

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Dienes Csaba Bálint

**A CBA és az ABT-333 emlős kamrai akciós potenciálra és az azt
kialakító ionáramokra kifejtett hatásai**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A CBA és az ABT-333 emlős kamrai akciós potenciálra és az azt
kialakító ionáramokra kifejtett hatásai**

Dr. Dienes Csaba Bálint

Témavezető: Dr. Szentandrassy Norbert



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. A bal kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja	9
2.2. A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) csatornák	10
2.2.1. A Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin (TRPM) csatornák	11
2.2.1.1. A Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 4 (TRPM4) csatornák.....	13
2.3. A TRPM4 jelenléte különböző sejtekben/szervekben	14
2.3.1. TRPM4 a szívben	14
2.3.2. A TRPM4 szerepe az ingerképzésben	14
2.3.3. A TRPM4 hozzájárulása a pitvari elektrofiziológiához	15
2.3.4. A TRPM4 szerepe a szív ingerületvezetésében	16
2.3.5. A TRPM4 hozzájárulása a kamrai elektrofiziológiához.....	17
2.4. A TRPM4 vizsgálatára alkalmazott farmakológiai módszerek	18
2.5. A késői káliumáram (I_K).....	19
2.5.1. A késői egyenirányító káliumáram gyors komponense (I_{Kr}).....	19
2.5.2. Az I_{Kr} gátlószerei	21
2.5.3. Az ABT-333 (dasabuvir)	22
3. Célkitűzések	24
4. Anyagok és módszerek	25
4.1. A kamrai szívizomsejtek izolálása.....	25
4.2. Elektrofiziológiai mérések	26
4.3. A szívizomsejtek akciós potenciáljának elvezetése.....	26
4.4. Az akciós potenciál repolarizáció variabilitásának elemzése.....	27
4.5. Feszültség-zár vizsgálatok	28
4.6. A hERG-áramok rögzítése.....	29
4.7. Fehérjeminta előkészítése és Western blot analízis	30
4.8. Statisztikai analízis	31
5. Eredmények	32
5.1. A TRPM4 fehérje expressziója.....	32
5.2. A CBA hatása az akciós potenciál morfológiájára	33
5.3. A CBA hatása a repolarizáció rövid távú variabilitására.....	36
5.4. Az APVC technikával mért CBA-érzékeny áram	38
5.5. A CBA hatása a repolarizáció ionáramaira.....	40

5.6. 1 μ M ABT-333 megnyújtotta a bal kamrai akciós potenciált	43
5.7. Az ABT-333 koncentrációfüggő hatása a kamrai akciós potenciál paraméterekre	46
5.8. Korai utódepolarizációk kialakulása az ABT-333 jelenlétében	48
5.9. ABT-333-érzékeny áramprofil AP feszültség clamp technikával (APVC).....	49
5.10. Az ABT-333 idő- és koncentrációfüggő módon blokkolta az expresszált hERG csatornákat	51
6. Megbeszélés	55
6.1. TRPM4 expresszió a kutyaszívben	55
6.2. A CBA hatása az akciós potenciál morfológiájára	56
6.3. A CBA hatása a repolarizáció rövid távú variabilitására.....	59
6.4. A CBA APVC-vel és hagyományos feszültség-zár technikával mért hatásai	60
6.5. 1 μ M ABT-333 AP-ra kifejtett hatásai	62
6.6. Az ABT-333 magasabb koncentrációinak hatása	63
6.7. ABT-333-érzékeny áramprofil APVC-vel	63
6.8. A hERG-csatorna-áramok ABT-333-indukált csökkenése	65
6.9. Orvosi relevancia	65
7. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények.....	67
7.1. CBA - TRPM4	67
7.2. ABT-333 – I_{Kr} (hERG)	67
8. Összefoglalás.....	68
8.1. CBA - TRPM4	68
8.2. ABT-333 – I_{Kr} (hERG)	68
9. Summary	69
9.1. CBA - TRPM4	69
9.2. ABT-333 – I_{Kr} (hERG)	69
10. Irodalomjegyzék.....	70
11. Tárgyszavak	83
12. Keywords	83
13. Köszönetnyilvánítás.....	84
14. Függelék.....	85

Rövidítések jegyzéke

4-AP	4-aminopiridin
ABT-333	a dasabuvir molekula másik neve
AP	akciós potenciál
APA	akciós potenciál amplitúdó
APD	akciós potenciál időtartam (action potential duration)
APD _x	az AP csúcsértékétől a repolarizáció x %-áig eltelt időtartam
APVC	akciós potenciál feszültség-zár
ATP	adenozin-trifoszfát
BAPTA	2,2',2'',2'''-[Etán-1,2-diilbisz(oxi-2,1-fenilenenitrilo)]tetraecet sav (2,2',2'',2'''-[Ethane-1,2-diylbis(oxy-2,1-phenylenenitrilo)]tetraacetic acid)
BTY	bikarbonát puffer tartalmú Tyrode-oldat
CBA	4-kloro-2-[[2-(2-klorofenoxi)acetyl]amino]benzoesav (4-chloro-2-[[2-(2-chlorophenoxy)acetyl]amino]benzoic acid)
C _{max}	maximális plazmakoncentráció
CYP2C8	citokróm P450 2C8 enzim
DAD	késői utódepolarizáció (delayed afterdepolarization)
EAD	korai utódepolarizáció (early afterdepolarization)
EC ₅₀	félhatásos koncentráció (half effective concentration)
HCV	hepatitis C vírus
HEK	emberi embrionális vese (human embryonic kidney) eredetű sejtvonal
I _{ABT-333}	ABT-333-érzékeny áram
IC ₅₀	félgátló koncentráció (half inhibitory concentration)
I _{Ca,L}	L-típusú Ca ²⁺ áram
I _{CBA}	CBA-érzékeny áram
I _{endsus}	az ABT-333-érzékeny tartós kifelé irányuló áram vége
I _{K1}	befelé egyenirányító K ⁺ áram
I _{Kr}	a késői egyenirányító káliumáram gyors komponense

I_{Ks}	a késői egyenirányító káliumáram lassú komponense
I_{Na}	Na^+ áram
$I_{Na,L}$	késői Na^+ áram
I_{NCX}	a Na^+/Ca^{2+} cserélő árama
I_{NSCCa}	kalcium-aktivált monovalens kationáram
I_{to}	transziens kifelé irányuló káliumáram
IP3	inozitol 1,4,5-triszfoszfát
LQTS2	2-es típusú hosszú QT-szindróma
OSP	túllövési potenciál (overshoot potential)
PIP2	foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát
PKC	protein kináz C
$Plat_{0.20}$	a membránpotenciál értéke a 90 %-os repolarizációig eltelt idő 20 %-ánál
$Plat_{0.20}$ amplitúdó	a nyugalmi membránpotenciál és a 90 %-os repolarizációig eltelt idő 20 %-ánál mért membránpotenciál értékek közti különbség
$Plat_{0.50}$	a membránpotenciál értéke a 90 %-os repolarizációig eltelt idő felénél
$Plat_{0.50}$ amplitúdó	a nyugalmi membránpotenciál és a 90 %-os repolarizációig eltelt idő felénél mért membránpotenciál értékek közti különbség
RCF	megmaradó áramhányad (remaining current fraction)
RMP	nyugalmi membránpotenciál (resting membrane potential)
RSV	a repolarizáció relatív rövidtávú variabilitása
SV	a repolarizáció rövidtávú variabilitása
TdP	Torsade de Pointes
TRP	transziens receptor potenciál
TRPM4	transziens receptor potenciál melasztatin 4
V_{Ph1max}	az 1. fázis repolarizáció legnagyobb meredeksége
V_{max}^+	a 0. fázis depolarizáció legnagyobb meredeksége
V_{max}^-	a 3. fázis repolarizáció legnagyobb meredeksége

1. Bevezetés

A TRPM4 a tranziens receptor potenciál csatornacsalád melasztatin alcsaládjának tagja. Expresszióját több humán szervben is kimutatták már. Részt vesz többek közt a membránpotenciál és a Ca^{2+} homeosztázis szabályozásában ingerlékeny, valamint nem ingerlékeny szövetek sejtjeiben egyaránt, valamint az inzulinszekrécióban, az immunválaszban, daganatok kialakulásában, vagy az agyi érszűkületben is¹⁻⁴.

A TRPM4-csatornák szívben mind a munkaizomrostokban, mind pedig a szív ingerületvezető rendszerében kimutathatók⁴⁻⁶. A TRPM4 csatornák mutációja a szívben ingervezetési zavarokhoz vezethet, továbbá feltételezik, hogy a TRPM4 részt vesz a szívizom hipertrófia, valamint ischaemia-reperfúziós sérülés kialakulásában^{4,7-9}.

Eddig a TRPM4 fiziológiai és patofiziológiai funkcióit vagy knock-out állatmodelleken^{10,11}, vagy farmakológiai megközelítéssel vizsgálták a csatorna gátlószereivel beleértve a 9-phenanthrolt¹²⁻¹⁴, a glibenklamidot^{15,16}, vagy a flufenaminsavat¹⁵⁻¹⁷. Sajnos ezeknek a vegyületeknek egyike sem elég szelektív. A csatorna funkcionális vizsgálataihhoz azonban szelektív vegyületre lenne szükség, vagy legalábbis a rendelkezésre álló TRPM4-re ható anyagok megfelelő kiegészítő farmakonokkal való kombinációs alkalmazására, ez utóbbi módszer viszont nagy körültekintést igényel.

Disszertációmban egy célzottan a TRPM4-csatorna gátlására kifejlesztett szer, a CBA bal kamrai kutya szívizom sejtekre gyakorolt hatásait mutatom be. A CBA potenciálisan szelektívnek vélt TRPM4 gátlószer, azonban mielőtt TRPM4 funkcionális vizsgálatokra használhatnánk, munkacsoportunk megelőzően a CBA-val szelektivitási vizsgálatokat végzett, hogy lássuk, befolyásol-e a CBA a kamrai szívizom akciós potenciált (AP) kialakító bármilyen áramot, illetve hogy a CBA hogyan befolyásolja az AP morfológiáját. Továbbá kollaborációs munka kereteiben megvizsgáltuk a TRPM4 csatornaexpresszióját is, melynek eredményeit szintén bemutatom disszertációmban.

A késői egyenirányító káliumáram a kamrai izomsejtek repolarizációjában elsődleges szerepet játszik. Kamrai munkaizomsejteken két komponensét írták le¹⁸: a gyors komponens (I_{Kr}) az AP 3. fázis repolarizációjának kialakításáért, míg a lassú komponens (I_{Ks}) az ún. repolarizációs rezerv biztosításáért felel. Ez utóbbi azt jelenti, hogy az áram nem vesz részt a normális repolarizáció biztosításában, viszont az AP megnyúlt állapotában az áram fokozódik¹⁹.

A csökkent I_{Kr} áram hosszú QT-szindrómához és korai utódepolarizációhoz (EAD) vezet, ezért potenciálisan életveszélyes ritmuszavarokat és hirtelen szívhalált okozhat²⁰.

A késői egyenirányító káliumáram gyors komponensének (I_{Kr}) több szelektív gátlószere is ismert, mint például a dofetilid vagy az E-4031. Ezen két vegyület közös tulajdonsága, hogy kémiai szerkezetükben metánszulfonamid csoportot tartalmaznak, továbbá jelentősen megnövelik a kamrai AP időtartamát^{21,22}.

Az ABT-333 (dasabuvir) egy vírusellenes szer, amelyet a hepatitis C kezelésében alkalmaznak. A molekula, hasonlóan az I_{Kr} kialakításáért felelős hERG- csatornák egyes gátlószereihez (dofetilid és E-4031), metánszulfonamid csoportot tartalmaz. Ezen hasonlóság alapján az ABT-333 is potenciálisan I_{Kr} gátló hatással bír, azonban a vegyület kamrai szívizomzatra gyakorolt hatásai még nem ismertek. Disszertációmban az ABT-333 kutya kamrai szívizomsejtek AP morfológiára gyakorolt hatásait és az annak hátterében álló ionáramokra kifejtett hatásokat mutatom be. Kollaborációs partnereinknek köszönhetően megvalósult az ABT-333 hERG csatornákra gyakorolt hatásainak vizsgálata expresszált sejteken is, melyből származó eredmények szintén bemutatásra kerülnek.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A bal kamrai szívműködés akciós potenciálja

A kamrai szívműködésben az akciós potenciált hagyományosan 5 fázisra szokás osztani (1. ábra). A szívműködés akciós potenciálját számos ionáram finoman összehangolt működése alakítja ki. Ezek az AP különböző fázisaiban aktiválódnak és különböző hatással bírnak a lefutására.

Az akciós potenciál 0. fázisában (feszültség-, és időfüggő gyors Na^+ csatornák aktiválódnak, sokszorosára növelve az addig alacsony Na^+ konduktanciát. A Na^+ ionokra jelentős elektrokémiai gradiens hat, ezért a csatorna megnyílása jelentős befelé irányuló áramot eredményez. Az aktuális membránpotenciál a Na^+ egyensúlyi potenciálja felé mozdul el, vagyis a membrán depolarizálódik. A gyors Na^+ csatornák a depolarizáció hatására gyorsan inaktiválódnak és a kiindulási zárt állapotba - ahol majd ismét ingerelhetőek lesznek - csak a membrán repolarizációja során kerülnek.

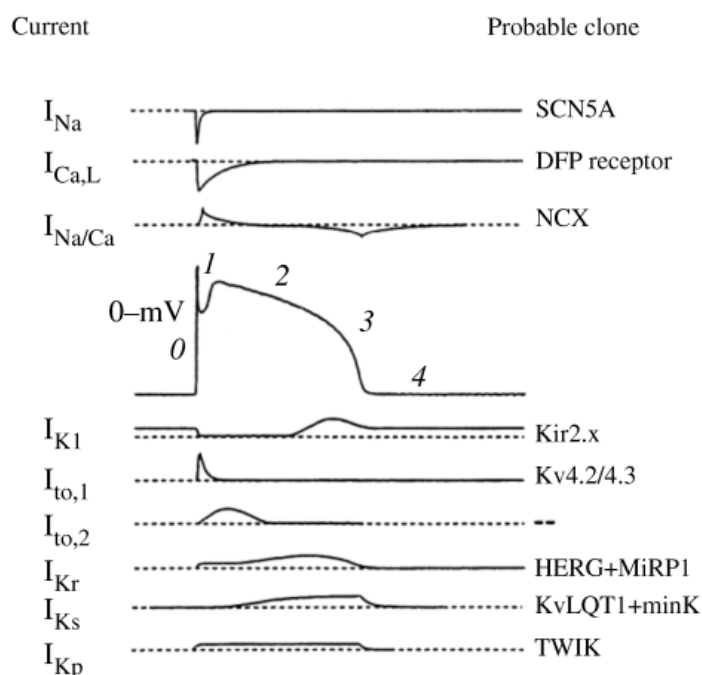
A depolarizáció hatására egy korai kifelé irányuló áram, a tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to}) aktiválódik. Ez az áram repolarizáló hatású, és az akciós potenciál első fázisának, a gyors, átmeneti repolarizáció kialakításáért felel.

A depolarizáció tartós fennállása aktiválja a lassú típusú (L-típusú) feszültségfüggő kalciumcsatornákat ($I_{\text{Ca,L}}$). Ez a depolarizáló áram a membránpotenciált újra a pozitív irányba tolja el kialakítva a dómot. A 2. vagy plató fázis alatt az I_{to} inaktiválódása és a K^+ csatornák lassú aktivációja miatt nincs jelentős repolarizáció, a befelé és kifelé irányuló áramok egyensúlya miatt jelentős időtartamra depolarizált marad a sejt.

Az AP 3. fázisában a terminális repolarizáció állítja vissza a membránpotenciál nyugalmi értékét (4. fázis). A repolarizációt számos áram együttes működése alakítja ki. A kezdeti szakaszt leginkább az $I_{\text{Ca,L}}$ inaktivációja határozza meg, később a késői K^+ áram (delayed rectifier, I_{K}) komponenseinek jut egyre nagyobb szerep, majd a repolarizációt a befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) teszi teljessé.

Az AP 4. fázisa során az automáciával nem rendelkező (extranodális) szívműködés - így a kamrai sejtek - membránpotenciálja is a nyugalmi értéken marad egészen egy újabb AP kezdetéig. A negyedik fázist meghatározó nagy K^+ konduktancia (amely az I_{K1} -et eredményezi) felel azért, hogy a kamrai miociták nyugalmi membránpotenciálja a K^+ ionok egyensúlyi potenciáljához közeli érték.

A kamrai AP létrehozásában több olyan befelé és/vagy kifelé irányuló ionáram (pl. TRPM4 áram) részt vehet, melyek élettani működése kevésbé jól jellemzett, viszont bizonyított, hogy hibás működése patofiziológiai jelentőséggel bírhat.



1. ábra A kamrai szívizomsejtek akciós potenciáljának fázisai és az ezeknek megfelelő ionáramok.

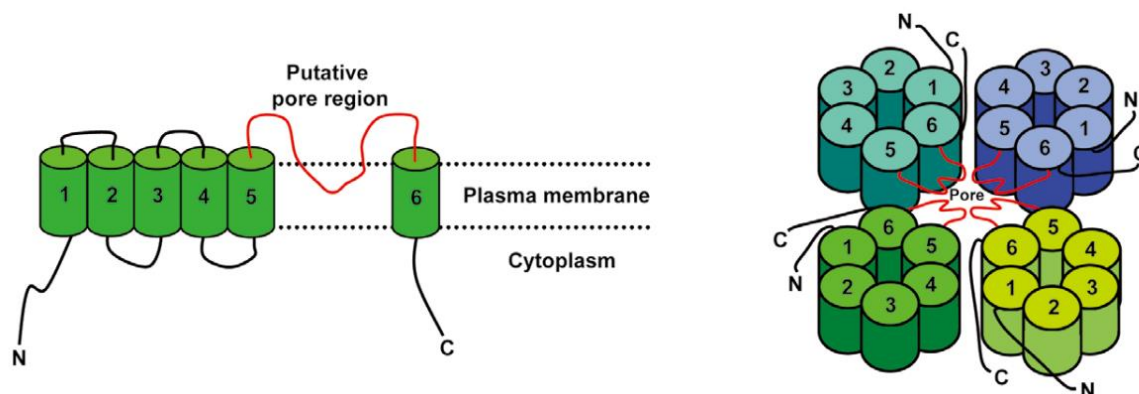
Az AP mellett feltüntetett arab számok az AP egyes fázisait jelölik. A szaggatott nulla vonal felett látható jelek kifelé irányuló ("outward"), míg a vonal alatti jelek befelé irányuló ("inward") áramokat reprezentálnak. Bal oldalon az ionáramok neve, míg jobbra az adott áramok kialakításáért felelős csatornafehérjék szerepelnek Rosen és mtsai. alapján²³.

2.2. A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) csatornák

A tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák egy több mint 50 tagot számláló ioncsatorna szupercsalád, melynek 28 tagja humán szövetekben is megtalálható²⁴. A TRP-ket Drosophilákban fedezték fel, ahol fényingerre a membránpotenciál átmeneti emelkedésével reagáltak, így „tranziens receptor potenciál” csatornáknak nevezték el őket²⁵.

A csatornák szekvencia homológiája alapján 6 alcsoportot különböztetünk meg: TRPC (6 tag, C mint Canonical), TRPV (6 tag, V mint Vanilloid), TRPM (8 tag, M mint a tumorszupresszor Melastatin), TRPP (4 tag, P mint Polycystin), TRPML (3 tag, ML mint Mucolipin), és a TRPA (1 tag, A mint Ankyrin)²⁶. Zárójelben a humánban előforduló csatornatípusok száma, valamint a rövidítések feloldása látható.

A TRP csatornafehérjék 6 transzmembrán doménnel rendelkeznek, melyek tetramerbe rendeződve alkotnak funkcionális csatornákat (2. ábra). Ez a fehérjeszerkezet megfelel a feszültségfüggő kationcsatornák klasszikus struktúrájának. Szelektivitási szűrőként az 5. és 6. szegmens között található P-hurok funkcionál. Az S4 régióban található pozitív töltésű aminosavak a csatorna feszültségérzékenységeért felelnek. A TRP ioncsatornák bár feszültségfüggőek, S4 doménjükben kevesebb a pozitív töltésű aminosav, mint általában a feszültségérzékeny ioncsatornáknakban.



2. ábra A tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák általános szerkezete.

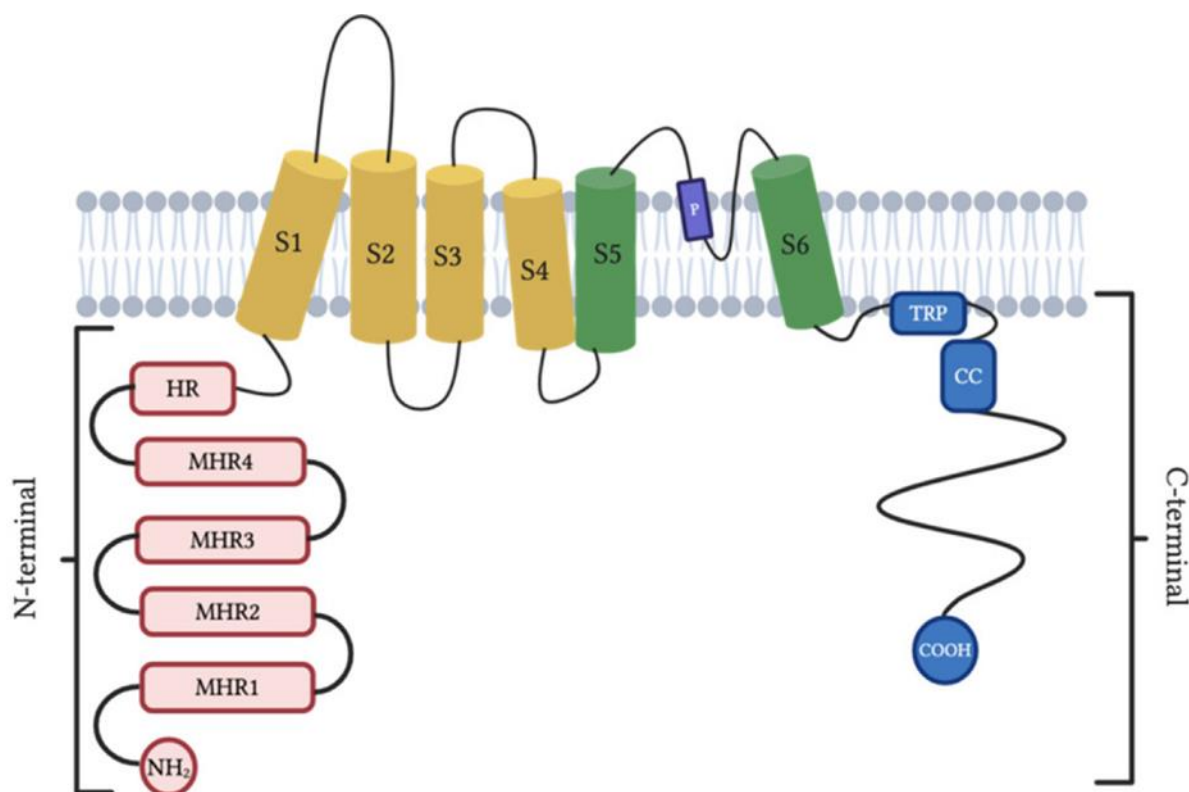
Bal oldalon egy monomer látható. A TRP fehérjének 6 transzmembrán doménje van, és egy pórusrégiója van az 5. és 6. között. A jobb oldalon a TRP-k tetramer csatornaszerkezete látható. Watanabe és mtsai. alapján²⁷.

A TRP-ket az intracitoplazmatikus N- és C-terminális közötti specifikus kötőhelyeik alapján tudjuk megkülönböztetni. A TRP alcsaládok közötti különbségek az N- és C-terminálisok (mindkettő citoszolikus) hosszúságának és doménjeik nagyfokú variabilitásának köszönhetőek. A TRPA, TRPC és TRPV alcsaládokban az N-terminális ankyrin ismétlődéseket, a TRPC és a TRPM alcsaládokban a C-terminális nagy mértékben konzervált TRP domént tartalmaznak^{28,29}. Továbbá ismert, hogy a TRP csatornák intracelluláris doménjei erősen befolyásolják a csatorna aktiválását, gátlását, valamint a különböző modulátorokra adott válaszkészségét³⁰.

2.2.1. A Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin (TRPM) csatornák

A TRPM alcsalád nyolc tagból (TRPM1-8) áll, amelyek négy párt alkotnak: TRPM1/M3, M2/M8, M4/M5 és M6/M7. Ennek a párosításnak a C-terminálisokban található tekercselt tekercs („coiled-coil”) szekvencia homológia az alapja³¹.

A TRPM csatornák a humán szervezet valamennyi szövetében jelen vannak, továbbá fiziológiás és patológiás jelentőséggel bírnak³². Ezek az ioncsatornák három fő régióból állnak: az N-terminálisból, a csatornadoménból és a C-terminálisból. Az N-terminális 4 „melasztatin homológ régióból” és egy „homológ régióból” vagy más néven pre-S1 doménből áll (3. ábra, piros dobozok).



3. ábra A tranziens receptorpotenciál melasztatin (TRPM) alcsalád csatornaszerkezete.

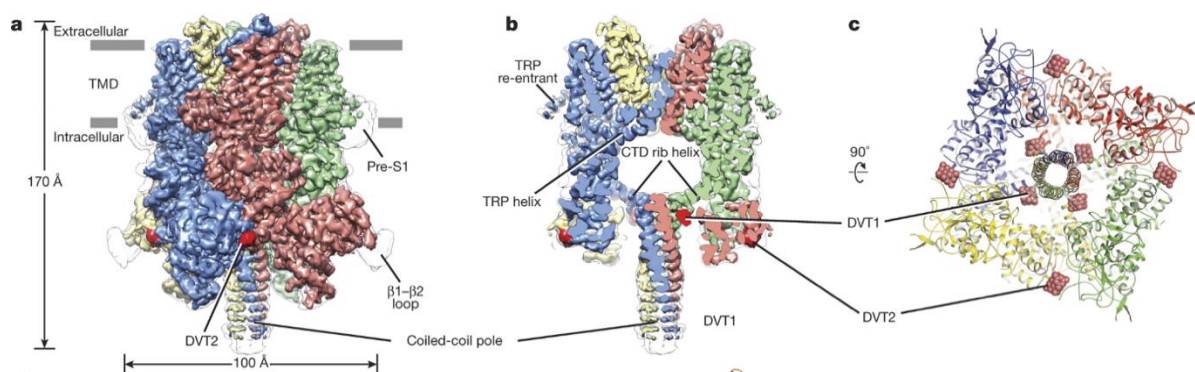
Az N-terminális négy melasztatin homológ régióból és az S1 előtti homológ régióból áll (melasztatin homológ régiók (MHR) és homológ régiók (HR), piros dobozok). A csatornatartomány hat transzmembrán szegmenst (S1–S6) tartalmaz. Az S1–S4 (sárga hengerek) régió a feszültségérzékelő doménnek felel meg, míg a pórust az S5 és S6 szegmensek közötti hurok képezi (P jelű doboz és zöld henger). A C-terminális TRP-ből és a tekercselt tekercsből („coiled-coil” - CC) (kék dobozok) áll. Jimenez és mtsai. alapján³¹.

Ezek a régiók egy zsebet alkotnak, amelyről feltételezték, hogy fontos szerepet játszanak az ingerek érzékelésében és a csatorna összeszerelődésében³³. A csatornadomén és a P-hurok (3. ábra, S1-S6 és P) a transzmembrán térben található. Főleg az S4 (de a többi, S1–S3 is) (3. ábra, világosbarna hengerek) egy feszültségérzékelő domén, amely a csatorna aktiválásához kapcsolódik. Az S5 és S6 alegységek között található P-hurok alkotja az ionvezető pórust.

A melasztatin család két tagja, a TRPM4 és 5 a családon belül is egyedülállóak, mivel ezek nem permeábilisak kétértékű kationokra, például Ca^{2+} -ra és Mg^{2+} -ra^{6,34–36}.

2.2.1.1. A Transiens Receptor Potenciál Melasztatin 4 (TRPM4) csatornák

A TRPM4-áramot a TRPM4 csatornafehérje közvetíti (4. ábra), ami egy 1214 aminosav hosszú transzmembrán fehérje, humánban a 19-es kromoszómán elhelyezkedő *trpm4* gén kódolja^{37,38}. A TRPM4-áram egy feszültségfüggő, nem specifikus, monovalens kationáram. Bár Ca^{2+} nem jut át a csatornán, a csatorna aktivációjához azonban szükség van Ca^{2+} -ra^{38,34}. Single channel mérések alapján egy ioncsatorna vezetőképessége 23-25 pS között van. A TRPM4 permeabilitási sorrendje: $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$ ^{38,39}.



4. ábra A TRPM4-csatorna felépítésének krio-elektronmikroszkópos szerkezeti képe.

a, Háromdimenziós kép a membrán síkjában. A négy különböző szín az alegységeket jelöli, az élénkebb pirossal a DVT kötőhelyek láthatók. **b**, A szerkezet szeletképe. **c**, A csatorna modell a citoszolikus oldal felől. Winkler és mtsai. alapján³³.

Az olyan vegyületek, mint a dekanadát (DVT) – ami egy erősen negatívan töltött fém klaszter – a TRPM4 feszültségfüggését a negatív potenciálok felé tolják el. Winkler és munkatársai a TRPM4-csatornák krio-elektronmikroszkópos szerkezetének felderítésekor azt találták, hogy a DVT befolyásolja a TRPM4 feszültségfüggését, valamint, hogy a DVT a Ca^{2+} -aktivált áram amplitúdóját a Ca^{2+} -koncentrációtól függő módon modulálja. Két modulátor DVT-kötőhelyet tártak fel, egyet a C-terminális domén (CTD) fordulójánál, egyet pedig az MHR1/2 és a szomszédos MHR3 közötti határfelületen. Ez arra utal, hogy a DVT a csatorna kapuzására a C-terminális doménen és az N-terminális MHR-en keresztül hat³³.

Az áram Ca^{2+} -érzékenységét a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2)⁴⁰ és a kalmodulin (CaM)³⁵ befolyásolja, emellett a csatorna aktivációjában a protein kináz C (PKC)-függő foszforilláció is részt vesz^{28,35,41,42}.

2.3. A TRPM4 jelenléte különböző sejtekben/szervekben

Még a TRPM4 felfedezése előtt - melyről később kiderült, hogy ez az ioncsatorna felelős a kalcium-aktivált monovalens kationáramokért (I_{NSCCa}) - több kutatás eredménye utalt ezen áramok szerepére, például újszülött patkány szívsejtekben⁴³ és a tengerimalac csiga külső szőrsejtjeiben⁴⁴. Azóta a TRPM4 expresszióját számos szövetben és sejttypusban megerősítették, funkciójára pedig több elmélet is született. Az érrendszer simaizomsejtjei^{45,46}, a húgyhólyag⁴⁷ és a vastagbél⁴⁸, az endotél⁴⁹, az immunsejtek⁵⁰, a központi idegrendszer számos része², a Langerhans-sziget endokrin sejtjei⁵¹, zsírsejtek⁵², keratinociták⁵³, mucin szekretáló sejtek⁵⁴, emberi billentyű interstitialis sejtek⁵⁵ és a vázizomzat³² mind expresszálják a TRPM4-et. A TRPM4-et különböző rosszindulatú daganatokkal is összefüggésbe hozták^{56,57}.

2.3.1. TRPM4 a szívben

A TRPM4 szívben is expresszálódik, és szinte valamennyi sejtjének működéséhez hozzájárul, beleértve a sinoatrialis- és atrioventricularis csomó sejtjeit^{8,16,58}, az ingerületvezető rendszer sejtjeit^{4,59}, valamint a pitvari^{6,12} és a kamrai szívizomsejteket^{5,15}. Még az I_{NSCCa} vizsgálata során sok esetben kimutatták a TRPM4-et, így ez vált a legvalószínűbb I_{NSCCa} -t kialakító ioncsatornává. Számos összefoglaló tanulmány részletezi a TRP-csatornák kardiovaszkuláris rendszerben betöltött szerepét⁶⁰. Egyesek kifejezetten a TRPM4-re összpontosítanak⁶¹⁻⁶³. A TRPM4 fontos szereplője a szív elektromos aktivitásának és kóros folyamatokban is szerepet játszik³.

2.3.2. A TRPM4 szerepe az ingerképzésben

Egerek pacemaker szöveteiben a TRPM4-et mRNS⁶⁴ és fehérje¹⁶ szinten is kimutatták. TRPM4-szerű tulajdonságokkal rendelkező ionáramok egereken kívül patkányokban és nyulakban is kimutathatók^{58,65}. A 9-phenanthrollal elért TRPM4-gátlás a szívfrekvencia koncentrációfüggő csökkenéséhez vezetett a vad típusú egerekben (TRPM4 KO egerekben nem), ami alátámasztja a TRPM4 szerepét az ingerképzésben⁵⁸. Meg kell azonban jegyezni, hogy a TRPM4 KO állatokban a szívfrekvencia a vad típusúakhoz képest nem csökkent^{64,66,67}. Ezek a megfigyelések a TRPM4 ingerképzésben betöltött szerepe ellen szólnak, vagy a KO állatokban bekövetkezett kompenzációs változások következményei lehetnek. Mivel az ingerképzés esszenciális funkció, ezért több mechanizmus (Ca^{2+} - és membránóra-elméletek) együttműködése révén nagymértékben védett⁶⁸. Ezért lehetséges, hogy a TRPM4 KO állatok

esetében más, nem TRPM4 által közvetített mechanizmusok hozzájárulása úgy módosul, hogy a szívfrekvencia végül változatlan marad.

2.3.3. A TRPM4 hozzájárulása a pitvari elektrofiziológiához

Újszülött patkány pitvari sejtjeiben és a jobb pitvari fülcséből izolált pitvari sejtekben⁶ Ca^{2+} -aktivált, nem szelektív kationáramokat írtak le⁶⁹. A TRPM4 mRNS a humán pitvari izomban is kimutatható volt⁶. A TRPM4 fehérje expressziója hasonló mértékű volt a jobb pitvari fülcséből izolált, pitvarfibrillációval rendelkező vagy anélküli betegek szívmusclesejtjeiben is⁷⁰.

A TRPM4 pitvari AP-ben betöltött funkcióját TRPM4 KO egerek és farmakológiai vizsgálatok kombinációjával tesztelték¹². A 9-phenanthrollal, vagy flufenaminsavval előidézett TRPM4-gátlás reverzibilis és koncentrációfüggő módon csökkentette az AP időtartamát vad típusú egyedekből izolált pitvari sejteken, míg TRPM4 KO állatok sejtjein nem. A pitvari AP-k rövidebbek voltak a TRPM4 KO állatokban a vad típusúakhoz képest^{12,64,67}, kivéve egy nemrégiben megjelent tanulmányt, ahol a KO állatokból származó pitvari sejtek kissé depolarizáltabb nyugalmi membránpotenciállal rendelkeztek⁷¹.

A korábbi vizsgálatokkal összhangban - ahol a pitvari AP-k rövidebbek a TRPM4 KO állatokban - számítógépes szimulációval a TRPM4 enyhe (2-5-szörös) és nagy (legalább 6-szoros) overexpressziója az AP időtartamának növekedéséhez, valamint korai utódepolarizációk (EAD-k) kialakulásához vezetett⁷². Ezek a szimulációk összhangban voltak az immortalizált patkány pitvari HL-1 szívmusclesejtekből nyert elektrofiziológiai adatokkal, ahol az angiotenzin II növelte a TRPM4 expresszióját⁷². A TRPM4 aktivitása szintén megnőtt a CaMKII δ -val való funkcionális összekapcsolást követően a HL-1 szívmusclesejtekben⁷³.

Patkány pitvari sejtekben a TRPM4 által közvetített áram - a 2-es típusú IP3 receptor által közvetített Ca^{2+} -felszabadulások aktiválásán keresztül - részt vehet a nyíróerő növekedésére (shear stress) adott válaszban⁷⁴. A TRPM4 szerepet játszhat az aldosteron által kiváltott AP rövidülésében és elősegítheti az aldosteron által kiváltott pitvari aritmiákat⁶⁷.

A TRPM4-et humán és egér pitvari fibroblasztok működésével is kapcsolatba hozták. Sejtenyésztes során mRNS és fehérje szinten is megnőtt a TRPM4 expresszió, valamint a TRPM4-áram is. Ha 1-10 μM koncentrációban 9-phenanthrolt adtak a sejtenyészethez, szignifikánsan redukálódott a sejtek növekedése, így arra a következtetésre jutottak, hogy a TRPM4 hozzájárul a sejtek növekedéséhez⁷⁵.

2.3.4. A TRPM4 szerepe a szív ingerületvezetésében

A TRPM4 mRNS-szintje a humán szív Purkinje-sejtjeiben a legmagasabb⁷, azonban funkciója atrioventrikuláris csomósejtek szöveteiben nem ismert. A TRPM4 fehérje nagy mértékben expresszálódik szarvasmarha szív Purkinje-sejtekben is⁴. Nyúl Purkinje-sejtekben a TRPM4 gátló 9-phenanthrol reverzibilis és koncentrációfüggő módon rövidítette az AP-ket anélkül, hogy más AP paramétereket befolyásolt volna. Továbbá szintén Purkinje-sejtekben egy TRPM4-szerű ionáram (vezetőképesség 23,8 pS; azonos permeabilitás Na⁺ és K⁺ számára; érzékenység feszültségre, Ca²⁺-ra és 9-phenanthrolra) figyelhető meg⁷⁶.

Purkinje-sejteken végzett akciós potenciál clamp kísérletek az AP platófázisa alatt egy átmeneti, befelé irányuló, 9-phenanthrol-érzékeny áramot mutattak ki⁷⁶. Az eredmények a TRPM4 hozzájárulását mutatják a Purkinje-sejtek AP-jához, valamint a TRPM4 potenciális részvételét a szív ingerületvezetésében, illetve aritmiák generálásában. Humánban a TRPM4 mutációi a szív ingerületvezetési zavaraiért felelősek⁷⁷. Az elsőként azonosított mutáció egy aminosavcsere a 7. pozícióban glutamátról lizinre (E7K), amely csökkent endocitózis és megnövekedett TRPM4-áramsűrűség révén funkcionyeréshez vezet a Purkinje-rostok sejtmembránjában⁷. Az autoszomális domináns módon öröklődő E7K mutáció progresszív I. típusú familiáris szívblokkhoz vezethet. Számítógépes szimulációkban a megnövekedett E7K mutáns áramsűrűség a nyugalmi membránpotenciál depolarizációjához és az AP megnyúlásához vezetett. Az E7K mutáns TRPM4-áramdenzitásának növekedése fokozatosan csökkenti az AP vezetési sebességét is, ami teljes vezetési blokkban csúcsosodik ki⁷⁸.

A legtöbb TRPM4-polimorfizmust és pontmutációt Brugada-szindrómás betegeknél azonosították, valamint TRPM4 mutációt mutattak ki atrioventrikuláris blokkban és jobb Tawara-szár blokkban szenvedő betegeknél is. Sinuscsomó-diszfunkcióban, vagy hosszú QT-szindrómában azonban nem írtak le TRPM4 mutációt⁸.

A TRPM4-overexpresszió és az atrioventrikuláris blokk közötti kapcsolatot számítógépes modellezés is alátámasztotta, ahol a TRPM4-áramok megduplázódása EAD kialakulásához vezetett. Gaur és munkatársainak kutatásai alapján a TRPM4-csatornák lehetnek felelősek a háttér nátriumáramért, valamint megállapították, hogy a TRPM4 heterogén expressziója a His/Purkinje rendszerben II. típusú szívblokkhoz vezet⁵⁹.

A Brugada-szindrómás betegek 6 %-ánál mutattak ki valamilyen TRPM4 mutációt^{9,79}. Érdekes módon ezek közül néhány mutáció (T873I és az L1075P) funkció nyeréshez vezettek, míg más mutációk (P779R és a K914X) csökkent TRPM4-áramot eredményeztek.

A nyugalmi membránpotenciál bármely TRPM4 mutáció indukált változása csökkentheti a nátriumcsatorna elérhetőségét és hozzájárulhat a Brugada-szindróma kialakulásához. A Brugada-szindróma számos esetében az SCN5A gén mutációja - amely a nátriumáram megváltozásához vezet - az okozója a vezetési zavarnak⁸⁰.

2.3.5. A TRPM4 hozzájárulása a kamrai elektrofiziológiához

A TRPM4 kamrai AP-ben való funkciója a legvitatottabb terület, mivel a korai kutatások szerint a szív más részeihez képest a kamrákban nagyon kis mértékben expresszálódik. A TRPM4 mRNS-expressziója humán szívben a bal kamrában volt a legalacsonyabb⁷.

A TRPM4 részt vesz állóképességi edzés által indukált jótékony kardiális remodellingben⁸¹. Bár a TRPM4 fehérje egér kamrai izomban is kifejeződött⁷¹, a pitvari expresszió magasabb volt⁶⁶. Patkányokban megközelítőleg azonos expressziót mutattak ki mind a pitvari, mind a kamrai szívizomsejtekben⁷⁴.

A korai kutatások TRPM4-szerű áramokat mutattak ki tenyésztett, dedifferenciált patkány kamrai sejtekben^{82,83}. Felnőtt Wistar patkányok bal kamrai sejtjeiben alig detektáltak TRPM4-szerű áramot (és mRNS-t), de spontán hipertóniás patkányok bal kamrai sejtjeiben megjelentek¹⁵. Mindezek ellenére Ca²⁺-aktivált nem szelektív kationáramokat írtak le tenyésztett patkány kamrai sejtekben⁴³ és frissen izolált tengerimalac kamrai szívizomsejtekben⁸⁴.

A TRPM4 egerekben hozzájárul az AP morfológiájához, mivel a bal kamrai papilláris AP-k időtartama szignifikánsan kisebb volt TRPM4 KO egerekben, mint a vad típusúakban⁸⁵.

Egészséges felnőtt patkányokban a TRPM4 fehérje egyértelműen expresszálódik kamrai szívizomsejtekben⁵, ellentétben a Guinamard-csoport eredményeivel^{15,83}. A különbség oka lehet, hogy a korábbi munkák során Wistar (vagy Wistar-Kyoto) patkányokat használtak^{15,83}, míg újabban Sprague-Dawley patkányokkal dolgoznak^{5,74}.

Az ellentmondásos adatok ellenére a TRPM4 gátlása az inotrópia növelésének egyik módja lehet. A közelmúltban kidolgoztak egy *in vivo* AAV9-RNSi által közvetített géncsendesítő stratégiát, mely alkalmas lehet például a TRPM4 kifejeződés csökkentésére is. Ezzel a módszerrel annak reményében csökkentették a szívben a TRPM4 expresszióját, hogy ezáltal

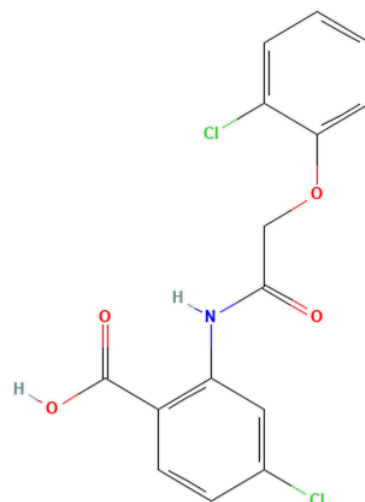
fokozzák a szív kontraktilitását szívelégtelenség-állatmodellben. A technikával felnőtt egér szívben a TRPM4 fehérje expressziójának 90 %-os csökkenését érték el⁸⁶.

2.4. A TRPM4 vizsgálatára alkalmazott farmakológiai módszerek

Számos vegyület blokkolja a TRPM4-áramot. Ezek közül néhány endogén molekula, mint például az adenosin-trifoszfát (ATP) és rokonvegyületei⁸⁷, a nitrogén-oxid (NO)⁸⁸ és a spermin⁸⁷. Mások exogén vegyületek, köztük a kinin⁸⁹, az MPB-104⁹⁰, a nem szteroid gyulladáscsökkentő flufenaminsav (FFA)⁹¹, az antidiabetikus glibenklamid⁶, az antimycoticus klotrimazol²⁸, kloridcsatorna-blokkolók (mint például a difenil-amin-2-karbonsav (DPC), 3t,5-diklór-difenil-amin-2-karbonsav (DCDPC) és az 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoesav (NPPB))¹⁴, valamint a 9-phenanthrol¹⁴.

E vegyületek szelektivitása sok esetben meglehetősen gyenge, ami újabb és újabb vegyületek keresését és tesztelését teszi szükségessé. Ilyen nemrégiben kifejlesztett szerek a 4-klór-2-[[2-(2-klór-fenoxi)acetil]amino]benzoesav (CBA, 5. ábra), a 4-klór-2-(1-naftiloxi-acetamido)benzoesav (NBA) és a 4-klór-2-(2-(4-klór-2-metilfenoxi)propanamido)benzoesav (LBA)^{92,93}. Egy közelmúltban megjelent tanulmány kimutatta, hogy egy nem szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyag, a meklofenamát szintén alkalmas lehet a csatorna gátlására és ezáltal annak vizsgálatára⁹⁴. Ezenkívül, különösen *in vivo* vizsgálatokban, specifikus M4P, M4M és M4M1 antitesteket használtak a TRPM4 blokkolására^{95,96}. Alkalmaztak továbbá kis interferáló RNS-t (siRNS) a TRPM4 csendesítésére⁹⁷, mely megközelítést *in vitro* is használták⁹⁸.

Bár a TRPM4-et először a 21. század elején írták le, a különböző szövetekben előforduló Ca^{2+} -aktivált, nem specifikus kationáramról már jóval korábbról is rendelkezésre állnak publikációk. Azóta hatalmas mennyiségű ismeretanyag gyűlt össze a TRPM4-ről, de még mindig vannak megválaszolatlan kérdések. A kutatások eredményei nem mindig egyeznek, ha a KO állatokból, valamint a TRPM4-gátlószerekkel nyert kísérleti adatokat összehasonlítjuk egymással. Mindazonáltal, a kutatások eredményei alapján a TRPM4 befolyásolása akár potenciális terápiás eljárás is lehet a jövőben.



5. ábra A CBA kémiai szerkezete.

A képlet a ChemDrawPro 12.0 szoftverrel készült.

2.5. A késői káliumáram (I_K)

A késői káliumáramot kialakító ioncsatornák depolarizációra aktiválódnak (nyílnak), míg negatívabb membránpotenciálra viszonylag lassan térnek vissza zárt állapotba. A csatornák által közvetített káliumáram (I_K) feszültség és idő függően változik és legfőbb funkciója az akciós potenciál repolarizációjának kialakítása^{99,100}. A késői káliumáram a kinetikai- és egyenirányító tulajdonságok, gátlószér érzékenység, valamint intracelluláris moduláció szempontjából három összetevőre osztható: ultragyors (I_{Kur}), gyors (I_{Kr}), valamint a lassú komponensek (I_{Ks})^{18,101,102}.

A késői káliumáramot a szív valamennyi sejtípusában kimutatták, ám az egyes komponensek áramsűrűsége a szív egyes régióiban, illetve a különböző fajokban is jelentősen eltér¹⁰³. Az I_{Ks} és I_{Kr} a pitvari és a kamrai munkaizomsejtekben is megtalálható^{104,105}, azonban az I_{Kur} áramot humánban eddig csak pitvari sejtekben írták le¹⁰². A késői káliumáram összetevőinek a szív bal kamrájában eltérő a szívcsúcs-szívbázis irányú, illetve transzmurális expressziója. Nyúl sejteken az I_{Ks} , és az I_{Kr} az apikális miocitákon kisebb, mint a szívbázison¹⁰⁶. Kutya szívizomsejteken az I_{Kr} esetében nem mutatható szignifikáns apiko-bazális eltérés, de a bázis részen az I_{Ks} kisebb a szívcsúcsához képest¹⁰⁷. A miokardium egyes rétegeiben az I_{Kr} áramsűrűségében nincs szignifikáns eltérés, míg az I_{Ks} kisebb a kamra midmiokardialis rétegében a szubepikardiumhoz képest¹⁰⁸.

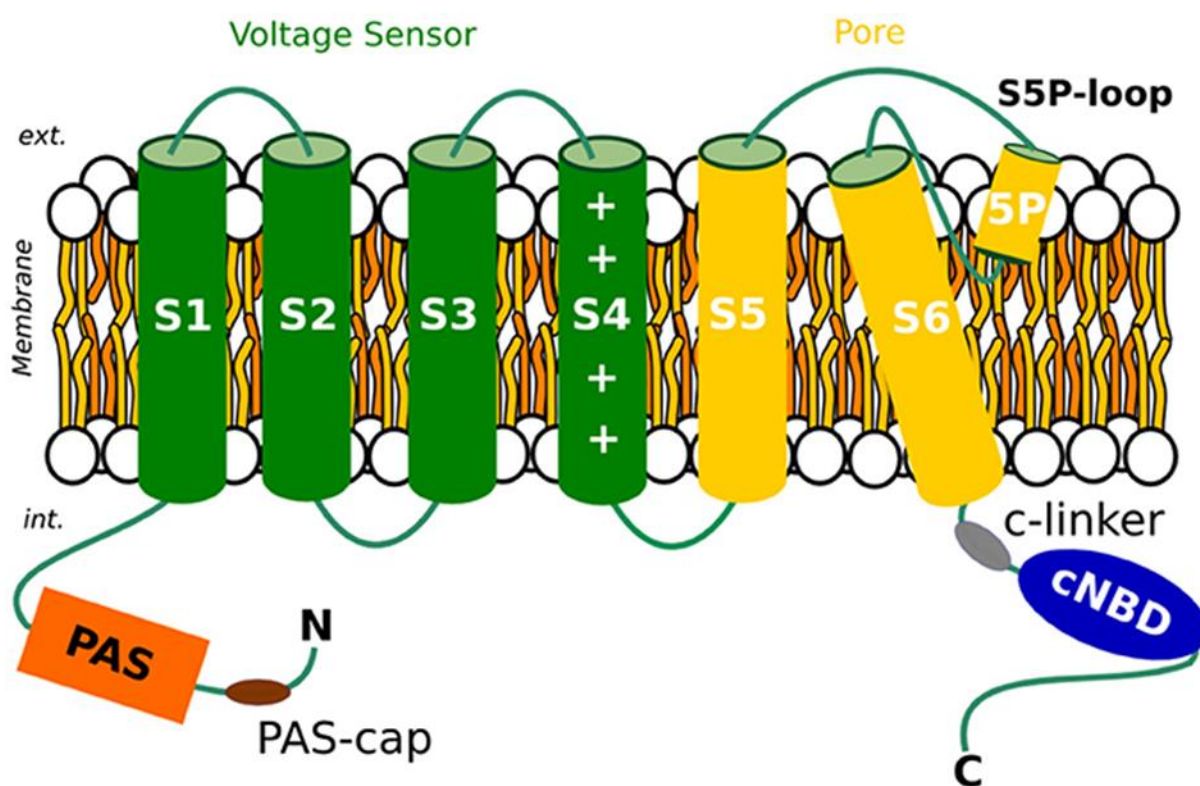
A késői káliumáram elsődleges szerepet játszik a szívizom akciós potenciáljának repolarizációjában. Az áramot létrehozó csatornafehérjék szerkezetének megváltozása vagy farmakológiai befolyásolása az áram - és így az akciós potenciál időtartamának megváltozásához és aritmiák kialakulásához vezethet. Ezek közül a legjellemzőbbek a hosszú QT-szindrómák különböző formái^{109–111}. Ezekben a betegségekben az akciós potenciál megnyúlása miatt fokozódik a korai utódepolarizációk és a TdP kamrai tachycardia kialakulásának valószínűsége, így gyakrabban fordul elő hirtelen szívhalál^{112–114}.

2.5.1. A késői egyenirányító káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Az I_{Kr} -t létrehozó ioncsatorna a feszültségfüggő K^+ csatornák *eag* család *erg* alcsaládjába tartozik. A csatornát a Kv11.1 fehérje alakítja ki, melyet a 7. kromoszómán elhelyezkedő KCNH2 gén (hERG gén¹¹⁵) kódol^{116,117}. Ennek a génnek a mutációja okozza a hosszú QT szindróma 2. típusát (LQT2)⁴. LQTS2-ben az I_{Kr} csökkenése miatt az AP megnyúlik. Az I_{Kr} gátlása által kiváltott akciós potenciál (AP) megnyúlás alapján korai utódepolarizációk (EAD) hozhatók létre^{118,119}. Ez az állapot növeli az APD rövid távú variabilitást (SV)¹²⁰ és a transzmurális akciós potenciál

időtartamának heterogenitását. Mindkettő életveszélyes szívritmuszavarokhoz, például Torsade de Pointes-hoz¹²¹ és hirtelen szívhalálhoz^{122,123} vezethet.

A Kv11.1 csatorna szerkezete (6. ábra) a feszültségérzékeny káliumcsatornák többségével mutat homológiát és tetramerbe rendeződve alkot funkcionális csatornát. A hERG kapuzást a citoplazmatikus domének (N-terminális vagy PAS (*Per-Arnt-Sim*)-domén, C-terminális vagy CNBD (*ciklikus nukleotid kötő domén* - *cyclic nucleotide binding domains*) és C-linker) befolyásolják, de ezen mechanizmusok még mindig nagyrészt ismeretlenek. Ugyanakkor a QT-megnyúlásért felelős szerkezeti mechanizmusok szempontjából ezeknek a doméneknek kiemelt jelentőséget tulajdonítanak¹²⁴.



6. ábra A Kv11.1 vagy hERG-csatorna monomer topológiája.

A monomer hat transzmembrán szegmenst (S1–S6) tartalmaz. Az S4 régió a feszültségérzékelő doménnek felel meg, míg a pórust az S5, S6 és 5P szegmensek közötti hurkok (sárga hengerek) képezik. PAS, CNBD az N-, illetve a C-terminális. Perissinotti és mtsai. alapján¹²⁴.

Az I_{Kr} a -40 mV-nál pozitívabb depolarizáció hatására gyorsan aktiválódik, az aktiváció félmaximális feszültségértéke -20 mV és -5 mV közé esik. Mind az aktiváció, mind a deaktiváció függ a membránpotenciáltól, időállandói pedig fajok közti eltérést mutatnak. Az I_{Kr} aktivációs időállandója 100–500 ms^{18,125}, humán szívizomban 100–200 ms^{104,126,127}. Teljes sejtes konfigurációban az áram lefutása időben telítődést mutat inaktivációra utaló jel nélkül. A csatorna elsősorban K^+ ionokra permeábilis, de közel sem annyira szelektív K^+ ionokra, mint pl.

a befelé egyenirányító K^+ áramot (I_{K1}) kialakító ioncsatornák. Egyetlen hERG ioncsatorna fiziológiás konduktanciája mintegy 2 pS^{128} . Munkacsoportunk korábbi kísérletei alapján kutyaszívben az I_{Kr} a plató alatt fokozatosan nőtt, a $0,62 \pm 0,08 \text{ pA/pF}$ nagyságú áramcsúcsot 7 ms -mal a maximális repolarizációs sebesség ($V_{\max}^-$) időpontja előtt érte el⁹⁹.

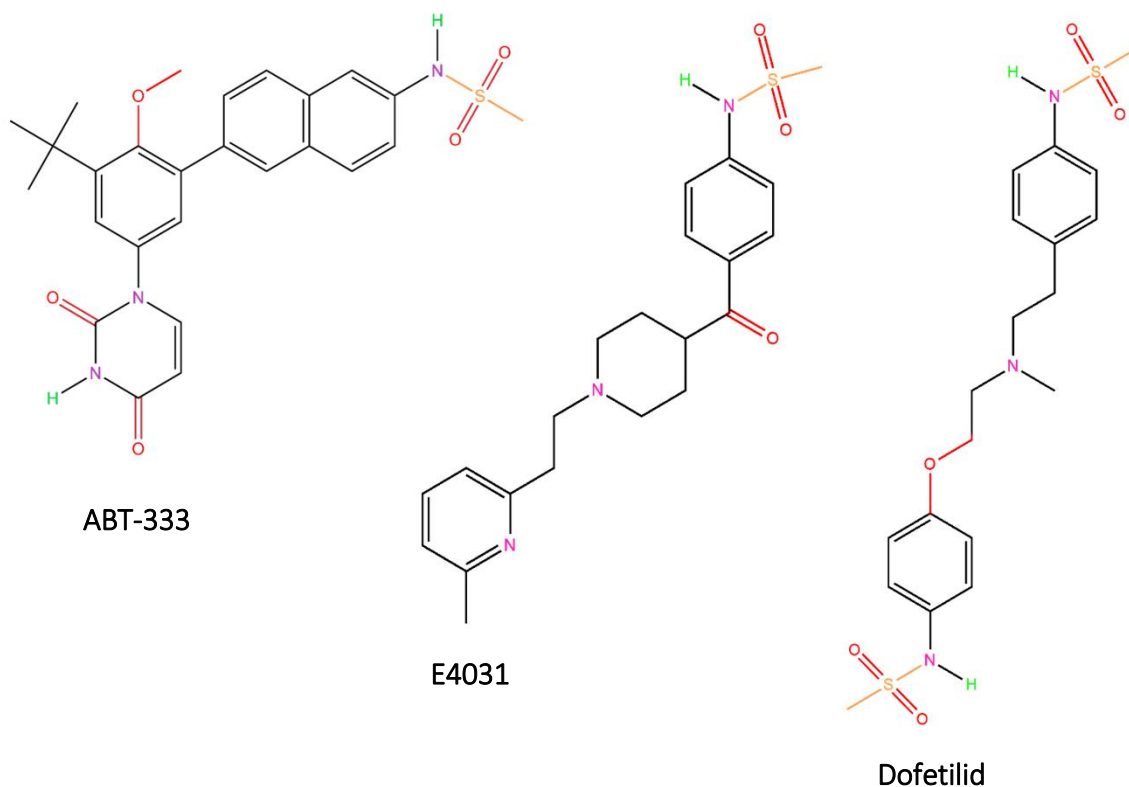
2.5.2. Az I_{Kr} gátlószerei

Az I_{Kr} -nek több szelektív gátlószere is ismert, mint például a dofetilid, az E-4031 vagy a d-Sotalol. Ezen vegyületek közös tulajdonsága, hogy kémiai szerkezetében valamennyi vegyület metánszulfonamid csoportot tartalmaz, továbbá jelentősen megnövelik a kamrai AP időtartamát^{18,21,22,117}. A Vaughan-Williams féle besorolás szerint a III. osztályú antiaritmiás szerek célzottan az I_{Kr} csatornára hatnak¹²⁹.

Az I_{Kr} -t kialakító ioncsatornákat a III. osztályon kívül további antiaritmiás szerek gátolják, például néhány Na^+ csatorna blokkoló (flecainid, amiodaron) is¹³⁰. Az I_{Kr} áramot különböző hatástani csoportba tartozó farmakonok is gátolják. Ilyen például néhány antimikrobás szer (pl. ketokonazol és erythromycin), antihisztaminok (pl. cetirizine, terfenadin, astemizol), gyomor-bélrendszerre ható szer (pl. cisaprid), illetve antipszichotikum (pl. haloperidol) is¹³¹. A felsorolt hatóanyagok szerkezetében legalább egy aromás gyűrű található, illetve az I_{Kr} gátló hatásuk úgy valósul meg, hogy a farmakonok a nyitott ioncsatornák pórusába kötődnek, majd az aktivációs kapu záródása után ott maradnak.

Ahogy arról már korábban szó esett, egyes I_{Kr} blokkolók metánszulfonamid csoportokat tartalmaznak (7. ábra). A jelenleg használt gyógyszerek számos hatóanyaga tartalmazza ugyanezt a funkciós csoportot a kémiai szerkezetében. Ilyen például a rosuvastatin, a szérum koleszterinszint csökkentésére széles körben alkalmazott gyógyszer, amely potenciális I_{Kr} gátló hatással rendelkezik¹³². Ez részben a hERG közvetlen gátlásának köszönhető, ami az áram inaktiválásának felgyorsításával, valamint a hERG fehérje expressziójának csökkentésével jár¹³³. Két másik metánszulfonamid-tartalmú gyógyszer a daganatellenes amszakrin és a nem-szteroid gyulladáscsökkentő nimesulid. Az utóbbi esetében az I_{Kr} gátlására nincsenek adatok, de az amszakrin a hERG-csatornákat nyitott és inaktivált állapotban is blokkolja a pórus S6 régiójába kötődve¹³⁴.

Ezenkívül 2018. május 20-tól az amszakrin a CredibleMeds weboldalán a TdP feltételes kockázatával járó gyógyszerként szerepel¹³⁵.



7. ábra Az ABT-333 és két I_{Kr} blokkoló kémiai szerkezete.

Minden képlet a ChemDrawPro 12.0 szoftverrel készült.

2.5.3. Az ABT-333 (dasabuvir)

Az ABT-333, vagy más néven dasabuvir, egy nem nukleozid típusú hepatitis C vírus (HCV) polimeráz inhibitor, amely metánszulfonamid csoportot tartalmaz (7. ábra). A krónikus HCV-fertőzés kezelésére használják, gyakran más vegyületekkel, például ombitasvirrel, paritaprevirrel és ritonavirral kombinálva^{136–138}.

A krónikus HCV-fertőzés „csendes” járvány, világszerte mintegy 130-170 millió érintett beteggel¹³⁹, és évtizedekig nyugalmi állapotban marad, mielőtt jelentős tünetei jelentkeznének¹⁴⁰. A betegség magas morbiditáshoz és mortalitáshoz vezet, valamint jelentős egészségügyi ellátási költségekkel jár¹⁴¹.

Az ABT-333 tartalmú anti-HCV gyógyszeres kezelés szívre gyakorolt mellékhatásait néhány betegnél észlelték, amiket Li és munkatársai foglaltak össze¹⁴². Ezen mellékhatások közé tartozott az extrém bradikardia¹⁴³, a szívmegállás¹⁴⁴ és a mellkasi fájdalom¹⁴⁵.

Mivel az ABT-333 a máj citokróm P450 2C8 enzim (CYP2C8) által metabolizálódik, a CYP2C8 erős gátlószerei növelhetik az ABT-333 plazmaszintjét, valamint a QT-megnyúlás fokozott kockázatát hordozzák¹⁴⁶. Ez lehet a helyzet a klopidoგრél alkalmazása esetén is, mivel annak glükuronidált metabolitja gátolja a CYP2C8-t¹⁴⁷.

Mivel az ABT-333 metánszulfonamid-csoportot tartalmaz, ezért már önmagában is fennáll a QT-megnyúlás kockázata. Az ABT-333 IC_{50} értéke 2-10 nM tartományba esett a rekombináns HCV-polimeráz (NS5B) ellen¹⁴⁸. Hasonló értékeket (2-8 nM) figyeltek meg a félgátló ABT-333 koncentrációk esetében sejttenyésztési próbák segítségével a HCV szubgenomiális replikonok replikációjának gátlására két genotípus (1a (H77) és 1b (Con1)) esetében, de az értékek 40 % humán plazma jelenlétében jelentősen (kb. 12-13-szorosára), 20-100 nM-ra emelkedtek¹⁴⁸.

Még fontosabb az ABT-333 koncentrációinak összehasonlítása a hatóanyag plazmakoncentrációival a vegyületet anti-HCV-kezelés során szedő betegeknél. A HCV és HIV fertőzés egyidejű fennállása esetén a maximális plazmakoncentráció (C_{max}) az ABT-333-at kombinációban szedő fertőzött betegeknél King és mtsai.¹⁴⁹ szerint körülbelül 600 ng/ml volt, ami körülbelül 1,2 nM-nak felel meg. Egészséges önkénteseknél a naponta kétszeri, 200 mg ABT-333 tartalmú tabletta önmagában történő szedése 500 ng/ml maximális koncentrációt eredményezett, ami körülbelül 1 nM¹⁵⁰. A dózis növelése lineárisan magasabb C_{max} értékeket eredményezett (1,8, 2,9 és 4,2 nM naponta kétszer 400, 600 és 1000 mg tartalmú tabletta esetén). A plazmaszintekben és a felhalmozódási arányban sem volt jelentős napi ingadozás, kivéve az 1000 mg-os dózist, ahol a 10. napra 1,6-szor magasabb koncentráció volt megfigyelhető¹⁵⁰.

Ezenkívül a vese- és májkárosodás (kivéve az utóbbi esetében a súlyos fokút) nem változtatta meg az ABT-333 metabolizmusát, alig befolyásolva a maximális plazmakoncentrációt¹⁵⁰. Az ABT-333 plazmakoncentrációja viszont emelkedhet klopidoget¹⁴⁶ és gemfibrozil¹⁵¹ szedő betegeknél.

3. Célkitűzések

Tekintettel a TRPM4 szívből korábban ismertetett szerepére kutatásaink során az alábbi vizsgálatok elvégzését tűztük ki célul:

- először is a TRPM4 fehérje expresszióját szeretnénk volna bizonyítani.

Célul tűztük ki egy, a közelmúltban kifejezetten a TRPM4-csatorna gátlására kifejlesztett vegyület, a CBA hatásának vizsgálatát a következőkre:

- az akciós potenciál morfológiájára
- a repolarizáció rövid távú variabilitására

Ahhoz, hogy a TRPM4-áram vizsgálható legyen ezzel a vegyülettel, először ki kell zárni a szer más ionáramokra gyakorolt hatását, így

- egyrészt célul tűztük ki a CBA-érzékeny áram felderítését akciós potenciál feszültség-zár (APVC) technikával,
- továbbá vizsgálni kívántuk a CBA hatását a repolarizáció ionáramaira.

Az ABT-333 kémiai szerkezetéből adódóan potenciálisan gátolja az egyik fő repolarizáló áramot (I_{kr}), azonban a szer kamrai AP-ra gyakorolt hatása még nem ismert. Célunk volt tehát megvizsgálni:

- 1 μ M ABT-333 hatását a kutyaszív bal kamrai akciós potenciálra
- az ABT-333 koncentrációfüggő hatásait az AP különböző paramétereire
- az ABT-333-érzékeny áramprofilt APVC technikával
- végül, de nem utolsósorban az ABT-333 hatását expresszált hERG-csatornákon.

Természetesen kísérleti céllal egészséges humán szívből származó sejtekhez jutni nem egyszerű, ezért kísérleteinkhez a bal kamrai szívmusclesejteket kutyák szívéből izoláltuk, amely elektrofiziológiai szempontból a humán szívmusclesejtek egyik legjobb modellje¹⁵².

4. Anyagok és módszerek

4.1. A kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából enzimatikusan izolált szívizomsejtjein végeztük¹⁵³. A sejteket vegyes nemű és fajtájú, általában 1-3 év körüli, ivarérett, kísérleti célra tenyésztett állatok szívéből nyertük. A 10-15 kg tömegű kutyák túlaltatásához intramuszkulárisan beadott 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország) és 1 mg/kg xylazin-hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV, Bladel, Hollandia) elegyét tartalmazó injekciót használtunk. Az alkalmazott protokollunk összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publikációs száma: 85-23., 1996. évben átdolgozott verzió) és a Helsinki Deklaráció 1964-ben lefektetett alapelveivel. A kísérleti protokollt jóváhagyta a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is (engedély száma: 9/2015/DEMÁB). Az állatokon végrehajtott fájdalommentes mélyaltatást akkor tekintettük megfelelőnek, amikor cornea reflex nem volt kiváltható, valamint az állat nem reagált fájdalomingerre.

A mellkast a bal oldali scapula csúcsát és a processus xyphoideust összekötő vonal mentén, a 4 vagy 5. bordaközben nyitottuk meg, majd a szívet gyors kiemelést követően hideg (4-8 °C) fiziológiás Tyrode oldatba (összetétel: 144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES (4-(2-hidroxietil) piperazin-1- etánszulfonsav), 10 mM glükóz, pH=7,4) helyeztük. Ezt követően az anterográd szegmentperfúziós technikát alkalmaztuk, melyhez először a bal elülső leszálló koronáriát kanuláltuk¹⁵⁴. Így Langendorff apparátus segítségével ezen koronária vérellátási területét perfundáltuk a szívizom extracelluláris mátrixát emésztő enzimmel.

Az emésztést megelőzően a vér és Ca²⁺ eltávolítása céljából a szívet mintegy 5 percen keresztül Ca²⁺-mentes JMM oldattal (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) perfundáltuk. A JMM oldatot taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l), NaH₂PO₄-tal (200 mg/l), illetve NaHCO₃-tal (1,4 g/l) egészítettük ki. A perfúziós oldatot karbogén gázzal (95 % O₂ + 5 % CO₂) kevertettük és 37 °C-ra melegítve használtuk. Ezután következett a mintegy 30-40 perc hosszú emésztés, amit 1 mg/ml koncentrációjú kollagenáz enzimmel (Type II., 305 U/mg; Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA), 0,2 % borjú albuminnal (2 g/l, Fraction V.; Sigma-Aldrich Co.) és 50 µM CaCl₂-del kiegészített JMM oldattal végeztünk.

Az emésztést követően U alakú bemetszést ejtettünk a perfundált és emésztett területen, majd a bemetszett kamrafalból szike segítségével szabadítottuk ki a sejteket és Ca^{2+} -t tartalmazó JMM oldatban szuszpendáltuk. A sejteket 4 lépcsős szűrési és további 2 lépcsős mosási folyamatnak vetettük alá, megtisztítva a szeparált sejteket tartalmazó szuszpenziót a szöveti törmelékektől. A folyamat során az oldat Ca^{2+} tartalmát fokozatosan emeltük és állítottuk fiziológiás értékre. Az elektrofiziológiai kísérletekig a sejteket MEM tápoldatban (Minimum Essential Medium Eagle, pH=7,4, $[\text{Ca}^{2+}]$ 2,5 mM, Sigma-Aldrich Co.) 15 °C-os hőmérsékleten tároltuk.

A sejteket jelentős stressz érte az enzimatikus emésztés során, ezért a sejtek regenerációjának időt hagyva, a kísérleteinket csak néhány órával később kezdtük meg. A sejszuszpenzióban általában kb. 50 % volt az élő sejtek aránya, amelyek téglalap alakúak, éles szélekkel, valamint ép harántcsíkolattal és tiszta citoplazmával rendelkeztek. Kísérleteink során csak az ép, élő sejteket használtuk fel. A sejtek általában az izolálást követő mintegy 36 órán belül voltak alkalmasak az elektrofiziológiai mérésekre.

4.2. Elektrofiziológiai mérések

A sejteket 1 ml térfogatú plexikamrába helyeztük és folyamatosan bikarbonát pufferrel kiegészített Tyrode-oldattal perfundáltuk. A perfundáló oldat összetétele: NaCl 121 mM; KCl 4 mM; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 1,3 mM; HEPES 10 mM; glükóz 10 mM; NaHCO_3 25 mM; (pH=7,3; NaOH-val beállítva) volt, amely kb. 2 ml/perc sebességgel áramlott be a mérőkádba a gravitáció hatására. A mérőkádban lévő folyadék térfogatának állandó értéken tartását folyamatos elszívás biztosította. A kísérletek során a kádban lévő oldat hőmérsékletét egy hőmérséklet-szabályozóval (Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA) 37°C-ra állítottuk be. A sejteket egy rezgéscsillapító asztalon (Newport, Rochester, NY, USA) Faraday kalitkában elhelyezett inverz mikroszkóppal vizualizáltuk. Az elektromos jeleket intracelluláris erősítővel (MultiClamp 700A, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), analóg-digitális átalakítás után (Digidata 1440A, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) pClamp 10 szoftverrel (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) rögzítettük.

4.3. A szívizomsejtek akciós potenciáljának elvezetése

Az akciós potenciálokat 3 M KCl-t tartalmazó, 20-50 M Ω ellenállású boroszilikát mikroelektrodákkal mértük. Az 1 s ciklushosszúságú steady-state ingerlést egy elektronikus

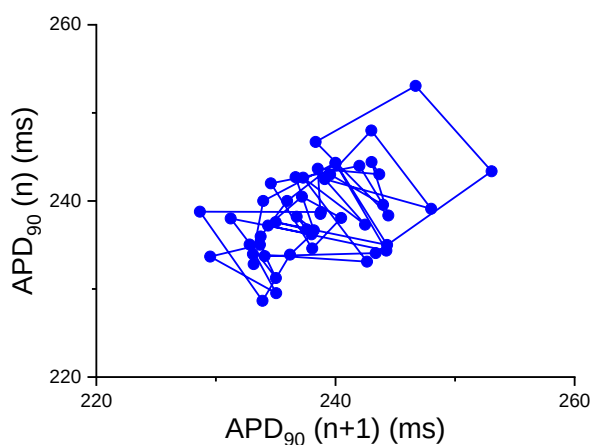
stimulátorral (DS-R3; Főnixcomp Kft., Debrecen, Magyarország) előállított, 2 ms időtartamú, a küszöbérték 120-130 %-ának megfelelő nagyságú áramimpulzusokkal végeztük. Az AP-ket 50 kHz-es frekvencián digitalizáltuk, kiértékelésük során, az AP morfológia időbeli változékonyságának csökkentésére, tíz egymást követő AP-ból a következő paramétereket határoztuk meg, majd a 10-10 egymást követő AP esetén kapott értékeket átlagoltuk: APD_{50} , APD_{75} és APD_{90} értékek (az AP időtartama a csúcstól a repolarizáció 50, 75 és 90 %-áig), a 0., 1. és 3. fázis maximális sebessége ($V_{\max}^+$, $V_{Ph1\max}$ és $V_{\max}^-$), nyugalmi membránpotenciál (RMP), túllövési potenciál (OSP), APA (akciós potenciál amplitúdó, amelyet az OSP és az RMP különbségeként határoztunk meg), $Plat_{020}$ és $Plat_{050}$ amplitúdó (a nyugalmi membránpotenciál és a 90 %-os repolarizációig eltelt idő 20, illetve 50 %-ánál mért membránpotenciál értékek közti különbség) valamint a membránpotenciál értéke az APD_{90} érték 50 %-ánál ($Plat_{050}$).

4.4. Az akciós potenciál repolarizáció variabilitásának elemzése

50 egymást követő akciós potenciálból álló sorozatot rögzítettünk a korábban leírtak szerint és offline elemeztük a repolarizáció rövid távú variabilitásának (SV) becslése céljából a következő képlet segítségével:

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

ahol SV a rövid távú variabilitás, APD_n és APD_{n+1} az n-edik és n+1-edik AP APD_{90} értékét jelöli, i pedig az elemzett egymást követő AP-k számát jelöli^{155,156}. Az 50 egymást követő APD_{90} értékekből készített Poincaré-diagram (8. ábra) segítségével szemléltettük az SV-változásokat.



8. ábra A rövid távú variabilitás (SV) szemléltetése Poincaré-diagram segítségével.

Mivel az SV értéke erősen függ az APD₉₀ értékétől¹⁵⁵, az SV legjobban az APD függvényében ítéltethető meg. A repolarizációs variabilitás további elemzéséhez az egymást követő APD₉₀ értékek közötti különbségeket tartományokba csoportosítottuk (20 ms alatt 1 ms-os tartományokba, 20 ms felett pedig 5 ms-os tartományokba) és minden egyes sejtben kiszámítottuk a megjelenésük valószínűségét¹⁵⁷. Ezután ezen adatok átlagát ábráztuk, hogy szemléltessük az APD értékek ütésről ütésre történő változékonyságát.

4.5. Feszültség-zár vizsgálatok

A membránáramok rögzítése patch-clamp technikával¹⁵⁸ történt teljes sejt konfigurációban. A sejteket 37°C-on bikarbonát pufferrel kiegészített Tyrode-oldattal perfundáltuk (összetételét lásd fentebb). Az ebbe merített, belső oldattal (K-aszpartát 100 mM; KCl 45 mM; BAPTA 10 mM; HEPES 5 mM; K₂ATP 3 mM; MgCl₂ 1 mM; KOH 10 mM) feltöltött boroszilikát üveg mikropipetták hegye 2-3 MΩ ellenállással rendelkezett. A pipettaoldat pH-ját KOH segítségével 7,3-ra, ozmolalitását gőznyomásos ozmométerrel (Vapro 5520, Wescor Inc., Logan, UT, USA) 287-290 mmol/kg-ra állítottuk be. A magas (1-10 GΩ) ellenállású kapcsolat („gigaseal”) enyhe szívással történő létrehozása után a mikropipetta csúcsa alatti sejtmembránt további szívással, esetleg fújással, és/vagy 1,5 V-os elektromos impulzusok 1 ms-ig történő alkalmazásával megbontottuk. A soros ellenállás jellemzően 4-6 MΩ volt a kompenzáció előtt (általában 50-80 %). A kísérleteket elvetettük, ha a soros ellenállás magas volt vagy a mérés során jelentősen megnőtt.

Az ionáramok normalizálása a sejtkapacitásra történt, amit a -80 mV-os tartófeszültségről 20 ms hosszú, 0 mV-ra történő depolarizációt követő, 45 ms hosszú, -10 mV-ra történő hiperpolarizáló impulzusok alkalmazásával határoztunk meg. A sejtkapacitás átlagos értéke $144,1 \pm 3,8$ pF volt a vizsgált karidomiociták átlagában. A kísérletekben alkalmazott feszültségprotokollt és az oldatok közötti esetleges különbségeket az eredmények releváns részében ismertetem.

Az akciós potenciál feszültség-zár kísérleteket a korábban leírt hagyományos feszültség-zárhoz hasonló módszer szerint végeztük és a jeleket 50 kHz-es frekvencián digitalizáltuk. A kísérletek során a sejteket egy úgynevezett "kanonikus" AP-val ingereltük, mely egy midmiokardiális sejtben 700 ms ciklushosszúságú ingerlési frekvenciával korábban rögzített, átlagos alakú AP.

A CBA-érzékeny áramot farmakológiai kivonással kaptuk: a 10 μM CBA jelenlétében rögzített áramjeleket kivontuk a kontrollban (Tyrode-oldatban) mért jelekből^{153,159}. A 10 μM CBA-val kezelt sejteket (Tocris Bioscience, termékszám: 6724) 5 percig perfundáltuk CBA-val, amit 5 perces kimosás követett. A CBA-t tömény DMSO-ban oldottuk. Az ABT-333-érzékeny áram meghatározása szintén farmakológiai kivonással történt. 1 μM ABT-333 mintegy 15 perc hosszú alkalmazását 20 perces kimosás követte. A magasabb ABT-333 koncentrációk alkalmazásakor (1-3-10-30 μM) minden koncentrációt köztes kimosás nélkül, egyenként 5 percig alkalmaztunk. Az ABT-333-at szintén tömény DMSO-ban oldottuk. A végső DMSO-koncentráció a CBA-s kísérletek esetében 0,1 % volt, az ABT-333-as kísérletek esetében 1,5 % volt a legmagasabb, 30 μM ABT-333 alkalmazásakor, ami nem befolyásolta a vizsgált fiziológiai paraméterek egyikét sem.

4.6. A hERG-áramok rögzítése

Kísérleteink következő szakaszában feszültség-zár technikával, teljes-sejt elrendezésben hERG-csatornákat stabilan expresszáló HEK sejteken ionáramot vizsgáltunk. Az áramot Digidata 1550B analóg-digitális átalakítóval való konverzió után Axopatch 200B erősítővel mértük (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). A 3-5 M Ω ellenállású mikropipettákat GC 150F-15 boroszilikát üvegkapillárisokból (Harvard Apparatus, Hollister, MA, USA) három lépésben húztuk. A sejteket a mérés előtt közvetlenül a regisztráló Petri-csészében kontroll oldatban (kolin-klorid 140 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 2 mM; CaCl₂ 2 mM; glükóz 20 mM; HEPES 10 mM és CdCl₂ 0,1 mM; pH = 7,35 (NaOH-val beállítva)) tartottuk. A mérésekhez a patch-pipettában használt oldat (belső oldat) összetétele: KCl 140 mM; HEPES 10 mM; MgCl₂ 2 mM; és EGTA 10 mM; pH = 7,3 (KOH-val beállítva).

Annak vizsgálatára, hogy a töltéshordozó K⁺ volt-e, pozitív kontrollként, emelt kálium koncentrációjú oldatot (összetétel: KCl 150 mM; HEPES 10 mM; glükóz 5,5 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 1 mM; pH = 7,3 (KOH-val beállítva)) használtunk.

Az ABT-333-at 1, 3, 10 és 30 μM koncentrációra hígítottuk. Mivel az ABT-333 DMSO-ban oldódott, a kontroll oldathoz 1,5 % V/V arányban DMSO-t is adtunk. Az oldatcserét gravitációs áramlású rendszerrel valósítottuk meg, a felesleges folyadék folyamatos eltávolításával. A feszültség-zár mérésekhez -80 mV-os tartófeszültséget használtunk. A patch-clamp adatokat a pClamp10 program (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) segítségével rögzítettük. Az áramokat az erősítőbe beépített analóg négypólusú aluláteresztő Bessel-szűrő segítségével

szűrtük és 20 kHz-es mintavételezéssel rögzítettük. Az elemzés előtt a sejtek teljes áramgörbéit digitálisan ötpontos boxcar simításnak vetettük alá. A kísérleteket szobahőmérsékleten (20-24°C) végeztük. Az adatok megjelenítéséhez és elemzéséhez a Clampfit 10.7 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) és a Graphpad Prism 7 (Graphpad, San Diego, CA, USA) programot használtuk.

A G-V görbéket a farokáramok normalizálásával hoztuk létre és Boltzmann-egyenlettel:

$$G = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_{1/2} - V}{k}}}$$

illesztettük, ahol k a meredekség, V a membránpotenciál és V_{1/2} a félérték feszültség.

A koncentráció-hatás görbét Hill-egyenlettel:

$$RCF = \frac{1}{1 + \frac{[c]^{nH}}{IC_{50}^{nH}}}$$

illesztettük, ahol RCF a megmaradó áramhányad, nH a Hill-koefficiens, [c] az ABT-333 koncentráció és az IC₅₀ a félgátló koncentráció. Az RCF értékét a következő egyenlettel számoltuk: RCF = I_{ABT-333} / I_{Kontroll}, ahol I_{ABT-333} az ABT-333 jelenlétében mért farokáram, I_{Kontroll} pedig a kontroll oldatban mért farokáram.

Az időfüggést egyexponenciális egyenlettel illesztettük:

$$Y = (Y_0 - C)e^{\frac{-t}{\tau}} + C$$

ahol Y₀ az Y értéke (t)=0 időpillanatban, C a pulzus végén mért áram és τ az időállandó.

4.7. Fehérjeminta előkészítése és Western blot analízis

A Western blot kísérletekhez teljes sejtlyázátumokat állítottunk elő kutyák bal kamrai szívműködéséből és szív szövetmintákból (a szív négy üregének falából izolálva) mechanikai módszerekkel: a szövetmintákból származó sejtlyázátumokat a sejtek rozsdamentes acélgolyókkal történő roncsolásával, míg az izolált kamrai sejteket szonikációval.

A fehérjekoncentrációt BCA (Bicinchoninic acid) fehérje-tesztel (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) határoztuk meg, majd a mintákat SDS-PAGE-nek (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis) vetettük alá (10 %-os gélek, sávonként 20 µg fehérjével töltve) és nitrocellulóz membránokra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) vittük át.

A membránokat PBS (Phosphate Buffered Saline) alapú 5 %-os, nem-zsíros tejport tartalmazó oldattal blokkoltuk, majd anti-TRPM4 primer antitestekkel (OriGene Technologies,

Rockville, MD, USA, TA500381, OTI10H5 klón, egér-IgG, poliklonális, 1:1500) inkubáltuk, amelyet HRP-konjugált szekunder antitest jelölés követett 1:1000 hígításban. Az primer-szekunder antitest komplexeket egy erősített kemilumineszcenciájú Western blotting Pico vagy Femto kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) segítségével, detektáltuk egy Fujifilm Labs-3000 készülékkel.

A membránokat ezután (a TRPM4 elleni antitest lemosása) α -aktinin-specifikus jelölésnek vetettük alá (1:1000; Santa Cruz BioTechnology, Dallas, USA). Az expressziós szintek számszerűsítéséhez háttérrel korrigált denzitometriát végeztünk ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével. A TRPM4-specifikus sávok optikai sűrűségét a minták α -aktininre specifikus sávjára normalizáltuk.

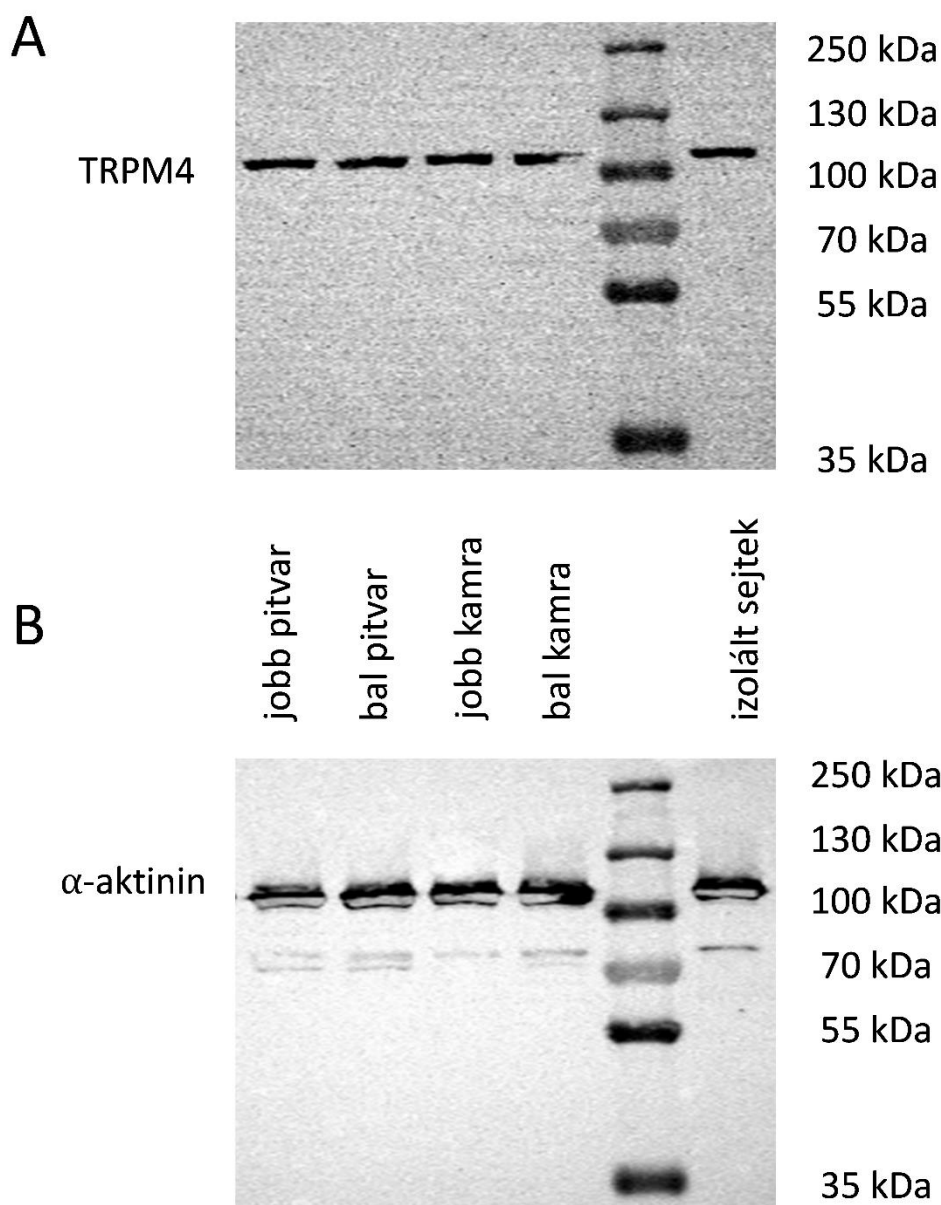
4.8. Statisztikai analízis

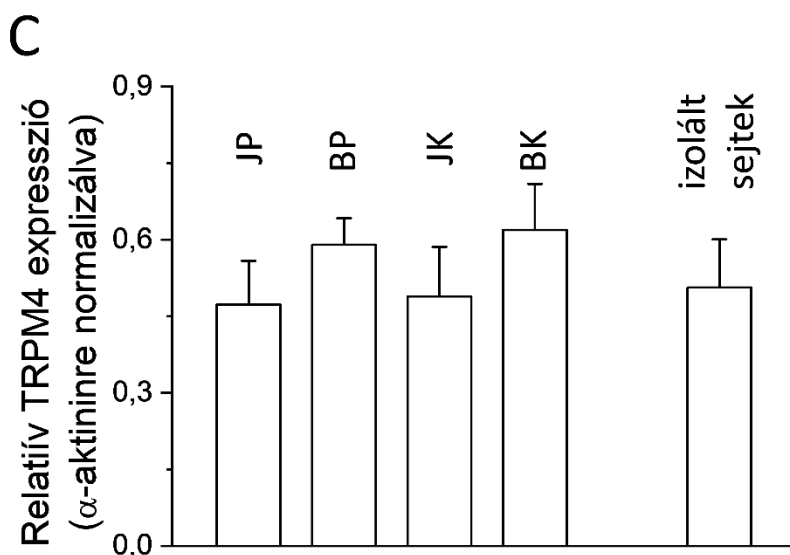
Minden érték számtani átlagként $\pm$ az átlag standard hibájaként (SEM) szerepel. Tekintettel a sejtek közötti biológiai változékonyságra, a statisztikai vizsgálatokban minden egyes sejtet függetlenként kezeltünk, bár ugyanabból az állatból több sejtet is nyer(het)tünk. A munkában az n értékek a vizsgált sejtek számát jelzik. A különbségek statisztikai szignifikanciáját JASP programban (verzió: 0.16.3.0) eloszlás és szóráshomogenitás vizsgálatát követően egyirányú ANOVA, majd Student féle t-próba segítségével értékeltük. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p kisebb volt, mint 0,05, amit a grafikonokon csillagok jeleznek.

5. Eredmények

5.1. A TRPM4 fehérje expressziója

A fehérje expressziós vizsgálatokhoz öt állatból gyűjtöttünk szövetmintákat és izolált bal kamrai sejteket. A fehérjék elektroforézissel történő szétválasztását és az azt követő megfelelő antitestekkel történő jelölést minden mintánál legalább kétszer végeztük el. A TRPM4 a szív mind a 4 üregének falában, valamint izolált bal kamrai sejtjeiben is kimutatható volt (9. ábra). A TRPM4 expresszióját minden esetben az α -aktinin expressziójára normalizáltuk. A relatív expresszió értékei $0,47 \pm 0,08$; $0,59 \pm 0,05$; $0,49 \pm 0,10$; $0,62 \pm 0,09$ és $0,51 \pm 0,09$ voltak sorrendben a jobb pitvarból, bal pitvarból, jobb kamrából, bal kamrából és izolált bal kamrai sejtekből származó minták esetében, melyek között nem volt szignifikáns különbség.





9. ábra A TRPM4 expressziója a kutyaszív különböző részeiben.

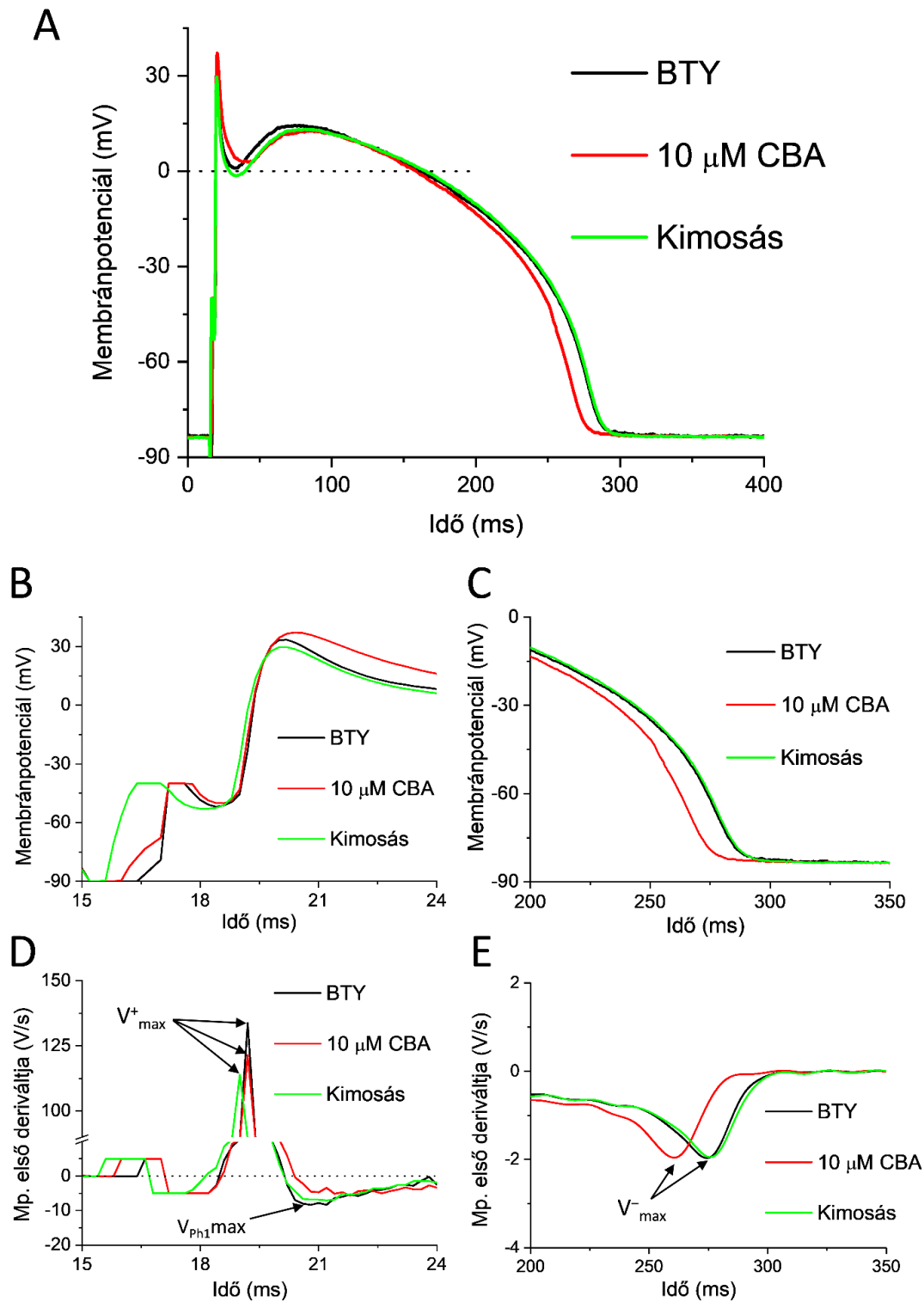
Reprezentatív Western blot képek a TRPM4 (A) és az α -aktinin (B) expressziójával a képen feltüntetett mintákban. A jobb oldali molekulatömegek a balról az 5. sávban látható fehérje létrára vonatkoznak. Az α -aktinin expresszióra normalizált TRPM4-expresszió (C) átlag $\pm$ SEM értékei a különböző, oszlopok tetején jelölt mintákban. Az állatok száma minden esetben 5 volt és legalább 8 független blotot elemeztünk.

5.2. A CBA hatása az akciós potenciál morfológiájára

Az AP-eket 3 M KCl-dal töltött hegyes mikroelektrodákkal rögzítettük, amely technika a legközelebb áll a fiziológias helyzethez (változatlan intracelluláris tér, nem pufferelt Ca^{2+} koncentrációval). Hat állatból izolált nyolc sejtet 5 percig 10 μM CBA-val perfundáltuk, majd a kísérlet végén 5 perces kimosási periódust alkalmaztunk. Az AP paramétereinek átlagát jól reprezentáló AP és annak idő szerinti első deriváltja látható a 10. ábrán. A CBA nem változtatta meg a nyugalmi membránpotenciált (RMP), a túllövési potenciált (OSP), a membránpotenciál APD időtartamának felénél mért értékét (Plat_{50}) és a 3. fázis maximális sebességét (V_{max}) (1. táblázat).

	RMP (mV)	OSP (mV)	Plat_{50} (mV)	V_{max} (V/s)
Kontroll körülmények között	$-86,3 \pm 0,9$	$31,0 \pm 2,1$	$1,3 \pm 3,0$	$-1,5 \pm 0,1$
10 μM CBA jelenlétében	$-85,2 \pm 1,4$	$32,4 \pm 1,9$	$3,5 \pm 4,6$	$-1,6 \pm 0,1$
CBA kimosása után	$-84,8 \pm 1,5$	$29,7 \pm 1,7$	$3,4 \pm 4,1$	$-1,5 \pm 0,1$

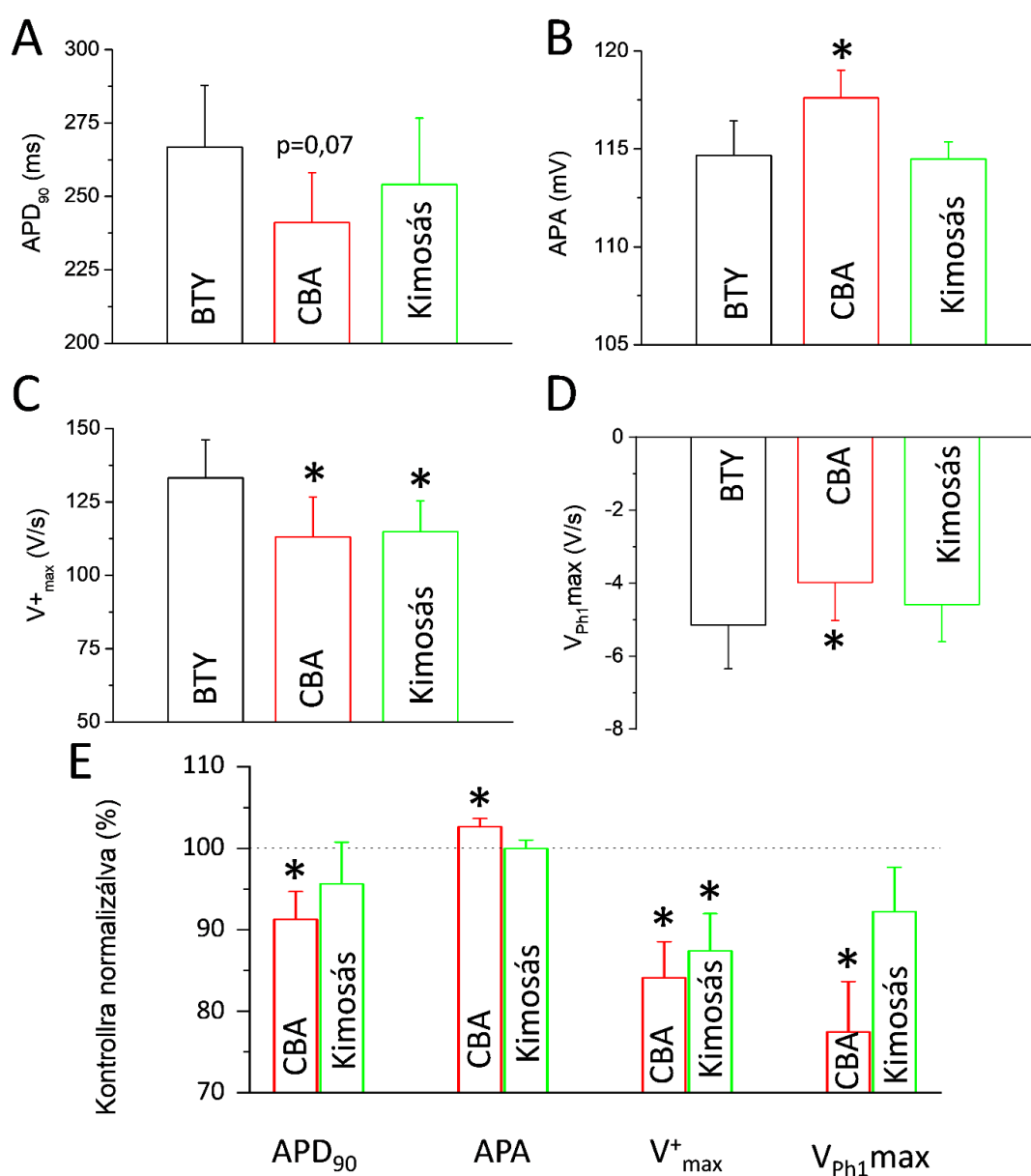
1. táblázat A CBA által nem befolyásolt AP paraméterek 6 állatból származó 8 sejten vizsgálva



10. ábra A CBA hatása a kutya bal kamrai sejtek akciós potenciáljaira (AP).

Reprezentatív AP-k (A), amelyeket kontroll körülmények között (fekete), a TRPM4 inhibitor 10 μ M CBA jelenlétében (piros) és a CBA kimosása után (zöld) rögzítettünk. Az AP-k kezdeti része (B) és terminális repolarizációja (C) nagyítva. A (B) panel görbéinek első deriváltja (D), amely a depolarizáció és a korai repolarizáció (1. fázis) maximális sebességeit (V_{max}^+), illetve (V_{ph1max}) szemlélteti. A (C) panel görbéinek első deriváltja (E), amely a késői repolarizáció maximális sebességét (V_{max}^-) mutatja. A (B) és (D) panelen a jobb láthatóság érdekében 15 és 18 ms között az ingerlési artefaktumokat és azok deriváltját csökkentettük.

A CBA jelenlétében az AP időtartamának rövidülésére minden vizsgált repolarizációs szinten mutatkozott tendencia. Az AP időtartama (APD) az AP csúcstól a repolarizáció 50, 75 és 90 %-áig (rendre APD₅₀, APD₇₅ és APD₉₀) az alábbiak szerint csökkent CBA jelenlétében: APD₅₀: $214,7 \pm 22,3$ ms versus $191,9 \pm 18,2$ ms ($p = 0,09$); APD₇₅: $254,2 \pm 21,2$ ms versus $229,0 \pm 17,4$ ms ($p = 0,07$); APD₉₀: $266,8 \pm 21,0$ ms versus $241,1 \pm 17,0$ ms ($p = 0,07$). A CBA jelentősen és szignifikáns mértékben csökkentette a depolarizáció maximális sebességét ($V_{\max}^+$: $133,2 \pm 12,9$ V/s versus $113,1 \pm 13,6$ V/s). A korai repolarizáció maximális sebessége szintén szignifikáns mértékben csökkent CBA-ban (V_{Ph1max} : $-5,1 \pm 1,2$ V/s versus $-3,9 \pm 1,0$ V/s); az APA értéke azonban szignifikáns mértékben nőtt ($114,7 \pm 1,8$ mV versus $117,6 \pm 1,4$ mV) (11. A-D ábra).



11. ábra A CBA hatása az akciós potenciál paramétereire.

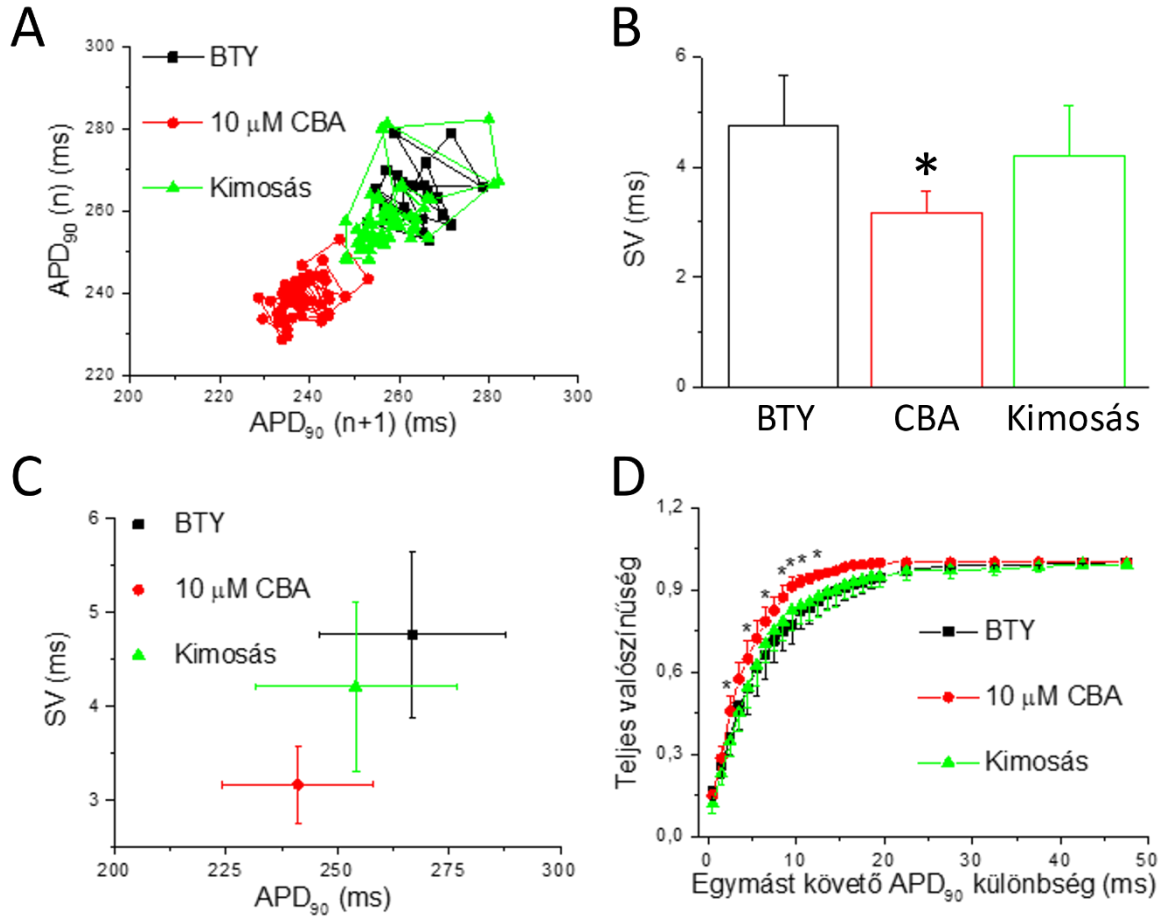
Az AP paramétereket bemutató diagramok kontroll körülmények között (BTY, fekete),

CBA jelenlétében (10 μ M, piros) és a CBA kimosása után (zöld). 6 állatból származó 8 sejtben mért repolarizáció 90 %-ánál mért akciós potenciál időtartam (A), akciós potenciál amplitúdó (APA) (B), depolarizáció maximális sebesség (V_{max}^+) (C) és korai repolarizáció maximális sebesség (V_{ph1max}) paraméterek átlag $\pm$ SEM értékei. (E) Ugyanezen négy paraméter kontroll körülményekre normalizálva átlag $\pm$ SEM értékei a CBA jelenlétében (piros oszlopok) és a CBA kimosása után (zöld oszlopok). A csillagok a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik.

Az APD₇₅ és az APD₉₀ esetében a statisztikai szignifikanciát csak az abszolút értékek normalizálása után értük el. Az APD₇₅ 91,0 $\pm$ 3,6 %-ra, az APD₉₀ pedig 91,3 $\pm$ 3,4 %-ra csökkent a CBA jelenlétében (11.E ábra). Kimosáskor a CBA szinte minden fent említett hatása reverzibilis volt (11. ábra), az egyetlen kivétel a depolarizáció maximális sebessége volt, a V_{max}^+ 114,9 $\pm$ 10,4 V/s maradt a kimosás után.

5.3. A CBA hatása a repolarizáció rövid távú variabilitására

A kamrai repolarizáció rövid távú variabilitásának elemzését ugyanezen nyolc vizsgált sejtben végeztük el. Az APD₉₀ a szív AP-k időtartamának közelítésére szolgált, abból számoltunk a módszereknél leírtak szerint SV és relatív SV értékeket. A 12.A ábrán látható reprezentatív Poincaré-diagram az AP-k reverzibilis rövidülését mutatja 10 μ M CBA jelenlétében. Az SV értéke (12.B ábra) szignifikánsan kisebb, mintegy 27 %-kal alacsonyabb volt a CBA-ban a kontroll körülményekhez képest (4,8 $\pm$ 0,9 ms versus 3,2 $\pm$ 0,4 ms). Ez a csökkenés reverzibilis volt (SV a kimosás után: 4,2 $\pm$ 0,9 ms). Mivel az SV értéke magától az APD-től függ, ezért az SV értékeket a megfelelő APD értékek függvényében ábráztuk, hogy szemléltessük a CBA hatását és annak reverzibilitását (12.C ábra). Továbbá, az egymást követő APD₉₀ értékek különbségeinek szórását bemutató kumulatív eloszlási görbe a CBA jelenlétében reverzibilis módon eltolódott a kisebb APD különbségek felé (12.D ábra).



12. ábra A kamrai repolarizáció rövid távú variabilitása.

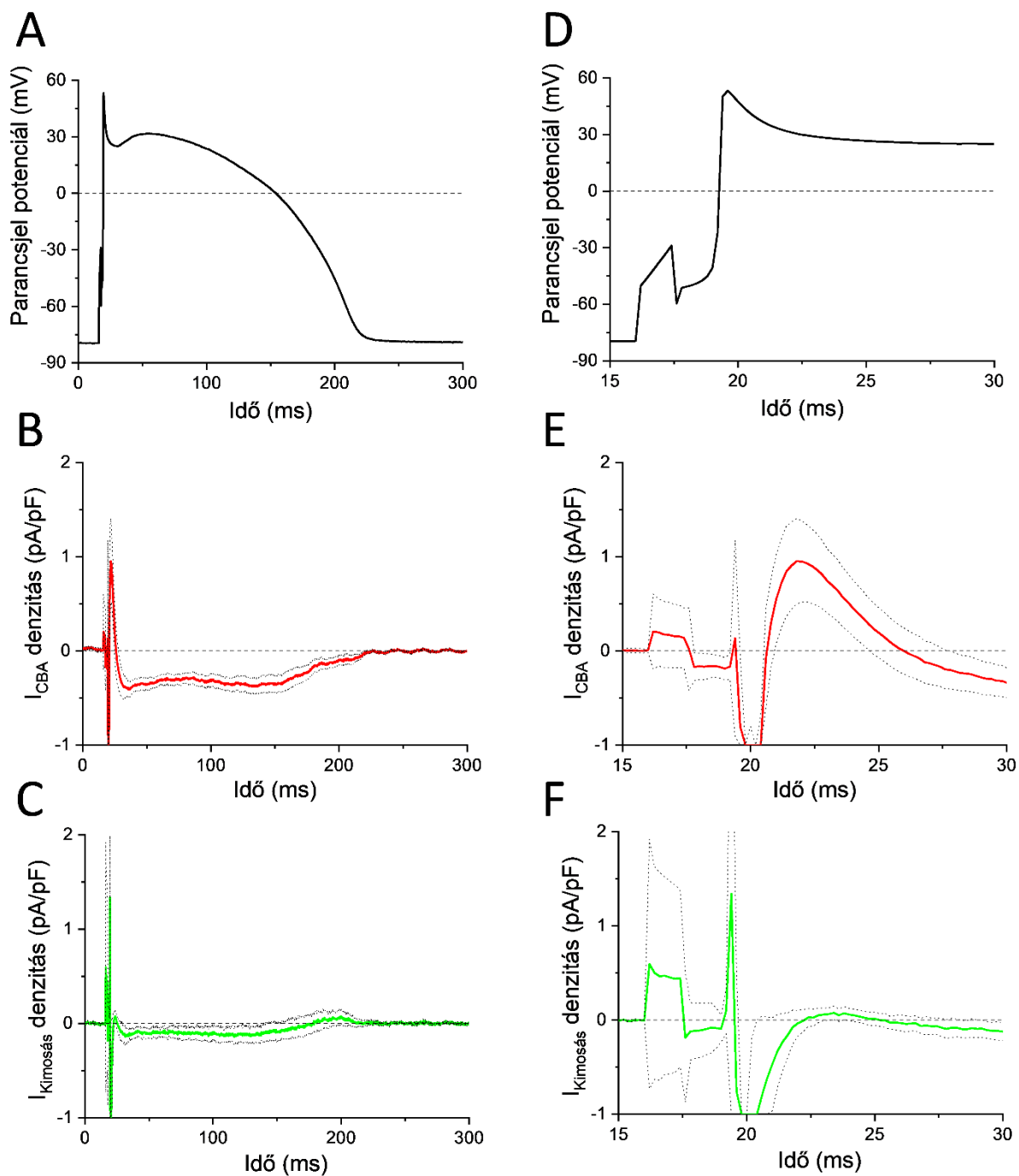
(A) Egy reprezentatív kísérlet Poincaré-diagramja, amely az egymást követő APD_{90} értékeket mutatja kontroll körülmények között (fekete négyzetek), 10 μ M CBA jelenlétében (piros teli körök) és a CBA kimosása után (zöld háromszögek). (B) A kamrai repolarizáció rövid távú variabilitásának (SV) átlag $\pm$ SEM értékei, amelyeket 6 állatból izolált 8 sejtben kaptunk. (C) Az SV átlag $\pm$ SEM értékei az APD_{90} értékek átlag $\pm$ SEM értékeinek függvényében. (D) 6 állatból származó 8 mérésből készített, egymást követő APD_{90} különbségek teljes valószínűsége kontroll (fekete), CBA (piros) és kimosás utáni (zöld) körülmények között. A csillagok statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak a BTY-hez képest.

5.4. Az APVC technikával mért CBA-érzékeny áram

Ezt követően meg akartunk bizonyosodni arról, hogy a CBA szelektív a TRPM4-re, vagyis a megfigyelt hatások nem a TRPM4-től eltérő ionáramok CBA általi befolyásolása miatt jöttek létre. Ezért teljes sejtes patch-clamp méréseket végeztünk 10 mM BAPTA-t tartalmazó belső oldattal. A BAPTA pufferelem az intracelluláris Ca^{2+} tartalmat és így megakadályozható a TRPM4-csatornák aktiválódása. Kísérleteinkben a CBA alkalmazását csak akkor kezdtük meg, ha meggyőződünk a BAPTA alkalmazásra jellemző AP nyúlásról.

A CBA-érzékeny áramokat (I_{CBA}) három állatból izolált öt egyedi sejtben mértük és normalizáltuk a sejtkapacitásra a Módszerek 4.5. pontban leírtak szerint. Az I_{CBA} rövid kifelé irányuló komponenssel rendelkezett az AP korai repolarizációs fázisában (13.E ábra) és egy sokkal hosszabb befelé irányuló komponenssel az AP további részében (13.B ábra). Az áramok részletes elemzését a 2. táblázat foglalja össze, ahol az $I_{\text{Kimosás}}$ árammérések eredményei (10 μM CBA kimosása után rögzített áramgörbe kivonása a kontroll körülmények között (Tyrode-oldatban) mért áramgörbéből) is szerepelnek.

Az egyik sejt esetében a befelé irányuló csúcs sokkal később jelentkezett (I_{CBA} és az $I_{\text{Kimosás}}$ esetében az AP csúcspontja után 141, illetve 145 ms-mal), mint a többinél, ezért azt kizártuk az átlagolásból. A CBA hatása reverzibilis volt (13.C és 13.F ábra), amint azt az I_{CBA} és az $I_{\text{Kimosás}}$ közötti statisztikai szignifikancia jelzi bizonyos paramétereknél (2. táblázat). A reverzibilitást a CBA legtöbb, hagyományos mikroelektrodákkal rögzített AP paraméter kapcsán is tapasztaltuk (10-12. ábra).



13. ábra Akciós potenciál feszültség-zár mérésekkel rögzített CBA-érzékeny áram.

(A) A stimulációhoz használt feszültség parancsjel (kanonikus AP). (B) A 3 állatból izolált 5 sejtben kapott CBA-érzékeny áramsűrűség átlaga (folytonos piros vonal) $\pm$ SEM (szaggatott vonalak). (C) A CBA kimosása után a kezdeti 5 sejtből 4-ben mért áramsűrűségek átlaga (folytonos zöld vonal) $\pm$ SEM (szaggatott vonalak). (D-F) A megfelelő bal oldali panelek 15 és 30 ms közötti részei kinagyítva.

	I_{CBA}	$I_{Kimosás}$
*Korai kifelé irányuló csúcsáram denzitás (pA/pF)	$1,38 \pm 0,32$ (n=5)	$0,16 \pm 0,06$ (n=4)
Korai kifelé irányuló áramcsúcs ideje az AP csúcstól mérve (ms)	$2,33 \pm 0,48$ (n=5)	$3,49 \pm 0,47$ (n=4)
A kifelé irányuló komponens által szállított töltés (fC/pF)	$3,94 \pm 1,58$ (n=5)	$0,54 \pm 0,22$ (n=4)
*Befelé irányuló csúcsáram denzitás (pA/pF)	$-0,53 \pm 0,06$ (n=5)	$-0,25 \pm 0,07$ (n=4)
Befelé irányuló áramcsúcs ideje az AP csúcstól mérve (ms)	$11,73 \pm 0,67$ (n=4)	$9,41 \pm 3,34$ (n=3)
*A befelé irányuló komponens által szállított töltés (fC/pF)	$-55,33 \pm 11,42$ (n=5)	$-19,68 \pm 9,03$ (n=4)
*A befelé irányuló áramdenzitás a $Plat_{50}$ -nél mérve (pA/pF)	$-0,35 \pm 0,07$ (n=5)	$-0,13 \pm 0,09$ (n=4)

2. táblázat A CBA- és a kimosás szenzitív áram paraméterei APVC-kísérletekben.

Az adott paraméterek I_{CBA} és $I_{Kimosás}$ értékei közötti szignifikáns különbségeket a paraméter neve előtt csillaggal jelöltük.

5.5. A CBA hatása a repolarizáció ionáramaira

Az APVC-kísérletek eredményei azt sugallták, hogy a CBA a TRPM4-en kívül más ioncsatornákat is befolyásol. A CBA-érzékeny áramprofil alapján a CBA által kiváltott gátlás lehetséges célpontjai a tranziens kifelé irányuló K^+ áram (I_{to}) és az L-típusú Ca^{2+} áram ($I_{Ca,L}$). Ezért ezeket az ionáramokat hagyományos feszültség-zár technikával külön-külön is megvizsgáltuk. Az 5.4. szakaszban bemutatott APVC kísérleteinkhez hasonlóan BAPTA-tartalmú belső oldatot használtunk a TRPM4-csatornák aktiválódásának megakadályozására.

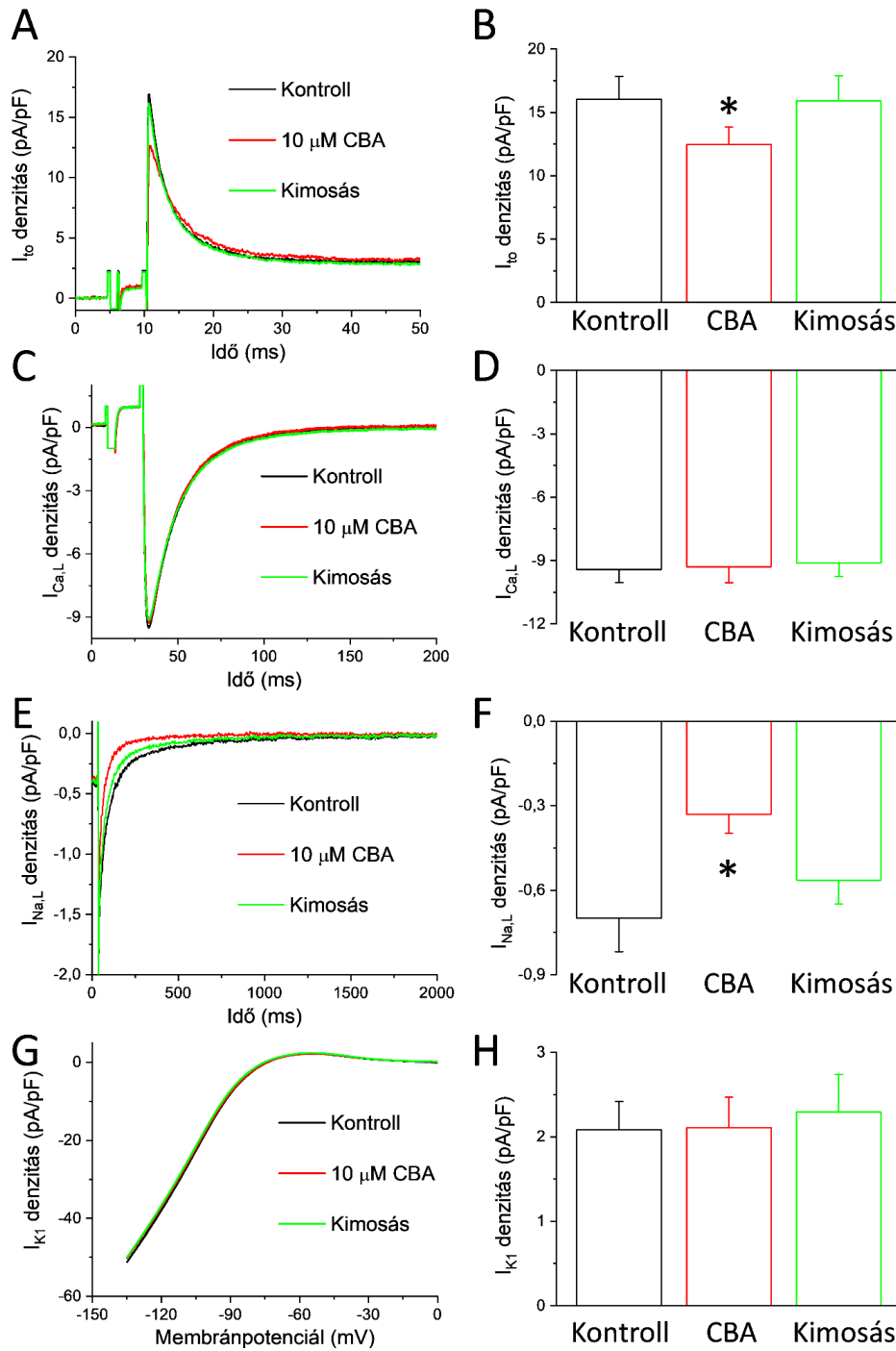
Az I_{to} áramokat $1 \mu M$ nisoldipin és $1 \mu M$ E4031 jelenlétében rögzítettük, hogy blokkoljuk az $I_{Ca,L}$ és a késői egyenirányító K^+ áram gyors komponensét (I_{Kr}). Az I_{to} áramot 10 kHz-es mintavételezéssel, -80 mV-os tartópotenciálról 200 ms hosszúságú, $+60$ mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk 0,2 Hz-es ingerlési frekvencia mellett. A depolarizáció előtt 5 ms-ig -40 mV-ra történő előimpulzust alkalmaztunk a gyors Na^+ áram aktiválása, majd inaktiválása érdekében. Az I_{to} amplitúdót az áramcsúcs és a fenntartott komponens közötti különbségként

mértük. A CBA $20,4 \pm 6,2$ %-kal csökkentette az I_{to} amplitúdót ($16,0 \pm 1,8$ pA/pF áramsűrűségről $12,5 \pm 1,4$ pA/pF-re) az öt állatból izolált hét vizsgált sejten (14. A-B ábrák). Ez a gátló hatás teljesen reverzibilis volt (kimosás utáni áramsűrűség: $15,9 \pm 2,0$ pA/pF).

Az $I_{Ca,L}$ mérések során a külső Tyrode-oldat $1 \mu\text{M}$ E4031-et és $1 \mu\text{M}$ HMR1556-ot tartalmazott az I_{Kr} és a késői egyenirányító K^+ áram lassú komponensének (I_{Ks}) blokkolására, valamint 3 mM 4-AP-t az I_{to} blokkolására. Az $I_{Ca,L}$ aktiválását 400 ms hosszúságú, $+5 \text{ mV}$ -ra történő depolarizációval értük el, amely a -80 mV -os tartópotenciálról az I_{to} -nál szereplővel megegyező ingerlési frekvencia és mintavételezés mellett. A tesztimpulzust rövid (20 ms) depolarizáció előzte meg -40 mV -ra, hogy aktiváljuk, majd inaktiváljuk a gyors Na^+ áramot. Az $I_{Ca,L}$ amplitúdót az áramcsúcs és a fenntartott komponens közötti különbséggént mértük. A CBA nem volt hatással a sejtkapacitásra normalizált áramamplitúdóra (kontrollban $-9,4 \pm 0,6$ pA/pF, CBA jelenlétében pedig $-9,3 \pm 0,8$ pA/pF) a négy állatból nyert nyolc sejten mérve (14. C-D ábrák).

Tekintettel arra, hogy a CBA nem befolyásolta az $I_{Ca,L}$ áramot, az I_{CBA} esetében tapasztalt inward áram a késői nátriumáram ($I_{Na,L}$) CBA általi gátlásának lehetett a következménye. Az $I_{Na,L}$ mérések során a Tyrode-oldat $1 \mu\text{M}$ nisoldipint, 100 nM dofetilidet és $100 \mu\text{M}$ chromanol-293B-t tartalmazott a Ca^{2+} és K^+ -áramok gátlásához. A -120 mV -os tartópotenciálról indított, 2 s hosszú -20 mV -ra történő tesztimpulzusokat $0,2 \text{ Hz}$ -es ingerlési frekvenciával és 5 kHz -es mintavételezéssel alkalmaztuk. Az $I_{Na,L}$ -t $20 \mu\text{M}$ TTX érzékeny áramként határoztuk meg, amplitúdóját pedig az impulzus kezdete után 50 ms -mal olvastuk le. Az áramintegrál meghatározásánál a kezdeti 20 ms -ot kizártuk az értékelésből, annak érdekében, hogy minimalizáljuk a korai nátrium áramcsúcsnak az integrálhoz való hozzájárulását. A CBA $47,3 \pm 7,0$ %-kal csökkentette az $I_{Na,L}$ értékét az öt állatból izolált kilenc vizsgált sejten ($-0,70 \pm 0,12$ pA/pF és $-0,33 \pm 0,07$ pA/pF) (14. E-F ábrák). Ez a gátló hatás nagyrészt reverzibilis volt (kimosása után $-0,56 \pm 0,08$ pA/pF áramsűrűség). Hasonló eredményeket kaptunk, amikor az $I_{Na,L}$ integrálját határoztuk meg (a teljes töltés értékei rendre $-160,9 \pm 36,1$, $-60,0 \pm 16,6$ és $-117,8 \pm 21,1 \text{ mC/F}$ voltak, kontrollban, CBA jelenlétében, illetve annak kimosása után).

Az I_{K1} -et $50 \mu\text{M}$ $BaCl_2$ -érzékeny áramként definiáltuk, amit egy 300 ms hosszú, 0 mV -tól -135 mV -ig tartó rámpa-protokollal mértünk. A CBA nem befolyásolta a négy állatból nyert hét vizsgált sejten az I_{K1} -et ($2,09 \pm 0,33$ pA/pF és $2,11 \pm 0,36$ pA/pF áramsűrűség értékek -50 mV -on mérve kontrollban és CBA jelenlétében) (14. G-H ábrák). A CBA kimosása után az áramsűrűség $2,29 \pm 0,44$ pA/pF volt.



14. ábra A CBA hatása a hagyományos feszültség clamp technikával mért ionáramokra.

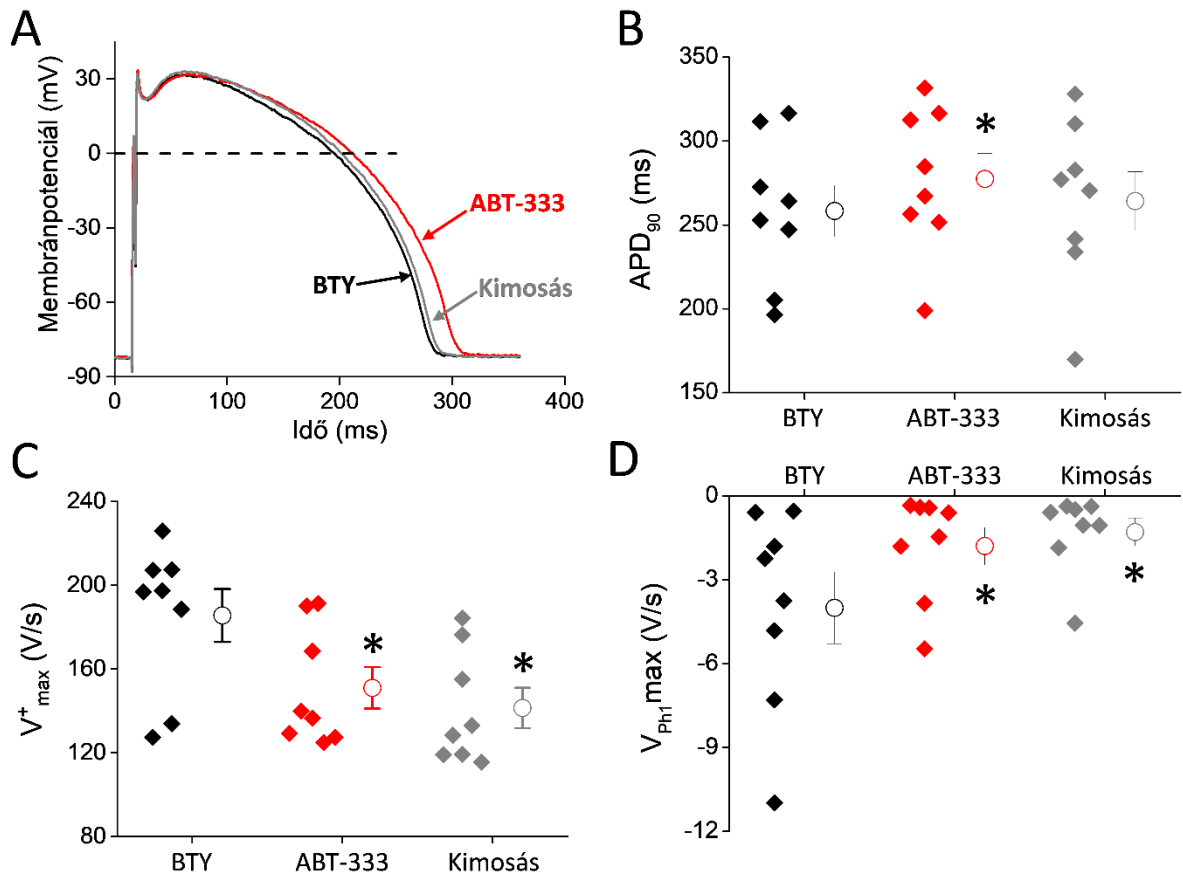
Kontroll körülmények között (fekete), CBA jelenlétében (10 μ M, piros) és a CBA kimosása után (zöld) felvett áramgörbék. (A) Reprezentatív I_{to} áramok. (B) Az áramsűrűség értékek átlag $\pm$ SEM értékei 5 állatból származó 7 vizsgált sejtben. (C) Reprezentatív $I_{Ca,L}$ áramok. (D) 4 állatból származó 8 vizsgált sejtben kapott $I_{Ca,L}$ áramsűrűség értékek átlaga $\pm$ SEM értékei. (E) Reprezentatív TTX-érzékeny ($I_{Na,L}$) áramok. (F) 5 állatból származó 9 vizsgált sejtben kapott $I_{Na,L}$ áramsűrűség értékek átlaga $\pm$ SEM értékei. (G) Reprezentatív $BaCl_2$ -érzékeny (I_{K1}) áramok. (H) 4 állatból származó 7 vizsgált sejtben kapott I_{K1} áramsűrűség értékek átlaga $\pm$ SEM értékei. A csillagok a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak.

5.6. 1 μ M ABT-333 megnyújtotta a bal kamrai akciós potenciált

Először a kutyák bal kamrai sejtjeit 1 μ M ABT-333-mal perfundáltuk. Ezen kísérletek során az ABT-333 perfúziója 15 percig tartott, amelyet 20 perces kimosás követett. Az ABT-333 perfúzió előtt rögzített utolsó tíz akciós potenciált tekintettük kontrollnak és elemzett paramétereiket átlagoltuk: bikarbonát puffert tartalmazó Tyrode-oldat (BTY). Az ABT-333 hatásának a kimosás előtti utolsó tíz AP átlagát tekintettük, míg a 20 perces kimosást követő tíz AP átlagát Kimosásként jelöltük.

Az 1 μ M koncentrációban alkalmazott ABT-333 növelte a bal kamrai sejtek AP időtartamát $258,3 \pm 15,4$ ms-ról $277,4 \pm 15,3$ ms-ra (15. A, B ábra), ami $7,84 \pm 3,09$ %-os növekedést eredményezett az AP időtartamában az AP csúcstól a repolarizáció 90 %-áig (APD₉₀). Az AP megnyúlás nem volt statisztikailag szignifikáns az APD₅₀ esetében ($p = 0,08$), de a megnyúlási tendencia kimosásra reverzibilis volt, csakúgy, mint az ABT-333 által kiváltott APD₉₀ növekedés. Az ABT-333 szignifikánsan, de nem reverzibilis módon csökkentette a 0. fázis (15. C ábra) és az 1. fázis maximális sebességét (V_{Ph1max} , 15. D ábra) a kontroll $82,8 \pm 5,1$ illetve $51,6 \pm 11,3$ %-ára. Más AP paraméterek, mint például az APA, az APD₅₀ és az APD₉₀, az OSP, az RMP, a Plató₂₀ és Plató₅₀ amplitúdók, valamint a V_{max} értékei nem változtak (3. táblázat).

Egészséges önkénteseken végzett vizsgálatok alapján az ABT-333 terápia során alkalmazott dózissal az elérhető maximális ABT-333 plazmakoncentráció értéke 1 nM. Mivel az általunk vizsgált koncentrációk egy nagyságrenddel magasabbak, mint a gyógyszeres kezelés során elérhető plazmakoncentráció, így az ABT-333 terápiás koncentrációjának (1 nM) akciós potenciálra gyakorolt hatásait is vizsgáltuk, melynek eredményeit a 4. táblázat foglalja össze. Vizsgálataink alapján az 1 nM terápiás koncentráció az AP semmilyen paraméterére nincs szignifikáns hatással (4. táblázat).



15. ábra Az 1 μM ABT-333 hatása a bal kamrai AP-re.

(A) Reprezentatív akciós potenciálok. A fekete görbe a BTY-ben (kontroll) mért AP, a piros 1 μM ABT-333 jelenlétében, míg a szürke a kimosás után mért AP. (B-D) Az AP paramétereit bemutató diagramok kontroll állapotban (BTY, fekete), ABT-333 jelenlétében (1 μM, piros) és az ABT-333 kimosása után (szürke), ahol a teli rombusz szimbólumok az egyedi értékeket, a körök az átlagokat, a vonalak pedig a ± SEM értékeket mutatják. (B) A repolarizáció 90 %-ánál mért akciós potenciál időtartam (APD₉₀), (C) a depolarizáció maximális sebesség (V_{max}) és (D) a korai repolarizáció maximális sebesség (V_{Ph1}max) értékei, amelyeket 4 állatból izolált 8 vizsgált sejtben kaptunk. A csillagok a kontrolltól való statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik ($p < 0,05$).

Paraméter	BTY (Kontroll)	1 μ M ABT-333	Kimosás
APA (mV)	108,9 $\pm$ 2,5	106,4 $\pm$ 3,0	105,7 $\pm$ 3,6
APD ₅₀ (ms)	220,0 $\pm$ 13,1	236,7 $\pm$ 13,3	225,5 $\pm$ 15,0
APD ₉₀ (ms)	258,3 $\pm$ 15,4	277,4 $\pm$ 15,3	264,2 $\pm$ 17,5
APD ₅₀ /APD ₉₀	0,85 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,01
OSP (mV)	17,6 $\pm$ 2,0	13,7 $\pm$ 3,0	12,0 $\pm$ 3,4
V _{Ph1max} (V/s)	-4,00 $\pm$ 1,28	-1,79 $\pm$ 0,67	-1,29 $\pm$ 0,50
Plató ₂₀ amplitúdó (mV)	106,6 $\pm$ 1,9	107,3 $\pm$ 2,4	107,0 $\pm$ 2,5
Plató ₅₀ amplitúdó (mV)	90,0 $\pm$ 2,0	89,1 $\pm$ 2,3	89,2 $\pm$ 2,5
RMP (mV)	-81,2 $\pm$ 1,4	-82,6 $\pm$ 1,6	-83,7 $\pm$ 1,3
V ⁺ _{max} (V/s)	185,6 $\pm$ 12,6	151,0 $\pm$ 9,9	141,4 $\pm$ 9,6
V ⁻ _{max} (V/s)	-1,72 $\pm$ 0,08	-1,64 $\pm$ 0,07	-1,65 $\pm$ 0,08

3. táblázat Az 1 μ M ABT-333-mal kapott AP paraméterek.

A vastag betűvel szedett értékek szignifikáns különbséget jeleznek a BTY-hez (kontroll) képest ($p < 0,05$). Az adatok 4 állatból származó 8 sejt átlaga $\pm$ SEM.

Paraméter	BTY (Kontroll)	1 nM ABT-333	Kimosás
APA (mV)	121,5 $\pm$ 1,6	117,4 $\pm$ 4,5	120,7 $\pm$ 5,1
APD ₅₀ (ms)	168,7 $\pm$ 12,7	157,0 $\pm$ 11,2	142,7 $\pm$ 27,2
APD ₉₀ (ms)	230,4 $\pm$ 11,7	220,9 $\pm$ 11,5	209,6 $\pm$ 27,8
APD ₅₀ /APD ₉₀	0,73 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,04
OSP (mV)	32,8 $\pm$ 1,0	29,1 $\pm$ 2,2	28,2 $\pm$ 4,7
V _{Ph1max} (V/s)	-10,80 $\pm$ 3,55	-9,18 $\pm$ 2,82	-6,95 $\pm$ 3,28
Plató ₂₀ amplitúdó (mV)	98,4 $\pm$ 1,3	95,2 $\pm$ 3,0	93,1 $\pm$ 5,2
Plató ₅₀ amplitúdó (mV)	80,8 $\pm$ 1,8	77,1 $\pm$ 3,1	74,8 $\pm$ 5,0
RMP (mV)	-82,7 $\pm$ 1,4	-82,3 $\pm$ 3,2	-88,5 $\pm$ 2,2
V ⁺ _{max} (V/s)	305,8 $\pm$ 15,1	253,9 $\pm$ 22,6	258,8 $\pm$ 14,5
V ⁻ _{max} (V/s)	-1,25 $\pm$ 0,12	-1,19 $\pm$ 0,15	-1,13 $\pm$ 0,11

4. táblázat 1 nM ABT-333-mal kapott AP paraméterek

Az adatok átlag $\pm$ SEM értékek amelyeket 2 állatból nyert 5 sejten mértünk Kontrollban és ABT 333 jelenlétében, valamint 1 állatból nyert 3 sejten a Kimosás alatt.

5.7. Az ABT-333 koncentrációfüggő hatása a kamrai akciós potenciál paraméterekre

Miután kimutattuk a kutya bal kamrai AP 1 μ M ABT-333 által kiváltott megnyúlását, a magasabb ABT-333 koncentrációk hatását kumulatív módon ellenőriztük, koncentrációnként 5 perces, 1 és 30 μ M közötti, növekvő ABT-333 perfúziójával. A magasabb ABT-333 koncentrációk jelenlétében gyakran észleltünk korai utódepolarizációt (EAD). E kísérletek AP paramétereit az 5. táblázat foglalja össze.

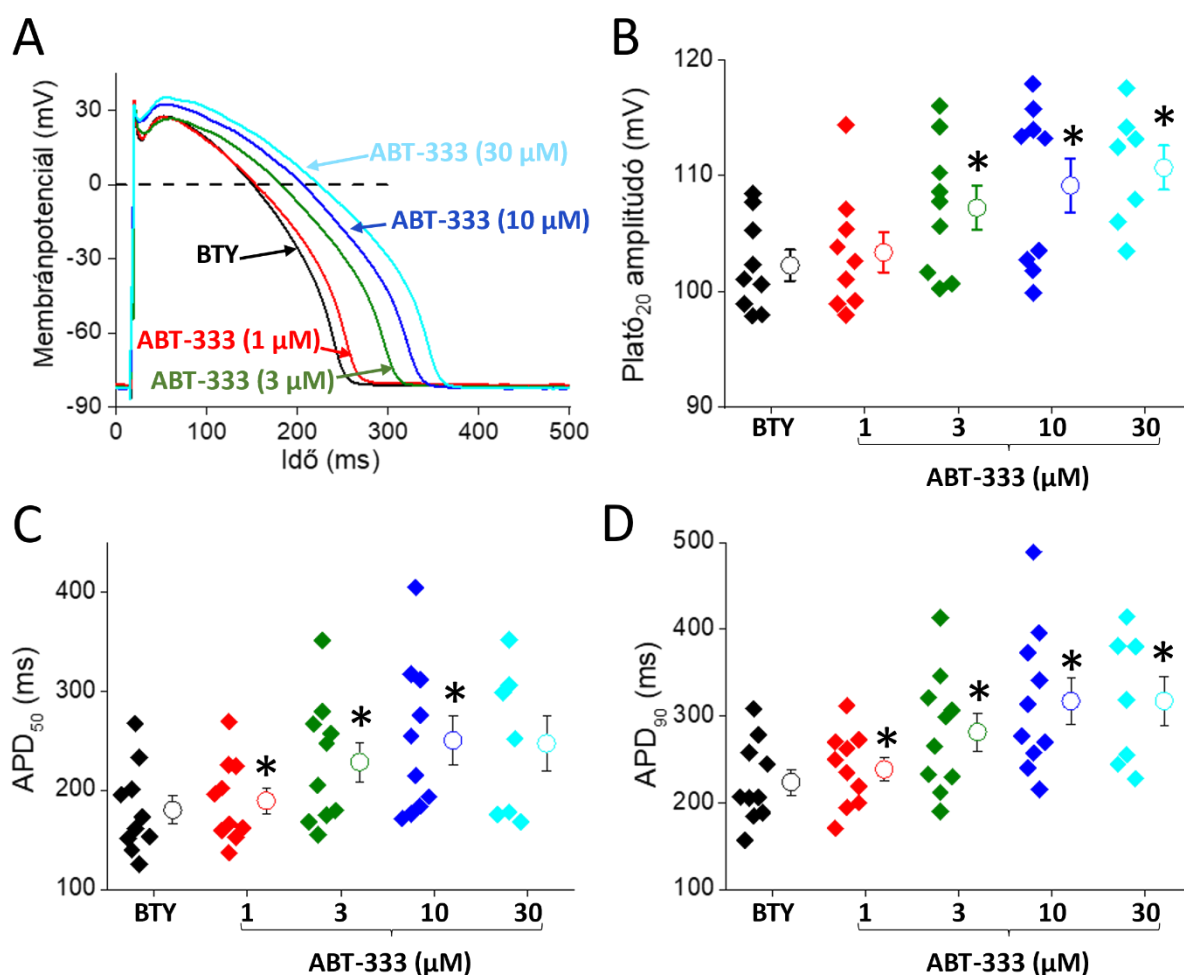
Paraméter	BTY (Kontroll)	ABT-333 (1 μ M)	ABT-333 (3 μ M)	ABT-333 (10 μ M)	ABT-333 (30 μ M)
APA (mV)	115,9 $\pm$ 2,5	115,6 $\pm$ 2,4	117,0 $\pm$ 2,6	117,5 $\pm$ 2,5	115,9 $\pm$ 1,6
APD ₅₀ (ms)	198,8 $\pm$ 14,4	213,8 $\pm$ 14,2	252,2 $\pm$ 22,5	273,9 $\pm$ 25,3	284,3 $\pm$ 29,4
APD ₉₀ (ms)	223,8 $\pm$ 14,9	238,6 $\pm$ 13,6	281,7 $\pm$ 21,7	317,4 $\pm$ 26,5	317,5 $\pm$ 28,7
APD ₅₀ /APD ₉₀	0,80 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,02
OSP (mV)	32,6 $\pm$ 2,7	31,3 $\pm$ 2,9	31,9 $\pm$ 2,9	33,3 $\pm$ 2,7	32,7 $\pm$ 2,5
V _{Ph1} max (V/s)	-7,44 $\pm$ 1,47	-6,69 $\pm$ 1,40	-5,99 $\pm$ 1,37	-4,21 $\pm$ 1,01	-3,63 $\pm$ 1,15
Plató ₂₀ amplitúdó (mV)	102,3 $\pm$ 1,2	103,4 $\pm$ 1,5	106,8 $\pm$ 1,8	108,6 $\pm$ 2,2	110,7 $\pm$ 1,9
Plató ₅₀ amplitúdó (mV)	84,9 $\pm$ 1,2	84,5 $\pm$ 2,2	86,3 $\pm$ 1,5	84,4 $\pm$ 2,6	83,6 $\pm$ 2,5
RMP (mV)	-81,3 $\pm$ 1,2	-82,3 $\pm$ 1,6	-83,0 $\pm$ 1,1	-82,2 $\pm$ 1,2	-83,1 $\pm$ 1,8
V ⁺ _{max} (V/s)	189,6 $\pm$ 22,6	169,5 $\pm$ 18,0	167,4 $\pm$ 15,1	152,4 $\pm$ 14,3	123,5 $\pm$ 21,0
V ⁻ _{max} (V/s)	-1,78 $\pm$ 0,08	-1,71 $\pm$ 0,09	-1,69 $\pm$ 0,07	-1,53 $\pm$ 0,07	-1,42 $\pm$ 0,09

5. táblázat Az ABT-333 növekvő koncentrációjával rögzített AP paraméterek.

A vastag betűvel szedett értékek szignifikáns különbséget jeleznek a BTY-hez (kontroll) képest ($p < 0,05$). Az adatok 7 állat 10 sejtjének $\pm$ SEM átlaga, kivéve a 30 μ M ABT-333 esetében, ahol kevesebb, 6 állat 7 sejtjének eredményei láthatóak.

Az ABT-333 növekvő koncentrációban alkalmazva megnyújtotta a bal kamrai sejtek AP-ját (16. ábra), ami 8,1 $\pm$ 2,7; 26,3 $\pm$ 5,9; 37,6 $\pm$ 7,6 valamint 54,3 $\pm$ 15,2 %-os növekedést eredményezett az APD₅₀ értékekben 1, 3, 10 és 30 μ M alkalmazás esetén (16. C ábra).

Hasonlóképpen, az ABT-333 $7,4 \pm 2,9$; $26,2 \pm 6,0$; $42,6 \pm 8,6$; valamint $52,6 \pm 13,6$ %-kal növelte az APD_{90} értékeket 1, 3, 10 és 30 μM koncentrációban (16. D ábra). A magasabb ABT-333 koncentrációk (3-30 μM) szintén növelték a korai platófázis magasságát, mivel a $Plat_{20}$ amplitúdó értékei enyhén, de szignifikánsan, $4,3 \pm 0,7$; $6,1 \pm 1,7$ valamint $9,2 \pm 1,2$ %-kal nőttek 3, 10 és 30 μM koncentrációban (16. B ábra). Az ABT-333 csökkentette a depolarizáció (0. fázis; V_{max}^+), a korai repolarizáció (V_{ph1max}) és a terminális repolarizáció maximális sebességét (V_{max}^-). Csak a 10 és 30 μM ABT-333 csökkentette szignifikáns mértékben a V_{max}^+ -ot ($84,4 \pm 6,2$; illetve $77,8 \pm 10,9$ %-a a kontrollnak). Magasabb ABT-333 koncentráció szintén csökkentette a V_{max}^- értékeket a kontroll $95,1 \pm 0,9$; $87,1 \pm 4,2$ és $84,4 \pm 5,6$ %-ára 3, 10 és 30 μM koncentrációban. Az ABT-333 az 1. fázis repolarizáció maximális sebességét $78,5 \pm 6,3$; $57,7 \pm 6,8$ valamint $40,0 \pm 8,3$ %-ra csökkentette 3, 10 és 30 μM esetén.



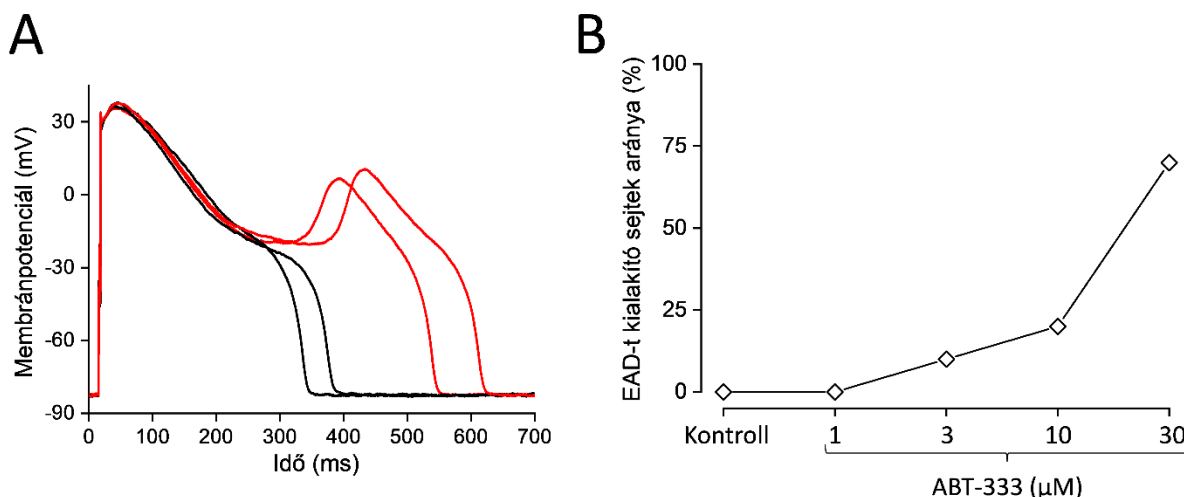
16. ábra Az 1-30 μM ABT-333 hatása a bal kamrai AP-re.

(A) Reprezentatív akciós potenciálok. A fekete görbe a BTY-ben (kontroll) mért AP, a színek növekvő ABT-333 koncentráció jelenlétében. (B-D) Az AP paramétereit bemutató diagramok kontroll körülmények között (fekete) és ABT-333 jelenlétében (különböző koncentrációk színekkel), ahol a teli rombusz szimbólumok az egyedi értékeket, a körök az

átlagokat, illetve a vonalak a $\pm$ SEM értékeket mutatják. **(B)** A korai platófázis amplitúdójának ($Plat_{20}$ amplitúdó), **(C)** a repolarizáció 50 %-ánál mért akciós potenciál időtartamának (APD_{50}), és **(D)** a repolarizáció 90 %-ánál mért akciós potenciál időtartamának (APD_{90}) értékei, amelyeket 7 állat 10 sejtjénél kaptunk, kivéve 30 μ M ABT-333 esetén, ahol ez 6 állat 7 sejtje volt. A csillagok a kontrolltól való statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik ($p < 0,05$).

5.8. Korai utódepolarizációk kialakulása az ABT-333 jelenlétében

Ahogy arról korábban már esett szó, ABT-333 jelenlétében bizonyos sejtekben EAD-ket mutattunk ki (17. ábra). Az EAD megjelenését attól a legalacsonyabb ABT-333 koncentrációtól kezdve állítottuk, amelyben az első EAD megjelent, még akkor is, ha később az EAD-k már nem alakultak ki az adott koncentrációjú ABT-333 jelenlétében. A kontrollban, sőt 1 μ M ABT-333 jelenlétében sem figyeltünk meg EAD-ket, de az ABT-333 magasabb koncentrációiban fokozatosan nőtt az EAD-ket kialakító sejtek aránya (17. B ábra).



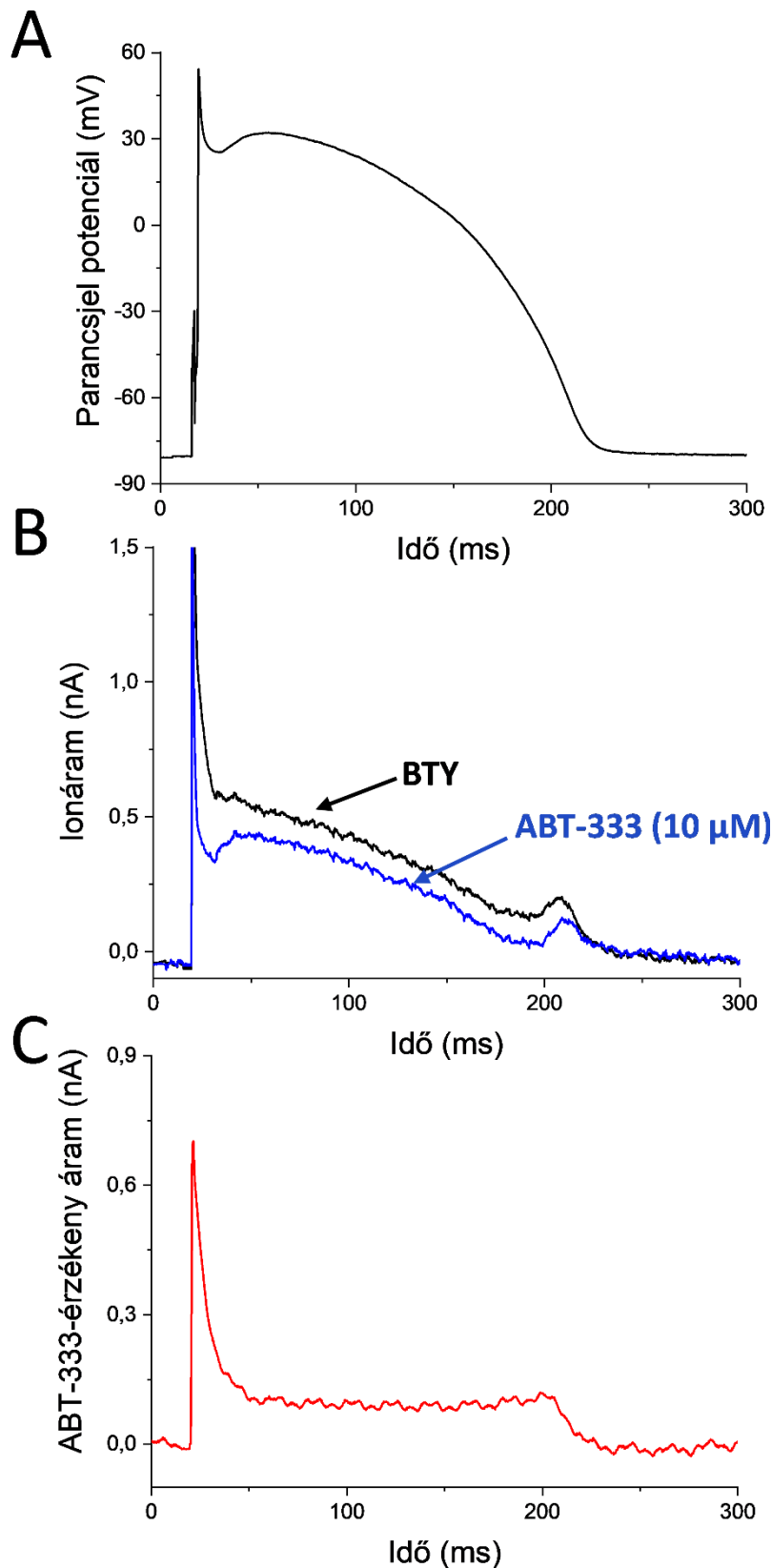
17. ábra EAD képződés ABT-333 jelenlétében.

(A) 30 μ M ABT-333 jelenlétében egymás után mért reprezentatív akciós potenciálok. A piros görbék EAD-ket tartalmazó AP-kat mutatnak. **(B)** Az ábra a 7 állatból nyert 10 vizsgált sejtől az EAD-ket kialakító sejtek százalékos arányát mutatja.

5.9. ABT-333-érzékeny áramprofil AP feszültség clamp technikával (APVC)

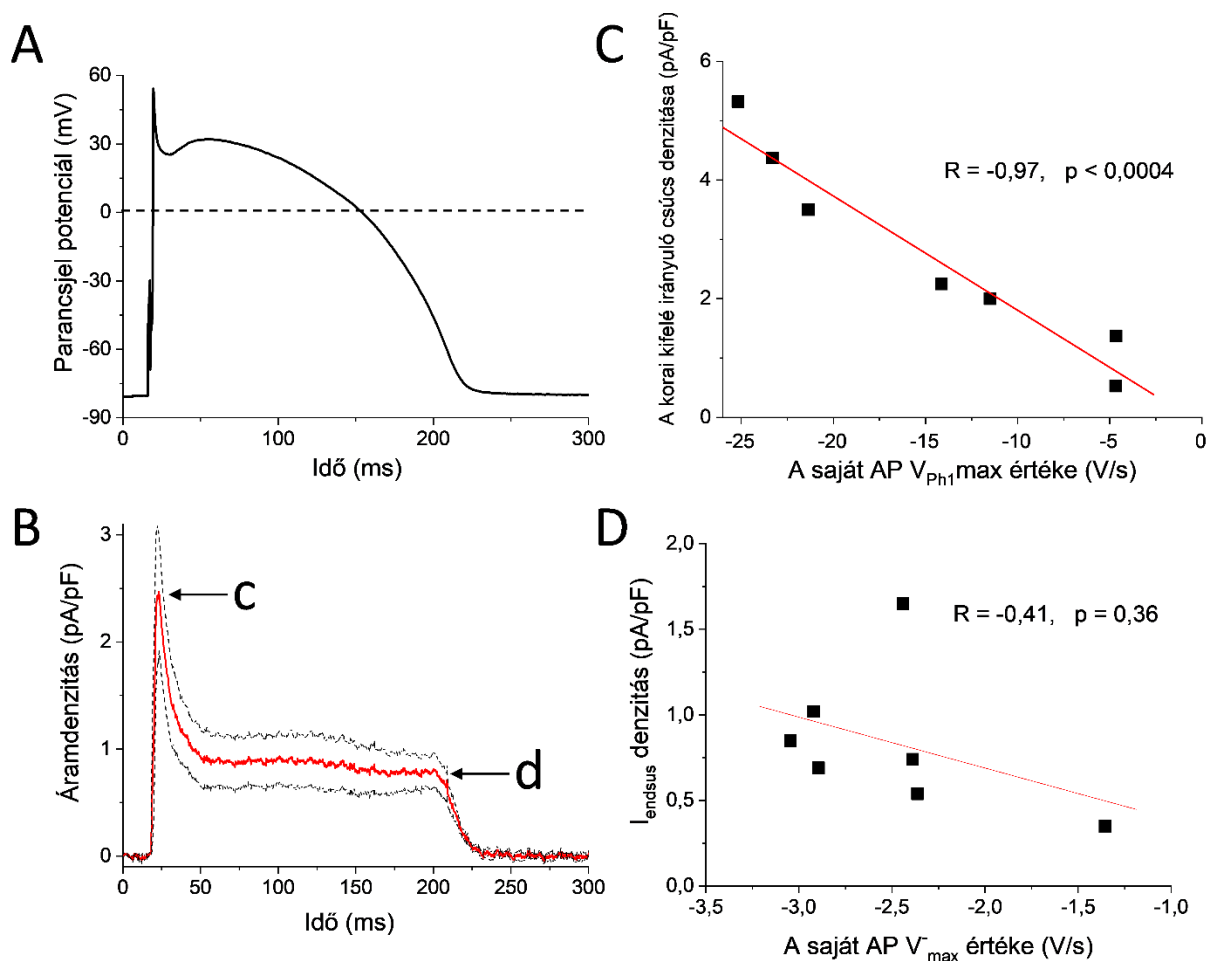
Az ABT-333 által kiváltott AP megnyúlás és a $V_{\max}$ csökkenése az I_{Kr} gátlására utal, mivel mindkét változás létrejöhet az I_{Kr} csökkenése esetén. Az ABT-333 által kiváltott $V_{Ph1\max}$ csökkenése pedig az I_{to} gátlásának lehet a következménye. Ezen hipotézis megerősítése érdekében 10 μ M ABT-333 hatását rögzítettük az AP feszültség-zár technika során, kanonikus AP-t használva feszültség parancsjelként (18. A ábra). Ezekben a mérésekben az ABT-333-érzékeny áramot úgy határoztuk meg, hogy az ABT-333 jelenlétében mért áramgörbét (kék görbe a 18. B ábrán) kivontuk az ABT-333 alkalmazása előtt rögzített áramgörbéből (fekete görbe a 18. B ábrán). Ezért az ABT-333-érzékeny áram tartalmazta mindazokat az ionáramokat, amelyeket az ABT-333 befolyásolt (18. C ábra).

Az APVC technika sajátossága, hogy egy kifelé irányuló (pozitív) áram látható az ABT-333-érzékeny áramon mind egy kifelé irányuló áram ABT-333 általi gátlása, mind pedig egy befelé irányuló áram ABT-333 általi növelése esetén. A 10 μ M ABT-333-érzékeny áram a teljes AP alatt kifelé irányuló volt. Megfigyeltünk egy korai kifelé irányuló áramcsúcsot (19. B ábra), amelynek sűrűsége $2,76 \pm 0,64$ pA/pF volt és $2,90 \pm 0,81$ ms-mal követte a feszültség parancsjel AP $V_{Ph1\max}$ időpontját. A vizsgált sejtek saját AP-jának alakja alapján negatív korreláció volt a $V_{Ph1\max}$ értékek és a korai kifelé irányuló áramsűrűség csúcsértékek között (19. C ábra). A kifelé irányuló áram sűrűsége a feszültség parancsjel AP időtartamának felénél $0,89 \pm 0,24$ pA/pF-nak adódott. A terminális repolarizációnak megfelelő tartós kifelé irányuló áram végét (I_{endsus}) közvetlenül a nullára való visszatérés kezdete előtt mértük (a 19. B ábrán d-vel jelölve). Az I_{endsus} értéke $0,83 \pm 0,16$ pA/pF volt és a pozíciója $7,82 \pm 1,64$ ms-mal volt a kanonikus AP $V_{\max}$ érték időpontja előtt. A mért sejtek saját AP-jának $V_{\max}$ értékei és az I_{endsus} sűrűsége között nem volt korreláció (19.D ábra).



18. ábra Reprezentatív APVC kísérlet.

(A) A kanonikus akciós potenciál, amelyet feszültség parancsjelként használtunk. (B) A kontrollban (BTY - fekete görbe) és 10 μ M ABT-333 jelenlétében (kék görbe) felvett áramgörbék. (C) A 10 μ M ABT-333-érzékeny áram, amelyet a B panel kék görbéjének a fekete görbéjéből való kivonásával készítettünk.



19. ábra ABT-333-érzékeny áram APVC körülmények között.

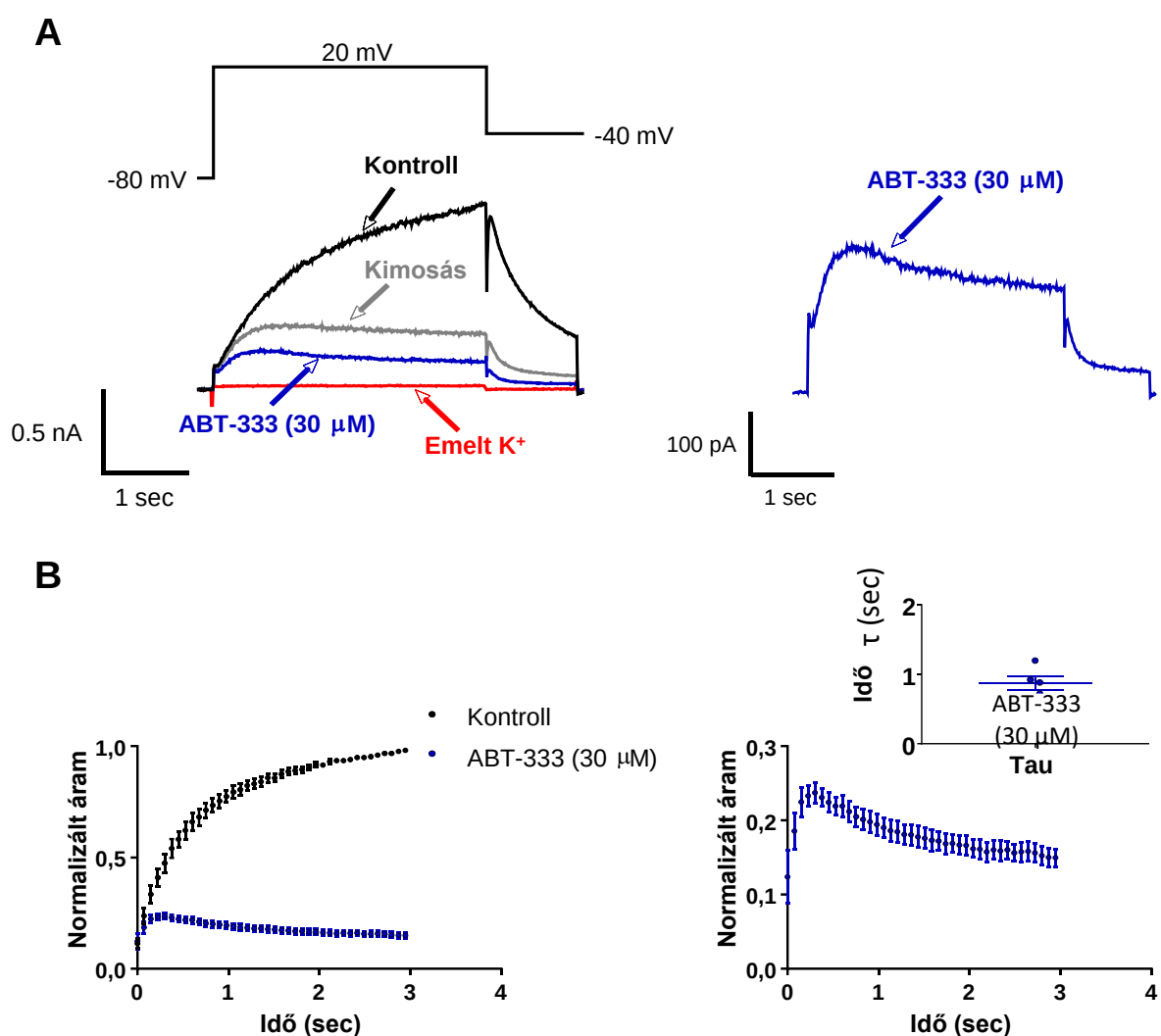
(A) A kanonikus akciós potenciál, amelyet feszültség parancsjelként használtunk. (B) A 10 μ M ABT-333-érzékeny áram 7 sejten mért átlaga (piros görbe) $\pm$ SEM (fekete szaggatott vonalak). A korai kifelé irányuló csúcsot **c** jelöli, míg **d** a tartós kifelé irányuló áram végét (I_{end}). (C) A korai kifelé irányuló csúcsáram-sűrűség értékeinek (a B panelen **c**-vel jelölve) korrelációja a sejt saját AP-jának V_{ph1max} értékével. (D) Az I_{end} értékek sűrűsége (a B panelen **d**-vel jelölve) és a sejt saját AP-jának V_{max} értékei közötti összefüggés.

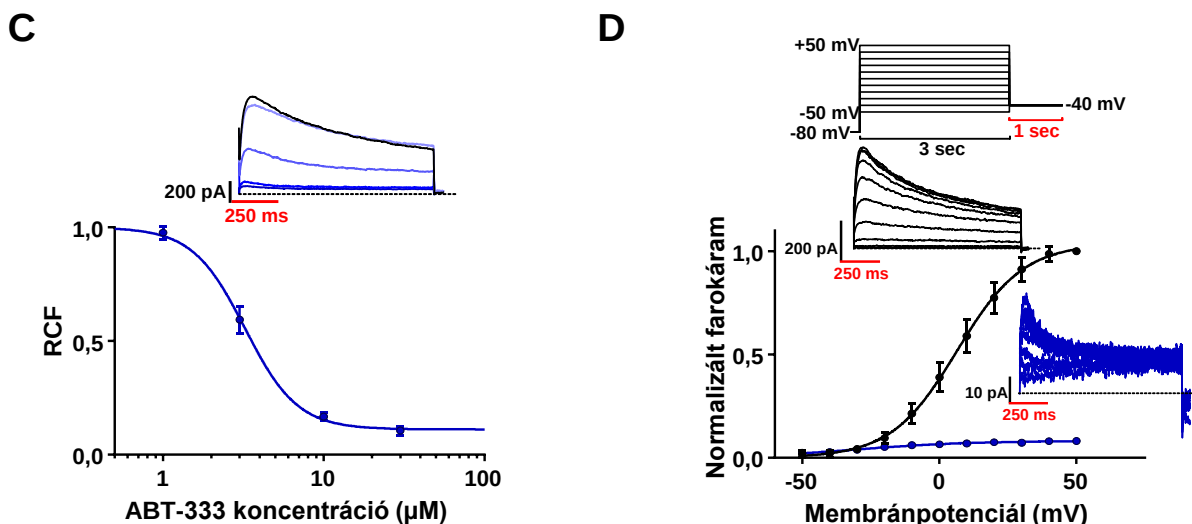
5.10. Az ABT-333 idő- és koncentrációfüggő módon blokkolta az expresszált hERG csatornákat

Az ABT-333 30 μ M koncentrációban gátolta a hERG-áramot, amit egy 3 másodperces, +20 mV-ra történő depolarizációt követő -40 mV-ra történő repolarizációval vizsgáltunk (20. A ábra). A tartópotenciál -80 mV volt és az impulzusokat 30 másodpercenként alkalmaztuk. Az ABT-333 a hERG-áram csökkenését okozta mind +20, mind -40 mV-on. A +20 mV-nál monoton növekvő kontroll áram az ABT-333 jelenlétében csökkenő árammá változott, amelyet monoexponenciális függvénnyel illesztve $0,87 \pm 0,09$ s időállandót eredményezett (20. B ábra, $n = 5$). A gátlás koncentrációfüggésének vizsgálatához 1, 3, 10 és 30 μ M ABT-333-at alkalmaztunk. A megmaradó áramhányad értékek (RCF) $0,93 \pm 0,04$; $0,63 \pm 0,05$; $0,26 \pm 0,04$ és

0,15 ± 0,02 voltok ($n \geq 4$ minden koncentráció esetén). A koncentráció-hatás görbe 3,2 μM félgátló koncentrációt (IC_{50}) eredményezett (20. C ábra).

Az ABT-333 hatását a hERG-csatornák feszültségérzékelésére egy áram-feszültség protokollal vizsgáltuk, amely -50 mV-tól +50 mV-ig terjedő, 10 mV-onként emelkedő depolarizáló impulzusokból állt. A normalizált farokáram-csúcsokból létrehoztuk a kontroll oldat és a 30 μM ABT-333-mal perfundált mérések konduktancia-feszültség görbéit. Ezeket Boltzmann-egyenlettel illesztve a $V_{1/2}$ értéke a kontroll oldat esetében $6,50 \pm 1,03$ mV volt. Az ABT-333 esetében a kis áramnagyság miatt a $V_{1/2}$ érték megfelelő meghatározása nem volt lehetséges (20. D ábra, $n = 3$).

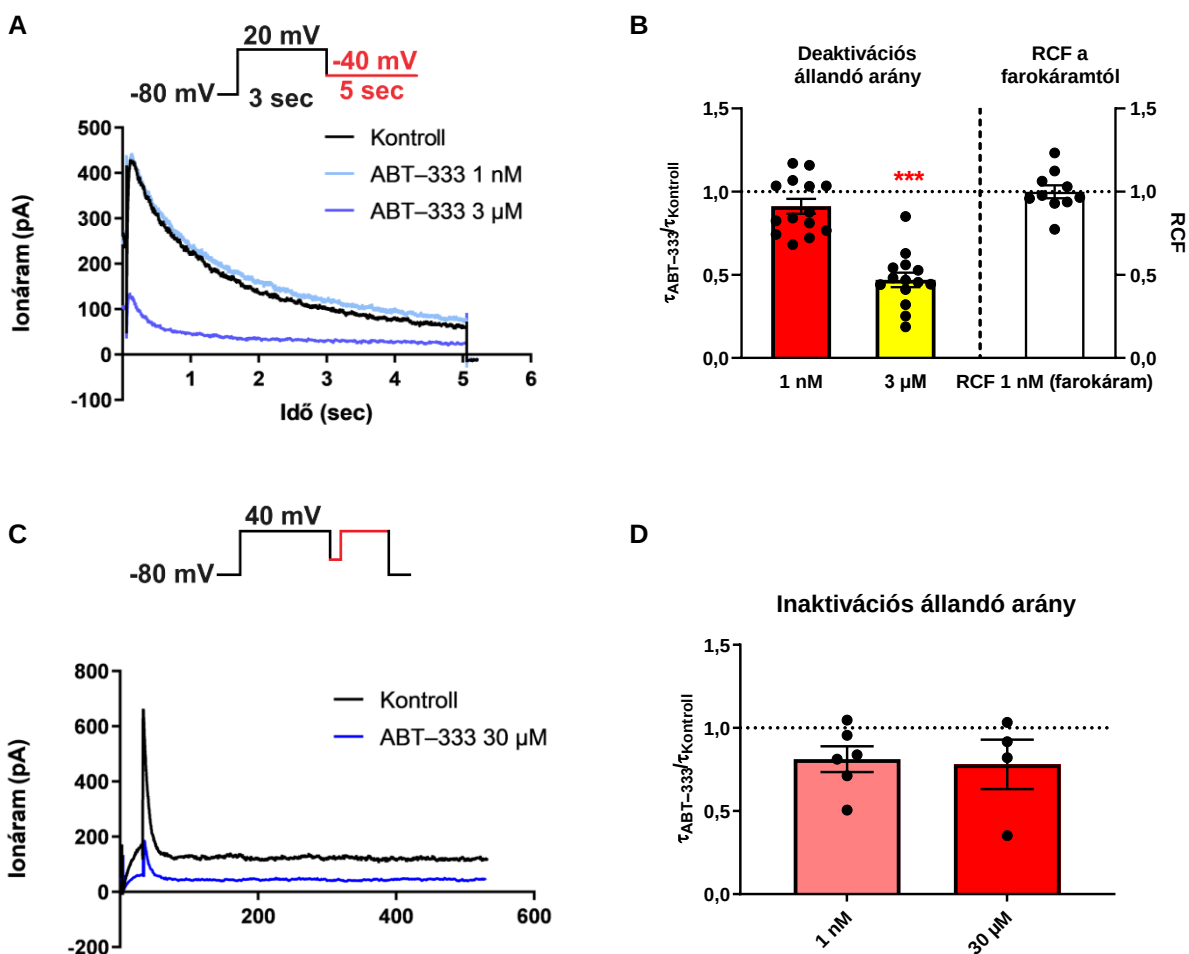




20. ábra Az ABT-333 hatása a HEK sejtekben kifejezett hERG csatornák áramára.

((A) balra) Egy feszültség-zár módban rögzített reprezentatív áramgörbe kontroll oldatban (fekete görbe), 30 μM ABT-333 perfúziója mellett (kék görbe), emelt extracelluláris K⁺ koncentráció jelenlétében (piros görbe) és kimosás után (szürke görbe). ((A) jobbra) Az ABT-333 jelenlétében mért áramgörbe nagyítva. ((B) balra) Az átlagolt és a kontroll oldatban mért csúcsáramra normalizált áramgörbék (n = 5). ((B) jobbra) A bal oldali kék görbe kinagyítva és az áramcsökkenés egyedi időállandóit bemutató kiegészítő ábra. (C) Az ABT-333 koncentrációválasz görbéje, amelyet az 1, 3, 10 és 30 μM koncentrációkra illesztettünk (n ≥ 4 minden koncentrációhoz). A görbe felett a reprezentatív farokáramok kontrollban (fekete) és az ABT-333 adott koncentrációinál (kék). (D) Kontroll oldatban (fekete) és 30 μM ABT-333-ban (kék) mért adatokból számított G-V görbék (n = 3). A G-V görbe felett a feszültségprotokoll, valamint két reprezentatív mérés a farokáramokról kontroll állapotban (fekete görbék) és 30 μM ABT-333 jelenlétében (kék görbék) látható.

Mivel az ABT-333 időfüggő gátlást okozott (időállandó $0,87 \pm 0,09$ s (20. B. ábra)), megvizsgáltuk az ABT-333 lehetséges hatásait a hERG-csatorna kapuzási átmeneteire is (21. ábra). Az ABT-333 már 3 μM-os koncentrációban szignifikánsan csökkentette a deaktiválási időállandó arányát ($\tau_{\text{ABT-333}} / \tau_{\text{kontroll}} = 0,46 \pm 0,04$, p = 0,0001), 30 μM ABT-333 perfúziója pedig az inaktiválási időállandó arányát csökkentette $0,78 \pm 0,15$ -ra (átlag ± SEM). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az ABT-333 blokkolja a csatorna pórusát, főként a csatorna nyitott állapotában.



21. ábra Az ABT-333 hatása a hERG-csatorna kapuzási átmeneteire.

(A) A deaktivációs (nyitott (O) $\rightarrow$ zárt (C) átmenet) kinetika reprezentatív mérése. Az alkalmazott feszültség protokoll felül látható, alatta pedig a protokoll pirossal kiemelt része alatt rögzített áramgörbe látható. A fekete áramgörbe a kontroll, a világoskék a hERG-áram 1 nM ABT-333 jelenlétében, a sötétkék pedig a hERG-áram 3 μM ABT-333 jelenlétében. (B) A deaktiválási időállandók (balra) és a megmaradó áramhányad (RCF) 1 nM ABT-333 jelenlétében (jobbra). A bal y-tengelyen a deaktiválási időállandó aránya ($\tau_{ABT-333}/\tau_{kontroll}$) van ábrázolva (piros és sárga oszlopdiagramok 1 nM, illetve 3 μM ABT-333 jelenlétében). A jobb y-tengelyen a megmaradó áramhányad (RCF) 1 nM ABT-333 jelenlétében (fehér sáv). (C) Az inaktivációs (nyitott (O) $\rightarrow$ inaktív (I) átmenet) kinetika reprezentatív mérése. Az alkalmazott feszültség protokoll felül látható, alatta pedig a protokoll pirossal kiemelt része alatt rögzített áramgörbe látható. A fekete áramgörbe a kontroll, a sötétkék pedig a hERG-áram 30 μM ABT-333 jelenlétében. (D) Az inaktivációs időállandók aránya ABT-333 jelenlétében. Az y-tengelyen az inaktiválás időállandójának aránya ($\tau_{ABT-333}/\tau_{kontroll}$) látható (rózsaszín és piros oszlopok az 1 nM és 30 μM ABT 333 jelenlétében). Az ábra oszlopdiagramjain a sávok az átlag $\pm$ SEM értékeket jelzik, az adott számú kísérletekben (a fekete teli körök egy-egy kísérletet jelentenek), és a csillagok szignifikáns eltéréseket jeleznek (***) $p < 0,001$.

6. Megbeszélés

6.1. TRPM4 expresszió a kutyaszívben

A TRPM4 számos szövetben, többek között a szívben is nagy mennyiségben expresszálódik^{32,38,160,161}, de munkacsoportunk első ízben mutatta ki jelenlétét kutyaszívben. Több korábbi tanulmányban csak az mRNA szintű expressziót írták le^{6,162}. Hasonlóan jelen volt a humán- és egérszívben¹⁶⁰ továbbá patkányszívben is detektálták^{15,163}. A TRPM4 fehérje kifejeződik HL-1 szívizomsejtek plazmamembránjában is¹⁶⁴. Egészséges patkány kamrában a TRPM4 fehérje a plazmamembránban volt jelen⁵ és szarvasmarha szívben expressziója erősebb volt a pitvari izomzatban, mint a kamrai sejtekben⁴. Egerekben a TRPM4 expresszióját mind fehérje-, mind mRNA-szinten kimutatták pitvari és kamrai mintákon, valamint izolált kamrai sejteken is⁷¹. A TRPM4 mRNA jelen volt humán bal kamrai mintákban is¹⁶¹.

A jelenlegi vizsgálatban egészséges kutyákból gyűjtöttünk szív mintákat. Korábban azonban a TRPM4 expressziójának növekedéséről számoltak be különböző patológiás állapotokban, például spontán hipertóniás patkányokban¹⁵, infarktusos egér bal kamrában¹⁶⁵ és humán NYHA 3-4-es stádiumú szívelégtelenségben szenvedő betegekben¹⁶¹. Bár a TRPM4 expresszióban nem tudtunk szignifikáns különbségeket kimutatni a kutyaszív négy különböző üregének falából származó minták között, korábban patkányban a jobb kamrában hatszor magasabb expressziót írtak le a bal kamrához képest¹⁶³. Ennek oka a fajok közötti fehérje expressziós különbség lehet. Bár a szívszövetben a sejtek túlnyomó többségét a kamrai sejtek teszik ki, a vizsgált minták más sejttípusokat is tartalmaznak, beleértve a fibroblasztokat, a simaizomzatot és az endothel sejteket.

Az egyéb sejttípusok interferenciájának minimalizálása érdekében a TRPM4 expresszióját közvetlenül az enzimatikusan izolált bal kamrai sejteken is meghatároztuk (a 9. ábra jobb szélső sávja és oszlopa). A TRPM4 expressziójában nem volt szignifikáns különbség a bal kamra izolált sejtjei és a teljes bal kamra falszövet között, ami arra utalhat, hogy a TRPM4 jel forrása főként a kardiomiocitákból származik. Eredményeink összhangban vannak egy nemrégiben végzett vizsgálattal, ahol egér pitvari és kamrai mintákban, valamint izolált kamrai kardiomiocitákban azonos TRPM4 expressziót mutattak ki⁷¹.

Összefoglalva, a TRPM4 fehérje expresszióját a kutyaszív mind a négy üregének falában, valamint az izolált bal kamrai kardiomiocitákban is kimutattuk.

6.2. A CBA hatása az akciós potenciál morfológiájára

Az AP mérések során a hagyományos hegyes mikroelektroda technikát használtuk a TRPM4 inhibitor CBA hatásának vizsgálatára kutya bal kamrai szívizomsejteken. Ez a technika közelíti leginkább a fiziológias állapotot, mert a vizsgált sejtek intracelluláris terének összetételét nem befolyásolja. Ennek köszönhetően, pl. a patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésével ellentétben sem az intracelluláris Ca^{2+} pufferelem, sem a sejt dialízist követő intrinsic citoszolikus Ca^{2+} pufferelem elvesztése nem következik be¹⁶⁶. Ez különösen fontos, mivel a TRPM4-áramok gyorsan csökkennek, ha teljes sejtes patch-clamp vagy inside-out patch konfigurációval méri őket⁴⁰.

Jelen vizsgálatban a CBA-t 10 μM -ban használtuk, ahol egy korábbi tanulmány szerint legalább 90 %-os a TRPM4-áram gátlása, de nem tapasztaltak jelentős hatást sem a hERG, sem az L-típusú kalciumcsatornákra⁹². Jelen vizsgálatunk az első eset, ahol a CBA hatását natív szívsejtekben vizsgálták - minden korábbi vizsgálatban vagy TRPM4 génkiütött állatokat, vagy más TRPM4-gátlókat, például 9-phenanthrolt használtak.

Eredményeink azt mutatják, hogy a CBA reverzibilis módon csökkentette az 1. fázis meredekségét és növelte az akciós potenciál amplitúdóját (10-11. ábra). A depolarizáció maximális sebességének CBA által kiváltott csökkenése azonban nem volt visszafordítható. Csak tendenciózus volt az AP rövidülése, de az APD_{90} értékek normalizálása után, a kontroll körülmények között rögzített értékekhez képest kis mértékű (kb. 9 %), de szignifikáns csökkenést tapasztaltunk (10. E ábra). Ezek a változások vagy a CBA által közvetített TRPM4 gátlás, vagy a CBA nem specifikus, a TRPM4-től eltérő ioncsatornákon kiváltott hatásai, vagy ezek kombinációja miatt következhetnek be. A TRPM4 gátlása által okozott lehetséges elektrofiziológiai változások feltételezéséhez el kell képzelnünk, hogyan nézhet ki a TRPM4 által közvetített áram a kamrai AP alatt. Ehhez figyelembe kell venni a TRPM4 Ca^{2+} -függő aktiválódását^{16,17} és a monovalens kationok iránti szelektivitását^{6,38}.

A kamrai sejtekben a membránpotenciál és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció is dinamikusán változik a szív ciklus során¹⁶⁷. Ráadásul a Ca^{2+} koncentrációk jelentősen eltérnek a különböző sejt kompartmentekben. A Ca^{2+} csúskoncentrációja megközelítőleg 600 nM-ig emelkedhet a citoplazmában, 6 μM -ig a szubsarkolemmális térben, de akár 10-50 μM -ig a szubmembrán hasadékban (a sarkolemmális Ca^{2+} belépési és a sarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -felszabadulási helyei közötti szűk tér)^{168,169}. Ami a TRPM4 aktiválásához szükséges Ca^{2+}

koncentrációt illeti, az EC_{50} értékek az irodalomban igen változatosak és a kísérleti körülményektől függően 400 nM-tól³⁸ egészen 1 mM-ig¹⁷⁰ terjednek. A natív sinoatrialis és kamrai sejtekben a csatorna aktiválásához szükséges minimális Ca^{2+} koncentráció 0,1-1 μM között volt^{15,16,170}, az EC_{50} pedig 10 μM volt patkány kamrai sejtekben¹⁵. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a TRPM4 valóban aktiválódhat a szív akciós potenciálja során a kalcium beáramlás és az azt követő Ca^{2+} -felszabadulás révén. A legnagyobb aktiváció kevéssel az AP-csúcs után és a korai platófázisban várható¹⁵³, mivel a kalcium az AP-csúcs után a szubsarkolemmális térben néhány ms alatt, a szubmembrán hasadékban pedig még gyorsabban éri el maximális koncentrációját¹⁶⁸.

Abból kiindulva, hogy a TRPM4 mind a Na^+ , mind a K^+ számára permeábilis (a Ca^{2+} számára viszont nem), áramának várható reverzálpotenciálja 0 mV körül van⁷⁶. Ezek szerint a TRPM4 aktiválása várhatóan 0 mV felé mozdítja el a membránpotenciált, ami közvetlenül az AP csúcs után repolarizáló áramot eredményez. Ezért a CBA által kiváltott TRPM4 gátlás hatására az 1. fázis repolarizáció lassulása várható, ahogyan azt a kísérleteinkben is láttuk.

A TRPM4 által közvetített áram viszont csökkentheti a plató potenciált a plató korai fázisában, amikor a membránpotenciál 0 mV-nál magasabb. Elméletileg minél pozitívabb a membránpotenciál, annál nagyobb lesz ez a csökkenés. Ezenkívül megemelheti a plató késői potenciálját, ha az áram ekkor még aktív, de a TRPM4-csatornák közelében a kalciumszintek vélhető nagyon gyors csökkenése alapján ez eléggé valószínűtlen. Ezért a TRPM4 CBA-val történő blokkolása várhatóan némileg megemeli a korai plató potenciált és talán kis mértékben csökkenti a késői plató membránpotenciált. Kísérleteinkben a plató potenciálját a CBA jelentősen nem változtatta meg (a kezdetben enyhén pozitív $Plat_{50}$ potenciál körülbelül 2 mV-os növekedése ellenére) (1. táblázat). Ez (1) a $Plat_{50}$ közel 0 értékével magyarázható, vagy (2) arra utal, hogy az AP ezen későbbi fázisában a TRPM4 aktiválásához már nem elegendő a Ca^{2+} mennyisége, vagy (3) a CBA-nak a TRPM4-től eltérő, ebben a fázisban aktív csatornákra gyakorolt hatása is lehet.

Elméletileg az AP időtartamának rövidülése várható a TRPM4 gátlásától, ahogyan azt a nyúl Purkinje rostokban egy másik TRPM4 blokkoló (30 μM 9-phenanthrol) jelenlétében⁷⁶ és a TRPM4-et nem expresszáló egér pitvari sejtekben^{12,85} is megfigyelték. A mi eredményeink hasonlóak ezekhez, de csak az APD_{90} csökkenésének tendenciáját figyeltük meg (körülbelül 25 ms) és ez csak az egyes vizsgált sejtek kezdeti APD_{90} értékeire való normalizálás után eredményezett szignifikáns mértékű és 9 %-os APD_{90} csökkenést (10. E ábra).

Nyúl kamrai sejtekben a TRPM4 30 μ M 9-phenanthrollal történő gátlása azonban nem volt hatással az AP amplitúdóra és időtartamra, valamint a nyugalmi membránpotenciálra és a $V_{\max}^+$ -ra⁷⁶. A CBA hatása az AP amplitúdóra bár statisztikailag szignifikáns, de nagyon kicsi volt (3 mV vagy 2,5 %-os növekedés) (10. B és 10. E ábra). Ez a növekedés a túllövési potenciál nem szignifikáns növekedésének és a nyugalmi membránpotenciál nem szignifikáns csökkenésének összegéből adódhat. Az AP-csúcs alatti TRPM4-gátlástól ez várható, mivel a TRPM4-árama a membránpotenciált 0 mV felé mozdítaná, így ellensúlyozva a depolarizációt. Ha ezt a hatást a CBA csökkenti akkor a túllövési potenciál és/vagy az AP-amplitúdó növekedése várható.

Ami a depolarizáció maximális sebességét illeti, annak CBA által kiváltott csökkenése a gyors Na^+ -áram gátlásának köszönhető, mivel a $V_{\max}^+$ meglehetősen jó mérőszáma a Na^+ -áram sűrűségének¹⁷¹. A $V_{\max}^+$ és az áramsűrűség közötti kapcsolat azonban nem lineáris, ezért a $V_{\max}^+$ kis mértékű változása a gyors Na^+ -áram nagyobb mértékű csökkenésének köszönhető¹⁷². A CBA által kiváltott irreverzibilis $V_{\max}^+$ csökkenés körülbelül 15 %-os volt, ami nem volt megfigyelhető egér kamrai izomzatban¹². Egy nemrégiben végzett vizsgálatban a $V_{\max}^+$ értéke kisebb volt a TRPM4 knockout egerek kamrai szívizomsejtjeiben, mint a vad típusú állatokéban⁷¹. A kisebb $V_{\max}^+$ érték a Na^+ -áramcsúcs sűrűségének csökkenésével magyarázható, mivel az körülbelül 30 %-kal kisebb volt a TRPM4 knockout egerekben⁷¹. Lehetséges, hogy a $V_{\max}^+$ CBA által kiváltott csökkenése a mi vizsgálatunkban a Na^+ csúcsáram csökkenését tükrözi, hiszen egy tanulmányban a TRPM4 delécioja a Nav1.5 funkcionális csökkenését okozta⁷¹.

Munkacsoportunk 9-phenanthrollal¹⁷³ végzett korábbi kísérleteinek eredményei összhangban vannak a CBA-val mért eredménnyel a $V_{\max}^+$ és az 1. fázis meredekség tekintetében, mivel mindkét szer mindkét paramétert csökkentette. Ezzel szemben a CBA nem hatott a Plat_{50} -re, ellentétben a 30 μ M 9-phenanthrol általi csökkentéssel¹⁷³. Hasonlóképpen a CBA és a 9-phenanthrol hatása az APD_{90} tekintetében is eltérő volt, mivel a CBA esetében rövidülő tendencia volt megfigyelhető, de 10 és 30 μ M 9-phenanthrol esetében az APD csökkenése csak a sejtek kisebb hányadában volt jellemző, és átlagosan az AP megnyúlása volt megfigyelhető¹⁷³.

Úgy tűnik tehát, hogy a CBA és a 9-phenanthrol hasonló TRPM4-gátlása ellenére a kutya kamrai AP morfológiára gyakorolt hatásuk jelentősen különbözik. Ez valószínűleg az egyéb, nem TRPM4-csatornákra gyakorolt eltérő hatásuknak köszönhető.

Összefoglalva, a TRPM4 gátlása várhatóan az APA növekedését, az 1. fázis repolarizáció lassulását, a plató potenciál enyhe változását (pozitív plató potenciálok esetén emelkedést, míg

negatív plató potenciálok esetén csökkenését) és az AP rövidülését eredményezi. Kísérleteinkben ezekhez hasonló, de a feltételezett hatásokkal nem teljesen egyező eredményeket tapasztaltunk: az APA kismértékű, de szignifikáns növekedését, az 1. fázis meredekségének csökkenését, a $V_{\max}^+$ irreverzibilis csökkenését és az AP rövidülésének tendenciáját.

6.3. A CBA hatása a repolarizáció rövid távú variabilitására

A TRPM4-csatornák tranziens befelé irányuló áramot közvetíthetnek (mint a kalcium-aktivált kloridáram és nátrium-kalcium csereáram), ami kalciummal túltöltődött sejtekben DAD kialakuláshoz vezet. Ezek szívritmuszavarokhoz vezethetnek a TdP típusú malignus kamrai tachyaritmia beindításával¹⁷⁴.

A TRPM4 gátlása valóban antiaritmiás lehet humán pitvari szívizomsejtekben és spontán hipertóniás patkányok kamrai sejtjeiben^{6,15}. Hasonló eredményeket kaptak egérben is, mivel a 9-phenanthrol dózisfüggő módon megszüntette a hipoxia és a reoxigenizáció által kiváltott korai utódepolarizációt¹³. A TRPM4 szívspecifikus overexpressziója egerekben erős terhelés és β -adrenerg stimuláció együttes alkalmazása esetén megnövelte az ektopiás kamrai ütések előfordulását¹⁷⁵. Ez a megfigyelés rávilágít annak lehetőségére, hogy a TRPM4 valóban képes *in vivo* kalciummal-túltöltődött sejtekben DAD generálásra. Hasonlóképpen, egerekben a TRPM4 részt vehet az aldoszteron által kiváltott pitvari aritmiákban⁶⁷. Továbbá, a TRPM4 T160M polimorfizmusát (a KCNQ1 G219E mutációjával együtt) egy olyan családban találták meg, ahol a hordozókban hosszú QT-szindróma lépett fel¹⁷⁶. Ezek alapján a TRPM4 a normál AP-időtartam fenntartásában is szerepet játszhat.

Vizsgáltuk a CBA által kiváltott TRPM4 gátlás hatását a repolarizáció rövid távú variabilitására (SV). A variabilitás növekedése a European Heart Rhythm Association és a European Society of Cardiology Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology által közösen kialakított állásfoglalás szerint a szívritmuszavarok jó előrejelzője¹⁷⁷. Az SV csökkentése antiaritmiás tulajdonságokkal bírhat. Mivel a TRPM4 CBA általi gátlása az SV reverzibilis csökkenését okozta, úgy tűnik, hogy a TRPM4-nek proaritmiás hatása van (12. A-C ábrák). Az egymást követő APD értékek nagymértékű, hirtelen változása (különösen, ha ez a teljes szívizomban nem egyenletes módon történik) hatékonyabban indukálhat szívritmuszavart¹⁷⁸. Ezért az esetlegesen előforduló 1-1 rövid vagy hosszú AP-k könnyebb észlelése érdekében az egymást követő APD értékek különbségét tartományokba rendeztük és megjelenésük

valószínűségét ábrázoltuk (12. D ábra). A görbe CBA jelenlétében reverzibilisen balra tolódott, ami ismét alátámasztja a szívritmuszavar esélyének csökkenését. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a natív TRPM4-áram hozzájárulhat a szívritmuszavarhoz, összhangban a korábbi vizsgálatokkal. Eredményeink azonban inkább a TRPM4-áram által közvetített SV növekedésen alapuló mechanizmusra utalnak, mint az EAD indukciójára, ahogy azt korábban kimutatták¹³. Meg kell említeni, hogy mivel a CBA a TRPM4-en kívül más ionáramokat is befolyásolhat (lásd a következő fejezetben), ezek is hozzájárulhatnak a CBA SV-re és relatív SV-re gyakorolt hatásához. Ezért az SV csökkenése mögött a CBA által gátolt I_{to} és $I_{Na,L}$ állhat, mivel ez a két áram valószínűleg növeli az SV-t¹⁵⁵. Ezzel párhuzamosan a TRPM4 által közvetített áram szerepe az SV növekedésében kisebb lehet. Mivel ezek a változások a CBA nem-TRPM4 ioncsatornákra kifejtett hatásai is lehetnek, ennek a lehetőségét hagyományos feszültség-zár mérésekkel teszteltük.

6.4. A CBA APVC-vel és hagyományos feszültség-zár technikával mért hatásai

A TRPM4-csatornák közvetlen gátlása mellett a CBA által kiváltott AP-morfológiai változásokat a vegyület nem specifikus hatásai is okozhatják. Például a V_{max}^+ csökkenése a Na^+ csatornák gátlásának, az 1. fázis meredekség csökkenése és az APA növekedése az I_{to} gátlásának eredménye lehet. Emellett az AP rövidülésére való hajlam pedig az $I_{Na,L}$ vagy az $I_{Ca,L}$ gátlásának, vagy akár késői K^+ áramok (I_{Kr} , I_{Ks} , esetleg I_{K1}) aktiválásának következménye is lehet.

Annak kizárására, hogy a CBA a TRPM4-en kívül más ioncsatornákon is hatna, a patch-clamp technika teljes sejtes konfigurációját használtuk, ahol a TRPM4 aktiváció megelőzésére 10 mM BAPTA formájában egy gyors kalcium kelátort alkalmaztunk. Ez a BAPTA koncentráció nemcsak az intracelluláris Ca^{2+} -tranziens teljes megszüntetésére képes, hanem a szubsarkolemmális és valószínűleg a szubmembrán hasadék Ca^{2+} -szintjének szisztolés emelkedésének megakadályozására is^{153,166}. Ennek megfelelően, legalábbis artériás simaizomban 10 mM BAPTA csökkentette a Ca^{2+} -szintet a mikrodoménekben és megakadályozta a TRPM4 aktiválódását¹⁶⁶. Bár nem közvetlenül TRPM4-áram mérések, de más vizsgálatok is arra utalnak, hogy a BAPTA blokkolhatja a TRPM4-et^{179,180}. Nyilvánvalóan meg kell említeni, hogy a BAPTA alkalmazása nem csak a TRPM4 aktiválódását akadályozza meg, hanem az összes Ca^{2+} érzékeny áramot befolyásolja, beleértve az L-típusú Ca^{2+} áramot (ahol a Ca^{2+} -függő inaktiválódása megszűnik, ami nagyobb áramot eredményez)¹⁸¹, a Ca^{2+} -aktivált Cl^- áramot (ahol az aktiválódás akadályozott)¹⁵³, az I_{Ks} -t (ahol a csatorna egyébként is kismértékű

aktiválódása egy normál időtartamú AP alatt valószínűleg tovább csökken)¹⁰⁰ és az I_{NCX} -et (amely BAPTA alkalmazásakor fordított üzemmódban működik, mely Ca^{2+} belépést és kifelé irányuló áramot eredményez)¹⁸¹. Ezek minden bizonnyal módosítják az egyes sejtek AP-jainak alakját, de ezt a méréseink során azzal küszöböltük ki, hogy ugyanazzal a kanonikus AP-vel ingereltünk minden sejtet. Tulajdonképpen a Ca^{2+} -aktivált Cl^- áram blokkolása és - az amúgy is meglehetősen kicsi - I_{Ks} csökkenése előnyös volt, mivel így a CBA nem volt képes ezeket módosítani a 10 mM BAPTA alkalmazásával végzett APVC kísérletek esetében. A hagyományos feszültségprotokollok során a vizsgált áramokat specifikus inhibitorok és feszültségimpulzusok alkalmazásával egyenként vizsgáltuk, tanulmányozva a CBA lehetséges hatását az adott áramra.

Mint már említettem, a CBA-t csak azután alkalmaztuk, hogy megerősítettük a BAPTA AP alakjára gyakorolt hatását. A CBA-érzékeny áram korai, rövid, kifelé irányuló csúcsa a CBA által indukált, az 1. fázis alatt folyó tranziens kifelé irányuló áram gátlásának köszönhető (13. E ábra). Mivel a kalcium-aktivált kloridáram aktiválódását 10 mM BAPTA-val megakadályoztuk¹⁵³, a gátolt áram csak a tranziens kifelé irányuló K^+ -áram lehet. Ezt meg is erősítettük hagyományos feszültség-zár protokollal megvizsgálva, ahol az összes többi fő áramot vagy inhibitorokkal gátoltuk (nisoldipin és E4031) vagy egy előimpulzussal inaktíváltuk (14. A-B ábra).

Az I_{to} reverzibilis CBA általi gátlása magyarázhatja az APVC kísérletek CBA-érzékeny áramának kifelé irányuló komponensét. Ez pedig jól egybevágh az AP mérésekben CBA által indukált 1. fázis meredekségének csökkenéssel és az AP amplitúdó enyhe növekedésével (10. ábra). A CBA-érzékeny áramban megfigyelhető hosszú befelé irányuló áram az L-típusú Ca^{2+} -, vagy a késői nátriumáram CBA általi gátlásának lehet a következménye. A CBA által indukált I_{NCX} gátlás a fent említett erős Ca^{2+} pufferek miatt valószínűtlen a méréseink során hiszen ilyenkor az I_{NCX} főként kifelé irányuló áramként lehet jelen. A CBA nem volt hatással az L-típusú Ca^{2+} -áramra (14. C-D ábra), ami összhangban van egy korábbi vizsgálattal⁹². A késői nátriumáramot azonban csökkentette a CBA (14. E-F ábra) amely hozzájárulhat az AP mérések során tapasztalt AP időtartam kis mértékű csökkenéséhez.

Mint korábban említettem, a TRPM4 knockout egerekben kisebb Na^+ áramcsúcsot figyeltek meg, de a késői nátriumáramot nem regisztrálták⁷¹. Mindazonáltal lehetséges, hogy a késői nátriumáram is nagyobb lehet a TRPM4 jelenlétében. Eredményeink alapján nem valószínű, hogy a CBA gátolná az AP-t alakító késői egyenirányító K^+ -áramokat (I_{Kr} és I_{Ks}), mivel ez kifelé irányuló áramokat eredményezne az APVC-vel mért CBA-érzékeny áramban a plató fázis alatt, különösen annak vége felé. Továbbá, ha ezeket az áramokat a CBA csökkentené, az

az AP-t megnyújtaná. Az I_{K1} szintén fontos szerepet játszik a terminális repolarizációban, de annak CBA-érzékenységét kizártuk (14. G-H ábrák). Ezzel összhangban az AP mérések során a CBA nem befolyásolta sem a nyugalmi membránpotenciál sem pedig a terminális repolarizáció maximális sebességének értékét. Ráadásul az APVC kísérletek során, ahol a BAPTA jelenléte miatt a TRPM4 nem aktiválódott, még valószínűbb lenne a CBA ezen nem specifikus gátló hatásainak megfigyelése.

A CBA-érzékeny áramgörbéken nem volt megfigyelhető az I_{K1} gátlására utaló áramjel változás (a diasztole során detektálható kifelé irányuló áram), valamint az AP vége felé növekvő és csúcspontot elérő kifelé irányuló áram sem (ami az I_{Kr} és az I_{K1} gátlására utalna). Mivel sem az AP-változások, sem a CBA-érzékeny áram nem utalt az I_{K1} , az I_{Kr} és az I_{Ks} potenciális gátlására, az I_{Kr} és az I_{Ks} esetében a közvetlen árammérések hiányában is kizárhatjuk e három K^+ -áram CBA általi gátlását. A CBA hatásának elmaradása az I_{Kr} -re várható volt, mivel a szív hERG csatornákra (az I_{Kr} pórusképző alegysége) nem volt hatással a CBA, valamint 10 μM CBA hatására kevesebb, mint 5 %-os csökkenést észleltek a specifikus antagonistá (dofetilid) kötődésében⁹².

Összehasonlítva a 9-phenanthrollal végzett korábbi vizsgálatunkkal, megállapíthatjuk, hogy a CBA specifikusabb, mint a széles körben alkalmazott 9-phenanthrol, mivel a CBA "csak" az I_{to} és az $I_{Na,L}$ áramot befolyásolta, míg a 9-phenanthrol az összes fő K^+ -áramot (I_{to} , I_{Kr} és I_{K1}) csökkentette a TRPM4 gátlására használt koncentrációkban¹⁷³. Bár sem a 9-phenanthrol, sem a CBA nem csökkentette az L-típusú Ca^{2+} -áramot, a 9-phenanthrol egy extra áramot aktivált +10 és +40 mV között¹⁷³ tovább csökkentve a vegyület specificitását.

6.5. 1 μM ABT-333 AP-ra kifejtett hatásai

Először 1 μM ABT-333 kutya bal kamrai szívműködés AP-jára gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az APD_{90} jelentősen és reverzibilisen megnőtt, valószínűleg az ABT-333 feltételezett I_{Kr} gátló hatása miatt.

Az I_{Kr} felelős a 3. fázis repolarizáció megindulásáért, de annak maximális sebessége (a V_{max} értéke) elsősorban, de nem kizárólag a befelé egyenirányító káliumáram, az I_{K1} áramsűrűségétől függ⁹⁹.

Az ABT-333 nem csökkentette a V_{max} -ot 1 μM koncentrációban, ami arra utal, hogy nem gátolja az I_{K1} -et. Az APD_{50}/APD_{90} arányt gyakran használják az AP-trianguláció markereként. Minél kisebb az érték, annál háromszögletesebb az AP-k alakja, ami gyakran megfigyelhető az I_{K1} gátlása során. Mivel az APD_{50}/APD_{90} arány nem változott jelentősen ABT-333 jelenlétében,

ez is megerősíti, hogy az ABT-333 nem gátolta az I_{K1} -et.

Az ABT-333 által kiváltott V_{Ph1max} és V_{max}^+ csökkenést a tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to}) és a nátriumáram (I_{Na}) gátlása okozhatja. Ezek a hatások a 20 perces kimosás után is jelen voltak, ami felveti az ABT-333 által okozott irreverzibilis csatornagátlás lehetőségét.

6.6. Az ABT-333 magasabb koncentrációinak hatása

1 μ M-nál magasabb koncentrációkban alkalmazott ABT-333 további változásokat okoztak az AP paraméterekben (16. ábra, 5. táblázat). Mind az APD_{50} , mind az APD_{90} értékek, valamint a korai platófázis amplitúdója ($Plat_{20}$ amplitúdó) koncentrációfüggő módon nőtt, ami ismét arra utal, hogy az ABT-333 csökkentette az I_{Kr} -t.

A V_{Ph1max} és V_{max}^+ értékek szintén csökkentek az ABT-333 jelenlétében. Ezek a megfigyelések felvetik az I_{to} és az I_{Na} gátlásának lehetőségét az I_{Kr} blokkolásán kívül. Az ABT-333 nagyobb koncentrációinál EAD-k jelentek meg, ami szintén az I_{Kr} gátlására utal, mivel az AP megnyúlása gyakran előzi meg EAD-k képződését. Egy számítógépes szimulációs vizsgálatban jelentős (több mint 90 %-os) I_{Kr} csökkenés volt szükséges az EAD kialakuláshoz¹¹⁸. Az APD növekedése azonban nem mindig az I_{Kr} gátlásának köszönhető, elvileg lehet a plató fázis alatti nátrium- vagy kalciumáramok növekedésének következménye is. Az előbbi valószínűleg kizárható, mivel az ABT-333 hatására észlelt V_{max}^+ csökkenés nem áll összhangban a nagyobb nátriumárammal. Az ABT-333 által okozott kalciumáram növekedés egy valószínűbb lehetőség, különösen mivel ez a korai plató potenciál emelkedéséhez vezetne, amit valóban észleltünk az ABT-333 alkalmazásakor (16. B ábra).

Összegezve tehát, a főleg magasabb ABT-333 koncentrációkban tapasztalt EAD-k megjelenése a nagy mértékű I_{Kr} gátlás, vagy az I_{Kr} gátlás és az egyidejű kalciumáram növelés következménye.

6.7. ABT-333-érzékeny áramprofil APVC-vel

Az ABT-333 által kiváltott V_{Ph1max} csökkenés az I_{to} gátlására utalt az I_{Kr} gátláson felül. Ezt próbáltuk megerősíteni az APVC mérésekkel. Az ABT-333-érzékeny áram korai, kifelé irányuló csúcsának tulajdonságai nagyon hasonlóak voltak ahhoz, amit korábban az I_{to} gátló 4-AP-vel^{99,182} mutattunk ki. 1 mM 4-AP az I_{to} körülbelül 70 %-át gátolja és körülbelül 3 pA/pF csúcsáramsűrűséget eredményezett (lásd az 1. ábrát Bányász és mtsai.⁹⁹).

A disszertációban bemutatott ABT-333-érzékeny áram korai, kifelé irányuló csúcsának áramsűrűsége valamivel kisebb volt: $2,76 \pm 0,64$ pA/pF. Ennek oka lehet a kis I_{to} árammal rendelkező sejtek nagyobb arányú előfordulása. Ezenkívül az ABT-333-érzékeny áramcsúcs időpontja mindig a V_{Ph1max} időpontja után, de a parancspotenciál incisura legmélyebb pontja előtt volt. További bizonyíték arra, hogy az ABT-333 gátolhatja az I_{to} -t, az a sejtek saját AP-jainak V_{Ph1max} értékei és az ABT-333-érzékeny áramok korai áramcsúcs-sűrűség értékei közötti erős korreláció (19. C ábra). Továbbá a korai kifelé irányuló áram nagyon gyorsan lecsengett, hasonlóan a 4-AP-érzékeny áramhoz¹⁸³. Az I_{to} tanulmányozására 100 μ M chromanol-293B is használható, ahol az áram lecsengése kevésbé volt gyors¹⁸⁴. Megjegyzendő, hogy az ABT-333-érzékeny áram nem csökkent le közel nullára, mint ahogyan a 4-AP-érzékeny áram esetében megfigyelhető volt⁹⁹. Ez az ABT-333-nak az AP korai platófázisa alatt aktív egyéb ioncsatornákra gyakorolt hatásával magyarázható. Eredmények alapján tehát úgy tűnik, hogy 10 μ M ABT-333 jelentősen gátolja az I_{to} -t.

Az ABT-333-tól várt I_{Kr} gátló hatást APVC-vel is megerősítettük. Az I_{endsus} pozíciója $7,82 \pm 1,64$ ms volt a parancspotenciál V_{max} időpontját megelőzően, ami jó összhangban van a korábbi eredményekkel^{99,183}. Az 1 μ M E4031-érzékeny áram csúcsértéke körülbelül 0,6 pA/pF volt, ami valamivel kisebb, mint a jelenlegi vizsgálatban megfelelő helyen mért ABT-333-érzékeny áramsűrűség (kb. 0,8 pA/pF). Ennek oka az lehetett, hogy a jelenlegi vizsgálat sejtjeiben nagyobb I_{Kr} áramok voltak, mint a korábbi vizsgálatunkban (lásd a 2. ábrát Bányász és mtsai. ⁹⁹), mivel az abban használt 1 μ M E4031 az I_{Kr} kb. 80 %-át gátolja¹⁸, hasonlóan a hERG 10 μ M ABT-333 általi szintén kb. 80 %-os gátlásához (20. C ábra).

Ezenkívül lehetséges, hogy az ABT-333-érzékeny áram az I_{to} és az I_{Kr} mellett egy aktivált kalciumáram-komponenst is tartalmaz, ahogy azt korábban is említettem. Ez az aktivált kalciumáram, ha még aktív a plató késői fázisában, hozzáadódhat az ABT-333-érzékeny áram késői csúcsértékéhez az I_{Kr} -en felül, ami magyarázhatja az E4031-érzékeny áramnál nagyobb ABT-333 érzékeny áram (I_{endsus}) értéket. Ez a lehetőség nyilvánvaló, ha megfigyeljük az I_{to} és az I_{Kr} áramgörbéit, mivel az I_{to} legkésőbb a plató fázis után 50 ms-mal nullára csökken, míg az I_{Kr} csak az AP csúcs után kb. 70-80 ms-mal kezd aktiválódni⁹⁹. Az I_{to} azonban lassabban is lecsökkenhet¹⁸⁴ és ezért hozzájárulhat az ABT-333-érzékeny áram kifelé irányuló komponensének fenntartásához a korai platófázisban (19. B ábra). Az ABT-333-érzékeny áram késői csúcsáért felelős lehet az ABT-333-indukált nátrium- vagy kalciumáram fokozódása is, mivel az kifelé irányuló áramként jelenik meg. A késői nátriumáram hozzájárulása azonban

valószínűtlen, mivel az ABT-333 csökkentette az AP $V_{\max}^+$ értékét, ami a nátriumáram aktiválása ellen szól.

6.8. A hERG-csatorna-áramok ABT-333-indukált csökkenése

Az ABT-333 által kiváltott AP-paraméter változások, nevezetesen az APD₅₀ és az APD₉₀ növekedése, főként arányuk megváltozása nélkül, valamint a $V_{\max}$ csökkenése az I_{Kr} gátlására utalt. Ez várható volt az ABT-333-ban található metánszulfonamid csoport miatt. Ezenkívül az ABT-333-érzékeny áram a késői platófázisban is kifelé irányuló volt, ami szintén az I_{Kr} gátlására utal. Tekintettel arra, hogy az I_{Kr} áramért a hERG-csatornák felelősek, kísérleteket végeztünk a hERG-csatornákat stabilan expresszáló HEK-sejteken. Várakozásunknak megfelelően, a hERG-mediált áramot az ABT-333 koncentrációfüggő módon, 3,2 μ M-os IC₅₀ értékkel gátolta. Hasonlóan néhány AP paraméterhez, ahol az ABT-333 által kiváltott változások (részben) irreverzibilisek voltak kimosásra, a hERG-áram ABT-333 általi csökkentése sem volt teljesen visszafordítható. Sőt, az ABT-333 30 μ M koncentrációban történő alkalmazása a depolarizáló impulzus során időfüggő gátlást okozott, amelynek időállandója $0,87 \pm 0,09$ s (20. B. ábra). Ez arra készítetett minket, hogy megvizsgáljuk az ABT-333 lehetséges hatásait a hERG-csatorna kapuzási átmeneteire (21. ábra). Ennek alapján 3 μ M ABT-333 szignifikánsan csökkentette a deaktiválási időállandó arányát ($\tau_{\text{ABT-333}} / \tau_{\text{Kontroll}} = 0,46 \pm 0,04$, $p = 0,0001$), 30 μ M ABT-333 perfúziója pedig az inaktiválási időállandó arányát csökkentette $0,78 \pm 0,15$ -ra (átlag $\pm$ SEM). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az ABT-333 blokkolja a csatorna pórusát, főként a csatorna nyitott állapotában.

6.9. Orvosi relevancia

Hipotézisünknek megfelelően az ABT-333 valóban blokkolta az I_{Kr} áramot. Ezt alátámasztotta (1) a kutya kamrai AP megnyúlása; (2) a terminális repolarizáció maximális sebességének csökkenése ($V_{\max}$ csökkenés); (3) az ABT-333-érzékeny áram késői fázisának I_{Kr} -szerű profiljának kimutatása APVC-vel; és (4) az expresszált hERG-csatornák, az I_{Kr} -ért felelős csatornafehérje áramának gátlása. Egy vegyület kettős hatást fejthet ki bizonyos ioncsatornákon, mint például a 2-APB esetében a TRPM7 csatornákon¹⁸⁵, vagy a Ca^{2+} -felszabadulással aktivált Ca^{2+} -áramért felelős csatornákon¹⁸⁶. Ezenkívül számos I_{Kr} aktivátor, mint például az RPR260243¹⁸⁷, NS1643¹⁸⁸, NS3623¹⁸⁹, ICA-105574¹⁹⁰ és az A-935142¹⁹¹ nagy koncentrációban gátolta az I_{Kr} -t. Ebben a kísérletsorozatban 1-30 μ M közötti ABT-333-at

használtunk, de tekintettel a terápiás ABT-333 dózis (1 nM) és az általunk vizsgált koncentrációk közötti nagy különbségre, az ABT-333 terápiás koncentrációját is vizsgáltuk (4.táblázat). Eredményeink alapján a terápiás dózis biztonságosnak mondható, az ABT-333 nem befolyásolja szignifikánsan a bal kamrai AP semelyik paraméterét. Összességében meglehetősen valószínűtlen, hogy az ABT-333 a vérplazmában 1 nM-nál magasabb koncentrációt érhet el, tekintettel arra, hogy az ajánlott adag napi kétszer 250 mg. Ezért még ABT-333-túladagolás esetén is nagyon alacsony az ABT-333 aritmiás kockázata.

7. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények

Munkacsoportunk első ízben vizsgálta meg a CBA és az ABT-333 hatásait kutyák bal kamrai szívműködésében. Ez volt az első kísérletsorozat, amely nagyobb testű állatok szívéből nyert sejteken történt, ezáltal közelebb kerülve a szerek humánra gyakorolt hatásának potenciális profiljának felderítéséhez.

7.1. CBA - TRPM4

Munkacsoportunk a TRPM4 fehérje kifejeződését elsőként mutatta ki kutyaszív mind a négy üregének falában, valamint izolált bal kamrai kutya kardiomiocitákban is.

Eredményeink alapján a TRPM4 csatornákra szelektívnek vélt CBA csökkentette az 1. fázis repolarizáció meredekségét, valamint enyhén növelte az AP amplitúdóját, mely hatásokért valószínűleg a szer I_{to} gátló hatása felelős.

Az AP rövidülésének tendenciája a befelé irányuló áramok gátlásával magyarázható, amelyek az APVC méréseken láthatóak a plató fázisban. Ez a hatás a CBA befelé irányuló a $I_{Na,L}$ -ra gyakorolt gátló hatásának köszönhető.

Eredményeink alapján tehát a CBA nem teljesen szelektív a TRPM4-csatornákra, így a csatorna funkcionális vizsgálatára önmagában natív szöveten nem használható, farmakológiai kombinációban való alkalmazása pedig fokozott körültekintést igényel.

7.2. ABT-333 – I_{Kr} (hERG)

1 μ M ABT-333 alkalmazása reverzibilis módon megnyújtotta az AP hosszát. A 0. és 1. fázis maximális sebessége irreverzibilis csökkenést mutatott. A magasabb ABT-333 koncentrációk nagyobb AP megnyúlást, a korai platópotenciál növekedését és a 0., 1. és 3. fázis maximális sebességének csökkenését okozták.

Egyes sejtekben 3-30 μ M ABT-333 koncentrációban EAD-k jelentek meg. A 10 μ M ABT-333-érzékeny áram, amelyet APVC technikával mértünk, tartalmazott egy késői kifelé irányuló komponenst, ami az I_{Kr} -nek, valamint egy korai kifelé irányuló komponenst is, amely a tranzienst kifelé irányuló káliumáramnak (I_{to}) felelt meg.

Az ABT-333 koncentrációfüggő, részben reverzibilis módon csökkentette a hERG-csatorna által közvetített ionáramot, 3,2 μ M-os félgátló koncentrációval.

8. Összefoglalás

8.1. CBA - TRPM4

A jelen tanulmány főbb eredményei a TRPM4 fehérje kifejeződését mutatják a kutyaszív mind a négy üregének falában, valamint az izolált bal kamrai kutya kardiomiocitákban. A CBA egy meglehetősen új vegyület, úgy tűnik, hogy a 9-phenanthrolnál specifikusabb a TRPM4 gátlására és ezért alkalmasabb a TRPM4 szív fiziológiában betöltött szerepének tanulmányozására. Mivel a CBA befolyásolja az I_{to} -t és az $I_{Na,L}$ -t, fokozott óvatossággal kell eljárni amikor olyan kísérleti körülmények között alkalmazzák, ahol ezek az ionáramok aktívak, mint például a natív kardiomiocitákban.

8.2. ABT-333 – I_{Kr} (hERG)

Az ABT-333 a molekuláris szerkezete alapján potenciálisan blokkolja a hERG-csatornákat és az I_{Kr} áramot. Ez beigazolódott, mivel 1-30 μ M ABT-333 jelenlétében a szív AP megnyúlt és EAD-k jelentkeztek, továbbá csökkent az expresszált hERG csatornák árama is. Az ABT-333 a fenti koncentráció tartományban valószínűleg gátolja az I_{to} áramot is és aktiválhatja a kalciumáramot. Mindezek ellenére az ABT-333 szívritmuszavarok szempontjából biztonságosnak tekinthető, mivel plazmaszintje még túladagolás esetén sem ér el ilyen magas koncentrációt. Amiatt is biztonságos, mert a terápiás koncentrációban nem befolyásolta a hERG-csatornákat és a kamrai AP-t sem.

9. Summary

9.1. CBA - TRPM4

The main results of the present study show the expression of TRPM4 protein in the wall of all four chambers of the canine heart and in isolated left ventricular canine cardiomyocytes. CBA, a rather new compound, appears to be more specific than 9-phenanthrol for inhibiting TRPM4 and is therefore more suitable for studying the role of TRPM4 in cardiac physiology. As CBA affects I_{to} and $I_{Na,L}$, increased caution should be exercised when used in experimental conditions where these ion currents are active, such as in native cardiomyocytes.

9.2. ABT-333 – I_{Kr} (hERG)

Based on its molecular structure, ABT-333 has the potential to block hERG channels and I_{Kr} currents. This was confirmed as the administration of 1-30 μ M ABT-333 led to prolongation of cardiac APs and generation of EADs and also to the reduction of the expressed hERG channel current. ABT-333 also inhibits I_{to} current and may activate calcium current in this concentration range. Nevertheless, regarding cardiac arrhythmogenesis ABT-333 is considered safe because its plasma level is unlikely to reach such high concentrations even in the case of overdose. The lack of effect on hERG channels and AP at therapeutic concentrations also strengthen its safety.

10. Irodalomjegyzék

1. Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Ono, K. & Ito, H. The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circ. J.* 73, 419–427 (2009).
2. Cho, C. H., Lee, Y. S., Kim, E., Hwang, E. M. & Park, J. Y. Physiological functions of the TRPM4 channels via protein interactions. *BMB Rep.* 48, 1–5 (2015).
3. Guinamard, R. *et al.* TRPM4 in cardiac electrical activity. *Cardiovasc. Res.* 108, 21–30 (2015).
4. Liu, H. *et al.* Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 3, 374–385 (2010).
5. Piao, H. *et al.* Transient receptor potential melastatin-4 is involved in hypoxia-reoxygenation injury in the cardiomyocytes. *PLoS One* 10, 1–15 (2015).
6. Guinamard, R. *et al.* Functional characterization of a Ca²⁺-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J. Physiol.* 558, 75–83 (2004).
7. Kruse, M. *et al.* Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J. Clin. Invest.* 119, 2737–2744 (2009).
8. Stallmeyer, B. *et al.* Mutational spectrum in the Ca²⁺-activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Hum. Mutat.* 33, 109–117 (2012).
9. Liu, H. *et al.* Molecular Genetics and Functional Anomalies in a Series of 248 Brugada Cases with 11 Mutations in the TRPM4 Channel. *PLoS One* 8, (2013).
10. Rixecker, T. *et al.* TRPM4-mediated control of FcεRI-evoked Ca²⁺ elevation comprises enhanced plasmalemmal trafficking of TRPM4 channels in connective tissue mast cells. *Sci. Rep.* 6, 1–11 (2016).
11. Kecskés, M. *et al.* The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is a negative regulator of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res. Cardiol.* 110, (2015).
12. Simard, C., Hof, T., Keddache, Z., Launay, P. & Guinamard, R. The TRPM4 non-selective cation channel contributes to the mammalian atrial action potential. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 59, 11–19 (2013).
13. Simard, C., Sallé, L., Rouet, R. & Guinamard, R. Transient receptor potential melastatin 4 inhibitor 9-phenanthrol abolishes arrhythmias induced by hypoxia and re-oxygenation in mouse ventricle. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2354–2364 (2012).
14. Guinamard, R., Hof, T. & Del Negro, C. A. The TRPM4 channel inhibitor 9-phenanthrol. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1600–1613 (2014).
15. Guinamard, R., Demion, M., Magaud, C., Potreau, D. & Bois, P. Functional expression of the TRPM4 cationic current in ventricular cardiomyocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 48, 587–594 (2006).

16. Demion, M., Bois, P., Launay, P. & Guinamard, R. TRPM4, a Ca²⁺-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells. *Cardiovasc. Res.* 73, 531–538 (2007).
17. Ullrich, N. D. *et al.* Comparison of functional properties of the Ca²⁺-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice. *Cell Calcium* 37, 267–278 (2005).
18. Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol.* 96, 195–215 (1990).
19. Varro, A. *et al.* The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J. Physiol.* 523 Pt 1, 67–81 (2000).
20. Lazzara, R. Mechanisms and management of congenital and acquired long QT syndromes. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 89 Spec No, 51–55 (1996).
21. Hondeghem, L. M. & Snyders, D. J. 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 (1990).
22. Jurkiewicz, N. K. & Sanguinetti, M. C. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ. Res.* 72, 75–83 (1993).
23. Rosen, M. R. & Cohen, I. S. Molecular/genetic determinants of repolarization and their modification by environmental stress. *J. Intern. Med.* 259, 7–23 (2006).
24. Yue, Z. *et al.* Role of trp channels in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 308, H157–H182 (2015).
25. Montell, C., Jones, K., Hafen, E. & Rubin, G. Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* (80-.). 230, 1040–1043 (1985).
26. Chang, Y., Schlenstedt, G., Flockerzi, V. & Beck, A. Properties of the intracellular transient receptor potential (TRP) channel in yeast, Yvc1. *FEBS Lett.* 584, 2028–2032 (2010).
27. Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Takahashi, Y. & Ito, H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* 118, 337–351 (2008).
28. Vennekens, R. & Nilius, B. Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role. *Handb. Exp. Pharmacol.* 179, 269–285 (2007).
29. Gaudet, R. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol. Biosyst.* 4, 372–379 (2008).
30. Hellmich, U.A.; Gaudet, R. Structural biology of TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2014, 223, 963–990. *Physiol. Behav.* 176, 139–148 (2018).
31. Jimenez, I. *et al.* TRPM Channels in Human Diseases. *Cells* 9, (2020).

32. Fonfria, E. *et al.* Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J. Recept. Signal Transduct.* 26, 159–178 (2006).
33. Winkler, P. A., Huang, Y., Sun, W., Du, J. & Lü, W. Electron cryo-microscopy structure of a human TRPM4 channel. *Nature* 552, 200–205 (2017).
34. Liu, D. & Liman, E. R. Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15160–15165 (2003).
35. Nilius, B. *et al.* Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.* 280, 6423–6433 (2005).
36. Guinamard, R., Sallé, L. & Simard, C. The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, 147–171 (2011).
37. Guinamard, R., Demion, M. & Launay, P. Physiological roles of the TRPM4 channel extracted from background currents. *Physiology* 25, 155–164 (2010).
38. Launay, P. *et al.* TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109, 397–407 (2002).
39. Nilius, B. *et al.* The selectivity filter of the cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.* 280, 22899–22906 (2005).
40. Nilius, B. *et al.* The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *EMBO J.* 25, 467–478 (2006).
41. Nilius, B. & Vennekens, R. From cardiac cation channels to the molecular dissection of the transient receptor potential channel TRPM4. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 453, 313–321 (2006).
42. Earley, S., Straub, S. V. & Brayden, J. E. Protein kinase C regulates vascular myogenic tone through activation of TRPM4. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 292, 2613–2622 (2007).
43. Colquhoun, D., Neher, E., Reuter, H. & Stevens, C. F. Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature* 294, 752–754 (1981).
44. Van den Abbeele, T., Tran Ba Huy, P. & Teulon, J. A calcium-activated nonselective cationic channel in the basolateral membrane of outer hair cells of the guinea-pig cochlea. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 427, 56–63 (1994).
45. Earley, S. TRPM4 channels in smooth muscle function. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 465, 1223–1231 (2013).
46. Gonzales, A. L. & Earley, S. Regulation of Cerebral Artery Smooth Muscle Membrane Potential by Ca²⁺-Activated Cation Channels. *Microcirculation* 20, 337–347 (2013).
47. Malysz, J., Maxwell, S. E., Yarotsky, V. & Petkov, G. V. TRPM4 channel inhibitors 9-phenanthrol and glibenclamide differentially decrease guinea pig detrusor smooth muscle whole-cell cation currents and phasic contractions. *Am. J. Physiol. Physiol.* 318,

C406–C421 (2020).

48. Dwyer, L. *et al.* Basally activated nonselective cation currents regulate the resting membrane potential in human and monkey colonic smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 301, 287–296 (2011).
49. Negri, S., Faris, P., Berra-Romani, R., Guerra, G. & Moccia, F. Endothelial Transient Receptor Potential Channels and Vascular Remodeling: Extracellular Ca²⁺ Entry for Angiogenesis, Arteriogenesis and Vasculogenesis. *Front. Physiol.* 10, 1–23 (2020).
50. Vennekens, R. *et al.* Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat. Immunol.* 8, 312–320 (2007).
51. Islam, M. S. Molecular Regulations and Functions of the Transient Receptor Potential Channels of the Islets of Langerhans and Insulinoma Cells. *Cells* 9, (2020).
52. Tran, T. D. N. *et al.* Histamine-induced Ca²⁺ signalling is mediated by TRPM4 channels in human adipose-derived stem cells. *Biochem. J.* 463, 123–134 (2014).
53. Wang, H. *et al.* Gain-of-Function Mutations in TRPM4 Activation Gate Cause Progressive Symmetric Erythrokeratoderma. *J. Invest. Dermatol.* 139, 1089–1097 (2019).
54. Cantero-Recasens, G. *et al.* Sodium channel TRPM4 and sodium/calcium exchangers (NCX) cooperate in the control of Ca²⁺-induced mucin secretion from goblet cells. *J. Biol. Chem.* 294, 816–826 (2019).
55. Al-Shammari, H. *et al.* Expression and function of mechanosensitive ion channels in human valve interstitial cells. *PLoS One* 15, 1–18 (2020).
56. Borgström, A., Peinelt, C. & Stokłosa, P. Trpm4 in cancer—a new potential drug target. *Biomolecules* 11, 1–14 (2021).
57. Hantute-Ghesquier, A., Haustrate, A., Prevarskaya, N. & Lehen'kyi, V. TRPM family channels in cancer. *Pharmaceuticals* 11, 1–14 (2018).
58. Hof, T., Simard, C., Rouet, R., Sallé, L. & Guinamard, R. Implication of the TRPM4 nonselective cation channel in mammalian sinus rhythm. *Hear. Rhythm* 10, 1683–1689 (2013).
59. Gaur, N., Hof, T., Haissaguerre, M. & Vigmond, E. J. Propagation Failure by TRPM4 Overexpression. *Biophys. J.* 116, 469–476 (2019).
60. Inoue, R. *et al.* Transient Receptor Potential Channels in Cardiovascular Function and Disease. *Circ. Res.* 99, 119–131 (2006).
61. Abriel, H., Syam, N., Sottas, V., Amarouch, M. Y. & Rougier, J. S. TRPM4 channels in the cardiovascular system: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Biochem. Pharmacol.* 84, 873–881 (2012).
62. Kruse, M. & Pongs, O. TRPM4 channels in the cardiovascular system. *Curr. Opin.*

Pharmacol. 15, 68–73 (2014).

63. Wang, C., Naruse, K. & Takahashi, K. Role of the TRPM4 channel in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Cells* 7, (2018).
64. Demion, M. *et al.* Trpm4 Gene Invalidation Leads to Cardiac Hypertrophy and Electrophysiological Alterations. *PLoS One* 9, e115256 (2014).
65. Guo, J., Ono, K. & Noma, A. Monovalent cation conductance of the sustained inward current in rabbit sinoatrial node cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 433, 209–211 (1996).
66. Mathar, I. *et al.* Increased catecholamine secretion contributes to hypertension in TRPM4-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 120, 3267–3279 (2010).
67. Simard, C. *et al.* TRPM4 Participates in Aldosterone-Salt-Induced Electrical Atrial Remodeling in Mice. *Cells* 10, 636 (2021).
68. Choudhury, M., Boyett, M. R. & Morris, G. M. Biology of the Sinus Node and its Disease. *Arrhythmia Electrophysiol. Rev.* 4, 28 (2015).
69. Zhainazarov, A. B. Ca²⁺-activated nonselective cation channels in rat neonatal atrial myocytes. *J. Membr. Biol.* 193, 91–98 (2003).
70. Zhang, Y. H. *et al.* Evidence for functional expression of TRPM7 channels in human atrial myocytes. *Basic Res. Cardiol.* 107, (2012).
71. Ozhathil, L. C. *et al.* Deletion of Trpm4 Alters the Function of the Nav1.5 Channel in Murine Cardiac Myocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3401 (2021).
72. Hu, Y. *et al.* Uncovering the arrhythmogenic potential of TRPM4 activation in atrial-derived HL-1 cells using novel recording and numerical approaches. *Cardiovasc. Res.* 113, 1243–1255 (2017).
73. Hu, Y. *et al.* Pathological activation of CaMKII induces arrhythmogenicity through TRPM4 overactivation. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 473, 507–519 (2021).
74. Son, M. J. *et al.* Shear stress activates monovalent cation channel transient receptor potential melastatin subfamily 4 in rat atrial myocytes via type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and Ca²⁺ release. *J. Physiol.* 594, 2985–3004 (2016).
75. Simard, C. *et al.* TRPM4 non-selective cation channel in human atrial fibroblast growth. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 472, 1719–1732 (2020).
76. Hof, T. *et al.* TRPM4 non-selective cation channels influence action potentials in rabbit Purkinje fibres. *J. Physiol.* 594, 295–306 (2016).
77. Amarouch, M. Y. & El Hilaly, J. Inherited Cardiac Arrhythmia Syndromes: Focus on Molecular Mechanisms Underlying TRPM4 Channelopathies. *Cardiovasc. Ther.* 2020, (2020).
78. Hu, Y. *et al.* Theoretical Investigation of the Mechanism by which A Gain-of-Function

- Mutation of the TRPM4 Channel Causes Conduction Block. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8513 (2021).
79. Tambi, R. *et al.* Single-cell transcriptomics trajectory and molecular convergence of clinically relevant mutations in Brugada syndrome. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 320, H1935–H1948 (2021).
 80. Gualandi, F. *et al.* Mutation Load of Multiple Ion Channel Gene Mutations in Brugada Syndrome. *Cardiol.* 137, 256–260 (2017).
 81. Gueffier, M. *et al.* The TRPM4 channel is functionally important for the beneficial cardiac remodeling induced by endurance training. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 38, 3–16 (2017).
 82. Guinamard, R., Rahmati, M., Lenfant, J. & Bois, P. Characterization of a Ca²⁺-activated nonselective cation channel during dedifferentiation of cultured rat ventricular cardiomyocytes. *J. Membr. Biol.* 188, 127–135 (2002).
 83. Guinamard, R., Chatelier, A., Lenfant, J. & Bois, P. Activation of the Ca²⁺-activated nonselective cation channel by diacylglycerol analogues in rat cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 15, 342–348 (2004).
 84. Ehara, T., Noma, A. & Ono, K. Calcium-activated non-selective cation channel in ventricular cells isolated from adult guinea-pig hearts. *J. Physiol.* 403, 117–133 (1988).
 85. Mathar, I. *et al.* Increased β -adrenergic inotropy in ventricular myocardium from Trpm4^{-/-} mice. *Circ. Res.* 114, 283–294 (2014).
 86. Medert, R. *et al.* Development of an AAV9-RNAi-mediated silencing strategy to abrogate TRPM4 expression in the adult heart. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 473, 533–546 (2021).
 87. Nilius, B., Prenen, J., Voets, T. & Droogmans, G. Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4b. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 448, 70–75 (2004).
 88. Suh, S. H., Watanabe, H., Droogmans, G. & Nilius, B. ATP and nitric oxide modulate a Ca²⁺-activated non-selective cation current in macrovascular endothelial cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 444, 438–445 (2002).
 89. Talavera, K. *et al.* The taste transduction channel TRPM5 is a locus for bitter-sweet taste interactions. *FASEB J.* 22, 1343–1355 (2008).
 90. Grand, T. *et al.* 9-Phenanthrol inhibits human TRPM4 but not TRPM5 cationic channels. *Br. J. Pharmacol.* 153, 1697–1705 (2008).
 91. Guinamard, R., Simard, C. & Del Negro, C. Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol. Ther.* 138, 272–284 (2013).
 92. Ozhatil, L. C. *et al.* Identification of potent and selective small molecule inhibitors of the cation channel TRPM4. *Br. J. Pharmacol.* 175, 2504–2519 (2018).

93. Delalande, C. *et al.* Optimizing TRPM4 inhibitors in the MHFP6 chemical space. *Eur. J. Med. Chem.* 166, 167–177 (2019).
94. Vandewiele, F. *et al.* TRPM4 inhibition by meclofenamate suppresses Ca²⁺-dependent triggered arrhythmias. *Eur. Heart J.* 43, 4195–4207 (2022).
95. Chen, B. *et al.* TRPM4-specific blocking antibody attenuates reperfusion injury in a rat model of stroke. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 471, 1455–1466 (2019).
96. Low, S. W. *et al.* Development and characterization of a monoclonal antibody blocking human TRPM4 channel. *Sci. Rep.* 11, 10411 (2021).
97. Chen, B. *et al.* Non-Invasive Multimodality Imaging Directly Shows TRPM4 Inhibition Ameliorates Stroke Reperfusion Injury. *Transl. Stroke Res.* 10, 91–103 (2019).
98. Flannery, R. J., Kleene, N. K. & Kleene, S. J. A TRPM4-dependent current in murine renal primary cilia. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 309, F697–F707 (2015).
99. Bányász, T. *et al.* Action potential clamp fingerprints of K⁺ currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiol. (Oxf).* 190, 189–198 (2007).
100. Horváth, B. *et al.* Ion current profiles in canine ventricular myocytes obtained by the “onion peeling” technique. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 158, 153–162 (2021).
101. Chinn, K. Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 553–560 (1993).
102. Nattel, S., Yue, L. & Wang, Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 9, 217–226 (1999).
103. Ono, K., Shibata, S. & Iijima, T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. *J. Physiol.* 524, 51–62 (2000).
104. Li, G.-R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M. & Nattel, S. Evidence for Two Components of Delayed Rectifier K⁺ Current in Human Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* 78, 689–696 (1996).
105. Wang, Z., Fermini, B. & Nattel, S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc. Res.* 28, 1540–1546 (1994).
106. Cheng, J. *et al.* Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K⁺ current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilideclass III agents. *Cardiovasc. Res.* 43, 135–147 (1999).
107. Szentadrassy, N. *et al.* Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc. Res.* 65, 851–860 (2005).
108. Szabó, G. *et al.* Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 450, 307–316 (2005).

109. Drici, M. D. & Barhanin, J. Cardiac K⁺ channels and drug-acquired long QT syndrome. *Therapie* 55, 185–193 (2000).
110. Roden, D. M. Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J. Intern. Med.* 259, 59–69 (2006).
111. Roden, D. M. & Viswanathan, P. C. Genetics of acquired long QT syndrome. *J. Clin. Invest.* 115, 2025–2032 (2005).
112. Chiang, C. E. & Roden, D. M. The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 1–12 (2000).
113. el-Sherif, N. & Turitto, G. The long QT syndrome and torsade de pointes. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 22, 91–110 (1999).
114. Priori, S. G. & Napolitano, C. Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1015, 96–110 (2004).
115. Warmke, J. W. & Ganetzky, B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3438–3442 (1994).
116. Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E. & Keating, M. T. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81, 299–307 (1995).
117. Spector, P. S., Curran, M. E., Keating, M. T. & Sanguinetti, M. C. Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ. Res.* 78, 499–503 (1996).
118. Christophe, B. Occurrence of early afterdepolarization under healthy or hypertrophic cardiomyopathy conditions in the human ventricular endocardial myocyte: In silico study using 109 torsadogenic or non-torsadogenic compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 438, 115914 (2022).
119. Studenik, C. R., Zhou, Z. & January, C. T. Differences in action potential and early afterdepolarization properties in LQT2 and LQT3 models of long QT syndrome. *Br. J. Pharmacol.* 132, 85–92 (2001).
120. Szentandrassy, N. *et al.* Contribution of ion currents to beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 467, 1431–1443 (2015).
121. Baumert, M. *et al.* QT interval variability in body surface ECG: measurement, physiological basis, and clinical value: position statement and consensus guidance endorsed by the European Heart Rhythm Association jointly with the ESC Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiol. *Eur. J. Work. groups Card. pacing, arrhythmias, Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 18, 925–944 (2016).
122. Shimizu, W. & Antzelevitch, C. Cellular basis for long QT, transmural dispersion of repolarization, and torsade de pointes in the long QT syndrome. *J. Electrocardiol.* 32

Suppl, 177–184 (1999).

123. Curran, M. E. *et al.* A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795–803 (1995).
124. Perissinotti, L. L. *et al.* Determinants of Isoform-Specific Gating Kinetics of hERG1 Channel: Combined Experimental and Simulation Study. *Front. Physiol.* 9, 207 (2018).
125. Carmeliet, E. Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262, 809–817 (1992).
126. Veldkamp, M. W. Is the slowly activating component of the delayed rectifier current, I_{Ks} absent from undiseased human ventricular myocardium? *Cardiovascular research* vol. 40 433–435 (1998).
127. Veldkamp, M. W., van Ginneken, A. C., Opthof, T. & Bouman, L. N. Delayed rectifier channels in human ventricular myocytes. *Circulation* 92, 3497–3504 (1995).
128. Kiehn, J., Lacerda, A. E., Wible, B. & Brown, A. M. Molecular physiology and pharmacology of HERG. Single-channel currents and block by dofetilide. *Circulation* 94, 2572–2579 (1996).
129. Vaughan Williams, E. M. Classifying antiarrhythmic actions: by facts or speculation. *J. Clin. Pharmacol.* 32, 964–977 (1992).
130. Carmeliet, E. & Mubagwa, K. Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanisms of action. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 70, 1–72 (1998).
131. Mitcheson, J. S., Chen, J., Lin, M., Culberson, C. & Sanguinetti, M. C. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12329–12333 (2000).
132. Plante, I., Vigneault, P., Drolet, B. & Turgeon, J. Rosuvastatin blocks hERG current and prolongs cardiac repolarization. *J. Pharm. Sci.* 101, 868–878 (2012).
133. Feng, P.-F. *et al.* Intracellular Mechanism of Rosuvastatin-Induced Decrease in Mature hERG Protein Expression on Membrane. *Mol. Pharm.* 16, 1477–1488 (2019).
134. Thomas, D. *et al.* Inhibition of cardiac HERG currents by the DNA topoisomerase II inhibitor amsacrine: mode of action. *Br. J. Pharmacol.* 142, 485–494 (2004).
135. <https://www.crediblemeds.org/blog/fivedrugs-added-crediblemeds-qtdrugs-lists>.
136. Droc, G. *et al.* Safety and Efficacy of Direct-acting Antiviral Therapies for Chronic HCV Infection in Hemodialysis Patients. *In Vivo* 36, 2918–2922 (2022).
137. Gentile, I., Buonomo, A. R. & Borgia, G. Dasabuvir: A Non-Nucleoside Inhibitor of NS5B for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *Rev. Recent Clin. Trials* 9, 115–123 (2014).
138. Zeuzem, S. *et al.* Retreatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* 370, 1604–1614 (2014).

139. Lavanchy, D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 29 Suppl 1, 74–81 (2009).
140. Raedler, L. A. Viekira Pak (Ombitasvir, Paritaprevir, and Ritonavir Tablets; Dasabuvir Tablets): All-Oral Fixed Combination Approved for Genotype 1 Chronic Hepatitis C Infection. *Am. Heal. drug benefits* 8, 142–147 (2015).
141. Wong, J. B., McQuillan, G. M., McHutchison, J. G. & Poynard, T. Estimating future hepatitis C morbidity, mortality, and costs in the United States. *Am. J. Public Health* 90, 1562–1569 (2000).
142. Li, T., Qu, Y., Guo, Y., Wang, Y. & Wang, L. Efficacy and safety of direct-acting antivirals-based antiviral therapies for hepatitis C virus patients with stage 4-5 chronic kidney disease: a meta-analysis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 37, 974–981 (2017).
143. Ucciferri, C., Occhionero, A., Vecchiet, J. & Falasca, K. Cardiac Toxicity Associated with HCV Direct Antiviral Agents. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 10, e2018069 (2018).
144. Özer Etik, D. *et al.* Successful Treatment With Direct-Acting Antiviral Agents of Hepatitis C in Patients With End-Stage Renal Disease and Kidney Transplant Recipients. *Exp. Clin. Transplant. Off. J. Middle East Soc. Organ Transplant.* 17, 52–58 (2019).
145. Pockros, P. J. *et al.* Efficacy of Direct-Acting Antiviral Combination for Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection and Severe Renal Impairment or End-Stage Renal Disease. *Gastroenterology* 150, 1590–1598 (2016).
146. Stark, J. E. Potential for a Significant Interaction Between Clopidogrel and Dasabuvir. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 61 134–135 (2015).
147. Arya, V., Zhao, P., Reynolds, K. S., Mishra, P. & Younis, I. R. Utilizing PBPK Modeling to Evaluate the Potential of a Significant Drug-Drug Interaction Between Clopidogrel and Dasabuvir: A Scientific Perspective. *Clin. Pharmacol. Ther.* 102, 578–580 (2017).
148. Kati, W. *et al.* In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1505–1511 (2015).
149. King, J. R. *et al.* Pharmacokinetic Evaluation of Darunavir Administered Once or Twice Daily in Combination with Ritonavir or the Three-Direct-Acting Antiviral Regimen of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir and Dasabuvir in Adults Coinfected with Hepatitis C and Human Immunod. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, (2017).
150. King, J. R., Zha, J., Khatri, A., Dutta, S. & Menon, R. M. Clinical Pharmacokinetics of Dasabuvir. *Clin. Pharmacokinet.* 56, 1115–1124 (2017).
151. Menon, R. M. *et al.* Drug-drug interaction profile of the all-oral anti-hepatitis C virus regimen of paritaprevir/ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir. *J. Hepatol.* 63, 20–29 (2015).
152. Nánási, P. P. *et al.* Canine Myocytes Represent a Good Model for Human Ventricular

- Cells Regarding Their Electrophysiological Properties. *Pharmaceuticals (Basel)*. 14, (2021).
153. Horváth, B. *et al.* Sarcolemmal Ca²⁺-entry through L-type Ca²⁺ channels controls the profile of Ca²⁺-activated Cl⁻ current in canine ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97, 125–139 (2016).
 154. Magyar, J. *et al.* Electrophysiological effects of bimoclomol in canine ventricular myocytes. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 361, 303–310 (2000).
 155. Szentandrassy, N. *et al.* Contribution of ion currents to beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 467, 1431–1443 (2015).
 156. Johnson, D. M. *et al.* IKs restricts excessive beat-to-beat variability of repolarization during beta-adrenergic receptor stimulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 122–130 (2010).
 157. Hegyi, B. *et al.* Ca²⁺-activated Cl⁻ current is antiarrhythmic by reducing both spatial and temporal heterogeneity of cardiac repolarization. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 109, 27–37 (2017).
 158. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 391, 85–100 (1981).
 159. Horváth, B. *et al.* Late sodium current in human, canine and guinea pig ventricular myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 139, 14–23 (2020).
 160. Nilius, B. *et al.* Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.* 278, 30813–30820 (2003).
 161. Dragún, M., Gažová, A., Kyselovič, J., Hulman, M. & Mát'uš, M. TRP channels expression profile in human end-stage heart failure. *Med.* 55, 1–10 (2019).
 162. Murakami, M. *et al.* Identification and characterization of the murine TRPM4 channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 522–528 (2003).
 163. Frede, W. *et al.* TRPM4 Modulates Right Ventricular Remodeling Under Pressure Load Accompanied With Decreased Expression Level. *J. Card. Fail.* 26, 599–609 (2020).
 164. Burt, R. *et al.* 9-Phenanthrol and flufenamic acid inhibit calcium oscillations in HL-1 mouse cardiomyocytes. *Cell Calcium* 54, 193–201 (2013).
 165. Hedon, C. *et al.* New role of TRPM4 channel in the cardiac excitation-contraction coupling in response to physiological and pathological hypertrophy in mouse. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 159, 105–117 (2021).
 166. Gonzales, A. L. & Earley, S. Endogenous cytosolic Ca²⁺ buffering is necessary for TRPM4 activity in cerebral artery smooth muscle cells. *Cell Calcium* 51, 82–93 (2012).
 167. Bers, D. M. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 23–49 (2008).

168. Bers, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198–205 (2002).
169. Acsai, K., Antoons, G., Livshitz, L., Rudy, Y. & Sipido, K. R. Microdomain $[Ca^{2+}]$ near ryanodine receptors as reported by L-type Ca^{2+} and Na^{+}/Ca^{2+} exchange currents. *J. Physiol.* 589, 2569–2583 (2011).
170. Yarishkin, O. V. *et al.* Endogenous TRPM4-like channel in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 712–717 (2008).
171. Hondeghem, L. M. Validity of V_{max} as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys. J.* 23, 147–152 (1978).
172. Sheets, M. F., Hanck, D. A. & Fozzard, H. A. Nonlinear relation between V_{max} and I_{Na} in canine cardiac Purkinje cells. *Circ. Res.* 63, 386–398 (1988).
173. Veress, R. *et al.* Transient receptor potential melastatin 4 channel inhibitor 9-phenanthrol inhibits K^{+} but not Ca^{2+} currents in canine ventricular myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 96, 1022–1029 (2018).
174. ter Bekke, R. M. A. & Volders, P. G. A. Arrhythmogenic mechano-electric heterogeneity in the long-QT syndrome. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 110, 347–358 (2012).
175. Pironet, A. *et al.* AAV9-Mediated overexpression of TRPM4 increases the incidence of stress-induced ventricular arrhythmias in mice. *Front. Physiol.* 10, 1–13 (2019).
176. Zhao, Y. *et al.* KCNQ1 G219E and TRPM4 T160M polymorphisms are involved in the pathogenesis of long QT syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 100, e24032 (2021).
177. Baumert, M. *et al.* QT interval variability in body surface ECG: measurement, physiological basis, and clinical value: position statement and consensus guidance endorsed by the European Heart Rhythm Association jointly with the ESC Working Group on Cardiac Cellular Electroph. *Europace* 18, 925–944 (2016).
178. Varró, A. & Baczkó, I. Possible mechanisms of sudden cardiac death in top athletes: a basic cardiac electrophysiological point of view. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 460, 31–40 (2010).
179. Mrejeru, A., Wei, A. & Ramirez, J. M. Calcium-activated non-selective cation currents are involved in generation of tonic and bursting activity in dopamine neurons of the substantia nigra pars compacta. *J. Physiol.* 589, 2497–2514 (2011).
180. Alvares, T. S., Revill, A. L., Huxtable, A. G., Lorenz, C. D. & Funk, G. D. P2Y1 receptor-mediated potentiation of inspiratory motor output in neonatal rat in vitro. *J. Physiol.* 592, 3089–3111 (2014).
181. Banyasz, T., Horvath, B., Jian, Z., Izu, L. T. & Chen-Izu, Y. Profile of L-type Ca^{2+} current and Na^{+}/Ca^{2+} exchange current during cardiac action potential in ventricular myocytes. *Hear. Rhythm* 9, 134–142 (2012).
182. Zygmunt, A. C., Robitelle, D. C. & Eddlestone, G. T. Ito1 dictates behavior of $ICl(Ca)$ during early repolarization of canine ventricle. *Am. J. Physiol.* 273, H1096-106 (1997).

183. Szentandrassy, N. *et al.* Powerful technique to test selectivity of agents acting on cardiac ion channels: the action potential voltage-clamp. *Curr. Med. Chem.* 18, 3737–3756 (2011).
184. Varró, A. *et al.* Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior. *Physiol. Rev.* 101, 1083–1176 (2021).
185. Li, M., Jiang, J. & Yue, L. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J. Gen. Physiol.* 127, 525–537 (2006).
186. Prakriya, M. & Lewis, R. S. Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J. Physiol.* 536, 3–19 (2001).
187. Zhou, J. *et al.* Novel potent human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel enhancers and their in vitro antiarrhythmic activity. *Mol. Pharmacol.* 68, 876–884 (2005).
188. Casis, O., Olesen, S.-P. & Sanguinetti, M. C. Mechanism of action of a novel human ether-a-go-go-related gene channel activator. *Mol. Pharmacol.* 69, 658–665 (2006).
189. Hansen, R. S. *et al.* Biophysical characterization of the new human ether-a-go-go-related gene channel opener NS3623 [N-(4-bromo-2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl)-N'-(3'-trifluoromethylphenyl)urea]. *Mol. Pharmacol.* 70, 1319–1329 (2006).
190. Gerlach, A. C., Stoehr, S. J. & Castle, N. A. Pharmacological removal of human ether-a-go-go-related gene potassium channel inactivation by 3-nitro-N-(4-phenoxyphenyl) benzamide (ICA-105574). *Mol. Pharmacol.* 77, 58–68 (2010).
191. Su, Z. *et al.* Electrophysiologic characterization of a novel hERG channel activator. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1383–1390 (2009).

11. Tárgyszavak

ABT-333

dasabuvir

akciós potenciál

kutya kardiomiocita

I_{Kr}

I_{to}

hERG

hosszú QT-szindróma

hepatitis C-vírus

12. Keywords

ABT-333

dasabuvir

action potential

canine cardiomyocyte

I_{Kr}

I_{to}

hERG

long QT-syndrome

hepatitis C-virus

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, aki az Élettani Intézet igazgatójaként biztosította az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szentandrassy Norbertnek az áldozatkész segítségét, elméleti és gyakorlati tanácsait, bátorítását, melyek nélkül munkám nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom a Szívelektrofiziológiai Laboratórium vezetőjének, Prof. Dr. Nánási Péternek a hatékony munkavégzés feltételeinek biztosításáért, és hasznos tanácsaiért, valamint a laboratórium volt, és jelenlegi munkatársainak Prof. Dr. Bányász Tamásnak, Prof. Dr. Magyar Jánosnak, Dr. Horváth Baláznak és Dr. Kistamás Kornélnak elméleti és gyakorlati tanácsaikért, amelyekkel felkeltették érdeklődésem a szívelektrofiziológia iránt.

Hálásan gondolok volt, és jelenlegi PhD-s társaimra, Dr. Veress Rolandra, Dr. Hézső Tamásra, Dr. Kiss Dénes Zsoltra, Baranyai Dórára, Dr. Kovács Zsigmond Mátéra, Dr. Óvári Józsefre, Csemer Andreára és Szabó Lászlóra, akikkel nem csak a közös munka, de a kikapcsolódás felejthetetlen pillanatait is megoszthattam.

Külön köszönetemet fejezem ki Dr. Szentandrassy Dr. Gönczi Mónikának és Szabó Lászlónak a molekuláris biológiai kísérletek kivitelezéséért, valamint Dr. Fehér Ádámnak az expresszált sejtvonalon végzett elektrofiziológiai mérésekért, akik nélkül nem készülhettek volna el a disszertációm megalapozó közlemények.

Köszönöm Sági Évának a kísérletek előkészítésében nélkülözhetetlen technikai segítséget, és derűs légkört. Köszönöm az Élettani Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, hogy támogattak és segítettek munkámat.

Köszönöm családomnak a támogatást biztatást, és hogy megteremtették az egyetemi, és PhD-s tanulmányaim feltételeit.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm menyasszonyomnak, Dr. Magyar Zsuzsanna Éduának, aki mellett a kezdetektől különlegesen teltek a PhD-s évek.

14. Függelék

Publikációs lista, valamint az értekezést megalapozó közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/532/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dienes Csaba

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10068161

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kovács, Z. M., Óvári, J., **Dienes, C.**, Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Fehér, Á., Varga, Z., Szentandrassy, N.: ABT-333 (Dasabuvir) Increases Action Potential Duration and Provokes Early Afterdepolarizations in Canine Left Ventricular Cells via Inhibition of IKr. *Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (4), 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16040488>
IF: 4.6 (2022)
2. **Dienes, C.**, Hézső, T., Kiss, D. Z., Baranyai, D., Kovács, Z. M., Szabó, L., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Gönczi, M., Szentandrassy, N.: Electrophysiological Effects of the Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Inhibitor (4-Chloro-2-(2-chlorophenoxy)acetamido) Benzoic Acid (CBA) in Canine Left Ventricular Cardiomyocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (17), 9499, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179499>
IF: 6.208

További közlemények

3. Horváth, B., Kovács, Z. M., **Dienes, C.**, Óvári, J., Szentandrassy, N., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P.: Conductance Changes of Na⁺ Channels during the Late Na⁺ Current Flowing under Action Potential Voltage Clamp Conditions in Canine, Rabbit, and Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (4), 1-14, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16040560>
IF: 4.6 (2022)





4. Naveed, M., Mohammed, A. S. A., Topal, L., Kovács, Z. M., **Dienes, C.**, Óvári, J., Szentandrassy, N., Magyar, J., Bányász, T., Prorok, J., Jost, N., Virág, L., Baczkó, I., Varró, A., Nánási, P. P., Horváth, B.: Selective Inhibition of Cardiac Late Na⁺ Current Is Based on Fast Offset Kinetics of the Inhibitor.
Biomedicines. 11 (9), 2383, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11092383>
IF: 4.7 (2022)
5. Horváth, B., Szentandrassy, N., **Dienes, C.**, Kovács, Z. M., Nánási, P. P., Chen-Izu, Y., Izu, L. T., Bányász, T.: Exploring the Coordination of Cardiac Ion Channels With Action Potential Clamp Technique.
Front. Physiol. 13, 864002, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.864002>
IF: 4
6. Horváth, B., Szentandrassy, N., Almássy, J., **Dienes, C.**, Kovács, Z. M., Nánási, P. P., Bányász, T.: Late Sodium Current of the Heart: where Do We Stand and Where Are We Going?
Pharmaceuticals (Basel). 15 (2), 231, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15020231>
IF: 4.6
7. Kovács, Z. M., **Dienes, C.**, Hézső, T., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Szentandrassy, N.: Pharmacological Modulation and (Patho)Physiological Roles of TRPM4 Channel-Part 1: modulation of TRPM4.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (1), 81, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15010081>
IF: 4.6
8. **Dienes, C.**, Kovács, Z. M., Hézső, T., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Szentandrassy, N.: Pharmacological Modulation and (Patho)Physiological Roles of TRPM4 Channel-Part 2: TRPM4 in Health and Disease.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (1), 40, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15010040>
IF: 4.6
9. Horváth, B., Kiss, D. Z., **Dienes, C.**, Hézső, T., Kovács, Z. M., Szentandrassy, N., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P.: Ion current profiles in canine ventricular myocytes obtained by the "onion peeling" technique.
J. Mol. Cell. Cardiol. 158, 153-162, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.05.011>
IF: 5.763





10. Kiss, D. Z., Horváth, B., Hézső, T., **Dienes, C.**, Kovács, Z. M., Topal, L., Szentandrassy, N., Almássy, J., Prorok, J., Virág, L., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P., Magyar, J.: Late Na⁺ Current Is [Ca²⁺]_i-Dependent in Canine Ventricular Myocytes. *Pharmaceuticals (Basel)*. 14 (11), 1142, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14111142>
IF: 5.215
11. Hézső, T., Naveed, M., **Dienes, C.**, Kiss, D. Z., Prorok, J., Árpádfy-Lovas, T., Varga, R., Fujii, E., Mercan, T., Topal, L., Kistamás, K., Szentandrassy, N., Almássy, J., Jost, N., Magyar, J., Bányász, T., Baczkó, I., Varró, A., Nánási, P. P., Virág, L., Horváth, B.: Mexiletine-like cellular electrophysiological effects of GS967 in canine ventricular myocardium. *Sci. Rep.* 11, 9565, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-88903-3>
IF: 4.996
12. Horváth, B., Hézső, T., Szentandrassy, N., Kistamás, K., Árpádfy-Lovas, T., Varga, R., Gazdag, P., Veress, R., **Dienes, C.**, Baranyai, D., Almássy, J., Virág, L., Nagy, N., Baczkó, I., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P.: Late sodium current in human, canine and guinea pig ventricular myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 139, 14-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.12.015>
IF: 5
13. Veress, R., Baranyai, D., Hegyi, B., Kistamás, K., **Dienes, C.**, Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrassy, N., Horváth, B.: Transient receptor potential melastatin 4 channel inhibitor 9-phenanthrol inhibits K⁺ but not Ca²⁺ currents in canine ventricular myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 96 (10), 1022-1029, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2018-0049>
IF: 2.041

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 60,923

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,808

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



Debrecen, 2023.12.05.