzemmódban regisztráltuk miközben a sejteket Tyrode oldattal perfundáltuk. Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásait Fura-2 fluoreszcens festék segítségével mértük. A patch-pipetták belső oldatának összetétele a következő volt: K-aszpartát: 110; KCl: 20; MgATP: 3.0; HEPES: 10; EGTA: 0.1; Fura-2: 0.1 mmol/l; pH=7.2. Az izolált sejteket váltakozva 340 és 380 nm hullámhosszú fénnel világítottuk meg, amelye egy kettős monokromátor rendszer segítségével alkalmaztuk. A kibocsátott fluoreszcens jelet a látótér egy korlátozott területéről gyűjtöttük, amely terület egy sejt két dimenziós területét fedte le, így az erről a területről érkező fényjelek a sejt átlagos intracelluláris kalciumkoncentrációját jellemezték. A sejtek két dimenziós képét videokamerával folyamatosan monitoroztuk. A kibocsátott fluoreszcens jelet fotoelektronsokszorozóval detektáltuk. A háttér-fluoreszcenciát a whole-cell konfiguráció kialakítása előtt megmértük, majd kivontuk mind a 340, mind a 380 nm hullámhosszú fénnel történt gerjesztéssel kiváltott fluoreszcens jelből. Az adatgyűjtést 400 Hz frekvencián OSCAR szoftverrel végeztük. Az intracelluláris kalciumkoncentrációt a háttér-fluoreszcenciára korrigált fluoreszcens hányados (F_{340}/F_{380}) formájában fejeztük ki (Grynkiewicz és mtsai 1985).

Patkányból izolált kamrai szívműködéseken az intracelluláris kalciumtranzienseket Indo-1 fluoreszcens festék segítségével mértük, a festéket a membránon könnyen penetráló acetoxymetilészter formájában juttattuk a sejtbe. A sejteket 340 nm hullámhosszú gerjesztőfénnel világítottuk meg, majd a kibocsátott fluoreszcens jelet 400 és 500 nm-en

regisztráltuk. Az intracelluláris kalciumkoncentrációt a 400 és 500 nm-en történt fluoreszcens emisszió hányadosaként fejeztük ki (O'Neill és mtsai 1990).

Vegyszerek

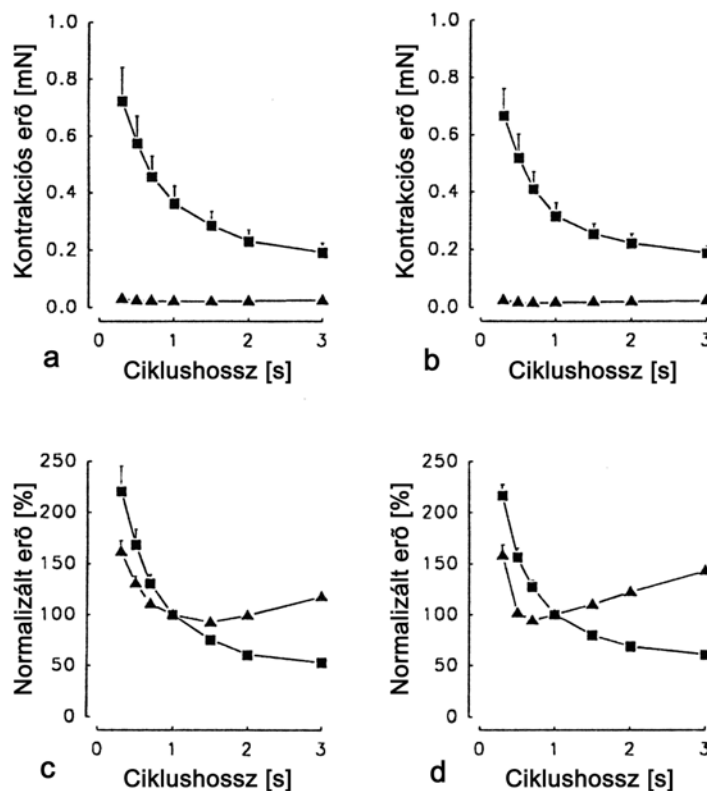
A kísérleteink során felhasznált vegyszerek közül a 4-aminopyridin (4-AP), tetraetilammonium (TEA), nifedipin, acetylstrophantidin, 4-acetamido-4'izotiocianatostilbén-2,2'-diszulfonsav (SITS), kollagenáz (I.A.), proteáz (XIV), EGTA és nicorandil a SIGMA-tól; az indo-1-AM, Fura-2, BAPTA-AM a Molecular Probes-tól; a levkromakalim a SmithKline Pharmaceuticals-tól; az egyéb vegyszerek a Reanal Budapest-től származtak.

A mérési eredményeket átlag $\pm$ SEM formában fejeztük ki, a szignifikanciát Student féle t-teszttel számítottuk. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket, ha a P értéke 0.05 alatt volt.

Eredmények

A kontrakciós erő frekvencia-függésének vizsgálata emlős kamrai preparátumokon

A tengerimalac és nyúl preparátumokon mért kontrakciós erő frekvencia-függése látható az 1. ábrán, egyrészt kontroll körülmények között, valamint 30 perc 15 $\mu\text{mol/l}$ levkromakalim kezelés után. A levkromakalim, amely az ATP-szenzitív kálium csatornák egyik leghatékonyabb aktivátora, alkalmazásával a tengerimalac és nyúl preparátumok akciós potenciálját kívántuk olyan mértékben rövidíteni, hogy az összevethető legyen a patkány akciós potenciálok időtartamával. Mindezt olyan szer alkalmazásával kívántuk elérni, amely közvetlenül nem befolyásolja a felszíni membrán kalcium csatornáit, tehát inotrop hatását kizárólag az akciós potenciál időtartamának módosítása útján fejt ki.

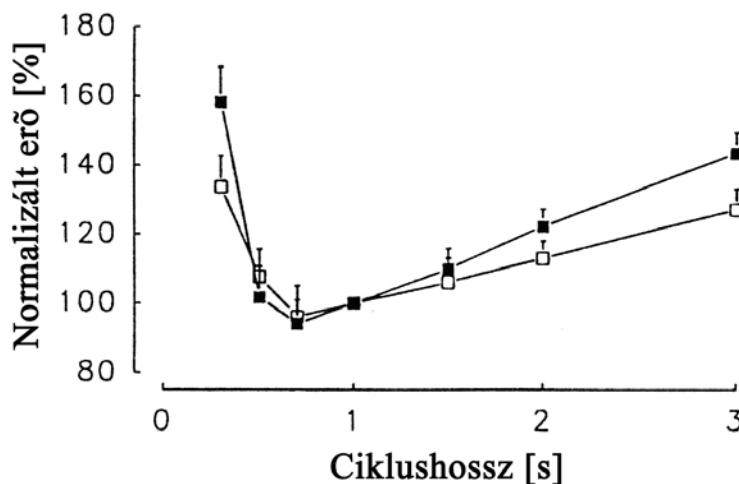


1.ábra Az ábrán tengerimalac (a,c) és nyúl (b,d) kamrai papilláris izmának kontrakciós erő-frekvencia összefüggését ábrázoltuk egyrészt kontroll körülmények között (négyzet), valamint 15 $\mu\text{mol/l}$ levkromakalim jelenlétében (háromszög). Az ábra felső részén (a,b) a kontrakciós erő nagyságának abszolút értékét tüntettük fel, míg az alsó részen (c,d) a különböző ciklushosszakon mért értékeket az 1 Hz frekvenciánál kapott érték százalékában fejeztük ki. Tengerimalac esetében a mérések száma kontroll körülmények között $n=8$, levkromakalim jelenlétében $n=21$, nyúl preparátumokon az esetszámok $n=7$ és $n=13$

Ezekben a kísérletekben a preparátumokat először 2000 ms ciklushosszon ingereltük, majd a ciklushosszakot lépcsőzetesen csökkentettük 1500, 1000, 700, 500, 300 ms-ra. Az akciós potenciált és a kontrakciós görbét 3-5 perc elteltével rögzítettük minden ciklushosszon. Az alkalmazott ekvilibrációs idő lehetővé

tette a kontrakciós erő frekvencia-függő változásainak közel steady-state körülmények között történő vizsgálatát anélkül, hogy a magasabb ingerlési frekvenciákon szokásosan kialakuló centrális hipoxia bekövetkezett volna.

Mindkét vizsgált preparátumon a kontrakciós erő nagysága minden frekvencián körülbelül egy nagyságrenddel csökkent a levkromakalim kezelés hatására. Ilyen mértékű csökkenés nem teszi lehetővé a megfelelő görbék közvetlen összehasonlítását, ezért az ábra alsó részén (c és d) a különböző frekvenciákon kapott értékeket az 1000 ms ciklushossznál mért erő százalékában fejeztük ki. Kontroll körülmények között a kontrakciók amplitúdója monoton növekedett az ingerlés ciklushosszának a 3000 - 300 ms-os tartományban történő csökkentésekor (pozitív erő-frekvencia összefüggés). Amikor levkromakalim jelenlétében az akciós potenciált a kontrollban mért 150-200 ms értékről a patkányra jellemző 20-40 ms értékre rövidítettük, az erő-frekvencia összefüggés megváltozott, az erő-frekvencia összefüggés az alacsonyabb frekvenciákon megfordult. A negatív erő-frekvencia összefüggés megjelenése tengerimalac esetében 1500 ms, míg nyúl esetében 700 ms feletti ciklushosszknál következett be.

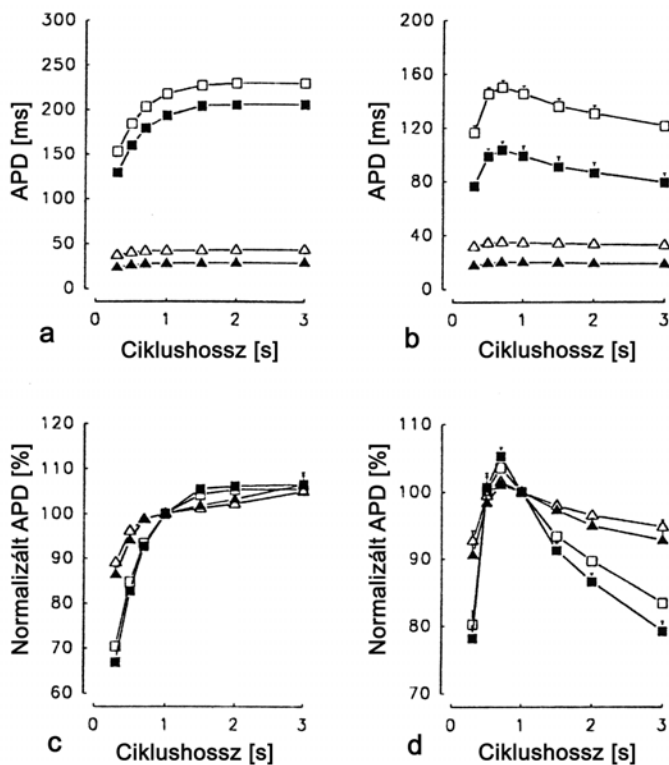


2. ábra Nyúl preparátumon mért erő-frekvencia összefüggés az 1 Hz frekvenciánál mért értékre normalizálva. A sötét négyzetek a 15 $\mu\text{mol/l}$ levkromakalim jelenlétében nyert értékeket ($n=13$), míg az üres négyzetek a 250 $\mu\text{mol/l}$ pinacidil kezelés után kapott értékeket jelölik ($n=5$).

Annak bizonyítására, hogy a levkromakalim jelenlétében észlelt változások nem a szer esetleges specifikus hatásának tulajdoníthatóak, egy másik akciós potenciál időtartamot rövidítő szerrel, az ugyancsak ATP-szenzitív káliumcsatorna aktivátor pinacidillel is megismételtük a méréseket (2. ábra). Pinacidillel és levkromakalimmal minden szempontból azonos eredményeket kaptunk, így arra következtettünk, hogy az

erő-frekvencia összefüggésben észlelt változások nem a levkromakalim specifikus hatására, hanem az akciós potenciál időtartamának rövidülése miatt jöttek létre.

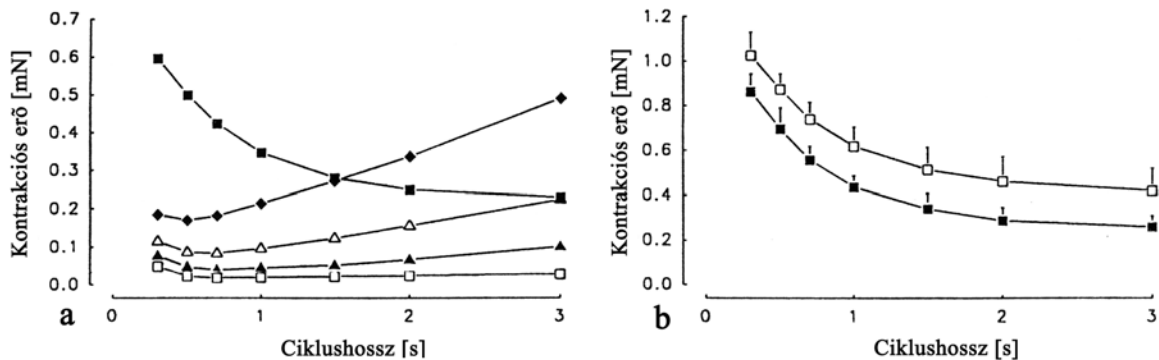
A levkromakalim jelenlétében megfigyelt akciós potenciál rövidülés azonos nagyságrendű volt a nyúlból és a tengerimalacból izolált preparátumokon (3a és 3b ábra). Bár az akciós potenciál frekvencia-függését leíró görbe lefutásának meredeksége csökkent levkromakalim kezelés hatására, a frekvencia-függés jellege nem változott meg (3c és 3d ábra). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a kontrakciós erő frekvencia-függésében bekövetkezett változás nem magyarázható az akciós potenciál időtartamának esetlegesen megváltozott frekvencia-függésével.



3. ábra Tengerimalacon (a,c) és nyúlon (b,d) mért akciós potenciálok időtartamának frekvencia-függése kontrol körülmények között és 15 $\mu\text{mol/l}$ levkromakalim jelenlétében. A felső ábrákon (a,b) abszolút értékekben, az alsó ábrákon (c,d) az 1 Hz-nél kapott érték százalékában kifejezve ábrázoltuk az akciós potenciálok időtartamát. A sötét és üres négyzetek rendre a kontrol körülmények között kapott APD_{50} és APD_{90} értékeket jelölik, míg a sötét és üres háromszögek ugyanezen paramétereket ábrázolják 15 $\mu\text{mol/l}$ levkromakalim jelenlétében. A mérések száma tengerimalacon kontrol körülmények között $n=5$, levkromakalim jelenlétében $n=11$. Nyúlon az esetszámok rendre $n=8$ és $n=13$ voltak.

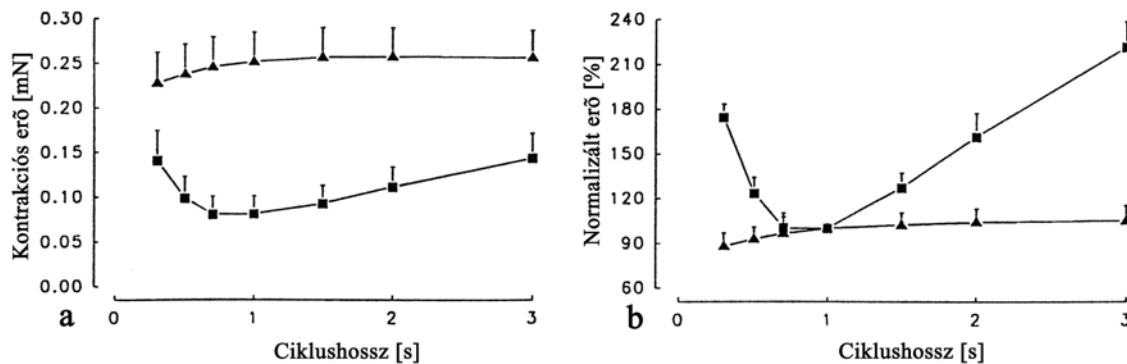
Mivel a patkány szívműködésének viszonylag magas intracelluláris nátriumkoncentrációját többen a patkányra jellemző negatív erő-frekvencia összefüggés egyik lehetséges okaként említik, következő kísérleteinkben az acetylcholin hatását vizsgáltuk a kontrakciós erő frekvencia-függésére nyúl kamrai papilláris izmon levkromakalim jelenlétében (4a ábra). Az acetylcholin a Na/K-ATP-áz gátlása útján növeli az intracelluláris nátriumkoncentrációt. Az előzőleg alkalmazott

levkromakalim ezekben a kísérletekben is jelentősen csökkentette a kontrakciós erő nagyságát és a kontroll körülmények között megfigyelt pozitív erő-frekvencia összefüggést a 700 ms-nál hosszabb ciklushosszakon megfordította. Az erő frekvenciafüggésének megfordulása egyre kifejezettebbé vált növekvő koncentrációjú acetylstrophantidin hatására, miközben a kontrakciók nagyságát az acetylstrophantidin minden frekvencián szignifikánsan növelte. Ez a hatás 3000 ms ciklushossznál volt a legerősebb, ahol a kontrakciós erő nagysága 1 $\mu\text{mol/l}$ acetylstrophantidin jelenlétében a levkromakalim-mentes kontroll értéket is meghaladta. Fentiekben túlmenően, az acetylstrophantidin kezelés a görbék inflexiós pontját is balra tolta (700 ms-ról 500 ms-ra). Fontos megjegyezni, hogy az acetylstrophantidin kezelés hatására az akciós potenciál időtartama nem változott jelentősen a levkromakalim folyamatos jelenléte miatt. A kontrakciós erő frekvenciafüggését az acetylstrophantidin kezelés önmagában nem változtatta meg (4b ábra), miközben a kontrakciós erő nagyságát minden ingerlési frekvencián megnövelte. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a kontrakciós erő frekvenciafüggésének megfordulása nincs összefüggésben az erő abszolút nagyságában bekövetkezett változással, annak ellenére, hogy az acetylstrophantidin pozitív inotróp hatása rövid akciós potenciálok esetén sokkal erősebb volt, mint hosszabb akciós potenciál időtartamok mellett.



4. ábra (a) Acetylstrophantidin (AC) hatása a kontrakciós erő frekvencia-függésére nyúl papilláris izmán (n=5). A satírozott négyzetek a kontroll értékeket jelölik; üres négyzetek: 15 $\mu\text{mol/l}$ levkromakalim önmagában (30 perc); satírozott háromszögek: levkromakalim plusz 0.2 $\mu\text{mol/l}$ AC; üres háromszögek: levkromakalim plusz 0.5 $\mu\text{mol/l}$ AC; satírozott rombusz: levkromakalim plusz 1 $\mu\text{mol/l}$ AC. (b) 30 perc 1 $\mu\text{mol/l}$ AC kezelés hatása 4 papilláris izmon levkromakalim előkezelés nélkül.

A kontrakciós erő frekvencia-függésének levkromakalim jelenlétében észlelt részleges megfordulása alapján feltételezhető volt, hogy patkányban az akciós potenciál időtartamának megnyújtása a kontroll körülmények között megfigyelhető negatív erő-frekvencia összefüggést részben, vagy egészében megfordítja. Ezt a hipotézist a továbbiakban úgy vizsgáltuk, hogy a káliumcsatorna-blokkoló 4-aminopyridin (10 mmol/l) és tetraetylammonium (2 mmol/l) együttes alkalmazásával megnöveltük patkányban az akciós potenciálok időtartamát. Ennek eredményeképpen az 1000 ms ciklushossznál mérhető APD_{50} és APD_{90} értékek 7.8 ± 1.2 és 30 ± 5 ms-ról rendre 28 ± 6 és 103 ± 24 ms-ra növekedtek ($p < 0.001$, $n = 8$). A 4-aminopyridin és tetraetylammonium együttes jelenléte minden ciklushossznál növelte a kontrakciós erő nagyságát miközben a kontroll körülmények között (1000 ms-nál hosszabb ciklushosszak esetén) megfigyelhető negatív erő-frekvencia összefüggést megszüntette, jöllehet a kontrakciós erő frekvencia-függése nem fordult meg (5. ábra).

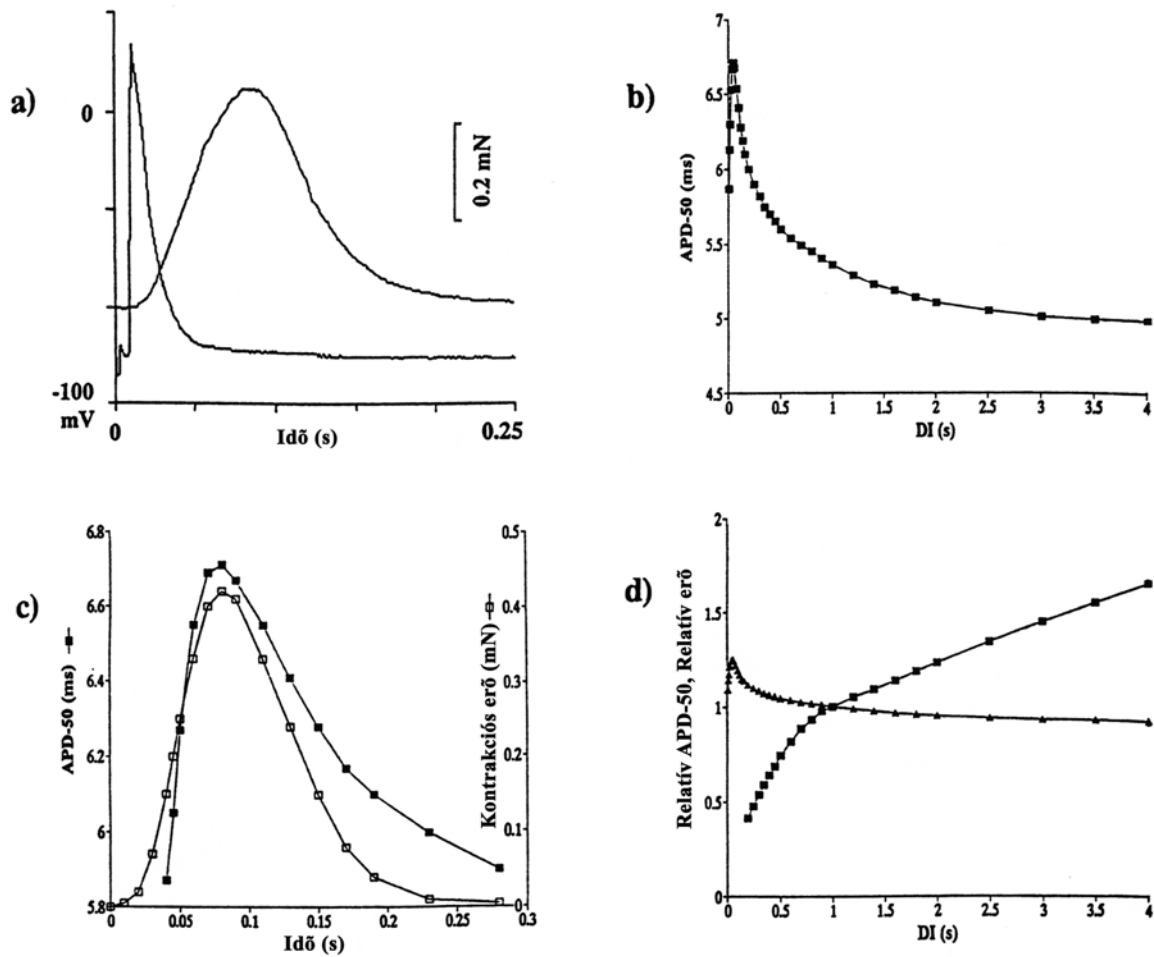


5.ábra Patkány papilláris izmán mért kontrakciós erő frekvencia-függése kontroll körülmények között (négyzet, $n = 10$) és 10 mmol/l 4-aminopyridin plusz 2 mmol/l tetraetylammonium jelenlétében (háromszög, $n = 16$). Az ábra (a) részén abszolút értékben, a (b) részen 1 Hz-re normalizálva ábrázoltuk az eredményeket.

Feltételezzük, hogy patkányban a tényleges átfordulás elmaradásának oka az APD_{50} elégtelen mértékű megnyújtása volt. A kontrakciós erő frekvencia-függésével kapcsolatos eredményeinket összegezve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az erő-frekvencia összefüggés jellegét elsősorban az akciós potenciál időtartama határozza meg, míg az intracelluláris nátriumkoncentráció nagyságának ezirányú hatása másodlagos.

Ppatkány kamrai szívmóráról 1 Hz ingerlőfrekvencia mellett elvezetett akciós potenciál megelőzi a kontrakciót (6a ábra). Így a restitúciós folyamat során a korai extrastimulus által kiváltott akciós potenciálok az utolsó kondicionáló impulzus által kiváltott kontrakciós válasz felszálló szárára, míg a későbbiek a leszálló szárra, vagy a teljes relaxáció idejére esnek.

A patkány kamrai szívmóráról 1 Hz ingerlőfrekvencia mellett elvezetett akciós potenciál megelőzi a kontrakciót (6a ábra). Így a restitúciós folyamat során a korai extrastimulus által kiváltott akciós potenciálok az utolsó kondicionáló impulzus által kiváltott kontrakciós válasz felszálló szárára, míg a későbbiek a leszálló szárra, vagy a teljes relaxáció idejére esnek.



6.ábra (a) Akciós potenciál és az általa kiváltott kontrakciós válasz patkány kamrai trabekulán Tyrode oldatban, 37 °C-on. (b) Patkány kamrai szívmórának elektromos restitúciója, ahol az APD₅₀ értékeket ábrázoltuk a diasztolés időtartam függvényében (n=9). (c) Az elektromos restitúciós görbe kezdeti része (tömör szimbólumok, bal ordináta) együtt ábrázolva az extrastimulust megelőző utolsó akciós potenciál által kiváltott kontrakciós válasz aktuális erőértékével (üres szimbólumok, jobb ordináta), ahol az eltelt időt az akciós potenciál felszálló szárától mértük. (d) Szimultán regisztrált elektromos (háromszög) és mechanikai (négyzet) restitúciós kinetika patkány kamrai szívmórában (n=9). Mindkét paramétert a DI=1000 ms esetén mérhető steady-state értékre normalizáltuk.

A patkány kamrai szívizom elektromos restitúciójának sajátosságait (az APD_{50} változását a diasztolés idő függvényében) a módszerek fejezetben leírt módon vizsgáltam. A restitúciós kinetika Tyrode oldatban 37°C -on legjobban három exponenciális komponens összegeként volt jellemezhető. Amikor a diasztolés időtartamot a kiindulási 10 ms értékről folyamatosan növeltük, az APD_{50} kezdetben növekedett, míg el nem érte maximális értékét 50 ms diasztolés időtartamnál, majd ezt követően a diasztolés időtartam további növelésekor az APD_{50} értéke először gyors, majd lassú kinetikával rövidült (6b ábra). A korai pozitív komponens időállandója 21.9 ± 1.9 ms, a következő gyors negatív komponensé 73.1 ± 6.0 ms, míg a késői negatív komponensé 1053 ± 61 ms volt ($n=9$).

A 6c ábrán a restitúciós görbe kezdeti szakaszát az utolsó kondicionáló impulzus által kiváltott akciós potenciálhoz tartozó kontrakciós válasszal együtt ábrázoltuk úgy, hogy az akciós potenciál felszálló szárát vettük a kezdőpontnak, majd ábrázoltuk a diasztolés időtartamnak megfelelő pillanatban mérhető kontrakciós erőt. Látható, hogy mindkét görbe a maximumát körülbelül 80 ms-nál éri el, ami szoros ok-okozati összefüggésre, vagy közös eredetre utal. Egy lehetséges magyarázat erre az intracelluláris kalciumszint fokozatos növekedése, amely lehetőséget a későbbiekben részletesen vizsgáltunk.

Szimultán regisztrált elektromos és mechanikai restitúciós kinetika látható a 6d ábrán. Mindkét görbét az 1000 ms diasztolés időtartam mellett elért steady-state értékére normalizáltuk a jobb összehasonlíthatóság kedvéért. Jól látható, hogy a fokozatosan emelkedő diasztolés időtartamokat követően kiváltott akciós potenciálok időtartama egy kezdeti emelkedés után fokozatosan csökken, míg az ugyanezen akciós potenciálok által kiváltott kontrakciós erők maximuma monoton nő, tehát a korai akciós potenciálok esetén megfigyelt pozitív korrelációval szemben hosszabb diasztolés időtartamok esetén negatív összefüggés tapasztalható az akciós potenciál időtartama és a kontrakciós erő (esetleg az intracelluláris kalciumszint) között.

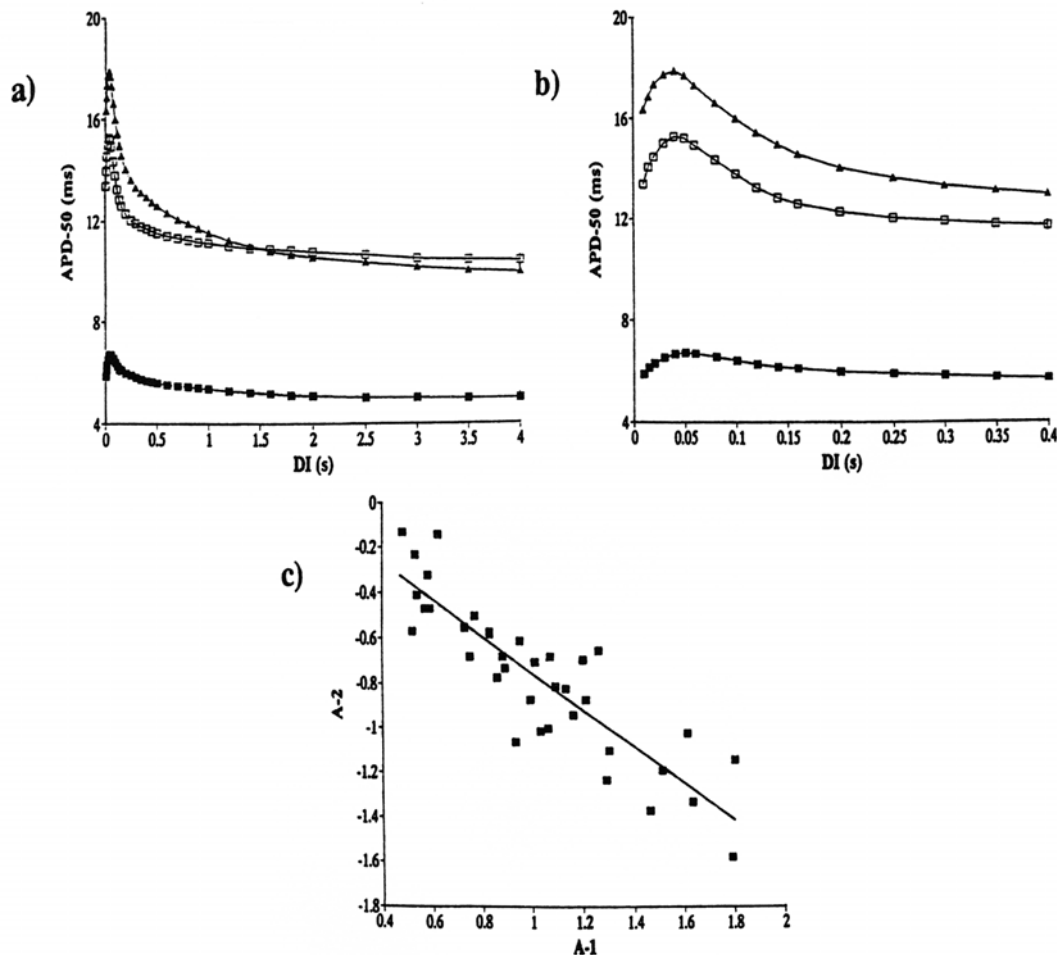
Az emlős szívizom restitúciós sajátosságait a különböző ioncsatornák feszültségfüggő reaktivációjával magyarázzák. Ezért a következő kísérletek során gátoltuk a repolarizációban résztvevő különböző ionáramokat, hogy azoknak a restitúciós folyamatban betöltött szerepét egyenként vizsgálhassuk. A különböző gátlószerek hatása

az akciós potenciál időtartamára 1 Hz ingerlési frekvencia mellett az 1. táblázatban látható. A tranziens kifelé irányuló káliumáram és a késői káliumáram blokkolása 5 mmol/l 4-aminopyridinnel és a preparátum tetraetilammoniummal történt kezelésével (60 perc 5 mmol/l koncentrációjú tetraetilammonium) szignifikánsan megnövelte, míg az L-típusú kalciumáram gátlása céljából alkalmazott 2.5 μ mol/l nifedipin, vagy 2 mmol/l mangán-klorid szignifikánsan csökkentette az APD₅₀ értékeket. A kalcium-függő kloridesatorna specifikus gátlószereként használt 2 mmol/l SITS nem befolyásolta szignifikánsan az akciós potenciál időtartamát.

1. Táblázat. Különböző csatornagátlók hatása az akciós potenciál időtartamára patkány kamrai szívműködés mellett.

Kezelés	cc. (mmol/l)	(n)	APD ₅₀ (ms)	P<
Kontroll (Tyrode)		(9)	5.32±0.43	
4-AP	5	(9)	11.2±0.73	0.0001
TEA	5	(4)	11.3±0.27	0.0001
SITS	2	(3)	5.53±0.32	n.s.
Nifedipin	0.0025	(8)	4.14±0.17	0.05
MnCl ₂	2	(10)	4.47±0.19	0.05
Koffein	10	(5)	12.9±0.46	0.0001

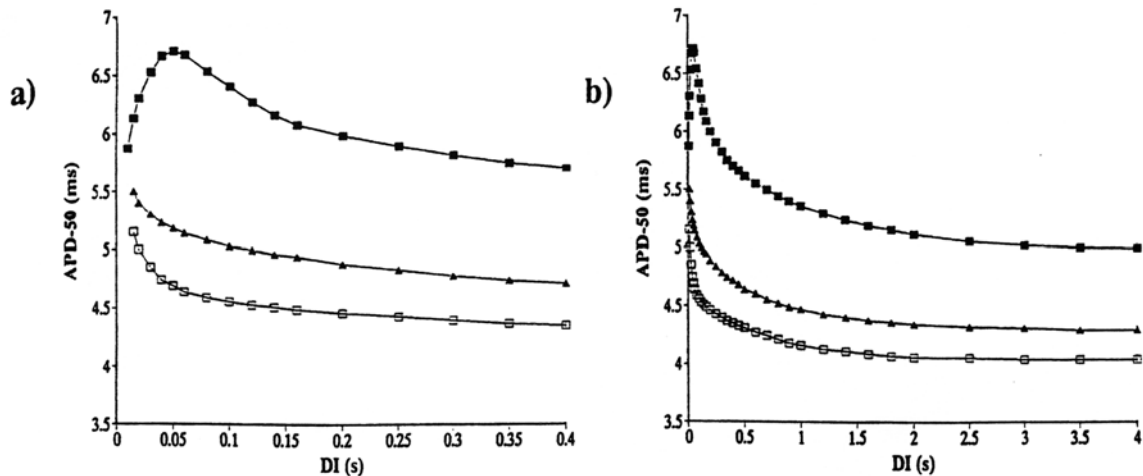
Megvizsgálva a fenti szerek restitúciós kinetikára irányuló hatását megállapítottuk, hogy sem a 4-aminopyridin, sem a tetraetilammonium nem változtatta meg szignifikánsan egyik exponenciális komponens időállandóját sem, de mindhárom komponens relatív amplitúdója (kivéve a 4-aminopyridin jelenlétében mért 3. komponens) szignifikánsan megnőtt a kezelések hatására (7a és 7b ábra, 2. táblázat). A különböző kísérleti feltételek között meghatározott kezdeti gyors pozitív komponens és az azt követő gyors negatív komponens relatív amplitúdóit egymás függvényében ábrázolva megállapítottuk, hogy azok között egyenes arányosság van (7c ábra). Ez felveti, hogy az első és második komponensért felelős folyamatok valamilyen módon kapcsolódnak egymáshoz.



7. ábra (a) Patkány kamrai szívizmának elektromos restitúciós kinetikája Tyrode oldatban (tömör négyzet, $n=9$), 5 mmol/l 4-aminopiridin jelenlétében (üres négyzet, $n=9$) és tetraetilammonium jelenlétében (háromszög, $n=4$). Az (a) ábra kezdeti, 0 és 400 ms DI közötti része látható felnagyítva a (b) ábrán. (c) A restitúciós kinetika második, gyors negatív komponensének amplitúdója (A-2) az első, gyors pozitív komponens amplitúdójának (A-1) függvényében ábrázolva. Minden restitúciós görbét három exponenciális komponens összegével illesztettünk és az egyes kísérletekben kapott A-1 és A-2 értékeket ábrázoltuk egymás függvényében. Az ábrán 36 kísérlet mérési eredményeit tüntettük fel, amelyeket különböző oldatokban (Tyrode, 4-AP, TEA) és különböző kondicionáló frekvenciák (1 és 3.3 Hz) alkalmazása mellett végeztünk. Az egyenest lineáris regresszióval illesztettük ($R=0.963$).

A kalciumáram gátlása 2.5 $\mu\text{mol/l}$ nifedipinnel, vagy 2 mmol/l mangán-kloriddal teljesen eltüntette az első két komponenst, míg a harmadik komponens változatlan maradt (8. ábra). A nifedipin vagy mangán-klorid jelenlétében kapott restitúciós görbék monoton csökkenő tendenciát mutattak és két negatív exponenciális komponens összegeként voltak leírhatók (az első, gyors negatív komponens időállandója 5 és 20 ms között változott, míg az azt követő lassú negatív komponens időállandóját az 500-1000 ms tartományban találtuk). Tehát a kalciumáram gátlását követően a restitúciós kinetika

alapvetően megváltozott, ami arra utal, hogy patkányban a normális restitúciós kinetika megjelenéséhez intakt kalciumcsatornák szükségesek.



8. ábra Nifedipin (2.5 $\mu\text{mol/l}$, üres négyszög, $n=8$) és MnCl_2 (2 mmol/l, háromszög, $n=10$) hatása patkány kamrai szívizom restitúciós kietikájára. A tömör négyszög a Tyrode oldatban mért kontroll értékeket jelzi ($n=9$). Az (a) ábrarészen a kezdeti $\text{DI}=400$ ms értékig ábrázoltuk a restitúciós görbét, míg a (b) ábrarészen a teljes, 4 s-ig terjedő diasztolés intervallum látható.

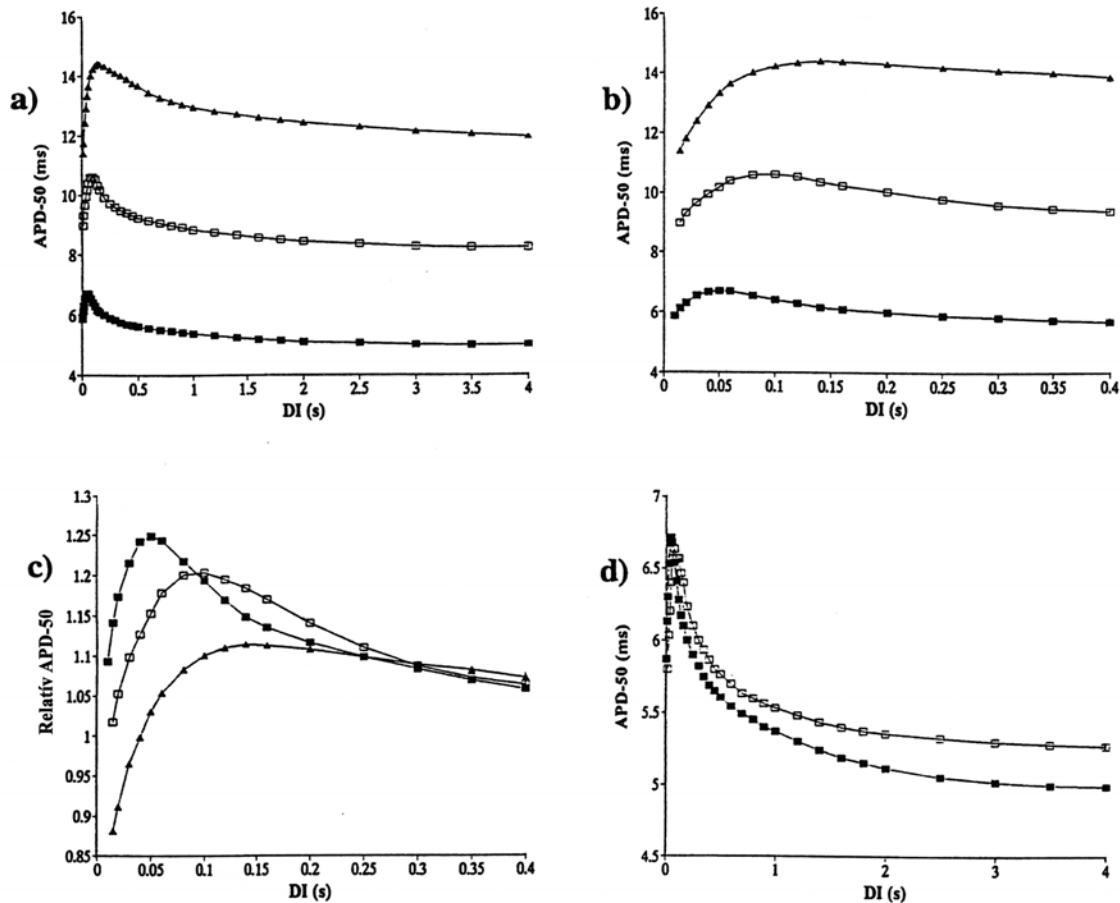
2. Táblázat. Patkány kamrai szívizmának restitúciós paraméterei 37 °C hőmérsékleten

	APDp (ms)	A_1	τ_1 (ms)	A_2	τ_2 (ms)	A_3	τ_3 (ms)
TYR ($n=9$)	4.96 ± 0.34	0.72 ± 0.08	21.9 ± 1.9	-0.5 ± 0.09	73.1 ± 6	-0.21 ± 0.03	1053 ± 61
4-AP ($n=7$) 5 mmol/l	$10.1 \pm 0.73^{***}$	$1.06 \pm 0.05^{**}$	21.2 ± 2	$-0.8 \pm 0.06^{**}$	69 ± 5.2	-0.17 ± 0.02	1083 ± 107
TEA ($n=4$) 5 mmol/l	$9.83 \pm 0.29^{***}$	$1.02 \pm 0.11^*$	22.2 ± 3	$-0.95 \pm 0.12^{**}$	71.2 ± 6.9	$-0.44 \pm 0.06^{***}$	982 ± 142

TYR: kontroll restitúciós kinetika Tyrode oldatban, 4-AP: 30 perc 5 mmol/l 4-aminopyridin jelenlétében, TEA: a méréseket 60-120 perc 5 mmol/l tetraetilammonium oldatban történt előkezelés után Tyrode oldatban végeztük a TEA eltávolítása után. A restitúció paramétereit a módszerek fejezetben leírt módon három exponenciális komponens összegeként határoztuk meg. Az APDp az APD_{50} végtelen hosszú diasztolés intervallumok mellett várható értéke; a τ_1 , τ_2 és τ_3 a megfelelő exponenciális komponensek időállandóit, míg az A_1 , A_2 és A_3 a hozzájuk tartozó relatív amplitúdókat jelölik. A regressziós koeficiens minden csoportban 0.9999 volt. A szignifikancia fokát Student féle t-próbával határoztuk meg (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$).

Koffein kezelés hatására a restitúciós görbe első, gyors pozitív valamint a második, gyors negatív komponense jelentősen lassult, míg a görbe harmadik szakasza alig változott (9a és 9b ábra). Az APD_{50} steady-state értéke is növekedett koffein

hatására. Ezek a koffein okozta változások jobban láthatóak a 9c ábrán, ahol a restitúciós görbe pontjait az 1000 ms diasztolés intervallum után mért APD_{50} értékre normalizáltuk, így a steady-state akciós potenciál időtartam változások zavaró hatását kiküszöbölhettük. Ezeken a görbéken az első gyors komponens időállandója a kontroll 21.9 ± 1.9 ms ($n=9$) helyett 39.5 ± 5.8 ms ($n=5$) lett, miközben a gyors negatív komponens eltűnt 10 mmol/l koffein hatására. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy az intracelluláris kalciumszint tranziens változásai összetett mechanizmusokon keresztül vesznek részt a patkány kamrai szívműködés elektromos restitúciójának szabályozásában. Az egyik ilyen mechanizmus lehet a kalcium-függő kloridáram (Zygmunt and Gibbons 1992), azonban az áram gátlása 2 mmol/l SITS-el nem okozott jelentős változást a restitúciós kinetikában, tehát a kloridáram ezirányú szerepe nem valószínűsíthető (9d ábra).



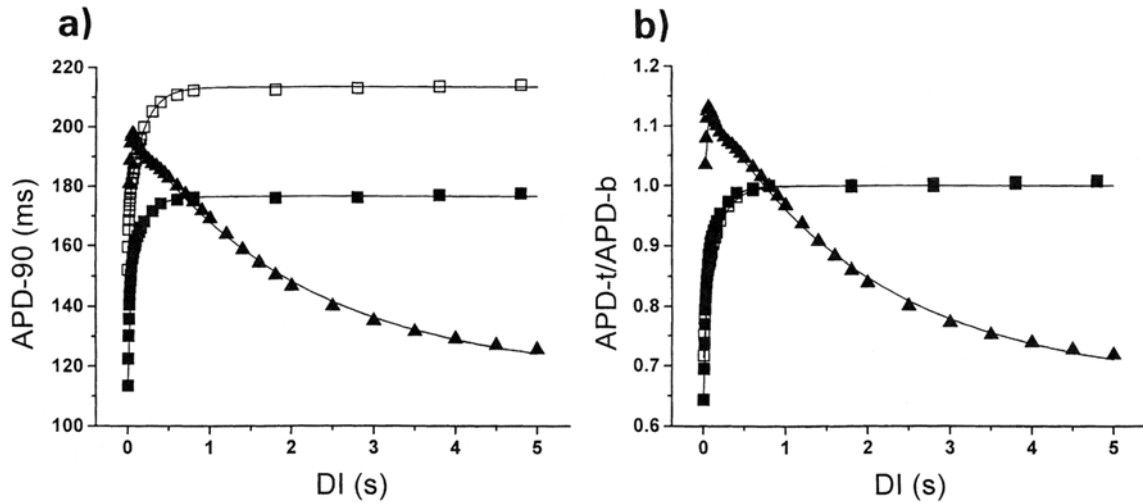
9. ábra (a,c) Koffein hatása patkány kamrai szívműködés restitúciós kinetikájára (üres négyszög: 5 mmol/l, $n=4$; háromszög: 10 mmol/l, $n=5$; tömör négyszög: kontroll, $n=9$). Az (a, b) ábrarészekben abszolút értékeket, a (c) ábrarészen az 1000 ms diasztolés intervallumnál mért (steady-state) értékre normalizált APD_{50} értékeket tüntettük fel. (d) Patkány kamrai szívműködés restitúciós kinetikája Tyrode oldatban (sötét négyzet) és 2 mmol/l SITS jelenlétében (üres négyzet).

A citoplazmatikus kalciumszint változásait enzimatikusan izolált patkány kamrai szívműködéseken indo-1 fluoreszcens festék segítségével követtük. Ezeket a kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük, a kalciummérésekkel párhuzamosan akciós potenciálokat vezettünk el áram-clamp üzemmódban, vagy mértük a nátrium-kalcium csereáramot voltage-clamp körülmények között. A szimultán nyert akciós potenciálok és kalciumtranziensek időviszonyait összehasonlítva megállapíthattuk, hogy az intracelluláris kalciumszint gyorsan emelkedett a stimulust követően, csúcsát az APD_{90} értékkel egyidőben érte el, majd ezt követően lassan csökkent.

A nátrium-kalcium csereáramot a -40 mV holding potenciálról kiinduló 0 mV-ra történő 50 ms időtartamú depolarizációt követően kialakuló farokáramként regisztráltuk. Mivel a kalciumáram gyorsan deaktiválódik a repolarizáció során és a káliumcsatornákat 30 mmol/l $CsCl_2$, 5 mmol/l $4-AP$ és 0.1 mmol/l $BaCl_2$ segítségével maradéktalanul blokkoltuk, a -40 mV holding potenciálra történő visszatéréskor megjelenő farokáramot döntően a nátrium-kalcium cseremechanizmus árama hozta létre. Öt kísérlet átlagában a nátrium-kalcium csereáram relaxációs időállandója 140 ± 4.5 ms, amplitúdója -102.4 ± 21.3 pA volt. A szimultán regisztrált kalciumtranziensek csúcsamplitúdója 736.6 ± 103 nmol/l, míg relaxációs időállandója 151 ± 12.3 ms volt. Méréseink értelmében tehát a kalciumtranziens és nátrium-kalcium csereáram relaxációs időállandója egymástól nem különbözött szignifikánsan.

A kalciumtranziens reaktivációs kinetikáját áram-clamp körülmények között alkalmazott páros impulzusok segítségével vizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben a tesztimpulzust követő kalciumtranziens amplitúdóját normalizáltuk a kondicionáló impulzussal kiváltott amplitúdóra, majd a hányadosokat a két impulzus közötti időtartam függvényében ábrázoltuk. A kapott adatok nagyfokú szórása csak monoexponenciális illesztést engedett meg, melynek során a kalciumtranziens restitúciójának időállandóját 1575 ± 326 ms-nak határoztuk meg.

A kutyából és tengerimalacból izolált preparátumok esetén a 0.5-1 s diasztolés időtartományban az APD monoton növekedett, majd a vizsgált 5 s diasztolés időtartamon belül a restitúciós görbe szaturálódott. Ezzel szemben, a nyúl kamrai szívműködés restitúciós görbéje bifázisos volt: az APD értéke kezdetben nőtt, majd ezt követően folyamatosan csökkent a diasztolés időtartam növelésekor (10. ábra).

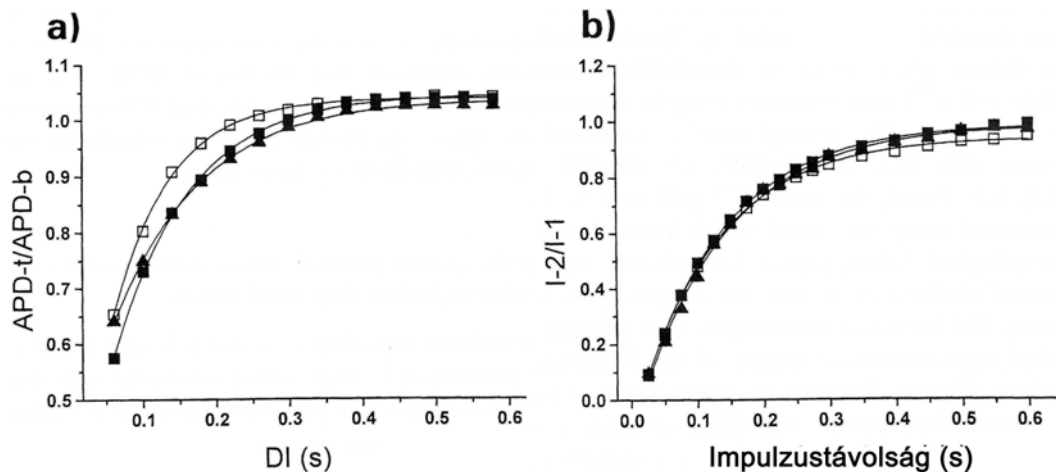


10.ábra (a) multicelluláris kamrai szívműködés elektromos restitúciója tengerimalac (tömör négyszög, $n=8$), kutya (üres négyszög, $n=5$) és nyúl (háromszög, $n=15$) preparátumokon, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, KCl-dal töltött konvencionális mikroelektrodával mérve. A mérések során a kondicionáló frekvencia 1 Hz volt. (b) az (a) ábrarészen látható görbék a steady-state APD_{90} értékre normalizálva. A görbék két exponenciális tag összegeként illesztettük.

A könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért a különböző diasztolés időtartamok után kapott APD értékeket az 1000 ms diasztolés időtartam után mérhető steady-state APD értékre normalizáltuk. Megvizsgálva ezeket a görbéket azt találtuk, hogy kutya és tengerimalac kamrai szívműködés restitúciós kinetikája közel azonos. Mindhárom species restitúciós kinetikájának első komponensének időállandójára közel azonos értékeket kaptunk: tengerimalacban 14.5 ± 1.1 ms ($n=8$), kutyában 12.7 ± 0.4 ms ($n=5$), nyúlban 13.7 ± 1.1 ms ($n=15$). Ezt egy lassabb, de ugyancsak pozitív komponens követte, amely tengerimalacnál 215 ± 49 ms, kutyánál 187 ± 9 ms időállandóval volt jellemezhető. Nyúl esetében a második komponens előjele negatív, időállandója 2070 ± 140 ms volt. Ezek az

eredmények azt mutatják, hogy fiziológiás körülmények között a nyúl és a másik két species kamrai szívmizának restitúciós kinetikájában alapvető különbségek vannak.

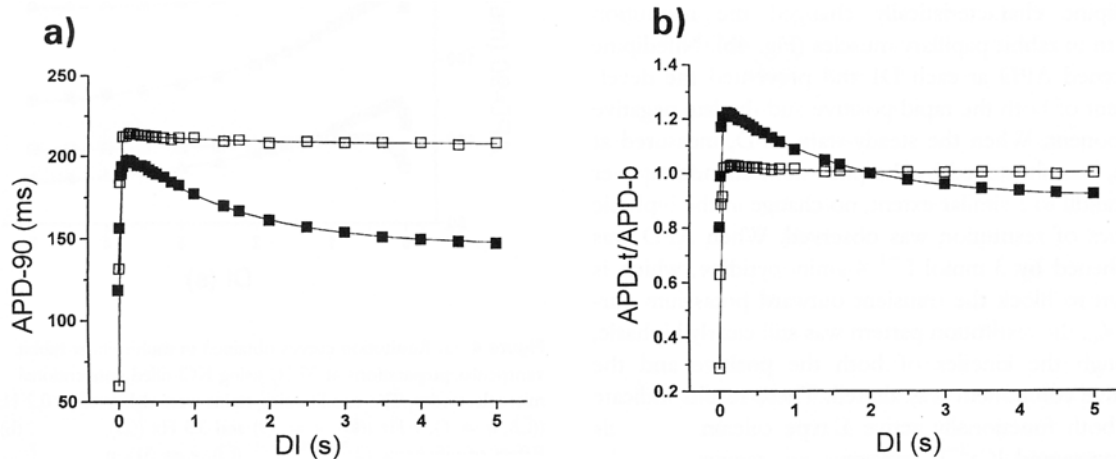
Mivel számos megfigyelés bizonyosága szerint az L-típusú kalciumáram reaktivációja befolyásolhatja a restitúciós kinetikát, meghatároztuk a kalciumáram reaktivációs kinetikáját és az akciós potenciál restitúciós kinetikáját mindhárom species izolált kamrai szívmizomsejtjein azonos kísérleti körülmények között (11. ábra). Mindegyik görbe monoexponenciálisan volt illeszthető és mindhárom species esetén az akciós potenciál restitúciós kinetikája gyorsabb volt, mint a kalciumáram reaktivációjának időállandója. Az akciós potenciál restitúciós kinetikájának időállandója tengerimalacban 103 ± 13 ms ($n=6$), kutyában 72 ± 6 ms ($n=5$) és nyúlban 93 ± 8 ms ($n=7$) volt. A kalciumáram reaktivációs időállandója a három species esetén hibahatáron belül megegyezett: rendre 141 ± 15 ms ($n=7$), 147 ± 26 ms ($n=6$) és 137 ± 12 ms ($n=7$) értékeket kaptunk.



11. ábra APD₉₀ restitúciója (a) és I_{Ca,L} inaktivációból való visszatérése (b) izolált kamrai szívmizomsejteken tengerimalac (tömör négyszög, $n=6$), kutya (üres négyszög, $n=5$) és nyúl (háromszög, $n=7$) esetén. A kísérleteket szobahőmérsékleten 1 mmol/l EGTA tartalmú patch pipettával végeztük. A páros impulzussal végzett ingerlés frekvenciája 0.33 Hz, az alkalmazott leghosszabb diasztolés intervallum 600 ms volt. A görbéket monoexponenciálisan illesztettük.

A 10b és 11a ábrákat összevetve azt is megállapíthatjuk, hogy jelentős különbség van a nyúl kamrai szívmizomsejtek restitúciós kinetikájában aszerint, hogy a restitúciót multicelluláris preparátumon vagy izolált szívmizomsejten vizsgáltuk. A különbség egyik lehetséges oka az intracelluláris kalciumszintben lévő különbség, mivel az izolált szívmizomsejtek vizsgálatát EGTA-t tartalmazó patch pipettával végeztük, míg a multicelluláris preparátumokon alkalmazott konvencionális üvegmikroelektróda nem

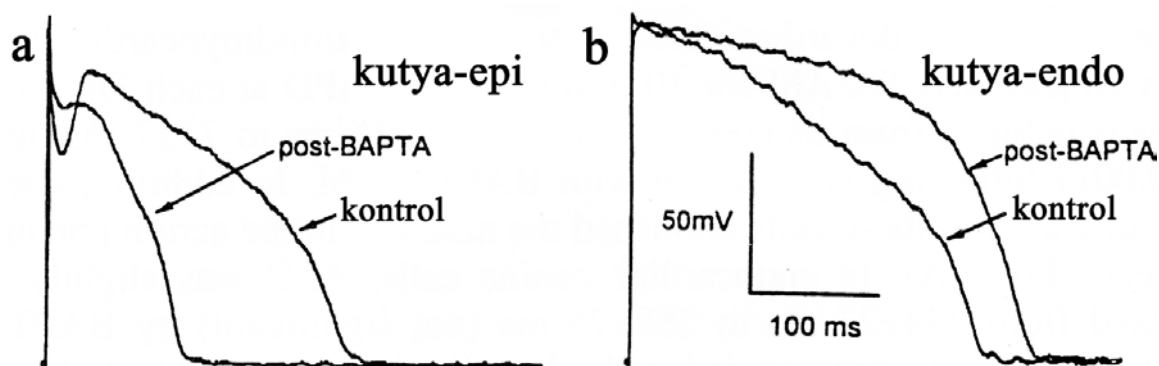
tartalmazott kalcium-kelátort. Ezért a 12. ábrán bemutatott kísérletben a nyúl kamrai szívműködés restitúciós kinetikáját $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ BAPTA-AM jelenlétében is megvizsgáltuk (a BAPTA az EGTA-hoz hasonlóan, de annál jóval nagyobb affinitással köti a kalciumot).



12. ábra BAPTA-AM hatása a nyúlból izolált kamrai szívműködés restitúciós kinetikájára. A kontroll görbét Tyrode oldatban regisztráltuk (tömör négyszög, $n=8$), majd a sejteket $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ BAPTA-AM tartalmú oldatban inkubáltuk (üres négyszög, $n=7$). A méréseket KCl-dal töltött konvencionális mikroelektrodák alkalmazásával végeztük $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten. Az extrastimulust megelőző kondicionáló frekvencia 0.5 Hz volt. A (b) ábrarészen az (a) ábrarészen látható görbe steady-state APD-re normalizált alakja látható. A görbéket két exponenciális komponens összegeként illesztettük.

A méréseket EGTA-mentes konvencionális mikroelektrodával végeztük $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, az extrastimulust megelőző ingerlési frekvencia 0.5 Hz volt. Ilyen körülmények között hasonlítva össze a nyúlból izolált kamrai szívműködés restitúciós kinetikáját a multicelluláris preparátumokéval, mindkét esetben egyértelműen bifázisos görbét kaptunk, jóllehet a görbék lefutásában találtunk kisebb eltéréseket. Az intracelluláris kalcium kelálása BAPTA-AM segítségével minden diasztolés időtartam mellett szignifikánsan növelte az akciós potenciál időtartamát: az APD_p a kontroll $134\pm 14\text{ ms}$ -ről $210\pm 10\text{ ms}$ -ra nőtt ($n=7$, $P<0.001$). Lényegesnek tartom, hogy a restitúciós kinetika nyúlra jellemző lassú negatív komponense BAPTA-AM kezelés hatására gyakorlatilag eltűnt, míg a gyors pozitív komponens időállandója nem változott szignifikánsan BAPTA-AM kezelés hatására (25.5 ± 2 és $26.8\pm 2\text{ ms}$).

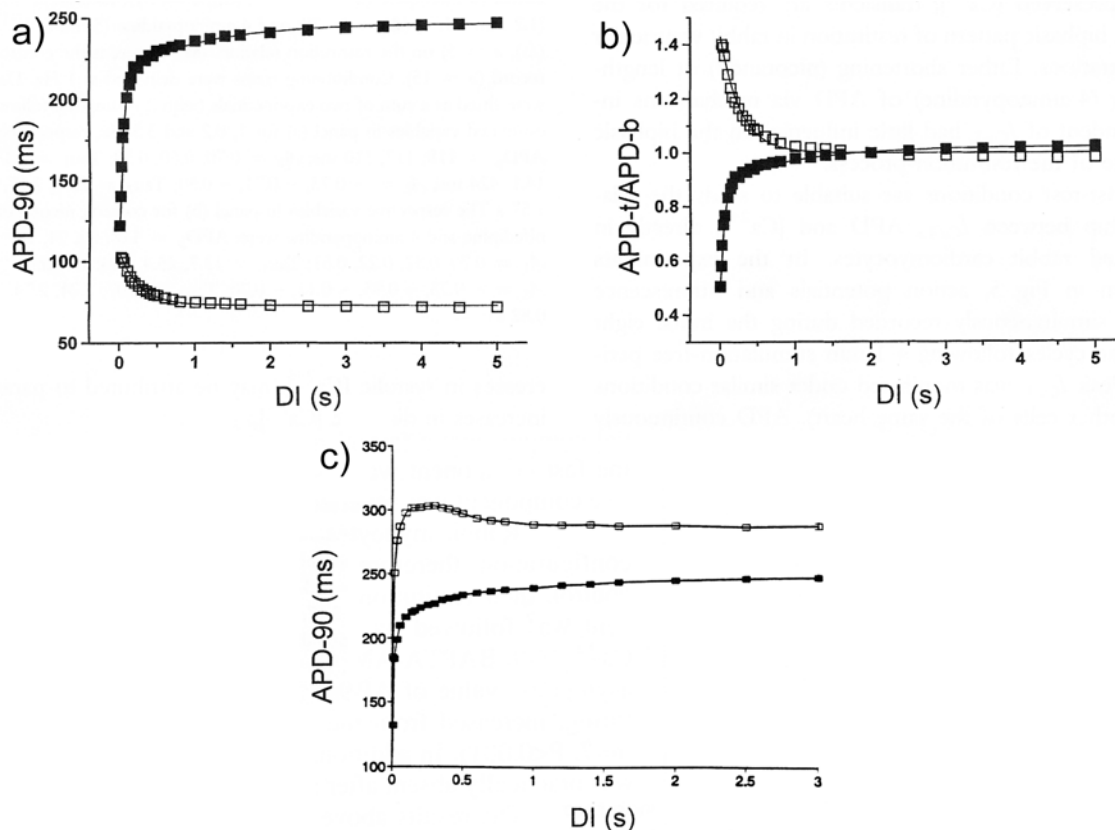
Az intracelluláris kalcium kelálására alkalmazott BAPTA-AM eltérő változást okozott kutya kamrai szívműködésen attól függően, hogy azok endokardiális, vagy epi-midmiokardiális eredetűek voltak (13. ábra).



13. ábra BAPTA-AM hatása epi-midmiokardiális (a) és endokardiális (b) kutya kamrai szívműködési akciós potenciáljának alakjára.

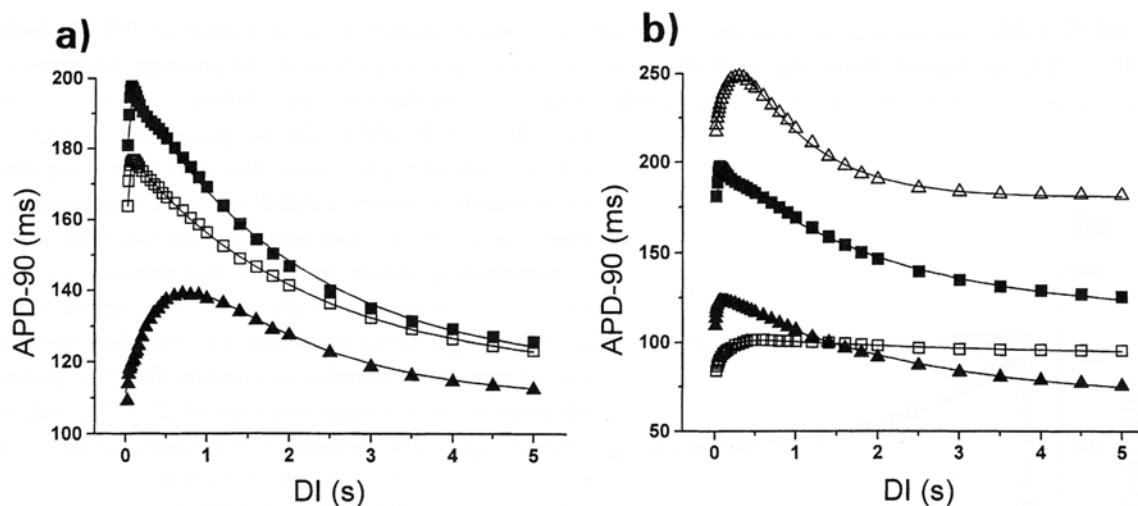
A szívműködési sejteket az akciós potenciáljuk alakja alapján azonosítottuk. Az epi-midmiokardiális sejtek akciós potenciáljára jellemző a markáns korai repolarizációt követő mély incisura (notch), amely hiányzik az endokardiális sejteken. 10 $\mu\text{mol/l}$ BAPTA-AM hatására az epikardiális eredetű kutya kamrai szívműködési sejtek akciós potenciáljára jellemző notch eltűnt, az akciós potenciál időtartama (APD_{90}) 248 ± 15 ms-ről 73 ± 7 ms értékre csökkent ($n=8$, $p<0.001$). Az endokardiális sejteken BAPTA-AM hatására az APD_{90} érték mérsékelt növekedése volt megfigyelhető (244 ± 27 ms kontroll értékről 288 ± 75 ms-ra, nem szignifikáns).

A kutya kamrai endokardiális és epi-midmiokardiális sejtjeinek restitúciós görbéi kontroll körülmények között hasonló kinetikát követtek, azok mindkét sejtípus esetén két pozitív komponens összegeként voltak jellemezhetők, amelyek időállandója 86 ± 11 ms és 1.56 ± 0.17 s voltak, azonban a BAPTA-AM kezelés eltérően hatott a kétféle sejtípus restitúciós folyamatára. Epi-midmiokardiális eredetű sejteken BAPTA-AM hatására az első, gyors pozitív komponens eltűnt és a második, lassú pozitív komponens előjelet váltott (14a és 14b ábra). Endokardiális eredetű kutya kamrai sejteken a restitúciós kinetika BAPTA-AM jelenlétében bifázissá vált (14c ábra).



14. ábra BAPTA-AM hatása kutyából izolált epi-midmiokardiális (a,b) és endokardiális (c) kamrai szívizomsejtek restitúciós kinetikájára. A kontroll görbéket Tyrode oldatban regisztráltuk (tömör négyszög, $n=8$). Az üres négyszög 10 $\mu\text{mol/l}$ BAPTA-AM kezelés után jelöli ugyanezen görbéket ($n=8$). A méréseket 37 °C hőmérsékleten, KCl-dal töltött konvencionális mikroelektrodák segítségével végeztük. Az extrastimulust megelőző kondicionáló frekvencia 0.5 Hz volt. A (b) ábrarészen az (a) ábrarészen látható görbék steady-state APD-re normalizált alakja látható. A kontroll görbéket két exponenciális komponens összegeként, a BAPTA-AM kezelés után kapott görbéket monoexponenciálisan illesztettük.

Ismert, hogy az intracelluláris kalciumszint (szisztolés és diasztolés) változik az ingerlési frekvencia függvényében, ezért megvizsgáltuk a nyúl kamrai szívizomsejtek restitúciós kinetikáját 0.2, 1 és 3.3 Hz kondicionáló frekvencia esetén (15a ábra). Összehasonlítva a görbéket látható, hogy bár a 0.2 és 1 Hz frekvencia mellett meghatározott restitúciós kinetika nem különbözik egymástól lényegesen, a 3.3 Hz kondicionáló frekvencián mért restitúciós görbe első gyors pozitív komponensének időállandója jelentős mértékben megnövekedett (13.7 ms-ról 424 ms-ra), miközben APD_p értéke csökkent (118 ms-ról 110 ms-ra) az 1 Hz-en mért értékekhez képest. Ezek az eredmények ismét arra utalnak, hogy a magasabb (3.3 Hz) ingerlőfrekvencia hatására megnövekedett intracelluláris kalciumszint rövidíti az akciós potenciál időtartamát és lassítja a restitúciós folyamatot annak kezdeti szakaszán.



15. ábra (a) Multicelluláris nyúl kamrai preparátumon, 37°C hőmérsékleten, KCl-dal töltött konvencionális mikroelektrodák segítségével nyert restitutionis görbék. A kondicionáló frekvencia 0.2 Hz (üres négyszög, $n=6$), 1 Hz (tömör négyszög, $n=19$) és 3.3 Hz (háromszög, $n=7$) volt. A görbéket két exponenciális komponens összegével illesztettük, amely során rendre a következő paramétereket kaptuk 1, 0.2 és 3.3 Hz esetében: APD_p=118, 117, 110 ms; $A_1=0.70, 0.60, 0.58$; $\tau_1=13.7, 14.1, 424$ ms, $A_2=-0.73, -0.71, -0.59$; $\tau_2=2.07, 2.17, 1.57$ s.

(b) Nifedipin (2.5 $\mu\text{mol/l}$, üres négyszög, $n=31$), nicorandil (1.2 mmol/l, tömör háromszög, $n=28$) és 4-aminopyridin (3 mmol/l, üres háromszög, $n=5$) hatása nyúl kamrai szívizmának restitutionis kinetikájára 1 Hz kondicionáló frekvencia esetén (kontroll: tömör négyszög). A görbéket két exponenciális komponens összegével illesztettük, amely során rendre a következő paramétereket kaptuk kontroll körülmények között, valamint nicorandil, nifedipin 4-aminopyridin hatására: APD_p=118, 69, 94, 181 ms; $A_1=0.70, 0.32, 0.22, 0.51$; $\tau_1=13.7, 25.4, 144, 194$ ms, $A_2=-0.73, -0.95, -0.11, -0.70$; $\tau_2=2.07, 2.24, 2.74, 0.82$ s.

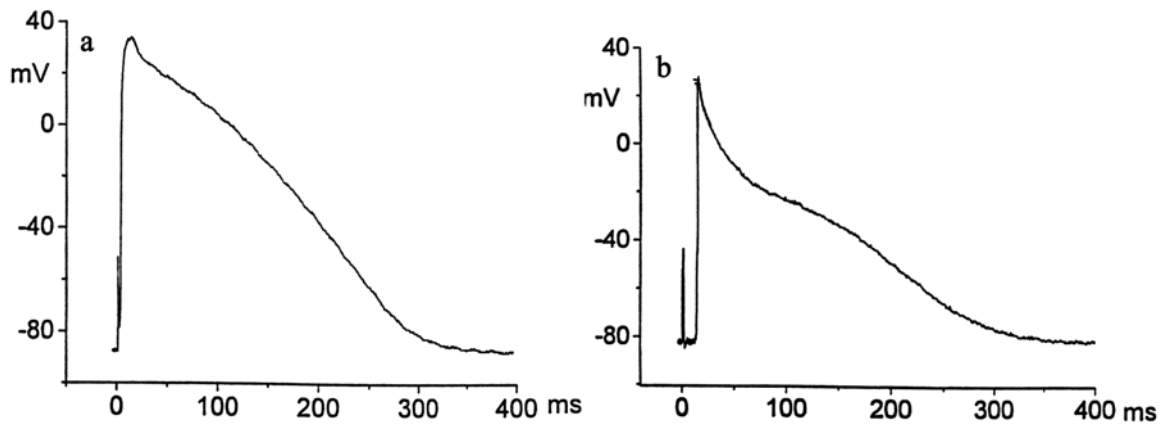
Nyúl kamrai szívizmán a kalciumáram gátlása minden diasztolés intervallum esetén rövidítette az akciós potenciál időtartamát és megakadályozta mind az első gyors pozitív, mind az azt követő negatív komponens kialakulását (15b ábra). Ha nicorandillal, az ATP-szenzitív káliumcsatorna gátlószerével, rövidítettük az akciós potenciál időtartamát ugyanilyen mértékben, a restitutionis kinetika bifázisos jellege megmaradt. Ugyanígy 4-aminopyridin, az I_{to} gátlószerének hatására a bifázisos jelleg nem változott, bár mindkét komponens időállandója eltért a kontroll körülmények közt mérhető értéktől. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy fiziológiás körülmények között a nyúl kamrai szívizomsejtek restitutionis kinetikájában tapasztalt bifázisos jelleg kialakulásához funkcionálisan aktív kalciumcsatorna és a normális intracelluláris kalciumszint egyaránt szükséges. Az akciós potenciál időtartamának $I_{\text{Ca,L}}$ -től független rövidítése (nicorandil),

vagy nyújtása (4-aminopyridin) nem változtatja meg a nyúl kamrai szívizomsejtjeinek restitúciós görbéinek bifázisos lefutását.

A hosszabb ingerlés-mentes periódust követő sorozatingerlés hatására bekövetkező változások alkalmasak a kalciumáram, az APD és az intracelluláris kalciumszint közötti kapcsolat vizsgálatára. Kísérleteinket nyúl kamrai szívizomsejteken úgy végeztük, hogy 1 perces ingerlés-mentes periódus (pihenés) után szimultán regisztráltuk az első nyolc stimulus által kiváltott kalciumtranzienst és akciós potenciált. A kalciumáram amplitúdóját voltage-clamp körülmények között mértük egy ugyanazon szívből származó, de másik sejten. Az akciós potenciál időtartama a másodiktól a nyolcadik stimulusig folyamatosan csökkent, ez a rövidülés az akciós potenciál 30, 50 és 90 százalékos repolarizációjának megfelelő szinteken arányos volt. Ezzel egyidőben a kalciumáram csúcsamplitúdója folyamatosan csökkent, míg az intracelluláris kalciumszint (szisztolés és diasztolés) párhuzamosan nőtt az első nyolc stimulus során. A változatlan amplitúdójú kalciumtranziens mellett észlelt magasabb szisztolés kalciumszint tehát valószínűleg a diasztolés kalciumszint növekedésének tulajdonítható. Fenti eredményeket a három paraméter kapcsolatának szempontjából elemezve arra a következtetésre jutunk, hogy az intracelluláris kalciumszint növekedése a kalciumáram és az akciós potenciál időtartamának csökkenését vonja maga után nyúl kamrai szívizomsejteken.

Az elektromos restitúció vizsgálata humán kamrai és pitvari szívizomban

Humán szívizmon a restitúciós kinetika farmakológiai vizsgálatra a minták alacsony száma miatt nem volt lehetőségünk. A humán kamrai és pitvari szívizomról elvezetett reprezentatív akciós potenciálok és azok jellemző paraméterei láthatóak az 16. ábrán és 3. táblázatban.



16.ábra Multicelluláris humán kamrai (a) és pitvari (b) preparátumokról elvezetett akciós potenciálok 750 ms ciklushossz mellett.

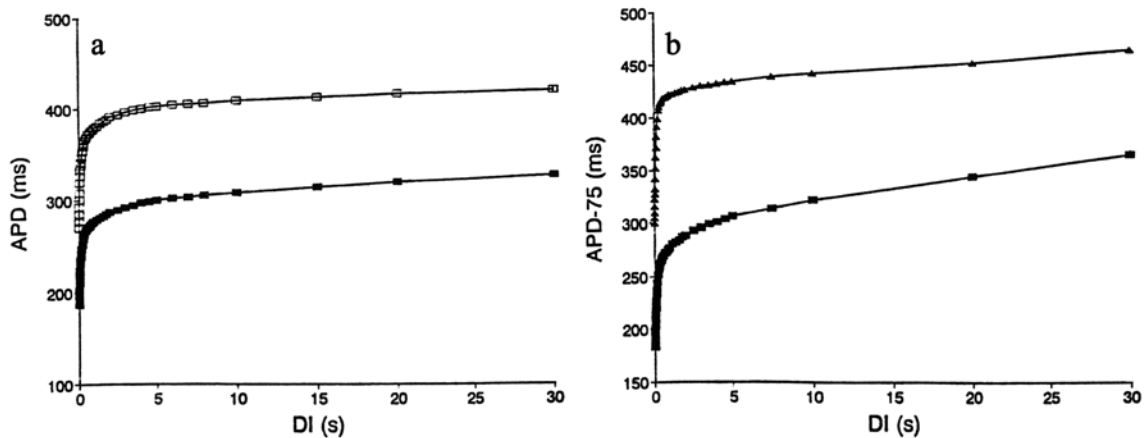
3. táblázat A humán szívizomról steady-state körülmények között elvezetett akciós potenciálok paraméterei.

	RP (mV)	APA (mV)	APD ₅₀ (ms)	APD ₉₀ (ms)
Kamra (n=5)	-84.5±1.7	115.2±2.8	199±11	299±11
Pitvar (n=5)	83.1±0.52	106.5±1.7	131±10	305±23
P	n.s.	<0.05	<0.01	n.s.

Az ingerlés ciklushossza 750 ms volt. RP: nyugalmi membránpotenciál, APA: az akciós potenciál amplitúdója, APD₅₀ és APD₉₀: az akciós potenciál időtartama a repolarizáció 50 és 90 százalékánál.

A humán pitvari szívizom akciós potenciáljának amplitúdóját és APD₅₀ értékét szignifikánsan kisebbnek találtuk, mint a kamrai szívizomét, azonban a nyugalmi membránpotenciál és APD₉₀ értékben nem találtunk szignifikáns eltérést. A pitvari szívizom akciós potenciáljának háromszög alakja és a deprimált platófázis miatt a

terminális repolarizáció sebessége az APD_{75} szintjén a legkifejezettebb, ezért a restitutionós kinetikát pitvari szívizmon az APD_{75} értékekre vonatkozóan határoztuk meg, ellentétben a kamrai szívizommal, ahol a restitutionós kinetika vizsgálata konvencionális módon, az APD_{50} és APD_{90} értéknél történt (17. ábra).



17. ábra A humán kamrai (a) és pitvari (b) miokardium restitutionós kinetikája. Kamrai preparátumokon a kondicionáló ingerlés ciklushossza 750 ms volt. A tömör négyzetek az APD_{50} , az üres négyzetek az APD_{90} értékeket jelölik. A (b) ábrarészen a pitvari preparátumokon nyert az APD_{75} értékeket hasonlítottam össze 750 ms (négyzet) és 5000 ms (háromszög) ciklushosszak esetén. A görbék illesztésével meghatározott paramétereket a 4. táblázatban tüntettük fel.

4. táblázat A humán kamrai és pitvari szívizom restitutionós kinetikájának paraméterei.

	$APD_p(ms)$	A_1	$\tau_1(ms)$	A_2	$\tau_2(ms)$	A_3	$\tau_3(ms)$	A_4	$\tau_4(ms)$
Kamra									
ciklushossz=750 ms (n=8)									
APD_{50}	316 ± 10	0.12 ± 0.02	42.5 ± 3.4	0.18 ± 0.01	147 ± 6.5	0.09 ± 0.01	1.44 ± 0.14	0.13 ± 0.02	14.4 ± 0.51
APD_{90}	399 ± 16	0.15 ± 0.03	42.8 ± 3.4	0.16 ± 0.01	139 ± 9.1	0.09 ± 0.01	1.34 ± 0.14	0.08 ± 0.01	16 ± 0.72
Ptvar (APD_{75})									
ciklushossz=750 ms (n=8)	364 ± 14	-	-	0.18 ± 0.01	154 ± 9.9	0.12 ± 0.02	1.52 ± 0.19	0.27 ± 0.02	25.5 ± 1.2
ciklushossz=5000 ms (n=5)	456 ± 9	-	-	0.26 ± 0.01	149 ± 5	0.03 ± 0.01	1.83 ± 0.1	0.08 ± 0.01	24.9 ± 1.3
P	<0.001	-	-	<0.001	n.s.	<0.001	n.s.	<0.001	n.s.

Humán kamrai és pitvari szívizom restitutionós kinetikáját rendre 4 ill. 3 exponenciális komponens összegeként illesztettük. A τ értékek, a megfelelő komponensek időállandói, az A értékek a hozzájuk tartozó relatív amplitúdók. A regressziós koeficiens minden csoportban 0.999 felett volt. A pitvari preparátumoknál feltüntetett szignifikancia szintek a 750 ms és az 5000 ms ciklushosszaknál nyert adatok összehasonlítására vonatkoznak.

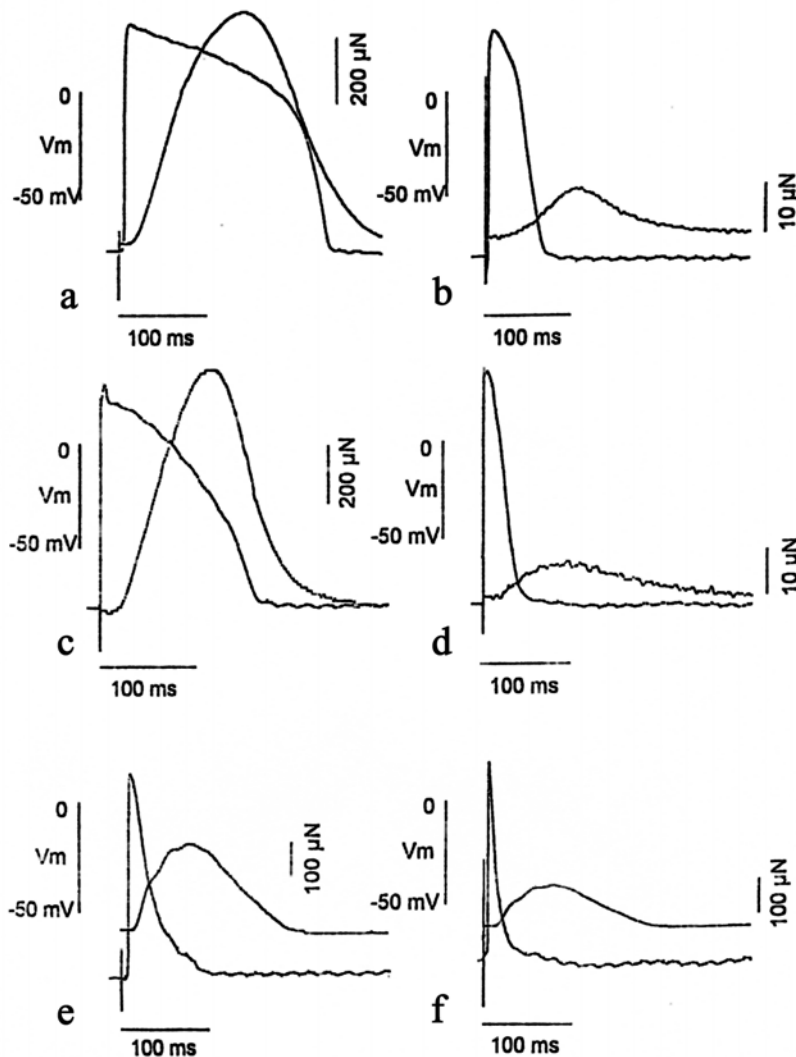
A humán kamrai szívizom restitúciós kinetikáját négy pozitív exponenciális komponens összegével illesztettük, amelyek időállandói sorrendben 42.8 ms, 139 ms, 1.34 s és 16 s voltak az APD_{90} értékek esetén. Hasonló időállandókat kaptunk az APD_{50} értékek vizsgálatakor is (4. táblázat). A kamrai szívizom restitúciós kinetikájában megfigyelt első gyors komponens a vizsgált nyolc pitvari preparátum mindegyikénél hiányzott, a pitvari preparátumok restitúciós kinetikájának első és második komponensének időállandója megegyezett a kamrai preparátumok második és harmadik komponensével, azonban a pitvari preparátumokon a harmadik komponens időállandója szignifikánsan hosszabb volt, mint a kamrai preparátumokon negyedik komponensére jellemző érték. A pitvari preparátumok restitúciós kinetikáját meghatároztuk 5000 ms kondicionáló ciklushossz mellett is. Ezekben a kísérletekben a sejtek kalciumtartalma csökkent az alacsony ingerlési frekvencia miatt. Nem találtunk szignifikáns eltérést a pitvari preparátumok restitúciós kinetikájában 750 és 5000 ms kondicionáló ciklushosszak esetén, azonban a harmadik és negyedik komponens relatív amplitúdói (A_3 és A_4 értékek) szignifikánsan csökkentek a ciklushossz növelésekor.

Megbeszélés

A kontrakciós erő frekvencia-függése

Az irodalmi adatokkal összhangban (Morad és Trautwein 1968, Bers 1991) azt találtuk, hogy nyúlban és tengerimalacban az akciós potenciál időtartamának rövidítésekor csökkent, míg annak nyújtásakor, valamint az intracelluláris nátriumkoncentráció növelésének hatására nőtt a kontrakciós erő nagysága minden vizsgált ingerlési frekvencián. Azt is megállapítottuk, hogy ezekben a speciesekben a kontroll körülmények között megfigyelt pozitív erő-frekvencia összefüggés az akciós potenciál időtartamának rövidítésekor részlegesen megfordult, ami az intracelluláris nátriumkoncentráció növelésekor még kifejezettebbé vált. Nyúlban a kontrakciós erő frekvencia-függésének megfordulása 700 ms-nál, míg tengerimalacnál 1500 ms-nál hosszabb ciklushosszak mellett következett be. A patkányból származó preparátumok

erő-frekvencia összefüggése kontroll körülmények között hasonló lefutást mutatott azzal, amit nyúl és tengerimalac preparátumokon észleltünk az akciós potenciál időtartamának rövidítése után. Fenti eredmények értelmezését megkönnyíti a 18. ábra, amelyen az akciós potenciál és kontrakciós erő görbéket közös időskálán ábrázoltuk.



18. ábra Az ábrán a kontrakciókat és az akciós potenciálokat azonos időskálán ábrázoltuk. (a) kontrol tengerimalac, (b): tengerimalac levkromakalimban, (c): kontrol nyúl, (d): nyúl levkromakalimban, (e): patkány 4-AP plusz TEA jelenlétében, (f): kontrol patkány. A ciklushossz minden esetben 1000 ms volt.

Tengerimalacnál (felső ábra) az akciós potenciál és kontrakciós erő görbéje majdnem teljesen átfedi egymást, míg nyúlön az erőgörbe maximuma az akciós potenciál már repolarizáltabb szakaszára esik a nyúl akciós potenciáljának rövidebb platófázisa miatt (középső ábra). Patkány esetében a repolarizáció lényegében már lezajlott a csúcsfeszülés kialakulásakor (alsó ábra).

A szívizomsejtek citoplazmájából három mechanizmus távolíthat el kalciumot: a sejtmembránban lévő aktív kalciumpumpa, a szarkoplazmatikus retikulumba történő kalcium-visszavétel biztosító SR kalciumpumpa, valamint a sejtmembránon keresztül megvalósuló nátrium-kalcium cserediffúzió. A felszíni membránban lévő kalcium-ATP-áz részvétele kevesebb, mint 5%, ezért a sejtől történő kalciumeltávolításban a nátrium-kalcium cseremechanizmus játszik döntő szerepet. Azokban az esetekben, amikor az akciós potenciál időtartama lényegesen rövidebb, mint a kontrakciós idő, megnő a nátrium-kalcium cserediffúzió hajtóereje, mivel a sejtmembrán a kalciumtranziens tetőzésekor már jelentős mértékben repolarizálódott (Eisner és Lederer 1985, Egan és mtsai 1989, Noble és mtsai 1991). Mindez a citoplazma - és ebből következően, a szarkoplazmatikus retikulum - csökkent kalciumtartalmához vezet, ami a kontrakciós erő csökkenését vonja maga után. Az akciós potenciál rövidítésekor megfigyelt erő-csökkenés részben ezzel a jelenséggel, másrészt a rövidebb akciós potenciál alatt belépő kalcium és nátrium kisebb mennyiségével magyarázható, azonban a kontrakciós erő frekvencia-függésének megváltozása további magyarázatot igényel. Ahhoz, hogy ezt megértsük, meg kell vizsgálnunk a kontrakciós erő nagyságának frekvencia-függését potenciálisan meghatározó mechanizmusokat.

A szívizom kontrakciója a citoplazmatikus kalciumkoncentráció átmeneti növekedésének következménye, amely kisebb mértékben az extracelluláris, míg jelentősebb mértékben az intracelluláris kompartmentből származik. Az intracelluláris kalcium pool (szarkoplazmatikus retikulum) utántöltésében fontos szerepet játszik az a kalcium mennyiség, ami a sejtmembrán feszültség-függő kalcium csatornáin keresztül jut a sejtbe. A magasabb ingerlési frekvenciáknál észlelt pozitív erő-frekvencia összefüggés megjelenéséért részben az L-típusú kalciumcsatornák, részben a gyors nátrium csatornák gyakoribb megnyílása lehet felelős. Az ily módon megnövekedett kalcium beáramlás közvetlenül, míg a nátrium beáramlás a nátrium-kalcium cserediffúzió közvetítésével vezet az intracelluláris kalciumtartalom növekedéséhez és a pozitív erő-frekvencia összefüggés megjelenésére nyúlban és tengerimalacban.

Az alacsonyabb ingerlési frekvenciákon patkányban tapasztalt erőnövekedés (negatív erő-frekvencia összefüggés) megjelenéséért két további mechanizmus tehető felelőssé: a szarkoplazmatikus retikulum kalcium kibocsájtó csatornáinak (ryanodine-

receptorainak) idő-függő reaktivációja, valamint a kalcium idő-függő továbbítása a szarkoplazmatikus retikulumon belül a felvevőhelyekről a kibocsájtó helyekre. A szarkoplazmatikus retikulum ugyanis funkcionálisan nem homogén: a kalciumfelvétel a longitudinális ciszternákban, míg a kalcium felszabadulása a terminális ciszternákból történik.

Fentiek alapján a kontrakciós erő frekvencia-függését az alábbi mechanizmusok relatív egyensúlya szabja meg: (1) az időegység alatt megnyíló kalcium- és nátriumcsatornák száma, tehát az időegységre jutó kalcium- és nátriumbeáramlás, (2) az akciós potenciál időtartamának frekvencia-függő változásaiból levezethető kalcium- és nátriuminflux-változások, (3) az SR-ből történő kalciumfelszabadulás, valamint az SR kalciumtartalmának frekvencia-függő változásai. Az első mechanizmus növeli, míg a két utóbbi csökkenti a kontrakciós erő nagyságát az ingerlőfrekvencia növelésekor.

Az még nem világos, hogy ezen mechanizmusok viszonylagos jelentősége hogyan változik meg az ingerlési frekvencia módosításakor, de a levkromakalimmal nyert eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy, hogy az akciós potenciál időtartam változásai fontos szerepet játszanak az erő-frekvencia összefüggés kialakításában. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a patkányban észlelt fordított erő-frekvencia összefüggés nem eredendően interspecies különbség, hanem a patkányszívre jellemző rövid akciós potenciál valamint a magasabb intracelluláris nátriumkoncentráció kombinációjának következménye. Emlős szívizomban mindkét tényező a kontraktilis erő frekvencia-függésének fontos szabályozója. Úgy tűnik, hogy e két tényező közül az akciós potenciál időtartam változásaink nagyobb jelentőséget tulajdoníthatunk.

Az emlős szívizom elektromos restitúciója

Az általunk vizsgált emlősök (nyúl, tengerimalac, kutya, patkány) valamint az ember szívizomsejtjeinek restitúciós sajátásaiban markáns különbségeket találtunk. Az általunk vizsgált emlős kamrai szívizommintákat restitúciós kinetikáik alapján két csoportra oszthatjuk: a nyúl és a patkány restitúciós kinetikájára jellemző egy kezdeti gyors komponens, amelyet egy vagy több negatív komponens követ, míg kutya, tengerimalac és humán szívizmon (ez utóbbiról intracelluláris elvezetéssel nyert

restitúciós görbéket korábban nem publikáltak) a restitúciós kinetika csak pozitív komponensekből áll. Bár a kutya és a tengerimalac restitúciós kinetikája egymáshoz igen hasonló, a két preparátumon a repolarizációért felelős káliumáramok tekintetében jelentős különbségeket találtak (Hume és Uehara 1985, Matsuura és mtsai 1987). A nyúl és patkány káliumáramaiban – e fajok restitúciós kinetikájában tapasztalt hasonlóságok ellenére – szintén markáns különbségek vannak. Mindezt egybevetve a káliumcsatorna-gátlókkal kapott eredményeinkkel arra kell következtetnünk, hogy – ellentétben a korábbi közvélekedéssel – a repolarizáció alatt folyó káliumáramok szerepe a restitúciós kinetika kialakításában számos esetben másodlagosnak tekinthető. Úgy tűnik, ez alól a humán szívizom kivételnek számít, ahol eredményeink szerint a káliumáramok jelentős szerepet játszanak a restitúciós kinetika kialakításában.

A humán kamrai és pitvari szívizom restitúciós kinetikájának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a humán kamrai szívizom restitúciós kinetikája négy exponenciális taggal illeszthető, míg a pitvari szívizomé hárommal. A kamrai első, gyors pozitív komponens időállandója (43 ms) jól közelíti az L-típusú kalciumcsatorna reaktivációjának időállandóját, amelynek értékét 37 °C-on 30-50 ms-nak mérték (Tseng és mtsai 1987, Tseng 1988). Bár az L-típusú kalciumcsatorna nagy számban megtalálható a pitvari szívizomsejteken is, a kamrára jellemző első restitúciós komponens humán pitvaron nem jelent meg. Ennek kézenfekvő oka lehet egy, a kalciumárammal ellentétes irányú, ionáram párhuzamos reaktivációja, amely kinetikai sajátosságai alapján csak a tranziens kifelé irányuló káliumáram lehet (Wettwer és mtsai 1993). A pitvari szívizomsejtek $I_{to}/I_{Ca,L}$ aránya lényegesen magasabb, mint a kamrai szívizomsejteké (Varró és Papp 1992), így a két áram párhuzamos reaktivációja humán pitvaron teljesen kiolthatja egymást, melynek eredménye a gyors komponens hiánya ezen a preparátumon.

Mivel a tranziens kifelé irányuló káliumáram a patkány kamrai szívizom repolarizációjában lényeges szerepet játszik (Apkon és Nerbonne 1991), ezen ionáram reaktivációja a restitúciós görbe kezdeti szakaszán rövidítenie kellene az akciós potenciál időtartamát. Bár méréseink során nem láttunk ilyen rövidülést, nifedipin vagy mangán (az L-típusú kalciumcsatorna ismert gátlói) jelenlétében a kezdeti gyors pozitív komponens eltűnt és az I_{to} idő-függő reaktivációjából fakadó rövidítő hatás érvényesült. Ez arra utal, hogy a humán mintákon tapasztaltakhoz hasonlóan a restitúciós kinetika első szakaszát

patkányban is az $I_{to}/I_{Ca,L}$ aránya határozza meg. A késői káliumáram (amely a másik nagy repolarizációért felelős áram patkány kamrai szívizomsejteken) reaktivációs kinetikája 25-ször lassúbb, mint az I_{to} -é (Apkon és Nerbonne 1991), így szerepe esetleg csak a restitúciós kinetika későbbi szakaszában lehet. Kísérleteink alapján sem a 4-AP (I_{to} gátló), sem a TEA (I_K gátló) nem csökkentette a patkány szívizom restitúciós kinetikájának negatív komponensét (sőt növelte annak relatív amplitúdóját), így ezen áramok szerepe a patkány restitúciós görbe késői szakaszának kialakításában nagy valószínűséggel elhanyagolható.

Patkányban az L-típusú kalciumáram gátlása maradéktalanul megszüntette a restitúciós kinetika első és második komponensét, ami azt bizonyítja, hogy ez az áram döntő szerepet játszik – mint szabályozó vagy szabályozott tényező, esetleg mindkettő - a restitúciós kinetika alakításában. Az intracelluláris kalciumszint szabályozó szerepét alátámasztják azon kísérleteink, amelyekben az intracelluláris kalciumszint BAPTA-AM vagy EGTA segítségével történő puffereklése megszüntette a nyúlra jellemző bifázisos restitúciós kinetikát.

Érdekes, hogy a BAPTA-AM restitúciós kinetikára gyakorolt hatása ellentétes volt a kamrafal belső és külső rétegeiből származó sejteken. Szemben a kutya epi-midmiokardiális sejteken BAPTA-AM hatására tapasztalt változással (a két pozitív komponens helyett egy negatív jelent meg), az endokardiális sejtek restitúciós kinetikáját éppen a BAPTA-AM kezelés tette bifázissá. Különbőség mutatkozott a BAPTA-AM akciós potenciálok időtartamára kifejtett hatásában is: az endokardiális sejteknél nőtt, míg az epi-midmiokardiális szívizomsejteken csökkent az akciós potenciálok időtartama BAPTA-AM hatására. Ezen különbségek oka nem világos, háttérükben nagy valószínűséggel a kamrafal különböző rétegeiben elhelyezkedő sejtek által expresszált kalcium-függő ioncsatornák megoszlásában és denzitásában található eltérések állhatnak.

Irodalmi adatok (Mitchell és mtsai 1984a, 1984b, duBell és mtsai 1991) alapján ismert, hogy a kalciumtranziens nagysága hatással van az akciós potenciál időtartamára, így szerepet játszhat az emlős szívizom restitúciós kinetikájának alakításában. Emlősök kamrai szívizmán három mechanizmus ismert, amely az intracelluláris kalciumkoncentráció függvényében módosítani képes az akciós potenciál időtartamát: (1) a nátrium-kalcium cseremechanizmus (Eisner és Lederer 1985, Noble és mtsai 1991), (2)

a kalcium-függő kloridáram (Zygmunt és Gibbons 1992), valamint (3) az L-típusú kalciumáram kalcium-függő inaktivációja és abból való visszatérése (Shimoni 1981, Lee és mtsai 1985). A kloridáram aktiválódása rövidíti, a nátrium-kalcium cseremechanizmus aktiválódása nyújtja az akciós potenciál időtartamát. Az növekvő intracelluláris kalciumszint csökkenti az L-típusú kalciumáramot annak kalcium-függő inaktivációja miatt (Lee és mtsai 1985), bár alacsony intracelluláris kalciumszint mellett annak mérsékelt emelkedése növelheti is a kalciumáramot (Marban és Tsien 1982). Patkány és tengerimalac kamrai szívműködésében az intracelluláris kalciumszint emelkedése az akciós potenciál időtartamának növekedésével járt együtt (Mitchell és mtsai 1984a, duBell és mtsai 1991, Janvier és mtsai 1997a, Janvier és mtsai 1997b), melyet az emelkedett intracelluláris kalciumszint következtében kialakuló fokozott nátrium-kalcium cserével magyaráztak. Nyúl kamrai szívműködésén végzett kísérleteink során az ellenkező folyamatot találtunk, miszerint az intracelluláris kalciumszint emelkedése az akciós potenciál időtartamának csökkenésével járt együtt, tehát a méréseink során kapott adatok nem magyarázhatóak a nátrium-kalcium csere változásával. Nyúl esetében nem valószínű, hogy a kalcium-függő kloridáram lényeges szerepet játszana kísérletes eredményeink magyarázatában az alábbiak miatt: (1) az áram aktiválódása jelentős intracelluláris kalciumszint-növekedést igényel, (2) az áram aktiválódása során a platófázis alatt egy kifelé irányuló, míg az akciós potenciál 90%-os repolarizációjánál egy befelé folyó áram jelenik meg (Sipido és mtsai 1993). Ez azt jelenti, hogy az áram aktivációja az APD_{50} és APD_{30} érték csökkenésében és ezzel együtt APD_{90} érték növekedésben nyilvánulna meg. Méréseink során ilyen jellegű eltéréseket egyetlen esetben sem tapasztaltunk.

Fentiek értelmében az egyetlen mechanizmus, amely a nyúl kamrai szívműködésében az akciós potenciáljának időtartamát csökkentheti az intracelluláris kalciumszint emelkedésekor az L-típusú kalciumáram kalcium-függő inaktivációja. Az emelkedő intracelluláris kalciumszint közismert módon gátolja az L-típusú kalciumáramot. Az L-típusú kalciumáram reaktivációja az intracelluláris kalciumkoncentráció bonyolult függvénye. Kutya kamrai szívműködésében a kalciumáram reaktivációs kinetikája egy korai túllövést mutat, amely eltűnik ryanodine és koffein jelenlétében, vagy az intracelluláris kalcium pufferekkelését követően (Tseng 1988). Az

izolált sejteken alkalmazott kísérleti feltételeink mellett (-50 mV holding potenciál, EGTA a pipetta töltőoldatában) nem tapasztaltuk ezt a túllövést kutyából származó preparátumok esetén, azonban a nyúl kamrai szívműködési sejtek restitúciós kinetikájának vizsgálatakor, - amelyet konvencionális mikroelektrodatechnikával végeztünk, tehát a pipetta EGTA-mentes volt - kontroll körülmények között tapasztalt bifázisos jelleg legalább részben magyarázható az L-típusú kalciumáram reaktivációjának túllövésével. A nyúlban BAPTA-AM valamint nifedipin hatására kialakuló restitúciós kinetikaváltozás alátámasztani látszik ezt a feltevést.

Magyarázatra szorul, hogy a kalciumáram reaktivációjának fentiekben taglalt túllövése miért nem jelenik meg kontroll körülmények között a kutya és tengerimalac kamrai szívműködési sejteinek restitúciós kinetikájában. Annak alapján, hogy a BAPTA-AM kezelés eredményeként a kutya kamrai szívműködési sejtek restitúciós kinetikája a nyúléhoz vált hasonlóvá, ugyanakkor a kalciumáram reaktivációjának kinetikáját kutya, tengerimalac és nyúl szívműködési sejtjein közel azonosnak találtuk, felvetődik a lehetőség, hogy az intracelluláris kalciumszinttől függő nátrium-kalcium csereáram valamint az L-típusú kalciumáram kalcium-függő amplitúdó-változásának aránya különbözik a nyúl és más fajok esetében. Nyúlban az intracelluláris kalciumszint emelkedése feltehetően nagyobb mértékben csökkenti az L-típusú kalciumáram amplitúdóját, s így az akciós potenciál időtartamát, mint amennyivel növeli a nátrium-kalcium csereáram intenzitását. A kutyából és tengerimalacból származó preparátumokon ennek az ellenkezője valószínűsíthető, így módon a növekvő intracelluláris kalciumkoncentráció az akciós potenciál időtartamának növekedéséhez vezet. Mindezek mellett a restitúciós kinetikában tapasztalt interspecies különbségek magyarázatakor nem hagyhatjuk figyelmen a szarkoplazmatikus retikulum morfológiai és funkcionális tulajdonságaiban fellelhető interspecies különbségeket sem, amelyek az intracelluláris kalciumkoncentráció-változások kinetikai sajátosságait jelentős mértékben módosíthatják.

Az intracelluláris kalciumszint restitúciós kinetikára kifejtett szabályozó szerepének és a patkány kamrai szívműködésen nifedipinnel és mangánnal végzett kísérleteink eredményeinek ismeretében valószínű, hogy patkány kamrai szívműködési sejtek restitúciós kinetikájában kiemelt szerepet játszanak az intracelluláris kalciumszint-változások. Feltételezhető, hogy a patkány restitúciós kinetikájának második fázisáért az

extrastimulust megelőző utolsó akciós potenciál által kiváltott kalciumtranziens felelős. Ezt a feltevést a következő eredmények támasztják alá. (1) A restitúciós görbe maximumának ideje gyakorlatilag egybeesett a multicelluláris preparátumokon mért kontrakciós erő maximumának idejével. (2) Az intracelluláris kalciumkoncentráció és a nátrium-kalcium csereáram lecsengésének megközelítően 140 ms-os időállandója jól egyezett a restitúciós görbe második komponensének időállandójával. (3) A kalciumtranziensek amplitúdóját csökkentő ágensek (a kalcium csatornákat blokkoló nifedipin és mangán, valamint a nagy koncentrációban alkalmazott koffein) eltüntették a patkány szívizom restitúciós görbéjének második komponensét.

Patkányon végzett kísérleteink során megfigyeltük, hogy koffein hatására nem tűnt el a restitúciós görbe első komponense, míg nifedipin vagy mangán jelenlétében igen. Ez arra enged következtetni, hogy az első komponens sajátosságait nem csupán az intracelluláris kalciumszint változása határozza meg. Az első komponens időállandója 21 ± 1.9 ms volt kontroll körülmények között (39 ± 5.8 ms koffein jelenlétében), amely értékek nagyságrendileg megfelelnek a kalciumáram reaktivációs időállandójának, amit a kísérleti feltételektől (elsősorban az intracelluláris kalciumkoncentráció nagyságától) függően 30-50 ms-nak találtak 37°C -on (Tseng 1988). Azt is kimutatták, hogy a koffein lassítja az L-típusú kalciumáram reaktivációjának időállandóját (Tseng 1988). A fentiek alapján nagyon valószínű, hogy az első komponens időállandóját a kalciumáram inaktivációból történő reaktivációja határozza meg, amelyet folyamatosan modulál az intracelluláris kalciumkoncentráció szimultán változása. Mire a kalciumáram reaktivációja közel teljessé válik, az akciós potenciál időtartamának szabályozásában az SR kalciumfelvétele miatt bekövetkező intracelluláris kalciumszint-csökkenés válik domináló tényezővé. Így a restitúciós görbe első 200 ms-os szakasza alatt megfigyelt akciós potenciál időtartam rövidülést az egyre csökkenő intenzitású nátrium-kalcium cserediffúzióval magyarázzuk, mely az előző kalciumtranziens leszálló szárával esik egybe. Ez a feltételezés összhangban van Kirby és mtsai (1993) eredményeivel, akik megfigyelték, hogy menyét kamrai szívizomsejteken a nátrium-kalcium cseremechanizmus gátlása az akciós potenciál rövidülését vonta maga után.

A patkány kamrai szívizom restitúciós kinetikájának harmadik, lassú negatív komponensének magyarázata nem teljesen tisztázott. Ha összehasonlítjuk a

szívizomsejtek elektromos és mechanikai restitúcióját, azt tapasztaljuk, hogy az akciós potenciál időtartamának csökkenésével párhuzamosan nőtt a kialakuló maximális kontrakciós erő nagysága, melyet az irodalom is megerősít (Schouten és Ter Keurs 1984, Poggesi és mtsai 1987). Bár a kalciumtranziensről kimutatták, hogy növelheti az akciós potenciál időtartamát, az aktuális kísérletes körülmények függvényében ezzel ellenkező eredmények is napvilágot láttak (duBell és mtsai 1991, Lakatta 1992). Kísérleteinkben a harmadik komponens időállandója 1.05 s-nak adódott, ami nem esik messze a kalciumtranziensek 1.58 s-os reaktivációs időállandójától. Ezek szerint a harmadik, késői negatív komponensért a fokozatosan növekvő kalciumtranziens okozta kalciumáram-csökkenés lehet felelős, amelynek rövidítő hatása erőteljesebb, mint az emelkedő intracelluláris kalciumszint okozta nátrium-kalcium csereáram intenzitásfokozódása miatt bekövetkező akciós potenciál időtartam-növekedés. Elméletileg a kalcium-függő kloridáram is rövidíthetné az akciós potenciál időtartamát a restitúció harmadik szakaszában (Zygmunt és Gibbons 1992). E lehetőség valószínűségét jelentősen csökkenti az a megfigyelésünk, mely szerint 2 mmol/l SITS - a kloridcsatorna specifikus gátlószere - jelenlétében a restitúciós kinetika nem változott érdemlegesen.

Patkány kamrai szívmán végzett kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a restitúciós kinetika alakításában az intracelluláris kalciumkoncentráció tranziens változásainak mindkét irányú hatása valószínűsíthető. Egyrészt az extrastimulust megelőző akciós potenciál által kiváltott kalciumtranziens csökkenti az L-típusú kalciumáram nagyságát, másrészt növeli a nátrium-kalcium csereáram intenzitását. Ezen ellentétes irányú hatások relatív részvételének megítélését tovább bonyolítja az a többek által megfigyelt jelenség, hogy alacsony intracelluláris kalciumkoncentráció esetén a kalciumkoncentráció növekedése paradox módon fokozhatja a kalciumáram nagyságát, míg a gátló hatás inkább a magasabb kalciumszintek mellett érvényesül (Marban és Tsien 1982, Lee és mtsai 1985, Lee 1987, Tseng 1988).

A humán kamrai szívizomsejtek restitúciós kinetikáját csak részben magyarázhatjuk az L-típusú kalciumáram reaktivációs sajátágaival vagy az intracelluláris kalciumszint változásaival. A humán kamrai szívizomsejtek restitúciós kinetikájának második, és a pitvari szívizomsejtek restitúciós kinetikájának első komponensének időállandóját körülbelül 150 ms-nak találtuk, ami irodalmi adatok szerint

megközelítőleg megfelel a késői káliumáram (I_K) deaktivációs időállandójának (Sanguinetti és Jurkiewicz 1990), ezért ennek a komponensnek a megjelenését a késői káliumáram idő-függő deaktivációjával magyarázzuk. Alátámasztani látszik feltevésünket, hogy a restitúciós kinetikának ezt a komponensét prominensnek találták minden olyan emlős kamrai szívizomsejten és Purkinje roston, ahol a késői káliumáram kifejezett (Elharrar és Surawicz 1983, Robinson és mtsai 1987). Az intracelluláris kalciumszintnek a humán restitúciós kinetikára kifejtett szabályozó szerepét valószínűsíti az a kísérleti eredmény, mely szerint a humán restitúciós kinetika utolsó két komponense jelentős frekvencia-függést mutatott abban a tartományban, ahol a hagyományos feszültség-függő konduktanciák időfüggő változásai már aligha jöhetnek szóba. A pitvari szívizomsejtekre jellemző A_3 és A_4 relatív amplitúdókat lényegesen nagyobbak találtuk rövid (750 ms), mint hosszú (5000 ms) kondicionáló ciklushosszak esetén. Az ezekhez a komponensekhez tartozó időállandók (kb. 1.5 s és 15-25 s) hosszabbak, mint a szobajövő feszültség-függő konduktanciák reaktivációs időállandói, így feltételezhető, hogy azok az intracelluláris ionösszetétel (elsősorban kalciumkoncentráció) lassú változásait tükrözik („memory effect”). Mindenesetre figyelemre méltó, hogy a humán kamrai restitúció harmadik (pitvaron második) komponensének kb. 1.5 s időállandója hibahatáron belül jó egyezést mutat a kalciumtranziens patkányon mért reaktivációs időállandójával, így ez a mechanizmus a nátrium-kalcium cserediffúzión keresztül részt vehet a harmadik kamrai komponens kialakításában. Az utolsó, 15-25 s időállandóval jellemezhető igen lassú komponens eredetét nem sikerült azonosítanunk.

Eredményeinket és az azokból levonható következtetéseinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy kísérleteink során a restitúciós kinetika minden esetben szoros összefüggést mutatott az L-típusú kalciumáram reaktivációs sajátágaival, valamint a patkány miocitákon regisztrált intracelluláris kalciumkoncentráció változásaival. A kalciumáram intracelluláris kalcium-kelátor jelenlétében meghatározott reaktivációs kinetikájában sem mi, sem mások (Josephson és mtsai 1984, Robinson és mtsai 1987, Tseng és Boyden 1989) nem találtak olyan különbségeket, amelyekkel az akciós potenciál időtartamának restitúciójában észlelt nagyfokú heterogenitást meg lehetne magyarázni. A nyúlön és patkányon végzett kísérleteink arra utalnak, hogy az észlelt diverzitás nem magyarázható a különböző típusú káliumcsatornák preparátumonkénti

sajátos megoszlásával sem (Varró és mtsai 1993). Az intracelluláris kalciumkoncentráció által szabályozott – korábban már említett – ionáramok fajonkénti megoszlása sajnálatos módon még nincs megfelelően feltérképezve, ennek ellenére valószínűnek látszik, hogy az emlősök miocitáinak restitúciós kinetikájában észlelt heterogenitás háttérében az intracelluláris kalcium kezelésében és a szarkoplazmatikus retikulum funkcionális és morfológiai tulajdonságaiban fellelhető különbségek állhatnak, melyeket fajonként eltérő mértékben módosítanak az akciós potenciál időtartamát szabályozó intracelluláris kalcium-függő és attól független ionáramok sajátos megoszlása.

Irodalomjegyzék

Apkon M., Nerbonne J.M.: Characterization of two distinct depolarization-activated K^+ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 1991;97:973-1011.

Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M, Ojeda C.: The steadystate TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch.* 1979;379:137-142.

Bass BG.: Restitution of the action potential in cat papillary muscle. *Am. J. Physiol.* 1975;228:1717-1724.

Bers D.M.: Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 1991. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Boyett M.R., Jewell B.R.: Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon electrical activity in the heart. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1978;36:1-52.

Boyett M.R., Fedida D.: The effect of heart rate on the membrane currents of isolated sheep Purkinje fibres. *J. Physiol* 1988;399:467-491.

Carmeliet E.: Repolarisation and frequency in cardiac cells. *J. Physiol. Paris* 1977;73:903-923.

Cohen C.J., Fozzard H.A., Sheu S.S.: Increase in intracellular sodium activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. *Circ. Res.* 1982;50:651-662.

Colatsky T.J., Hogan P.M.: Effects of external calcium, calcium channel blocking agents, and stimulation frequency on cycle length-dependent changes in canine cardiac action potential duration. *Circ. Res.* 1980;46:543-552.

duBell W.H., Boyett M.R., Spurgeon H.A., Talo A., Stem M.D., Lakatta E.G.: The cytosolic calcium transient modulates the action potential of rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 1991;436:347-369.

Egan T.M., Noble D., Noble S.J., Powell T., Spindler A.J., Twist V.W.: Sodium-calcium exchange during the action potential in guinea pig ventricular cells. *J. Physiol.* 1989;411:639-661.

Eisner D., Lederer W.J.: Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *Am. J. Physiol.* 1985;248:189-202.

Elharrar V., Surawicz B.: Cycle length effect on restitution of action potential duration in dog cardiac fibers. *Am. J. Physiol.* 1983;244:H782-H792.

Elharrar V.: Cycle length-dependent action potential duration in canine cardiac Purkinje fibers. *Am. J. Physiol* 1984;247:H936-945.

Endresen K., Amlie J.P.: Electrical restitution and conduction intervals of ventricular premature beats in man: influence of heart rate. *PACE* 1989;12:1347-1354.

Franz M.R., Schaefer J., Schöttler M., Seed W.A., Noble M.I.M.: Electrical and mechanical restitution of the human heart at different rates of stimulation. *Circ. Res.* 1983;53:815-822.

Franz M.R., Swerdlow C.D., Liem L.B., Schaefer J.: Cycle length dependence of human action potential duration in vivo. Effects of single extrastimuli, sudden sustained rate acceleration and deceleration, and different steady-state frequencies. *J. Clin. Invest.* 1988;82:972-979.

Gibbs, C.L., Johnson E.A.: Effect of changes in frequency of stimulation upon rabbit ventricular action potential. *Circ. Res.* 1971;9:165-170.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.W.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985;260:3440-3450.

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. Sigworth F.J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 1981;391:85-100.

Hirano Y., Moscucci A., January C.T.: Direct measurement of L-type Ca^{2+} window current in heart cells. *Circ. Res.* 1992;70:445-455.

Hume J.R., Uehara A.: Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J. Physiol* 1985;368:535-544.

Jahnel U., Klemm P., Nawrath H.: Different mechanisms of the inhibition of the transient outward current in rat ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 1994;349:87-94.

Janvier N.C., Harrison S.M. Boyett M.R.: The role of inward Na^{+} - Ca^{2+} exchange current in the ferret ventricular action potential. *J. Physiol.* 1997a;498:611-625.

Janvier N.C., McMorn S.O., Harrison S.M., Taggart P., Boyett M.R.: The role of inward Na^{+} - Ca^{2+} exchange current in electrical restitution in ferret ventricular cells. *J. Physiol.* 1997b;504:301-314.

Josephson L.R., Sanches-Chapula J., Brown A.M.: Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ. Res.* 1984;54:157-162.

Kirby M.S., McCall E., Orchard C.H., Boyett M.R.: The role of Na^{+} - Ca^{2+} exchange in paired pulse potentiation of ferret ventricular muscle. *J. Physiol.* 1993;472:415-442.

Lakatta E.G.: Functional implications of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in the heart. *Cardiovasc. Res.* 1992;26:193-214.

Lee K.S.: Potentiation of the calcium-channel currents of internally perfused mammalian heart cells by repetitive depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84:3941-3945.

Lee K.S., Marban E., Tsien R.W.: Inactivation of Ca channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.* 1985;364:395-411.

Litovsky S.H., Antzelevitch C.: Rate dependence of action potential duration and refracteriness in canine ventricular endocardium differs from that of epicardium: role of the transient outward current. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1989;14:1053-1066.

Marban E., Tsien R.W.: Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart: Positive feedback regulation by intracellular calcium? *J. Physiol.* 1982;329:589-614.

Matsuura H., Ehara T., Imoto Y.: An analysis of the delayed outward current in single ventricular cells of the guinea-pig. 1987;410:596-603.

Miller J.P., Wallace A.G., Feezor M.D.: A quantitative comparison of the relation between the shape of the action potential and the pattern of stimulation in canine ventricular muscle and Purkinje fibers. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1971;2:13-19.

Mitchell M.R., Powell T., Terrar D.A., Twist V.W.: Strontium, nifedipine and 4-aminopyridine modify the time course of the action potential in cells from rat ventricular muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1984b;81:551-556.

Mitchell M.R., Powell T., Terrar D.A., Twist, V.W.: The effects of ryanodine, EGTA and low-sodium on action potentials in rat and guinea-pig ventricular myocytes: Evidence for two inward currents during the plateau. *Br. J. Pharmacol.* 1984a;81:543-550.

Morad M., Trautwein W.: The effect of the duration of the action potential on concentration in the mammalian heart muscle. *Pflügers Arch.* 1968;299:66-82.

Morgan J.M., Cunningham D., Rowland E.: Electrical restitution in the endocardium of the intact human right ventricle. *Br. Heart. J.* 1992;67:42-46.

Nánási P.P., Varró A., Pankucsi Cs. et al.: Electrical restitution in diseased human ventricular myocardium. *Clin. Physiol.* 1996;16:339-351.

Noble D., Noble S.J., Bett G.C.L., Earm Y.E., Ho W.-K., So I.-S.: The role of sodium-calcium exchange during the cardiac action potential. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1991;639:334-353.

Noble D., Tsien R.W.: Outward membrane currents activated in the plateau range of action potentials in cardiac Purkinje fibers. *J. Physiol.* 1969;200:205-231.

Ochi R., Nishiye H.: Effect of intracellular tetraethylammonium ion on action potential in the guinea pig's myocardium. *Pflügers Arch.* 1974;348:305-316.

O'Neill S.C., Donoso P., Eisner D.A.: The role of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ -sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and $[caffeine]_i$. *J Physiol* 1990;425:55-70.

Poggesi C., Evens M., Polla B., Tanzi F., Reggiani C.: Influence of thyroid state on mechanical restitution of rat myocardium. *Circ. Res.* 1997;60:142-151.

Robinson R.B., Boyden P.A., Hoffman B.F., Hewett K.W.: Electrical restitution process in dispersed canine cardiac Purkinje and ventricular cells. *Am. J. Physiol.* 1987;253:H1018-H1025.

Sanguinetti M.C., Jurkiewicz N.K.: Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol.* 1990;96:195-215.

Schouten V.J.A., Ter Keurs H.E.D.I.: The slow repolarization phase of the action potential in rat heart. *J. Physiol.* 1984;360:13-26.

Seed W.A., Noble M.I.M., Oldershaw P. et al.: Relation of human cardiac action potential duration to the interval between beats: implications for the validity of rate corrected QT interval (QTc). *Br. Heart. J.* 1987;57:32-37.

Shimoni Y.: Parameters affecting the slow inward channel repriming process in frog atrium. *J. Physiol.* 1981;320:269-291.

Sipido K., Callewaert G., Carmeliet E.: $[Ca^{2+}]_i$ transients and $[Ca^{2+}]_i$ -dependent chloride current in single Purkinje cells from rabbit heart. *J. Physiol.* 1993;465:641-667.

Sutro J.B.: Kinetics of veratridine action on Na channels of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 1986;87:1-24.

Tseng G.-N., Robinson R.B., Hoffman B.F.: Passive properties and membrane currents of canine ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 1987;90:671-701.

Tseng G.-N.: Calcium current restitution in mammalian ventricular myocytes is modulated by intracellular calcium. *Circ. Res.* 1988;63:468-482.

Tseng G.-N., Boyden P.A.: Multiple types of calcium currents in single canine Purkinje cells. *Circ. Res.* 1989;64:1735-1750.

Varró A., Elharrar V., Surawicz B.: Effect of antiarrhythmic drugs on the premature action potential duration in canine cardiac Purkinje fibers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985;233:304-311.

Varró A., Papp J.Gy.: The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. *Cardioscience* 1992;3:131-144.

Varró, A., Nanasi P.P., Lathrop D.A.: Voltage-clamp characteristics of ventricular myocytes in rabbit. *Cardioscience* 1991;2:233-243.

Wettwer E., Amos G., Gath J., Zerkowski H.-R., Reidemeister J.-C., Ravens U.: Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993;27:1662-1669.

Zygmunt A.C., Gibbons W.R.: Properties of the calcium-activated chloride current in heart. *J. Gen. Physiol.* 1992;99:391-414.

Köszönetnyilvánítás

A téziseket megalapozó kísérleteket a Debreceni Orvostudományi Egyetem Élettani Intézetében végeztem. Köszönetem fejezem ki témavezetőmnek, Dr Nánási Péternek, aki magas szintű elméleti tudásával és gyakorlati segítségével munkámat folyamatosan irányította.

Hálás köszönettel tartozom programvezetőmnek, Dr Kovács László akadémikusnak, aki lehetővé tette az általa vezetett intézetben kísérleteim elvégzését.

Köszönet illeti azokat a közvetlen munkatársaimat – név szerint Dr Bányász Tamást, Dr Magyar Jánost, Körtvély Ágnes és Víghné Horváth Katalint – akik munkám során a legtöbb segítséget nyújtották.

A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK

1. Szigligeti P, Pankucsi C, Bányász T, Varró A, Nánási PP: Action potential duration and force-frequency relationship in isolated rabbit, guinea pig and rat cardiac muscle. *J Comp Physiol B* 1996;166:150-155.
2. Nánási PP, Pankucsi C, Bányász T, Szigligeti P, Papp JG, Varró A: Electrical restitution in rat ventricular muscle. *Acta Physiol Scand* 1996;158:143-153.
3. Bányász T, Magyar J, Szigligeti P, Pankucsi C, Varró A, Nánási PP: Frequency-dependent characteristics of human cardiac muscle. *Exp Clin Cardiol* 1997;2:205-209.
4. Szigligeti P, Bányász T, Magyar J, Szigeti Gy, Papp Z, Varró A, Nánási PP: Intracellular calcium and electrical restitution in mammalian cardiac cells. *Acta Physiol Scand* 1998;163:139-147.
5. Szigligeti P, Bányász T, Magyar J, Varró A, Nánási PP: Effect of chelation of cytosolic calcium on action potential duration and electrical restitution in dog rabbit and rat ventricular myocytes. XIII. World Congress of Cardiology - Free Papers 1998, 207-211.