

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szerepe
szívizomsejtek ionáramainak szabályozásában**

Veress Roland

Témavezető: Dr. Horváth Balázs



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szerepe szívműködés ionáramainak szabályozásában

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

Írta: Veress Roland
okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Horváth Balázs, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus

tagok: Dr. Czirják Gábor, PhD
Dr. Pórszász Róbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet Könyvtára
2019. december 4. 11.00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Hajdu Péter Béla, PhD
Dr. Nagy Norbert, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus

tagok: Dr. Czirják Gábor, PhD
Dr. Hajdu Péter Béla, PhD
Dr. Nagy Norbert, PhD
Dr. Pórszász Róbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2019. december 4. 13.00 óra

Bevezetés

Általános megfontolások

Szervezetünkben a vért egy életen át a szívünk tartja keringésben. A szív egy elektromechanikus pumpa, benne spontán ritmikusan keletkező akciós potenciálok (AP) hatására összehúzódás és ellazulás váltakozik egymás után. A szív tömegének nagy részét pitvari és kamrai szívműködő sejtek alkotják, amelyek kontrakciós erőt generálnak és a pumpafunkciót látják el („munkaszövet”).

A kamrai szívműködő sejtek AP-ja számos ionáram együttes működése alapján jön létre. Ezen ionáramok az AP eltérő fázisaiban aktiválódnak, és különböző mértékben járulnak hozzá annak kialakításához.

Az alapállapotban lévő, nem aktivált sejtekben a sejt plazma szabad Ca^{2+} -koncentrációja $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 10 és 100 nM között változik. A Ca^{2+} -szint emelkedése eltérő, akár párhuzamos folyamatokat indukálhat, amelyek számos sejt funkció aktiválásához vezetnek, mint például a szívműködő sejtek összehúzódása is. A szívműködő sejt kontrakciójának erőssége bizonyos határok között függ a Ca^{2+} -jel nagyságától, a szarkoplazma Ca^{2+} -szintjének emelkedésétől. Magasabbra emelkedő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint az összehúzódás erejének fokozódását okozza.

A membrán feszültségváltozásaival párhuzamosan a kalcium szint oszcillációja figyelhető meg, aminek direkt, azonnali hatása van a kalcium-függő áramokra. A szívben az ionáramok széles skálájáról ismert, hogy Ca^{2+} -függők, beleértve a Na^+ , a Ca^{2+} , a K^+ , a Cl^- , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélő és nem specifikus kation áramokat. Fontos a kalciumfüggő ionáramok élettani és patofiziológiai működésének megismerése.

A sejt szintű elektrofiziológiai kísérletekben az intracelluláris kalciumkoncentrációt gyakran puffereljük a Ca^{2+} -függő ionáramok tanulmányozásának céljából. Ezt általában azért tesszük, hogy a sejtben belüli Ca^{2+} -függő folyamatok változásai ne legyenek hatással a mérési eredményeinkre.

Jelen disszertációmban két, eddig kamrai szívműködő sejtben kevésbé jól jellemzett kalcium-függő ionáram tulajdonságait kívántuk megvizsgálni specifikus gátlószerek segítségével. Az egyik ilyen áram a Ca^{2+} -függő kloridáram ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$), míg a másik a Transiens Receptor Potenciál Melastatin 4 (TRPM4) áram.

A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és ionáramai

Az élő sejtek membránjának két oldala között potenciálkülönbség van, az intracelluláris tér negatívabb az extracelluláris térhez viszonyítva. A nyugalmi membránpotenciál értéke sejttypustól függően -50 és -90 mV közötti értéket vehet fel. A nyugalmi membránpotenciál mérhető elektrofiziológiai módszerekkel, illetve kiszámítható a Goldman-Hodgkin-Katz egyenlet alapján.

A kamrai szívizomsejtek AP-ja számos ionáram együttes működése alapján jön létre. Ezen ionáramok az AP eltérő fázisaiban aktiválódnak, és különböző mértékben járulnak hozzá annak kialakításához.

Az AP 0. fázisa alatt, a gyors, idő- és feszültségfüggő Na^+ csatornák aktiválódnak, ami létrehozza az AP felszálló szárát. A Na^+ csatornák általi depolarizációt követően bizonyos áramokért felelős csatornák aktiválódnak, vagy inaktiválódnak. A nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős magas K^+ konduktancia (befelé egyenirányító K^+ csatornák – inward rectifier potassium current, I_{K1}) a befelé történő egyenirányítás következtében lecsökken, ez lehetetlenné teszi repolarizáló hatású K^+ áram létrejöttét a nulladik fázis alatt.

Az 1. fázis egy gyors, rövid ideig tartó részleges repolarizáció, melyet a tranziens kifelé irányuló áram hoz létre. Ennek van egy 4-aminopiridin érzékeny komponense (tranziens kifelé irányuló káliumáram – transient outward potassium current, I_{to1}) valamint egy Ca^{2+} -függő kloridáram komponense (tranziens kifelé irányuló kloridáram – transient outward chloride current, I_{to2}). A 2. fázis során aktiválódik az L-típusú kalciumáram (L-type calcium current, $\text{I}_{\text{Ca,L}}$) és a késői káliumáramok. A plató fázis alatt nincsen jelentős nettó mérhető membránáram és repolarizáció az I_{to} gyors inaktiválódása és a különböző repolarizáló K^+ csatornák lassú aktivációja miatt.

A 3. fázis során az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ inaktiválódik és több káliumáram párhuzamosan, fokozatosan aktiválódik. Fontos ionáramok az AP ezen szakaszában a késői egyenirányító káliumáram lassú és gyors komponense (slow/rapid component of delayed rectifier potassium current, $\text{I}_{\text{Ks}}/\text{I}_{\text{Kr}}$) és végül a terminális repolarizációban résztvevő korábban már említett I_{K1} .

A 4. fázis a nem ingerelt kamrai szívizomsejtek elektromos diasztole szakasza, a nagy I_{K1} konduktancia tartja fenn, megegyezik a nyugalmi membránpotenciállal, értéke -80 mV.

A kamrai AP létrehozásában több olyan inward (pl. TRPM4 áram) és outward (pl. Ca^{2+} -függő kloridáram) ionáram is részt vehet, melyek élettani működése kevésbé jól jellemzett, viszont bizonyított, hogy hibás működése patofiziológiai jelentőséggel bírhat.

A kamrai repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitása

A szív AP eltérő a munkaizomzat különböző régiói között. A repolarizáció térbeli inhomogenitása magában foglalja a repolarizáció apiko-bazális gradiensét, illetve a transmuralis diszperzióját, továbbá a két kamra közötti különböző repolarizációs időket.

A szívcsúcs felé eső, ún. „apikális” szívizomterületek akciós potenciálja rövidebb, mint az annulus fibrosus felé eső, ún. „bázis” részen. Ezt a különböző káliumáramok eltérő aránya okozhatja. Az apiko-bazális inhomogenitás mellett transzmurális AP inhomogenitás is megfigyelhető. A kamrai szívizomzat az AP alakjának szempontjából három, szubepikardiális (EPI), szubendokardiális (ENDO) és a kettő között elhelyezkedő midmiokardiális (MID) régióra osztható. Az epikardiális sejtek ún. „*tüske és kupola*” konfigurációjúak, ami a kifejezett 1. fázis repolarizáció következménye. A midmiokardiális vagy M-sejteken kisebb a korai repolarizáció, endokardiális sejteken a legkisebb. Az akciós potenciálok időtartama (APD) is különbözik a kamrafal eltérő rétegeiben. A MID sejtek akciós potenciálja a leghosszabb, az EPI sejteké viszont rövid. A transzmurális eltérések okozója lehet az I_{to} különböző denzitása, illetve a kalciumcsatornák újranyílása EPI sejteken. A regionális heterogenitás befolyásolja az EKG hullámok alakját, míg a heterogenitás növekedése reentry kialakítása miatt aritmogén.

A szívben állandó szívfrekvencia esetén az egymást követő ütések időtartama ütésről ütésre változik, a jelenség neve a „beat-to-beat” variabilitás, vagy másnéven rövidtávú variabilitás (short-term variability, SV). Számos faktornak tulajdonítanak szerepet a SV létrehozásában, mint pl. az ioncsatornák sztochasztikus viselkedése, az ingerlési frekvencia és farmakológiai behatások, az AP alakja és időtartama, az ioncsatorna denzitás, vagy az intracelluláris Ca^{2+} -szint szabályozás is részt vesz annak kialakításában.

A QT-intervallum megnyúlását a szívritmuszavarok rizikófaktorának tekintik, mivel elősegítheti a korai utódepolarizációk (EAD-k) és a torsades de pointes kamrai tachycardia (TdP) kialakulását. A SV megfigyelhető az AP-ok időbeli és térbeli variabilitásaként, helyi aktivációs és recovery intervallumokban vagy a testfelszíni EKG QT-intervallumának variabilitásaként. A QT-intervallum rövid távú variabilitásának növekedése azonban magasabb prediktív értékkel rendelkezik, mint a QT-intervallum abszolút hosszának megnyúlása.

A szívizomsejtek kalcium homeosztázisa

Egy Ca^{2+} -függő ionáram élettani környezetben történő vizsgálatához ismernünk kell a szívciklus alatti intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásokat.

A szívizom excitációs-kontrakciós kapcsolata az elektromos jel mechanikai válasszá alakítása. A Ca^{2+} elengedhetetlen a sejtek elektromos aktivitásához és a kontrakcióhoz, az

utóbbi teljes mértékben függ a környezet Ca^{2+} -koncentrációjától. A szív ciklus során a felszabaduló, majd eltávolított Ca^{2+} mennyiségnek azonosnak kell lennie, mivel ellenkező esetben szívizomsejt Ca^{2+} -nal túltöltődne vagy kiürülne.

A kontrakciót kiváltó teljes Ca^{2+} -jel kb. 30%-a származik az extracelluláris folyadékból és mintegy 70%-a a szarkoplazmatikus retikulumból (SR). Az AP plató fázisa során depolarizációt követően Ca^{2+} -ok lépnek be az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ és a reverz módú $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ csereáram (I_{NCX}) áramokkal a szívizomsejtekbe, ahol az SR-ből rianodin receptorokon keresztül további Ca^{2+} -ot szabadít fel. A jelenség neve Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulás. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció átmeneti növekedése, majd csökkenése a Ca^{2+} tranziens.

A $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ depolarizációra aktiválódik, majd idő- és Ca^{2+} -függő módon inaktiválódik. Az ionszatórnán át a sejtbe jutó Ca^{2+} -ok mellett a SR-ből történő Ca^{2+} felszabadulás szintén hozzájárul a Ca^{2+} csatorna Ca^{2+} -függő inaktivációjához. A nagy mértékű Ca^{2+} beáramlás vagy felszabadulás további Ca^{2+} beáramlást csökkent, megakadályozva ezáltal a proaritmiás hatású Ca^{2+} túltöltődést.

A szívizomsejtek relaxációjához a Ca^{2+} -ot el kell távolítani a szarkoplazmából. A Ca^{2+} eltávolításában résztvevő folyamatok egymáshoz viszonyított aránya fajfüggést mutat. A kontrakció lecsengésekor a szarkoplazma emelkedett Ca^{2+} -tartalmának 70%-át a SR Ca^{2+} -pumpája juttatja vissza a SR-ba. A maradék 30% eltávolítását az extracelluláris folyadékba a plazmalemma $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélő transzportere és a plazmalemma Ca^{2+} -pumpája végzi.

A szívizomsejtek kalciumfüggő kloridárama

A $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ részt vesz az AP repolarizációjában nyúl, birka, sertés és kutya szívizomsejtekben. Korábban már leírtam az akciós potenciált létrehozó ionáramok jellemzésekor, hogy az 1. fázis repolarizációért szívizomsejtekben a tranziens kifelé irányuló áramok, a I_{to1} és I_{to2} felelősek. A I_{to2} a pillanatnyi membránpotenciáltól és a Cl^- egyensúlyi potenciáljától (E_{Cl} : -50 mV és -30 mV között) függően depolarizálja vagy repolarizálja a membránt. Az akciós potenciál plató fázisa alatt a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ a membránpotenciált negatív irányba tolja, repolarizáló áramként van jelen, csökkenti az APD-át. A Cl^- egyensúlyi potenciáljától negatívabb membránpotenciálokon (nyugalomban) azonban a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ depolarizáló hatású és ezáltal EAD és késői utódepolarizációk (DAD) létrejöttét segítheti elő.

Munkacsoportunk korábban megállapította, hogy kutya és humán szívizomzatban a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ az AP során az 1. fázis és terminális repolarizáció alatt aktiválódik. Ezen munka során a munkatársaim azt is meghatározták, hogy a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktiválásában alapvető jelentőségű a csatorna

közelében elhelyezkedő L-típusú Ca^{2+} csatornákon át történő Ca^{2+} belépés, a szarkoplazmatikus retikulumból felszabaduló Ca^{2+} csak felerősíti a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktivációját.

A kalciumfüggő kloridáram gátlószere, 9-AC

A Ca^{2+} -függő Cl^- csatornák vizsgálatára több eltérő szerkezetű gátlószert is használnak. Korábban munkacsoportunk megvizsgálta kutya izolált szívműködéseken a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot két, széleskörűen alkalmazott Cl^- csatorna gátlószert, antracén-9-karboxilsav (9-AC) és 4,4'-diizotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav (DIDS) segítségével. Akkor munkatársaim bebizonyították, hogy a 9-AC-érzékeny áram Ca^{2+} -függő és a Cl^- a töltéshordozó. A két inhibitor közül a 9-AC előnyösebb a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ élettani szerepének a vizsgálatára, mert az általunk vizsgált koncentrációban nem gátolta az AP-t létrehozó fontosabb ionáramokat (I_{Na} , $\text{I}_{\text{Ca,L}}$, I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}).

A kalciumfüggő kloridáram pro- vagy antiaritmiás szerepe

A szívritmuszavarokban a szív elektromos aktivitása megváltozik. Ezen ritmuszavarok némelyike lehet életveszélyes tachyaritmia, mint TdP és kamrafibrilláció. Ezek a tachyaritmiák hirtelen szívhalált okozhatnak, amely vezető halálok Európában és az Amerikai Egyesült Államokban.

Az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis rendellenességei (Ca^{2+} túlterhelés és spontán Ca^{2+} felszabadulás a SR-ból) szintén elősegíthetik TdP kialakulását. A spontán SR Ca^{2+} felszabadulás aktiválja a sejt Ca^{2+} eltávolító mechanizmusait, és egy tranziens befelé irányuló áramot hoz létre, ami DAD-hoz vezet és triggerelt aktivitást okoz. A tranziens befelé irányuló áram forrása lehet a forward üzemmódban működő I_{NCX} , vagy a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktiválódása.

A $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ Ca^{2+} -túlterhelt sejtekben DAD kialakulását okozhatja, így aritmogén hatású lehet. Ennek ellentmond, hogy bizonyos körülmények között kiváltott EAD-k és DAD-k előfordulása nőtt, ha kutya kamrai sejtekben gátolták az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -t 9-AC segítségével, ami az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ szívritmuszavarokat mérséklő szerepét mutatja. Hasonlóképpen, az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ fontos szerepet játszhat az aritmiák megelőzésében acidózisban nyúl kamrai szívműködéseken. Ez az antiaritmiás funkció azonban elmaradt juhok EAD modelljében, ahol a DIDS alig volt hatással. Ezek az ellentétes eredmények további vizsgálatokat igényelnek az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ pro- vagy antiaritmiás szerepének meghatározásához.

A kalciumfüggő kloridáramért felelős fehérjék

Az $I_{Cl(Ca)}$ molekuláris identitása még mindig nem teljesen tisztázott; a TMEM16A és a Bestrophinok a legvalószínűbb jelöltek, az utóbbiak legalábbis mint a Ca^{2+} -érzékeny csatorna alegységek.

A Transmembrane protein 16 (TMEM16) család fehérjéi anion csatornák 8 transzmembrán doménnel, innen származik a fehérjecsalád másik elnevezése: az Anoctamin1 vagy röviden Ano1. Egyre több információ áll rendelkezésre a TMEM16 fiziológiai funkcióiról simaizomban, valamint neuronális és más szövetekben. A TMEM16A rágsálók kamrájában expresszálódik, és valószínűleg ez a fehérje felelős a kamrai szívizomsejtek $I_{Cl(Ca)}$ -áért. A TMEM16A-t vizsgálva több munkacsoport is a klasszikus $I_{Cl(Ca)}$ -hoz nagyon hasonló ionáramot regisztrált.

A Bestrophin-t először a Best-féle vitelliform macula dystrophiáért felelős génként írták le. A Best-1 génmutációt hordozó knock-in egerek retinális pigment epitél sejtjeinek Cl^- konduktanciája változatlan volt, azonban a mutáció az emberi megbetegedésekhez hasonló retinális elváltozásokat okozott. Mindent egybevetve, feltételezhetjük, hogy a Bestrophin-ok anion csatornák, viszont funkciójuk a $I_{Cl(Ca)}$ létrehozásában még nem tisztázott.

Korábban munkacsoportunk kimutatta a TMEM16A és a Bestrophin-3 expresszióját mind kutya, mind emberi izolált bal kamrai szívizomsejtekben. Immuncitokémiai kísérletekkel bizonyítottuk továbbá, hogy ez a két fehérje és a $Ca_v1.2$ csatorna a sarcolemmában kolokalizált, ami azt sugallja, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatornákon keresztül bejutó Ca^{2+} közvetlenül szabályozza a $I_{Cl(Ca)}$ -t kutya kamrai szívizomsejtekben.

Intracelluláris kalcium koncentráció befolyásolása

A sejtszintű elektrofiziológiai kísérletekben az intracelluláris kalciumkoncentrációt gyakran puffereljük ún. kalcium kelátorokkal, melyek közül gyakran alkalmazott az EGTA és a BAPTA. A BAPTA sokkal gyorsabb Ca^{2+} kötési kinetikával bír, ezért a két szer a különböző szubcelluláris kompartmentekben eltérő módon képes a Ca^{2+} pufferelésére.

A szarkolemma és a SR közötti ún. juncionális résben (az L-típusú Ca^{2+} csatornák és a rianodin receptorok közötti térben) a Ca^{2+} koncentrációja sokkal magasabb értéket érhet el, és kinetikailag gyorsabban változik a citoplazmában mérhető globális Ca^{2+} koncentráció változásokhoz viszonyítva. Nagyon fontos a megfelelő kinetikával rendelkező kalcium kelátor megválasztása az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez, különösen igaz ez a Ca^{2+} -függő áramok vizsgálata esetén. A szívben az ionáramok széles skálájáról ismert, hogy Ca^{2+} -függőek,

beleértve a Na^+ , a Ca^{2+} , a K^+ , a Cl^- , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélő és nem specifikus kation áramokat, pl. TRPM4 áramot.

Korábban munkacsoportunk megvizsgálta a BAPTA és az EGTA $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ra és $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ra gyakorolt hatása közötti különbséget. Annak ellenére, hogy egyik puffer jelenlétében sem volt Ca^{2+} tranziens, csak a BAPTA volt képes hatékonyan csökkenteni az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ Ca^{2+} -függő inaktivációját, ami nagyobb I_{NISO} (megegyezik az L-típusú kalciumárammal) amplitúdót és áram által szállított össztöltést okozott, valamint hosszabb akciós potenciált is eredményezett. BAPTA jelenlétében a $\text{I}_{9\text{-AC}}$ (megegyezik a Ca^{2+} -függő kloridárammal) megszűnt, viszont EGTA hatására csak csökkent az áram amplitúdója és az áram által szállított össztöltés.

Feszültség-clamp kísérletekben a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pufferelése viszonylag egyszerű, mivel az intracelluláris kompartment BAPTA Ca^{2+} kelátképzővel történő dialízisét könnyen elvégezhetjük nagy csúcsátmérőjű (tipikusan $>2 \mu\text{m}$) patch pipettával.

Az akciós potenciálok fiziológias körülmények közötti rögzítése hagyományos hegyes mikroelektrodákkal történik, azonban ekkor a kelátor pipettán keresztül sejtbe juttatása nem lehetséges a mérőelektrod csúcsának kis átmérője miatt. Ebben az esetben a Ca^{2+} kelátképző sejt-permeabilis acetoxi-metilészter formáját (BAPTA-AM, EGTA-AM) alkalmazhatjuk a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ redukálására. Ilyen kísérleteket évtizedek óta végeznek, és a kapott eredményeket kizárólag a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puffereléssel értelmezték annak ellenére, hogy ismert: a BAPTA-AM (és az EGTA-AM is) kölcsönhatásba lép a HEK sejtekben kifejezett K^+ csatornákkal.

A szívizomsejtek TRPM4 árama

A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatorna család 28 tagja megtalálható emberi szervezetben is. Ennek a hatalmas családnak a tagja a Tranziens Receptor Potenciál Melastatin 4 (TRPM4) csatorna is.

A TRPM4 fehérje szerkezetét hat transzmembrán domén alkotja. A fehérje N- és C-terminális végein a csatorna több PKA és PKC foszforilációs helyet, ABC-motívumot (ATP-binding cassette, ATP-kötő kazetta), kalmodulin kötőhelyet, Walker B motívumot (ATP kötőhelyként tartják számon), PIP_2 (foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát) kötőhelyet és ún. „feltekercselt tekercs” (coiled coil) domént tartalmaz.

A TRPM4 csak egyértékű kationokra permeabilis, permeabilitási sorrendje: $\text{Na}^+ \sim \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$. Fiziológias körülmények között, az intracelluláris kalcium növelésével történő aktiválás ($K_d=400 \text{ nM}$) után a TRPM4 indukálja a nátrium bejutását, ami membrán depolarizációhoz vezet.

TRPM4 csatornák jelenlétét leírták patkány, egér, szarvasmarha és humán szívben expressziós, vagy elektrofiziológiai vizsgálatokkal. A TRPM4 génfüggő mutációi az I. típusú familiáris szívbetegséghez köthető. Továbbá a TRPM4 gén genetikai elváltozásai pitvar-kamrai szívblokkhoz, jobb Tawara-szár-blokkhoz, bradycardiához és Brugada-szindrómához vezetnek. A TRPM4 áram patkányban, egérben és nyúlban hozzájárul a pacemaker funkcióhoz is, valószínűsíthetően bradycardia elleni védő funkció céljából. A TRPM4 áram hatására növekszik az APD pitvari izomban és izolált szívizomsejtekben egyaránt. Rágcsálók kamrai izmaiban a β -adrenerg stimuláció inotróp hatásának közvetítésében a TRPM4 is részt vesz. Az áramról leírták, hogy képes az angiotenzin II indukált hipertrófia csökkentésére.

Mivel a Ca^{2+} -függő csatornák Na^+ és K^+ ionok között nem válogatnak, többnyire inward áramot hoznak létre, ami növeli az aritmiára való hajlamot. Ellentétben ezzel, az esetleges TRPM4 gátlás antiaritmiás hatású.

A TRPM4 áram gátlószere, 9-phenanthrol

Jelenleg a TRPM4 farmakológiája még viszonylag ismeretlen. Kísérletekben leggyakrabban flufenaminsavat, vagy 9-phenanthrolt alkalmaznak az áram gátlására, azonban a flufenaminsav bizonyítottan nem szelektív, a 9-phenanthrol TRPM4 szelektivitása pedig szívben eddig nem nyert hiteles bizonyítást. Fontos megjegyezni, hogy a 9-phenanthrol szívelektrofiziológiai hatásait eddig csak egerekben vizsgálták, egy olyan fajban, amely akciós potenciálja és az azt létrehozó ionáramai nagy mértékben eltérnek az emberétől.

Célkitűzés

Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ milyen szerepet tölt be a szív bal kamrai repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitásának kialakításában. Ennek meghatározását az élettani állapotokat jól tükröző (fiziológias intra-, és extracelluláris ionösszetétel, megtartott intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis, AP feszültségparancs) két módszer segítségével terveztük. Egyrészt hagyományos hegyes mikroelektrodás méréseket, másrészt az akciós potenciál feszültség-clamp (APVC) technikát kívántuk alkalmazni az $I_{Cl(Ca)}$, mint 9-AC érzékeny áram jellemzésére a bal kamrai miokardium különböző régióiból származó sejteken. Továbbá az izolált szívizomsejteken a TMEM16A és a Bestrophin-3 fehérjék normalizált expresszióját Western blot segítségével kívántuk meghatározni.

Munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy a kalcium kelátor BAPTA-AM és I_{Ks} illetve I_{Kr} kálium csatornát gátló vegyületek együttes alkalmazásakor a BAPTA-AM akciós potenciál morfológiájára gyakorolt hatása függött az alkalmazott kálium csatorna gátlószer szelektivitásától. A BAPTA-AM és az EGTA-AM is kölcsönhatásba lép HEK sejtekben kifejezett K^+ csatornákkal. Ismert továbbá, hogy a hatóanyag-csatorna kölcsönhatások jelentősen eltérőek lehetnek natív és expresszált ioncsatornák esetén. Ezek miatt célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a BAPTA-AM befolyásolja-e a bal kamrai szívizomsejtek akciós potenciálját, illetve I_{Kr} áramát.

Vizsgálni kívántuk a TRPM4 áram akciós potenciál morfológia kialakításában betöltött szerepét, illetve az áram AP alatti viselkedését. Ehhez az áram specifikusnak tartott gátlószerét, a 9-phenantrolt kívántuk felhasználni bal kamrai szívizomsejteken akciós potenciál feszültség-clamp mérésekben. Mivel ehhez a módszerhez lehetőleg minél szelektívebb ioncsatorna gátlószerre van szükség, ezért mindenekelőtt a 9-phenanthrol szelektivitási vizsgálatát terveztük elvégezni.

Valamennyi vizsgálatunkhoz kutya kamrai sejteket választottunk, mert ennek a preparátumnak az elektrofiziológiai tulajdonságai hasonlítanak a legjobban a humán szívizomzathoz.

Anyagok és módszerek

Kutya szívizomsejtek izolálása

Elektrofiziológiai és génexpressziós kísérleteinket kutyaszív bal kamrájából enzimatikusan izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket kísérleti célra tenyésztett vegyes nemű, ivarérett kutyák szívéből nyertük anterográd szegmensperfúziós technika használatával. Az elvégzett kísérletek összhangban voltak a „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” és „*Guide to the Care and Use of Experimental Animals*” és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta.

A szívizomsejteket szegmentperfúziós technikával, kollagenáz emésztéssel izoláltuk. A sejtizolálás jellegéből adódóan a méréseink többsége midmiokardiális (MID) sejteken történt. Azonban egyes kísérleteinkhez a bal kamra szabad falának szubepikardiális (EPI) és szubendokardiális (ENDO) régióiból izolált szívizomsejteket használtunk. A kísérletek egy külön csoportjához bal kamrai fal MID rétegének apikális és bazális részeiből gyűjtöttünk sejteket. A végleges sejtszuspenzióban a sejtek szabályos téglalap alakúak, éles szélűek, citoplazmájuk tiszta, épen harántcsíkozottak.

Elektrofiziológia

A sejtszuspenzió 2-3 cseppjét egy 1 ml térfogatú plexi mérőkádba helyeztük, és folyamatosan perfundáltuk Tyrode oldattal, amelyet egy gravitáció-hajtott rendszer szolgáltatott. Kísérleteink során az állandó 37 °C hőmérsékletet hőmérséklet szabályozóval állítottuk be. A sejteket egy Faraday-kalitkában elhelyezett antivibrációs asztalon lévő invertált mikroszkóppal tettük láthatóvá. A sejteket mikropipettával, vagy hegyes mikroelektróddal szúrtuk meg, a későbbi AP illetve ionáram regisztrálásának céljából. Ezeket kapilláris húzó használatával készítettük el. A mikroelektrodák és mikropipetták sejtekhez érintését mechanikus makromanipulátorral és három irányba mozgatható, piezoelektromos mikromanipulátorral végeztük. A sejtekből elvezetett elektromos analóg jeleket fejegységen keresztül elvezettük, erősítettük. Az erősített analóg jeleket oszcilloszkópon is nyomon követtük. A számítógép általi vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 10 szoftvert használtunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot digitalizáló tette lehetővé. A nyers adatok kiértékeléséhez Microsoft Excel szoftvert, a kiértékelés során kapott adatokból az ábrák készítéséhez Origin és PowerPoint grafikus szoftvereket használtunk.

Akciós potenciálok mérése hegyes mikroelektróda technikával

A membránpotenciál mérésekhez az egysejtes rendszerre kidolgozott, nagyellenállású üveg mikroelektróda technikát használtuk. Az AP-ok elvezetésére 3 M KCl-dal töltött, nagy ellenállású (25–40 M Ω) mikroelektródát használtunk. Az erősített áram-clamp módban használtuk, a sejtek ingerlése impulzus generátorral történt. A rögzített AP-ok kiértékelését egy, a munkacsoportunk által programozott Microsoft Excel makróval végeztük. A szoftver által kiszámított paraméterek: nyugalmi membránpotenciál (RMP), a depolarizáció maximális sebessége ($V_{\max}^+$), az AP amplitúdója (APA), az 1. fázis repolarizáció amplitúdója (feszültségkülönbség az AP csúcsa és a kupolát megelőző notch között) és meredeksége, az AP 90 %-os repolarizációjához tartozó időtartama (APD₉₀), az APD₉₀ felénél mérhető membránpotenciál (plató₅₀) értéke, valamint a terminális repolarizáció meredeksége ($V_{\max}^-$).

Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában mértük, amihez az erősített feszültség-clamp üzemmódban használtuk. A mérések kivitelezéséhez mikropipettát (2-3 M Ω) használtunk. A patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében a mikropipetta belső oldata közlekedik a sejtek intracelluláris terével. A belső oldat összetételének változtatásával, kalcium kelátor segítségével lehetőségünk volt befolyásolni a sejtek szabad Ca^{2+} koncentrációját. Az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramok fiziológias körülmények közötti vizsgálatára a legalkalmasabb módszer az akciós potenciál feszültség-clamp technika. Ilyen méréseink során a sejt saját, áram-clamp üzemmódban rögzített akciós potenciálját használtuk parancsjelként ugyanazon sejten.

Fehérjeminta előkészítés és Western blot analízis

A bal kamra különböző transzmurális régióiból (EPI, ENDO, MID), valamint a bal kamra midmiokardiális rétegének apikális és basalis régiójából nyert, enzimatikusan izolált szívmusclesejteket molekuláris biológiai vizsgálatokhoz használtunk. A TMEM16A- és a Bestrophin 3-specifikus sávok optikai sűrűségét normalizáltuk a minták β -aktin-specifikus sávjainak optikai sűrűségére.

Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei $\pm$ a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos variancianalízist, Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollós t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdéseknek megfelelően. Az adatok között az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A 9-AC a $I_{Cl(Ca)}$ mérésének alkalmas eszköze

Megvizsgáltuk, hogy a 9-AC gátolja-e az $I_{Ca,L}$ illetve az I_{to1} áramokat. Erre azért volt szükség, hogy meggyőződjünk a 9-AC $I_{Cl(Ca)}$ -ra vonatkozó teljes szelektivitásáról a tervezett APVC kísérleteinkhez. Ahhoz, hogy megakadályozzunk bármiféle $I_{Cl(Ca)}$ aktiválódást, mindkét áram mérése során 10 mM BAPTA tartalmú belsőoldatot, továbbá az I_{to1} mérése során nisoldipine tartalmú perfúziós oldatot használtunk. Korábban megmutattuk, hogy a pipetta belsőben használt 10 mM BAPTA alkalmas az $I_{Cl(Ca)}$ kikapcsolására, mivel gyorsan és nagy kapacitással képes a $I_{Cl(Ca)}$ kalcium általi aktivációjának megakadályozására. Kísérleteink során 0.5 mM 9-AC jelenlétében sem az $I_{Ca,L}$ sem a I_{to1} nem különbözött a kontrollhoz képest.

A $I_{Cl(Ca)}$ hozzájárulása az AP alakjának különbségeihez a kutya bal kamrai miokardium transzmurális rétegeiben

Megvizsgáltuk 0,5 mM 9-AC-vel elért $I_{Cl(Ca)}$ gátlás hatását a bal kamra elülső falának különböző rétegeiből származó izolált szívizomsejtekben. Az AP-okat alakjuk stabilizálódását követően („egyensúlyi állapot”-ban) rögzítettük kontroll oldatban, elsőként 5 s ciklushosszon (CL), majd fokozatosan csökkenő CL-akon (2s, 1s, 500 ms, 300 ms). Ezután a CL-t 5 másodpercre váltottuk vissza és 9-AC-val perfundáltuk a sejteket. Megvártuk, amíg a 9-AC hatása teljesen kifejlődött (jellemzően 7-8 perc), majd az AP-k változó CL-on történő rögzítését a korábbiakhoz hasonlóan megismételtük. Végül a gátlószer kimosását végeztük el a 9-AC által létrehozott változások visszafordíthatóságának tesztelésére.

A 9-AC csökkentette az AP 1. fázisának amplitúdóját az összes vizsgált sejttípusban. Az $I_{Cl(Ca)}$ gátlás a MID és ENDO sejtekben megnövelte az APD_{90} -et, de nem változtatta meg szignifikánsan az EPI sejtek APD_{90} értékeit. Az akciós potenciál időtartamát a 9-AC fordított frekvencia-függő módon növelte meg a MID és ENDO sejtekben, tehát a legkifejezettebb AP nyújtó hatás a legkisebb ingerlési frekvencián (a legnagyobb ingerlési ciklushossznál; 5 s) jött létre. Minden 9-AC-indukált AP paraméter változás visszafordítható volt a kimosás 10-15. percén belül. A nyugalmi membránpotenciál (RMP) és a V_{max} értékeit nem változtatta meg a 9-AC.

A megfigyelt 9-AC-indukált AP-változás transzmurális különbségeinek lehetséges okainak tanulmányozása céljából EPI sejteken 1 mM 4-aminopiridint (4-AP, I_{to1} inhibitor) alkalmaztunk az 1. fázis csökkentésére. A beavatkozás által az EPI sejtek AP profilja hasonlóvá vált az ENDO sejtek AP-jához. A 9-AC a 4-AP folyamatos jelenlétében az AP paramétereit

hasonló módon változtatta meg, mint amit az ENDO sejtekben figyeltünk meg, azaz például a 9-AC meghosszabbította az AP-t 4-AP előkezelt EPI sejtben.

A 9-AC hatása a szívcsúcs és a szívbázis sejtjeinek AP paramétereire

Hasonló kísérleteket végeztünk a bal kamrai midmiokardium szívcsúcsához közeli (apikális) és a pitvarok felé eső (bazális) részeiből izolált sejteken. A 9-AC mindkét sejttypusban az APD₉₀ növekedését és az AP 1. fázis amplitúdójának csökkenését okozta. Az AP fordított frekvenciafüggő hosszabbodása kifejezettebb volt a bazális sejtekben, és ez a különbség szignifikánsnak adódott 0,5 és 1 s CL-on. A különböző transzmurális rétegekből izolált sejtekkel végzett kísérleteink eredményeivel összhangban a 9-AC nem befolyásolta a RMP és V_{max} értékeket, és az AP paraméterekre gyakorolt hatásai visszafordíthatóak voltak.

A négyszögimpulzusokkal vizsgált I_{Cl(Ca)} áramsűrűségek, valamint a TMEM16A és Bestrophin-3 expressziós szintek közel azonosak különböző bal kamrai régiókból nyert szívizomsejtekben

A 9-AC különböző módon változtatta meg az AP-kat a bal kamra különböző régióiból származó sejteken. A különbségek okának felderítése céljából megvizsgáltuk, hogy az egyes régiók sejtjei között van-e különbség az I_{Cl(Ca)} áramsűrűségében, illetve a legvalószínűbb I_{Cl(Ca)}-ért felelős fehérjék (TMEM16A és Bestrophin-3) expressziós szintjeiben. A 9-AC-érzékeny áramokat a bal kamra különböző eredetű sejtjeiben hagyományos négyszögimpulzusok segítségével mértük. A legnagyobb I_{Cl(Ca)} áramsűrűségek egyenlőek voltak a vizsgált sejt eredetétől függetlenül. Ez nem csak a transzmurális, hanem az apiko-bazális gradiens esetében is így volt. Az I_{Cl(Ca)} -20 mV-nál kezdett aktiválódni, és legmagasabb értéke +60 mV volt minden vizsgált sejttypusban, hasonlóan a korábbi közleményekben leírtakhoz. A TMEM16A és a Bestrophin-3 expressziós szintjeit a β-aktinével együtt detektáltuk, és arra normalizáltuk. A vizsgált sejtekben – a maximális áramsűrűséghez hasonlóan – mind a TMEM16A, mind a Bestrophin-3 esetében azonos normalizált expressziós szinteket figyeltünk meg. A hagyományos feszültség-clamp adatok és a fehérjeexpressziós eredmények alapján a 9-AC által létrehozott AP változások regionális eltérései nem a csatornák expressziójának különbségei miatt következtek be.

A I_{Cl(Ca)} profilok transzmurális heterogenitása APVC segítségével mérve

A különböző régiókból származó bal kamrai sejtekben a 9-AC eltérően befolyásolta az AP alakját és paramétereit. Ezen különbségek megmagyarázására I_{Cl(Ca)} áramprofilokat vizsgáltunk, amihez I_{9-AC}-t rögzítettük APVC-vel. Ezzel a technikával az I_{Cl(Ca)}-t az egyes sejtek

korábban rögzített saját AP-ja, mint feszültségparancs során vizsgáltuk, hogy teszteljük az AP alakjának fontosságát az áram aktiválásában. Mivel a pipettaoldat nem tartalmazott kalcium-puffereket vagy Ca^{2+} -ot, így a sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ homeosztázisát nem módosítottuk mesterségesen. A $I_{9\text{-AC}}$ profilok dinamikájukban hasonlítottak a bal kamrai fal különböző transzmurális régióiból származó minden egyes sejtípusban, függetlenül az AP-k alakjában jól ismert különbségektől. Az $I_{9\text{-AC}}$ profilok tartalmaztak egy korai, nagy és gyors kifelé irányuló komponenst, amely megfelel az AP-ok 1. fázisának, majd a végső repolarizáció (3. fázis) során egy késői, kicsi és befelé irányuló komponenst figyelhettünk meg. Azonban a kifelé irányuló komponens csúcsának áramsűrűsége, továbbá a normalizált összöltése is statisztikailag nagyobb volt EPI sejtekben az ENDO sejtekhez képest.

Az AP alakjának hatása az $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ profilokra

Az EPI és ENDO sejtek között jelentős különbséget találtunk mind a 9-AC AP alakjára gyakorolt hatásában, mind az APVC-vel mért $I_{9\text{-AC}}$ profilok (maximális áramsűrűség és összöltés) tekintetében. A jelenségek hátterében az EPI és ENDO AP-ok eltérő alakját sejtettük, ezért teszteltük az AP parancs alakjának szerepét az $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktiválásában. Tipikus ENDO és EPI AP-kat választottunk és használtunk feszültségparancsként APVC kísérletekben mind ENDO, mind EPI sejteken. A $I_{9\text{-AC}}$ profilok mind az ENDO sejtekben mind az EPI sejtekben mindkét stimulus parancsjellel hasonlóak voltak. Azonban különbség mutatkozott a korai kifelé irányuló komponens maximális áramsűrűségének és összöltésének értékei között, mivel az EPI parancsjelekkel aktivált $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ mindig nagyobb értékeket eredményezett, függetlenül attól, hogy melyik sejtípust használtuk $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ rögzítésére.

A $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ szerepe az EAD-k létrejöttében és a repolarizáció rövid távú variabilitásában

Az EAD egy teljes repolarizáció előtti depolarizáció, az AP plató fázisa során, és felelősnek tekinthető a malignus szívritmuszavarok kialakulásáért. Kísérleteink során 0,5 mM 9-AC csak a sejtek kis százalékában indukált EAD-t és csak hosszú CL stimulálás esetén. A nem specifikus β -adrenerg agonista isoproterenol (ISO, 10 nM) alkalmazásával elért $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés nem mutatott EAD-t egyik vizsgált CL-on sem 9-AC hiányában, viszont a két vegyület egyidejű alkalmazása sokkal gyakoribb EAD előfordulást eredményezett, különösen hosszú CL-ok esetén.

A QT-intervallum rövid távú variabilitása jobb prediktív értéket mutat a szívritmuszavarok kialakulásával kapcsolatban, mint maga a QT-intervallum időtartama. Mivel a QT-intervallum megfelel a kamrai AP időtartamának, a QT-intervallum rövid távú variabilitását az AP időtartam rövid távú variabilitásaként (SV) lehet reprezentálni sejt szinten. Hangsúlyozni kell,

hogy ezeket a kísérleteket 1 Hz-es egyensúlyi ingerléssel végeztük, ezért az APD vagy SV változásai nem lehetnek az EAD előfordulása miatt. Az SV legjobb ábrázolására a Poincaré diagram alkalmas, melyeken az AP-k (APD₉₀) vagy a QT intervallumok időtartamát ábrázoljuk a korábbi APD₉₀ vagy QT intervallum időtartam értékek függvényében. A 9-AC növelte az APD₉₀ értéket, míg az ISO hozzáadása megszüntette ezt az AP megnyúlást. A 24 vizsgált sejtben a SV értékek átlaga nagyobb volt 9-AC jelenlétében ($3,1 \pm 0,2$ ms), de az ISO hozzáadása lecsökkentette az SV értéket ($1,8 \pm 0,2$ ms) a kontroll állapotban számított érték ($2,3 \pm 0,1$ ms) alá. Azonban 9-AC előkezelés nélkül az ISO még alacsonyabb értékre csökkentette le a SV-t ($1,4 \pm 0,1$ ms). Még ennél is fontosabb, hogy a 9-AC jelenlétében az egymás utáni APD₉₀-értékek közötti különbségek diszpergálásának értékelésénél a kumulatív eloszlási görbe a nagyobb beat-to-beat variabilitás irányába tolódott, jelezve az egymást követő APD₉₀ értékek közötti különbségek növekedését.

A BAPTA-AM hatása az akciós potenciál morfológiájára

A $[Ca^{2+}]_i$ változás akciós potenciál konfigurációjára gyakorolt hatásának tanulmányozására a két legkézenfekvőbb módszer a $[Ca^{2+}]_i$ csökkentése kalciumkelátorral (pl. BAPTA), illetve a $[Ca^{2+}]_i$ növelése kalcium-ionofór (A23187) alkalmazásával. Sejtjeinket a BAPTA sejt-permeáns acetoxi-metilészter formájával (5 μ M BAPTA-AM) kezelve meghosszabbodott, míg az 1 μ M A23187 esetében rövidült a repolarizáció 90 % -nál mért akciós potenciál időtartam (APD₉₀). Ezek a változások fokozatosan alakultak ki, bár a BAPTA-AM esetében az APD₉₀ kezdeti gyors növekedését figyeltük meg. Az APD₉₀ változásai mellett az akciós potenciál általános morfológiájában is jellemző változások következtek be. A $[Ca^{2+}]_i$ csökkentése (BAPTA-AM-mel) a plató potenciálját pozitívabb feszültségekre tolta, miközben a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése a platópotenciál jelentős csökkenését eredményezte.

A BAPTA-AM hatását korábban tanulmányozták olyan körülmények között, ahol az $I_{Ca,L}$ nagyságát manipulálták. Ca^{2+} -csatorna-blokkoló nisoldipine jelenlétében a BAPTA-AM által létrehozott APD-hosszabbítás kismértékű, bár statisztikailag szignifikáns volt 5 perc után, és átmenetinek bizonyult, mivel 20 percnyi BAPTA-AM expozíció után megszűnt. Ezzel szemben az $I_{Ca,L}$ növelése BAY K8644-gyel jelentősen növelte a BAPTA-AM által előidézett APD₉₀ nyújtó hatást. Érdeemes megjegyezni, hogy a BAPTA-AM hatása kétfázisú volt BAY K8644 jelenlétében: a BAPTA-AM 5 percnyi alkalmazása után az APD₉₀ elérte a maximális értékét, és ezután az APD₉₀ fokozatosan csökkent, majd a BAPTA-AM alkalmazás 15. percében érte el a minimumát.

A $I_{Ca,L}$ gátló nisoldipine által okozott platópotenciál csökkenés, illetve a $I_{Ca,L}$ -ot megnövelő BAY K8644 által létrehozott plató emelkedés hasonlít az A23189 és a BAPTA-AM esetében látottakhoz. Ezeket az eredményeket egybevetve arra a következtetésre juthatunk, hogy a $[Ca^{2+}]_i$ csökkentése megnyújtja, míg növelése rövidíti az akciós potenciált; és ezeket a hatásokat valószínűleg a $I_{Ca,L}$ Ca^{2+} -függő inaktivációja hozza létre.

A fenti eredményekkel szemben, amikor gátoltuk a sejtek I_{Kr} áramát (100 nM dofetiliddel vagy 300 nM E4031-el), a BAPTA-AM rövidítette az AP-kat. Az I_{Kr} gátlószer az általunk alkalmazott koncentrációkban az I_{Kr} áram több, mint 75 %-át gátolja. A BAPTA-AM APD_{90} rövidítő hatása azonban átmenetinek bizonyult, hasonlóan a BAY K8644 jelenlétében alkalmazott BAPTA-AM 5 perc és 20 perc között tapasztalt átmeneti APD_{90} rövidítési tendenciájához. A kísérleteket elvégeztük úgy is, hogy fordított sorrendben alkalmaztuk a szereket, tehát BAPTA-AM előkezeléssel, illetve annak hiányában vizsgáltuk 100 nM dofetilide hatását. A dofetilide mindkét esetben megnövelte az APD_{90} értékét, ám a szer AP meghosszabbító hatása szignifikánsan kisebbnek bizonyult 5 μ M BAPTA-AM jelenlétében. Az önmagában alkalmazott BAPTA-AM AP időtartamot növelő hatását kizárólag az I_{Kr} gátlása változtatta ellentétes, AP időtartamot csökkentő hatássá. A sejteket az I_{Ks} gátló 1 μ M HMR-1556-tal⁵³ előkezelve ugyanis a BAPTA-AM hozzáadása ugyanúgy az AP időtartam további növekedését okozta, mint az önmagában alkalmazott BAPTA-AM.

Megvizsgáltuk a nisoldipine, BAY K8644, dofetilide és E4031 (szerek, melyeket BAPTA-AM alkalmazása előtt használtunk) időfüggő hatását 20-30 percig tartó kísérletekben. Így bizonyosodtunk meg arról, hogy a BAPTA-AM által előidézett bármilyen APD_{90} változás nem tulajdonítható az előkezelés során alkalmazott szer időfüggő hatásának.

Annak vizsgálatára, hogy a BAPTA-nak kizárólag az AM formája változtatja meg az akciós potenciál morfológiáját, a szívizomsejteket 5 μ M BAPTA-val perfundáltuk. 30 percig tartó BAPTA-expozíció során nem figyeltünk meg változást sem az akciós potenciál időtartamában sem más paraméterében. Ez azt sugallja, hogy az acetoximetil csoport jelenléte szükséges a BAPTA-AM akut APD -növelő hatásának kialakulásához. Az akciós potenciálok időtartama és konfigurációja sem változott szignifikánsan a kezeletlen kutya kamrai sejtekben a 60 perces rögzítési idő alatt, hasonlóan a BAPTA jelenlétében tapasztaltakhoz.

A BAPTA-AM hatása az I_{Kr} áramra

Az első kísérletsorozatban a perfúziós oldatban külsőleg alkalmazott BAPTA-AM I_{Kr} -re gyakorolt hatását vizsgáltuk 5 kamrai szívizomsejtben hagyományos feszültség-clamp technikával. Az I_{Kr} áramsűrűségét a -40 mV-ra történő repolarizáció után mért I_{Kr} farokáram

amplitúdóból számítottuk. A sejtek I_{Kr} áramsűrűségét $5\text{ }\mu\text{M}$ BAPTA-AM a kontroll körülmények között mért érték $32\pm 8\%$ -ára csökkentette ($0,39\pm 0,05$ és $0,12\pm 0,03$ A/F, $p < 0,05$, $n=5$). Ez a hatás részlegesen reverzibilis volt, mivel BAPTA-AM-mentes perfúziós oldatban az 5 perces kimosási idő alatt az áram amplitúdó visszatért a kontroll értékének $76\pm 5\%$ -ára. Ezekben a kísérletekben a pipetta belső oldat 10 mM BAPTA-t tartalmazott, így tehát az extracellulárisan alkalmazott BAPTA-AM I_{Kr} -t csökkentő hatása független volt a BAPTA-AM intracelluláris Ca^{2+} -ot keláló hatásától.

A BAPTA-AM hatása az I_{Kr} áramra (APVC)

A hagyományos feszültség-clamp kísérletek nem ideálisak az ionáram gátlás következményeinek vizuális megjelenítésére az akciós potenciál során. Ezért akciós potenciál feszültség clamp kísérleteket is terveztünk, hogy vizsgálni tudjuk az $5\text{ }\mu\text{M}$ BAPTA-AM hatását az AP alatti I_{Kr} áramprofilra. Mivel ez a technika az I_{Kr} farmakológiai kivonásán alapul ($1\text{ }\mu\text{M}$ E4031 alkalmazásával), a méréseket szívműködő sejtekként populációjában kellett elvégeznünk. Az I_{Kr} áramsűrűsége BAPTA-AM hiányában (kontroll) és jelenlétében rendre $0,50\pm 0,03$ és $0,17\pm 0,06$ A/F ($n=7$ és $n=5$, $p < 0,05$) volt, ami 66% -os amplitúdócsökkenésnek felel meg. Még nagyobb különbség mutatkozott az akciós potenciál alatti, I_{Kr} által szállított töltés mennyiségében: kontroll körülmények között 22 ± 5 mC/F, míg BAPTA-AM-ben 6 ± 2 mC/F ($n=7$ és $n=5$, $p < 0,05$) értékeket kaptunk, mely a kontroll érték 27% -ával egyenlő. A BAPTA-AM Ca^{2+} -pufferelő hatását kizárhatjuk ezekben a kísérletekben is, mert a sejteket a külső BAPTA-AM alkalmazása előtt előzetesen BAPTA-val töltöttük fel (lásd a Módszerek részt).

A 9-phenanthrol hatása a szívműködő fontosabb ionáramaira

A 9-phenanthrol ionáramokra gyakorolt koncentrációfüggő hatását vizsgáltuk 1 , 3 , 10 és $30\text{ }\mu\text{M}$ koncentrációban hagyományos feszültség-clamp technikával. Minden egyes koncentrációt 5 percen át alkalmaztunk, a kísérlet végén a kimosás 10 percig tartott. Kísérleteink során célunk a TRPM4 csatornák Ca^{2+} -függő aktiválódásának megakadályozása volt, ezért 10 mM BAPTA-t tartalmazó pipettaoldatot alkalmaztunk a citoplazmatikus Ca^{2+} pufferelése érdekében.

A befelé egyenirányító K^+ áramot (I_{K1}) hiperpolarizáló, -80 mV -ról 200 ms -ig -130 mV -ra tartó impulzusok alkalmazásával regisztráltuk $0,05\text{ Hz}$ frekvencián. Az áramot a -130 mV -os feszültségimpulzus végén határoztuk meg. A 9-phenanthrol $10\text{ }\mu\text{M}$ -os vagy annál magasabb koncentrációban szignifikánsan csökkentette az I_{K1} -et részben reverzibilis módon.

A gyors késői egyenirányító K^+ áramot (I_{Kr}) $0,5\text{ s}$ időtartamú, -40 mV tartófeszültségről $+40\text{ mV}$ -ra depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Az I_{Kr} -t a -40 mV -ra történő repolarizációtól

során megjelenő farokáramokként értékeltük. Méréseink során az L-típusú kalciumáramot ($I_{Ca,L}$) és az I_{Ks} -t farmakológiailag gátoltuk. Az I_{Kr} farokáramok amplitúdói fokozatosan csökkentek a 9-phenanthrol koncentrációjának növelésével párhuzamosan, amely hatás csak részben volt reverzibilis.

Az L-típusú kalciumáramot ($I_{Ca,L}$) +10 mV-on rögzítettük -80 mV tartófeszültségről 200 ms-ig tartó depolarizációval 1 Hz frekvencián. A tesztimpulzust egy rövid időtartamú (20 ms) -40 mV-ra történő depolarizáció előzte meg a Na^+ áram megszüntetése céljából. A 9-phenanthrol jelenlétében +10 mV-on egy koncentráció-függő módon növekvő, de egy adott koncentrációnál a tesztpotenciál fennállása alatt állandó amplitúdójú (a továbbiakban „steady”) kifelé irányuló áramot tapasztaltunk, ami csak részben volt reverzibilis a szer kimosása során. A csúcsáram és a depolarizáló impulzus végén mért áram közötti különbséggént meghatározott $I_{Ca,L}$ amplitúdót a 9-phenanthrol nem befolyásolta 30 μM koncentrációig.

A tranziens kifelé irányuló káliumáramot (I_{to1}) +40 mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk -80 mV-os tartófeszültségről 0,05 Hz frekvencián. A tesztpotenciálra lépés előtt 10 ms-ig tartó -40 mV prepulzust alkalmaztunk a gyors Na^+ áram inaktiválásához, míg az $I_{Ca,L}$ és I_{Ks} áramokat 1 μM nisoldipinnel és 1 μM HMR-1556-mal gátoltuk. Hasonlóan az $I_{Ca,L}$ mérések során tapasztaltakhoz, a 9-phenanthrol jelenlétében megfigyelhetünk egy „steady” kifelé irányuló áramot. Az I_{to1} -et a csúcsáram és a teljes inaktiváció után mért fenntartott áramkomponens (40 ms-mal a +40 mV depolarizáció kezdetét követően) közötti különbséggént határoztuk meg. A 9-phenanthrol szignifikánsan gátolta az I_{to1} -t 10 és 30 μM koncentrációban, és ez a hatás nagyrészt reverzibilisnek bizonyult.

Amint azt korábban is említettem, 9-phenanthrol jelenlétében +10 mV és +40 mV potenciálon egy „steady” kifelé irányuló áramot rögzítettünk. Megkíséreltük ezt az áramot közvetlenül is megjeleníteni egy 200 ms hosszú, +5 és -120 mV közötti feszültségrámpa segítségével. A rámpát először 9-phenanthrol hiányában, majd annak jelenlétében alkalmaztuk, 1 Hz ingerlés mellett. 9-phenanthrol jelenlétében a rámpa segítségével kapott áram-feszültség összefüggés a negatív ágában (valószínűsíthetően az I_{K1} gátlásának következtében) és a -40 mV-nál nagyobb potenciál tartományban is eltért a kontroll körülmények között rögzítettől. Annak ellenőrzésére, hogy ez az áram nem csak feszültségrámpa során tapasztalható, megmértük a 9-phenanthrol által indukált „steady” áramot állandó, -40, +10 és +40 mV membránpotenciálokon is. A „steady” kifelé irányuló áram 3 μM 9-phenanthrol koncentráció fölött +10 és +40 mV-os tesztpotenciálon is megjelent, az amplitúdója a 9-phenanthrol koncentrációjával arányosan növekedett, és fontos, hogy -40 mV-on nem tapasztaltunk ilyen „steady” áramot.

A 9-phenanthrol hatása az akciós potenciál morfológiájára

A 9-phenanthrol az akciós potenciál időtartamának 50 %-ánál mért platópotenciál (plató_{50}) koncentrációfüggő csökkenését okozta. Ez a hatás 3 μM fölötti koncentrációnál szignifikáns, és kimosás során reverzibilis volt. A depolarizáció maximális sebessége (V_{max}^+), ami arányos a gyors Na^+ áram áramsűrűségével, szintén szignifikáns mértékben csökkent 1 μM -nál nagyobb koncentrációk esetén, de csak részben volt visszafordítható a kimosás során. 30 μM 9-phenanthrol nem változtatta meg szignifikáns mértékben a nyugalmi membránpotenciált ($-82,2 \pm 0,9$ versus $-80,5 \pm 1,2$ mV a 9-phenanthrol távollétében és jelenlétében, $n = 16$, *nem szignifikáns*), azonban szignifikánsan csökkentette a csúcspotenciál értékét, és így az akciós potenciál amplitúdóját is. (rendre $25,3 \pm 1,8$ mV-ról $9,2 \pm 2,3$ mV-ra; illetve $107,5 \pm 1,6$ -ról $99,7 \pm 2,1$ mV-ra, $n=16$, $p<0,05$).

A 9-phenanthrol szignifikánsan csökkentette a korai repolarizáció (1. fázis) meredekségét. Az AP ezen fázisa az I_{to1} áramsűrűségét tükrözheti. A szernek az akciós potenciál konfigurációjára gyakorolt hatásai közül ez volt a legjellemzőbb: már 3 μM koncentráció esetén szignifikáns volt, és teljesen reverzibilisnek bizonyult. Az első fázis repolarizáció amplitúdója, amit a csúcspotenciál és az incisura bemélyedése között mértünk, szintén szignifikánsan csökkent 30 μM 9-phenanthrol hatására ($22,5 \pm 2,0$ -ról $6,0 \pm 1,7$ mV-ra, $n = 16$, $p < 0,05$). A terminális repolarizáció sebességét (V_{max}^-), ami jól korrelál az I_{K1} sűrűségével⁵, szintén szignifikánsan csökkentette 10 és 30 μM 9-phenanthrol, azonban ez a jelenség kevésbé volt kifejezett az 1. fázisra gyakorolt hatásokhoz viszonyítva, és csak részben volt visszafordítható kimosás során.

A 9-phenanthrol hatása az akciós potenciál 90 %-os repolarizációjához tartozó időtartamra (APD_{90}) nem volt egységes a vizsgált szívműködő sejtekben. Valamennyi, (16 db) sejtnek megfelelő APD_{90} átlagértékek nem mutattak szignifikáns változást 10 μM 9-phenanthrol koncentrációig, azonban 30 μM jelenlétében az APD_{90} növekedni kezdett, ami a kimosás alatt is folytatódott. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a 16 vizsgált szívműködő sejtől 12 esetén, azonban 4 szívműködő sejt az APD_{90} jelentős csökkenésével reagált a kezelésre. A kimosás során azonban az APD_{90} az említett 4 sejtben a kontrollnál hosszabb lett. A többi vizsgált akciós potenciál paramétert hasonlóan befolyásolta a 9-phenanthrol a szívműködő sejtek mindkét csoportjában. A 9-phenanthrol alkalmazása előtt, kontroll körülmények között mért akciós potenciál paramétereket közül, az alábbiak voltak statisztikailag szignifikánsan eltérőek a két sejtcsoport között: a plató_{50} és az 1. fázis végén mért legnegatívabb feszültségek magasabbak voltak; míg az APD_{90} rövidebb volt az akciós potenciál megnyúlásával reagáló sejtekben, mint a 9-phenanthrol kezelést követően AP rövidülésével reagáló sejtekben.

Megbeszélés

A kalciumfüggő-kloridáram szerepe a repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitásában

Az $I_{Cl(Ca)}$ hatása az AP konfigurációra és a repolarizáció térbeli heterogenitására

A korábbi vizsgálathoz hasonlóan a 9-AC nem módosította a V_{max} -ot egyik vizsgált sejttypusban sem, jelezve, hogy a szer nincs hatással a gyors Na^+ áramra. Ezáltal a szer alkalmas a $I_{Cl(Ca)}$ szerepének tanulmányozására AP mérések során is. A 9-AC meghosszabbította az AP-t ENDO és MID sejtekben is a korábbi eredményekkel összhangban. EPI sejtekben azonban nem okozott AP megnyúlást. Ez az I_{Kr} felhalmozódása által kiváltott esetleges rövidítő hatásnak, valamint a kisebb Ca^{2+} -beáramlásnak köszönhető a kifejezett tüske és kupola AP konfiguráció hiányában. Ez az AP rövidítő hatás úgy tűnik, kiegyenlíti a 9-AC által okozott $I_{Cl(Ca)}$ gátlás miatt várható AP megnyúlást.

A repolarizáció 1. fázisának nagyságát a 9-AC minden vizsgált sejttypusban csökkentette. Az 1. fázis előzetes csökkentése után (az I_{to1} részleges, 1 mM 4-AP-vel történő gátlásával) az EPI sejtek AP alakja hasonlónak vált az ENDO-okéhoz. Amikor a 9-AC-t ilyen körülmények között alkalmaztuk, akkor az AP paraméterek változása gyakorlatilag azonos volt az ENDO sejtekben megfigyelttel. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 9-AC APD-re gyakorolt hatásának hiánya EPI sejteken a nagy I_{to1} sűrűség által létrehozott kifejezett tüske és kupola AP konfigurációnak tulajdonítható. Ez összhangban áll a Zygmunt és mtsai. által leírtakkal, akik szintén fontos szerepet tulajdonítottak az I_{to1} -nek a későbbi ionáramok aktiválásában, mint például a $I_{Cl(Ca)}$ és $I_{Ca,L}$.

Eredményeink jól illeszkednek egy korábbi tanulmányhoz a kísérleti körülmények közötti különbségek ellenére is. Verkerk és mtsai. az AP méréseiket nyúl bal kamrai szívműködésben, patch-clamp konfigurációban végezték, és DIDS-et használtak a $I_{Cl(Ca)}$ gátlására, miközben mi 9-AC-t alkalmaztunk kutya bal kamrai szívműködésben, hegyes mikroelektroda technikával. Mindazonáltal AP megnyúlást ők sem találtak az EPI sejtekben, kivéve a leggyorsabb stimulációs sebességen, 3,33 Hz-en. Ezenkívül, a mi megfigyelésünkhöz hasonlóan a $I_{Cl(Ca)}$ DIDS-el történő gátlása az EPI sejtek AP-ját 1 Hz-en csak I_{to1} gátlás jelenlétében hosszabbította meg. Eredményeinkkel összhangban egy szintén kutya sejteken végzett vizsgálatban az APD csak akkor növekedett, amikor a repolarizáció 1. fázisa lassú és csekély volt (mint a MID és ENDO sejtekben).

A MID, az ENDO és a 4-AP-nel előkezelt EPI sejtekben a $I_{Cl(Ca)}$ gátlása fordított frekvenciafüggő módon hosszabbította az AP-t. Ez megegyezik a kutya és más emlősfajok APD-ának frekvenciafüggő változásairól szóló korábbi megállapításainkkal. Ezen kívül két másik tényező is hozzájárulhat a 9-AC-indukált, frekvenciafüggő AP megnyúláshoz. Az egyik a $[Ca^{2+}]_i$ frekvenciafüggő ingadozása, ami nagyobb mértékű magasabb ingerlési frekvencia esetén mind egyensúlyi, mind nem-egyensúlyi állapotban. Ezenkívül a $[Ca^{2+}]_i$ jól korrelál a I_{9-AC} -ként, négyszögimpulzusokkal mért $I_{Cl(Ca)}$ -mal. Egy másik tényező az I_{to1} áramsűrűség frekvenciafüggő viselkedése, mivel az aktiválható csatornák száma nagy ingerlési frekvencián csökken az I_{to1} viszonylag lassú inaktivációból történő visszatérése miatt³¹. Ez abban tükröződött, hogy a repolarizáció 1. fázisa frekvenciafüggő tulajdonságokat mutatott kontroll körülmények között, mivel nagyobb volt hosszú CL-nál. Ezenkívül, ez a frekvenciafüggés jelen volt akkor is, amikor a $I_{Cl(Ca)}$ -t 9-AC-vel gátoltuk mind az 5 vizsgált sejttypusban (nem ábrázoltuk). Emiatt az 1. fázis frekvenciafüggését inkább befolyásolja az I_{to1} inaktivációs kinetikája, mint a $I_{Cl(Ca)}$ nagysága. Ez hangsúlyozza a fordított frekvenciafüggésnek, mint a szívizom belső tulajdonságának a tényét. Ezért a $I_{Cl(Ca)}$ szerepe a APD transzmurális heterogenitásának csökkenésében lassú szívverésnél erőteljesebb, mint ahogy azt nyúl szívizomsejteken végzett kísérletek is bizonyították. Ez még fontosabbá teszi az $I_{Cl(Ca)}$ repolarizációhoz történő hozzájárulását, mivel a repolarizáció heterogenitása alacsony frekvencián a legnagyobb.

Vizsgálatunk elsőként írja le az $I_{Cl(Ca)}$ apiko-bazális hozzájárulását az AP konfigurációhoz. A kiindulási AP paramétereink hasonlóak voltak a korábban publikált értékeinkhez, és a 9-AC-indukált AP paraméterek apiko-bazális irányú változásai hasonlóak voltak a transzmurális irányban tapasztaltakhoz. Ismét, az AP repolarizáció heterogenitását $I_{Cl(Ca)}$ -mal csökkentettük, és ez a hatás a legerősebb a lassú stimulációs sebességeknél volt.

A $I_{Cl(Ca)}$ és annak ioncsatorna fehérjéi közötti transzmurális különbség

A I_{9-AC} felhasználható a $I_{Cl(Ca)}$ AP-hoz való hozzájárulásának feltárására közel fiziológias körülmények között (APVC-vel, megtartott intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis mellett)²⁴, ennek ellenére a $I_{Cl(Ca)}$ regionális különbségeit még nem vizsgálták ilyen módon. Két hasonló vizsgálat történt, az egyikben egy "tipikus" AP-t alkalmaztak parancsjelként perforált patch mérésekben, nem specifikus $I_{Cl(Ca)}$ gátlószereket használva a másikon pedig a fiziológias kalcium homeosztázisba avatkoztak bele, ugyanis a pipetta belső 10 mM EGTA-t tartalmazott. Méréseinkben a I_{9-AC} korai kifelé irányuló komponensének áramsűrűsége statisztikailag szignifikánsan nagyobb volt az EPI sejtekben az ENDO értékekhez képest. Ez az EPI-ENDO

különbség váratlan volt, mivel Zygmunt által végzett korábbi vizsgálat nem számolt be a $I_{Cl(Ca)}$ áramsűrűségének transzmurális különbségéről kutya bal kamrájában. Az idézett vizsgálat EPI és MID sejtek $I_{Cl(Ca)}$ áramsűrűségét összehasonlító eredményei teljes mértékben egybehangzóak a jelen értekezésben taglalt kísérleti eredményekkel. Azonban ők a $I_{Cl(Ca)}$ -t nem vizsgálták ENDO sejtekben, és hagyományos négyszögimpulzusokat alkalmaztak az áram nem-specifikus gátlószerének (DIDS) használatával. Jelen kísérleteink alkalmával 9-AC-t használtunk mind az APVC, mind a hagyományos feszültség-clamp mérések során, azonban az utóbbi esetben nem találtunk szignifikáns különbséget a $I_{Cl(Ca)}$ sűrűségében sem a különböző transzmurális rétegekből származó, sem az apikális vagy bazális eredetű midmiokardiális sejtek összehasonlításakor. Az értekezésben bemutatott eredményekkel ellentétben, a hagyományos feszültség-clamppal mért $I_{Cl(Ca)}$ amplitúdó szignifikánsan nagyobb volt macska EPI sejtekben az ENDO sejtekhez képest, ami fajok közötti különbséget sugall a $I_{Cl(Ca)}$ transzmurális eloszlásában.

Az EPI sejtek nagyobb $I_{Cl(Ca)}$ sűrűségét az AP alakja határozza meg

A 9-AC-indukált AP megnyúlás erőteljesebb volt ENDO sejtekben, mint EPI sejtekben. Továbbá a I_{9-AC} korai kifelé irányuló komponensének áramsűrűsége is nagyobb volt EPI sejtekben, mint ENDO sejtekben APVC-körülmények között. Ezzel szemben a I_{9-AC} áramsűrűségben nem tapasztaltunk transzmurális különbségeket hagyományos feszültség-clamp kísérletek során. Megjegyzendő, hogy az ingerlőjel formája jelentősen különbözik a hagyományos feszültség-clamp (négyszögjel) és az APVC esetén (saját, fiziológias AP). Ezért vizsgáltuk azt a hipotézist, hogy az ingerlőjel (ingerlő AP) alakja lehet felelős az EPI-sejtek nagyobb $I_{Cl(Ca)}$ sűrűségéért. Ehhez korábban rögzített tipikus ENDO és EPI AP-t használtunk ingerlőjelként. Az ENDO AP csak lassú és kis amplitúdójú 1. fázissal rendelkezik, míg az EPI AP 1. fázisa gyors és nagy, amit egy kifejezett kupola követ. A jellegzetes EPI ingerlő AP nagyobb korai kifelé irányuló $I_{Cl(Ca)}$ -t indukált, mint az ENDO AP, függetlenül attól, hogy APVC során az ingerlőjelet EPI vagy ENDO sejteken alkalmaztuk. Ezek az eredmények hasonlóak a csoportunk által korábban kutya és humán bal kamrai szívmusclesejtekben mért nisoldipine-érzékeny áram esetében tapasztaltakhoz. Kimutattuk, hogy a nisoldipine-érzékeny áram töltése jelentősen nagyobb volt az EPI AP során az ENDO-hoz képest. Ez a $I_{Cl(Ca)}$ erőteljesebb aktiválódását eredményezheti az AP korai fázisában. Nehéz megjósolni a pontos mechanizmust, mivel a $[Ca^{2+}]_{res}$ mellett a membránpotenciál is befolyásolja a $I_{Cl(Ca)}$ aktiválódását. Az EPI AP jellegzetes 1. fázisa kettős hatást gyakorol a $I_{Cl(Ca)}$ -ra. Az 1. fázis során folyamatosan csökkenő membránpotenciál egyrészt csökkenti Cl^- elektrokémiai

grádiensét, és így közvetlenül gátolja a Cl^- beáramlását, másrészt viszont elősegíti a Ca^{2+} beáramlását a Ca^{2+} megnövekedett hajtóereje és az LTCC-k I-V karakterisztikája miatt. Kísérleteink alapján a hangsúlyosabb 1. fázis (EPI AP) hatása összességében az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ korai kifelé irányuló komponensének növekedését eredményezi. Ez a nagyobb áram biztosan nem az EPI sejtekben lévő csatornafehérjék nagyobb sűrűségének tulajdonítható, mivel a TMEM16A és a Bestrophin-3 expressziója mind transzmurális, mind apiko-bazális irányban egyenlő volt. Bár a $\text{Ca}_v1.2$, az LTCC-k pórusképző alegységének expressziós szintjét nem vizsgáltuk ENDO sejtekben, a kifejeződés mértékét egyenlőnek találtuk EPI és MID sejtekben, hasonlóan a jelen munkánkban leírt egyenlő TMEM16A és Bestrophin-3 sűrűséghez.

Az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ hatása a bal kamrai repolarizáció időbeli változékonyságára és az EAD képződésre

A repolarizáció megnyúlása növeli a szívritmuszavarok előfordulását, mivel EAD-okhoz és TdP-hez vezethet³⁰. Azonban az Európai Szívritmus Társaság (European Heart Rhythm Association) és az Európai Sejtszintű Szívelektrofiziológiai Munkacsoport (European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology) állásfoglalása és irányelvei⁷ szerint a repolarizáció rövid távú variabilitása (SV) a szívritmuszavarok előrejelzésében fontosabb, mint önmagában a repolarizáció megnyúlása.

A korábban említett vizsgálatok szerint bármely SV csökkentő beavatkozásnak lehet antiaritmiás tulajdonsága. Az értekezésben tárgyalt SV számítások alapját képező kísérleteinket 1 Hz-es steady-state ingerléssel végeztük, és ezen körülmények között nem tapasztaltunk EAD-t, ezért az APD vagy SV változásai nem lehetnek az EAD előfordulása miatt. A 9-AC az SV növekedését indukálta, ami a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ antiaritmiás szerepét sugallja. A $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ lehetséges antiaritmiás tulajdonságát tovább erősíti, hogy a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ gátlásakor EAD-ket detektáltunk 1 Hz-nél alacsonyabb ingerlési frekvencián. Az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ antiaritmiás szerepét alátámasztó további bizonyíték, hogy 9-AC és ISO egyidejű jelenlétében nagyobb EAD incidenciát tapasztaltunk, mint kizárólag 9-AC jelenlétében. Az ISO $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ növelő hatása jól ismert, ezáltal ISO jelenlétében növekszik a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{rés}}$, ami nagyobb $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -hez vezet. Ha ezt a megnövekedett – és feltehetően antiaritmiás hatású – $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -t 9-AC-vel gátoljuk, logikusan nagyobb EAD előfordulás várható, csakúgy, mint amit kísérleteinkben láttunk.

A jelen értekezésben és korábbi publikációkban is az SV érték számítására használt képlet nem érzékeny módszer annak vizsgálatára, ha csak néhány AP hosszúsága különbözik erősen az átlagtól. Az átlagtól való nagymértékű eltérés annál valószínűbb, minél több egymást követő AP-t használunk. Az egymást követő APD értékek hirtelen nagymértékű változásának előfordulása azonban nem feltétlenül homogén a miokardium különböző eredetű sejtjeiben.

Egy ilyen változás hatékonyabban válthat ki szívritmuszavart, mint egy hatóanyag a fokozatos és egyidejű APD növelő hatásának kifejtése során. Ezért az egymást követő APD értékek közötti különbséget 1 ms-os tartományonként csoportosítottuk, és kiszámítottuk a megjelenésük kumulatív valószínűségét az 50 elemzett AP között esetlegesen előforduló szokatlanul rövid vagy szokatlanul hosszú AP-k érzékenyebb észlelése érdekében. Ezt az elemzést használva, a 9-AC jobbra tolta a kumulatív valószínűségi görbét, ami az egymást követő APD értékek közötti különbségek növekedését, tehát aritmogén hatást jelez. Az ISO önmagában antiaritmias hatású, mivel a kumulatív valószínűségi görbét balra tolta. Ez az antiaritmias hatás azonban kisebb volt 9-AC jelenlétében, mert a kumulatív valószínűségi görbét az ISO kisebb mértékben tolta balra 9-AC jelenlétében, mint önmagában. Hasonlóképpen, a 9-AC és az ISO együttes jelenlétében az SV értéke nagyobbak adódott, mint az önmagában alkalmazott ISO esetén. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az $I_{Cl(Ca)}$ hozzájárul az ISO által okozott SV csökkenéshez. Eredményeink mindegyike alátámasztja az $I_{Cl(Ca)}$ szívritmuszavarral szembeni védő szerepét, az APD heterogenitásának fent említett térbeli csökkenésével együtt.

A jelen értekezésben bemutatott eredmények összhangban vannak munkacsoportunk korábbi tanulmányával mely a $I_{Cl(Ca)}$ védő szerepét a cézium és az ouabain által indukált kutya kamrai szívizomsejt EAD modellekben is feltételezte. Ezzel szemben juh kamrai sejteken a DIDS alig volt hatással az EAD-k paramétereire. A különböző fajoktól eltekintve, a juhokon végzett vizsgálatban noradrenalin alkalmaztak EAD kiváltására, illetve a DIDS, egy nem specifikus $I_{Cl(Ca)}$ gátlószer (amely gátol Na^+ csatornákat is) EAD paraméterekre gyakorolt hatását tanulmányozták. A jelenlegi vizsgálatban EAD-ket nem idéztünk elő, de előfordulási gyakoriságukat 9-AC, a $I_{Cl(Ca)}$ specifikus gátlószerének hiányában vagy jelenlétében vizsgáltuk. E különbségek miatt nehéz összehasonlítani ezeket a vizsgálatokat.

Megemlítendő továbbá a DAD és a $I_{Cl(Ca)}$ kapcsolata. Ismert, hogy a DAD szívritmuszavarokat provokálhat TdP elindításával. A DAD-kat nem csak az I_{NCX} forward módja, hanem az $I_{Cl(Ca)}$ is létrehozhatja, legalábbis bizonyos fajokban és sejtípusokban. Korábban kimutatták a $I_{Cl(Ca)}$ aktiválásának szerepét Ca^{2+} -túltöltött kutya kamrai, nyúl pitvari, kamrai és Purkinje, valamint juh Purkinje és kamrai sejtek DAD-inak előidézésében. Az ISO által indukált kloridáram (és DAD-k) jelenlétét nem figyelték meg kutya kamrai sejtekben, de ugyanolyan kísérleti körülmények között tengerimalac kamrai szívizomsejtekben kimutatták a membrán depolarizációját. Lehetséges, hogy az 1 μM ISO 20 másodpercig történő alkalmazása nem volt elegendő Ca^{2+} -túlterhelés indukálására, és ezáltal az $I_{Cl(Ca)}$ és a DAD-k aktiválására a kutyákból származó szívizomsejteken. Hasonlóképpen, ISO jelenlétében DAD-kat nem

észleltük kísérleteink során, jelezve, hogy a 10 nM ISO nem okoz Ca^{2+} túlterhelést kutya kamrai szívizomsejtekben. Lehetséges DAD-k létrehozása kutya sejtekben Ca^{2+} -túlterheléssel, de az ISO-t ehhez 100-szor magasabb koncentrációban, és ouabainnal együtt kellett alkalmazni.

Összefoglalás és lehetséges relevancia

Az értekezésben bemutatott eredmények arra utalnak, hogy a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ védő szereppel bír a bal kamrai szívizomzat ritmuszavarának kockázatával szemben. Az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ ezt a repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitásának együttes csökkentésével éri el. Amint azt korábban említettük, az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ gátlása hasznos lehet a Ca^{2+} túlterhelés által indukált DAD-k csökkentésére. Ugyanakkor azonban az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ gátlása növelheti a szívritmuszavarok kockázatát a repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitásának és az EAD képződés gyakoriságának növelésével. Amint azt kimutattuk, az EAD képződés előfordulása még nagyobb volt a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ gátlásakor ISO együttes jelenlétében. Ezért olyan klinikai környezetben, ahol β -blokkolót alkalmaznak a szívfrekvencia és a Ca^{2+} túlterhelés csökkentésére, a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ antiaritmiás hatása még kifejezettebb lehet, mivel a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ a lassú szívfrekvenciákon hatékonyabban csökkenti az APD heterogenitást.

A BAPTA-AM akciós potenciál időtartamára kifejtett hatása

A jelen vizsgálatban egyértelműen kimutattuk a Ca^{2+} kelátképző BAPTA-AM reverzibilis I_{Kr} -t gátló hatását kutya kamrai szívműködősejtekben. Eredményeink megegyeznek Tang és mtsai. eredményeivel, akik szerint a BAPTA-AM IC_{50} értéke $1,3 \mu\text{M}$ volt HEK 293 sejtekben expresszált HERG-csatornákon (és más expresszált K^{+} csatornán is hasonlóan adódott). A szerzők úgy találták, hogy a BAPTA-AM a nyitott hERG csatornához kötődik. Ezért kissé meglepő, hogy hasonló mértékű gátló hatást figyeltünk meg a hagyományos feszültség clamp és akciós potenciál feszültség clamp körülmények között (az I_{Kr} áram a kontroll értékek rendre 32 és 34% -ára csökkent). A hasonló gátló hatás valószínűleg a hagyományos feszültség-clamp kísérletekben alkalmazott +40 mV-os aktivációs feszültség következménye, szemben a kevésbé pozitív akciós potenciál platóhoz képest, ellensúlyozta a magasabb, 1,4 Hz-es ingerlő frekvencia az utóbbi kísérleti elrendezésben. Mindkét feszültség clamp kísérlet legfontosabb üzenete, hogy amikor olyan sejtekben vizsgáljuk a szív ionáramainak Ca^{2+} függését, amelyek hERG csatornát (és néhány más K^{+} -csatornát) expresszálnak, a külső oldatban BAPTA-AM nem használható kísérleti Ca^{2+} kelátképzőként a BAPTA-AM közvetlen, K^{+} áramokat gátló hatása miatt.

Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy az aktuális kísérleti elrendezéstől függően a BAPTA-AM időben változó és nagyon összetett hatást gyakorolhat az APD_{90} -re, így az eredmények magyarázata szükségszerűen spekulatív. A BAPTA-AM gyorsan (5 perc alatt) kialakuló hatása, az APD_{90} szignifikáns megnyújtása hátterében nagyon valószínű, hogy az I_{Kr} BAPTA-AM általi gátlása áll. Ezt az egyszerű képet árnyalja, hogy a BAPTA-AM akut AP hosszabbító hatását csökkentette a nisoldipine és növelte a BAY K8644, ami a I_{Ca} változásának a BAPTA-AM által létrehozott APD_{90} változásban betöltött szerepére utal. Figyelembe kell vennünk továbbá, hogy a BAY K8644 és a nisoldopin hatására nem csak a I_{Ca} növekedett vagy csökkent, hanem a BAPTA-AM kezelés előtti APD_{90} valamint a plató potenciál értéke is. Az I_{Kr} -gátlás AP-t nyújtó hatása sokkal kifejezettebb, ha az APD_{90} hosszabb, mint ahogy azt a BAY K8644 jelenlétében is tapasztaltuk, és sokkal kisebb, ha az APD_{90} rövidebb, amint azt nisoldipine jelenlétében megfigyeltük. Ezenkívül az I_{Kr} relatív fontossága az APD_{90} szabályozásában erősen növekszik a plató pozitívabb potenciálok felé tolódásával, mivel az I_{Kr} gyorsabban aktiválódik pozitívabb feszültségeken. Ez szintén hozzájárulhat ahhoz, hogy BAY K8644 jelenlétében a BAPTA-AM kifejezettebben megnyújtotta az AP-t, mint nisoldipine jelenlétében.

Amikor a sejteket I_{Kr} -gátló szerekkel (dofetilide vagy E4031) előkezeltük, a BAPTA-AM nem tud további I_{Kr} gátló hatást kifejteni. Ilyenkor a BAPTA-AM csökkentette az APD_{90} -et, amely hatás valószínűleg a $[Ca^{2+}]_i$ csökkenéséhez köthető. Ennek a BAPTA-AM által indukált rövidülésnek a legvalószínűbb magyarázata a fiziológias körülmények között befelé irányuló Na^+/Ca^{2+} csere áram (NCX) kifelé irányulóvá válása a csökkent $[Ca^{2+}]_i$ következtében. Ezzel összhangban, a BAY K8644-gyel előkezelt szívműködősejtekben a BAPTA-AM kezdetben az APD_{90} növekedését okozta, majd 5 perc után az APD_{90} tendenciózus csökkenése következett be. Ennek oka valószínűleg az, hogy a hosszú AP és pozitívabbá váló platópotenciál reverz módú, kifelé irányuló NCX áram létrejöttének kedvez. Ez a hatás összefügghet a $[Ca^{2+}]_i$ pufferelése következtében tapasztalt szignifikáns APD_{90} rövidüléssel patkány, tengerimalac és görény szívműködősejtekben.

A BAPTA-AM által létrehozott APD_{90} rövidítő hatás csak átmeneti volt, a hosszan tartó BAPTA-AM expozíció a progresszív AP megnyúlást okozott. Ez az AP nyújtó hatás nyilvánvaló volt kontroll körülmények között is, ahol nem észleltünk átmeneti rövidülést (csak egy kis bemetszést 5 perc után). Az APD_{90} meghosszabbodását egy vagy néhány Ca^{2+} -függő kifelé irányuló áram kikapcsolása is okozhatja. Ilyen lehet például a Ca^{2+} -függő Cl^- áram, és a $I_{Ca,L}$ Ca^{2+} -függő inaktiválódásának megszüntetése szintén hozzájárulhat ezen jelenséghez. Összefoglalva, amikor a sejteket I_{Kr} -gátló szerekkel kezeltük, tehát a BAPTA-AM nem tudott további I_{Kr} gátló hatást kifejteni, akkor a $[Ca^{2+}]_i$ pufferelése az APD_{90} kétfázisú válaszát eredményezte: az AP tranziens kezdeti rövidülését az AP fokozatos meghosszabbodása követte.

A TRPM4 gátlószer 9-phenanthrol hatása az akciós potenciált létrehozó főbb ionáramokra

Munkánk során a TRPM4 gátlószer 9-phenanthrol akciós potenciál konfigurációra és a legfontosabb, azt létrehozó ionáramokra gyakorolt hatásait vizsgáltuk kutya bal kamrai szívizomsejteken. Feszültség-clamp méréseinkhez 10 mM BAPTA-tartalmú pipetta belsőt használtunk a TRPM4 csatornák Ca^{2+} -függő aktivációjának kikapcsolása érdekében azért, hogy vizsgálhassuk a 9-phenanthrol Ca^{2+} -tól független, direkt csatorna hatásait. A 9-phenanthrol a koncentráció függvényében az általunk vizsgált K^+ áramokat (I_{to1} , I_{Kr} és I_{K1}) gátolta, azonban a $I_{\text{Ca,L}}$ -ra nem volt befolyással. Rágcsálók kamrai szívizomsejtjeiben a 9-phenanthrol 10 μM koncentrációban nem hatott az $I_{\text{Ca,L}}$ -ra és a teljes K^+ áramra (I_{K}), de 100 μM koncentrációban már ezen áramokat jelentősen gátolta. Méréseink eredményei egybevágnak az előbb említett kutatás adataival, a 9-phenanthrol az általunk használt legmagasabb koncentrációban (30 μM) sem volt az $I_{\text{Ca,L}}$ -ra hatással. Azonban a kutya kamrai szívizomsejtek K^+ csatornái érzékenyebbek tűnnek a rágcsálókénál 9-phenanthrolra, mivel a mi mérési eredményeink alapján az I_{to1} , I_{Kr} és I_{K1} áramokat a szer már 10 μM koncentrációban is szignifikánsan gátolta. Az eredmények összehasonlításakor fontos megjegyezni, hogy a rágcsálók és a kutyák I_{K} -ai különbözőek, az adatok fajok közötti különbségre utalnak. A 9-phenanthrol félhatásos gátló koncentrációja a TRPM4 tekintetében 17 μM és 21 μM a szakirodalom szerint. Eredményeinket értelmezve arra a következtetésre juthatunk, hogy a 9-phenanthrol nem szelektív TRPM4 gátlószer izolált kutya kamrai szívizomsejtekben, mivel a TRPM4 csatornák gátlásához szükséges IC_{50} értéknél a 9-phenanthrol már a K^+ áramok szignifikáns gátlását okozta.

Hegyes mikroelektrodás AP méréseink alapján a 9-phenanthrol hatására csökkent az AP amplitúdója, a túllövési potenciál és a depolarizáció maximális sebessége (V_{max}^+). Ezen paraméterek bizonyosan a szer Na^+ csatornát gátló hatásának következtében változtak. A 9-phenanthrol a platófázist csökkentő hatását valószínűleg a késői Na^+ áram gátlásán keresztül közvetítheti, mivel a szer az $I_{\text{Ca,L}}$ -ra nem volt szignifikáns hatással. A szer az 1. fázis és a terminális repolarizáció meredekségét (V_{max}^-) egyaránt csökkentette, ami magyarázható az I_{to1} és az I_{K1} áramok gátlásával.

A fent említett AP paraméterek létrejöttéért egy-egy ionáram felelős, azonban az APD befolyásolásában számos különböző ionáram is részt vesz. Ezért a 9-phenanthrol APD_{90} -ra gyakorolt hatásának értelmezése során számos szempontot figyelembe kell venni. A sejtek populációja két csoportot alkotott a 9-phenanthrol APD_{90} -változtató hatásának tekintetében. Az első csoportban a szer hatására szignifikáns és reverzibilis AP rövidülést, míg a második

csoportban AP megnyúlást tapasztaltunk. Mint azt az előbb leírtam, a 9-phenanthrol befolyással van az inward és outward áramokra egyaránt, amiért az individuális sejt-sejt ionáram denzitás különbségek felelhetnek³. Ezen eredményeink ellentétesek egy egerek kamrai szívizomzatában végzett kutatással szemben, mivel az általuk alkalmazott modellben $V_{\max}^+$ és az AP amplitúdója egyaránt nem csökkent 100 μM 9-phenanthrol hatására. Kamrai és pitvari sejtekben eltérő hatású volt a 9-phenanthrol, előbbiben az APD-ának kis mértékű rövidülését okozta, míg utóbbiban az AP amplitúdóját és időtartamát egyaránt jelentősen csökkentette. Eredményeik arra utalnak, hogy a 9-phenanthrol hatása a pitvari sejtekben kifejezettebb, mint a kamrai szívizom sejtekben (legalábbis egerekben), amit az alacsonyabb kamrai TRPM4 csatorna kifejeződéssel magyaráznak. Érdeemes megjegyezni, hogy a TRPM4 knockout egerek pitvari AP-jai rövidebbek voltak a vad típusú állatok hasonló sejtjeiben tapasztaltakhoz képest. Nyulak esetében a 9-phenanthrol rövidítette a Purkinje rostok AP-ját, de szemben a mi eredményeinkkel, 30 μM koncentrációban a kamrai rostok AP-jára nem volt hatással.

Méréseink során 9-phenanthrol jelenlétében +10 mV és +40 mV membránpotenciálon megjelent egy időben állandónak tűnő, kifelé irányuló áram. Hasonló megfigyelést eddig nem írtak le 9-phenanthrollal végzett kutatásokban. Mivel a pipetta belsőben használt 10 mM BAPTA alkalmazásával a Ca^{2+} függő TRPM4 csatorna aktivák aktivációját lehetetlenné tettük, az állandó áram elméletileg nem jöhet létre a 9-phenanthrol TRPM4 csatornákon történő hatás eredményeként. Az áram reverzál potenciálja -40 mV-hoz közeli, messze van a TRPM4 áram közel 0 mV-os reverzál potenciáljától. Az áram természetének kiderítésére további vizsgálatokra van szükség, jelenlegi ismereteink alapján csak spekulálhatunk az áramot létrehozó ioncsatornákat és a töltéshordozó ionokat illetően.

Kifelé irányuló áram kifelé irányuló áram aktiválásával vagy befelé irányuló áram gátlásával jöhet létre. A késői Na^+ áram gátlása elméletileg felelőssé tehető a 9-phenanthrol alkalmazása során megjelenő kifelé irányuló áramért. A 9-phenanthrol késői Na^+ áramot gátló hatása jelenleg nem ismert, a szakirodalomban nem található erre utaló közvetlen kísérletes adat. Kifelé irányuló áramként a K^+ áram aktivációja is összeköthető az áram létrejöttével. Azonban nem tűnik valószínűnek ez a magyarázat, mivel a 9-phenanthrol az I_{K1} , az I_{Kr} és az I_{to1} gátlását is okozta, illetve a méréseinkben az I_{Ks} áramot pedig annak gátlószerével, HMR-1556-tal blokkoltuk. További jelölt lehet egy Cl^- áram növekedése, ami szintén kifelé irányuló áramot hoz létre. Kísérleteinkben a Cl^- számított reverzál potenciálja -32 mV. Fontos megjegyeznünk, hogy a szakirodalom alapján a 9-phenanthrol gátló hatással bír a TMEM16A Cl^- csatornákra. Ennek tükrében, továbbá annak tudatában, hogy méréseink során Ca^{2+} kelátort (BAPTA) használtunk, szinte biztosan kizárhatjuk, hogy a 9-phenanthrol által indukált kifelé irányuló

áramért a Ca^{2+} -érzékeny TMEM16A csatornák aktivációja lenne felelőssé tehető. Nem kizárható az sem, hogy a 9-phenanthrol aktiválhat egy Ca^{2+} -tól független Cl^- csatornát. Az egyik lehetséges jelölt lehet CFTR Cl^- csatorna. Igaz, hogy a CFTR 2x6 transzmembrán domént, míg a TRPM4 4x6 transzmembrán domént tartalmaz, a két csatorna több szerkezeti eleme – mint például a Walker B motívum vagy az ATP kötő kazetta – is megegyezik. A CFTR csatornák lehetséges, 9-phenanthrol jelenlétében mért kifelé irányuló áram létrehozásában betöltött szerepét megkérdőjelezi az a tény, hogy kutyaszívben kérdéses a CFTR által mediált isoproterenol indukálta Cl^- áram jelenléte. Annyit biztosan állíthatunk, hogy ezen 9-phenanthrol által indukált áram elektrofiziológiai viselkedésének meghatározására további kísérletek kivitelezésére van szükség.

Az értekezésben bemutatott, kamrai szívműködésben végzett 9-phenanthrol általi TRPM4 ionáram vizsgálatok eredményei sajnos nem az eredetileg kívánt irányba haladtak. Munkánk legfontosabb következtetése az, hogy a 9-phenanthrol nem tekinthető szelektív TRPM4 csatorna gátlószernak (legalábbis kutya kamrai szívműködésben). Ennek következtében a 9-phenanthrol TRPM4 gátlószerként való használata csak expressziós rendszerekben célszerű, natív szívműködésben nem.

Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ionáramok szabályozásában betöltött szerepét vizsgálva a következő új tudományos eredményeket kaptam:

1. Karakterizáltam a 9-AC (antracén-9-karboxilsav) segítségével a különféle, bal kamrai kutya szívműködésben az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ szerepét az akciós potenciál kialakításában, az aritmiák kialakulásában játszott lehetséges szerepét megállapítottam: feltételezhetően antiaritmiás hatása van.

2. Megvizsgáltam az intracelluláris Ca^{2+} hatását az bal kamrai szívműködés AP alakjára és I_{Kr} (hERG) áramokra, majd kimutattam, hogy az intracelluláris Ca^{2+} BAPTA-AM-mel történő csökkentése az I_{Kr} áram gátlása révén módosíthatja az AP jellemzőit.

3. Karakterizáltam a 9-phenanthrol, a TRPM4 csatorna egy specifikusnak vélt antagonistájának hatását számos, szívműködésben kifejeződő ionáram esetén, és eredményeim alapján arra a következtetésre jutottam, hogy egyáltalán nem szelektív gátlószer, sokféle egyéb ioncsatornát is képes a TRPM4-nél hatásos koncentrációban gátolni.

Összefoglalás

A szívizomsejtekben a sejtmembrán feszültségváltozásaival párhuzamosan a kalcium szint oszcillációja megfigyelhető meg. A szívben az ionáramok széles skálájáról ismert, hogy Ca^{2+} -függők. A sejt szintű elektrofiziológiai kísérletekben az intracelluláris kalciumkoncentrációt gyakran puffereljük ún. kalcium kelátorokkal a Ca^{2+} -függő ionáramok tanulmányozásának céljából. Bizonyos kísérletekben a Ca^{2+} kelátképzők sejtpermeábilis acetoxi-metilészter formáját használják a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ redukálására. Ilyen kísérleteket évtizedek óta végeznek, és a kapott eredményeket kizárólag a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puffereléssel értelmezték annak ellenére, hogy ismert: a BAPTA-AM kölcsönhatásba lép a HEK sejtekben kifejezett K^+ csatornákkal.

Hagyományos mikroelektroda technikával, konvencionális-, és akciós potenciál feszültség-clamp (APVC) technikával, valamint fehérjeexpresszió meghatározásával vizsgáltuk, hogy a $I_{\text{Cl(Ca)}}$ milyen szerepet tölthet be a szív bal kamrai repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitásának kialakításában. Célul tűztük ki annak vizsgálatát is, hogy a BAPTA-AM befolyásolja-e a bal kamrai szívizomsejtek akciós potenciálját (AP), illetve I_{Kr} áramát. 9-phenanthrol segítségével vizsgálni kívántuk a TRPM4 áram AP morfológia kialakításában betöltött szerepét, illetve az áram AP alatti viselkedését akciós potenciál clamp mérésekkel. Mivel ehhez a módszerhez lehetőleg minél szelektívebb ioncsatorna gátlószerre van szükség, ezért mindenekelőtt a 9-phenanthrol szelektivitási vizsgálatát terveztük elvégezni.

Eredményeink azt mutatják, hogy a $I_{\text{Cl(Ca)}}$ csökkenti a repolarizáció regionális (transzmurális és apiko-bazális) és időbeli (AP hossz rövid távú variabilitása) heterogenitását, ami arra utal, hogy az áramnak antiaritmiás szerepe van. Sem a négyszög impulzusokkal rögzített $I_{\text{Cl(Ca)}}$ sűrűség, sem a TMEM16A és a Bestrophin-3 fehérjék normalizált expressziója nem különbözött szignifikánsan a különböző eredetű vizsgált sejtek között. A szubepikardiális sejtekben az APVC-vel mért $I_{\text{Cl(Ca)}}$ sűrűség nagyobb volt, mint a szubendokardiális sejtekben, valószínűleg az LTCC-k által a szubepikardiális AP-k során bekövetkező nagyobb Ca^{2+} beáramlás miatt.

Méréseink bizonyították a BAPTA-AM I_{Kr} gátló hatását kamrai szívizomsejtekben.

Kísérleteink megmutatták, hogy a 9-phenanthrol kutya kamrai szívizomsejtekben nem tekinthető szelektív TRPM4 csatorna gátlószernek. Ennek következtében a 9-phenanthrol TRPM4 gátlószerként való használata csak expressziós rendszerekben célszerű, natív szívizomsejtekben nem.



Nyilvántartási szám: DEENK/306/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Veress Roland
Neptun kód: YPSJU9
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056829

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Horváth, B., Szentandrassy, N., **Veress, R.**, Baranyai, D., Kistamás, K., Almássy, J., Tóth, A., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P.: Effect of the intracellular calcium concentration chelator BAPTA acetoxymethyl ester on action potential duration in canine ventricular myocytes.
J. Physiol. Pharmacol. 69 (1), 99-107, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.26402/jpp.2018.1.11>
IF: 2.544
2. **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
3. Hegyi, B., Horváth, B., Váczi, K., Gönczi, M., Kistamás, K., Ruzsnavszky, F., **Veress, R.**, Izu, L. T., Chen-Izu, Y., Bányász, T., Magyar, J., Csernoch, L., Nánási, P. P., Szentandrassy, N.: Ca²⁺-activated Cl⁻ current is antiarrhythmic by reducing both spatial and temporal heterogeneity of cardiac repolarization.
J. Mol. Cell. Cardiol. 109, 27-37, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.06.014>
IF: 5.296





További közlemények

4. Kristóf, E., Klusóczki, Á., **Veress, R.**, Shaw, A., Combi, Z., Varga, K., Győry, F., Balajthy, Z., Bai, P., Bacsó, Z., Fésüs, L.: Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning.
Exp. Cell Res. 377 (1-2), 47-55, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.02.015>
IF: 3.329 (2018)
5. Horváth, B., Szentandrassy, N., **Veress, R.**, Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Tóth, A., Papp, Z., Nánási, P. P.: Frequency-dependent effects of omecamtiv mecarbil on cell shortening of isolated canine ventricular cardiomyocytes.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 390 (2), 1239-1246, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/doi: 10.1007/s00210-017-1422-z>
IF: 2.238

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,448

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,881**

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, 2019.09.02.

