## EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

## A fordított frekvenciafüggés, mint a szívizom intrinzik tulajdonsága

Dr. Bárándi László Viktor Témavezető: Prof. Dr. Nánási Péter



**DEBRECENI EGYETEM** 

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

## Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
Bevezetés	5
I. A szívizomsejtek akciós potenciálja	5
II. A szívizomsejteken előforduló ioncsatornák jellemzése	8
II./1. Kardiális nátrium-csatornák	9
II./2. Kardiális kalcium-csatornák	10
II./3. Kardiális kálium-csatornák	11
II./3.1. Tranziens kifelé irányuló K <sup>+</sup> -áram (I <sub>to</sub> )	12
II./3.2. A késői egyenirányító K⁺-áram gyors komponense (I <sub>Kr</sub> )	12
II./3.3. A késői egyenirányító K⁺-áram lassú komponense (I <sub>Ks</sub> )	13
II./3.4. Befelé egyenirányító K <sup>+</sup> -áram (I <sub>K1</sub> )	13
III. Antiaritmiás szerek	14
III./1. I. osztályba tartozó antiaritmikumok	14
III./2. II. osztályba tartozó antiaritmikumok	16
III./3. III. osztályba tartozó antiaritmikumok	16
III./4. IV. osztályba tartozó antiaritmikumok	17
III./5. Egyéb antiaritmikumok	17
Irodalmi áttekintés	18
IV. A fordított frekvenciafüggés hátterében feltételezett elméletek	18
IV./1. Az antiaritmikum és az ioncsatorna kölcsönhatásának frekven	ciafüggése
a "modulált receptor teória", a "védett receptor elmélet" értelmezés	ében19
IV./2. Az I <sub>ks</sub> áram magas ingerlési frekvenciáknál kumulálódik	20
IV./3. Az extracelluláris térben K $^{+}$ akkumulálódik magas ingerlési frekven	nciánál20
IV./4. A káliumáramok kinetikai paramétereinek frekvenciafüggő viselkec	lése21
Célkitűzések	24
Anyagok és módszerek	25
V. A preparátumok előkészítése	25
V./1. Multicelluláris emlősszív-preparátumok készítése	25
V./2. Humán papilláris izomszövet izolálása	25
V./3. Izolált szívizomsejtek preparálása	26

VI. Elektrofiziológiai mérések	26
VI./1. Izolált szívizomsejtek vizsgálata	26
VI./2. Multicelluláris preparátumok (kamrai munkaizomrostok és Purki	nje rostok)
vizsgálata	27
VI./3. Alkalmazott kísérleti protokollok	27
VII. Felhasznált anyagok	
VIII. Matematikai modellezés	
IX. Statisztikai analízis	
Eredmények	31
X. Nem kizárólag a III. osztályú antiaritmiás szerek APD nyújtó hat	ása mutat
fordított frekvenciafüggést	31
XI. A fordított frekvenciafüggés nem csak az AP-t nyújtó szerek sajátos	sága33
XII. Az áraminjektálás hatásának frekvenciafüggése	
XIII. A fordított frekvenciafüggés nem korlátozódik egy adott fajra	37
XIV. A fordított frekvenciafüggés nem jellemző minden fajra	
XV. Az APD változás nagysága a kiindulási AP időtartamának függvény	ye40
XVI. A patkányszívizom frekvenciafüggő viselkedése	43
XVII. A nettó membránáram és az APD kapcsolata	46
XVIII. Számítógépes modellezés	48
Megbeszélés	50
Összefoglalás	56
Summary	57
Irodalomjegyzék	58
Tárgyszavak	67
Keywords	67
Köszönetnyilvánítás	68
Függelék: az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények	69

## Rövidítések

AP	akciós potenciál (action potential)
APD	akciós potenciál időtartam (action potential duration)
APD <sub>50, 90</sub>	azon időtartam, mely az AP kezdetétől az AP amplitúdójához képest mért 50,
	illetve 90 %-os repolarizációig telik el
$I_{Ca,L}$	az L-típusú Ca <sup>2+</sup> -csatornákon keresztül folyó áram
$I_{Ca,T}$	a T-típusú Ca <sup>2+</sup> -csatornákon keresztül folyó áram
I <sub>Na</sub>	a gyors, feszültség függő Na⁺-csatornákon keresztül folyó áram
I <sub>K1</sub>	befelé egyenirányító K $^+$ -csatornák által létrehozott áram (inward rectifier K $^+$
	current)
Ι <sub>κ</sub>	késői K <sup>+</sup> -áram (delayed rectifier K <sup>+</sup> current)
I <sub>K.AA</sub>	arachidonsav (AA) által vezérelt K⁺-csatornák által létrehozott áram
I <sub>K.Ach</sub>	acetilkolin vezérelt K <sup>+</sup> -csatornák által létrehozott áram
I <sub>K.ATP</sub>	ATP vezérelt K <sup>+</sup> -csatornák által létrehozott áram
I <sub>Kr</sub>	az I <sub>K</sub> gyorsan aktiválódó összetevője (rapid component of I <sub>K</sub> )
I <sub>Ks</sub>	az $I_{\text{K}}$ lassan aktiválódó összetevője (slow component of $I_{\text{K}})$
I <sub>to</sub>	tranziens kifelé irányuló áram (transient outward current)
I <sub>net</sub>	nettó membránáram
V <sup>-</sup> max	a repolarizáció legnagyobb sebessége

#### **Bevezetés**

#### I. Hiba! A könyvjelző nem létezik. A szívizomsejtek akciós potenciálja

A szív munkaizomzatának akciós potenciálja jelen ismereteink szerint legalább tucatnyi ionáram finoman hangolt összjátékaként alakul ki, amelyet az **1. ábrán** mutatok be [99, 131]. Hogy megértsük ennek a bonyolult szimfóniának a precizitását, vissza kell nyúlnunk a sejtélettani alapokig.

A szervezetben található sejtek plazmamembránjának intra- és extracelluláris oldala között az aktív transzportmechanizmusok elektrokémiai grádienst építenek ki,

$$E_{K^+} = \frac{R T}{F Z} \ln \frac{[K^+]_{ec.}}{[K^+]_{ic.}} \qquad \qquad \underline{1. egyenlet}$$

amely hajtóerejét képezi a sejtmembránon keresztül történő egyszerű és carrier mediálta passzív transzportfolyamatoknak [16]. Amennyiben egy adott ionra nézve megnövekszik a membrán permeábilitása, az illető ion, hogy elérje saját egyensúlyipotenciálját, addig vándorol a sejtmembrán két oldala között, amíg az elektromos és kémiai grádiensek ki nem egyenlítik egymást. Ilyenkor a két grádiens összege nullával lesz egyenlő, ezért megszűnik a transzport hajtóereje. Megállapíthatjuk, hogy minden ion igyekszik elérni saját egyensúlyi-potenciálját, ha van az adott ionra nézve grádiens és permeabilitás a plazmamembránon keresztül (**2. egyenlet**). Ekkor az ion a sejt membránpotenciálját saját egyensúlyi-potenciálja felé tolja el. Ebből

$$E_{MP} = \frac{R T}{F} \ln \frac{p_{K+} [K^{+}]_{ec.} + p_{Na+} [Na^{+}]_{ec.} + p_{Cl-} [Cl^{-}]_{ic.} + ...}{p_{K+} [K^{+}]_{ic.} + p_{Na+} [Na^{+}]_{ic.} + p_{Cl-} [Cl^{-}]_{ec.} + ...} \frac{2. \text{ egyenlet}}{2. \text{ egyenlet}}$$

következik, hogy a szívizomsejtek nyugalmi membránpotenciálja megközelítően -80 és -90 mV közé esik, hiszen membránjuk nyugalomban szinte kizárólag K<sup>+</sup>-ra permeabilis. A külső és belső ionösszetétel az adott ion egyensúlyi-potenciáljának nagyságát a Nernst-egyenletnek (**1. egyenlet**) megfelelően befolyásolja. Többek között ennek köszönhető, hogy hiper- és hipokalémiában aritmiák alakulhatnak ki, hiszen a K<sup>+</sup> egyensúlyi-potenciáljában történő változás a membrán depolarizációját, illetve hiperpolarizációját vonja maga után, amelynek következtében könnyebben, illetve nehezebben lehet az adott sejten akciós potenciált kiváltani.

- 5 -

Magát az akciós potenciált az emlősök szívizomsejtjeiben a plazmamembrán időés feszültségfüggő ioncsatornáinak konduktancia-változásai hozzák létre. A kamrai munkaizomsejtek akciós potenciálját konvencionálisan öt fázisra szokás felosztani. A kardiális akciós potenciál nulladik fázisában a Na<sub>v</sub>1.5 típusú fehérjék által mediált idő- és feszültségfüggő gyors Na<sup>+</sup>-csatornák aktiválódnak és a Hodgkin-ciklus beindulása miatt létrejövő pozitív visszacsatolás révén sokszorosára nő a membrán Na<sup>+</sup>-permeabilitása. A Na<sup>+</sup>-ra ható jelentős mértékű befelé irányuló elektrokémiai hajtóerő a Goldmann-Hodgkin-Katz egyenlet (**2. egyenlet**) értelmében a membránpotenciált a Na<sup>+</sup> egyensúlyi-potenciáljának irányába mozdítja el. Ennek a következménye a gyors felszálló szár alatt tapasztalható túllövés (overshoot), melynek során a membránpotenciál átmenetileg a pozitív feszültség-tartományba lépve, megközelíti a Na<sup>+</sup> egyensúlyi-potenciálját. Ezalatt a Na<sup>+</sup>-csatornák gyorsan inaktiválódnak, így újra megnyitható állapotba csak a repolarizáció után kerülnek. Emiatt alakul ki a refrakter fázis, amely alatt hiába ingereljük a sejteket, azokon nem tudunk újabb akciós potenciált kiváltani.

A gyors feszültségfüggő Na<sup>+</sup>-csatornák által létrehozott erőteljes depolarizáció bizonyos csatornák aktivációs feszültségét túllépve a csatornákat aktiválhatja, míg másokat inaktiválhat. A nyugalmi membránpotenciál kialakításáért felelős befelé egyenirányító K<sup>+</sup>-csatornák (I<sub>K1</sub>) vezető képessége például a plató alatt markánsan lecsökken, amely jelentősen csökkenti a plató alatti K<sup>+</sup> kiáramlás nagyságát. Ugyancsak a depolarizáció következtében a korai kifelé irányuló tranziens áram (I<sub>to</sub>) aktiválódik, amely az akciós potenciál első fázisában tapasztalható gyors átmeneti repolarizációért felelős [55, 94]. Az akciós potenciál második, úgynevezett plató fázisát a lassú befelé irányuló Ca2+ áram (ICa,L) depolarizáló hatása, valamint az ezt részben ellensúlyozó gyors késői egyenirányító K<sup>+</sup>-áram (I<sub>Kr</sub>) - ill. annak zavara esetén a lassú késői egyenirányító K<sup>+</sup>-áram (I<sub>Ks</sub>) - repolarizáló hatása együttesen alakítja ki. Ugyanakkor ebben a fázisban az Ito inaktiválódása és IK1 deaktiválódása miatt jelentős repolarizáció nem következik be. A második fázis végére a folyamata, amelynek kezdeti szakaszában inkább repolarizáció az I<sub>Ca.L</sub> inaktivációjának, míg a későbbi szakaszban inkább az I<sub>Kr</sub> aktivációjának jut egyre fontosabb szerep, fokozatosan felgyorsul [61]. A repolarizációt az I<sub>K1</sub> áramért felelős ioncsatornák újbóli aktiválódása teszi teljessé az AP harmadik fázisában [98, 107], melynek során a munkaizomsejtek membránpotenciálja visszatér a nyugalmi szintre (4. fázis) és ezt a feszültségértéket tartja egészen a pacemaker sejtektől érkező következő ingerület kezdetéig.



**<u>1. ábra</u>** A szív kamrai munkaizomsejtjeinek akciós potenciálja, azok fázisai, valamint az egyes fázisokat létrehozó legfontosabb ionáramok összessége látható az ábrán. A nullavonal felett található áramkomponensek kifelé irányulnak, míg a nullavonal alattiak befelé irányuló áramokat jelölnek. Varró és munkatársainak közleménye [115] alapján módosítva.

Az előzőekben részletezett öt akciós potenciál fázist csak a nagyobb emlős fajokban figyelhetjük meg (pl.: kutya, nyúl, sertés, ember), míg tengerimalac esetén a korai repolarizáció fázisa hiányzik, patkány esetén már plató fázis sem alakul ki (**2**. **ábra**). Az akciós potenciál 0. fázisában valamennyi faj esetén gyors depolarizáció jön létre a munkaizomzatban. Ugyanakkor a depolarizáció maximális sebessége (V<sub>max</sub>) nyúl, kutya és ember esetén, ezen belül is a midmiokardiális sejteken a legnagyobb.

A korai repolarizáció fázisa kutya és humán szívizomsejteken jelenik meg legdominánsabban, itt is elsősorban az epicardium és midmiokardium sajátja.



<u>2. ábra</u> Az általunk vizsgált emlősfajok kamrai munkaizomsejtjeinek akciós potenciál morfológiái láthatóak. Szembeötlő, a humán és kutya karmai szívizomsejtjek akciós potenciálja között hasonlóság (a humán szív elektromos szempontból eddigi legjobb modelljének a kutya szívizomzatot tekinthetjük) [104, 105].

#### II. A szívizomsejteken előforduló ioncsatornák jellemzése

Az ioncsatornákat aktivációs mechanizmusuk alapián feloszthatjuk feszültségkapuzott, ligandvezérelt, valamint feszülésaktivált csoportokra [4]. A feszültségfüggő ioncsatornák, amelyek dominánsan meghatározzák a szívizomsejtek akciós potenciáljának az alakját, struktúrájukat tekintve további alcsoportokra oszthatók. A Nav- és Cav-csatornák felépítésére jellemző, hogy egyetlen polipeptid láncból álló 4 homológ domén alkot egy ioncsatornát. Ezen domének mindegyike 6-6 transzmembrán szegmensből tevődik össze. Az S5-S6 szegmensek között létrejövő hurok alkotja a pórusformáló régiót, míg a S4 szegmens feszültségszenzorként funkcionál [23, 24, 86]. A K<sub>v</sub>-csatornák 4 különálló α alegység tetramerizációjával jönnek létre homo- vagy heterotetramer formában, melyek mindegyike az előbb említett feszültségfüggő Na<sup>+</sup>- és Ca<sup>2+</sup>-csatornák egy-egy doménjével analóg (6 transzmembrán szegmens, S5-S6 közötti pórusformáló régió). A K<sub>ir</sub>-csatornák is négy alegységből épülnek fel, melyek mindegyike csak 2-2 transzmembrán szegmensből áll, amelyek leginkább az S5-S6 pórusformáló régióval analógok. A két pórusú K<sup>+</sup>-csatornákra jellemző felépítés, a 4 transzmembrán alfa hélix, melyek a pórusformáló régiókat alkotják [77, 99].

A fenti ioncsatornák funkciójáért egyrészt a pórusformáló régióban elhelyezkedő rövid aminosav szekvencia által létrehozott szelektivitási filter (S5-S6 hurok), valamint feszültség-érzékeny csatornák esetén, többségében az S4 szegmentumban helyet foglaló pozitív töltésű aminosavak (főként arginin és lizin) által kialakított feszültségszenzor a felelős [4, 63]. Az egykapus kapuzási séma esetén a csatornáknak egyszerűen nyitott és zárt állapotait különböztethetjük meg. A Na<sub>v</sub>- és Ca<sub>v</sub>-csatornákra a kétkapus kapuzási mechanizmus jellemző (Hodgkin-Huxley modell), amely esetben alapvetően nyugalmi zárt, nyitott és inaktivált állapotokat különíthetünk el. Ez utóbbi csatornaállapot dominánsá válása okozza a sejtek refrekter állapotát, amelynek során újabb akciós potenciál a szokásos nagyságú ingerrel nem váltható ki.

#### II./1. Kardiális nátrium-csatornák

Az emberi szívben előforduló Na<sup>+</sup>-csatornák egy 260 kDa tömegű pórusformáló a és két járulékos ß alegységből épülnek fel. A járulékos alegységek módosíthatják a csatorna kapuzási kinetikáját, befolyásolhatják a csatorna vezetőképességét, az alegységek összeszerelését, de az a alegység önállóan is működőképes. A humán szívre jellemző domináns Nav1.5 nátriumcsatorna-fehérjét a 3-as kromoszóma rövid karján (3p21) található SCN5A gén kódolja, amelynek mutációi hosszú QTszindrómát (LQT3), hirtelen bölcsőhalált, vezetési zavarokat, valamint paroxizmális familiáris kamrafibrillációt okozhatnak [14, 24, 83, 122]. Az első interdomén hurkon helyezkednek el a PKA-dependens foszforilációs helyek, míg a harmadik interdomén hurok inaktivációs kapuként funkcionál. A csatorna ionszelektivitásáért a pórusformáló régióban elhelyezkedő Asp-Glu-Lys-Ala szekvencia a felelős. A csatorna aktivációs feszültsége kb. -60 mV. Kinetikáját tekintve gyors aktiváció (időállandó: kb. 100 µs) és inaktiváció (időállandó: kb. 1 ms) jellemzi. A csatorna gátlására tetrodotoxint, saxitoxint, helyi érzéstelenítőket és Ι. osztályú

- 9 -

antiaritmikumokat, míg fokozott aktiválására veratridint, batrachotoxint, valamint különböző skorpiófajokból és tengeri viaszrózsákból izolált toxinokat alkalmazhatunk.

#### II./2. Kardiális kalcium-csatornák

Szívizomzatban a kalcium-csatornák számos típusa közül leginkább az L- és T-típus fordul elő. Az L-típusú csatornák  $\alpha$ 1-alegységei ( $\alpha_{1C}$ ), amelyek a CACNA1C gén által a 12p13.3 régióban kódoltak, nagyfokú szekvenciahomológiát mutatnak a Na<sub>v</sub>-csatornák αalegységével, szerkezeti felépítésük sok tekintetben hasonló [2, 23]. A legmarkánsabb különbség ionszelektivitásért felelős az aminosav szekvenciában van, mely ebben az



<u>3. ábra:</u> A I<sub>Ca,T</sub>, I<sub>Ca,L</sub> feszültségfüggése látható. Caterall és munkatársainak közleménye [23] alapján módosítva.

esetben Glu-Glu-Glu-Glu. Az ezen struktúrához intracellulárisan kapcsolódó  $β_2$ alegység módosítani képes a csatorna feszültségfüggését, sejtfelszíni expresszióját [48], valamint aktivációs és inaktivációs kinetikáját – hasonlóan az extracellulárisan elhelyezkedő  $α_2 δ$ -alegységhez, amely ezen felül az áram amplitúdóját is megnövelheti. A L-típusú csatorna aktivációs feszültsége (**3. ábra**) megközelítőleg -30 mV, aktivációja gyors (időállandó: kb. 3 ms), inaktivációja lassúbb és két exponenciális komponens összegeként értelmezhető (időállandóik nagyságrendileg a 10 és 100 ms-os tartományokban). A szívizomzat nodális szöveteiben (SA- és AVcsomó) és Purkinje sejtjeiben megtalálható T-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatornák (Ca<sub>v</sub> 3.1 és Ca<sub>v</sub> 3.2) fő funkciói a pacemaker potenciál generálása. Aktivációs feszültségük megközelítőleg -60 – -70 mV. Kinetikáját tekintve mind aktivációjuk (időállandó: kb. 1-2 ms), mind inaktivációjuk (időállandó: kb. 10-20 ms) gyors. Az ioncsatornák gátlására szervetlen vegyületeket (NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>) és szerves anyagokat (nifedipin, verapamil és diltiazem származékok) egyaránt alkalmazhatunk.

#### II./3. Kardiális kálium-csatornák



**<u>4.</u> ábra:** Pórus-formáló K<sup>+</sup>-csatorna alegységek családfája és a jelentősebb típusok struktúrális felépítése. Priori és munkatársainak közleménye [81] alapján módosítva.

Az emlősök szívizomsejtjein expresszálódó sokféle K<sup>+</sup>-csatornát kapuzási mechanizmusuk szerint szokás felosztani (**4. ábra**). Igy megkülönböztetünk feszültségfüggő K<sup>+</sup>-áramokat [8, 28, 103] (ilyen a tranziens kifelé irányuló K<sup>+</sup>-áram (I<sub>to</sub>), valamint a késői egyenirányító K<sup>+</sup>-áram gyors (I<sub>Kr</sub>) és lassú (I<sub>Ks</sub>) komponensei). Ismerünk ligandfüggő K<sup>+</sup>-áramokat, amelyek közül egyesek acetilkolin hatására aktiválódnak (I<sub>KAch</sub>), míg mások ATP jelenlétében gátolt állapotban vannak (I<sub>KATP</sub>) [30]. A nyugalmi potenciál kialakításáért felelős I<sub>K1</sub>-áramokat közvetítő csatornák markánsan befelé egyenirányítanak: ezek a K<sub>ir</sub> csatornák [130]. A különböző, eddig csak részben felderített sajátságokkal rendelkező, ún. háttéráramokat közvetítő csatornáknak (TASK, TREK, TWIK) a plató alatt lehet szerepük [38, 80]. A membránpotenciál és a K<sup>+</sup> egyensúlyi-potenciál viszonyából adódóan a K<sup>+</sup>-áram mindig kifelé irányul, éppen ezért ezek az áramok mindig repolarizáló hatásúak. Érdekes, hogy fiziológiás körülmények között főként a feszültség kapuzott áramok dominálnak, míg ischaemiás körülmények között felértékelődnek a I<sub>KATP</sub> és I<sub>K.ACh</sub> ligandfüggő ionáramok.

#### II./3.1. Tranziens kifelé irányuló K<sup>+</sup>-áram (I<sub>to</sub>)

Az Ito áram létrehozásáért a Ky4.2, Ky4.3, valamint a Ky1.4 pórusformáló αalegységek által alkotott homo- vagy heterotetramerek felelősek [99, 109, 135]. A dominánsan K<sub>v</sub>1.4-et expresszáló csatorna inaktivációból való visszatérése lassúbb (időállandó: kb. 1 sec) és a rajta keresztül folyó áram nagysága kisebb, mint a domnánsan K<sub>v</sub>4.3 fehérjéből felépülő csatornákon keresztül folyó áramé (időállandó: nagyságrendileg 0,1 sec). Humán és kutya kamrai szívizomban mindkét típus előfordul az utóbbi relatív dominanciája mellett. Jellegzetes a csatornák transzmurális megoszlása: az epikardiális szívizomban kb. hatszor akkora denzitással expresszálódnak, mint az endokardiális régióban [60, 62, 75]. Az epikardiális AP - többek között - emiatt rövidebb, mint az endokardiális területről elvezetett AP. Az ionszelektivitásért felelős struktúra a Kv csatornák esetében is az található Thr-x-Gly-Tyr-Gly S5-S6 szegmentum között szekvencia. Feszültségszenzor régió az S4 szegmentumon minden harmadik pozícióban megtalálható Arg vagy Lys [41]. A fent említett ioncsatornák megnyílása -20 mV felett kezdődik és mind aktivációjuk (időállandó:1-2 ms), mind inaktivációjuk (időállandó: kb. 10 ms) igen gyors [41, 56]. Az ioncsatornának szelektív gátlószere - ha egyáltalán létezik ilyen - jelenleg ismeretlen, az áram (nem szelektív módon) néhány mM 4-aminopiridinnel gátolható.

#### II./3.2. A késői egyenirányító K<sup>+</sup>-áram gyors komponense (I<sub>Kr</sub>)

Nagyobb testű emlősökben a kamrai repolarizációért felelős K<sup>+</sup>-áramok közül ez a komponens a legfontosabb [26, 74, 91]. Az áram már a plató fázis alatt elkezd aktiválódni és csúcsértékét néhány ms-mal a repolarizáció maximális sebessége előtt éri el. Az áram kialakulásáért a HERG fehérje "splice"-variánsai által létrehozott α-alegységek, valamint a hozzájuk kapcsolódó járulékos alegységek (dominánsan MiRP1) által felépített ioncsatornák a felelősek [1, 72, 90]. Az áram aktiválódása -40 mV-nál pozitívabb feszültség érték mellett kezdődik. Az I<sub>Kr</sub> aktivációs időállandója kb. 50 ms, inaktivációja rendkívül gyors (melynek köszönhetően az áram repetitív ingerlés hatására sem képes kumulálódni), deaktivációja kétkomponensű (időállandók: 0.3 és 3 sec) [41, 117]. Mind az aktiváció, mind az inaktiváció sebessége fajonként eltérő és erősen membránpotenciál függő [93, 127]. Az ioncsatorna különböző alegységeit kódoló KCNH2 és KCNE2 gén mutációi az ionáram csökkenését és ezen keresztül a repolarizáció elnyúlását okozzák, amely végső soron a hosszú QT-szindróma 2-es és 6-os altípusának kialakulásához vezet [25, 27]. Az áramot E-4031, dofetilid és d-sotalol alkalmazásával viszonylag szelektíven gátolhatjuk.

#### II./3.3. A késői egyenirányító K<sup>+</sup>-áram lassú komponense (I<sub>Ks</sub>)

Az I<sub>Ks</sub>-áram fiziológiás körülmények között kevéssé, patológiás állapotokban (pl. repolarizációs zavarok esetén) nagyobb mértékben járul hozzá az akciós potenciál repolarizációjához. Ennek értelmében az I<sub>Ks</sub>-áram egyfajta repolarizációs rezervként fogható fel. A K<sub>v</sub>7.1 (LQT1) fehérje által felépített α-alegység mellett a funkcionálisan működőképes csatorna kialakításához a MinK járulékos alegység jelenléte is szükséges, amely modulálja a csatorna α-alegységből történő felépülését és módosítja annak kapuzását [12, 89, 110]. A csatorna megnyílása 0 mV felett kezdődik, kinetikáját tekintve aktivációja lassú (időállandó: kb. 1 sec), inaktivációt nem mutat, deaktivációja viszont gyors (időállandó: kb. 0.1 sec) [6, 41, 61, 70]. A veleszületett hosszú QT-szindróma egyik leggyakoribb formájáért (1-es típus) az α-alegységet kódoló KCNQ1 gén mutációja felelős, amely többek között familiáris pitvarfibrilláció kialakulásához vezethet [123]. A járulékos alegység KCNE1 génjének mutációja a hosszú QT szindróma 5-ös típusának kialakulásában játszik szerepet [32, 101]. A csatorna gátlószereiként chromanol 293B és HMR-1556 használatos.

#### II./3.4. Befelé egyenirányító K<sup>+</sup>-áram (I<sub>K1</sub>)

A kamrai munkaizomsejtek membránja nyugalomban szinte kizárólag K<sup>+</sup>-ionokra nézve permeábilis, az így létrejövő nagy K<sup>+</sup>-konduktancia hozza létre az I<sub>K1</sub>-áramot, amelynek köszönhetően a nyugalmi membránpotenciál a K<sup>+</sup>-ionok egyensúlyipotenciálját közelíti meg [120]. Az akciós potenciál felszálló szára alatt -40 mV-nál pozitívabb membránpotenciálok mellett a Kir2.1 csatornákhoz Mg<sup>2+</sup>, illetve poliaminok kötődnek [64, 69, 111], miáltal deaktiválják az Ik1-et (ebből fakad a csatorna jellegzetes befelé egyenirányító sajátsága). А repolarizáció előrehaladásával az egyre negatívabb membránpotenciál mellett az IK1 fokozatosan újra aktiválódhat, így hozzájárul a terminális repolarizáció viszonylag gyors, késői szakaszához (lásd 1. ábra, 3. fázis). Az áram kialakulásáért felelős ioncsatornát két

- 13 -

transzmembrán alegységekből felépülő (S5-S6 analóg domén) homo- vagy heterotetramerek hozzák létre. Az ioncsatorna kinetikáját tekintve, aktivációja azonnali és csak minimális inaktivációt mutat. Szelektív gátlószere az I<sub>K1</sub>-nek jelen pillanatban nincs, kísérletes körülmények között 50 µM Ba<sup>2+</sup>-t alkalmaznak nem szelektív gátlószerként.

#### III. Antiaritmiás szerek

Ahogy már a bevezetés elején is említettem, a pacemaker és munkaizomrost típusú akciós potenciálok kialakításáért sokféle ionáram finom összhangja felelős. Ezen ionáramok veleszületett vagy szerzett defektusai következtében ingerképzési és/vagy ingerületvezetési zavarok alakulhatnak ki, melyek aritmiákhoz [35], ezeken keresztül a pumpafunkció erőteljes romlásához, végső soron halálhoz vezethetnek. Az ilyen kóros ingerképzés egyik gyakran előforduló fajtája a korai utódepolarizáció (EAD) kialakulása [50, 51, 134], mely a repolarizáció elnyúlása következtében jön létre és hosszú-QT szindrómával [58, 85, 88], következményes torsades de pointes tachikardiával [34], majd ennek típusú kamrai progressziója esetén kamrafibrillációval jár együtt [25, 82]. Gyakoriak továbbá a késői utódepolarizáció (DAD) következményeként kialakuló ritmuszavarok, melyek a kalciummal való túltelítődés következményei és leggyakrabban miokardiális ischaemia/reperfúziót követően fordulnak elő [21]. Az utódepolarizációs mechanizmusú ingerképzési zavarok könnyen aktiválhatnak reentry típusú ingerületvezetési zavart. A fenti, potenciálisan életet veszélyeztető állapotokat, főként a szívizom-ioncsatornákra ható farmakonok segítségével igyekszünk megszüntetni, ill. megelőzni (ugyanakkor, az életveszélyes ritmuszavarok kezelésse, megszüntetése sajnos nem minden esetben sikeres, gyakran az elektromos DC shock propmpt hatása is szükséges). Az antiaritmiás gyógyszereket hatásmechanizmusuk szerint Vaughan Williams-féle osztályokba sorolhatjuk (**5. ábra**).

#### III./1. Az I. osztályba tartozó antiaritmikumok

Ezek a szerek a Na<sup>+</sup>-csatornához kötődve gátolják azok megnyílását, ennek következtében az akciós potenciál kialakulását, így legtöbbjük helyi érzéstelenítőként is alkalmazható. Lassítják továbbá a szív ingerületvezetését és kiszélesítik a QRS-komplexumot.

A szerek kötődése a csatorna funkcionális állapotától függ. A nyitott vagy inaktív állapotban lévő csatornához nagyobb affinitással kötödnek, mint a zárt állapotban lévőhöz. Leválási kinetikájuk szerint lehetnek gyors (I./B), lassú (I./A), valamint igen lassú (I./C) disszociációval rendelkező alcsoportok, amelyek leválási időállandója rendre 0,1-0,4, 5-30 és 5-180 s között van. Fentiekből következik, hogy a gyors kinetikájú I./B szerek nyugalmi szívfrekvencia mellett is teljes mértékben disszociálnak az ioncsatornáról a diasztolé alatt, így a vegyület hatása csak részlegesen depolarizált szívizomban és csak jelentős tachikardia mellett érvényesülhet [79].



**<u>5. ábra</u>**: Az ábrán egy reprezentatív kamrai akciós potenciál és a szívfelszínen detektálható elektrokardiogram egymáshoz való viszonyát ábrázoltuk, valamint az egyes antiaritmikum osztályokat, a fő hatásmechanizmusnak megfelelő akciós potenciál fázis mellett.

Ezzel szemben az I./C típusú szerek disszociációja a Na<sup>+</sup>-csatornáról rendkívül lassú, aminek köszönhetően normális szívfrekvenciák mellett is erősen gátolják a 0. fázist. Az I./A alcsoportba sorolható antiaritmikumok már terápiás koncentrációban is gátolják a szívizom K<sup>+</sup>-csatornáit, ezért megnyújtják a repolarizációt [22]. Mindezeknek köszönhetően a QRS kiszélesedésén kívül, hosszabb lesz a QT- szakasz is, mely hatások már fiziológiás nyugalmi szívfrekvenciák mellett is jelentkezhetnek. Az I. osztályú szerek jellemző képviselői a mexiletin és lidokain (I./B), a flekainid, propafenon és enkainid (I./C), valamint a kinidin (I./A).

#### III./2. A II. osztályba tartozó antiaritmikumok

Az osztály képviselői többségükben a β-receptorok kompetitív antagonistái. Fő felhasználási területük a szívelégtelenséghez és infarktushoz társuló katecholamin túltengés okozta ritmuszavarok kezelése (bár antiarritmiás hatásuk nem elhanyagolható, a fent említett betegségekben nem csak ezen hatásuk miatt alkalmazzuk). Fokozott szimpatikus stimulus esetén a meredekebb prepotenciál sinustachikardiát, a fokozott Ca<sup>2+</sup>-csatorna aktiváció utódepolarizációk kialakulását segíthetik elő, amely hatásokat a β-blokkolók hivatottak kivédeni. A II. csoportba több mint 50 vegyület tartozik, legismertebb képviselői a pindolol, propranolol, metoprolol, atenolol és nebivolol.

#### III./3. A III. osztályba tartozó antiaritmikumok

Hatásmechanizmusukat tekintve az alábbi szerek а szívizomsejtek repolarizációjának nyújtásán keresztül fejtik ki hatásukat, amelynek következtében megnyúlik az akciós potenciál és emiatt a refrakter fázis időtartama. Antiaritmiás hatásukat a gyors depolarizációt okozó Na<sup>+</sup>-csatornák gátlása nélkül fejtik ki, ezért az intraventrikuláris ingerületvezetést nem befolyásolják, így a QRS-komplexum kiszélesedése nélkül okozzák a QT intervallum megnyúlását [31]. Refrakter periódust nyújtó hatásukat valamely K<sup>+</sup>-csatorna gátlásán keresztül fejtik ki, mely hatás elvileg felléphet a tranziens kifelé irányuló K<sup>+</sup>-áram (I<sub>to</sub>), a késői egyenirányító K<sup>+</sup>-áram gyors  $(I_{Kr})$  és lassú  $(I_{Ks})$  komponenseinek [97], valamint a befelé egyenirányító  $(I_{K1})$  áramok gátlásán keresztül. A valóságban viszont a III. osztályú antiaritmikumok az IKr áram szelektív vagy kevésbé szelektív gátlószerei [46, 54, 91, 100]. A III. osztályú antiaritmikumokat elsősorban а reentry mechanizmusok gátlása céljából szupraventrikuláris és kamrai ritmuszavarok kezelésében alkalmazzák. E csoport fontosabb képviselői: dofetilid, d-sotalol és az amiodaron.

#### III./4. A IV. osztályba tartózó antiaritmikumok

Az utolsó alcsoport tagjai az L-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatornák gátlószerei, amelyek markáns hatást fejtenek ki a nodális szöveteken, valamint a kamrai és pitvari munkaizomzaton. Ebből fakadóan legfontosabb hatásuk az AV-csomó depolarizációjának, ezáltal ingerületvezetésének lassítása, refrakter periódusának megnyújtása, valamint a kamrai munkaizomsejtek "Ca<sup>2+</sup>-overload"-tól történő megóvása, amely késői utódepolarizációk kialakulásához vezethet. Ezeket az antiaritmikumokat főként szupraventrikuláris tachikardiák, valamint atrio-ventrikuláris reentry aritmiák esetében alkalmazzák. A kezelés során mellékhatásként negatív inotrópia jelentkezhet, emiatt β-blokkolókkal történő alkalmazásuk csak ellenörzött körülmények között, nagy körültekintéssel lehetséges, mivel erősítik egymás negatív inotróp és kronotróp hatását. Képviselői: nifedipin, verapamil és a diltiazem.

#### III./5. Egyéb antiaritmikumok

Az adenozin, egy endogén anyag, mely a szíven A<sub>1</sub>-típusú, hét transzmembrán domén szerkezetű, G<sub>i</sub>-protein aktivált receptoron keresztül fejti ki hatásait, amelyek közül legfontosabb a Ca<sup>2+</sup>-áram csökkenése. Ezen kívül purinerg receptorokon keresztül fokozza az acetilkolin függő K<sup>+</sup>-áramot. Ezen hatásoknak köszönhetően csökken az ingerület vezetés az AV-csomóban, így kiválóan alkalmazható szupraventrikuláris tachikardiák kezelésére. Az I<sub>KATP</sub> gátló szerek (pl. *glibenclamid*) az ischaemia okozta aritmogén hatást mérséklik. Akut szívizom ischaemia esetén ugyanis a sejtek ATP tartalma csökken, ezért megnyílnak az ATP-függő K<sup>+</sup>-csatornák. Ez rövidíti a refrakter periódust, tehát aritmogén. Azon antiaritmikumokkal, melyek a pacemaker áram (I<sub>f</sub>) gátlásán keresztül csökkentik a spontán diasztolés depolarizáció meredekségét (pl.: *ivabradin*), növelni tudjuk a ciklushosszt és ezáltal csökkenti a kórosan magas szívfrekvenciát. Hasonló hatást érhetünk el a maximális diasztolés potenciál negatív irányba történő eltolásával pl. adenozin segítségével.

Fontos új antiaritmiás stratégia a szívizomsejtek közötti réskapcsolatok nyitvatartásának serkentése. A sejteket elektromosan összekötő "gap-junction"-ök acidózis hatására, ill. az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció növekedésére bezáródnak. A megnövekedett hosszanti ellenállás lassítja az ingerületvezetést, ami kedvez a reentry típusú aritmiák kialakulásának.

- 17 -

#### Irodalmi áttekintés

#### IV. A fordított frekvenciafüggés hátterében feltételezett elméletek

A SWORD (Survival With ORal D-sotalol) tanulmány óta tudjuk, hogy a III. osztályú antiaritmiás szerek az APD megnyújtásán keresztül fordított frekvenciafüggő módon meghosszabbítják az akciós potenciál refrakter periódusát [15, 46, 54]. Ez azt jelenti, hogy akciós potenciál nyújtó hatásuk kifejezettebb alacsonyabb frekvenciák esetén, mint magasabbak mellett, amint az az **6. ábrán** világosan látható. Tehát éppen tachikardiában, a kórosan alacsony ciklushosszok esetén nem érvényesül kellőképpen a repolarizációt és effektív refrakter fázist nyújtó hatásuk, mikor arra a legnagyobb szükség lenne [46, 47, 76, 124].



**<u>6. ábra</u>**: A III. osztályú antiaritmikumokra (d-sotalol és dofetilid) jellemzô akciós potenciál időtartamot nyújtó hatás, amely a ciklushossz növekedésével egyre kifejezettebbé válik. Ezt nevezzük fordított frekvenciafüggő hatásnak.

Ugyanakkor bradikardia estén a magasabb ciklushosszok mellett az extrém módon megnyúlt repolarizáció korai utódepolarizációk kialakulásához, ezáltal életveszélyes kamrai tachikardiához vezethet. Mivel a III. osztályú szerek proaritmiás kockázatát az akciós potenciál hosszára kifejtett fordított frekvenciafüggő hatásukkal hozzák összefüggésbe [76, 124], egy fordított frekvenciafüggést nem mutató III. osztályú vegyület kifejlesztése igen kívánatos lenne. A repolarizációt megnyújtó III. osztályú szerek fordított frekvenciafüggő természetének hátterében álló pontos elektrofiziológiai mechanizmus korábban nagyrészt tisztázatlan volt. Ugyanakkor a jelenség hátterében álló összefüggések pontos megismerése rendkívül fontos, hiszen ennek ismeretében esetleg lehetőség nyílna a mainál hatékonyabb szívritmus szabályozó gyógyszerek kifejlesztésére. A fordított frekvenciafüggés mechanizmusának értelmezésére korábban kidolgozott elméletek a következőkben kerülnek bemutatásra.

# IV./1. Az antiaritmikum és az ioncsatorna kölcsönhatásának frekvenciafüggése a "modulált receptor teória", a "védett receptor elmélet" értelmezésében

A modulált receptor elmélet értelmében a csatornafehérje affinitása a gátló hatású antiaritmiás szerhez függ a csatorna állapotától [44, 45]. Ennek egy speciális esete a védett receptor elmélet [102], amely szerint az antiaritmiás szer hozzáférése a csatornán lévő kötőhelyéhez változik a csatornán lévő kapuk pozíciójának függvényében. Mindkét esetben a kötött és a szabad kötőhelyek aránya a csatorna aktuális strukturális állapotának függvénye, amely folyamatos változáson megy keresztül a szívciklus során. Tehát olyan esetet feltételezve, amikor a gátlás kifejlődésének a diasztole kedvez, az akciós potenciál plató fázisa során a szer leválik kötőhelyéről, az akciós potenciál megnyúlásának fordított frekvenciafüggő jellegét eredményezve. Ráadásul a fenti ok miatt a ligand-kötött csatornák aránya exponenciális időkinetikát követ a repetitív ingerlés során, amit a stimulusok közötti időintervallum, a csatorna kapuzási folyamatai, a szer koncentrációja, valamint a kötődési folyamat frekvencia-függősége határoznak meg.

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

#### IV./2. Az I<sub>Ks</sub> áram magas ingerlési frekvenciáknál kumulálódik

Jurkiewicz és Sanguinetti 1993-ban beszámoltak arról, hogy a metánszulfonanilid szerkezetű III. osztályú antiaritmiás szerek az akciós potenciálok időtartamát fordított módon frekvenciafüggő nyújtották meg tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken [54], tehát a hatásuk alacsonyabb ingerlési frekvencia alkalmazásánál kifejezettebb volt, mint magasabb frekvenciák esetén [65]. A szerzők kísérleteikben dofetilidet használtak, amely az általuk alkalmazott koncentrációban  $(0,1 \mu M)$  az I<sub>Kr</sub> szelektív gátlószerének tekinthető, míg az I<sub>Ks</sub>-re gyakorlatilag körülmények végezve a hatástalan. Feszültség-clamp között vizsgálatot megerősítést nyert, hogy a dofetilid szelektíven gátolja az  $I_{Kr}$ -t (IC<sub>50</sub>=31,5 nM), ugyanakkor sem az I<sub>Ks</sub>-re, sem az I<sub>K1</sub>-re nem volt számottevő hatással. Különböző frekvenciájú ingerlést alkalmazva azt találták, hogy sem az I<sub>Kr</sub>, sem az I<sub>K1</sub> amplitúdója nem változott meg, sőt a dofetilid Ikr-re gyakorolt gátló hatása sem függött az ingerlési frekvencia nagyságától. Ezzel szemben azonban az I<sub>Ks</sub> amplitúdója nőtt az ingerlési frekvencia emelésével, amit az I<sub>Ks</sub> nem teljes deaktivációjával magyaráztak. Kísérleti eredményeikből arra a következtetésre jutottak, hogy bár dofetilid alkalmazása során az akciós potenciál megnyúlásáért az IKr gátlás a felelős, a tapasztalt frekvenciafüggésért nem az I<sub>Kr</sub>-re gyakorolt hatás, hanem az I<sub>Ks</sub> azon kinetikai sajátsága tehető felelőssé, hogy magas frekvenciájú ingerlés alatt deaktivációja nem következik be tökéletesen és ezáltal az áram kumulálódik. Tehát az IKs magas ingerlési frekvenciánál relatíve nagyobb szerepet játszik a repolarizáció folyamatában, emiatt az I<sub>kr</sub> gátlók akciós potenciált nyújtó hatása csökkenhet. Ennek a teóriának gyökeresen ellentmond az a megfigyelés, hogy a fordított frekvenciafüggés az I<sub>Ks</sub> teljes gátlása során is kimutatható [112].

## IV./3. Az extracelluláris térben K<sup>+</sup> akkumulálódik magas ingerlési frekvenciánál

Yang és Roden 1996-ban közölt cikkükben az  $I_{Kr}$ -t nem szelektíven gátló kinidin és az azt szelektíven gátló dofetilid hatását vizsgálták hERG csatornát expresszáló AT-1 sejteken, ahol az árammérést zavaró egyéb kifelé irányuló áram nem volt jelen [126]. Megállapították, hogy az extracelluláris kálium koncentráció növelése a dózishatás görbe nagymértékű jobbra tolódását okozta mindkét szer esetében. Az

- 20 -

extracelluláris K<sup>+</sup> koncentráció 1-ről 8 mmol/l-re növelésekor a dofetilid IC<sub>50</sub> értéke 2,7±0,9-ről 79±32 nmol/l-re nőtt, kinidin esetén 0,4±0,1-ről 3,8±1,2 µmol/l-re. Emelkedett szívfrekvenciánál a sejtek homeosztázisát fenntartó Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa kompenzáló működése viszonylag lassú, így káliumionok halmozódhatnak fel a sejtmembrán külső oldalán a sejtközötti térben (ugyanúgy, mint ischaemia során, amikor a pusztuló sejtekből káliumionok áramlanak ki). Mindezt egybevetve ischaemia vagy magas szívfrekvencia okozta extracelluláris kálium koncentráció emelkedés során az I<sub>Kr</sub> gátló szerek hatékonysága csökken. Hipokalémia esetén viszont a szerek I<sub>Kr</sub> gátló hatása kifejezettebbé vált, ami magyarázatul szolgálhat arra a klinikai tapasztalatra, hogy hipokalémia és bradikardia esetén a torsade de pointes típusú kamrai tachikardia gyakoribb kialakulása figyelhető meg [87]. Arra vonatkozóan, hogy az extracelluláris kálium koncentrációjának megváltozása milyen mechanizmussal okozhatja az I<sub>Kr</sub> gátlásának fordított frekvenciafüggését, a szerzők két lehetséges magyarázatot adnak. Az első szerint az extracelluláris kálium koncentrációjának változása a csatorna konformációjának változását indukálhatja, ezzel megváltoztatva a szer kötődését a csatornán lévő kötőhelyéhez. A másik lehetséges magyarázat az, hogy ezek a szerek feszültségfüggő módon kötődnek a nyitott állapotú csatornához. Ebben az esetben megnövekedett а káliumpermeabilitás ronthatja a gátlószerek kötődését a pórusban található kötőhelyeikhez. E teória ellen is leginkább az szól, hogy nemcsak az I<sub>Kr</sub> gátlószerei mutatnak fordított frekvenciafüggő hatást.

#### IV./4. A káliumáramok kinetikai paramétereinek frekvenciafüggő viselkedése

Rocchetti és mtsai (2001) tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken akciós potenciál-clamp technikával vizsgálták a késői egyenirányító káliumáramok frekvenciafüggését [84]. Azt találták, hogy a rövid ciklushossz (magas szívfrekvencia) mind az  $I_{Kr}$ -nek, mind az  $I_{Ks}$ -nek az akciós potenciál során korábban történő aktivációját és amplitúdójának emelkedését okozta, ugyanakkor az  $I_{Kr}$  és az  $I_{Ks}$  hozzájárulása a membránon átfolyó teljes áramhoz a repolarizáció folyamatában változatlan maradt. A ciklushossz rövidülése azonban a két ionáram növekedését egészen eltérő mechanizmussal hozza létre [37]. A diasztole intervallumának rövidítése azonos akciós potenciál időtartam mellett serkentette a  $I_{Ks}$ -t, viszont az  $I_{Kr}$ -re nem volt hatással, tehát az  $I_{Ks}$  nagysága a szisztole és a diasztole arányától

- 21 -

függhet. Ezzel szemben az akciós potenciál hosszának csökkentése, változatlan diasztolés intervallum mellett növelte az I<sub>Kr</sub>-t. Az I<sub>Ks</sub> növekedéséért a csökkenő diasztolés intervallum során az aktivált állapotú csatornák akkumulációja lehet felelős, amely mechanizmus jól korrelál a IV.2 pontban leírtakkal. A szerzők is megemlítik viszont, hogy ez a magyarázat nem lehet teljes mértékben helytálló más fajokban, úgymint kutya [37] és humán [119] szívizomban, ahol az  $I_{Ks}$  deaktivációs kinetikája a tengerimalacéhoz képest lényegesen gyorsabb folyamat. Az I<sub>Ks</sub> magas szívfrekvenciáknál megfigyelhető növekedése mögött további faktorok hozzájárulását valószínűsítik in vivo, ilyen lehet például az I<sub>Ks</sub> emelkedett intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció iránti érzékenysége [78, 108], valamint a β-adrenerg aktiváció [128]. Az I<sub>Kr</sub> olyan különleges kapuzási sajátságokkal (pl. ultragyors inaktivációval) rendelkezik, hogy a plató alatti lassú repolarizáció során (amikor a repolarizáció sebessége -1 V/s alatti) az I<sub>kr</sub> nagysága csökken, ezzel tovább lassítva a repolarizáció folyamatát. Ellenben a repolarizáció sebességének -1,5 V/s felé emelkedése az IKr jelentős növekedését eredményezi. Ennélfogva az IKr és a repolarizáció nagysága közötti pozitív visszacsatolás a repolarizációban egyfajta autoregeneratív mechanizmus kialakulását okozza. Ugyanakkor az I<sub>Kr</sub> nagysága és kinetikai paraméterei az egyes fajok között jelentős eltéréseket mutatnak: például kutya kamrai szívizomsejteken az Ikr amplitúdója független a repolarizáció sebességétől, míg az Ikr deaktivációja lényegesen lassúbb, mint tengerimalacban, ráadásul az IKr áram-feszültség karakterisztikája is eltérő [37].

Ezzel kapcsolatban Virág és mtsai (2009) megállapították, hogy az akciós potenciál konfigurációja az  $I_{Kr}$  és az  $I_{K1}$  kinetikai sajátságain keresztül befolyással lehet az akciós potenciál megnyúlásának fordított frekvenciafüggő jellegére [118]. A repolarizáló hatású kifelé irányuló áramok gátlása, vagy a depolarizációt okozó befelé irányuló áramok serkentése folytán a repolarizációt nyújtó szerek nagy valószínűséggel fordított frekvenciafüggést mutatnak, függetlenül attól, hogy mely áramot módosították. Az  $I_{K1}$  az  $I_{Kr}$ -hez hasonlóan Rocchetti és mtsai által előzőekben említett különleges kinetikai sajátságokkal rendelkezik. Az  $I_{Kr}$  esetében az inaktiváció és a deaktiváció időviszonyai [93, 127]. Az  $I_{K1}$  esetében a magnéziumionok és a poliaminok a nyugalmi membránpotenciálnál kevésbé negatív érték esetén gyorsan kötődnek a csatornához, ezáltal gyorsan elzárják a csatorna pórusát, így a csatorna deaktivációját okozzák [36, 64, 69, 111]. Pozitív potenciál értékeknél az  $I_{Kr}$  lassan

- 22 -

aktiválódik, de gyorsan inaktiválódik. Amikor a repolarizációs folyamat meredeksége megnő, időegység alatt az ioncsatornák nagyobb része tér vissza az inaktivációból, mint amikor a repolarizáció meredeksége alacsony. Fentiek értelmében a repolarizáció meredekségének emelkedése növeli ennek a repolarizáló áramnak a nagyságát, így tovább gyorsítva a repolarizáció folyamatát. A csatorna deaktivációja a repolarizáció során egy lényegesen lassabb folyamat és ez a kialakuló áram mértékét limitálja. Az IK1 esetében pozitív potenciál értékeknél a magnéziumionok és a poliaminok okozta gátlás a repolarizáció meredekségének növekedésével gyorsan oldódik, ezzel nagyobb IK1-áramot eredményez a repolarizáció folyamatának elmélyülésekor. Ennél fogva bármely, a repolarizáció meredekségét csökkentő tényező, akár egy káliumcsatorna gátlástól független esemény is, pl. a veratrin alkalmazása után megfigyelhető késői nátriumáram növekedése, vagy a szívelégtelenség okozta QT intervallum megnyúlás [67], ill. a hosszú QT szindróma 3-as típusa [92] tovább csökkentheti a repolarizációs hajtóerőt. Lényeges, hogy maguk a szerzők is hangsúlyozzák, hogy magas szívfrekvenciáknál nem csupán az  $I_{Kr}$  és az  $I_{K1}$  kinetikai tulajdonságai tehetők felelőssé a repolarizáció megnyúlásának fordított frekvenciafüggéséért, ugyanakkor felerősíthetik valamely szer által a plató fázis alatt folyó áramokban okozott kisebb változásokat.

#### Célkitűzések

A fordított frekvenciafüggés hátterében meghúzódó mechanizmusok feltárására kidolgozott nagyszámú teória ellenére a pontos működési elv mostanáig tisztázatlan maradt. Kutatásaink során tehát célul tűztük ki a fenti elméletek közötti ellentmondások feloldását, az egyezések okának tisztázását, szükség esetén az előző eredményeket magyarázó új elmélet felállítását a kísérletes célokra használt emlősök lehetőség szerint legszélesebb skáláján (patkány, tengerimalac, nyúl, kutya) valamint az emberi szíven elvégzett elektrofiziológiai vizsgálatok eredményeképpen. Bár tudjuk, hogy a humán szív elektromos szempontból eddigi legjobb modelljének a kutya szívizomzatot tekinthetjük [5, 9, 53, 104, 105]; vizsgálatainkat mégis több fajon végeztük el annak érdekében, hogy megtudjuk, hogy az egyes fajok akciós potenciáljai között tapasztalható, néhol markáns különbség (adott ionáramok megléte vagy hiánya) mennyiben befolyásolja az akciós potenciál hosszának változását az ingerlési frekvencia függvényében [114].

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

A fenti kérdésfelvetések alapján tehát megvizsgáltuk az APD moduláció frekvenciafüggését különféle ionáramokat serkentő és gátló szerek, valamint transzmembrán áram injektálás alkalmazásával. Vizsgáltuk továbbá, hogy az akciós potenciál platója alatt folyó membránáram és az APD közötti kapcsolat milyen mértékben igazolja kísérleti megfigyeléseinket [7, 132].

#### Anyagok és módszerek

#### Hiba! A könyvjelző nem létezik. V. A preparátumok előkészítése

#### V./1. Multicelluláris emlősszív-preparátumok készítése

Az általunk alkalmazott eljárások teljes mértékben összhangban voltak a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottságának szabályzatával, valamint a Helsinki Deklaráció és az NIH által definiált idevonatkozó irányelvekkel.

Kísérleteinket ivarérett, kísérleti célra tenyésztett 10-15 kg súlyú kutyákon, 2-3 kg súlyú házinyulakon, 0,3-0,5 kg súlyú tengerimalacokon, valamint 0,2-0,4 kg súlyú Wistar patkányokon végeztük. Az anesztéziához 5 mg/kg ketamin-hidrokloridot (Calypsol, Richter Gedeon Rt., Budapest, Hungary), illetve 170 mg/kg nátriumpentobarbitált (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), valamint 0,04 mg/kg xylazinhidrokloridot (CP-Xilazin, CP-Pharma, Burgdorf, Germany) alkalmaztunk. A mellkas megnyitását követően a szívet gyorsan kipreparáltuk, majd ezt követően hideg (5 °Cos) Tyrode-oldatba helyeztük, amelynek összetétele: NaCl 140 mM, KCl 5,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, HEPES 5 mM, glükóz 10 mM, pH 7,4 volt.

A kutya bal kamrájából ék alakú darabot metszettünk ki, majd a szövetdarabban futó bal elülső leszálló coronaria artéria ágat (LAD) kanüláltuk, majd anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával enzimatikusan izolált szívizomsejteket nyertünk belőle [66]. Ezzel egy időben történt a jobb ill. bal kamrai papilláris izom, valamint a szabadon futó Purkinje-rostok kipreparálása és Tyrode oldattal történő perfúziója.

#### V./2. Humán papilláris izomszövet izolálása

Kísérleti mintáinkat egészséges szívdonorok mintáiból nyertük. A szervdonorok által felajánlott szervekből a pulmonáris és aorta billentyűk kerültek beültetésre, míg a fennmaradó szövetek kutatási célra hasznosultak. A kiemelést közvetlenül megelőzően a donorok dobutaminon, furosemiden és plazma expandereken kívül más gyógyszeres kezelésben nem részesültek. A papilláris izom preparálási eljárása mindenben megegyezett az előzőekben leírtakkal. Az alkalmazott kísérleti eljárás a szegedi Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottságának engedélye alapján történt.

#### V./3. Izolált szívizomsejtek preparálása

Sejtizolálás céljából szegmentperfúziós technikát alkalmaztunk kutyaszíven [66]. A kanülált bal kamrai szegmenst Langendorff apparátus segítségével 5 percen keresztül Ca<sup>2+</sup>-mentes JMM (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás) oldattal perfundáltuk a szövet Ca<sup>2+</sup> és vértartalmának eltávolítása céljából (pH=6,9). Ennek összetétele a következő volt: taurin 2,5 g/l, piruvát 175 mg/l, ribóz 750 mg/l, allopurinol 13,5 mg/l és NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/l. Ezt követően a preparátumot mintegy 30 percen keresztül perfundáltuk JMM oldattal, melyhez 0,66 g/l kollagenázt (Type II, Worthington), 2 g/l borjú albumint (Fraction V, Sigma) és 50 µM CaCl<sub>2</sub>-ot adtunk. A sejtizolálás során az oldatokat végig karbogénnel equilibráltuk és a perfúziós oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. Felhasználásig a sejteket 14 °C-os MEM oldatban tároltuk.

#### VI. Elektrofiziológiai mérések

#### VI./1. Izolált szívizomsejtek vizsgálata

A kísérletek során a szívizomsejteket 10 ml/perc sebességgel perfundáltuk oxigenizált Tyrode-oldattal 37 °C hőmérsékleten. Az izolált sejtek elektrofiziológiai paramétereinek vizsgálatára kizárólag a megfelelő morfológiájú (ép szélű, tiszta harántcsíkolatot mutató és nyugalomban lévő) sejteket használtuk. А membránpotenciál változásait 3 M KCl oldattal töltött 20-40 MΩ ellenállású boroszilikát üvegből készült intracelluláris mikroelektródákkal regisztráltuk. Az elektródából érkező jeleket Axoclamp 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) erősítő alkalmazását követően Digidata 1200 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) analóg/digitális átalakító kártya segítségével 100 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk. A sejteket folyamatosan 1 Hz frekvenciájú, 1 ms időtartamú, és az ingerküszöb kétszeresének megfelelő amplitúdójú négyszögimpulzusokkal ingereltük úgy, hogy az ingerlési artefaktumtól az akciós potenciál felszálló szára jól elkülöníthető legyen. A frekvenciafüggés vizsgálatakor az

- 26 -

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

## VI./2. Multicelluláris preparátumok (kamrai munkaizomrostok és Purkinje rostok) vizsgálata

A papilláris izmon és Purkinje-rostokon végzett mérések során a preparátumokat a fentiekben ismertetett módon oxigenizált Tyrode-oldattal perfundáltuk 37 °C hőmérsékleten. A szövetek ingerlése platina elektródákkal 5 és 0,3 s közötti ciklushossz alkalmazása mellett történt (Purkinje-rostok esetén a leghosszabb ciklushossz 3 s volt). A vizsgálat során a membránpotenciál változásokat 3 M KCI oldattal töltött 5–20 MΩ ellenállású boroszilikát mikroelektródákkal regisztráltuk. Patkány AP-ok rögzítése esetén az erősítő típusa INTR-01 (Experimetria, Budapest, Hungary), míg az A/D-kártya UAM-1500 (Experimetria, Budapest, Hungary) volt, a többi multicelluláris mérés során az analóg-digitális konverziót ADA 3300 A/D-kártya (Real Time Device Inc., State College, PA, USA) segítségével végeztük 40-100 kHzes mintavételezési frekvencia mellett.

#### VI./3. Alkalmazott kísérleti protokollok

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

#### VII. Felhasznált anyagok

A kísérletek során felhasznált vegyszereket és gyógyszereket (lásd az **1. táblázatban**) a Sigma-Aldrich vállalattól (St. Louis, MO, USA) szereztük be. A vizsgált szerekből oldékonyságuktól függően desztillált vízben, dimetilszulfoxidban vagy alkoholban feloldva törzsoldatot képeztünk, amit közvetlenül az alkalmazás előtt tovább hígítottunk Tyrode-oldattal az alkalmazott végkoncentrációra. Minden esetben ügyeltünk arra, hogy a végső hígítás utáni oldószer-koncentráció ne haladja meg azt a kritikus értéket, amely a kísérlet kimenetelét érdemben befolyásolhatja. A kísérletek során alkalmazott szerkoncentrációk megválasztása a közel maximális áramgátlást ill. serkentést okozó dózisoknak megfelelően történt.

Vizsgált szerek	Alkalmazott koncentráció	Hatásmechanizmus	AP hosszára kifejtett hatás
dofetilid sotalol E-4031 BaCl <sub>2</sub> TEA 4-AP veratrin BAY K 8644 lidokain mexiletin tetrodotoxin nifedipin MnCl <sub>2</sub> lemakalim	50 nM, 1 μM* 20-40 μM** 1 μM 10 μM 5 mM 5 mM 1 μg/ml 1 μM 10 μM 2 μM 2,5 μM 2 μM 15 μM	$I_{Kr} gátlás I_{Kr} gátlás I_{Kr} gátlás I_{K1} gátlás I_{K1} gátlás I_{K2} gátlás I_{N2} gátlás I_{N2} gátlás I_{N2} gátlás I_{N2} gátlás I_{Ca(L)} gátlás I_{Ca(L)} gátlás I_{K(ATP)} növelés$	nyújt nyújt nyújt nyújt nyújt nyújt nyújt rövidít rövidít rövidít rövidít rövidít
nicorandil	100 µM	I <sub>K(ATP)</sub> növelés	rövidít

\*50 nM humán és 1 μM kutya papilláris izom vizsgálata esetén

\*\*20 μM nyúl, 30 μM humán és 40 μM tengerimalac papilláris izom vizsgálata esetén

**<u>1. táblázat</u>**: A vizsgálatainkhoz felhasznált vegyszerek és hatóanyagok alkalmazásuk dózisával, hatásuk mechanizmusával és az akciós potenciál hosszára kifejtett hatásukkal együtt feltüntetve.

#### VIII. Matematikai modellezés

Előzetes kutatási eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a fordított frekvenciafüggés egy olyan alapmechanizmus következménye, ami független az APD változásokat közvetlenül létrehozó hatásoktól. A szimuláció célja, hogy igazolja azon munkahipotézisünket, miszerint ezen alapmechanizmus az akciós potenciál platója alatt folyó nettó membránáram és az akciós potenciál időtartama közötti kapcsolat jellegzetességeiből adódik. A klasszikus AP mérés nem alkalmas sem ennek igazolására, sem megcáfolására, mivel ezen vizsgálat során nem tudunk szelektíven eltekinteni az ioncsatorna kapuzási kinetikájától, mely potenciálisan hozzájárulhat a fordított frekvenciafüggés mechanizmusához. Ebből kifolyólag fordultunk a matematikai modellezés eszközéhez, melynek során előzetesen két különböző ciklushosszon (0,3 s és 5 s) regisztrált kutya kamrai endokardiális AP-t alkalmaztunk (egyaránt 1 kHz-es mintavételezési gyakoriság mellett). A szimulációt a következő elvek szerint végeztük. A szimuláció során az AP-ra mint idő és feszültség mátrixára tekintettünk, melyben az időt monodimenzionális vektorként foghatjuk fel.

#### $I_{net} = -C_m (dV/dt)$ <u>3. egyenlet</u>

Ebből fakadóan a membránon átfolyó áram összmennyisége a teljes AP viszonylatában nullának tekinthető [29, 43]. Emiatt tekinthetjük úgy, hogy a nettó membránáram értéke megegyezik a kapacitív árammal (ellentétes előjellel). A kapacitív áramot a membránpotenciál változás sebességének és a membránkapacitásának szorzataként írhatjuk le a **3. egyenlet** értelmében.

$$t_{stim}(i) = t_{kont}(i-1) + \frac{\Delta V_m}{V_{m'(i)}}$$
4. egyenlet

A szívizomsejtek állandó membránkapacitását véve alapul a membránpotenciálváltozás sebessége jól korrelál a nettó transzmembrán árammal, melynek alapján becsülhetővé válik a különbség az egyes akciós potenciál profilok között, mivel a nettó membránáram amplitúdójának változása alakítja ki a membránpotenciál különbségek időbeni változását. A kísérlet során a befelé irányuló konstans áram (pl.: -0,066 pA/pF) hatását a membránpotenciál értékének időbeli változásából számoltuk. A számítást a **4. egyenlet** szerint elvégezhetjük minden egyes feszültségérték mellett, meghatározva az általunk alkalmazott áram injekció

- 29 -

idővektorát, ahol  $t_{kont}$  a kontroll idővektor, míg a  $\Delta V_m$  a feszültség változása két egymást követő időpillanat között.

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

#### IX. Statisztikai analízis

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

#### Eredmények

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

Mint ahogy azt a III. osztályú antiaritmiás szerekkel kapcsolatban már említettem a bevezetés során, régóta ismert, hogy akciós potenciál nyújtó hatásuk kifejezettebb alacsonyabb frekvenciák esetén, mint magasabbak mellett (a d-sotalol és a dofetilid vonatkozásában lásd az **6. ábrán**). Fentiek értelmében e vizsgált III. osztályú szerek akciós potenciál időtartamot nyújtó hatása fordított frekvenciafüggést mutat. Felmerül a kérdés, hogy vajon ez a jelenség csak a III. osztályú antiaritmikumokra jellemző, vagy esetleg más, az AP hosszát eltérő mechanizmussal nyújtó szerek esetén is megfigyelhető a jelenség. Ennek vizsgálatát először kutya kamrai papilláris izmon végeztük, mivel elektrofiziológiai szempontból ez a preparátum mutatja a legnagyobb hasonlóságot a humán kamrai szívizomhoz [39, 42, 104, 105].

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a window Na<sup>+</sup>-áram aktivátor veratrin (1  $\mu$ g/ml), a Ca<sup>2+</sup>-csatorna aktivátor BAY K 8644 (1  $\mu$ M), az I<sub>Kr</sub> gátló dofetilid (1  $\mu$ M) és az I<sub>K1</sub> gátló BaCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) az alkalmazott koncentrációkban kivétel nélkül mind fordított frekvenciafüggő módon növelte az akciós potenciál időtartamát, vagyis hatásuk nagyobb ingerlési ciklushosszak mellett egyre kifejezettebbé vált (**7. ábra**). Ráadásul a megfigyelt fordított frekvenciafüggés éppen az I<sub>Kr</sub>-gátló dofetilid esetében volt a legmérsékeltebb a vizsgált anyagok közül. Ez a legbiztosabban akkor ítélhető meg, amikor az APD nyúlás mértékét százalékban kifejezve ábrázoljuk a ciklushossz függvényében. Ezek az eredmények világosan jelzik, hogy a fordított frekvenciafüggő APD nyújtás nem korlátozódik az I<sub>Kr</sub> gátló szerekre, amint azt korábban az első klinikai megfigyelésekre támaszkodva feltételezték, hanem bármely, az APD megnyújtására képes szer esetén megfigyelhető.



<u>7. ábra</u> Cilushoszzfüggő APD változások 10 µM BaCl<sub>2</sub> (A, n = 11), 1 µM dofetilid (B, n = 13), 1 µg/ml veratrin (C, n = 7) és 1 µM BAY K 8644 (D, n = 6) alkalmazása után kutya papilláris izmon, valamint ezen szerek által létrehozott APD nyújtó hatás mértéke (százalékban kifejezve) a ciklushossz függvényében (E). Az ingerlési ciklushosszt fokozatosan csökkentettük 5 s-ról 0,3 s-ra a szerek alkalmazása előtt, majd 40 perccel azok alkalmazása után.

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

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



<u>8. ábra</u> Az akciós potenciál hosszának (APD<sub>90</sub>) rövidítésére használt szerek (100  $\mu$ M nicorandil (n=7), 10  $\mu$ M lidokain (n=7), 10  $\mu$ M mexiletin (n=4), 2  $\mu$ M tetrodotoxin (n=3) és 15  $\mu$ M lemakalim (n=11)) fordított frekvenciafüggő hatása látható kutya Purkinje-roston (**A**), valamint humán (**B**) és tengerimalac papilláris izmon (**C**).

A Na<sup>+</sup>-csatorna gátló lidokain és az ATP-függő K<sup>+</sup>-csatornát aktiváló nicorandil akciós potenciál időtartamot rövidítő hatása kutya Purkinje-roston ugyancsak fordított frekvenciafüggést mutatott (**8.A ábra**), akárcsak az AP-t nyújtó korábban vizsgált szerek. Rövid ciklushossz (0,3 s) mellett a lidokain AP-t rövidítő hatása

megközelítően a 30 %-a volt a hosszabb ciklushossz (3 s) mellett mért értéknek, hasonlóan nicorandil esetében tapasztaltakhoz. Az utóbbi szerhez hasonló hatásmechanizmusú lemakalim tengerimalac szívizmon ugyancsak kifejezettebb APD csökkenést okozott 3 s, mint 0,3 s ciklushosszokon (**8.C ábra**). Humán szívizom preparátumon is teszteltük az akciós potenciált rövidítő szerek hatását (**8.B ábra**). A Na<sup>+</sup>-csatornákat gátló mexiletin és tetrodotoxin alkalmazása során szintén azt találtuk, hogy az APD csökkenése is fordított frekvenciafüggő módon jött létre. Tehát megállapíthatjuk, hogy nemcsak az APD megnyúlását okozó szerek, hanem az azt rövidítők is fordított frekvenciafüggő módon hatnak, függetlenül a rövidülést létrehozó mechanizmustól.

#### XII. Az áraminjektálás hatásának frekvenciafüggése

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

Kísérleteinket 26 izolált kamrai szívizomsejten végeztük befelé irányuló (inward) és kifelé irányuló (outward) áramimpulzusok alkalmazásával, amelyek rendre nyújtották, illetve rövidítették az akciós potenciál időtartamát. A **9.A** és **9.B ábrákon** bemutatásra kerülő kísérleteinkben -30 pA amplitúdójú befelé irányuló áramimpulzusokat injektáltunk a szívizomsejtekbe azzal a céllal, hogy az AP-t megnyújtsuk, illetve ennek alternatívájaként +60 pA amplitúdójú kifelé irányuló áramimpulzusokat alkalmaztunk az akciós potenciálok rövidítésére. Mindezen

- 34 -

kísérleteket számos ciklushosszon elvégeztük, azt fokozatosan 5 s-ról 0,3 s-ra változtatva. Azt tapasztaltuk, hogy konstans áramimpulzusok alkalmazásakor is megfigyelhető volt az APD változásának fordított frekvenciafüggő jellege. Az alkalmazott befelé vagy kifelé irányuló áramimpulzusok akciós potenciált nyújtó és rövidítő hatása az ingerlési frekvencia csökkenésekor jelentősen növekedett, tehát azokban az esetben találtunk nagyobb változásokat, amikor az akciós potenciálok voltak. Az sui generis hosszabbak így nyert mérési pontok szinte vagy megkülönböztethetetlenek voltak valamely ioncsatorna agonistájával antagonistájával kapott eredményektől.

Az előbbi megállapítást tovább bizonyítja a 9.C és 9.D ábrákon bemutatott kísérletsorozat, ahol a 10 µM BaCl<sub>2</sub> által kiváltott APD megnyúlást egyidejű kifelé irányuló áramimpulzus alkalmazásával ellensúlyoztuk. A BaCl<sub>2</sub> okozta akciós potenciál nyújtás az I<sub>K1</sub> áram gátlásának következménye. Mivel sem az I<sub>K1</sub>, sem annak BaCl<sub>2</sub> általi gátlása nem mutat jelentős frekvenciafüggést, ezért ez a kísérlet is kifejezetten alkalmas arra, hogy megvizsgáljunk egy specifikus csatorna- vagy szerhatástól független fordított frekvenciafüggő mechanizmust. Áraminjektálás nélkül a BaCl<sub>2</sub> nyújtotta az APD-t (**9.C ábra**) és hatása a ciklushossz függvényében egyre kifejezettebbé vált (9.D ábra), tehát a BaCl<sub>2</sub> APD nyújtó hatása tisztán fordított frekvenciafüggő természetű. A BaCl<sub>2</sub> kiváltotta APD nyúlás azonban tökéletesen kioltható minden ciklushosszon egy konstans outward áramimpulzus (39±3 pA) egyidejű alkalmazásával (9.C ábra), vagyis a konstans áraminjektálás kiküszöbölte a BaCl<sub>2</sub> hatásának fordított frekvenciafüggését. Ez azt támasztja alá, hogy a BaCl<sub>2</sub> által okozott áramváltozás minden ciklushosszon azonos mértékű volt, tehát a következményes APD megnyúlásban csupán a kontroll APD értékek különbségeinek lehet szerepe, amely a ciklushosszal együtt folyamatosan változik.

További bizonyítékot szolgáltat a fenti gondolatmenet helyességére a következő kísérlet (**9.E ábra**), melynek során az ingerlés ciklushosszát két ütés között (beat-tobeat) 5 s-ről 0,5 s-ra csökkentettük. A ciklushossz csökkenése által létrehozott APD rövidülést egy befelé irányuló (inward) áram injektálásán keresztül teljes mértékben vissza lehetett fordítani. Csak úgy, mint az ingerlési frekvencia ellentétes irányú változtatása révén (0,5 s-ról 5 s-ra) kialakuló APD nyúlás egy outward (kifelé irányuló) áramimpulzus alkalmazása mellett szintén teljes mértékben elmaradt (**9.F ábra**).



**9. ábra A** Az akciós potenciál teljes ideje alatt alkalmazott konstans inward (-30 pA) és outward (+60 pA) áramimpulzusok hatására létrejött ciklushosszfüggő APD változások láthatók kutyából izolált kamrai szívizomsejteken (n=10). **B** Az áraminjektálás hatására létrejövő APD változások fordított frekvenciafüggő jellegét közvetlenül bemutató diagram. **C** Reprezentatív egymásra vetített akciós potenciál regisztrátumok ugyanarról a szívizomsejtről 1 Hz-es ingerléssel, kontroll körülmények között (1.), 10 μM BaCl<sub>2</sub> jelenlétében (2.), valamint BaCl<sub>2</sub> és outward áram injektálás együttes alkalmazásakor (3.) (n=7). **D** Az előző kísérlet APD értékeinek átlaga az ingerlő ciklushossz függvényében ábrázolva. **E,F** Frekvenciafüggő APD változások ellensúlyozása látható áraminjektálás segítségével. Az ingerlési ciklushossz 5 s-ről 0,5 s-ra való csökkentése által okozott APD rövidülés egy inward áram injektálásával került kompenzálásra (**E**) (n=6), míg az ingerlési frekvencia ellentétes irányú változtatása révén kialakuló APD megnyúlást egy outward áramimpulzussal sikerült ellensúlyozni (**F**) (n=6).

#### XIII. A fordított frekvenciafüggés nem korlátozódik egy adott fajra

Mint ahogy azt a korábbiakban láthattuk, a kutya kamrai papilláris izmon alkalmazott IKr gátló dofetilid, Na<sup>+</sup>-csatorna aktivátor veratrin, a Ca<sup>2+</sup>-csatorna aktivátor BAY K 8644 és az IK1 gátló BaCl2 APD nyújtó hatása egyaránt fordított frekvenciafüggést mutatott. A ciklushossz növekedésével az APD változás mértéke monoton növekedett (10.A ábra). Hasonló módon, kutya Purkinje-rostokon is az APD-t rövidítő Na<sup>+</sup>-csatorna gátló lidokain és az ATP-függő K<sup>+</sup>-csatorna aktivátor nicorandil hatása ugyancsak fordított frekvenciafüggést mutatott, és ez a hatás is a ciklushossz növekedésével egyre kifejezettebbé vált (10.C ábra). Humán multicelluláris kamrai szívizom preparátumon mind az APD megnyúlását kiváltó szerek, pl. az I<sub>Kr</sub>-gátló dofetilid (50 nM, n=5), d-sotalol (30 µM, n=4), E-4031 (1 µM, n=6), az I<sub>k1</sub>-gátló BaCl<sub>2</sub> (10 µM, n=5), mind az APD-t rövidítő szerek, pl. a I<sub>Na</sub>-gátló mexiletin (10 µM, n=4) és tetrodotoxin (2 µM, n=3) hatásai fordított frekvenciafüggést mutattak (10.B ábra), tehát APD-re kifejtett hatásuk nagyobb ciklushosszaknál volt kifejezettebb. Amint az a 10.D ábrán megfigyelhető, tengerimalacból izolált multicelluláris kamrai preparátumokon a d-sotalol az összes alkalmazott ingerlési ciklushossz mellett nyújtotta, míg az ATP-szenzitív K<sup>+</sup>-csatorna aktivátor lemakalim minden frekvencián jelentősen rövidítette az akciós potenciál időtartamát. A változások nagysága most is hosszabb ciklushosszok mellett volt markánsabb mindkét szer esetében. Megállapíthatjuk tehát, hogy a vizsgált szerek hatása fordított frekvenciafüggést mutatott tengerimalac kamrai papilláris izmon is, annak ellenére, hogy a tengerimalac szívizomsejteinek akciós potenciálját létrehozó ionáramok profilja jelentős mértékben különbözik a humán és kutya szíven találhatókétól. Mind az expresszált csatornafehérjék típusa, mind az ioncsatornák kinetikai sajátságai és denzitásuk eltérő tengerimalac szíven az előbb említett fajokétól. Viszont az akciós potenciál időtartama az emberi és a kutya munkaizomsejtekhez hasonlóan reagál a szívfrekvencia változására: az APD nő az ingerlés ciklushosszának növelésével, ahogy ezt a **10.B ábrán** demonstrálom. Fentiek alapján úgy tűnik, hogy a fordított frekvenciafüggés a szívizomsejteknek egy általános tulajdonsága, amely a fent bemutatok fajok esetén speciesfüggést nem mutat.



<u>10. ábra</u> Az APD ciklushosszfüggő változásainak ábrázolása az akciós potenciál során alkalmazott ioncsatorna gátló és aktiváló szerek hatására kutya (**A**), humán (**B**) és tengerimalac kamrai multicelluláris preparátumon (**D**), valamint kutyából izolált Purkinje-roston (**C**). Az **E** panelen az egyes fajokra jellemző kontroll APD értékeket tüntettem fel a ciklushossz függvényében. Lényeges, hogy mindegyik vizsgált preparátumon az APD pozitív korrelációt mutatott a ciklushosszal.

#### XIV. A fordított frekvenciafüggés nem jellemző minden fajra

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



<u>11. ábra</u> A-B 20 μM sotalol (n=5) és 15 μM lemakalim (n=13) frekvenciafüggő hatása az APD-re nyúl papilláris izom preparátumon az abszcisszán jelölt különböző ciklushosszon végzett ingerléssel. Jól látható, hogy ezek az APD változások nem a ciklushossz növekedéssel arányosak. **C** Az alkalmazott szerek által okozott APD változások a megfelelő kiindulási (kontroll) APD értékek függvényében ábrázolva. Látható, hogy a folyamatos vonal a 195 ms értéket elérve visszafordul.

Nyúl papilláris szívizom preparátumon is a már jól ismert hatású d-sotalolt és lemakalimot használtuk az APD növelésére, illetve csökkentésére. A várakozásoknak megfelelően nyúlban is minden vizsgált frekvencián 20 µM sotalol nyújtotta, míg 15 µM lemakalim rövidítette az akciós potenciált (11.A ábra). Lényeges, hogy a szerek alkalmazása után mért APD<sub>90</sub> értékek is a kontrollhoz hasonló mintázatú frekvenciafüggést mutattak. Amikor a kontrollhoz viszonyított APD<sub>90</sub> változásokat ábrázoltuk, azt találtuk, hogy a legnagyobb értékek nem a leghosszabb ciklushossznál, hanem 0,5 és 0,7 s-nál voltak mérhetők. Tehát nyúl papilláris izmon a szer által kiváltott maximális APD változások azon a köztes ciklushosszon jelentek meg, amelynél a kiindulási AP a leghosszabb volt (11.B ábra). Ezt szemlélteti a 11.C ábra is, amelyen a szerek által okozott APD<sub>90</sub> változásokat az adott ciklushosszon mért kiindulási (kontroll) APD<sub>90</sub> értékek függvényében ábrázoltuk. Megfigyelhető, hogy mind a 30 µM d-sotalol, mind a 15 µM lemakalim maximális APD módosító hatását a leghosszabb (195 ms körüli) kiindulási APD<sub>90</sub> érték esetében érte el, alacsonyabb kiindulási APD értékeknél a szer hatására bekövetkező változás nagysága csökken. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a szerhatások nagysága inkább a kiindulási APD-től, mintsem az ingerlési frekvenciától függ.

#### XV. Az APD változás nagysága a kiindulási AP időtartamának függvénye

Ahogy azt az előző kísérletsorozat sejtetni engedi, az APD változás nagysága a kiindulási AP hosszával mutat szoros korrelációt (ellentétben azzal, ahogy azt kezdetben a ciklushosszal kapcsolatban feltételeztük). Amennyiben a 7. ábrán bemutatott kutya papilláris izmon 1 µg/ml veratrin, 1 µM BAY K 8644, 1 µM dofetilid és 10 µM BaCl<sub>2</sub> által kiváltott APD változások eredményeit a kiindulási APD függvényében ábrázoljuk, egy bizonyos APD tartományon belül a nyúl preparátumokon tapasztalt korrelációhoz nagyon hasonló összefüggéseket kapunk, amelyeket a 12.A ábrán mutatok be. Érdekes, hogy a magasabb APD értékeknek megfelelő nagyobb ciklushosszak mellett a görbe egyre meredekebbé válik BAY K 8644 jelenlétében, ami esetleg az intracelluláris kalcium koncentrációjának ilyenkor bekövetkező extrém változásainak lehet a következménye. A humán multicelluláris kamrai preparátumon alkalmazott 50 nM dofetilid, 30 µM sotalol, 1 µM E-4031, 10 µM BaCl<sub>2</sub>, 2 µM tetrodotoxin,10 µM mexiletin, és 2 µM tetrodotoxin APD-t nyújtó ill. rövidítő hatását a szerek alkalmazása előtt felvett, kiindulási APD függvényében ábrázolva látható, hogy a szerek hatására bekövetkező APD

- 40 -

változások emberi szívizomban is arányosak voltak a kiindulási APD értékekkel (**12.B ábra**). Itt is megfigyeltük, hogy az összefüggést leíró görbe hosszabb kontroll APD értékeknél egyre meredekebbé vált, ami legkifejezettebben az 1 µM E-4031 alkalmazásakor jelentkezett. Ez a sajátság a különféle szereknél egymástól eltérő módon jelent meg, egyes szereknél az összefüggés kvázi lineáris volt, míg másoknál inkább parabolikus függvényhez hasonlított. Lényegében hasonló eredményeket kaptunk tengerimalacból izolált multicelluláris kamrai preparátumokon is (**12.C ábra**). Korábban, amikor a szerek által kiváltott változásokat a ciklushossz függvényében ábrázoltuk, rendszerint egy-egy parabolára emlékeztető görbét kaptunk. Ellenben, mikor a kiindulási APD-k függvényében ábrázoltuk az APD változásait tengerimalacban, akkor azok mindkét szer esetében egy-egy egyenesre illeszkedtek, vagyis lineáris összefüggést mutattak. Tehát az APD változása tengerimalac

A **9. ábrán** korábban bemutatott kísérletek során -30 pA amplitúdójú befelé irányuló áramimpulzusokat injektáltunk a szívizomsejtekbe azzal a céllal, hogy az APD-t megnyújtsuk, illetve ennek alternatívájaként +60 pA amplitúdójú kifelé irányuló áramimpulzusokat alkalmaztunk az akciós potenciálok rövidítésére. Ennek során, az APD változások szintén fordított frekvenciafüggő jelleget mutattak. Ezen APD változásokat a kiindulási APD függvényében ábrázolva láthatjuk (**12.D ábra**), hogy az alkalmazott befelé vagy kifelé irányuló áramimpulzusok akciós potenciált nyújtó és rövidítő hatásai ismét csak a kiindulási APD<sub>90</sub> értékekkel mutatnak pozitív korrelációt: az összefüggés gyakorlatilag lineáris volt a vizsgált tartományban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az APD változások nagysága kizárólag a kiindulási APD függvénye, de nem függ sem az áram változásának természetétől (hogy elektromos impulzus vagy szerhatás eredményeképpen jön létre), sem a kapuzási kinetikáktól, sem az érintett ionáram profiljától, sem az alkalmazott szer sajátságaitól.



<u>12. ábra</u> A-C A különböző ioncsatorna gátló és aktiváló szerekkel kiváltott APD<sub>90</sub> változások mértéke a kiindulási (kontroll) akciós potenciálok hosszának (APD<sub>90</sub>) függvényében ábrázolva kutya (A), humán (B) és tengerimalac (C) kamrai multicelluláris preparátumokon. A D panelen hasonló módon ábrázoltuk az áramimpulzusok alkalmazását követően megfigyelt APD változásokat. Ez utóbbi kísérleteket kutya kamrai szívizmából izolált szívizomsejteken végeztük.

#### XVI. A patkányszívizom frekvenciafüggő viselkedése

vizsgált fajok közül embertől filogenetikailag álló А az legtávolabb patkányszívizom akciós potenciálja több tekintetben is eltér a nagyobb testű emlősök akciós potenciáljától. A patkány kamrai szívizom akciós potenciáljának időtartama lényegesen, közel egy nagyságrenddel rövidebb, mint azon emlősöké, amelyek akciós potenciálja plató fázissal rendelkezik [3, 52, 106, 129]. Ennek hátterében az eltérő ioncsatorna-készlet és eltérő intracelluláris kalcium homeosztázis áll. Vizsgálataink szempontjából további lényeges sajátsága a patkány kamrai szívizomsejteknek, hogy akciós potenciáljuk időtartama magasabb szívfrekvenciánál növekszik, amely ellentétes az eddigiekben vizsgált emlősfajokban találtakkal [20, 96]. A fenti különbségeket figyelembe véve kézenfekvőnek tűnt megvizsgálni a patkány szívizom frekvenciafüggő sajátságait. Ráadásul - szemben az eddigi kísérletekkel, ahol a preparátumokat folyamatosan ingereltük konstans ciklushossz mellett - ezekben a kísérletekben APD-restitúciós protokollokat alkalmaztunk. Ez abból állt, hogy steady-state körülmények között (pl. 1 Hz frekvenciával) ingereltük a preparátumot, majd egy-egy korai extraszisztolét váltottunk ki úgy, hogy egyre hosszabb idő (ún. diasztolés intervallum) teljen el az utolsó reguláris AP repolarizációja és az extra AP felszálló szára között. Az extra AP időtartamát a diasztolés intervallum függvényében ábrázolva restitúciós görbéket kapunk, amelyek hűen tükrözik a szerhatások frekvenciafüggő sajátságait nemcsak steady-state körülmények között, hanem egy-egy extraszisztolé során is. Vizsgálatainkat többféle K<sup>+</sup>- és Ca<sup>2+</sup>-csatorna gátló vegyület alkalmazásával végeztük, és megfigyeltük e szerek APD-re gyakorolt frekvenciafüggő hatását.

akciós K<sup>+</sup>-csatorna А patkány kamrai potenciálokat а gátló tetraetilammóniumionnal és 4-aminopyridinnel nyújtottuk (mindkét szert 5 mM koncentrációban alkalmaztuk). Ennek hatására az APD<sub>50</sub> értéke rendre a kontrollban mért 10,8±1,7 ms ill. 9,8±0,9 ms-ról közel kétszeresére 22,8±1,9 és 21,1±1,2 ms-ra növekedett. Az akciós potenciálokat a Ca<sup>2+</sup>-csatornákat gátló nifedipin (2,5 µM) és MnCl<sub>2</sub> (2 mM) segítségével rövidítettük. Az előbbi szer esetén a kezdeti APD<sub>50</sub> megközelítően 79, utóbbi esetén 83 %-ra rövidült. A 4-aminopyridin döntően az Ito kialakításért felelős káliumcsatornákat gátolja, míg a tetraetilammónium többféle káliumáram gátlását is okozza az alkalmazott koncentrációban. A nifedipinről ismert annak use-dependens kölcsönhatása az L-típusú kalciumcsatornákkal, ezzel

- 43 -

szemben a MnCl<sub>2</sub> tisztán feszültségfüggő kölcsönhatásba lép az L-típusú kalciumcsatornákkal [73]. A fenti szerek APD moduláló hatását vizsgáltuk patkányban a diasztolés intervallum függvényében. Az alkalmazott szerkoncentrációk eléggé magasak voltak ahhoz, hogy szignifikáns APD<sub>50</sub> változásokat okozzanak steady-state körülmények között, konstans 1 Hz-es ingerlési frekvenciánál mérve, amint azt a **13. ábra** is mutatja.



<u>13. ábra</u> 5 mM tetraetilammónium (TEA), 5 mM 4-aminopyridine (4-AP), 2,5 μM nifedipin és 2 mM MnCl<sub>2</sub> hatása az akciós potenciál időtartamára (APD<sub>50</sub>) konstans 1 Hz-es ingerlési frekvencián mérve.

A 14. ábra a restitúciós protokollokkal nyert APD<sub>50</sub> értékeket ábrázolja a diasztolés intervallumok függvényében. Amikor a diasztolés időintervallumot 50 msról fokozatosan 4 s-ig növeltük, az APD értéke egyenletesen csökkent patkány kamrai szívizmon. Az APD a 60 percig tartó tetraetilammónium és 4-aminopyridin kezeléseket követően megnövekedett (14.A és 14.B ábrák). A nifedipin és a MnCl<sub>2</sub> a tőle elvárható módon [73] az összes alkalmazott diasztolés intervallum mellett rövidítette az APD-t (14.C és 14.D ábrák). A vizsgált szerek által kiváltott APD nyújtás és rövidítés mértéke rövidebb diasztolés intervallumok mellett nagyobb volt, mint a hosszabbak esetében (14.B és 143.D ábrák), tehát azokban az esetekben, ahol a kezelést megelőző kontroll APD hosszabb volt. Jól látható mindez a 14.E és 14.F ábrákon, ahol a már megszokott módon az APD-t nem a diasztolés intervallum függvényében, hanem a kiinduló (szerhatás előtti) APD függvényében ábrázoltuk. Patkányban tehát az összes szer által kiváltott APD-változás fordítottan volt arányos a diasztolés intervallum nagyságával, ugyanakkor - még e szokatlan kísérleti körülmények között is - sikerült megerősítenünk a korábban talált összefüggést, mely szerint a szerhatások minden körülmények között a kontroll AP időtartamával mutatnak megközelítően egyenes arányosságot.



<u>**14. ábra</u> A-D** 5 mM/l tetraetilammónium (TEA), 5 mM 4-aminopyridine (4-AP), 2.5 μM nifedipin és 2 mM MnCl<sub>2</sub> hatása látható a APD<sub>50</sub> értékére a diasztolés intervallum függvényében patkány multicelluláris kamrai preparátumon. A szerhatások rövidebb diasztolés intervallumok mellett kifejezettebbek voltak. **E-F** A szer által kiváltott APD<sub>50</sub> változások a kiindulási (szer alkalmazása előtti) APD<sub>50</sub> értékének függvényében patkány kamrai papilláris izom preparátumon.</u>

#### XVII. A nettó membránáram és az APD kapcsolata

Amint a módszertani fejezetben ismertetésre került **3. egyenletből**, valamint az alább látható **5. egyenletből** következik, az akciós potenciál hossza a nettó membránáram (I<sub>net</sub>) függvénye. Ezt az összefüggést az APD 50%-ánál mérhető nettó membránáram (amely az **3. egyenlet** alapján az aktuális V<sub>m</sub>-ből számítható) ábrázolásával vizsgáltuk. Ennek során a különböző ciklushosszakon mérhető, befelé

5. egyenlet

$$APD = - \frac{\Delta V_m C_m}{I_{net}}$$

vagy kifelé irányuló áramimpulzusok alkalmazása mellett, ill. gátlószerek jelenlétében vagy azok hiányában rögzített akciós potenciálokat és azok APD értékeit használtunk fel (**15. ábra**). Eredményeink szerint az I<sub>net</sub> praktikusan minden körülmények között fordított arányosságot mutatott az APD-vel, azaz az I<sub>net</sub> értékek egyazon görbére estek tekintet nélkül arra, hogy az APD változást ioncsatorna gátló vagy aktivátor hatású szer, áraminjektálás (akár kifelé, akár befelé irányuló), vagy esetleg a ciklushossz változása hozta létre.

Az akciós potenciál időtartamának felénél mért nettó membránáram (I<sub>net</sub>) és az APD<sub>90</sub> közötti összefüggést különböző kísérleti protokollok alkalmazása során vizsgáltuk. Az APD változtatásának hatását az előző kísérletek során ismertetett, különböző ionáramokat gátló szerek alkalmazásával teszteltük humán papilláris izmon és kutya kamrai szívizomsejteken. Ez utóbbi preparátumon a farmakológiai befolyásolás mellett (10 μM BaCl<sub>2</sub>) áramimpulzusok alkalmazásával (-30 és +60 pA) és az ingerlés ciklushosszának változtatásával (0,4 és 5 s között) is megvizsgáltuk az I<sub>net</sub> – APD<sub>90</sub> összefüggést (a **9.A-F ábrákon** bemutatott kísérletek alapján). Az I<sub>net</sub> és az APD<sub>90</sub> közötti összefüggést leíró görbe alakja valamennyi protokoll alkalmazásakor azonos volt, ami azt jelenti, hogy az adott APD<sub>90</sub> értéknél mérhető I<sub>net</sub> független az APD befolyásolásának módjától. Az I<sub>net</sub> értéke kizárólag a kiindulási APD nagyságától függ, amint azt a fordított arányosságot szimbolizáló hyperbolák is bizonyítják.



<u>15. ábra</u> Az akciós potenciál időtartama (APD<sub>90</sub>) és a nettó membránáram (I<sub>net</sub>) nagysága között látható reciprok összefüggés. Az I<sub>net</sub>-t a membránpotenciálváltozás meredekségéből (dv/dt) számoltuk (**A**). **B** Humán papilláris izmon 0,3 és 5 s közötti ciklushosszakon történő ingerléssel végzett kísérletek eredményei kölönféle farmakonok jelenlétében. **C** Az I<sub>net</sub> értékek az APD<sub>90</sub> függvényében kontroll körülmények között és 10 µM BaCl<sub>2</sub> jelenlétében kutya kamrai sejteken. **D** I<sub>net</sub> – APD<sub>90</sub> összefüggés kontroll körülmények között, valamint kifelé és befelé irányuló áramimpulzusok jelenlétében kutya kamrai sejteken. **E** I<sub>net</sub> – APD<sub>90</sub> kapcsolat kutya kamrai sejteken különböző ciklushosszokon.

#### XVIII. Számítógépes modellezés



<u>**16.** ábra</u> **A** A repolarizáció folyamatának számítógépes szimulációja konstans inward áram (-0,066pA/pF) alkalmazása után két ingerlési ciklushosszon. **B** A repolarizáció időtartamának összesített változása ( $\Delta$ cum), áraminjektálás hatására az idő függvényében. **C** A repolarizációs idő pillanatnyi (pontról pontra történő) változásai ( $\Delta$ inst) áraminjektálás hatására az idő függvényében. A pillanatnyi változások egy becslést adnak arra, hogy az I<sub>m</sub> APD-re kifejtett hatása hogyan változhat a repolarizáció alatt való megjelenésének idejétől függően (pl. 5 s-os ciklushossznál azonos nagyságú I<sub>m</sub> az APD-t 0,5 vagy 0,2 ms-mal nyújthatja meg, aszerint, hogy az APD<sub>90</sub> 30 vagy 60%-ánál kerül injektálásra). A **B** és **C** ábrarészen az idő az APD<sub>90</sub>-re van normalizálva (pl. 0,2 a 90%-os repolarizációhoz szükséges idő 20%-ának felel meg).

Az elvégzett számítógépes szimulációk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy az I<sub>net</sub> akciós potenciál hosszára kifejtett hatását mennyiben befolyásolja annak repolarizáció alatti időfüggése. Amint azt a **16.A ábra** mutatja, amikor -0,066 pA/pF befelé irányuló áramot adtunk hozzá az I<sub>net</sub>-hez, az APD<sub>90</sub> 5 s-os ciklushossznál

jobban megnyúlt (35,4 ms-mal), mint 0,3 s-os ciklushossznál (17,4 ms-mal), amely az APD változás fordított frekvenciafüggését tükrözi. Ez jó egyezést mutat azokkal a **12.D ábrán** bemutatott kísérleti eredményeinkkel, ahol az APD változások nagysága és fordított frekvenciafüggése szintén kisebb volt kifelé irányuló áram injektálásakor (amikor az APD rövidült), mint amit a befelé irányuló áram injektálásakor tapasztaltunk (amikor az APD növekedett). Itt a -30 pA áram beinjektálása okozott akkora APD megnyúlást, mint amekkora APD rövidülést +60 pA áram alkalmazásával értünk el, vagyis a befelé és kifelé irányuló áram injektálása

A legtöbb ioncsatornán átfolyó áram időfüggő kinetikát mutat, vagyis egy rá jellemző időprofilja van a repolarizáció alatt. A fordított frekvenciafüggés mechanizmusa előre vetíti, hogy az ilyen jellemvonás fontos lehet egy áram megváltoztatására adott APD válasz meghatározásakor. Ezt illusztrálja a 16.C ábra, amely az áraminjektálás által kiváltott egymást követő Vm értékek közötti késést ábrázolja a repolarizációnak abban az időpillanatában, amikor a hozzáadott áram folyik. Ez az analízis azt jósolja, hogy az APD leginkább azokra az Im változásokra érzékeny, amelyek a lassúbb repolarizációs fázisokra vannak hatással (pl. nagyobb a változás az APD<sub>90</sub> 20%-ának, mint 80%-ának értékeit összehasonlítva). Továbbá azt mutatja, hogy a repolarizáció spike-and-dome fázisa, annak nem-monoton lefolyása miatt nagyon érzékeny az Im változásokra. Egy befelé irányuló Im változás (például -0,066 pA/pF), ha erre a fázisra korlátozódik, paradox módon rövidítheti az APD-t, amint azt a 16. ábra B és C részein levő regisztrátumok negatív tartományba eső része (a szaggatott vonal alatti terület) is mutatja. Az ilyen negatív hányad hosszabb ciklushossznál nagyobbá válik a spike és a dóm közötti mélyebb notch miatt, azonban a spike-and-dome fázis időprofilja a ciklushossztól függetlenül is változhat (pl. a kamrafal heterogenitásának figyelembevételével), ennélfogva ennek a tulajdonságnak az általánosítása, mint az intrinzik fordított frekvenciafüggés sajátsága, nem helytálló.

#### Megbeszélés

A fordított frekvenciafüggés magyarázatára korábban kifejlesztett elméletek nagy száma világosan jelezte, hogy a jelenség pontos mechanizmusa tisztázásra vár. A korábbi magyarázatai frekvenciafüggés az fordított ioncsatorna kinetikai paramétereinek változásaira vagy a szer-csatorna kölcsönhatás tulajdonságaira alapultak [54, 45, 126]. Azonban a szer-csatorna kölcsönhatás a legtöbb esetben direkt módon frekvenciafüggő, ezáltal alkalmatlan arra, hogy a fordított frekvenciafüggést magyarázza. Például az IKr és IKs gátlók által okozott APD megnyúlás fordított frekvenciafüggése közötti jelentős különbség a tengerimalac szívizomsejtek egyik sajátsága [17, 54]. Kezdetben ezt a tulajdonságot e két áram különböző frekvenciafüggésének tulajdonították [54]. Ezekben a kísérletekben konvencionális voltage-clamp megközelítést használtak, később mások akciós potenciál-clamp alkalmazásával kimutatták, hogy a tengerimalac I<sub>Kr</sub> és I<sub>Ks</sub> konduktanciák egyaránt növekedtek gyorsabb ingerlési frekvencián, és hogy hozzájárulásuk aránya a teljes áramhoz nem függ lényegesen az ingerlési frekvenciától [84]. Ezen megfigyelések szerint tehát az Ikr és az Iks frekvenciafüggése nem alkalmas az APD változások fordított frekvenciafüggésének magyarázatára. Kutya kamrai szívizomsejteken az  $I_{Kr}$  és az  $I_{K1}$  járul hozzá leginkább a repolarizációhoz. Ezen ionáramok nem mutatnak frekvenciafüggést, ugyanakkor gátlásuk az APD-t egyértelműen fordított frekvenciafüggő módon befolyásolja [53]. A perzisztens Na<sup>+</sup>-áram intrinzik frekvenciafüggése viszonylag kicsi [14, 137], ráadásul a lidokain [19, 40] és a veratrin [13, 59, 136] erősebben kötődik a Na<sup>+</sup>-csatornákhoz magasabb, mint alacsonyabb szívfrekvenciák mellett. Ezzel együtt mindkét szer hatása jelentős fordított frekvenciafüggést mutatott. Így annak ellenére, hogy az APD változások fordított frekvenciafüggéséről több különböző teória született, a jelenséget egyik sem képes maradéktalanul megmagyarázni.

Tanulmányunkban olyan elmélet kidolgozását tűztük ki célul, mely minden körülmények között magyarázatot ad a jelenségre. Vizsgálataink során ezért különböző, a szív ionáramait serkentő vagy gátló szereket alkalmazva megvizsgáltuk számos emlősfajon, többek között humán, kutya, nyúl, tengerimalac és patkány szívizom szövetein, az APD változások frekvenciafüggő sajátságait. Vizsgáltuk továbbá a modulált áram tulajdonságaitól független módon a transzmembrán

- 50 -

áraminjektálás hatását izolált szívizomsejteken, így lehetőség nyílt a fordított frekvenciafüggés tanulmányozására a kinetikai paraméterek változásaitól mentes környezetben. Az emberéhez elektrofiziológiai szempontból a legnagyobb hasonlóságot a kutya miokardium mutatja, ezért számos APD-t nyújtó szer frekvenciafüggő hatását először kutya multicelluláris kamrai preparátumokon vizsgáltuk meg. Az I<sub>Kr</sub> gátló dofetilid [54], az I<sub>K1</sub> gátló BaCl<sub>2</sub> [95], az I<sub>CaL</sub> aktiváló BAY K 8644 [68] és az I<sub>Na</sub> aktiváló veratrin [13, 59, 136] tisztán fordított frekvenciafüggő hatását mutatott, vagyis az APD nyújtás monoton növekedett a stimuláló ciklushossz emelésével, függetlenül az alkalmazott szertől, de az aktivált, illetve gátolt ioncsatornától is. Ez a fordított frekvenciafüggő APD megnyúlás egyaránt kimutatható volt, ha az APD változását abszolút értékben (ms-ban) vagy százalékos formában fejeztük ki. Ezek az eredmények világosan jelzik, hogy a fordított frekvenciafüggő APD nyújtás nem korlátozódik sem az I<sub>Kr</sub> gátlására, sem a III. osztályú antiaritmiás szerekre, hanem bármely, az APD megnyújtására alkalmas szer esetén megfigyelhető.

Kutya Purkinje-rostokon eltérő támadáspontú, akciós potenciált rövidítő szerek hatását vizsgáltuk. A lidokainról ismert, hogy csökkenti a window Na<sup>+</sup>-áramot [19, 40], míg a nicorandilt gyakorta használják az ATP-érzékeny K<sup>+</sup>-csatornák megnyitására [49]. Ezeknek a szereknek nemcsak az APD-re kifejtett hatása volt hasonló, hanem frekvenciafüggésük is nagyrészt identikusnak adódott: mindkét szer erősebben rövidítette az APD-t hosszabb ciklushosszakon, mint rövidebbeken. Más szóval nemcsak az APD megnyújtása, hanem a rövidítése is fordított frekvenciafüggő sajátságokat mutat.

Hasonló eredményeket találtunk más emlősszív preparátumokon is [17], többek között tengerimalac és egészséges humán szívből származó papilláris izmokon. Az összes APD nyújtásra (az  $I_{Kr}$  gátló dofetilid, sotalol, E-4031 és az  $I_{K1}$  gátló BaCl<sub>2</sub>) vagy rövidítésre (az  $I_{Na}$  gátló mexiletin és tetrodotoxin) alkalmazott szer megegyezett a fordított frekvenciafüggő tulajdonságban. Ezen a ponton arra következtethetünk, hogy a szívre ható szerek fordított frekvenciafüggő természete a emlős szívizom szövetnek egy általános, intrinzik tulajdonsága, függetlenül a vizsgált fajtól vagy preparátumtól, a modifikált ioncsatornától vagy a következményes APD változás irányától – feltéve, hogy a preparátumok direkt APD – ciklushossz összefüggést mutatnak a teljes frekvenciatartományban.

Vizsgálatainkat nyúl szívizomszövetén is elvégeztük, mivel ezen fajban az APD nem mutat monoton ciklushossz függést, maximumát 0,5 és 0,7 s között egy közbeeső értéknél éri el. Ez jelentősen eltér attól, amit kutyaszívben vagy emberi szívben találunk, egyúttal egyedülálló lehetőséget nyújtott arra, hogy elkülönítsük a szer-indukálta APD változások frekvenciafüggését a kontroll APD időtartamától való függéstől. A várakozásoknak megfelelően a sotalol minden frekvencián nyújtotta, míg a lemakalim rövidítette az APD-t nyúl papilláris izmon, de a kutya, humán és tengerimalac preparátumokon kapott eredményekkel szemben, ahol az APD megnyúlása és rövidülése monoton fordított frekvenciafüggést mutatott, nyúl preparátumokon a szer által kiváltott maximális APD változások azon a 0,5 és 0,7 s közötti köztes ciklushossz tartományban jöttek létre, amelynél a kiindulási APD is a leghosszabb volt. Ezen eredmény szerint a szerhatás nagysága úgy tűnik, hogy inkább a kiindulási akciós potenciál időtartamától függ, mint az ingerlés frekvenciájától, ami azt sugallja, hogy a hosszabb akciós potenciálok az aktuális ingerlési frekvenciától függetlenül érzékenyebbek a modulációra, mint a rövidebbek. Fenti hipotézisünket leghatékonyabban patkányból származó kamrai preparátumon tesztelhettük, mert (1) ioncsatornáinak a készlete feltűnően különbözik más fajokétól, (2) az APD-je egy nagyságrenddel rövidebb, mint ami a platót kialakító nagyobb emlősökre jellemző [3, 52, 106, 129], és (3) ami a legfontosabb – sok más fajtól eltérően – patkányban az APD magasabb szívfrekvenciánál nő [20, 96]. A K<sup>+</sup>csatorna gátló 4-aminopyridin és tetraetilammónium APD nyújtó hatását, valamint a Ca<sup>2+</sup>-csatorna gátló nifedipin és MnCl<sub>2</sub> APD rövidítő hatását a diasztolés intervallum függvényében vizsgálva megállapítottuk, hogy valamennyi fent említett szer indukálta APD változás patkányban is egyenes arányban állt a kiindulási APD hosszával. Ez azt jelzi, hogy bár az APD ciklushossztól vagy diasztolés intervallumtól való függése és annak szer általi befolyásolása között szoros kapcsolat áll fenn, a ciklushossz és a diasztolés intervallum a kiindulási (szer előtti) APD modulátoraként szerepel, míg a kiindulási APD közvetlenül határozza meg a szer okozta változások nagyságát. Ezt az elképzelést erősíti meg, hogy az alkalmazott ingerlő ciklushossztól vagy diasztolés intervallumtól függetlenül a szer által kiváltott változások minden eddig vizsgált preparátumon (kutya, humán, tengerimalac, nyúl és patkány) arányosak voltak a kiindulási (szer előtti) APD értékével.

Amikor egy ioncsatorna aktivátor vagy gátló vegyület hatását vizsgáljuk az akciós potenciál konfigurációjára, erre a hatásra tekinthetünk úgy is, hogy egy befelé vagy

kifelé irányuló áramot adunk hozzá az akciós potenciál platója alatt folyó nettó membránáramhoz vagy veszünk el abból. Ezt a kérdést enzimatikusan izolált kutya kamrai szívizomsejteken végzett kísérletek során vizsgáltuk részletesen. Ezekben a kísérletekben -30 pA amplitúdójú befelé irányuló áramimpulzusokat injektáltunk a szívizomsejtekbe azzal a céllal, hogy az APD-t megnyújtsuk. Vagy ennek alternatívájaként +60 pA amplitúdójú kifelé irányuló áramimpulzusokat alkalmaztunk az akciós potenciálok rövidítésére. A kísérleteket számos ciklushosszon elvégezve, azt találtuk, hogy az áraminjektálás APD-re kifejtett hatása fordított frekvenciafüggő volt. Azt is megállapítottuk, hogy a befelé vagy kifelé irányuló áramimpulzusok által kiváltott APD változások egyenesen arányosak voltak az áraminjektálás előtt mért kiindulási APD értékekkel. Az így nyert pontok az Inet – APD<sub>90</sub> diagrammon szinte megkülönböztethetetlenek voltak egy ioncsatorna agonistával vagy antagonistával kapott eredményektől, ami arra utal, hogy a kiváltott APD változások nagysága csak a kiindulási APD hosszától függ [10, 11], de független az áramváltozás okától vagy természetétől (pl. a kapuzási kinetikáktól, az érintett ionáram egyéb tulajdonságaitól) vagy az alkalmazott szer sajátságaitól. További bizonyíték ebben a vonatkozásban, hogy a BaCl<sub>2</sub> által létrehozott APD-nyúlás minden ciklushossz mellett teljesen kivédhető volt valamely egyidejűleg alkalmazott konstans nagyságú outward áram injektálásával. Mint ismert, a BaCl<sub>2</sub>-dal okozott APD megnyúlás az I<sub>K1</sub> gátlás következménye. Mivel sem az I<sub>K1</sub>, sem annak BaCl<sub>2</sub> általi gátlása nem rendelkezik érdemben frekvenciafüggéssel, ezért az általa eredményezett APD megnyúlásra is csupán a kiindulási APD értéke lehet befolyással, amelyet viszont az ingerlési ciklushossz határoz meg. Hasonlóan magyarázható, hogy a ciklushossz hirtelen változtatásával kiváltott APD változásokat teljes mértékben vissza tudtuk fordítani egy konstans nagyságú, de ellentétes hatású áramimpulzus injektálásával.

Ha bármely APD változás nagysága valóban arányos a kiindulási APD értékével, akkor az APD változás nagyságának összefüggésben kell lennie az akciós potenciál platója alatt folyó nettó membránáram változásával. Az I<sub>net</sub>-et az akciós potenciál időtartamának felénél a plató meredekségéből határoztuk meg, a következő egyszerű egyenlet felhasználásával: I<sub>net</sub> = -C<sub>m</sub>\*dV/dt, ahol a C<sub>m</sub> a sejtmembrán kapacitása és a dV/dt a membránpotenciál változásának pillanatnyi sebessége (idő szerinti első deriváltja). Amennyiben az I<sub>net</sub>-et pA/pF-ban fejezzük ki, annak nagysága az akciós potenciál során bármely pillanatban megegyezik a membránpotenciál-változás negatív meredekségével. Feltételezésünk, hogy az APD változása az I<sub>net</sub>

- 53 -

változásának az érintett specifikus ionáram jellegétől függetlenül volna következménye, megerősítést nyert azáltal, hogy az l<sub>net</sub> a kiindulási APD függvényében állandónak bizonyult a rendkívül változatos kísérleti körülmények között is: különféle ingerlő ciklushosszoknál, ioncsatorna gátlók és aktiválók alkalmazása előtt és után, befelé vagy kifelé irányuló áramimpulzusok jelenlétében, ill. azok hiányában. Az I<sub>net</sub> - APD összefüggés egy hiperbolikus függvényt követ, amely alakját az alkalmazott kísérleti körülményektől (szerhatás vagy áram injektálás) és preparátumtól (humán papilláris izom, kutya Purkinje rost, izolált kutya szívizomsejt, stb.) függetlenül megőrzi.

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

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

Mivel a szerek által kiváltott APD változások minden vizsgált fajban jól korreláltak a kiindulási APD-vel tekintet nélkül a megváltoztatott ionáramra vagy a használt szerre, az ember arra a következtetésre juthat, hogy a fordított frekvenciafüggés kizárólag az Inet és az APD között meglévő fordított arányosság következménye. Ez egybecseng azzal, hogy az APD szerek általi befolyásolása kifejezettebb olyan körülmények között, amikor az akciós potenciál ab ovo hosszabb, ezzel szemben az ingerlési frekvencia csak egy a kiindulási APD-t szabályozó tényezők közül. Annak ellenére, hogy az APD és az Inet közötti matematikai összefüggés látszólag tökéletesen megmagyarázza a fordított frekvenciafüggő APD változásokat, számos megfigyelés utal arra, hogy további mechanizmusok is befolyással lehetnek a fordított frekvenciafüggő APD változásokra. Például, ha csak egyetlen kizárólagos mechanizmus magyarázná a fordított frekvenciafüggést, akkor azt várnánk, hogy a szer által okozott APD változások és a kiindulási APD közötti kapcsolat minden esetben azonos legyen. Jóllehet ez az összefüggés bizonyos szereknél és bizonyos APD tartományokban majdnem teljesen lineárisnak tűnt, nem mindenütt volt ez a helyzet (lásd pl. a BAY K 8644 hatását magasabb ciklushosszaknál). Mindez arra utal, hogy az APD változások függése a kiindulási APD-től mégis tartalmazhat olyan komponenseket, amelyek nem magyarázhatók egyetlen mechanizmussal. Továbbá egy, a kiindulási APD-től való intrinzik függés fennállása nem zárja ki más, szintén nyíltan frekvenciafüggő mechanizmusok (pl. a szer-ioncsatorna kapcsolatok vagy ionáramok kinetikájának frekvenciafüggése) hozzájárulását a frekvenciafüggő APD változások nagyságának meghatározásához. A fordított frekvenciafüggés nagysága valóban eltért az egyes vizsgált szerek esetében.

A jelen eredmények legfontosabb üzenete a gyógyszerfejlesztő műhelyek felé egyértelműen az, hogy újabb szelektív I<sub>Kr</sub> gátlók kifejlesztésével nem csökkenthető az APD fordított frekvenciafüggése, ezért a jól ismert proaritmiás kockázatuk sem szüntethető meg, mivel mindez az emberi szívizom elektromos tulajdonságaiból egyenesen következik. Ígéretesebb lehet olyan kombinált hatásmechanizmusú antiaritmikumok fejlesztése, melyek akár egy molekulán belül, akár több ismert molekula kombinációjaként többféle támadásponttal rendelkeznek és így a szokásosnál kisebb fordított frekvenciafüggést produkálnak. Ilyen molekulák már vannak: előbbire legjobb példa az amiodaron, utóbbi kombinációra a mexiletin + d-sotalol együttes alkalmazása [18, 57, 71, 113, 125].

### Összefoglalás

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

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

#### Summary

Since the SWORD (Survival With ORal D-sotalol) trial is known that class 3 antiarrhythmic agents exhibit reverse rate dependent lengthening of the action potential duration (APD) and refractery period. This indicates that changes in APD are greater at slower than at faster heart rates. Therefore in case of tachycardia when cycle lengths are pathological short and antiarrhythmic effect is most needed these agents have no proper effects on the lengthening of the repolarization and effective refractery period. However, in case of bradycardia when cycle lengths are long, the extremly prolonged repolarization can lead to formation of early afterdepolarization and life-threatening ventricular arrhythmias (tachycardia). The exact electrophysiological mechanism responsible for reverse rate dependency of class 3 antiarrhythmic drugs has not been clarified. For that reason, the detailed description of the underlying mechanism is really important, because probably it should provide a chance to develop more effective antiarrhythmic drugs.

Our experiments confirmed that reverse rate dependency is not only the property of class 3 antiarrhythmic drugs, but almost all drugs modulating action potentail show this feature. Reverse rate dependency can be considered as a general intrinsic property, which is well correlated with baseline APD and APD changes and independent of the species or preparation used, or modified ion channels. Thus we can conclude that reverse rate dependency may simply be a consequence of the inverse relationship existing between APD and net membrane current flowing during the plateau phase. The main conclusion of the present study is that the further development of selective  $I_{Kr}$  blocker drugs as potential class 3 antiarrhythmic agents are not likely to be successful. A more promising approach in the therapy of arrhythmias might be to combine distinct molecules or applying single drugs having intrinsically combined modes of action thus decrease the proarrhythmic risk of classic antiarrhythmic drugs.

### Irodalomjegyzék

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA (1999) MiRP1 forms I<sub>Kr</sub> potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97(2): 175–187
- Abernethy DR, Soldatov NM (2002) Structure-functional diversity of human L-type Ca2+ channel: perspectives for new pharmacological targets. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002, 300(3):724-8.
- 3. Apkon M, Nerbonne JM (1991) Characterization of two distinct depolarization-activated K+ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 97: 973-1011
- 4. Ashcroft FM (2000) Ion Channels and Disease. Academic Press London
- Baláti B, Varró A, Papp JG (1998) Comparison of the cellular electrophysiological characteristics of canine left ventricular epicardium, M cells, endocardium and Purkinje fibres. *Acta Physiol Scand* 164: 181-190
- 6. Balser JR, Bennett PB, Roden DM (1990) Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Gating kinetics of the delayed rectifier. *J Gen Physiol* 96(4): 835–863
- Bányász T, Horváth B, Virág L, Bárándi L, Szentandrássy N, Harmati G, Magyar J, Marangoni S, Zaza A, Varró A, Nánási PP (2009) Reverse rate dependency is an intrinsic property of canine cardiac preparations. *Cardiovasc Res* 84: 237-244
- Bányász T, Magyar J, Szentandrássy N, Horváth B, Birinyi P, Szentmiklósi J, Nánási PP. (2007) Action potential clamp fingerprints of K+ currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiol.(Oxf.)* 190, 189-98.
- 9. Bányász T, Magyar J, Szigligeti P, Pankucsi C, Varró A, Nánási PP (1997) Frequencydependent characteristics of human cardiac muscle. *Exp Clin Cardiol* 2: 205-209
- Bárándi L, Harmati G, Horváth B, Szentandrássy N, Bányász T, Magyar J, Varró A, Nánási PP (2010) Drug-induced changes in action potential duration are proportional to action potential duration in rat ventricular myocardium. *Gen Physiol Biophys* 29: 308-312
- Bárándi L, Virág L, Jost N, Horváth Z, Koncz I, Papp R, Harmati G, Horváth B, Szentandrássy N, Bányász T, Magyar J, Zaza A, Varró A, Nánási PP (2010) Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations. *Basic Res Cardiol* 105: 315-323
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1996) K<sub>V</sub>LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I<sub>Ks</sub> cardiac potassium current. *Nature* 384(6604): 78–80
- 13. Barnes S, Hille B (1988) Veratridine modifies open sodium channels. *J Gen Physiol* 91: 421-443
- Berecki G, Zegers JG, Bhuiyan ZA, Verkerk AO, Wilders R, van Ginneken AC (2006). Long-QT syndrome-related sodium channel mutations probed by the dynamic action potential clamp technique. *J Physiol*; 570:237-250.

- Berger F, Borchard U, Hafner D (1989) Effects of (+)- and (±)-sotalol on repolarizing outward currents and pacemaker current in sheep cardiac Purkinje fibres. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 696-704
- 16. Bers DM.(2002) Cardiac excitation-contraction coupling Nature. 10; 415 (6868): 198-205.
- Bosch RF, Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR, Nattel S. (1998) Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*; 38:441-450.
- Bril A, Forest MC, Cheval B, Faivre JF (1998) Combined potassium and calcium channel antagonistic activities as a basis for neutral frequency dependent increase in action potential duration: comparison between BRL-32872 and azimilide. *Cardiovasc Res* 37: 130-140
- Campbell TJ (1983) Kinetics of onset of rate-dependent effects of Class I antiarrhythmic drugs are important in determining their effects on refractoriness in guinea-pig ventricle, and provide a theoretical basis for their subclassification. *Cardiovasc Res* 17: 344-352
- 20. Carmeliet E (1977) Repolarization and frequency in cardiac cells. J Physiol (Paris) 73: 903-923
- 21. Carmeliet E (1999) Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev* 79(3): 917–1017
- 22. Carmeliet E, Mubagwa K (1998) Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanisms of action. *Prog Biophys Mol Biol* 70(1): 1–72
- 23. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.*; 57(4):411-25.
- 24. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* ;57(4):397-409.
- Chiang CE, Roden DM (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. J Am Coll Cardiol 36(1): 1–12
- 26. Chinn K (1993) Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 264(2): 553–560
- 27. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80(5): 795–803
- 28. Deal KK, England SK, Tamkun MM (1996) Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol Rev* 76(1): 49–67
- 29. Doerr T, Denger R, Doerr A, Trautwein W. (1990) Ionic currents contributing to the action potential in single ventricular myocytes of the guinea pig studied with action potential clamp. *Pflugers Arch.*; 416(3):230-7.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280(5360): 69–77

- 31. Drici MD, Barhanin J (2000) Cardiac K<sup>+</sup> channels and drugacquired long QT syndrome. *Therapie* 55: 185–193
- Duggal P, Vesely MR, Wattanasirichaigoon D, Villafane J, Kaushik V, Beggs AH (1998) Mutation of the gene for IsK associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano–Ward forms of Long-QT syndrome. *Circulation* 97(2): 142–146
- 33. Elharrar V, Atarashi H, Surawicz B (1984) Cycle length-dependent action potential duration in canine cardiac Purkinje fibers. *Am J Physiol* 247: H936-H945
- 34. El-Sherif N, Turitto G (1999) The long QT syndrome and torsade de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol* 22: 91–110
- 35. Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Eckardt L, Mönnig G, Milberg P, Breithardt G, Haverkamp W (2003) Prolonged action potential durations, increased dispersion of repolarization, and polymorphic ventricular tachycardia in a mouse model of proarrhythmia. *Basic Res Cardiol* 98: 25-32
- 36. Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM.(1994) Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K+ channels. *Science*.;266(5187):1068-72.
- 37. Gintant GA (1996) Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle.
   Does I<sub>Ks</sub> play a role in the reverse rate dependence pf class III agents? *Circ Res* 78: 26–37
- 38. Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2(3): 175–184
- Gralinski MR (2003) The dog's role in the preclinical assessment of QT interval prolongation. *Toxicol Pathol* 31 Suppl: 11–16
- 40. Grant AO, Dietz MA, Gilliam FR, Starmer CF (1989) Blockade of cardiac sodium channels by lidocaine. *Circ Res* 65: 1247-1262
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.*, 57(4):473-508.
- 42. Hamlin RL (2007) Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther* 113(2): 276–295
- 43. Hodgkin AL, Huxley AF, Katy B. (1952) Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol.*;116(4):424-48.
- 44. Hondeghem LM, Katzung BG (1977) Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 472: 373-398
- Hondeghem LM, Katzung BG (1984) Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 24: 387-423
- 46. Hondeghem LM, Snyders DJ (1990) Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation* 81: 686-690

- 47. Horváth B, Magyar J, Szentandrássy N, Birinyi P, Nánási PP, Bányász T (2006) Contribution of IKs to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflugers Arch* 452: 698-706
- 48. Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V. (1992) Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.*, 11(3):885-90
- Imanishi S, Arita M, Kiyosue T, Aomine M (1983) Effects of SG-75 (nicorandil) on electrical activity of canine cardiac Purkinje fibers: possible increase of potassium conductance. J Pharmacol Exp Ther 225: 198-205
- 50. January CT, Riddle JM, Salata JJ. (1988) A model for early afterdepolarizations: induction with The Ca<sup>++</sup> channel agonist Bay K 8644. *Circ Res*; 62:563-571.
- January CT, Riddle JM. (1989) Early afterdepolarizations: Mechanism of induction and block. A role for L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Circ Res*; 64:977-990.
- 52. Josephson IR, Sanches-Chapula J, Brown AM (1984) Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 54: 157-162
- 53. Jost N, Acsai K, Horváth B, Bányász T, Bitay M, Bogáts G, Nánási PP (2009) Contribution of I<sub>Kr</sub> and I<sub>K1</sub> to ventricular repolarization in canine and human myocytes. Is there any influence of action potential duration? *Basic Res Cardiol* 104: 33-41
- 54. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC (1993) Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ Res* 72: 75-83
- 55. Kenyon JL, Gibbons WR. (1979) 4-aminopyridine and the early outward current in sheep Purkinje fibers. *J Gen Physiol*; 73:139-157.
- 56. Kurata HT, Fedida D (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 92(2): 185–208
- 57. Lathrop DA, Varró A (1990) The combined electrophysiological effects of lignocaine and sotalol in canine isolated cardiac Purkinje fibres are rate-dependent. *Br J Pharmacol* 99: 124-130
- 58. Lazzara R. (1996) Mechanisms and management of congenital and acquired long QT syndromes. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 89(Spec No 1): p. 51-5.
- 59. Leibowitz MD, Sutro JB, Hille B (1986) Voltage-dependent gating of veratridine-modified Na channels. *J Gen Physiol* 87: 25-46
- 60. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M (1998) Transmural heterogeneity of action potentials and Ito1 in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol* 275(2 Pt 2): H369–377
- 61. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S (1996) Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 78: 689–696
- 62. Liu DW, Gintant GA, Antzelevitch C (1993) Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res* 72(3): 671–687

- 63. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling.*Science* 309(5736): 903–908.
- 64. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372(6504): 366–369
- 65. Lu Z, Kamiya K, Opthof T, Yasui K, Kodama I (2001) Density and kinetics of I<sub>Kr</sub> and I<sub>Ks</sub> in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of I<sub>Ks</sub> blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit: implications for arrhythmogenesis in humans. *Circulation* 104: 596–951
- 66. Magyar J, Bányász T, Szigligeti P, Körtvély Á, Jednákovits A, Nánási PP (2000) Electrophysiological effects of bimoclomol in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361: 303-310
- 67. Maltsev VA, Undrovinas A. (2008) Late sodium current in failing heart: friend or foe? *Prog Biophys Mol Biol.*;96(1-3):421-51.
- 68. Markwardt F, Nilius B (1988) Modulation of calcium channel currents in guinea-pig single ventricular heart cells by the dihydropyridine Bay K 8644. *J Physiol (London)* 399: 559–575
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* 325(7000): 156–159
- 70. Matsuura H, Ehara T, Imoto Y (1987) An analysis of the delayed outward current in single ventricular cells of the guinea-pig. *Pflügers Arch* 410(6): 596–603
- 71. Mátyus P, Varga I, Rettegi T, Simay A, Kállay N, Károlyházy L, Kocsis A, Varró A, Pénzes I, Papp JG (2004) Novel antiarrhythmic compounds with combined class IB and class III mode of action. *Curr Med Chem* 11: 61-69
- 72. Mazhari R, Greenstein JL, Winslow RL, Marbán E, Nuss HB (2001) Molecular interactions between two long-QT syndrome gene products, HERG and KCNE2, rationalized by in vitro and in silico analysis. *Circ Res* 89(1): 33–38
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA, Twist VW (1984) Strontium, nifedipine and 4-aminopyridine modify the time course of the action potential in cells from rat ventricular muscle. *Br J Pharmacol* 81: 551-556
- 74. Mitcheson JS, Sanguinetti MC (1999) Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 9(4-5): 201–216
- 75. Näbauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 93(1): 168–177
- 76. Nair LA, Grant AO (1997) Emerging class III antiarrhythmic agents: mechanism of action and proarrhythmic potential. *Cardiovasc Drugs Ther* 11: 149-167
- 77. Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525: 285–298
- Nitta J, Furukawa T, Marumo F, Sawanobori T, Hiraoka M.(1994) Subcellular mechanism for Ca(2+)-dependent enhancement of delayed rectifier K+ current in isolated membrane patches of guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res.*;74(1):96-104.

- 79. Ono M, Sunami A, Hiraoka M (1995) Interaction between external Na+ and mexiletine on Na+ channel in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 431: 101-109
- 80. Patel AJ, Honoré E (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Trends Neurosci*;24(6): 339–346
- Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, Haverkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, McKenna WJ, Roden DM, Rudy Y, Schwartz K, Schwartz PJ, Towbin JA, Wilde AM. (1999) Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management part III. *Circulation*.;99(5):674-81.
- Priori SG, Napolitano C (2004) Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. Ann N Y Acad Sci 1015: 96–110
- Rivolta I, Abriel H, Tateyama M, Liu H, Memmi M, Vardas P, Napolitano C, Priori SG, Kass RS. (2001) Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes. *J Biol Chem.* ;276(33):30623-30.
- Rocchetti M, Besana A, Gurrola GB, Possani LD, Zaza A (2001) Rate dependency of delayed rectifier currents during the guinea-pig ventricular action potential. *J Physiol (London)* 534: 721-732
- 85. Roden DM (2006) Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J* Intern Med 259: 59–69
- 86. Roden DM, George AL Jr. (1997) Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. *Am J Physiol* 273(2): H511–525
- 87. Roden DM, Hoffman BF. (1985) Action potential prolongation and induction of abnormal automaticity by low quinidine concentrations in canine Purkinje fibers. Relationship to potassium and cycle length. *Circ Res.*;56(6):857-67.
- Roden DM, Viswanathan PC (2005) Genetics of acquired long QT syndrome. J Clin Invest 115: 2025–2032
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384(6604): 80–83
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell* 81(2): 299–307
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1990) Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current.
   Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 96: 195–215
- 92. Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantù F, Towbin JA, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, Chen LS. (2005) Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na+ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy *Circulation*.;92(12):3381-6.

- 93. Shibasaki T (1987) Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol* 387: 227–250
- 94. Shibata EF, Drury T, Refsum H, Aldrete V, Giles W. (1989) Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol*; 257:H1773-H1781
- 95. Shieh R-C, Chang J-C, Arreola J (1998) Interaction of Ba2+ with the pores of the cloned inward rectifier K+ channels Kir2.1 expressed in Xenopus oocytes. *Biophys J* 75: 2313-2322
- 96. Shigematsu S, Kiyosue T, Sato T, Arita M (1997) Rate-dependent prolongation of action potential duration in isolated rat ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* 92: 123-128
- 97. Shima H, Gerlach U, Schmidt D, Nattel S (2004) In vivo electrophysiological effects of a selective slow delayed-rectifier potassium channel blocker in anesthetized dogs: potential insights into class III actions. *Cardiovasc Res* 61: 705–714
- 98. Shimoni Y, Clark RB, Giles WR (1992) Role of an inwardly rectifying potassium current in rabbit ventricular action potential. *J Physiol* 448: 709–727
- Snyders DJ (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 42(2): 377–390
- 100. Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC (1996) Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* 78(3): 499–503
- 101. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT (1997) Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 17(3): 338–340
- 102. Starmer CF, Grant AO (1985) Phasic ion channel blockade. A kinetic model and parameter estimation procedure. *Mol Pharmacol* 28: 348-356
- 103. Strauss HC, Morales MJ, Wang S, Brahmajothi MV, Campbell DL (2001) Voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. In: *Heart Physiology and Pathophysiology* (szerk: N Sperelakis, Y Kurachi, A Terzic, MV Cohen) pp. 259–280. Academic Press, San Diego
- 104. Szabó G, Szentandrássy N, Bíró T, Tóth BI, Czifra G, Magyar J, Bányász T, Varró A, Kovács L, Nánási PP (2005) Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Arch* 450: 307-316
- 105. Szentandrássy N, Bányász T, Bíró T, Szabó G, Tóth B, Magyar J, Lázár J, Varró A, Kovács L, Nánási PP (2005) Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 65: 851-860
- 106. Szigligeti P, Pankucsi C, Bányász T, Varró A, Nánási PP (1996) Action potential duration and force-frequency relationship in isolated rabbit, guinea pig and rat cardiac muscle. J Comp Physiol B 166: 150-155
- 107. Tanemoto M, Fujita A, Kurachi Y (2001) Inwardly-rectifying K<sup>+</sup> channels In: *Heart Physiology and Pathophysiology* (szerk: N Sperelakis, Y Kurachi, A Terzic, MV Cohen) pp. 281–308. Academic Press, San Diego

- 108. Tohse N, Kameyama M, Irisawa H.(1987) Intracellular Ca2+ and protein kinase C modulate K+ current in guinea pig heart cells. *Am J Physiol*.;253(5 Pt 2):H1321-4.
- 109. Tseng GN, Hoffman BF (1989) Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res* 64(4): 633–647
- 110. Unsöld B, Kerst G, Brousos H, Hubner M, Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Bleich M (2000) KCNE1 reverses the response of the human K<sup>+</sup> channel KCNQ1 to cytosolic pH changes and alters its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflügers Arch* 441: 368–378
- 111. Vandenberg CA (1987) Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(8): 2560–2564
- 112. Varró A, Baláti B, Iost N, Takács J, Virág L, Lathrop DA, Lengyel Cs, Tálosi L, Papp JG (2000) The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. J Physiol (London) 523: 67-81
- 113. Varró A, Lathrop DA (1990) Sotalol and mexiletine: combination of rate-dependent electrophysiological effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 16: 557-567
- 114. Varró A, Lathrop DA, Hester SB, Nánási PP, Papp JG (1993) lonic currents and action potentials in rabbit, rat and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol* 88: 93-102
- 115. Varró A, Papp JGy (1992) The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. *Cardioscience* 3(3): 131-144
- 116. Varró A, ya Y, Elharrar V, Surawicz B (1989) Frequency-dependent and independent effects of tetrodotoxin on Vmax in cardiac fibers. *Acta Physiol Hung* 73: 47-52
- 117. Veldkamp MW, van Ginneken AC, Opthof T, Bouman LN (1995) Delayed rectifier channels in human ventricular myocytes. *Circulation* 92(12): 3497–3504
- 118. Virág L, Acsai K, Hála O, Zaza A, Bitay M, Bogáts G, Papp JG and Varró A (2009) Self augmentation of the lengthening of repolarization is related to the shape of the cardiac action potential: implication for reverse rate dependency. *Br J Pharmacol* 156: 1076-1084
- Virág L, lost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szécsi J, Bogáts G, Szenohradszky P, Varró A, Papp JG.(2001) The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.*;49(4):790-7.
- 120. Wahler GM (2001) Cardiac action potentials. In: *Heart Physiology and Pathophysiology* (szerk: N Sperelakis, Y Kurachi, A Terzic, MV Cohen) pp. 199–211. Academic Press, San Diego
- 121. Waldeyer C, Fabritz L, Fortmueller L, Gerss J, Damke D, Blana A, Laakmann S, Kreinkamp N, Volkery D, Breithardt G, Kirchhof P (2009) Regional, age-dependent, and genotype-dependent differences in ventricular action potential duration and activation time in 410 Langendorff-perfused mouse hearts. *Basic Res Cardiol* 104: 523-533
- 122. Wang DW, Desai RR, Crotti L, Arnestad M, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege A, Rognum T, Schwartz PJ, George AL Jr. (2007) Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome. *Circulation*. 115(3):368-76.

- 123. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12(1): 17–23
- 124. Weirich J, Antoni H (1998) Rate-dependence of antiarrhythmic and proarrhythmic properties of class I and class III antiarrhythmic drugs. *Basic Res Cardiol* 93, Suppl 1: 125-132
- 125. Wu L, Shryock JC, Song Y, Li Y, Antzelevitch C, Belardinelli L (2004) Antiarrhythmic effects of ranolazine in a guinea pig in vitro model of long-QT syndrome. J Pharmacol Exp Ther 310: 599-605
- 126. Yang T, Roden DM (1996) Extracellular potassium modulation of drug block of I<sub>Kr</sub>. Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence. *Circulation* 93: 407-411
- 127. Yang T, Snyders DJ, Roden DM (1997) Rapid inactivation determines the rectification and [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> dependence of the rapid component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cardiac cells. *Circ Res* 80(6): 782–789
- 128. Yazawa K, Kameyama M. (1990) Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 421:135-50.
- 129. Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM (1996) Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol (London)* 493: 733-746
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL (2001) The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 533(Pt 3): 697–710
- 131. Zaza A (2000) The cardiac action potential. In: *An introduction to Cardiac Cellular Electrophysiology* (szerk: A Zaza, MR Rosen), pp. 59–82. Harwood Academic Publishers
- 132. Zaza A (2010) Control of cardiac action potential: The role of repolarization dynamics. *J Mol Cell Cardiol* 48: 106-111
- 133. Zaza A, Belardinelli L, Shryock JC (2008) Pathophysiology and pharmacology of the cardiac "late sodium current". *Pharmacol Ther* 119: 326-339
- 134. Zeng J, Rudy Y. (1995) Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophys J*; 68:949-964.
- 135. Zhang M, Jiang M, Tseng GN (2001) MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 88(10): 1012–1019
- Zong XG, Dugas M, Honerjager P (1992) Relation between veratridine reaction dynamics and macroscopic Na current in single cardiac cells. J Gen Physiol 99: 683-697
- 137. Zygmunt AC, Eddlestone GT, Thomas GP, Nesterenko VV, Antzelevitch C. (2001) Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. Am J Physiol Heart Circ Physiol; 281:H689-H697.

## Tárgyszavak

akciós potenciál hossz

antiaritmikumok

elektrofiziológia

fordított frekvenciafüggés

frekvenciafüggés

kamrai repolarizáció

membránáram

## **Keywords**

action potential duration

antiarrhythmics

electrophysiology

frequency dependence

membrane current

reverse rate dependence

ventricular repolarization

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki dr. Csernoch László professzor úrnak, aki az Élettani Intézet igazgatójaként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. dr. Nánási Péternek áldozatkész segítségét, bátorítását és kitartását. Köszönöm továbbá dr. Magyar Jánosnak, dr. Bányász Tamásnak, dr. Szentandrássy Norbertnek és dr. Horváth Balázsnak elméleti és gyakorlati tanácsaikért, amelyekkel bevezettek a laboratórium mindennapi életébe, valamint, hogy segítségemre voltak a mérések és az adatelemzés során is.

Hálásan gondolok PhD hallgató társaimra, dr. Harmati Gáborra, dr. Hegyi Bencére, Kistamás Kornélra, dr. Ruzsnavszky Ferencre és dr. Váczi Krisztinára, akikkel megoszthattam a közösen végzett munka felejthetetlen pillanatait.

Külön köszönetemet fejezem ki dr. Jost Norbertnek, dr. Koncz Istvánnak, dr. Papp Ritának, dr. Varró Andrásnak, dr. Virág Lászlónak és dr. Antonio Zaza-nak akik hozzájárultak az értekezésben bemutatott eredmények elkészítéséhez; valamint Prof. dr. Márton Ildikónak, hogy segédkezett a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 projekt keretein belül meghírdetett predoktori ösztöndíj elnyerésében, mellyel nagyban hozzájárult a jelen értekezés elkészüléséhez.

Köszönöm feleségemnek és családomnak az áldozatkész segítséget, mert az ő támogatásuk nélkül a jelen disszertáció nem készülhetett volna el.

A kísérletek előkészítése során nélkülözhetetlen segítséget nyújtott Víghné Horváth Katalin.

## Függelék



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

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

Jelölt: Bárándi László

Neptun kód: PHQ4B9

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

#### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Bányász, T., Bárándi, L., Harmati, G., Virág, L., Szentandrássy, N., Márton, I., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Mechanism of reverse rate-dependent action of cardioactive agents. *Curr. Med. Chem. 18* (24), 3597-3606, 2011.
 IF:4.859

 Bárándi, L., Harmati, G., Horváth, B., Szentandrássy, N., Magyar, J., Varró, A., Nánási, P.P., Bányász, T.: Drug-induced changes in action potential duration are proportional to action potential duration in rat ventricular myocardium. *Gen. Physiol. Biophys.* 29 (3), 309-313, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb\_2010\_03\_309 IF:1.146

 Bárándi, L., Virág, L., Jost, N., Horváth, Z., Koncz, I., Papp, R., Harmati, G., Horváth, B., Szentandrássy, N., Bányász, T., Magyar, J., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Reverse ratedependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations. *Basic Res. Cardiol. 105* (3), 315-323, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00395-009-0082-7 IF:6.128

4. Bányász, T., Horváth, B., Virág, L., Bárándi, L., Szentandrássy, N., Harmati, G., Magyar, J., Marangoni, S., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Reverse rate dependency is an intrinsic property of canine cardiac preparations. *Cardiovasc. Res. 84* (2), 237-244, 2009. DOI: http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp213 IF:5.801

4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

#### DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

#### További Közlemények

 Hegyi, B., Bárándi, L., Komáromi, I., Papp, F., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Krasznai, Z., Szentandrássy, N., Nánási, P.P.: Tetrodotoxin blocks L-type Ca2+ channels in canine ventricular cardiomyocytes. *Pflugers Arch.* 464 (2), 167-174, 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00424-012-1114-y IF:4.463 (2011)

- 6. Harmati, G., Papp, F., Szentandrássy, N., Bárándi, L., Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Panyi, G., Krasznai, Z., Nánási, P.P.: Effects of the PKC inhibitors chelerythrine and bisindolylmaleimide I (GF 109203X) on delayed rectifier K(+) currents. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 383 (2), 141-148, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0584-8 IF:2.647
- 7. Harmati, G., Bányász, T., Bárándi, L., Szentandrássy, N., Horváth, B., Szabó, G., Szentmiklósi, J.A., Szénási, G., Nánási, P.P., Magyar, J.: Effects of beta-adrenoceptor stimulation on delayed rectifier K(+) currents in canine ventricular cardiomyocytes.. *Br. J. Pharmacol. 162* (4), 890-896, 2011.
  DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01092.x
  IF:4.409
- Szentandrássy, N., Harmati, G., Bárándi, L., Simkó, J., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Szebeni, A., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of rosiglitazone on the configuration of action potentials and ion currents in canine ventricular cells. *Br. J. Pharmacol.* 163 (3), 499-509, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01215.x IF:4.409

 9. Simkó, J., Szentandrássy, N., Harmati, G., Bárándi, L., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Nánási, P.P.: Effects of ropinirole on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 382 (3), 213-220, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0538-1 IF:2.5

4032 Debrecen, Egyetem tér 1. e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

#### DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

#### Összesített impakt faktor: 36.362

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

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

Debrecen, 2012.09.10



4032 Debrecen, Egyetem tér 1. e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu