

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A szívizom nátriumáramainak faj-, és káliumáramainak  
 $\beta$ -adrenerg függése**

Dr. Kovács Zsigmond Máté

Témavezető: Prof. Dr. Bányász Tamás



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025



# **A szívizom nátriumáramainak faj-, és káliumáramainak $\beta$ -adrenerg függése**

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

Írta: Dr. Kovács Zsigmond Máté okleveles orvosdoktor

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

Témavezető: Prof. Dr. Bányász Tamás, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Koncz István, PhD  
Dr. Papp Ferenc, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora  
tagok: Dr. Koncz István, PhD  
Dr. Papp Ferenc, PhD  
Prof. Dr. Lengyel Csaba, PhD  
Dr. Fagyas Miklós, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület  
tanterme

2025. április 11. 13 óra

## Bevezetés

A szívizomsejtek működését koordináló ioncsatornák pontos szabályozása mindmáig széleskörben kutatott téma. Ugyan az évek során rengeteg ezzel kapcsolatos megfigyelés született, azonban továbbra is rengeteg megválaszolatlan kérdés maradt a szívizomsejtek elektromos tevékenységével kapcsolatban. Egy érdekes tény például, hogy bár minden gerinces faj kamrai izomzatában, esetenként jelentős eloszlásbeli különbségekkel, de ugyanazok az ionáramok alakítják ki a sejtek működéséhez nélkülözhetetlen akciós potenciált, az egyes ionáramok profilja és kinetikája a kutatásra használt modellállatok között is jelentős eltéréseket mutatnak. Emiatt a legtöbb szívelektrofiziológiában használt modellből nyert eredményeket csak megfelelő mérlegeléssel használhatjuk farmakológiai vizsgálatokra. Éppen ezért szükséges a különböző modellek egymáshoz, és főleg az emberi szívizomsejtekhez hasonlítása. Emellett az akciós potenciált kialakító áramok nem csak fajok között térnek el, de egyeden belül is, bizonyos ingerek hatására, vagy funkcionális állapottól függően megváltozhatnak. Az egyik legfőbb befolyásoló tényező a szívizom  $\beta$ -adrenerg szabályozása. Ugyan a szívizomsejtek membránján kialakuló akcióspotenciál és az azt létrehozó nátrium, kálium, kalcium és klorid áramok tulajdonságai már részletekbe menően leírásra kerültek és azt is tudjuk, hogy a szívizom egészére hogyan hat a  $\beta$ -adrenerg útvonal aktivációja, de ennek a pontos molekuláris hátterét továbbra is homály fedi. Az előbb leírtak okán, disszertációm két kutatási téma köré építettem fel. Egyrészt, munkám során összehasonlítottam a szívizomsejtek egyik fontos depolarizáló áramának, a késői nátrium áramnak a tulajdonságait három gyakran használt modellben, kutya, nyúl és tengerimalac szívizomsejtekben. Emellett vizsgáltam a kutya kamrai szívizomsejtek két, terminális repolarizációban létfontosságú káliumáramának a késői egyenirányító káliumáram gyors komponensének, és a befelé egyenirányító káliumáramnak a változását  $\beta$ -adrenerg serkentés, és a  $\beta$ -adrenerg jelátvitel két fő útvonalának, a kalcium-kalmodulin függő protein kináz II-nek (CaMKII) és a protein-kináz A-nak (PKA) a gátlása mellett is.

## Irodalmi áttekintés

### A balkamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és ionáramai

Az élő sejtek membránjának extra- és intracelluláris oldalai között potenciálkülönbség van, ezt nyugalmi membránpotenciálnak hívjuk, melynek értéke sejtípusonként eltérő. Emellett egyes sejteken bizonyos ingerek hatására ioncsatornák nyílhatnak meg, melyek térben és időben összehangolt működésükkel megváltoztatják a membránpotenciált, akciós potenciált kialakítva. Ezen sejtek az ún. ingerlékeny sejtek, mint pl. a szív bal kamrájának izomsejtjei is.

A kamrai szívizomsejteken kialakuló AP-t öt fázisra (0-4. fázis) oszthatjuk fel. A fázisokat különböző ionáramok alakítják ki, és tartják fent. Az ionáramok AP alatti lefutását alapvetően az aktuális membránpotenciál, és a csatornák áteresztőképessége, vagyis konduktanciája határozza meg. A csatornák konduktanciájának változása kóros állapotokban az ionáramok nagyságának változásához, így az AP alakjának módosulásához vezet, ami különböző szívritmuszavarok formájában nyilvánulhat meg.

A 0. fázis elején a membrán depolarizálódásának hatására gyors feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  csatornák nyílnak meg, kialakítva a korai nátriumáramot ( $I_{\text{Na,early}}$ ), és létrehozva az AP felszálló szárát. Ekkor a membránpotenciál 0 mV fölé emelkedik, ezzel aktiválva az AP további fázisaiért felelős áramokat.

Az 1. fázis egy rövid, részleges repolarizáció, amit a tranziens kifelé irányuló áram két (egy kálium és egy klorid áram) komponense ( $I_{\text{to1}}$  és  $I_{\text{to2}}$ ) hoz létre. A fázis végére aktiválódik az L-típusú kalcium áram ( $I_{\text{Ca,L}}$ ), megakadályozza a teljes repolarizációt, esetenként ismét depolarizálja a sejtmembránt.

A 2. fázis során, amit platónak is nevezünk, a  $I_{\text{Ca,L}}$  továbbra is aktív, ekkor éri el áramsűrűségének maximumát. A késői káliumáramok áramsűrűsége ekkorra éri el maximumát. Mivel a kálium és kalcium ionok egyensúlyi potenciálja jelentősen eltér az ekkor aktuális membránpotenciáltól, így nagyjából egyenlő mennyiségű töltés áramlik a membránon keresztül, ezért nincs kifejezett de- vagy repolarizáció az AP ezen szakaszán. Ebben a fázisban az inaktiválódott nátrium-csatornák egy része zárt állapotba kerül. Ezek a csatornák a jelenleg depolarizált membrán hatására újra megnyílnak, ezzel kialakítva a késői nátriumáramot ( $I_{\text{Na,late}}$ ). Ilyenkor aktív a nátrium-kalcium csereáram forward módja is ( $I_{\text{NCX}}$ ), ami a sejtben felgyűlt kalcium extracelluláris oldal felé történő eltávolításáért felel.

A 3. fázisra a  $I_{Ca,L}$  inaktiválódik, így a késői egyenirányító káliumáram gyors (rapid) és lassú (slow) komponensei ( $I_{Kr}$ ;  $I_{Ks}$ ) valamint az újra emelkedő aktivitású, egyébként a nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős befelé egyenirányító káliumáram ( $I_{K1}$ ) repolarizálja a sejtmembránt. A késői egyenirányító káliumáram az előbbi kettő mellett rendelkezik egy harmadik, ultragyors komponenssel is ( $I_{Kur}$ ), de ez csak pitvari szívizomsejteken jelenik meg.

A 4. fázis az elektromos diasztole szakasza, amit a  $I_{K1}$  hoz létre és tart fenn, a nyugalmi membránpotenciál, ami szívizomsejtek esetében -80 mV körüli.

### **A szívizom $\beta$ -adrenerg szabályozása**

A szervezetet érő stresszhatásokhoz a szív szövetei elsősorban a szimpatikus idegrendszer aktivitásának hatására alkalmazkodnak. A  $\beta$ -adrenerg stimuláció a szívizomsejteken G-fehérje kapcsolt 7-transzmembrán receptorok szupercsaládjába tartozó adrenerg receptorokon keresztül jön létre. Szívizomsejteken  $\alpha_1$  és a  $\beta$  receptorok több alcsoportja található meg, a  $\beta$ -receptorok jóval nagyobb arányban, mint az  $\alpha_1$  receptorok.

A  $\beta$ -receptorok Gs fehérjéken keresztül növelik a sejtek adenilát-cikláz aktivitását. Emellett aktiválják még a foszfolipáz C/foszfokináz C (PLC/PKC), a CaMKII, az EPAC és a PI3K útvonalakat, és befolyásolják a NO szintázokat, és a TGF- $\beta$  szignalizációt is.

A  $\beta$ -receptorok a cAMP/PKA útvonalat a sejt adenilátcikláz aktivitásának növelésén keresztül serkentik. Ennek következtében megnő az intracellulláris cAMP szint, ami pedig aktiválja a protein kináz A (PKA) enzimet. Foszforilációval aktiválja többek között a szívizomsejtek SR membránjának rianodin receptorát ( $RyR_2$ ), ezzel növelve a sejtek citoplazmájának kalciumtartalmát. Emellett gátló hatással van a  $\beta_2$ -receptorokra, de a  $K_v1.4$ , 4.2 és 4.3 csatornafehérjék foszforilálásával csökkenti az  $I_{to}$  áramot is.

A széleskörben alkalmazott  $\beta$ -receptor agonista, az isoproterenol nagy koncentrációban (1  $\mu$ M) alkalmazva csökkenti a tengerimalac kamrai szívizomsejtek és kutya purkinje sejtek  $I_{K1}$  áramát, viszont kis koncentrációt (10 nM) alkalmazva növelte azt rágcsáló szívizomsejteken. A PKA útvonal szerepe nem teljesen tisztázott az  $I_{K1}$  áram befolyásolásában.

Kutya szívizomsejtek  $I_{Kr}$ -ét az ISO és a PKA-aktivátorok növelték, amely hatás PKA-inhibitorok jelenlétében megszűnt. Ezzel összhangban, az ISO és az adenilát-cikláz aktivátor forskolin növelte az  $I_{Kr}$ -t tengerimalac szívizomsejtekben. Ezen hatásokat mind a PKA, mind a PKC gátlása, valamint az  $[Ca^{2+}]_i$  BAPTA-AM vagy nifedipin általi csökkentése befolyásolta. Ezzel szemben mind a  $\beta_1$ -receptor-aktiválás, mind a foszfodiészteráz-gátlás csökkentette az  $I_{Kr}$ -t PKA-függően tengerimalac-miocitákban.

Fiziológias esetben az emberi kamrai izomsejtekben a  $\beta$ -adrenerg hatás ezen, és a később tárgyalt PLC jelátviteli útvonalon keresztül serkenti az  $I_{Ks}$ -t, az  $I_{K1}$ -et és az  $I_{Kr}$ -t is, bár ez a hatás ebben a sorrendben egyre kisebb. Az is leírásra került, hogy szívelégtelenség modellben a mindhárom káliumáramot érintő serkentő hatás szinte eltűnik, ezzel jelentősen csökkentve a szívizomsejtek repolarizációs rezervért. Hatással van továbbá a  $Na_v$  csatornákra is, növeli az általuk kialakított  $I_{Na,late}$ -et.

A foszfolipáz C (PLC) aktiválásával a  $\beta$ -receptorok a sejtmembrán foszfoinozitol-biszfoszfát ( $PIP_2$ ) tartalmát alakítják diacil-glicerollá (DAG), és inozitol-1,3,5-trifoszfáttá ( $IP_3$ ). Ez a két termék együttesen aktiválja a protein kináz C-t (PKC), valamint növeli a  $[Ca^{2+}]_i$ -t, ami szintén PKC aktivitást növel. Egészséges szívizomban a PKC elsősorban a kontraktilitást szabályozza, de aktivitása megnő több szívizombetegségben.

Fontos még kiemelni emellett az EPAC („Exchange Protein directly Activated by cAMP”) útvonalat is. A fehérjét, nevéből adódóan a cAMP aktiválja. A PKA és PKC útvonalakat serkenti, emellett az SR-ek SERCA, és  $RyR_2$  pumpáit is, ezzel finomhangolva a sejtek kalcium homeosztázisát.

### **A kalcium szerepe a szívizomsejtek működésében**

A kalcium kiemelt szereppel bír az izomszövetek minden fajtájában, így a szívizomban is. Azt a folyamatot, melynek során a szívizomsejteket stimuláló elektromos jel mechanikai válasszá alakul, excitációs-kontrakciós kapcsolatnak nevezzük. Az AP kialakításához és az azzal egyidőben létrejövő kontrakció létrehozásához szükséges kalcium nagyjából 30%-a az extracelluláris térből származik, és az  $I_{Ca,L}$ , valamint az  $I_{NCX}$  reverse módja révén jut be a sejtbe. A maradék 70% az izomsejtek szarkoplazmaltikus retikulumából (SR) szabadul fel a növekvő  $[Ca^{2+}]_i$  hatására, a SR rianodin receptorain ( $RyR_2$ ) keresztül. Ezt hívjuk kalcium indukálta kalcium felszabadulásnak (CICR). Hogy az aritmiához vezető kalcium túltöltődés ne jöjjön létre, a növekvő  $[Ca^{2+}]_i$  inaktiválja az  $I_{Ca,L}$ -t. A sejtek relaxációjához azonban el kell távolítani a beáramlott, illetve felszabadult kalciumot a sejtplazmából. Ilyenkor a kalcium 70%-a ismét az SR-ben kerül eltárolásra az SR kalciumpumpáján (SERCA) keresztül, míg a maradék 30% az extracelluláris térbe kerül visszapumpálásra az  $I_{NCX}$  forward módján, és egyéb kalciumpumpákon át.

A korábban tárgyalt szimpatikus aktiváció is megemeli a  $[Ca^{2+}]_i$ -t. A  $Ca^{2+}$  ionok többféle úton keresztül közvetíthetik a szimpatikus aktiváció hatását a szív szöveteiben: közvetlenül, a  $Ca^{2+}$ -kötő fehérjékkel, például a kalmodulinnal komplexeket alkotva, és/vagy más  $Ca^{2+}$ -érzékeny szabályozó utakon keresztül (leggyakrabban a CaMKII).

Az L-típusú kalciumáramnak az AP létrehozásában betöltött szerepéről dolgozatomban korábban már írtam. A kalcium emellett a szívizomsejtek egyéb ionáramait is befolyásolják. A  $\text{Na}_v1.5$  csatornákon például mind kalcium mind CaM kötőhely található. Egyes munkacsoportok azt találták, hogy a kalcium önmagában is megváltoztathatja a csatorna működését, míg mások arra a következtetésre jutottak, hogy erre csak a  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM komplex képes. A direkt hatások mellett a  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM komplex a CaMKII aktiválásával is befolyásolja a  $\text{Na}_v$ -csatornákat. Az aktív CaMKII egy ser/thr kináz, ami legalább három helyen képes foszforilálni a  $\text{Na}_v1.5$  csatornákat.

Hasonlóan, a kalcium a CaM-CaMKII útvonalon hat a szívizomsejtek káliumáramaira. Míg akutan a korábban leírt  $\beta$ -adrenerg stimulációra növeli mind az  $I_{Ks}$  mind az  $I_{K1}$  amplitúdóját, addig a CaMKII krónikus aktivitása csökkenti mind az  $I_{Ks}$ , mind az  $I_{K1}$  áramokat létrehozó csatornák expresszióját, ezzel magukat az áramokat is.

### A késői nátriumáram ( $I_{\text{Na, late}}$ )

#### **A feszültségfüggő nátriumcsatorna**

Az emlősök szívében több  $\text{Na}_v$  izoforma is megtalálható, amelyek mind más feszültségérzékenységgel, kinetikával, vezetőképességgel és gyógyszerérzékenységgel bírnak. A szív szöveteinek nagyrésztében a  $\text{Na}_v1.5$  a leggyakoribb pórusképző alegység. Míg ez az izoforma nem érzékeny a legszélesebb körben hatékony nátriumcsatorna gátlószerre, a tetrodotoxinra (TTX), más TTX érzékeny  $\text{Na}_v$ -csatornák is megtalálhatóak a szíven. Az szív ingerületképző és vezető szöveteiben legsűrűbben a  $\text{Na}_v1.1$  és  $\text{Na}_v1.6$  izoformák találhatóak meg. A csatornák pórusformáló alegységéhez kapcsolódó járulékos fehérjék is módosíthatják az adott csatorna feszültségfüggését és kinetikáját.

A szív munkaizomzatában a sejtmembrán depolarizálójának hatására néhány milliszekundumnyi időre a feszültségfüggő nátriumcsatornák megnyílnak, ezzel létrehozva a korai nátriumáramot ( $I_{\text{Na, early}}$ ), ami a munkaizomsejtek akciós potenciáljának (AP) felszálló szárát alakítja ki. Megnyílásuk után ezek a nátriumcsatornák gyorsan inaktíválódnak, azonban az AP időtartama alatt egy részük visszatérhet zárt állapotba, és újra megnyílnak, vagy bizonyos esetekben a csatorna inaktiváció teljesen elmaradhat. A nátriumcsatornák így egy elnyújtott, késői nátriumáramnak ( $I_{\text{Na, late}}$ ) nevezett áramkomponenst hoznak létre, ami az AP plató fázisa alatt aktív.

## A $I_{Na,late}$ -et létrehozó mechanizmusok

A  $I_{Na,late}$ -et létrehozó mechanizmusok közül az egyik széleskörben elfogadott elmélet az ablak áram („window-current”). A „window-current” alapja az, hogy a  $Na_v$ -csatornák aktivációs és inaktivációs feszültségfüggés-tartományai átfednek egymással, ami lehetőséget biztosít arra, hogy a csatornák az inaktív állapotból újra nyitható, zárt állapotba lépjenek. Fiziológiás körülmények között, egészséges szívizomsejtekben ez a jelenség minimálisan járul hozzá a  $I_{Na,late}$ -hez. Bizonyos betegségekben ez a feszültségablak jelentősen megváltozhat.

A  $I_{Na,late}$ -ért jóval nagyobb mértékben felelő mechanizmus a feszültségfüggő nátriumcsatornák különböző kapuzási módjain alapul. Single-channel mérések sorozatával háromféle módját írták le a  $Na_v1.5$  kapuzásának a szív kamrai szöveteiben. Ezek az átmeneti [transient (TM)], a kitörés [burst (BM)] és a késői szórt [late scattered (LSM)] mód. Míg a  $I_{Na,early}$ -t jórészt a TM hozza létre, a  $I_{Na,late}$  kialakítását a másik két mód, a BM és a LSM a felelős. Ezek közül is főként az LSM, mivel a BM nyitások száma gyorsan csökken a membrán depolarizációja után.

A fentiek mellett egyéb tényezők is szerepet játszhatnak a  $I_{Na,late}$  kialakításában. Ilyen például a csatornák nem-egyensúlyi kapuzása („non-equilibrium gating”), ahol a sejtmembrán „feszültség-előzménye” idézi elő a nátriumcsatornák állapotai közötti átmenetek változása miatt. Egy másik tényező, hogy az áram kialakításában több  $Na_v$  izoforma is részt vesz.

## A késői nátriumáram szerepe a szív elektromos aktivitásában

Bár korábban alacsony áramsűrűsége miatt megkérdőjeleződött a  $I_{Na,late}$  szerepe az AP kialakításában, mivel a plató fázis fenntartásáért apró ki- és befelé irányuló áramok egyensúlya felel, és még egy kis elváltozás is jelentősen megváltoztathatja az AP időtartamát, ezért a fontossága nem elvethető. Az áram gátlása jelentősen lerövidíti az AP-t a szív ingerületvezető rendszerében, valamint a kamrai izomsejtekben. AP feszültség clamp kísérletek bizonyították, hogy az áram sűrűsége összeegyeztethető nagyságrendű a főbb káliumáramokéval tengerimalac és nyúl kamrai izomsejteken. Munkacsoportunk egy korábbi kutatása során azt is leírta, hogy a kutya, a tengerimalac, valamint az emberi szívizomsejtek  $I_{Na,late}$ -jének alakja között milyen karakterisztikus különbségek vannak.

Befelé irányuló áramként az  $I_{Na,late}$  depolarizálja a membránt, magasan tartja a membránpotenciált az AP plató fázisa alatt, ezzel nyújtja magát az AP-t. Minél több ideig van a membrán depolarizált állapotban, +40 mV felett, annál nagyobb az esélye, hogy az L-típusú Ca-csatornák meg- vagy újranyíljanak. Emiatt a hosszabb AP elkerülhetetlenül nagyobb  $Ca^{2+}$  beáramlással jár az izomsejtekbe.

## **A szív elektromos aktivitásának hatása a késői nátriumáramra**

Amellett, hogy a  $I_{Na,late}$  befolyásolja a szívizomsejtek akciós potenciálját és elektrofiziológiai paramétereit, úgy ennek a fordítottja is elmondható. Mint a szívizomsejtek legtöbb elektrofiziológiai tulajdonsága, úgy a  $I_{Na,late}$  is fordított-frekvenciafüggést mutat, tehát minél gyakoribb az ingerlés, annál kisebb lesz az áram sűrűsége. Így magasabb szívritmus mellett a  $I_{Na,late}$  egyre kevésbé járul hozzá a  $Na^+$  beáramláshoz is. Magasabb szívfrekvenciánál az AP is rövidül, ami miatt az  $I_{Na,late}$  rövidebb ideig aktív, ezzel is tovább csökkentve a  $Na^+$  ezen az úton történő sejtekbe áramlását. Csökken azonban a  $Na^+$  eltávolítása is, mivel a megnőtt frekvencia csökkenti az NKP aktivitását, így egy frekvenciafüggő  $Na^+$  túltöltést kialakítva izolált sejteken. Ez a jelenség ritkán fordul elő viszont  $\beta$ -adrenerg stimuláció hatására, mivel az foszfolemmánal növeli a  $Na^+/K^+$  pumpa (NKP) aktivitását, így serkentve a nátrium ezen útvonalon történő eltávolítását.

### **A késői egyenirányító káliumáram gyors komponense ( $I_{Kr}$ )**

#### **A feszültségfüggő káliumcsatornák**

Ahogy dolgozatomban korábban említettem, a késői egyenirányító káliumáram három komponensből ( $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$  és  $I_{Ks}$ ) áll. Bár a csatorna alegységeket felépítő fehérjék egyediek az egyes áramokra, ezzel kialakítva az eltérő áramkinetikákat, a szerkezeti felépítésük azonos. A csatorna felépítése hasonlít a feszültségfüggő nátriumcsatornához, azzal a különbséggel, hogy míg ott az egész csatornát egyetlen fehérje alkotja, itt négy azonos  $\alpha$ -alegység homotetramert alkotva alakítja ki a csatornát. Az  $\alpha$ -alegységek hat transzmembrán szegmessel rendelkeznek, és egy pórusformáló régióval, N- és C-terminálisuk intracellulárisan helyezkedik el. A feszültség szenzor az alegységek S4 szegmense, míg a  $K^+$  szelektivitásért az S5-S6 szegmenseket összekötő aminosav lánc a felelős. Az áram gyors komponensét ( $I_{Kr}$ ) kialakító ioncsatorna a  $K_v11.1$  csatornafehérjét tartalmazza. A csatorna az akciós potenciál elejét kialakító gyors depolarizáció hatására megnyílnak, majd gyorsan inaktiválódnak. Ezt egy lassú újra nyílás követ, majd a csatornák zárnak. Az ezen az AP-szakaszon megfigyelhető áramamplitúdó növekedést az okozza, hogy egyre több csatorna lép be ebbe a „körforgásba”, ezt áramakkumulációnak nevezzük.

## **Az $I_{Kr}$ elektrofiziológiai tulajdonságai**

Az áram akkor aktiválódik, amikor a membránpotenciál  $-40$  mV-nál pozitívabbá válik. Amplitúdója  $0$  mV-nál éri el a maximumot, ennél pozitívabb membránpotenciál értékeknél az áramsűrűség csökken. Az áram befelé egyenirányító tulajdonságáért a  $K_v1.1$  korábban említett kapuzási kinetikája a felelős. Az áram az AP elején történő depolarizáció hatására aktiválódik ugyan, de pozitív membránpotenciál miatt szinte azonnal inaktiválódik is, így az AP plató fázisa alatt nincs repolarizáló hatása. Ahogy azonban a kalciumcsatornák záródása következtében a membránpotenciál ismét megközelíti a  $0$  mV-t, a csatornák újra nyílnak. Az áram ekkor a repolarizáció fő hajtóerejét képezi, a terminális repolarizáció elindításáért felel. Hiányában a kamra akciós potenciál jelentősen megnyúlik, ezzel szívritmuszavarok táptalaját képezve.

## **Az áram működését módosító hatások**

Az extracelluláris  $[K^+]$  elemi befolyásoló tényezője az áram aktivitásának. A  $[K^+]_e$  növekedése megnöveli az áramsűrűséget, míg a káliumszint csökkenés gátolja az áramot is, ráadásul az  $I_{Kr}$ -t létrehozó csatorna internalizációját, és lebomlását eredményezi. A szervezet acidózisa, az áram aktivációjának feszültségfüggésének módosításával, és deaktivációjának gyorsítása révén szintén csökkenti az  $I_{Kr}$  sűrűségét. A kétértékű kationok szintén gátolják az áram működését. Az áramnak létezik több szelektív gátlószere is, például az E-4031, a d-Sotalol, és a Dofetilid is. Emellett olyan egyéb szervrendszerekre ható gyógyszereknek is van  $I_{Kr}$  gátló hatása, mint az antipszichotikum Haloperidol, vagy az antivirális Dasabuvir.

## **A befelé egyenirányító káliumáram ( $I_{K1}$ )**

### **A befelé egyenirányító kálium csatorna**

A befelé egyenirányító csatornák felépítése egyszerűbb feszültségkapuzott társaikénál. Emberben az  $I_{K1}$  áramot létrehozó csatorna fő pórusformáló fehérjéje a  $K_{ir}2.1$ , viszont a  $K_{ir}2.2$  és  $K_{ir}2.3$  alegységek is részt vesznek homo- vagy heteromerek formájában. Az  $\alpha$ -alegység két transzmembrán doménből áll, ezek között található meg a pórusformáló régió. Négy ilyen alegység képez egy funkcionáló csatornát. Tengerimalac kamrai izomsejteken négy kisebb vezetőképességű, és egy teljesen nyitott állapotát írták le a csatornának. Bár a csatorna sem ligand, sem feszültség által nem kapuzott, egyenirányító karakterisztikájáért az intracelluláris oldalhoz feszültség- és időfüggően kötődő  $Mg^{2+}$  és poliaminok (spermidin<sup>3+</sup>, spermin<sup>4+</sup>) a

felelősek, kötődésük a kifelé irányuló áramot  $-40$  mV-tól pozitívabb membránpotenciálon deaktiválja.

### **A befelé egyenirányító káliumáram működését befolyásoló tényezők**

Az  $I_{K1}$ -et létrehozó csatorna konduktanciáját növeli az extracelluláris  $[K^+]$  megemelkedése,  $Ba^{2+}$ ,  $Cs^+$  és különböző antiaritmiás farmakonok (pl. Amiodaron) gátolják a csatornát. Intracellulárisan a sejtek acidózisa, oxidatív stressz és lizofoszfátidil-kolin fejthet ki gátló hatást.

### **A kamrai szívizomsejtek ionáramainak fajok közti különbségei**

Az állatvilágban a szívizomsejtek akciós potenciáljai morfológiájukban jelentősen eltérnek. Ezek az eltérések függenek az állat testméretétől, szívritmusától, de a környezet oxigénellátottságától, és hőmérsékletétől is. Annak ellenére, hogy hatalmas eltérések léteznek a fajok között, az AP-t ugyan azok a korábban említett feszültség vezérelt ioncsatornák hozzák létre az összes emlősben. Az AP hullámformák közti különbségek hátterében elsősorban az eltérő szívritmus miatt kialakuló génextpressziós eltérések állhatnak.

Minden gerinces akciós potenciálja a 0-ik fázis gyors depolarizációjával kezdődik. Az első fázis csak emlősök és madarak esetében kifejezett, ebben az esetben is csak a kamrafal bizonyos rétegeiben. A plató fázis is formában és méretben van jelen a különböző fajok akciós potenciáljában. Míg egyes hüllők plató fázisa akár másodpercekig is tarthat, addig a legtöbb rágcsálófaj kamrai AP-ja egy gyors repolarizációval ér véget, közvetlenül az AP csúcsa után. A harmadik és negyedik fázis formája szintén univerzális, bár a nyugalmi membránpotenciál értéke szintén mutat eltéréseket a fajok között.

A nulladik fázisért, és a membránpolarizáció miokardiális terjedéséért az összes gerincesben a  $I_{Na}$  felel. A legtöbb gerinces szívében a  $Na_v1.5$  a fő pórusformáló alegység, de emlősökben (köztük emberben is) más, elsősorban idegsejteken előforduló izoformák is előfordulhatnak. Általánosságban elmondható azonban, hogy az azonos hőmérsékleten vizsgált gerinces szívizomsejtek hasonló  $I_{Na}$  áramsűrűséget mutattak. Eltér azonban a nátriumcsatornák TTX érzékenysége. Ez elsősorban a  $Na_v1.5$  gén specifikus mutációján, és a csatorna  $\alpha$ -alegység összetételén múlik.

Az emlős szívizomsejtek működéséhez a korábban részletesebben is tárgyalt kalcium indukálta kalciumfelszabadulás (CICR) elengedhetetlen. Teknősökben, és több halfajban

viszont a szívizomsejtek kontrakciója jóval inkább az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásán múlik, mintsem a CICR-en.

Az  $I_{\text{Kur}}$  az emlősökön kívül más gerincesben nem található meg, emellett a hüllő, kétéltű és hal szívizomsejteken sem találtak  $I_{\text{to}}$ , vagy egyéb gyors kinetikájú  $\text{K}^+$  áramot, annak ellenére, hogy az AP-juknak van első fázisa. Egyes rágcsálófajokban (egér, patkány, és mormota) a sejtek repolarizációját teljes egészében a gyors káliumáramok ( $I_{\text{Kur}}$ , és  $I_{\text{to}}$ ) koordinálják, ez különösen magas szívritmust tesz lehetővé.

Az  $I_{\text{Ks}}$  és  $I_{\text{Kr}}$  teljes aktivációja az őket létrehozó csatornák alcsoportbeosztásától, és a membránpolarizáció mértékétől függően akár több tíz másodpercig is eltarthat. Hal szívizomsejtekben jórészt az  $I_{\text{Kr}}$  felel a membrán repolarizációjáért, áramsűrűsége itt kifejezetten nagy. Az áram aktivációs kinetikája lassabb, inaktivációs kinetikája gyorsabb az emlős szívizomsejteken megtalálható verziójáénál. Az összes gerinces közül a hüllők  $I_{\text{Kr}}$  áramsűrűsége a legkisebb, míg a fűjékből nyert adatok alapján a madarak szívizomsejtjei jelentős denzitású  $I_{\text{Kr}}$ -rel rendelkeznek, amely sok emlőst is meghaladja. A kétéltűek jelentős áramdenzitást mutató  $I_{\text{Ks}}$ -e már régóta ismert, de halak kamrai izomsejtjein csak nemrég mutatták ki, hogy a késői egyenirányító káliumáram lassú komponense is fontos szerepet játszik az AP kialakításában.

A befelé egyenirányító káliumáram ( $I_{\text{K1}}$ ) minden gerinces szívizomsejtjén megtalálható, és a nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felel. Ennek ellenére elmondható, hogy törzsek, de még fajok között is lehetnek különbségek az áramsűrűségében, aminek filogenetikai, és az adott állat életvitelén múló okok állnak a háttérben. Halakban, főleg az fizikailag aktív fajokban a kamrai szívizomsejtek  $I_{\text{K1}}$  amplitúdója kifejezetten nagy. A hüllő és kétéltű szívek  $I_{\text{K1}}$  áramáról viszonylag kevés adatunk van. Ezzel szemben elmondható, hogy a szárnyas és emlős szívizomsejtek prominens  $I_{\text{K1}}$  árammal rendelkeznek, ami valószínűleg azért van így, mert endoterm szervezetekről van szó.

Mindezen különbségeket látva, kimondható, hogy a szívizomsejt-modellként használt állatfajok azonos ionáramainak közti különbségek vizsgálata kimondottan fontos annak szempontjából, hogy farmakológiai vizsgálatok során a kapott eredmények megfelelő súlyozással kerüljenek értelmezésre.

## Célkitűzés

### *Késői nátriumáramprofilok és konduktancia vizsgálata kutya, nyúl és tengerimalac modellen*

A késői nátriumáramot már több modellen is tanulmányozták, többek között tengerimalac, sertés, nyúl, kutya és ember szívműsejteken. Ezen vizsgálatokat jórészt hagyományos voltage clamp technikával végezték, melynek hátránya, hogy az áram fiziológias, akciós potenciál alatti alakja nem figyelhető meg. Ez a probléma kiküszöbölhető akciós potenciál voltage clamp technika használatával, viszont jelenleg kevés ezzel foglalkozó tanulmány létezik, melyek egyébként is főleg ionáram felvételeket vizsgálnak, nem foglalkozva az akciós potenciál alatt végbemenő konduktanciaváltozásokkal. Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában foglalkozott kutya és emberi szívműsejtek  $I_{Na,late}$  áramprofiljainak összehasonlításával, ám a membránon áthaladó töltés mennyiségét mi sem követtük nyomon. Így jelenlegi munkánk céljai a következők voltak:

- a késői nátriumáram profiljának ( $I_{Na,late}$ ) és konduktancia változásának ( $G_{Na,late}$ ) szimultán tanulmányozása APVC technika segítségével, három gyakran használt emlős állatmodellen (kutya, nyúl, tengerimalac)
- az akciós potenciál alakjának, mint befolyásoló tényezőnek a vizsgálata kutya szívműsejteken, eltérő fajokból származó kanonikus parancs akciós potenciált alkalmazva APVC technikával
- az Anemone toxin II (ATX-II) kialakította nátriumáram összehasonlítása a natív késői nátriumáram alakjával, és konduktanciaváltozásaival

### *A kifelé egyenirányító káliumáram, és a késői egyenirányító káliumáram gyors komponensének $\beta$ -adrenerg aktivációja a CaMKII útvonal által*

Bár az kijelenthető, hogy a szimpatikus stimuláció befolyásolja a kamrai szívműsejteknek mind az  $I_{K1}$  mind az  $I_{Kr}$  áramait, az még kétséges, hogy mi ennek a pontos módja. Emellett a képet tovább bonyolítják a PKA és a CaMKII útvonalak közti szoros összefüggése. Így kutatásunk ezen részének célja az volt, hogy elkülönítve vizsgáljuk a  $\beta$ -adrenerg aktiváció korábban említett két intracelluláris útvonalának hozzájárulását a szívműsejtek két káliumáramának szabályozásában.

## Anyagok és módszerek

### Kamrai szívizomsejtek izolálása

A kutatómunka során munkacsoportunk kutyák, tengeri malacok és nyulak szívéből izolált izomsejteket használt.

A kutyák esetében kísérleti célra tenyésztett, 10-12 hónapos, ivarérett beagle kutyák szívének bal kamrájából izolált szívizomsejteken dolgoztunk. Az állatok túllátatásához ketamin-hidroklorid és xylazine-hidroklorid kombinációját alkalmaztuk. Miután meggyőződünk az altatás megfelelő mélységéről, megnyitottuk az állat mellkasát, majd a lehető leggyorsabban kiemeltük a szívet. Ezt követően a szervet a benne lévő vér nagyrészeinek eltávolítása céljából Tyrode oldatban átmostuk. Ez után a szívizomsejtek szívből történő kinyeréséhez az úgynevezett anterográd szegment-perfúziós módszert használtuk. Ezen technika során a szív bal első leszálló koszorúérét (LAD) kanuláltuk, majd az ér vérellátási területének megfelelően Langendorff apparátus segítségével perfundáltuk a szív izomzatát.

Az izolálás első fázisában, az első 5 percben módosított JMM oldatot használtunk a szív megmaradt vér és  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmának eltávolításához. Ezt követően, a második fázisban az eddigi perfundáló oldatot lecseréltük kollagenázzal, és borjú albuminnal kiegészített JMM oldatra, mellyel a szív méretétől függően, 30-45 percig folytattuk a perfúziót.

Az emésztés befejezése után a kanulált ér ellátási területének megfelelően U-alakú metszést ejtettünk, nagyjából a bal kamrafal midmiokardiális rétegének szintjében, ezzel szabaddá téve az elfolyósodott szövetet, melyet az izolálás első fázisában alkalmazott,  $\text{Ca}^{2+}$ -mal kiegészített JMM-oldatba fogtunk fel, és szuszpendáltunk. Az izolálás utolsó fázisában ezt a sejtsuszpenziót 4 cikluson keresztül ülepítettük (ciklusonként 9 percig), majd egyre növekvő rácssűrűségű szűrővel szűrtük, és ciklusonként növekvő  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú JMM-oldattal mostuk. Ezt követően további 2 cikluson keresztül mostuk a sejteket MEM oldattal, szűrés nélkül.

Az izolálás után a sejteket az előbb említett MEM oldatban  $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A méréseket leghamarabb 2-3 órával az izolálás vége után kezdtük mérésre használni. Ekkor a sejtek 2/3-ada volt téglalap alakú, ép és éles szélű, valamint megtartott harántcsíkolatú.

A tengerimalacok, és nyulak esetében a sejtizolálás menete hasonló volt. Az állatok véralvadását először heparinnal gátoltuk, majd nembutállal altattuk. A megfelelően mély altatás beállása után az állatok szívet kiemeltük a mellkasukból, majd az aortánál fogva, Langendorff apparátusra rögzítve retrográd perfúzióval standard enzimátikus izolálást hajtottunk végre. A

szíveket előbb 5 percig mostuk oxigenizált Tyrode oldattal. Ezt követően kettes-típusú kollagenázzal, és proteázzal kiegészített,  $\text{Ca}^{2+}$  mentes Tyrode oldattal folytattuk a szervek perfúzióját 3 percig. Ez után a szívek bal kamráját felaprítottuk, és az így kapott darabokat további 1 órán keresztül a korábban említett enzimes oldatban inkubáltuk. Ez után a kinyert sejteket bikarbonátot tartalmazó Tyrode oldatban tároltuk felhasználásukig.

Az alkalmazott módszerek összhangban voltak mind a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publication No 85-23. revised 1996) mind pedig a Helsinkai Deklaráció alapelveivel, emellett a kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (No. 51-57/1997 OEJ) (9/2015/DEMÁB).

### **Elektrofiziológia**

A mérések megkezdése előtt a szívizomsejteket egy invertált tárgyasztalán helyet foglaló, 1 ml térfogatú, hőmérséklet szabályzó által fűthető plexiüveg mérőkádba helyezük, ami egy Faraday-kalitkában lévő antivibrációs asztalon foglal helyet. A sejteket a korábban említett bikarbonátot tartalmazó, módosított Tyrode oldattal perfundáljuk, egy gravitáció hajtotta perfúziós rendszerrel.

A mérések során 2-3 M $\Omega$  ellenállású mikroelektrodákat (patch pipetta) használtunk, melyeket boroszilikát üvegapillárisból készítettünk pipettahúzó segítségével. Az ionáramok méréséhez használt patch pipetta belső oldatát bizonyos méréseinknél különböző hatóanyagokkal egészítettük ki.

A mérések kivitelezéséhez a patch pipettákat ezüstklorid elektródra húztuk, amely egy fejegységhez kapcsolódik, ami a sejtek elektromos analóg jeleit vezeti el. Ez a fejegység egy három irányba mozgatható mechanikus makro- valamint piezoelektromos mikromanipulátorhoz rögzül, ezek segítségével közelítjük, és érintjük meg a sejteket a patch pipettával.

Az ionáramok MultiClamp 700B erősítőn keresztül, Digidata 1440A készülékkel végzett analóg-digitális konverzió után kerülnek rögzítésre a számítógépen pClamp 10.0 szoftver használatával.

A mérések megkezdéséhez a sejteket mikroszkóp alatt megközelítjük, majd megérintjük a patch pipetta hegyével. Ekkor gyenge szívást alkalmazunk, ezzel csökkentve a pipettában lévő nyomást, melynek hatására a sejt membránjának a pipetta hegyéhez érő része betüremkedik a pipettába. Ekkor egy nagy ellenállású (1-10 G $\Omega$ ) kapcsolat alakul ki a pipetta és a sejt között. Ha létrejött ez az úgynevezett „gigaseal”, hirtelen szívással, vagy fújással áttörjük a sejt

pipettában lévő membránrészletét, így kialakítva a patch-clamp technika teljesesjtes elrendezését. Ez után először, egy 15 ms hosszú, +10 mV-ról -10 mV-ra váltó, hiperpolarizáló áramimpulzussal meghatároztuk a sejtek membránjának kapacitását, amely a sejtmembrán felületével arányos. Erre azért van szükség, mert a mért ionáramokat a sejtek membránjának kapacitására történő normalizálásával kiküszöbölhetjük a sejtek méretkülönbségéből adódó eltéréseket. A sejtmembrán kapacitásának meghatározása után, a mérőrendszert áram-clamp módba állítva, a sejteket DS-R3 impulzus generátor által létrehozott 2 ms széles, 700 ms ciklushosszú négyszögimpulzusokkal ingerelve felvettük a szívizomsejtek akciós potenciálját (AP). Erre a sejtek transzmurális eredetének meghatározása érdekében van szükség, amire az AP alakjából lehet következtetni. Ezek után kezdődhet az ionáramok felvétele.

### **Ionáram mérés konvencionális feszültség clamp módszerrel**

Az  $I_{K1}$   $\beta$ -adrenerg függésének vizsgálatához konvencionális feszültség clamp technikát is alkalmaztunk. Ennek kivitelezéséhez a patch clamp teljes sejtes elrendezésének kialakítása után a sejteket 250 ms hosszú tesztimpulzusokkal ingereltük, az  $I_{Kr}$  és  $I_{Ks}$  áramok farmakológiai gátlása után. A tesztimpulzusok amplitúdója -80 mV-tól +20 mV-ig terjedt, tartópotenciálnak -80 mV-ot alkalmaztunk.

### **Ionáram mérés akciós potenciál feszültség clamp módszerrel (APVC)**

Az ingerlékeny sejtek AP-jának kialakításában résztvevő ionáramok vizsgálatára az akciós potenciál feszültség-clamp technika (action potential voltage-clamp, APVC) a legalkalmasabb. Méréseink során, az APVC technika kivitelezéséhez feszültségparancsként vagy egy korábban, másik sejtről rögzített, az átlagos paramétereket legjobban megközelítő, kanonikus akciós potenciált alkalmaztunk, vagy pedig a sejt saját akciós potenciálját használtuk. Így stimulálva a sejteket a mért referencia áram a saját AP használatakor nulla, mivel ilyenkor egyáltalán nincs szükség áramra az erősítőtől, a kanonikus akciós potenciál használatakor pedig közel nulla, mivel ilyenkor a sejteknek alig van szüksége az erősítőtől kapott áramra a saját AP-jának fenntartásához. A referenciaáram felvételét követően a vizsgálni kívánt ionáram gátlószert a perfúziós oldathoz adva blokkoljuk az adott ionáramot létrehozó csatornát. Az így kieső áramot a sejt AP-jának fenntartása érdekében az erősítőnek kell pótolnia, amit kompenzációs áram formájában kerül rögzítésre. Mérést követően, az analízis során a kompenzációs áramot kivonva a referencia áramból megkapjuk az általunk gátolt

ionáramot. A nátriumáramok definiálásához a perfúziós oldathoz tetrodotoxint (TTX, 10  $\mu$ M), vagy Anemone toxin II-t (ATX-II, 1, 10 nM) adtunk. A kalciumáram szerepének vizsgálata céljából az L-típusú kalciumcsatorna blokkoló nizoldipin-t (1  $\mu$ M) használtuk. Minden gátlószer esetében megvártuk a farmakológiai hatás stabilizálódását (4-5 perc), majd az áramjel ekkor regisztrált utolsó 20 ciklusának átlagát tekintettük a kompenzációs áramnak a mérési műtermékek, illetve a ciklusok közti különbségek kiküszöbölése céljából, végül ezt vontuk ki a referenciaáramból.

### **A „hagymahámozás” (onion-peeling) módszer**

Egy sejt több ionáramának vizsgálatára az APVC technika, „onion-peeling módszer” nevű változata alkalmazható. Ebben az esetben tulajdonképpen a sejtek kezdeti perfúziós oldatához kumulatíván, egyre több különböző ioncsatorna specifikus gátlószerét adjuk. Fontos azonban a használt gátlószer sorrendje, a legspecifikusabbtól (pl.: E4031) a kevésbé szelektív hatóanyagig (pl.:  $\text{BaCl}_2$ ) kell haladjunk, hogy a legpontosabb eredményeket kaphassuk. Ez alapján, a szívizomsejtek kifelé irányuló ionáramain végzett kísérleteink során a mért áramok sorrendje a következő volt:  $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{Ks}}$ ,  $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{K1}}$ . Minden farmakon esetében hatásának stabilizálódásáig perfundáltuk a sejtet az adott oldattal (4-5 perc). Az adott oldat perfúziója során felvett áramjelek utolsó 20 ciklusának átlagát tekintettük kompenzációs áramnak, majd kivontuk a referenciaáramból, ami ilyenkor mindig az előzőleg alkalmazott anyag kompenzációs árama (kivéve az első alkalmazott anyag esetében), így megkaptuk az adott gátlószer szenzitív áramát.

### **Statisztika**

A dolgozatban szereplő adatokat a mérési eredmények átlaga  $\pm$  SE-ben fejeztük ki. A különbségek statisztikai szignifikanciáját egyutas ANOVA-val értékeltük melynél posthoc tesztként Tukey tesztet végeztünk. A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p érték 0.05-nél kisebbnek adódott.

## Eredmények

### *A késői nátriumáram konduktancia és áram-profil változásai kutya, nyúl és tengerimalac szívizomsejteken*

#### **Natív $I_{Na,late}$ profilok kontroll körülmények között**

Kutatásunk elején kutya, nyúl és tengerimalac szívizomsejteken vizsgáltuk a késői nátriumáram alakját és konduktanciáját. A konduktancia számolásánál a  $I_{Na,late}$  értékeit elosztottuk a  $Na^+$  ionokra ható hajtóerővel, amit az aktuális membránpotenciálnak és a  $Na^+$  ekvilibrum potenciáljának különbségként írtuk le (ami +85.3 mV-nak adódott, aminek számolásához a következő értékeket vettük alapul:  $[Na^+]_e = 146$  mM,  $[Na^+]_i = 6$  mM,  $T = 310$  K). Az  $I_{Na,late}$  áramsűrűsége nagyjából állandó volt az AP plató fázisa alatt, ám a 3-adik fázisban, a sejtmembrán repolarizációja alatt lecsökkent kutya és nyúl miocitákban. Ezen méréseknél a  $G_{Na,late}$  végig egyenletesen csökkent. A tengerimalac sejtek AP-jának plató fázisa alatt az  $I_{Na,late}$  folyamatosan nőtt, míg a  $G_{Na,late}$  változatlan maradt.

Ahhoz, hogy az egyedi eredmények összehasonlíthatók legyenek, az  $I_{Na,late}$  és  $G_{Na,late}$  értékeket normalizáltuk az időtengelyen elfoglalt helyük alapján, ahol az AP-k repolarizációjának 90%-ánál mért időt ( $APD_{90}$ ) tekintettük 100%-nak. Így a kutya és nyúl szívizomsejteken mért  $I_{Na,late}$  és még inkább  $G_{Na,late}$  görbéi decrescendo alakot mutattak, vagyis amplitúdójuk az AP felszálló szárától a 3-adik fázisáig csökkent. Ezzel szemben a tengerimalacok  $I_{Na,late}$  amplitúdója crescendo alakban nőtt az AP platója alatt, és csak a terminális repolarizáció során kezdett csökkenni, a  $G_{Na,late}$  viszont nem mutatott változást ezen a szakaszon.

Megmértük a  $I_{Na,late}$  és  $G_{Na,late}$  az  $APD_{90}$  érték 20, 50 és 80 százalékánál, kutya, nyúl és tengerimalac sejteken. A konduktanciaváltozások arra engednek következtetni, hogy a  $G_{Na,late}$  hanyatlásának mértéke nagyobb kutya és nyúl szívizomsejtek esetén, mint a tengerimalacok sejtjein. A  $G_{Na,late}$  hanyatlásának mértékének számításához a  $G_{Na,late}$  csökkenését vettük figyelembe az  $APD_{90}$  20 és 80 százaléka között, majd az  $APD_{90}$  20%-ánál mért  $G_{Na,late}$  értékre normalizáltuk az eredményt (röviden: „hanyatlási faktor” =  $(G_{20\%} - G_{80\%}) / G_{20\%}$ ). Ez a hanyatlási faktor ténylegesen kisebbnek bizonyult a tengerimalac izomsejtek esetében ( $-0.07 \pm 0.16$ ,  $n=18$ ), mint a kutya ( $0.46 \pm 0.06$ ,  $n=15$ ), vagy a nyúl ( $0.60 \pm 0.04$ ,  $n=6$ ) szívizomsejtek esetén. Bár a  $G_{Na,late}$  hanyatlása gyorsabb volt nyulakban, mint kutyákban ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Az  $I_{Na,late}$  által szállított töltés mennyisége (amelyet az átlag-áramgörbék

integráljának tekintettünk) nagyjából megegyezett a nyúl ( $-66.5 \pm 14.6$  mC/F) és kutya ( $-64.2 \pm 6$  mC/F) szívizomsejtek esetében, viszont szignifikánsan kisebb volt a tengerimalac sejtek ( $-94.6 \pm 6$  mC/F) esetén.

### **Az parancsjel alakjának hatása a késői nátriumáramra**

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a  $G_{Na,late}$  profilok közti különbség csak az eltérő AP paramétereknek köszönhető, vagy a  $Na^+$  csatorna-kapuzás fajok közti különbségének eredménye, nyúl és tengerimalac szívizomsejtek által generált kanonikus akcióspotenciált használtunk kutya szívizomsejtek feszültségparancsaként. A különböző parancs AP-k ellenére az  $I_{Na,late}$  alakja továbbra is, a kutya  $I_{Na,late}$ -re jellegzetes, monoton csökkenést mutatott. Emellett az áramgörbék integrálja sem változott a parancs AP-k eltérő eredetétől függetlenül.

### **A kalcium szerepe késői nátriumáram szabályzásában**

Annak érdekében, hogy kiderítsük, a  $[Ca^{2+}]_i$  milyen szerepet játszik az  $I_{Na,late}$  szabályzásában és, hogy van-e hatása annak konduktanciájára, a csökkentettük a citoszol  $Ca^{2+}$  tartalmát  $1 \mu M$  nizoldipin, vagy  $10$  mM BAPTA alkalmazásával. Az  $I_{Na,late}$  amplitúdója csökkent nizoldipin alkalmazása esetén ( $-330 \pm 30$  mA/F vs.  $-457 \pm 38$  mA/F az APD<sub>90</sub> 20%-ánál, és  $-282 \pm 38$  vs.  $-412 \pm 37$  mA/F az APD<sub>90</sub> 50%-ánál  $p < 0.05$ ,  $n = 19$  vs.  $n = 15$ ). A BAPTA hatása az AP minden szakaszán szignifikánsan megváltoztatta az  $I_{Na,late}$  amplitúdóját ( $-277 \pm 44$  vs.  $-457 \pm 38$  mA/F az APD<sub>90</sub> 20%-ánál,  $-306 \pm 36$  vs.  $-412 \pm 37$  az APD<sub>90</sub> 50%-ánál, és  $-223 \pm 32$  vs.  $-284 \pm 34$  mA/F az APD<sub>90</sub> 80%-ánál,  $p < 0.05$ ,  $n = 11$  vs.  $n = 15$ ). A  $G_{Na,late}$ -et az  $I_{Na,late}$  amplitúdójához hasonlóan csökkentette a nizoldipin ( $5.0 \pm 0.5$  mS/F vs.  $6.9 \pm 0.7$  mS/F az APD<sub>90</sub> 20%-ánál, és  $4.0 \pm 0.5$  vs.  $5.9 \pm 0.6$  mS/F az APD<sub>90</sub> 50%-ánál), de a változás csak az APD<sub>90</sub> 80%-ánál mért értékeknél volt szignifikáns ( $2.0 \pm 0.3$  mS/F vs.  $3.5 \pm 0.4$  mS/F). Ezek alapján kijelenthető, hogy a nizoldipin főleg az AP kezdeti szakaszán csökkentette a  $G_{Na,late}$ -et, míg a BAPTA inkább a későbbi részeken. Az áram integrálokat viszont a BAPTA és a nizoldipin egyformán csökkentette ( $-48.5 \pm 5$  mC/F vs.  $-63.9 \pm 6$  mC/F és  $-46.7 \pm 5$  vs.  $-63.9 \pm 6$  mC/F).

### **Az ATX-II hatása kutya és tengerimalac szívizomsejtekre**

Az ATX-II a  $Na^+$  csatornák gyors inaktivációjának gátlása révén egy  $I_{Na,late}$ -re nagyon hasonlító áramot indukál a szív ingerlékeny szöveteiben. Ezen mérések esetében is a  $10 \mu M$  TTX-szenzitív áramot tekintettük  $I_{Na,late}$ -nek. Az ATX-II megnyújtotta mind a kutya mind a tengerimalac szívizomsejtek AP-ját, és növelte az  $I_{Na,late}$  amplitúdóját. Mivel az ATX-II jelenlétében és hiányában regisztrált  $I_{Na,late}$ -ek külön mérések során kerültek felvételre, így csak

az átlagolt  $I_{Na,late}$  és  $G_{Na,late}$  profilokat tudtuk összehasonlítani, a SEM értékek nélkül. Bár az ATX-II által kialakított áram alakja nem egyezett meg pontosan a natív  $I_{Na,late}$ -mal, alakja mindkét fajban hasonló volt natív megfelelőjéhez. Ezzel ellentétben, míg tengerimalac szívműködéseken a natív konduktancia nagyjából állandó volt az AP platója alatt, addig az ATX-II alkalmazásakor mért  $G_{Na,late}$  emelkedő tendenciát mutatott ugyanezen a szakaszon. Ennek megfelelően kutya szívműködéseken a  $G_{Na,late}$  hanyatlási faktora ATX-II jelenlététől függetlenül hasonló maradt ( $0.54 \pm 0.06$ ,  $n = 6$  és  $0.46 \pm 0.06$ ,  $n = 15$ ). Tengeri malacoknál a hanyatlási faktor ATX-II jelenlétében jóval kisebb érték volt, mint kontroll ( $-0.95 \pm 0.81$ ,  $n = 4$  vs.  $-0.07 \pm 0.16$ ,  $n = 18$ ,  $p < 0.05$ ), vagyis az AP terminális repolarizációjának idejére a konduktancia tovább nőtt.

### **A befelé egyenirányító káliumáram béta-adrenerg aktivációja a CaMKII útvonal által kutya szívműködés bal kamrájának izomsejtjein:**

#### **Az $I_{K1}$ paramétereinek változása az akciós potenciál alatt:**

Kísérletsorozatunk elején öt csoportban vizsgáltuk az  $I_{K1}$  áram APVC technikával mért tulajdonságait: kontroll, 10 nM ISO-val  $\beta$ -adrenerg stimulált,  $\beta$ -adrenerg stimulált, de 1  $\mu$ M KN-93-mal kezelt,  $\beta$ -adrenerg stimulált, de 3  $\mu$ M H-89-cel kezelt, és  $\beta$ -adrenerg stimulált, de mind KN-93-mal, mind H-89-cel kezelt sejtcsoportok.

Az ISO általi  $\beta$ -adrenerg stimuláció szignifikánsan megnövelte az  $I_{K1}$  áramsűrűségét a parancs AP hosszának felénél ( $I_{K1}$  plató közepi sűrűség; kontroll:  $0.067 \pm 0.019$  A/F vs ISO:  $0.159 \pm 0.029$  A/F,  $n=7$  mindkét csoportnál). Ezt a hatást a KN-93 előkezelés gátolta ( $0.073 \pm 0.014$  A/F,  $n=9$ ), de a H-89 nem volt hatással rá ( $0.136 \pm 0.024$  A/F,  $n=10$ ). Amikor a sejtek kombináltak, KN-93 és H-89 előkezelést kaptak ( $0.065 \pm 0.013$  A/F,  $n=7$ ), az  $I_{K1}$  áram plató közepi sűrűsége megközelítette a kontroll és csak KN-93-mal előkezelt esetekben mért értékeket. Az  $I_{K1}$  egyéb paramétereire, mint az áram terminális repolarizáció alatt mért csúcstörvénye (kontroll:  $1.849 \pm 0.120$  A/F vs ISO:  $1.967 \pm 0.159$  A/F), vagy a teljes áramintegrál (kontroll:  $66.7 \pm 11.7$  mC/F vs ISO:  $77.6 \pm 8.1$  mC/F) érdekes mód a  $\beta$ -adrenerg stimulációnak nem volt szignifikáns hatása.

Annak érdekében, hogy elkülönítsük a CaMKII és PKA gátlás hatását a  $\beta$ -adrenerg stimulációtól, megvizsgáltuk a KN-93 és a H-89 hatását az  $I_{K1}$ -re ISO nélkül is. Egyik gátlószer mellett sem tapasztaltunk eltérést a kontroll értékekhez képest sem az áramsűrűség, sem az áramintegrál eredményeinkben.

### **$\beta$ -adrenerg hatás, fókuszban az AP plató**

A korábbi eredményeink arra utalnak, hogy az  $I_{K1}$   $\beta$ -adrenerg jelátviteli útvonal általi felerősödése az AP 2. fázisa, azaz a plató alatt történik. Ezért a korábbi méréseink eredményeinek analízisét erre a szakaszra fókuszáltuk. Így az  $I_{K1}$  áramsűrűségét két fix membránpotenciálértéknél elemeztük, +20 mV, ami a plató közepi membránpotenciál, és 0 mV, ami pedig a repolarizáció gyors szakaszán mérhető. Az  $I_{K1}$  áramsűrűsége szignifikánsan megnő ISO hatására (0.148±0.034 A/F +20 mV-nál, 0.202±0.041 A/F 0 mV-nál), a kontroll értékekhez

(+20 mV: 0.042±0.011 A/F, 0 mV: 0.090±0.018 A/F) képest. Ezt a hatást a KN-93 gátolta (+20 mV: 0.052±0.012 A/F, 0 mV: 0.095±0.028 A/F), a H-89 viszont nem (+20 mV: 0.127±0.025 A/F, 0 mV: 0.159±0.022 A/F).

### **$\beta$ -adrenerg stimulált $I_{K1}$ konvencionális voltage clamp-pel**

Az előzőekhez hasonló eredményeket kaptunk, amikor az ISO, és a kináz inhibitorok hatásait konvencionális voltage clamp módszerrel vizsgáltuk, -80 és +20 mV között. -30 és +20 mV között az  $I_{K1}$  áramsűrűsége jelentősen megnő  $\beta$ -adrenerg stimuláció hatására a kontroll sejtcsoporthoz képest. Ezt a változást a CaMKII gátlása megszünteti, a PKA gátlása viszont nincs hatással rá. 0 mV-nál az  $I_{K1}$  áramsűrűség értékei a következőknek adódtak: kontroll (n=10): 0.266±0.042 A/F, ISO előkezelés után (n=9): 0.211±0.067 A/F, KN-93 és ISO előkezelés után (n=10): 0.211±0.067 A/F, míg H-89 és ISO előkezelés után (n=9): 0.431±0.103 A/F. -30 mV-nál negatívabb membránpotenciál értékeknél nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket.

### **Az $I_{Kr}$ és a $\beta$ -adrenerg stimuláció**

Kutatásunk során megvizsgáltuk mind az ISO, mind a fent említett kináz gátlószerek (KN-93, H-89) hatását a kamrai szívizomsejtek egyik fő repolarizáló áramára, az  $I_{Kr}$ -re is, a korábbiakkal megegyező körülmények között (önmagukban, és kombinálva is). Sem a  $\beta$ -adrenerg stimuláció, sem annak gátlása nem volt hatással sem az  $I_{Kr}$  áram profiljára, sem áramsűrűségére, és az áramintegrál értékekre sem.

## Megbeszélés

### A késői nátriumáram tulajdonságainak fajok közti különbségei

#### **A késői nátriumáram konduktanciájának fajfüggése**

Kutya és nyúl izomsejtek esetében a konduktancia monoton csökkent az AP plató fázisa alatt. Ezzel szemben, tengerimalacok szívizomsejtjeinek  $G_{Na,late}$ -je változatlan maradt az AP ugyanezen szakaszán, viszont hirtelen csökkenést mutatott terminális repolarizáció fázisában. A konduktanciaváltozás ezen különbségei megmagyarázhatják, miért nagyobb amplitúdójú a  $I_{Na,late}$  tengerimalac szívizomsejtek AP-jának plató fázisa alatt, mint kutya, vagy nyúl izomsejtek esetén. A nátriumcsatornák inaktiválódásának nyomon követésére bevezettük a hanyatlási faktort, ami jóval nagyobbak bizonyult nyúl és kutyasejtek esetén, jelezve, hogy a  $Na^+$  csatornák nagyrésze már inaktivált a terminális repolarizációra ezeknél a fajoknál. Ennek eredményeképp, a terminális repolarizáció szakaszára megnőtt hajtóerő nem igazán tudja megnövelni az  $I_{Na,late}$  amplitúdóját kutyák és nyulak esetében, tengerimalacoknál viszont igen. Ezt megmagyarázza, hogy tengerimalacok esetén a  $I_{Na,late}$  inaktivációjának-20 mV-on kapott időkonstansa konvencionális voltage clamp módszerrel vizsgálva, 2.5-szer hosszabb, mint kutyákban .

Ugyan a  $G_{Na,late}$  számolásához a pipetta belső oldatának  $Na^+$  koncentrációját (6 mM) tekintettük a sejt intracelluláris  $Na^+$  koncentrációjának, viszont az általunk használt sejtek szubsarkolemmális nátrium koncentrációja elérheti a 8-9 mM-t is. Ennek következtében, ahogy a  $Na^+$  koncentrációja nő, úgy csökken az egyensúlyi-potenciálja. A kisebb reverzál potenciál kisebb hajtóerőt generál a nátriumnak, ami nagyobb  $Na^+$  áteresztőképességet eredményez a számítások során. Mivel hasonló megközelítő  $Na^+$  koncentrációkat alkalmaztunk mindhárom faj esetén, nem találtunk nagy eltéréseket a koncentrációk dinamikájában e három faj esetében, ezért valószínűleg hasonló mértékben becsültük alul mindhárom faj  $G_{Na,late}$ -jét. Így feltételezhető, hogy az  $I_{Na,late}$  meglétéért inkább a sejtmembrán  $Na^+$  áteresztő-képessége felel, mintsem az aktuális  $[Na^+]$ .

#### **Az $I_{Na,late}$ és az akciós potenciál kapcsolata**

A tengerimalac kamrai szívizomsejtek  $I_{Na,late}$ -ának monoton növekvő formája az AP platója alatt a nátriumcsatornák nem-egyensúlyi kapuzásával magyarázható. E modell szerint a  $I_{Na,late}$  a lassú, rámpaszerű repolarizáció miatt „felgyűlik” az AP 2.fázisa alatt.

Várározásainkkal ellentétben viszont a késői nátriumáram profilja nem változott meg kutya szívizomsejteken, akár tengerimalac, akár nyúl kamraisejtekről felvett AP-t alkalmaztunk parancspotenciálnak. Ezzel kapcsolatban érdemes észben tartani azt is, hogy a nyúl és tengerimalac szívizomsejtek  $I_{Na,late}$  és  $G_{Na,late}$  profilja jelentősen eltér egymástól. Emiatt arra a következtetésre jutottunk, hogy a tengerimalac izomsejteknél megfigyelt monoton növekvő áramprofil a repolarizáció alatt megnőtt hajtóerő, és a lassú  $Na^+$  csatorna inaktivációs kinetika hatásainak együttese eredményezi. A késői nátriumáram inaktivációs kinetikájának fajok közti különbözőségeit ezért érdemes tovább vizsgálni.

### **Az $I_{Na,late}$ aritmogén hatása**

Mivel a  $I_{Na,late}$  profilja jelentős különbségeket mutat a fajok között, következtetésképp az AP alakját is különbözőképp formálja, ahogy az APD változik. A tengerimalac szívizomsejtek monoton növekvő árama miatt feltételezhetjük, hogy az APD nyúlásával nő hozzájárulása is az akciós potenciál kialakításához. Mivel az áram sűrűségének maximumát a repolarizáció végső szakaszán éri el, így ha az APD bármi okból kifolyólag meghosszabbodik, például  $K^+$  csatornablokkoló hatására, az egy megnövekedett befelé irányuló  $I_{Na,late}$  áramot fog eredményezni. Ez visszahatva tovább nyújthatja az APD-t. Emellett a nagyobb  $I_{Na,late}$  miatt kialakult  $Na^+$  és  $Ca^{2+}$  terhelés aritmiák táptalaja lehet.

Ezzel szemben a nyúl és kutya szívizomsejtek monoton csökkenést mutató áramsűrűségű  $I_{Na,late}$ -ja a terminális repolarizáció felé haladva egyre kisebb részben járul hozzá az AP kialakításához hosszabb APD esetén. Ez megfordítva is igaz, az alacsony terminális áramsűrűség miatt az APD változásának nem lesz szignifikáns hatása az  $I_{Na,late}$ -ra kutya és nyúl kamrai izomsejtek esetében. Ezzel együtt a  $I_{Na,late}$ -ot csökkentő mechanizmusok is kisebb szereppel bírnak kutya vagy nyúl szívizomsejteken. Ezt mindenképp figyelembe kell venni azon farmakológiai és elektrofiziológiai vizsgálatok esetében, melyek tengerimalac szívizomsejteket használnak modellként a  $I_{Na,late}$  vizsgálatára.

### **Az ATX-II által létrehozott ionáram tulajdonságai tengerimalac és kutya szívizomsejteken**

A késői nátriumáramon végzett kutatásaink kimutatták azt is, hogy ahogy az ATX-II által létrehozott áram növekszik az AP plató fázisa alatt, az ATX-II-indukált  $G_{Na,late}$  alakja jelentős eltérést mutat a natív konduktanciáéhoz képest tengerimalac szívizomsejteken APVC technikával vizsgálva. Ez a váratlan eltérés a konduktanciák között jelenthetné az ATX-

II Na<sup>+</sup> csatornákhöz való kötődését, ebben az esetben viszont az eltérésnek jelen kellene lennie kutya szívműködésében is. A másik magyarázat a nátriumcsatornák korábban említett nem-egyensúlyi kapuzása.

Mivel az ATX-II ismert hatása, hogy gátolja a Na<sup>+</sup> csatornák inaktivációját, így gyakran használt eszköz a I<sub>Na,late</sub> patológiás megnövekedésének szimulációjára. A korábban leírt eredményeink miatt az ATX-II ebből a célból történő használata elég félrevezető eredményekhez vezethet tengerimalac kamrai szívműködésükön végzett kísérletek esetében. Emellett az ATX-II kötődése megváltoztathatja a tengerimalac izomszövetek Na<sup>+</sup> csatornáinak hatóanyag-szenzitivitását is, ami nehézkessé teszi a tengerimalac preparátumokon végzett kísérletek eredményeinek értelmezését.

### **A $\beta$ -adrenerg stimuláció hatása a kamrai szívműködésük káliumáramaira**

#### **A CaMKII útvonal felelős a $\beta$ -adrenerg hatások kialakításáért**

Kísérleteink során a szívműködésük 10 nM ISO-val történő perfundálásával vizsgáltuk a  $\beta$ -adrenerg stimuláció hatását az AP terminális repolarizációjáért felelős két fő káliumáramra, az I<sub>K1</sub>-re és az I<sub>Kr</sub>-re. Az I<sub>K1</sub> amplitúdója megnőtt az ISO kezelés hatására, az I<sub>Kr</sub> áram paraméterei azonban nem változtak. Kísérletsorozatunk mutatta ki elsőként, hogy kuttyában a  $\beta$ -adrenerg jelátviteli út I<sub>K1</sub>-re kifejtett hatásaiért nem a PKA a felelős, ugyanis az ISO hatását a PKA gátló H-89-cel történő előkezelés nem változtatta meg. Ezzel szemben a CaMKII gátló KN-93 megszüntette az ISO hatását, ami arra enged következtetni, hogy a  $\beta$ -adrenerg serkentés a CaMKII enzimen keresztül fejti ki az áramot erősítő hatásait. Kijelenthetjük azt is, hogy a két útvonal között (PKA, és CaMKII) nincs szinergia sem, ugyanis, ha a két kináz gátlószerét kombinációban alkalmaztunk, eredményeink nem különböztek attól, amikor a KN-93-at önmagában használtuk.

Arra, hogy a CaMKII hogyan erősíti fel az I<sub>K1</sub>-et, az irodalomban található adatok alapján két lehetőség merül fel. Egy korábbi kutatásban a  $\beta$ -adrenerg stimuláció megnövelte a CaMKII aktivitást egy NO függő, de cAMP független módon tengerimalac szívműködésükön. Ez egy új, NO szintázon keresztüli CaMKII aktiváló útvonal jelenlétére enged következtetni. Emellett rágcső szívműködésükön 100 nM ISO hatását a CaMKII-delta nitrozilációja mediálja, de a NO megemeli a CaMKII aktivitását és a K<sub>ir2.1</sub> áram áramsűrűségét emberi pitvarból származó szívműködésükön is. Több tanulmány kimutatta az EPAC fehérje szerepét is a CaMKII aktivációjában. Nyúl és rágcső szívműködésükkel kapcsolatban került felvetésre, hogy a CaMKII egy cAMP -> EPAC -> NO -> CaMKII szekvencián keresztül aktiválódik, de

egy alternatív cAMP-> EPAC -> Rap -> PLC-epsilon szekvencia is felfedezésre került. Továbbá a  $\beta$ -arrestinek és a hozzájuk kapcsolódó szignálszómák szerepét sem lehet elvetni.

### **A $\beta$ -adrenerg stimuláció az $I_{K1}$ -et is csak részben befolyásolja**

Kutatásunk során azt tapasztaltuk, hogy az ISO az  $I_{K1}$  áramsűrűségét is csak az AP plató fázisának megfelelő membránpotenciál-tartományban növelte meg, de annál negatívabb értékeken, nem befolyásolta azt. Ez a felfedezés arra enged következtetni, hogy a  $\beta$ -adrenerg hatás sem az aktív  $K_{ir}2.1$  csatornák számát, sem azok áteresztőképességét nem befolyásolja. Eredményeink azt sugallják, hogy a csatornák befelé egyenirányító tulajdonságát csökkenti a CaMKII általi foszforiláció, így egy nagyobb kifelé irányuló  $I_{K1}$  áram jöhet létre a pozitív membránpotenciál tartományban. Hasonló foszforiláció-függő módosulást tapasztaltak a  $K_{ir}2.1/KCNJ2$  csatornák R67Q mutációjánál, ami csökkentette az ISO által kiváltott hatásokat az  $I_{K1}$ -en.

Egy Nagy és társai által végzett kutatás eredményei egybevágóak a mi mérési eredményeinkkel, az  $I_{K1}$  CaMKII általi kalciumfüggő felerősödésével kapcsolatban. Egy jelentős különbség adódott azonban a két kutatás között: míg a mi eredményeink esetében az ISO csak az AP platója alatt növelte meg az  $I_{K1}$  amplitúdóját, addig a korábbi kutatás során az áram csúcssűrűsége is megnőtt. A különbség valószínűleg abból adódik, hogy amíg a mi kísérleteink során a kalciumszintet kizárólag a  $\beta$ -adrenerg serkentéssel változtattuk meg, addig Nagy és társai az  $I_{K1}$  kalciumfüggését is vizsgálták alacsony és magas  $[Ca^{2+}]_i$  mellett, amit a patch pipetta belsejében alkalmazott BAPTA és  $CaCl_2$  alkalmazásával értek el.

A miénkhöz hasonló kísérleti körülmények mellett, de nyúl kamrai szívimrejekten Hegyi és társai is arra az eredményre jutottak, hogy a CaMKII gátlása nem befolyásolja az  $I_{K1}$  paramétereit, valamint 10 nM ISO alkalmazása nem változtatja meg az áram csúcssűrűségét. Ezek az adatok összhangban vannak a mi mérési eredményeinkkel, azonban ISO hatására jelentősen megnőtt az  $I_{K1}$  által szállított töltés a kontroll körülményekhez képest. Ez a jelentős változás a mi méréseink során nem mutatkozott meg. A szerzők nem tértek ki arra, hogy az  $I_{K1}$  áram mely részének változása magyarázza az áramintegrál szignifikáns megnövekedését, viszont mivel a csúcssűrűség nem változott így az  $I_{K1}$  amplitúdójának plató alatti növekedése szolgálhat magyarázatul erre a jelenségre, ami szintén megfelel az általunk leírtaknak. A kalcium BAPTA általi pufferelese után Hegyi és társai nem találtak szignifikáns eltérést  $\beta$ -adrenerg serkentés után sem az  $I_{K1}$  csúcssűrűségében, sem az áram által szállított nettótöltés mennyiségében. A mi kutatásunk során a CaMKII KN-93 általi blokkolása vezetett hasonló

eredményekre: a KN-93 megakadályozta az  $I_{K1}$  plató alatti amplitúdó növekedését 10 nM ISO hatására, és az áram integrálja is hasonlóan bizonyult a kontroll körülmények között mértékhez. Mindkét kutatás megfigyeléseit magyarázza az, hogy a  $\beta$ -adrenerg serkentés az  $I_{K1}$  áramot a CaMKII által aktiválja.

Széles körben elfogadott tény, hogy az  $I_{K1}$ -et alapvetően a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2) aktiválja és hogy a  $\beta$ -adrenerg serkentés a PIP2 koncentrációjának növekedéséhez vezet. Xu és munkatársai kutatásában a szerzők javasolják, hogy a  $\beta$ -adrenerg receptorok aktiválása a foszfatidil-inozitol-4-foszfát-5-kináz gamma (PIP5K $\gamma$ ) PKA-függő foszforilációján és ezáltal aktiválásán keresztül emeli a szívizomsejtek PIP2-szintjét. Szem előtt tartandó viszont, hogy a szerzők 30  $\mu$ M H-89-et alkalmaztak extracellulárisan a PKA gátlására. A H-89 a  $\beta_1$  (és  $\beta_2$ ) adrenerg receptor ligandhoz kötődésének erős és szelektív gátlója. Ezt a  $\beta$ -receptor-gátló tulajdonságot figyelembe kell venni a H-89 extracelluláris alkalmazásakor. Így a Xu és munkatársainak eredményei a H-89 által okozott  $\beta$ -adrenerg receptor gátlásnak tulajdoníthatók. Ez volt az oka annak is, hogy mi a H-89-et a pipetta belső oldatában, intracellulárisan, és jóval alacsonyabb, 3  $\mu$ M koncentrációban alkalmaztuk. Mindezeket figyelembe véve a  $K_{ir}$ -csatornák feltételezett CaMKII-függő foszforilációja mellett egy alternatív magyarázat is lehetséges az eredményeinkre. Mivel a  $\beta$ -adrenerg receptor aktiválása növeli a PIP2-szintet, az  $I_{K1}$  aktivitását is fokozhatja ezen a mechanizmuson keresztül. Mivel kísérleteinkben az intracellulárisan alkalmazott KN-93 megakadályozta az  $I_{K1}$  felerősödését, de a H-89-nek nem volt ilyen hatása, ez a feltételezett mechanizmus egyértelműen nem a PKA által közvetített, és a CaMKII is szerepet játszhat benne.

### **A $\beta$ -adrenerg serkentés nincs hatással az $I_{Kr}$ -re**

Az  $I_{Ks}$ -hez és az  $I_{K1}$ -hez képest az  $I_{Kr}$  áramsűrűségét nem változtatta meg az ISO-val történő  $\beta$ -adrenerg aktiváció. Emellett sem a CaMKII, sem a PKA gátlásának sem volt hatása az áramra. Heath és mtársai közölték, hogy tengerimalac szívizomsejteken az  $I_{Kr}$  áramsűrűsége megnőtt a PKC aktiválásának hatására, de Klare és mtársai azt találták, hogy a PKA aktivációja csökkentette azt. Ezzel szemben a PKA útvonal aktiválása növelte az  $I_{Kr}$  amplitúdóját kutya, de csökkentette azt ember, és patkány szívizomsejteken. Mivel mind a PKA mind a PKC jelátviteli útvonalak függenek a  $[Ca^{2+}]_i$ -tól, nem meglepő, hogy a kalcium az előbb említett hatások mértékét is jelentősen befolyásolja. Hasonlóképp, amennyiben az  $[Ca^{2+}]_i$ -t alacsony szinten tartották (EGTA és nifedipin segítségével) az ISO kezelés megnövelte az  $I_{Kr}$  áramsűrűségét. Hasonlóképpen, az ISO megnövelte az  $I_{Kr}$  áramsűrűségét, alacsony  $[Ca^{2+}]_i$  mellett (EGTA

kalciumpuffer, és nifedipin  $\text{Ca}^{2+}$  csatornagátló mellett) konvencionális voltage clamp kísérletekben, de ebben az esetben (intakt kalcium homeosztázis, APVC technika) nem változott. A korábbi irodalmi adatok, és kutatásunk eredményeit összevetve arra következtethetünk, hogy a kutyaszív  $\beta$ -adrenerg stimulációja befolyásolja ugyan az  $I_{\text{Kr}}$ -t viszont feltehetőleg legalább két, ellentétes hatású útvonalon keresztül, melyek normál kalciumháztartás mellett kioltják egymást.

## Összefoglalás

A balkamrai szívimozgások ioncsatornáinak és ionáramainak szabályozása régóta és széleskörben kutatott téma. Bár a területen számos előrelépés született, továbbra is rengeteg kérdés maradt megválaszolatlanul. Mint a biológiai rendszerek legtöbb eleme, így az ioncsatornák is több szinten szabályozódnak. Egyrészt genetikai szinten, mely hosszútávú adaptációt tesz lehetővé, az egyed környezetéhez, illetve az adott faj életviteléhez alkalmazkodva, másrészt viszont jóval rövidebb távú, vegetatív idegrendszeri szabályozás alatt is állnak, hogy az akut változásokra is megfelelő reakciót adjanak.

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a szívimozgások késői nátriumáramát három gyakran alkalmazott gerinces modellen, kutyán, tengerimalacon és nyúlon. Kísérleteinket elvégeztük kontroll körülmények között, illetve vizsgáltuk az áram kalciumfüggésének hasonlóságait, és különbségeit a fajok között. Emellett megvizsgáltuk, hogy a kutya balkamrai szívimozgások káliumáramainak  $\beta$ -adrenerg szabályozásán belül a CaMKII, vagy a PKA által mediált útvonalak közül melyik a domináns.

Kísérleteinket akciós potenciál feszültség clamp technikával végeztük. Ezzel hasonlítottuk össze a kutya, nyúl és tengerimalac  $I_{Na,late}$  áramait, illetve vizsgáltuk, hogy a parancs akciós potenciál alakja befolyásolja-e az áramprofil változását a fajok között. Ezzel a technikával vizsgáltuk a kutya szívimozgások káliumáramainak  $\beta$ -adrenerg szabályozásának hátterét is. Kutatásunk e részénél hagyományos feszültség clamp módszert is alkalmaztunk.

Kutatásunk eredményeként megfigyeltük, hogy a kutya és a nyúl folyamatosan csökkenő áramsűrűséget mutató  $I_{Na,late}$ -ával szemben a tengerimalac szívimozgások ugyanezen ionárama az AP végéig növekedést mutat. Leírtuk továbbá azt is, hogy a  $I_{Na,late}$  alakja nem függ a sejtet ingerlő AP alakjától, illetve, hogy az ATXII nagyjából hasonló hatást produkál kutya és tengerimalac szívimozgásokon mint a TTX.

Kutatásunk második felében bizonyítottuk, hogy a kutya szívimozgások  $I_{K1}$  áramára a  $\beta$ -adrenerg serkentés első sorban az AP plató fázisa alatt hat, és ezt a hatást a CaMKII útvonalon keresztül fejt ki, nem pedig a PKA mediált útvonalon keresztül. Arra is fény derült, hogy az  $I_{K1}$ -t ugyan befolyásolja a  $\beta$ -adrenerg stimuláció, de a változás nem szignifikáns.

Ezen eredményekkel kutatásunk, ha nem is válaszolta meg az összes kérdést a szívimozgások ionáramainak szabályozásával kapcsolatban, de pár lépéssel közelebb kerültünk a teljes kép kialakításához.



Nyilvántartási szám: DEENK/587/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Zsigmond Máté  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10079012

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, Z. M.**, Horváth, B., Dienes, C., Óvári, J., Kiss, D. Z., Hézső, T., Szentandrassy, N., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P.: Beta-Adrenergic Activation of the Inward Rectifier K<sup>+</sup> Current Is Mediated by the CaMKII Pathway in Canine Ventricular Cardiomyocytes.  
*Int. J. Mol. Sci.* 25 (21), 1-14, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms252111609>  
IF: 4.9 (2023)
2. Horváth, B., **Kovács, Z. M.**, Dienes, C., Óvári, J., Szentandrassy, N., Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P.: Conductance Changes of Na<sup>+</sup> Channels during the Late Na<sup>+</sup> Current Flowing under Action Potential Voltage Clamp Conditions in Canine, Rabbit, and Guinea Pig Ventricular Myocytes.  
*Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (4), 560, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16040560>  
IF: 4.3

### További közlemények

3. Horváth, B., **Kovács, Z. M.**, Dienes, C., Barta, Z., Óvári, J., Szentandrassy, N., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P.: Relationship between ion currents and membrane capacitance in canine ventricular myocytes.  
*Sci. Rep.* 14 (1), 11241, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-61736-6>  
IF: 3.8 (2023)
4. **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), 488, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16040488>  
IF: 4.3





5. Naveed, M., Mohammed, A. S. A., Topal, L., **Kovács, Z. M.**, Dienes, C., Óvári, J., Szentandrásy, 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<sup>+</sup> Current Is Based on Fast Offset Kinetics of the Inhibitor.  
*Biomedicines*. 11 (9), 2383, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11092383>  
IF: 3.9
6. Dienes, C., **Kovács, Z. M.**, Óvári, J., Szentandrásy, N.: TRPM4-ioncsatornák vizsgálatának farmakológiai lehetőségei = Pharmacological possibilities of testing TRPM4 ion channels.  
*Cardiol. Hung.* 53 (5), 446-450, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.26430/CHUNGARICA.2023.53.5.446>
7. Horváth, B., Szentandrásy, 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
8. Horváth, B., Szentandrásy, 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
9. **Kovács, Z. M.**, Dienes, C., Hézső, T., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Szentandrásy, 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
10. Dienes, C., **Kovács, Z. M.**, Hézső, T., Almássy, J., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., Szentandrásy, 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





11. 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
12. 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
13. 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<sup>+</sup> Current Is [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Dependent in Canine Ventricular Myocytes. *Pharmaceuticals (Basel)*. 14 (11), 1142, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14111142>  
IF: 5.215

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 56,186**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,2**

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

Debrecen, 2024.12.09.

