

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A szívizom akciós potenciálját kialakító ionáramprofilok összehasonlítása és azok kalciumfüggése

Dr. Kiss Dénes Zsolt

Témavezető: Prof. Dr. Magyar János



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1 A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és ionáramai	6
2.2. A szívizomsejtek főbb depolarizáló ionáramai	7
2.2.1. A feszültségfüggő nátriumáram (I_{Na}) és a késői nátriumáram ($I_{Na,L}$)	7
2.2.2 A nátrium-kalcium csereáram (I_{NCX})	10
2.2.3 Az L-típusú kalciumáram ($I_{Ca,L}$)	12
2.3. A szívizomsejtek főbb repolarizáló ionáramai	15
2.3.1. A késői egyenirányító káliumáram (I_K)	15
2.3.2. A befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})	18
2.4. Klinikai aspektusok	19
3. Célkitűzés	21
4. Anyagok és módszerek	22
4.1. Szívizomsejtek izolálása	22
4.2. Ionáram mérés akciós potenciál feszültség clamp technikával (APVC)	23
4.3. Az onion-peeling módszer	26
4.4. Ionáram mérés konvencionális feszültség clamp technikával	27
4.5. Akciós potenciál mérések hegyes mikroelektrodával	28
4.6. Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és sejtrövidülés mérése	28
4.8 Statisztikai elemzés	30
5. Eredmények	31
5.1 A szívizomsejtek főbb ionáramprofiljainak meghatározása	31
5.2 Korrelációk a szívizomsejtek főbb ionáramainak paramétereit között	34
5.3. A terminális repolarizáció ionprofiljainak idő- és kalciumfüggése	36
5.4. Az ionáramok gátlásának hatása a szívizomsejtek intracelluláris kalciumtranzienseire	40
5.5. A késői nátriumáram kalciumfüggése	42
5.6. A CaMKII út vonal szerepe a $I_{Na,L}$ szabályozásában	47
5.7. A GS-967 hatása az akciós potenciál morfológiájára	48
6. Megbeszélés	50
6.1. Az akciós potenciál kialakításában részt vevő ionáramok paramétereit közötti korrelációk és azok jelentősége szívizomsejteken	50
6.2. Az akciós potenciál terminális repolarizációja alatti ionáramprofilok időfüggése	51
6.3. Az ionáramok kalciumfüggése	52
6.4. A kísérletek limitációi	56

7. Az értekezésben szereplő új kutatási eredmények.....	57
8. Összefoglalás.....	58
9. Summary.....	59
10. Köszönetnyilvánítás.....	60
11. Irodalomjegyzék.....	62
12. Kulcsszavak	75
13. Keywords	75
14. Függelék.....	75

Rövidítések jegyzéke

4AP	4-aminopiridin
AP	akciós potenciál
APD	akciós potenciál időtartam
APVC	akciós potenciál feszültség clamp
BM	burst mód
CaM	calmodulin
CaMKII	kalcium-calmodulin függő protein kináz II
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
DAD	késői utódepolarizáció
EAD	korai utódepolarizáció
$I_{Ca,L}$	L-típusú kalciumáram
ID	interdomén rész
I_{K1}	befelé egyenirányító káliumáram
I_{Kr}	késői egyenirányító káliumáram gyors komponense
I_{Ks}	késői egyenirányító káliumáram lassú komponense
$I_{Na,early}$	feszültségfüggő nátriumáram gyors komponense
$I_{Na,L}$	késői nátriumáram
I_{NCX}	nátrium-kalcium csereáram
I_{to}	transziens outward káliumáram
K_{ir}	befelé egyenirányító káliumcsatorna
K_v	feszültségfüggő káliumcsatorna
LAD	bal elülső leszálló koszorúsér
LQT	hosszú-QT szindróma
LSM	late scattered mód
Na_v	feszültségfüggő nátriumcsatorna
PKA	protein-kináz A
SSS	sick sinus szindróma
TM	transzmembrán régió
TrM	transziens mód
TTP	áramcsúcs eléréséhez szükséges idő (time to peak)
TTX	tetrodotoxin
V_{max}^-	akciós potenciál repolarizációjának legnagyobb sebessége (V/s)

1. Bevezetés

A szív és érrendszeri megbetegedések, azon belül is a malignus kamrai szívritmuszavarok továbbra is vezető szerepet töltenek be mind a hazai, mind pedig az európai mortalitási mutatókban. Annak ellenére, hogy a szívritmuszavarok kialakulásával és kezelésével foglalkozó aritmológia a belgyógyászat és a kardiológia kiemelt területévé vált, sok esetben a legmodernebb, legkorszerűbb gyógyszeres és eszközös terápiás törekvések ellenére sem tudjuk megelőzni a szívritmuszavarok kialakulását és a hirtelen szívhalált. Ezért a legtöbbször hirtelen fellépő, gyakran halálos kimenetelű betegségeknek a kezeléséhez elengedhetetlen, hogy a betegségek élettani és kórélettani hátterét minél jobban megismerjük.

A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja (AP) egymással finom összhangban működő számos ionáram működésének eredménye. Az AP során a membránpotenciál értéke milliszekundumos tartományban folyamatosan változik, melynek hatására az ioncsatornák aktiválódnak, inaktíválódnak vagy deaktiválódnak. Ezeknek az áramoknak a nagysága és iránya függ az ionok elektrokémiai gradiensétől, a csatornák kapuzási kinetikájától, ami feszültség- és időfüggő.

Számos közlemény foglalkozik az AP-t kialakító csatornák elektrofiziológiai sajátágaival, azonban ezek az eredmények elsősorban hagyományos feszültség-clamp technikával végzett kísérletekből származnak. A hagyományos feszültség-clamp technika során négyszögimpulzusokat használunk az ioncsatornák aktiválására. Ezzel szemben, fiziológiás körülmények között, a sejt membránpotenciálja az AP-során pillanatról-pillanatra változik, így az ionáramok AP alatti áramprofilja jelentősen eltérhet a négyszögimpulzusok alatt regisztráltaktól. Az AP alatti áramprofilok vizsgálatára Fischmeister és munkatársai kifejlesztették az ún. akciós potenciál feszültség-clamp (APVC) technikát (1). Az APVC lényege, hogy az elektrofiziológiai mérés során parancsjelként négyszögimpulzus helyett akciós potenciált — vagy a sejt saját AP-ját, vagy egy előre regisztrált kanonikus AP-t — alkalmazunk, ezzel modellezve még jobban az in vivo körülményeket.

További előrelépést jelentett az ún. onion peeling technika bevezetése. Ez a technika azt teszi lehetővé, hogy ugyanazon a sejten több ioncsatorna működését tanulmányozhassuk APVC technika segítségével (2,3).

Patológias körülmények között megváltozhat az ioncsatornák szabályozása, expressziós mintázata, illetve különböző gyógyszerek gátolhatják, vagy serkenthetik működésüket, ami ritmuszavarok kialakulásához vezethet. Ezen elváltozások, azon túl, hogy változatos klinikai

kórképekben mutatkozhatnak meg, a szív- és érrendszeren kívül is, több szervrendszert is érinthetnek.

Az ionáramok közötti összefüggések, kapcsolatok kevésbé ismertek, ugyanakkor a ritmuszavarok adekvát kezeléséhez elengedhetetlen, hogy ismerjük az egyes ionkonduktanciák akciós potenciál alatti profilját, az ionáramok közötti korrelációkat. Ezen összefüggések feltárása új fejezetet nyithat a szívritmuszavarok kezelésében.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és ionáramai

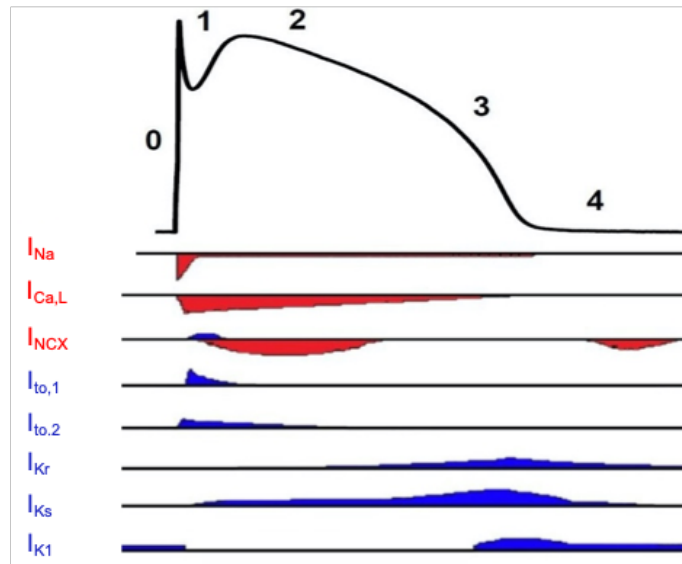
A szívizomsejtek akciós potenciálját számos, különböző fehérjéken keresztül folyó ionáram pontosan szabályozott működése együttesen alakítja ki (4). Az AP alakját az AP eltérő fázisaiban aktiválódó, majd inaktíváló áramok eredője befolyásolja. Az akciós potenciált rendszerint 4 fázisra osztjuk (0-4. fázis) (1. ábra).

A 0. fázis a gyors depolarizáció szakasza, melynek során a gyors, feszültségfüggő nátriumcsatornák megnyílnak, rajtuk keresztül a Na^+ ionok elektrokémiai gradiensüknek megfelelően belépnek a sejtbe. Ennek következtében a membránpotenciál értéke a Na^+ ionok Nernst-potenciálja felé tolódik, ezáltal jelentős depolarizáció alakul ki. A depolarizáció hatására a Na^+ csatornák igen gyorsan inaktíválódnak, ennél fogva relatíve hosszú ideig nem ingerelhetőek, ez okozza a szívizomsejtek refrakter periódusát.

Az AP 1. fázisáért a tranziens outward áramok (I_{to1} és I_{to2}) a felelősek. A I_{to1} egy 4-aminopiridin (4AP) szenzitív áram, míg az I_{to2} egy 4AP-ra nem érzékeny kloridáram (5). A I_{to} depolarizációra aktiválódik, és egy rövid ideig tartó, átmeneti enyhe repolarizációt idéz elő majd inaktíválódik. A sejtmembrán depolarizációjának hatására a nátriumcsatornákkal egyidőben az L-típusú kalciumcsatornák ($I_{\text{Ca,L}}$), valamint a különböző káliumcsatornák aktivációja is elkezdődik, azonban ezeknek a csatornáknak az aktivációja jóval lassabb. Az $I_{\text{Ca,L}}$ az AP 2. fázisa alatt éri el maximumát, ekkor dominál a működése. Mivel a kalcium-ionok equilibrium-potenciálja a membránpotenciál értékétől jóval pozitívabb, a kálium-ionoké pedig negatívabb, így a plató fázis során alig látható membránpotenciál változás, nagy a membrán impedanciája. A korábban inaktíválózott Na^+ -csatornák egy része a plató fázis során már visszatért inaktív állapotából és újra aktiválódnak (késői nátriumáram ($I_{\text{Na,L}}$)). Dominálón az AP 2. fázisa során működik továbbá a nátrium-kalcium csereáram (I_{NCX}), mely az intracellulárisan felhalmozott kalcium-ionok eltávolításában vesz részt. A plató fázist követően indul a valódi repolarizáció, melyet az AP 3. fázisának nevezünk.

A 3. fázis az $I_{Ca,L}$ inaktivációjával indul, melyet a késői egyenirányító káliumáram (delayed rectifier, I_K) gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponenseinek aktiválódása követ.

A terminális repolarizáció az AP 4. fázisa során megy végbe, melyet a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) alakít ki. A következő szívciklus kezdetéig a szív munkaizomsejtek membránpotenciálja a nyugalmi értéken marad, mely háttérben ugyancsak az I_{K1} áll.

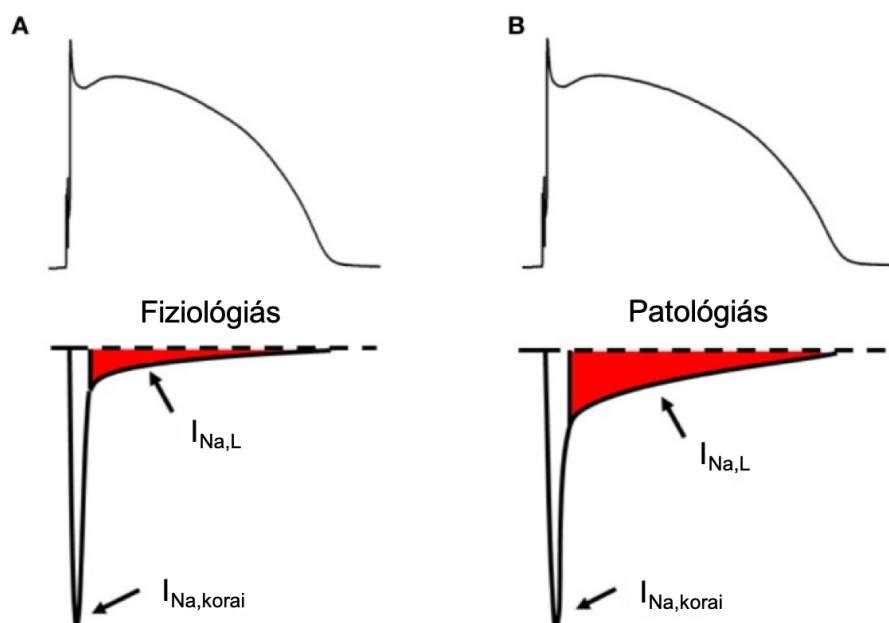


1. ábra. A kamra szívizomsejtjeinek akciós potenciálját kialakító ionáramok, az AP fázisai alatt. Megegyezés szerint a nulla vonal felett látható áramok kifelé irányuló ún. „outward” áramok, míg a nulla vonal alattiak befelé irányuló „inward” áramokat jelölnek. Varró és mtsai. közleménye alapján (6).

2.2. A szívizomsejtek főbb depolarizáló ionáramai

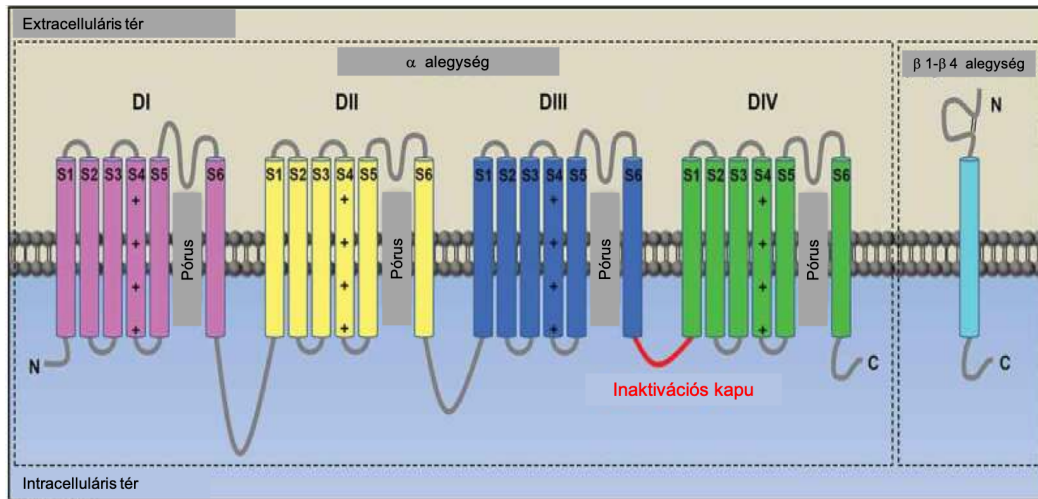
2.2.1. A feszültségfüggő nátriumáram (I_{Na}) és a késői nátriumáram ($I_{Na,L}$)

A szívizomsejtek akciós potenciáljának gyors felszálló szárát a feszültségfüggő nátriumáram gyors komponense ($I_{Na,early}$) alakítja ki. Az áramot kialakító csatornák gyors aktivációt követően gyorsan inaktiválódnak (7,8). Az inaktiválódott nátriumcsatornák tartós depolarizáció hatására kisebb valószínűséggel ugyan, de újraníllhatnak, kialakítva egy elnyújtott, kisebb amplitúdójú nátriumáramot ($I_{Na,L}$) az AP platófázisa alatt (2. ábra).



2. ábra: A késői nátriumáram a szív munkaizomrostjainak AP-ja alatt fiziológiás és kóros körülmények között. Horváth B. és mtsai közleménye alapján módosítva (9)

A szívizmon a feszültségfüggő nátriumcsatorna családból (Na_v) dominálónan a tetrodotoxinra (TTX) nem érzékeny $Na_v1.5$ isoforma expresszálódik (10–12), emellett azonban számos, szívre nem jellemző, TTX-szenzitív nátriumcsatorna ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.6$) is leírásra került (13–17). Az $Na_v1.5$ csatornafehérje követi a feszültségfüggő nátriumcsatornák családjának általános szerkezetét. A polipeptid lánc négy homológ alegységre osztható, melyeket egyenként hat transzmembrán (6-TM) domén épít fel, köztük intra- és extracelluláris hurkokkal. Az alegységek S4-es doménje tölti be a feszültség szenzor szerepét, ez a TM régió pozitív töltésű arginin/lizin aminosavakat tartalmaz. Az S5-S6 domén a pórusformáló alegysége a csatornának. A négy homológ alegységek közt is található interdomén régiók, melyeknek szabályozó szerepe van, illetve a csatorna inaktivációs kapuját is egy ilyen interdomén rész alkotja (IDIII-IV) (3. ábra).



3. ábra: Az Na_v1.5 csatorna szerkezete. Látható a polipeptidlánc négy homológ doménje az interdomén régiókkal. A III és IV domén közötti szakasz a csatorna inaktivációs kapuja (Kistamás és mtsai közleménye alapján módosítva)(18).

Az Na_v1.5-ös izoformának a szakirodalom szerint három különböző kapuzási módja ismert. A single-channel mérések alapján a „transziens mód (TM)”, a „burst mód (BM)”, és a „late-scattered-mód (LSM)” különböztethetőek meg. A csatornák TM aktivitása alakítja ki a korai nátriumáramot, míg a BM és az LSM a késői nátriumáram (I_{Na,L}) kialakulásáért felelős elsősorban (19). A I_{Na,L} szerepe a szívizom AP során sokáig vita tárgyát képezte, hiszen, a korai nátriumáramhoz képest egy jóval kisebb amplitúdójú (20-50 pA) áramról van szó. Az AP platója alatt azonban a szívizomsejtek impedanciája nagy, ezért egy viszonylag kis amplitúdójú ionáram is jelentős membránpotenciálváltozást tud előidézni (20). A I_{Na,L} profilja és működése jelentős fajok közötti eltérést mutat (21). Amplitúdója tengeri malac és nyúl mintákon mérve hasonló a plató alatt folyó repolarizáló káliumáramokéhoz, gátlása pedig szignifikánsan csökkenti az AP időtartamát, ilyen módon a I_{Na,L} jelentős mértékben hozzájárul az AP morfológia kialakításához (22–25).

A szívizomsejtek kalciumháztartásában is jelentős szerep jut a késői nátriumáramnak. A megnyíló nátriumcsatornák befelé irányuló áramot alakítanak ki, így átmenetileg megnő a szubmembrán tér nátrium koncentrációja, ami magával vonja a nátrium eltávolító mechanizmusok felerősödését (26). A sejtek nátrium és kalcium háztartása közti fő kapocs a nátrium-kalcium cserélő (NCX), mely az ún. „forward” módban működve 1 Ca²⁺ ellenében 3 Na⁺-ot juttat a sejtbe. Az NCX elsődleges szerepe a Ca²⁺ ionok eltávolítása a sejtől, azonban az AP alatt egy rövid ideig képes „reverz” módon is működni, amikor is kalciumot juttat a sejtbe és nátriumot távolít el onnan (26–30).

Mivel az inward késői nátriumáram depolarizálja a membránt, nő az AP hossza. Minél hosszabb ideig depolarizált a sejtmembrán, annál hosszabb ideig és annál nagyobb valószínűséggel nyílnak meg illetve nyílnak újra az L-típusú kalciumcsatornák, melyek kalcium influxot idéznek elő (31–35).

A késői nátriumáram szabályozása komplex módon zajlik. A kalcium ionok, melyek számos intracelluláris folyamatot regulálnak, befolyásolhatják a különböző ioncsatornák működését, így a $I_{Na,L}$ -t kialakító csatornákat is. A calmodulin (CaM) és a kalcium-calmodulin függő protein kináz II (CaMKII) is jelentős szerepet tölthet be az áram és a Na_v csatornák szabályozásában (36–40), valamint a β -adrenerg jelátviteli útvonal is részt vesz a $I_{Na,L}$ regulációjában (24).

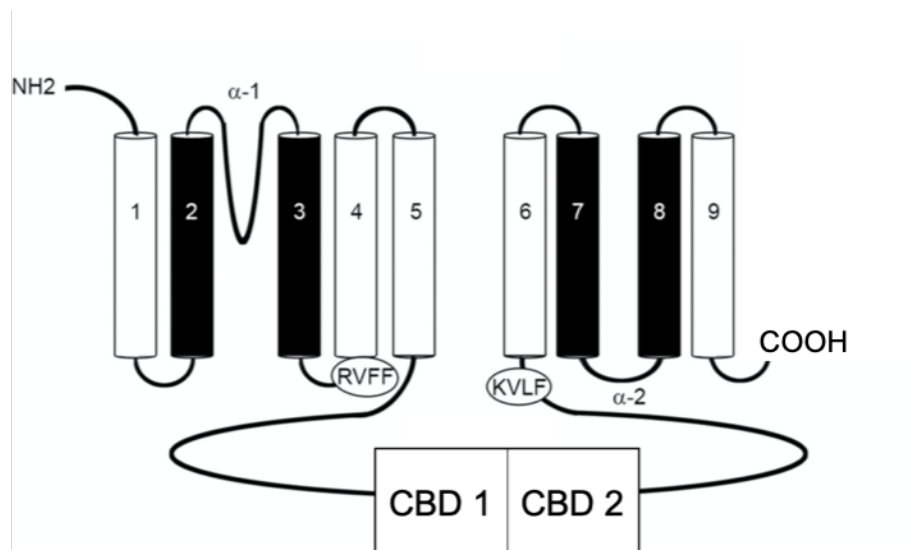
A késői nátriumáramnak több gátlószere is ismert. Ugyan a $Na_v1.5$ csatornafehérjét TTX-re nem szenzitív csatornaként ismerjük, a tetrodotoxin μ M-os koncentrációban (egyéb TTX-érzékeny csatornáknál nM-os koncentrációval szemben) gátolja a csatornát (41). Emellett a Vaughan-Williams beosztás I. osztályába tartozó antiaritmiás szerek (pl.: quinidin, procainamid, lidokain, flecainid, propafenon, mexiletin) is gátolják mind a $I_{Na,early}$ -t és a $I_{Na,L}$ -t. A mexiletinhez hasonló hatásokkal bír a GS-967 nevű molekula, melyet szelektív késői nátriumáram gátlószereknek fejlesztettek, azonban jelentős frekvenciafüggő $I_{Na,early}$ gátló hatása is van (42).

2.2.2 A nátrium-kalcium csereáram (I_{NCX})

A nátrium-kalcium csereáram fő funkciója az intracelluláris Ca^{2+} -ok eltávolítása a szívizomsejtekből. A nátrium-kalcium cserélő a membránpotenciál értékétől és az ionkoncentrációktól függően kétféleképpen működhet. Az egyik a sejtéből 1 Ca^{2+} -ot 3 Na^+ ellenében eltávolító forward, a másik pedig a fordítottan működő reverz mód. Mivel ez a folyamat nem elektroneutrális, így az AP során dominálónan egy depolarizáló áramot tart fenn a fehérje (6,27,43). Az akciós potenciál kezdeti fázisában azonban, a gyors depolarizációt követően, Na^+ -ok ellenében Ca^{2+} -okat juttat a sejtbe.

A nátrium-kalcium csereáramot egy a szarkolemmában található másodlagosan aktív fehérje alakítja ki. A fehérje szerkezetét tekintve 9 TM doménből áll, mely struktúra három részre osztható. Az N-terminális régió 5 TM alegységet foglal magában, míg a C-terminális régióban 4 TM egység található. Közöttük van egy hidrofil fehérjeszakasz, mely intracellulárisan helyezkedik el (44). A 2-3 TM domén alkotja az α_1 , míg a 7-8 TM domén pedig az α_2 alegységet. Ezek az α -alegységek felelősek az ionmegkötésért és transzportért (45).

Az intracelluláris protein β -alegységeket tartalmaz, melyek Ca^{2+} -kötőhelyekként funkcionálnak. A Ca^{2+} kötődése aktiválja a transzportert, Na^+ jelenlétében pedig deaktiválódik (46–49)(4. ábra).



4. ábra: Az NCX csatornafehérje szerkezete. A csatorna szerkezetileg 9 TM régióból áll, emellett tartalmaz α -alegységeket, melyek az ionmegkötésért és transzportért felelősek, illetve egy nagy intracelluláris fehérjeláncot, mely kalciumkötő régiókkal bír. (Hafver és mtsai. közleménye alapján módosítva)(50)

Az NCX esetében is több izoforma ismert, szívben leginkább az NCX1-es formája expresszálódik.

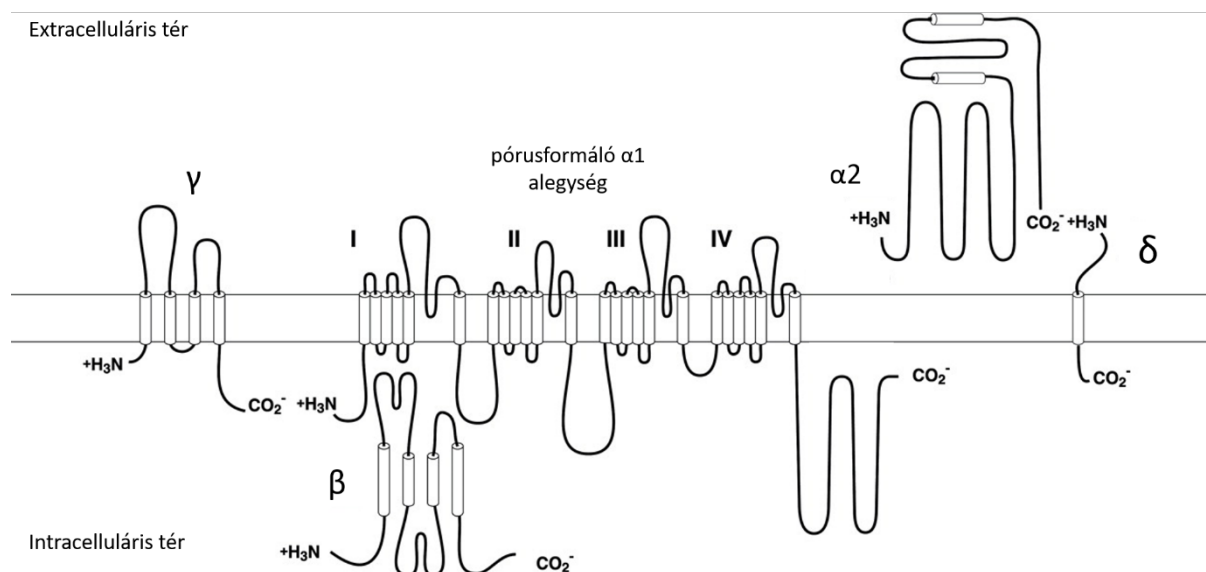
Az elmúlt évtizedek során az NCX, mint lehetséges antiarritmiás célpont is előtérbe került, így több gátlószer került kifejlesztésre. Az NCX gátlók első generációját egy gyakran alkalmazott vízhajtó, az amilorid és annak származékai jelentették, azonban alacsony szelektivitásuk miatt nem alkalmasak sem az áram vizsgálatára, sem aritmiák kezelésére (51). Li és munkatársai 1991-ben írtak az NCX gátló peptidről (XIP) mely egy szintetikus anyag, amit az NCX fehérje aminosav szerkezete alapján állítottak elő (52). A XIP kötőhelye azonban intracellulárisan helyezkedik el, a molekula nem jut át a sejtmembránon, így alkalmazása limitált, emellett szelektivitása is megkérdőjelezhető, mert egyes kalmodulinkötőhelyekkel is verseng (53). A KB-R7943 ígéretes szernek indult, azonban az NCX-re való szelektivitása ennek sem volt megfelelő, ugyanis leírták többek között nátrium-, L-típusú kalcium- és káliumcsatorna gátló hatását is (54). Az egyik legszelektívebb NCX inhibitoroként számontartott szer a SEA-0400, melynek egyéb ionáramokra kifejtett gátló hatása nem ismert (55). A SEA-0400 antiarritmiás hatását leírták kísérletesen létrehozott iszkémia-reperfúziós modellen,

továbbá a korai- és a késői utódepolarizációk amplitúdóját is hatékonyan csökkentette (56,57). A legújabb és legígéretesebb NCX gátlónak az ORM-10962 (ORM) tűnik. Nem ismert a molekula egyéb ionáramokra kifejtett gátló hatása. Az ORM kísérletes körülmények között szignifikánsan csökkentette a késői utódepolarizációk előfordulását, illetve a hozzájuk köthető ritmuszavarok kialakulását (58). Megfigyelték továbbá, hogy mérsékli az AP alternansok kialakulását is (59).

2.2.3 Az L-típusú kalciumáram ($I_{Ca,L}$)

Az L-típusú kalciumáram ($I_{Ca,L}$) a szív minden típusú sejtjén kimutatható (60). A szívműködéshez szükséges kalcium-ionok az L-típusú kalciumcsatornán keresztül az extracelluláris térből jutnak a sejtbe, ami kiváltja a kalcium indukált kalcium felszabadulást a szarkoplazmás retikulumból (61). Ezeken felül a kalcium, mint másodlagos hírvivő részt vesz a jelátviteli folyamatokban, így más ioncsatornák szabályozásában is (62). Az L-típusú kalciumcsatorna depolarizáció hatására nyílik. Ez a megnyílás azonban jóval lassabb, mint a feszültségfüggő nátriumcsatornáké. Ez az oka annak, hogy kalcium beáramlás főként az AP plató fázisa alatt mérhető.

Szerkezetét tekintve a feszültségfüggő kalciumcsatornák családját a feszültségfüggő nátriumcsatornákhoz hasonlóan heteropentamer fehérjék alkotják (63,64). A pórusformáló $\alpha 1$ alegység egy nagy molekulatömegű (körülbelül 200-250 kDa) fehérje, mely a feszültség szenzort, inaktivációs kaput és gyógyszerkötőhelyeket is tartalmaz (63,65). Emellett több, járulékos szereppel bíró, főként szabályozó alegység ($\alpha 2, \beta, \gamma, \delta$) alkotja a csatornát (11,63).



5. ábra: A feszültségfüggő kalciumcsatornák sematikus szerkezete. A pórusformáló $\alpha 1$ alegység négy doménből áll, melynek doménjeit egyenként hat transzmembrán régió alkotja. Ez az $\alpha 1$ alegység tartalmazza az inaktivációs kaput és a különböző gyógyszerkötőhelyeket is. Emellett több, szabályozó alegység ($\alpha 2, \beta, \gamma, \delta$) is részt vesz csatorna kialakításában. Catterall és mtsai. közleménye alapján módosítva (11).

A csatornaalkotó $\alpha 1$ alegységet négy családba oszthatjuk (Ca_v1-4), az egyes családokba több izoforma sorolható. Humán miokardiumban főként a CACNA1C gén által kódolt $\text{Ca}_v1.2$ izoforma van jelen (66,67). Az $\alpha 1$ alegység, a feszültségfüggő Na^+ csatornához hasonlóan négy homológ doménből (DI-DIV) áll, melyeket egyenként hat hidrofób transzmembrán régió (S1-S6) alkot (63). A feszültség-szenzor szerepét a Ca^{2+} csatornák esetében is az S4-es szegmens tölti be, mely pozitív töltésű aminosavakat, főleg arginint és lizint tartalmaz (68). Az ioncsatornák szelektivitását, ún. szelektivitási filterek biztosítják. Az S5-S6 régió közti hurokban egymáshoz nagyon közel álló negatív töltésű glutamát oldalláncok alakítják ki a pórus kalcium ionokra való szelektivitását (EEEE-szekvencia) (69). A kalcium ionokon kívül kevés kétértékű kation számára is átjárható a csatorna, a többi bivalens ion viszont gátolja a csatorna működését (pl.: Co^{2+} , Mn^{2+}) (11,68). Ennek oka, hogy ezek az ionok bekötődnek a csatorna pórusába, és nehezen disszociálnak onnan, elzárva így a Ca^{2+} -ok útját a csatorna lumenében (67).

A feszültségfüggő kalciumcsatornákat a fentebb ismertetett pórusformáló $\alpha 1$ alegységen kívül szabályozó domének alkotják. A β -alegység az $\alpha 1$ alegységhez kapcsolódik az

intracelluláris oldalon (5. ábra), és az $I_{Ca,L}$ feszültség és időfüggését befolyásolják (63,70). Az $\alpha 2$ protein extracellulárisan helyezkedik el, a δ alegységek pedig transzmembrán elhelyezkedésűek, közöttük diszulfidhidak vannak (63,65). Utóbbi két protein a pórusformálú $\alpha 1$ fehérje kapuzási kinetikáját változtatja meg (71).

A szívizomban dominálón jelenlévő $Ca_v1.2$ csatornák depolarizációra aktiválódnak. A folyamatot meghatározó félaktivációs feszültségérték szívizomsejteken körülbelül -15 és -20 mV közé esik. Ennek értékét is a különböző szabályozó proteinek ($\alpha 2$, β , δ), illetve a sejten kívüli tér Ca^{2+} koncentrációja befolyásolja (11). A csatorna a feszültségfüggő nátriumcsatornához hasonlóan inaktiválódik. Inaktivációja kalciumfüggést mutat, emellett természetesen feszültségfüggő folyamat is (72,73). Az ioncsatorna inaktivációját nagy mértékben befolyásolja az intracellulárisan elhelyezkedő kalmodulin, illetve a kalcium-kalmodulin függő protein kináz komplex (74).

Az $I_{Ca,L}$ gátlószereit több csoportra bonthatjuk. Főbb csoportjai közé a dihidropiridinek (pl.: nifedipin), a fenil-alkil-aminok (pl.: verapamil) és a benzothiazepin származékok (pl.: diltiazem) tartoznak. A példaként felsorolt hatóanyagok a klinikumban is gyakran alkalmazott antihipertenzív és antiarritmiás szerek (75).

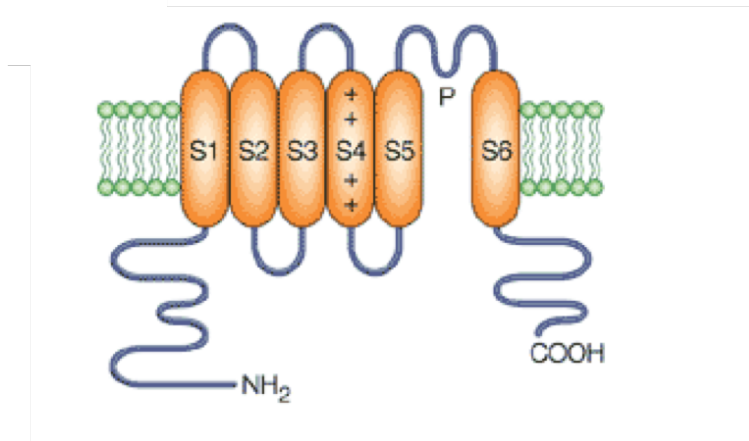
Valamennyi kalcium-antagonista szer a csatornák $\alpha 1$ -alegységéhez kötődik (65). A dihidropiridinek a III. és IV. domén, míg a fenil-alkil-amin származékok a IV. domén S6-os szegmenséhez kötődnek. Ezzel szemben a benzothiazepinek az intracelluláris oldalon a III. és IV. domén közötti interdomén-hídhöz kapcsolódnak (76). Az L-típusú kalciumcsatornák a szívizmon kívül számos humán szövetben kimutathatók (vázizom, vaszkuláris-, bronchiális-, gastrointesztinális-, urogenitális- és uterinális- simaizom). Emiatt a különböző kalciumcsatorna-blokkolók alkalmazása több betegség kezelésében is hatásos lehet, a klinikai alkalmazásuk leginkább a magasvérnyomás-betegség kezelésében elterjedt, azonban antiarritmiás és antianginás hatásukat is kihasználjuk (65).

2.3. A szívizomsejtek főbb repolarizáló ionáramai

2.3.1. A késői egyenirányító káliumáram (I_K)

A késői egyenirányító káliumáramot (I_K) több komponensre oszthatjuk az áram aktuális kinetikája, kapuzása és gyógyszerérzékenysége szerint: ultragyors- (I_{Kur}), gyors- (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponense (77–82). Általánosságban elmondható, hogy a késői káliumáramért felelős csatornák depolarizáció hatására kinyílnak, majd alacsonyabb feszültségértékek mellett kifejezetten lassan zárulnak. A I_K szerepe elengedhetetlen a szívizomsejtek repolarizációjában. Egyik fontos alkotója a szívizomzat repolarizációs rezervjének, ezáltal része egy komplex védőmechanizmusnak, mely a különböző szívritmuszavarokkal szemben véd (77,83).

A késői káliumért felelős csatornát egy 6TM/1P felépítésű csatornafehérje alakítja ki. A feszültségfüggő káliumcsatornák (K_v) szerkezete típusos, a feszültségfüggő nátriumcsatornáéhoz hasonló. Főbb különbség, hogy míg a nátriumcsatornák pórusformáló doménje egy nagy polipeptid lánc, addig a feszültségfüggő káliumcsatornákat egymással azonos proteinek homotetramert alkotva alakítják ki. Az α alegység 6TM régióból, valamint intracellulárisan elhelyezkedő N- és C-terminálisból áll. Az S4-es szegmens a feszültségfüggő nátriumcsatornához hasonlóan feszültségérzékelőként működik, minden harmadik pozícióban Arg/Lys oldalláncokat tartalmaz (84). A csatorna K^+ szelektivitását itt is egy szelektivitási filter biztosítja, melyet Thr-X-Gly-Tyr-Gly aminosav sorrend alakít ki. Ez a szelektivitási szűrő a csatornapórust kialakító S5-S6-os szegmens között található (85) (6.ábra).



6. ábra: A késői egyenirányító káliumáramot kialakító feszültségfüggő káliumcsatorna szerkezete. A csatornát négy, egymással analóg fehérje tetramerizációja alkotja. Minden domén 6TM alegységet tartalmaz. A feszültségszenzor szerepét itt is az S4 alegység tölti be. Choe és munkatársai alapján módosítva (86).

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

A késői káliumáram gyors komponenséért felelős ioncsatornát a KCNH2 gén (korábban hERG) által kódolt $K_v11.1$ csatornafehérje alkotja. Szerkezeti felépítése a korábban említett 6TM/1P típusú feszültségfüggő káliumcsatornákét követi (87).

A csatorna depolarizációra gyorsan aktiválódik, majd szinte azonnal inaktiválódik (88,89). A gyors inaktivációt fokozatos újrainyúlás követi, majd a csatornák zárt állapotba kerülnek, azaz deaktiválódnak (83). A csatorna működését némileg meglepő módon az extracelluláris K^+ koncentráció is befolyásolja. A sejten kívüli K^+ -szint növekedés ugyanis növeli az I_{Kr} -t, míg az extracelluláris K^+ -koncentráció csökkenése gátolja azt. Ez a jelenség ellentétes azzal, mint amire a K^+ ionok Nernst potenciálja alapján számítanánk (90,91). Megfigyelték továbbá, hogy nyúl és humán szíven is a hERG (KCNH2) gén által kódolt csatornát közvetlenül befolyásolja az extracelluláris K^+ -koncentráció, melynek csökkenése esetén fokozott csatorna internalizáció és lebomlás következik be (92).

Több szelektív I_{Kr} gátlószer ismert, ezek hatásmechanizmusuk szerint az antiarritmiás gyógyszerek III. osztályába sorolandók (93). Ide tartozik többek között az E-4031, a d-Sotalol és a Dofetilid is (82,94,95).

A különböző antiarritmiás szereken kívül fontos tudni, hogy egyéb szervrendszerekre ható gyógyszereknek is van I_{Kr} gátló hatásuk. Egyik legismertebb csoport, melynél igen gyakran megnyilvánul a QT-intervallumot nyújtó hatás, az antipszichotikumok egy csoportja (pl. Haloperidol, Kvetiapin) (96).

2.3.1.2. A késői egyenirányító káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

Szívizomsejteken a késői káliumáram lassú komponenséért felelős csatornát is a klasszikus 6TM/1P szerkezetű $K_v7.1$ csatorna egy MinK nevű járulékos proteinnel együttesen alakítja ki. A $K_v7.1$ fehérjét KCNQ1, míg a MinK fehérjét a KCNE1 gén kódolja (97). A MinK fehérje 1 TM alegységből áll, mely önmagában pórusformálásra nem képes, a $K_v7.1$ -hez β -alegységként kapcsolódva módosítja annak működését.

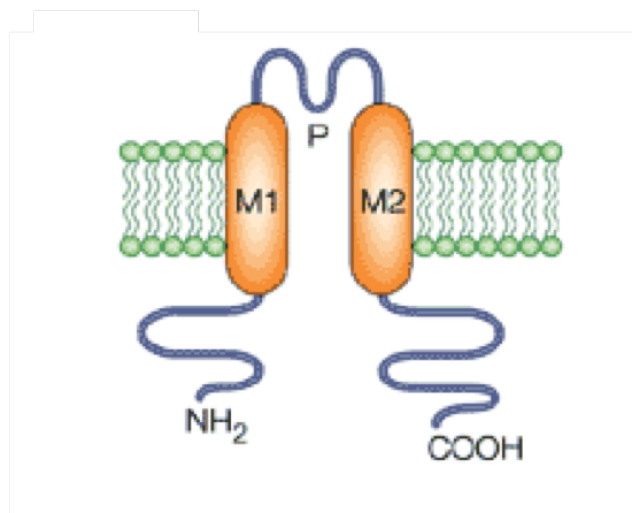
A I_{Ks} aktiválódása jóval lassabb, mint a I_{Kr} esetében megfigyelhető. Aktiválódása az AP plató fázisa alatt zajlik, majd negatív membránpotenciál értékeknél gyorsan deaktiválódik, inaktiváció nélkül (78,98). A I_{Ks} kinetikája és profilja jelentős fajok közötti különbségeket mutat (77–79,99–101). A humán mintán mérhető áramokkal (98,102,103) összehasonlítva megállapítható, hogy azokkal a kutyaszíven mért eredmények korrelálnak legjobban.

A I_{Ks} szimpatikus tónusfokozódás hatására (β -adrenerg aktiváció) aktiválódik, jelentősen megnő az amplitúdója (104,105). Ennek háttérében a cAMP-PKA útvonal mellett újabban a CaMKII útvonal szabályozó szerepét is felvetik (106). Ezen kívül az AP hosszának növekedése esetén is megfigyelhető a I_{Ks} amplitúdójának növekedése és ezáltal - bizonyos határok között - képes más, a repolarizációban részt vevő ionáramok működésének ellensúlyozására, helyettesítésére (107–109). A I_{Ks} fő szerepe az AP hossz növekedésének ellensúlyozása, de fiziológiás esetben kevésbé járul hozzá a humán szívizomsejtek repolarizációjához. Biztosítja a repolarizációs homogenitást, így egy védelmi vonalat biztosít kamrai ritmuszavarok, például a Torsade de Pointes aritmia ellen (110,111).

Számos I_{Ks} gátló szer ismert. A Chromanol 293B-t szelektív I_{Ks} gátlószernek fejlesztették, azonban a teljes gátlást előidéző koncentrációk (30-50 μ M) esetén már jelentős I_{to} gátlást is tapasztaltak (112,113). A HMR-1556 a Chromanol egyik analógja, mely annál jóval szelektívebbnek bizonyult (114–117).

2.3.2. A befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})

A befelé egyenirányító káliumáramért a feszültségfüggő káliumcsatornák egy speciális típusa felelős. Szerkezetükre jellemző, hogy 2 TM-doménból és 1 pórusformáló régióból állnak (86) (7. ábra). Intracelluláris N- és C-terminálissal rendelkeznek, ionszelektivitásukat egy Gly-(Tyr/Phe)-Gly aminosav szekvenciájú régió biztosítja. Nevét onnan kapta, hogy biofizikai karakterisztikája erőteljes befelé történő egyenirányítást mutat. Ezt a befelé egyenirányítást nagyméretű poliaminok (spermidin³⁺, spermin⁴⁺) valamint Mg²⁺ ionok biztosítják, melyek az intracelluláris oldal felől kapcsolódnak a csatornafehérjéhez és megváltoztatják annak szerkezetét (118–120).



7. ábra: A befelé egyenirányító káliumcsatornák általános szerkezete. Az ioncsatorna 2TM doménból áll, az N- és C-terminális intracellulárisan helyezkedik el. Choe és munkatársai alapján módosítva (86).

A szívizomban főként a $K_{ir2.1}$ fehérje által kialakított csatorna van jelen (121). Az ioncsatorna biztosítja a nagy nyugalmi kálium-permeabilitást, így az áram fő funkciója a nyugalmi membránpotenciál fenntartása. A csatornán -30 mV-nál negatívabb membránpotenciál értékek esetén nagy mennyiségű töltés jut keresztül, ennél pozitívabb értékeknél azonban gyakorlatilag megszűnik az áram (4). Működésére több tényező is hatással van. Az extracelluláris K^+ koncentráció növekedése növeli az I_{K1} konduktanciáját (122), ezzel szemben az extracellulárisan alkalmazott Ba^{2+} , Cs^+ valamint különböző antiaritmiás szerek (pl. Amiodaron)(123) gátolják az ioncsatornát. Leírták továbbá az intracelluláris acidózis, az oxidatív stressz és a lizofoszfatidil-kolin gátló hatását is (124–126).

2.4. Klinikai aspektusok

Az ioncsatornákat érintő mutációk, elváltozások változatos klinikailag is megnyilvánuló kórképekben mutatkoznak meg. A különböző ioncsatorna-betegségek több szervrendszert érinthetnek.

Az SCN5A-gén által kódolt csatorna ($I_{NaV1.5}$) mutációja igen változatos kardiológiai kórképeket okozhat. Funkciónyerő mutációi a hosszú QT-szindróma 3-mas típusát okozzák. Ilyenkor a késői nátriumáram tranzienst inaktivációja károsodik, megnövelve az akciós potenciálok időtartamát (127,128). Az SCN5A funkcióvesztő károsodása Brugada-szindrómához vezethet (129). háttérben többféle mechanizmus állhat. A nátriumcsatornák inaktivációját követő lassabb reaktiváció, illetve a csatorna megnyílását követő gyors inaktiváció is feltételezhető.

A $I_{Na,L}$ növekedését leírták még többek között szívelégtelenségben (15,130–134), továbbá szívizom ischaemiát követő reperfüziós károsodás is növelheti az áram denzitását (135,136), emellett farmakológiai hatásokra is nőhet az áram denzitása (137). A megnövekedett $I_{Na,L}$ növeli az akciós potenciál időtartamát, repolarizációs inhomogenitáshoz, valamint korai (EAD) és késői (DAD) utódepolarizációkhoz vezethet, melyek életveszélyes, kamrai ritmuszavarokat generálhatnak (132,138–140).

A fentiekén kívül leírtak még izolált kamrai vezetészavart (ICCD), autoszomális recesszív sick sinus szindrómát (SSS), familiáris paroxysmalis kamrafibrillációt de az SCN5A gén érintettségét a hirtelen bölcsőhalálban is felvetik (141).

A $Ca_v1.2$ -fehérjét ($I_{Ca,L}$) kódoló CACNA1C gén pontmutációja okozza a Timothy-szindrómát. A Timothy-szindróma egy több szervrendszert érintő betegség. Szívritmuszavarok, hosszú QT-szindróma, idegrendszeri érintettség, autizmus és syndactilia képében jelentkezik (142,143).

A korábban hosszú QT-szindróma 4. típusaként emlegetett ún. ankirin-B szindróma háttérben az ankirin-B proteint kódoló ANK2 gén mutációja áll. Az ankirin-B a nátrium-kalcium cserélő kihorgonyzásában játszik szerepet (144). Az ANK2 gén funkcióvesztő mutációja fenotípusosan változatos ritmuszavarokat okoz (pl.: sick sinus szindróma, pitvarfibrilláció, idiopátiás kamrafibrilláció, testedzés indukálta kamrai tachycardia) (145).

A KCNH2 gén ($K_v11.1$) funkcióvesztő mutációi nyomán az I_{Kr} amplitúdója és sűrűsége is csökken, ami LQT2-t okoz (146,147). A KCNH2 funkciónyeréses mutációja is lehetséges, mely rövid-QT szindrómához vezet. Ekkor azonban a csatorna C-típusú inaktivációja is károsodik, valamint a K^+ szelektivitását is elveszíti a csatorna (148).

A KCNQ1 gén funkcióvesztése során a Kv7.1 fehérje (I_{Ks}) működése károsodik. Domináns formában a hosszú-QT szindróma 1. típusáért, recesszív formában pedig Jervell–Lange–Nielsen-szindrómáért felelnek (149,150). A KCNQ1 funkcióyerése is lehetséges, ekkor fenotípusosan a rövid-QT szindróma 2. típusa jelenik meg (151). Leírták továbbá a KCNQ1 gén funkcióyeréses mutációját familiáris pitvarfibrillációban is.

Az ún. Andersen-Tawil szindrómát a Kir2.1 fehérjét kódoló KCNJ2 gén funkcióvesztése okozza. A betegség során az I_{K1} működése károsodik. A hosszú QT-szakaszon kívül periodikus paralízis, illetve craniofacialis eltérések jellemzik a kórképet (152). A KCNJ2 funkcióyerése rövid-QT szindrómát (3. altípus) okoz (153).

3. Célkitűzés

Számos kutatás vizsgálta a szívműködés ionáramait, azonban ezek a publikált eredmények egyrészt ellentmondásosak, másrészt a mérések döntően hagyományos feszültség-clamp technikával történtek, sokszor az élettani körülményektől jelentősen eltérő viszonyok között (szobahőmérséklet, eltérő ionösszetétel) (39,62). Ezért munkánk során a célkitűzéseink a következők voltak:

- Vizsgáljuk az akciós potenciál kialakításában résztvevő különböző ionáramok egymáshoz való viszonyát az in vivo körülményeket jól modellező akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között.
- Tanulmányozzuk az akciós potenciál kialakításában résztvevő depolarizáló és repolarizáló áramok paramétereinek közötti korrelációkat.
- Fiziológiai körülmények között vizsgáljuk az akciós potenciál terminális repolarizációjának eseményeit, valamint a repolarizációban részt vevő ionáramok (I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}) és a késői nátriumáram kalciumfüggését.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Szívizomsejtek izolálása

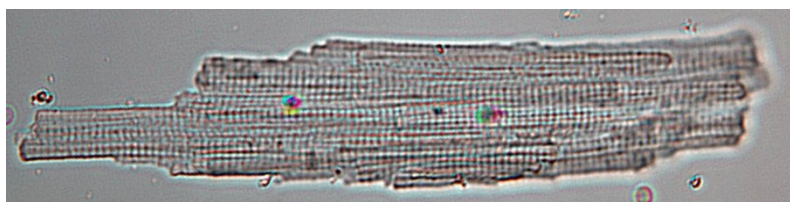
A kutatás során kutyák szívének bal kamrájából enzimatis emésztéssel nyert szívizomsejteken dolgoztunk. Azért ezt az állatmodellt választottuk, mert a humán szív legjobb elektrofiziológiai modelljének jelenleg a kutyaszívet tartják (21). A szívizomsejteket kísérleti célra tenyésztett, ivarérett, vegyes nemű kutyák szívéből izoláltuk. A sejtizolálás során az ún. anterográd szegmens-perfúziós technikát alkalmaztuk (154). Az állatok altatásához 10 mg/ttkg dózisban alkalmaztunk ketamin-hidrokloridot (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Magyarország), melyet 1 mg/ttkg dózisú xylazin-hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV) adásával egészítettünk ki. A mellkas megnyitását követően gyorsan kiemeltük a szívet, ezt követően a bal elülső leszálló koszorúseret (LAD) kanuláltuk. A LAD vérellátási területének megfelelően Langendorff apparátus segítségével perfundáltuk a szívizmot.

A sejtizolálás első fázisában (kb. 5 perc) 2,5 g/l taurint, 175 mg/l piruvátot, 13,5 mg/l allopurinolt, 750 mg/l ribózt, 1,3 g/l NaHCO₃-ot és 200 mg/l NaH₂PO₄-ot tartalmazó, Ca²⁺ mentes, módosított JMM oldatot (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, termékazonosító: M0518; Sigma) alkalmaztunk, hogy eltávolítsuk a szívizomszövet vér és Ca²⁺ tartalmát.

Az enzimatis emésztés során körülbelül 30 percig perfundáltuk a szívet kollagenázt (660 mg/l, 215 u/mg Type II.; Worthington), borjú albumint (2 g/l, Fraction V., Sigma) tartalmazó JMM oldattal. A sejtizolálás során végig karbogén gázzal ekvibráltuk az alkalmazott oldatokat, a hőmérsékletet állandó, 37 °C-on tartottuk.

Az enzimatis emésztés után az LAD ellátási területének megfelelően a bal kamra elülső falában egy a szívcsúcs felé eső U-alakú metszést ejtettünk a kamrafal midmiokardiális rétegében, ezzel szabaddá téve az elfolyósodott izomszövetet.

Az elfolyósodott szövetdarabokat 50 μM Ca²⁺ -ot tartalmazó JMM-oldatban szuszpendáltuk. Ezt a sejtszuspenziót több ülepítési cikluson át szűrtük, illetve mostuk át egyre növekvő Ca²⁺-koncentrációjú JMM oldattal. A sejtizolálást követően a sejteket 2,5 mM Ca²⁺ koncentrációjú módosított JMM oldatban, 14 °C -on tároljuk a kísérletek megkezdéséig. A méréseket a sejtizolálástól számítva leghamarabb 2-3 órával később kezdtük. Az izolálások során nyert sejtek átlagosan 40-60%-a volt téglalap alakú, éles szélű, ép citoplazmájú és ép harántcsíkolatú. A mérések során a megfelelő sejt kiválasztásához ezeket a tulajdonságokat figyeltük, mert ezek nagyban meghatározzák a sejtek életképességét.



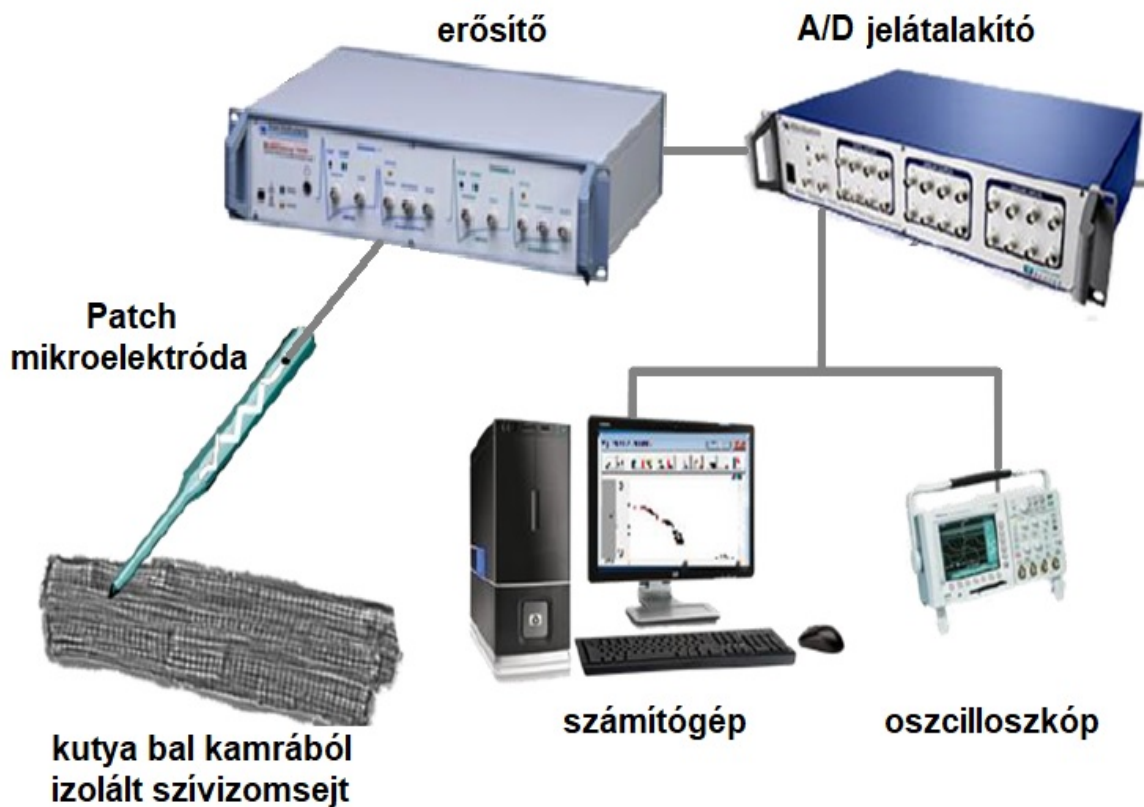
8. ábra: Izolált szívizomsejt az emésztési és szűrési folyamatot követően, mikroszkóp alatt. A sejt téglalap alakú, éles szélű. Ép harántcsikolatot és tiszta citoplazmát mutat.

Minden elvégzett kísérlet összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publication No 85-23. revised 1996) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (No. 51-57/1997 OEJ)(9/2015/DEMÁB).

4.2. Ionáram mérés akciós potenciál feszültség clamp technikával (APVC)

A mérések kezdetén a szívizomsejteket egy állandó 37 °C hőmérsékletű, 0,5 ml térfogatú plexiüveg mérőkádba helyezzük, mely egy invertált mikroszkóp (Nikon Eclipse TE2000-U; Nikon Corporation, Tokyo, Japán) tárgyasztalában foglal helyet. A sejteket bikarbonátot tartalmazó módosított Tyrode oldattal (121 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glükóz, pH=7,35) perfundáltuk 1-2 ml/perc sebességgel, gravitáció-vezérelt perfúziós rendszerrel.

Az áramjeleket MultiClamp 700B erősítő (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) segítségével regisztráltuk. A kimenő jeleket Digidata 1440A készülékkel (Molecular Devices) végzett analóg-digitális átalakítás után rögzítettük pClamp 6.0 és 10.0 (Axon Instruments Inc.) szoftverek alkalmazásával. A mérések során alkalmazott kísérletes elrendezést a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra: Az APVC mérések során alkalmazott kísérleti elrendezés. A szívizomsejtből elvezetett áramjelet egy erősítő továbbítja az A/D jelátalakítóba, ami digitalizálja azt, így teszi lehetővé, hogy számítógépen rögzítsük, tároljuk és értékeljük az áramjeleket.

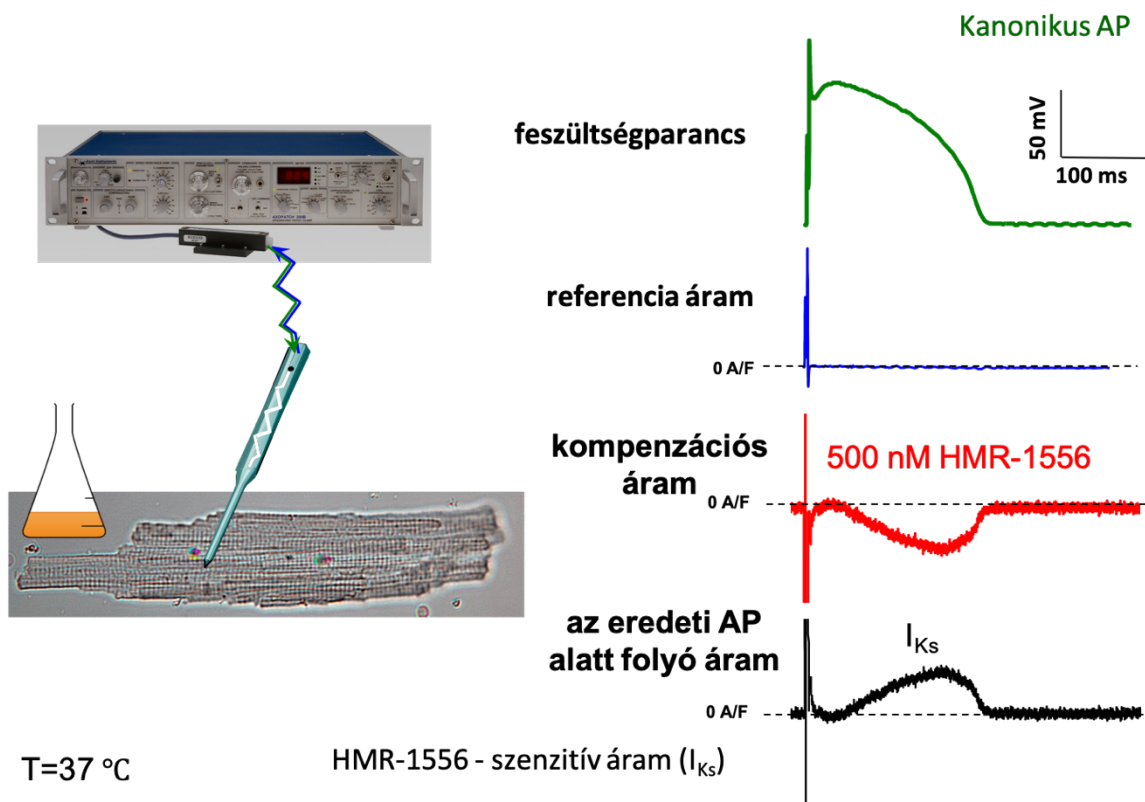
A mérésekhez 2-3 M Ω ellenállású boroszilikát mikroelektródákat (patch pipetta) használtunk. A patch pipettákat P-2000 típusú pipettahúzó használatával (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) készítettük. A pipetta belső oldatának a végső összetétele eltérő volt a különböző kísérletek során, azonban minden esetben ugyanaz a meghatározott összetételű alapbelső oldat került kiegészítésre. Ennek az alapoldatnak az összetétele a következő volt: 120 mM K-aszpartát, 30 mM KCl, 3 mM MgATP, 10 mM HEPES, 3 mM foszfo kreatinin, 0,01 mM EGTA, 0,002 cAMP, 10 mM KOH (pH=7,3). A CaMKII útvonal gátlásának vizsgálata során ezt az alapoldatot 1 μ M koncentrációjú KN-93-mal egészítettük ki.

Az APVC mérések során a pipettával, a mikroszkóp alatt, megközelítettük a vizsgált sejtet, majd a pipetta hegyével a sejt felszínét megérintve enyhe szívással csökkentettük a pipettában lévő nyomást, így egy nagy ellenállású kapcsolatot (1-10 G Ω) ún. „gigaseal” -t alakítottunk ki. A gigaseal kialakítását követően újabb szívással tovább csökkentve a pipetta

nyomását áttörtük a pipettába türemkedett membránrészletet, így kaptuk meg a patch-clamp technika egészsejtes elrendezését (155). Minden kísérlet elején meghatároztuk a vizsgált sejt kapacitását, mely egy rövid +10 mV-ról -10 mV-ra történő 15 ms hosszúságú, hiperpolarizáló áramimpulzus segítségével történt. A membránkapacitás mérésére azért volt szükség, mert a mért ionáramokat a sejtek membránjának kapacitására normalizáltuk, melynek nagysága arányos a sejtmembrán felületével. A mérések alatt a soros ellenállás 4-8 M Ω volt, az ennél nagyobb, illetve a mérés során fokozatosan növekedő soros ellenállás esetén a mérést elvetettük. Az egészsejtes konfiguráció kialakítását követően a sejteket folyamatosan stimuláltuk 0,7 szekundum hosszúságú ingerlési ciklushossz mellett.

Feszültségparancsként, a mérések jobb összehasonlíthatósága érdekében, minden esetben ugyanazt az előzetesen regisztrált, midmiokardiális szívizomsejtből származó akciós potenciált, az ún. kanonikus AP-t alkalmaztuk. A kanonikus AP alkalmazásának előnye a sejt saját akciós potenciáljával szemben, hogy kiküszöböli az egyes sejtek saját AP-ja közötti morfológiai különbségeket.

A kanonikus AP-val stimulálva a sejteket, közel nulla áramot mérünk. Ezt tekintjük referencia áramnak. Ezt követően a vizsgálni kívánt ionáram specifikus gátlószerét alkalmazva a gátolt ioncsatorna működését az erősítőnek kell pótolnia, ami így negatív előjellel az ún. kompenzációs áramot eredményezi. A kompenzációs áramot kivonva a referencia-áramból megkaptuk az eredeti, AP alatt folyó hatóanyag-szenzitív ionáramot (10. ábra).



10. ábra: Az APVC technika elve a HMR-1556 szenzitív áram (I_{Ks}) példáján bemutatva. az ábrán a szaggatott vonalak a nulla vonalat jelölik. A zöld színű analóg görbe a feszültségparancsként alkalmazott kanonikus AP, a kék szín a feszültségparancs alkalmazására kialakuló referencia áramot jelöli. A kompenzációs áramot piros színnel jelöltem, a referencia áram (kék) és a kompenzációs áram (piros) különbségének megfelelő valódi, AP alatti, hatóanyag-szenzitív ionáram fekete színnel van feltüntetve. Részletes magyarázatot lásd a szövegben.

4.3. Az onion-peeling módszer

Az ún. onion-peeling módszerrel egy sejten több ionáramot is vizsgálhatunk. A technika lényege, hogy a sejtet kumulatív módon, különböző ioncsatornák specifikus gátlószert tartalmazó oldattal perfundáljuk. Az oldatok sorrendje fontos, hiszen a legspecifikusabb gátlószert kell először alkalmazni, hogy egy kevésbé szelektív csatornagátló (pl.: BaCl_2) ne hamisítsa meg a mérési eredményeinket. Az APVC-mérések során minden esetben a perfúziós oldatok alapja a korábban feltüntetett bikarbonátot tartalmazó módosított Tyrode-oldat volt. Ehhez adtuk hozzá a különböző csatornagátlószereket meghatározott sorrendben és

koncentrációban. A vizsgált áramok sorrendje a következő volt: 1. $I_{Na,L}$; 2. I_{NCX} ; 3. $I_{Ca,L}$; 4. I_{Kr} ; 5. I_{Ks} ; 6. I_{K1} Az alkalmazott gátlószereket és koncentrációjukat az 1. táblázat tartalmazza.

Vizsgált ionáram	Gátlószer	Koncentráció
$I_{Na,L}$	GS-967	1 μ M
I_{NCX}	ORM-10962	0,5 μ M
$I_{Ca,L}$	Nizoldipin	1 μ M
I_{Kr}	E-4031	1 μ M
I_{Ks}	HMR-1556	0,5 μ M
I_{K1}	BaCl ₂	50 μ M

1. táblázat: Az APVC-mérések során alkalmazott csatornablokkolók és koncentrációik.

Az APVC mérések egy másik csoportjában a főbb outward áramokat mértük, szintén onion-peeling módszerrel. Ekkor a vizsgált áramok sorrendje az alábbiak szerint alakult: 1. I_{Kr} 2. I_{Ks} 3. I_{K1} . Minden áram esetében a gátlószert tartalmazó oldattal a farmakológiai hatás stabilizálódásáig (3-4 perc) perfundáltuk a sejteket, ezt követően a kanonikus AP-val stimulált sejten mérhető áramjeleket 20-30 cikluson keresztül regisztráltuk. A mérési műtermékek, illetve a ciklusok közti különbségek kiküszöbölésére a 20-30 ciklus alatt kapott áramjeleket átlagoltuk, majd kivontuk a referencia áramból, így kaptuk meg az adott hatóanyagra szenzitív ionáramot.

4.4. Ionáram mérés konvencionális feszültség clamp technikával

A késői nátriumáram gátlására alkalmazott GS-967 alkalmazása során felmerült a lehetősége annak, hogy a GS-967 hatással van nem csak a $I_{Na,L}$ -ra, hanem az $I_{Ca,L}$ -ra is. Ennek a kizárása érdekében konvencionális feszültség-clamp méréseket végeztünk. Az egészsejtes konfiguráció kialakítását követően feszültségparancsként négyszögimpulzusokat alkalmaztunk.

A kalciumáram mérése során a sejtek stimulálására egy 200 ms hosszúságú teszimpulzust használtunk, amely -80 mV-os tartófeszültségről indult. Ezt követte egy 15 ms hosszúságú -80 mV-ról -40 mV-ra depolarizáló előimpulzus, mellyel inaktíváltuk a nátriumcsatornákat, majd a teszimpulzus során +5 mV-ra depolarizáltuk a sejteket (11. ábra).



11. ábra: A konvencionális feszültség clamp mérések során alkalmazott feszültségimpulzus. A -80 mV-os tartófeszültségről induló tesztimpulzus tartalmazott egy 15 ms hosszúságú -40 mV-ra depolarizáló előimpulzust. A tesztimpulzus teljes hossza 200 ms volt.

A konvencionális mérések esetében a Tyrode oldatot az alábbi anyagokkal egészítettük ki: 10 μM TTX, 1 μM E-4031, 50 μM chromanol 293B és 3 mM 4-aminopyridin. Erre azért volt szükség, hogy a nátrium- és káliumcsatornák működését gátoljuk.

4.5. Akciós potenciál mérések hegyes mikroelektrodával

A szívizomsejtek transzmembrán potenciál változásait boroszilikát kapillárisból készített magas ellenállású (20-40 M Ω) hegyes mikroelektrodával mértük. Az elektrodák belső oldata ebben az esetben 3 M koncentrációjú KCl oldat volt.

A sejteket 1 másodperces ingerlési ciklushosszal stimuláltuk 1-2 ms hosszúságú négyszögimpulzusokkal, melyek amplitúdóját az ingerküszöb kb. 120%-ára állítottuk. Az egyensúlyi állapot elérését követően az impulzusok ciklushosszát változtattuk 0,3 és 2 másodperc között. Minden ciklushosszon 50 AP-t regisztráltunk, majd változtattuk a frekvenciát. Ez a mérési technika lehetővé teszi, hogy lényegében steady-state körülmények között vizsgáljuk egyes hatóanyagok frekvenciafüggését.

Az akciós potenciálok digitalizálása során a mintavételi frekvencia 200 kHz-es volt. A digitalizált AP-kat a számítógépen tároltuk a későbbi kiértékelésig.

4.6. Intracelluláris Ca²⁺ koncentráció és sejtrövidülés mérése

A szívizomsejtek intracelluláris Ca²⁺ tranzienseinek méréséhez a sejteket 6 μM Fura-2 AM-mel töltöttük 12 percen át, Tyrode oldatban, Pluronic F-127 jelenlétében. Ezt követően 30 percig szobahőmérsékleten, fénytől elzárt helyen pihentettük a sejteket, ezidő alatt az intracelluláris térben a festék deészterifikálódott. A 30 perc letelte után a kísérletekig 15 °C-on tartottuk a szívizomsejteket.

A mérések során a sejtek stimulációjához platinum elektródokat alkalmaztunk. Parancsjelként egy supramaximális 2 ms négyszögimpulzust adtunk, az impulzusok ciklushossza pedig 0,7 másodperc volt.

Az Ca^{2+} tranzienseket minden esetben 37 °C-on mértük alternáló, kettős sugárgerjesztésű fluoreszcens fotométer (Photon Technology International, New Brunswick, NJ, USA) segítségével. A mérés elve, hogy míg a Ca^{2+} -ot nem kötött festék abszorpciós maximuma 340 nm, addig a Ca^{2+} -ot kötött festéké 380 nm, így a két különböző gerjesztési hullámhossz alkalmazása után mért fluoreszcens fény intenzitásának a hányadosából következtethetünk az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra. A fluoreszcencia emisszióját 510 nm-en mértük egy R1527P fotoelektron-sokszorozó (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH., Herrsching am Ammersee, Germany) használatával. A háttérfluoreszcencia minden esetben levonásra került. Az analízis során 10 egymást követő Ca^{2+} tranzienszt átlagoltunk. A jelek digitalizálását 500 Hz-en végeztük a FeliX Software (Photon Technology International, New Brunswick, NJ, USA) alkalmazásával.

A szívizomsejtek hosszának rövidülésének mérése szintén platinaelektródok segítségével, téringlerléssel stimulált sejteken történt. A kísérletekhez egy speciális, a sejtek szélét érzékelő kamerát alkalmaztunk (VED-105, Crescent Electronics, Sandy, Utah, USA). A mintavételezési frekvencia 240 Hz volt. Az analóg jeleket erősítettük (DC amplifier, Főnixcomp Ltd, Hungary), digitalizáltuk (Digidata 1440A, Molecular Devices), majd számítógépen rögzítettük a pClamp 10 szoftver (Molecular Devices) segítségével. A sejthossz mérését megelőzően a rendszert hemocitométerrel kalibráltuk. A sejthossz rövidülést minden esetben a kiindulási diasztolés sejthosszhoz viszonyítva fejeztük ki (frakcionált rövidülés). Minden vizsgált esetben 10-10 görbét regisztráltunk 1 μM nizoldipin hozzáadása előtt és után. Az analízis során a sejtrövidülések görbéit átlagoltuk.

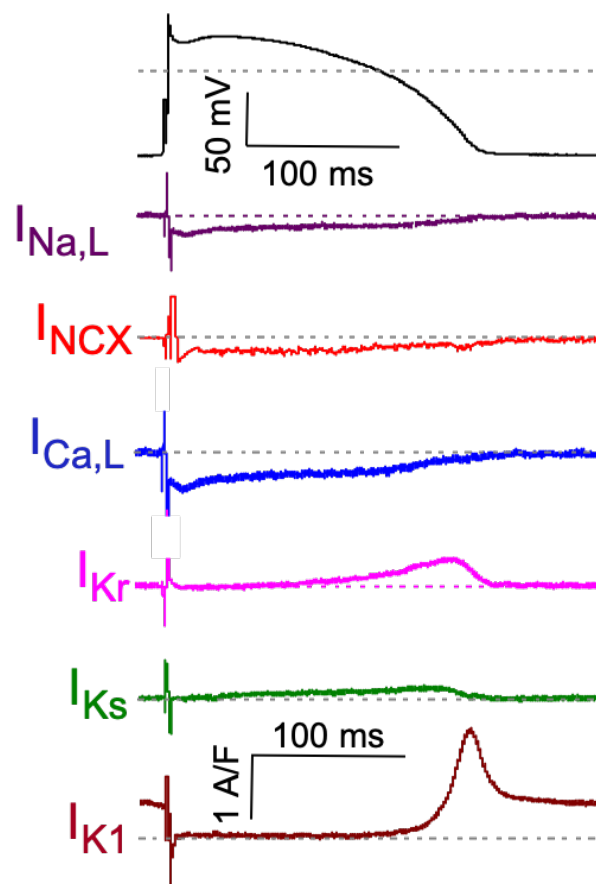
4.8 Statisztikai elemzés

A dolgozatban szereplő adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei \pm a középértékek körüli standard hiba. A csoportok közötti statisztikai szignifikanciát egyszempontos varianciaanalízissel, majd Student-féle t-próbával vizsgáltuk. Két változó közötti korreláció vizsgálatához korrelációanalízist végeztünk, a korrelációkat Pearson-féle korrelációs koefficienssel (r), és az egyenes meredekségével (m) fejeztük ki. A korrelációs koefficiens és meredekségek közti szignifikanciát, szintén Student-féle t-próbával vizsgáltuk. A különbségeket és a korrelációkat szignifikánsnak tekintettük azokban az esetekben, amikor a p érték kisebb volt, mint 0,05.

5. Eredmények

5.1 A szívizomsejtek főbb ionáramprofiljainak meghatározása

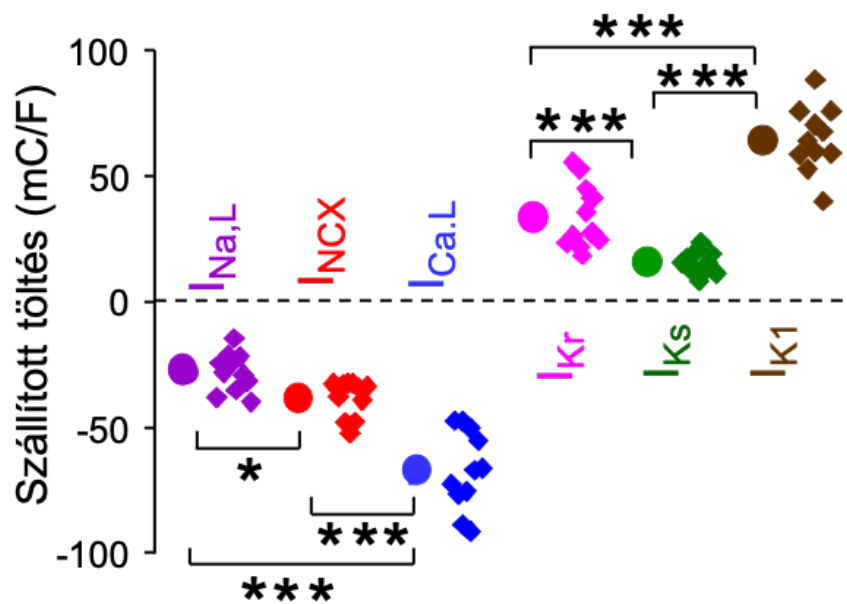
A szívizomsejtek főbb depolarizáló és repolarizáló ionáramainak vizsgálata során első lépésként akciós potenciál feszültség clamp módszer (4.2 fejezet) segítségével meghatároztuk a vizsgált ionáramok profilját, fiziológias körülmények között. A kísérletek során az ionáramok farmakológiai szeparálásához az onion peeling technikát (4.3 fejezet) alkalmaztuk (12. ábra). Az alkalmazott gátlószereket az 1. táblázatban tüntettük fel.



12. ábra: A vizsgált depolarizáló és repolarizáló ionáramok, és AP alatti profiljuk. Az áramprofilok meghatározását onion-peeling technikával végeztük. A szaggatott szürke vonal minden esetben a nulla vonalat jelöli.

Az áramjelek analízise során meghatároztuk az áramamplitúdót, az ionáramok által szállított töltésmennyiséget, és a plató fázis közepén mérhető áramdenzitást. Az áram amplitúdójának az áramjel csúcsertékét tekintettük, az áramok által szállított töltés mennyiségét

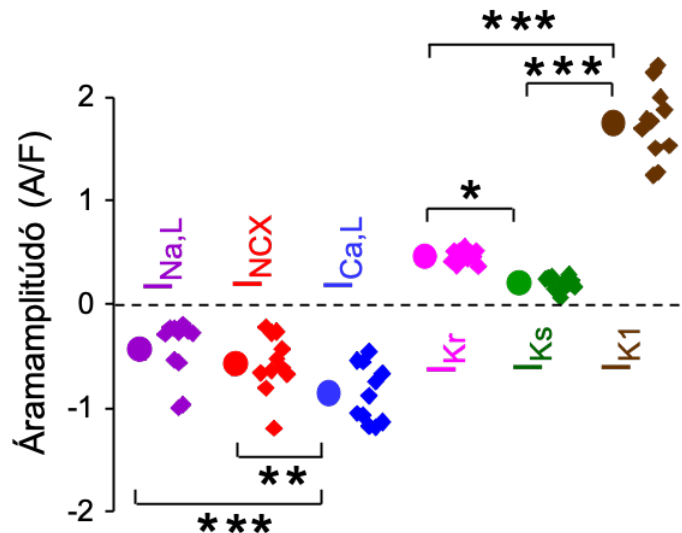
pedig a nulla vonalhoz viszonyított görbe alatti területként definiáltuk. A plató közepi áramdenzitást a 90%-os repolarizációhoz tartozó AP időtartam (APD₉₀) felénél mért áramdenzitásként határoztuk meg. A depolarizáló (inward) áramok közül a legnagyobb görbe alatti területtel az I_{Ca,L} rendelkezett, mely $-72,2 \pm 6$ mC/F töltést szállított. Ezt követte sorban a I_{NCX}, $-37,3 \pm 2,5$ mC/F, a I_{Na,L} által szállított töltés mennyisége pedig $-27,7 \pm 2,3$ mC/F volt. A repolarizáló (outward) áramok esetében a legnagyobb a I_{K1} adódott ($64,86 \pm 3,9$ mC/F), melyet a I_{Kr} ($34,1 \pm 3,9$ mC/F) majd a I_{Ks} ($15,64 \pm 1,3$ mC/F) követett (13. ábra).



13. ábra: A vizsgált ionáramok által szállított töltés mennyisége és egymáshoz való viszonyuk. Az áramok által szállított töltés mennyiségét az áramgörbék integráljaként határoztuk meg. A rombusz alakú szimbólumok az egyes mérési eredményeket, míg a kitöltött körök azok átlagát jelölik. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Az áramamplitúdókat összevetve szintén hasonló sorrendet kaptunk (14. ábra). A depolarizáló áramok közül a legnagyobb amplitúdója az L-típusú kalciumáramnak volt, $-1,01 \pm 0,086$ A/F. Ettől kisebbnek bizonyult a I_{NCX} és a I_{Na,L}, melyek amplitúdói rendre $-0,57 \pm 0,085$ A/F és $-0,43 \pm 0,091$ A/F voltak. Az repolarizáló áramokat is vizsgálatuk, itt a szállított össztöltéshez hasonlóan, a legnagyobb áramamplitúdót a I_{K1} esetében mértük $1,75 \pm 0,1$ A/F. Ezt követte a I_{Kr},

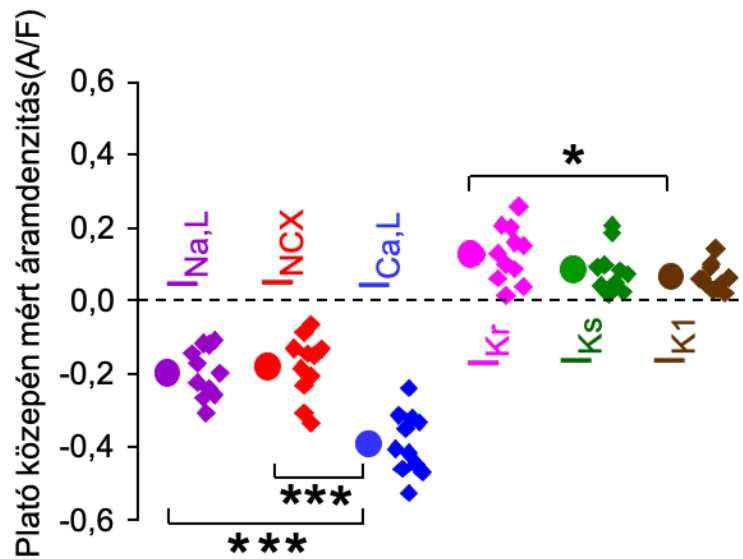
melynek legnagyobb áramsűrűsége $0,46 \pm 0,018$ A/F volt. A legkisebb amplitúdójú áramnak a I_{Ks} bizonyult, $0,2 \pm 0,02$ A/F.



14. ábra: Az ionáramok amplitúdói. Az áramamplitúdókat a nulla vonalhoz (szaggatott vonal) mért legnagyobb kitérésként határoztuk meg. A rombusz alakú szimbólumok az egyes mérési eredményeket, míg a kitöltött körök azok átlagát jelölik.

(*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$)

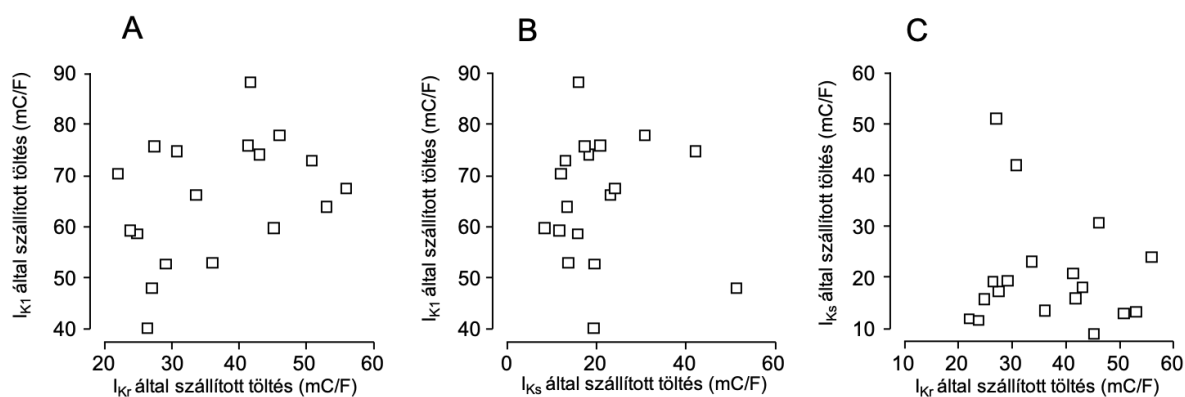
Ahhoz, hogy a különböző ionáramokról még átfogóbb képet kapjunk, és minél sokrétűbben tudjuk vizsgálni a fenti paraméterek közötti korrelációkat, megvizsgáltuk a plató fázis közepén mért áramsűrűségeket is. Ezeket összevetve megállapítottuk, hogy az inward áramok közül az AP plató fázisának közepén az $I_{Ca,L}$ -nak volt a legnagyobb az amplitúdója, itt $-0,44 \pm 0,029$ A/F áramsűrűséget mértünk. Ettől kisebb értéket mértünk a I_{NCX} esetében, ahol ez az érték $-0,17 \pm 0,026$ A/F volt. A $I_{Na,L}$ plató közepén mért denzitása $-0,19 \pm 0,02$ A/F-nak adódott. Az outward áramok esetén, a plató közepén a legnagyobb áramnak a I_{Kr} bizonyult, melynek áramdenzitása $0,13 \pm 0,022$ A/F volt. Ezt követte a sorban a I_{Ks} , mely esetén $0,084 \pm 0,018$ A/F denzitást mértünk. A plató közepén mérve, a legkisebb amplitúdójú áram a I_{K1} ($0,064 \pm 0,01$ A/F) (15. ábra).



15. ábra: Az AP plató fázisának közepén mért áramamplitúdók értéke a vizsgált ionáramok esetében. Ebben az esetben az amplitúdókat az APD 90 érték felénél, a nulla vonalhoz (szaggatott vonal) viszonyított legnagyobb kitérésként határoztuk meg. A rombusz alakú szimbólumok az egyes mérési eredményeket, míg a kitöltött körök azok átlagát jelölik. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

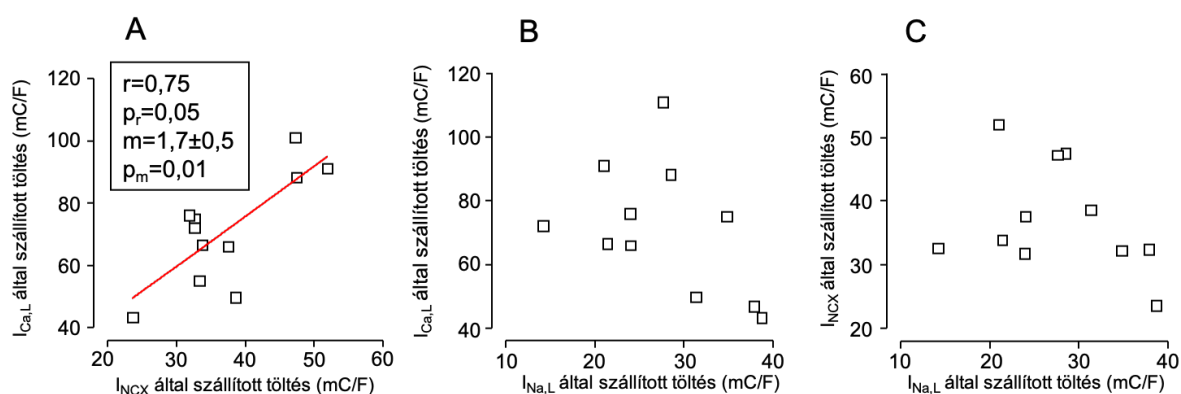
5.2 Korrelációk a szívműködés főbb ionáramainak paramétereinek között

Munkánk során tanulmányoztuk, hogy az ionáramoknak az előző fejezetben bemutatott paramétereik hogyan korrelálnak egymással. Elsőként az outward áramok paramétereit hasonlítottuk össze. Az outward áramok által szállított töltés mennyiség értékei között nem találtunk szignifikáns korrelációt (16. ábra).



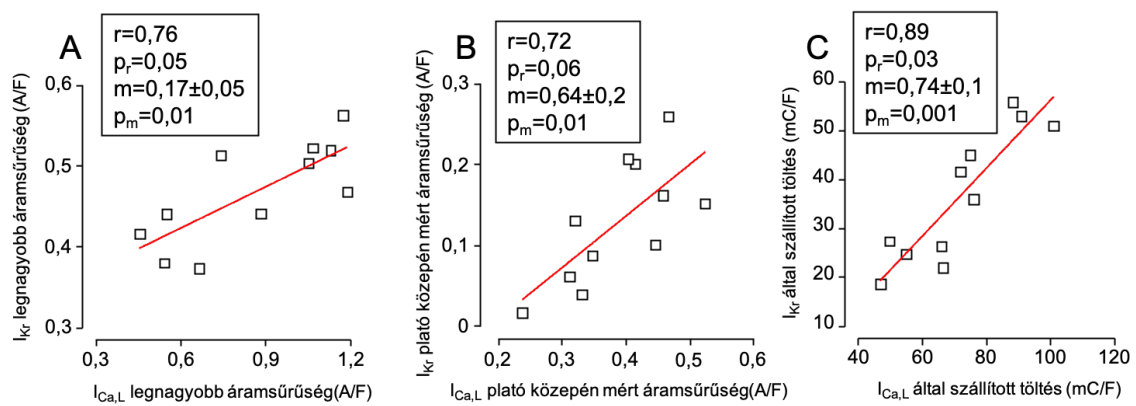
16. ábra: A vizsgált outward áramok által szállított töltések mennyiségének összehasonlítása. A korrelációkat a Pearson-féle korrelációs koefficienssel jellemeztük. A-C panel: Nem találtunk szignifikáns korrelációt sem a I_{K1} és I_{Kr} ; sem a I_{K1} és I_{Ks} ; sem pedig a I_{Ks} és I_{Kr} által szállított töltésmennyiségek között.

Az outward áramokkal ellentétben, az inward I_{NCX} és az $I_{Ca,L}$ által szállított töltésmennyiség összehasonlításakor, a Pearson-koefficiens 0,75-nek adódott, mely arra utal, hogy a két áram által szállított töltés mennyisége szignifikánsan korrelál egymással (17. ábra). A többi inward áram esetében hasonló jelenséget nem figyeltünk meg. A plató közepén mért áramdenzitás és az áramamplitúdó esetén sem találtunk kapcsolatot az inward áramok között.



17. ábra: Az inward áramok által szállított töltésmennyiségek összehasonlítása. A panel: A Pearson-féle korrelációs koefficiens ($r=0,75$) és a pontokra illesztett egyenes meredeksége alapján az $I_{Ca,L}$ és a I_{NCX} között a szállított töltésmennyiség esetében szignifikáns korrelációt figyeltünk meg. B-C panel: Az $I_{Ca,L}$ és $I_{Na,L}$, illetve a I_{NCX} és $I_{Na,L}$ által szállított töltésmennyiség esetén nem találtunk szignifikáns kapcsolatot.

Az inward és az outward áramok paramétereit egyenként, egymással is összehasonlítottuk. Szignifikáns kapcsolatot találtunk — némileg meglepő módon — az $I_{Ca,L}$ és a I_{Kr} paramétereit között (18. ábra). Összefüggést találtunk az $I_{Ca,L}$ és I_{Kr} amplitúdója, valamint a plató közepén mért denzitása és az áramok által szállított töltésmennyiség esetében is (18. ábra). Ezen felül, várható módon, az inward és az outward áramok által együttesen szállított töltés mennyiség között szintén szignifikáns korreláció áll fenn.



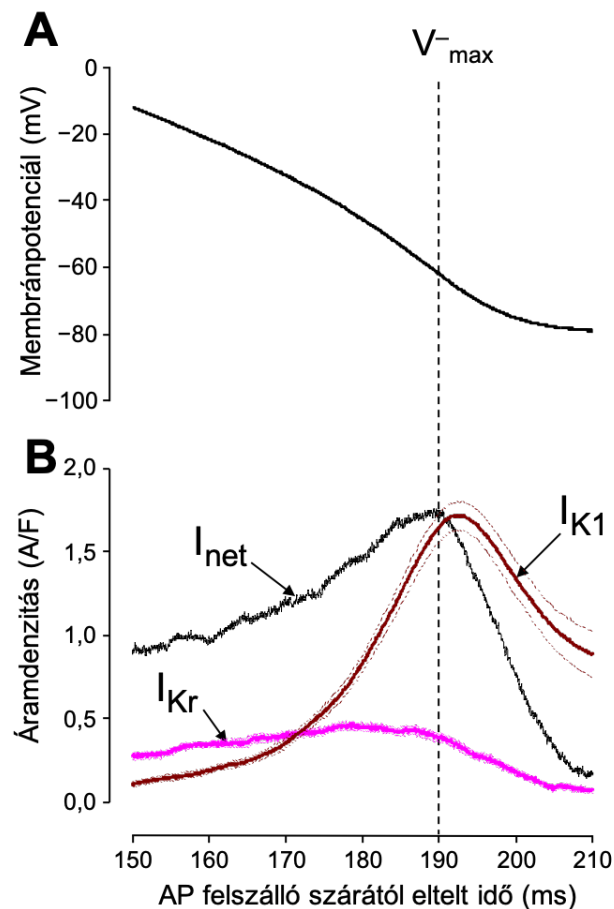
18. ábra: Az $I_{Ca,L}$ és a I_{Kr} paramétereit közötti korrelációk. A panel: A Pearson-féle korrelációs együtthatók alapján szignifikáns korrelációt találtunk a I_{Kr} és az $I_{Ca,L}$ között a legnagyobb áramsűrűség tekintetében. B-C panel: A plató közepén mért áramsűrűség (B panel) és az áramok által szállított töltésmennyiség (C panel) szintén szignifikáns korrelációt mutatott.

5.3. A terminális repolarizáció ionprofiljainak idő- és kalciumfüggése

Megvizsgáltuk az AP terminális repolarizációjában közreműködő áramokat, azok időbeli lefutását, és meghatároztuk az AP maximális repolarizációs sebességét (V^-_{max}). Ez utóbbi paraméter megfelel a membránon átfolyó nettó áramnak (I_{net}) a terminális repolarizáció során, mely a membránpotenciál értékének idő szerinti első deriváltjaként definiálható (19. ábra).

Megfigyeltük, hogy annak ellenére, hogy a I_{Kr} amplitúdói jelentősen kisebbek voltak, mint a I_{K1} -é, a I_{Kr} időben előbb, egy kevésbé negatív membránpotenciál értéknél érte el a maximumát. Így a I_{Kr} legnagyobb kitérését a V^-_{max} -hoz képest 11 ms-mal előbb, a I_{K1} pedig 3,5 ms-al később érte el. Ezek alapján feltételezzük, hogy a terminális repolarizáció elindításáért, és így az AP hosszának meghatározásáért a I_{Kr} lehet a felelős. Az AP időtartama

természetesen valamennyi repolarizáló káliumáram függvénye, de az eredményeink arra utalnak, hogy fiziológias körülmények között a I_{K1} ezt csak kisebb mértékben befolyásolhatja.



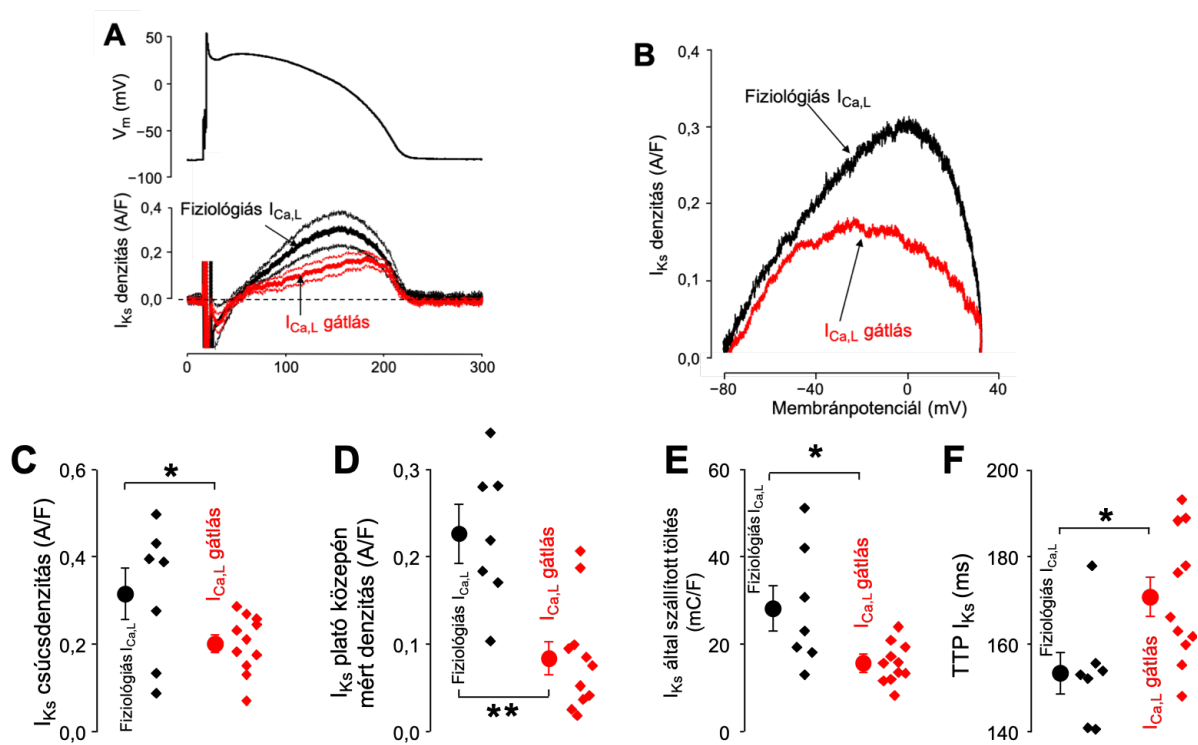
19. ábra: A terminális repolarizáció során mérhető főbb ionáramok.

A panel: A membránpotenciál értékének változása az AP terminális repolarizációja során. A V_{max} -ot a szaggatott vonal jelöli. B panel: A terminális repolarizáció alatt mérhető ionáramok profilja. Az I_{net} a membránon átfolyó nettó áramot jelenti.

Vizsgáltuk a repolarizációban részt vevő főbb ionáramok kalciumfüggését is. Az onion-peeling mérések során az ionáramok elkülönítése minden esetben az inward áramokkal kezdődött, így az általunk vizsgált összes outward, repolarizáló áram mérése $1\mu\text{M}$ GS-967 + $0,5\mu\text{M}$ ORM-10962 + $1\mu\text{M}$ nizodipin jelenlétében történt. A nizodipin gátolta az L-típusú kalcium csatornákat, így ezen mérések során mind a szubmembrán tér, mind pedig a teljes citoplazma kalciumkoncentrációja kisebb volt, a nizodipin mentes oldattal perfundált szívizomsejtekhez képest. Ezért további kísérleteinket olyan szívizomsejteken végeztük, ahol

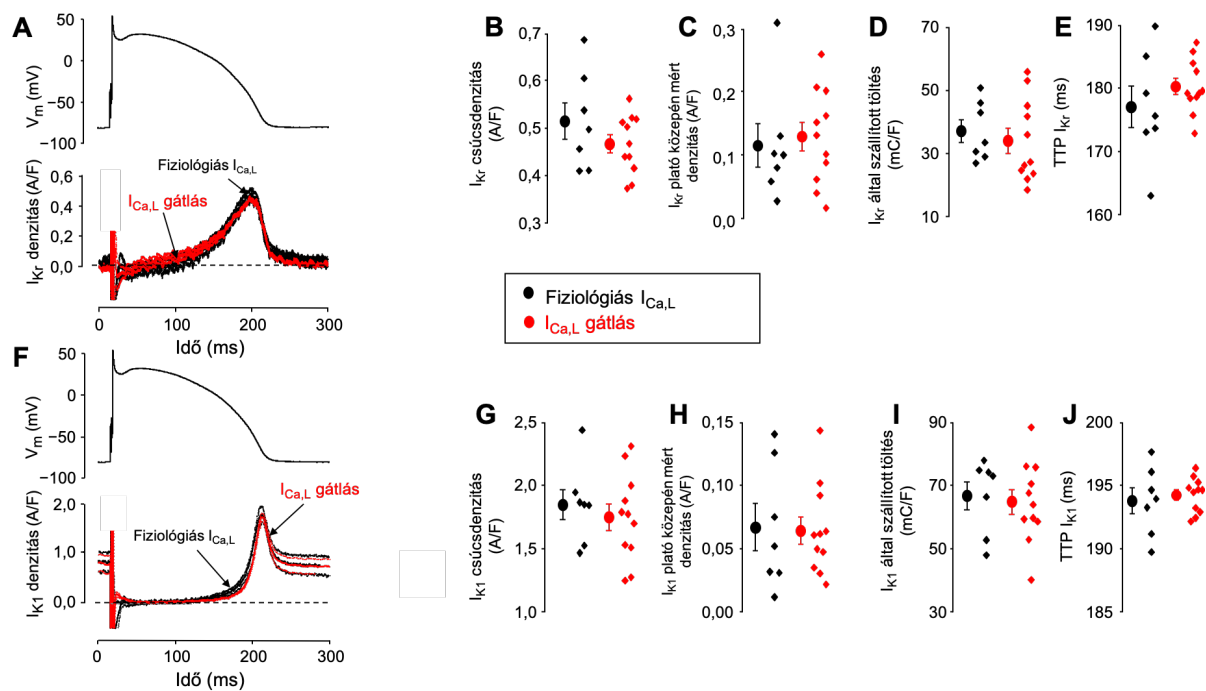
nem gátoltuk az $I_{Ca,L}$ -t, így szabad kalciumciklus mellett vizsgálhattuk az outward áramokat. Az APVC mérések során három káliumáramot (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) vizsgáltunk az onion-peeling technika segítségével, a kalciumáramok módosítása nélkül.

Megállapítottuk, hogy a késői egyenirányító káliumáram lassú komponense jelentős kalciumfüggést mutatott, az áram profiljában pedig jelentős, kalciumfüggő változásokat figyeltünk meg (20. ábra A-B panel). A szabad kalciumciklus mellett mért eredményekhez képest, gátolt $I_{Ca,L}$ esetén a maximális áramdenzitás ($0,32 \pm 0,06$ A/F-ról $0,20 \pm 0,02$ A/F-ra; $n=11$ $p < 0,05$), a plató közepén mért denzitás ($0,23 \pm 0,03$ A/F-ról $0,08 \pm 0,02$ A/F-ra; $n=11$ $p < 0,01$) illetve az áram által szállított töltés mennyisége is ($28,2 \pm 5,2$ mC/F-ról $5,6 \pm 1,4$ mC/F-ra; $n=11$ $p < 0,05$) szignifikánsan csökkent (20. ábra C-E panel). Megfigyeltük továbbá, hogy gátolt $I_{Ca,L}$ mellett a I_{Ks} az AP felszálló szarától mérve szignifikánsan később (154 ± 4 ms helyett 171 ± 5 ms; $n=11$, $p < 0,05$) érte el az áramcsúcsát (20. ábra F panel).



20. ábra: A I_{Ks} kalciumfüggése. A panel: A I_{Ks} -t APVC technikával mértük. Parancsjelként a panelen bemutatott kanonikus AP-t alkalmaztuk. A gátolt kalciumciklus jelentősen megváltoztatta a I_{Ks} akciós potenciál alatti profilját. Az AP alatti áramgörbéken a vastag vonal az átlagot, a vékonyabb vonal pedig a szórást jelöli. B panel: A szabad kalciumciklus mellett, valamint a gátolt $I_{Ca,L}$ esetén mért I_{Ks} áram-feszültség görbéje. C-F panel: A I_{Ks} paraméterei és azok változása fiziológias és gátolt kalciumciklus mellett. A rombusz alakú szimbólumok az egyes mérési eredményeket, míg a kitöltött körök azok átlagát jelölik. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$).

A I_{Ks} -vel ellentétben sem a I_{Kr} , sem pedig a I_{K1} esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget egyik vizsgált paraméter esetében sem gátolt és szabad kalciumciklus mellett (21.ábra).

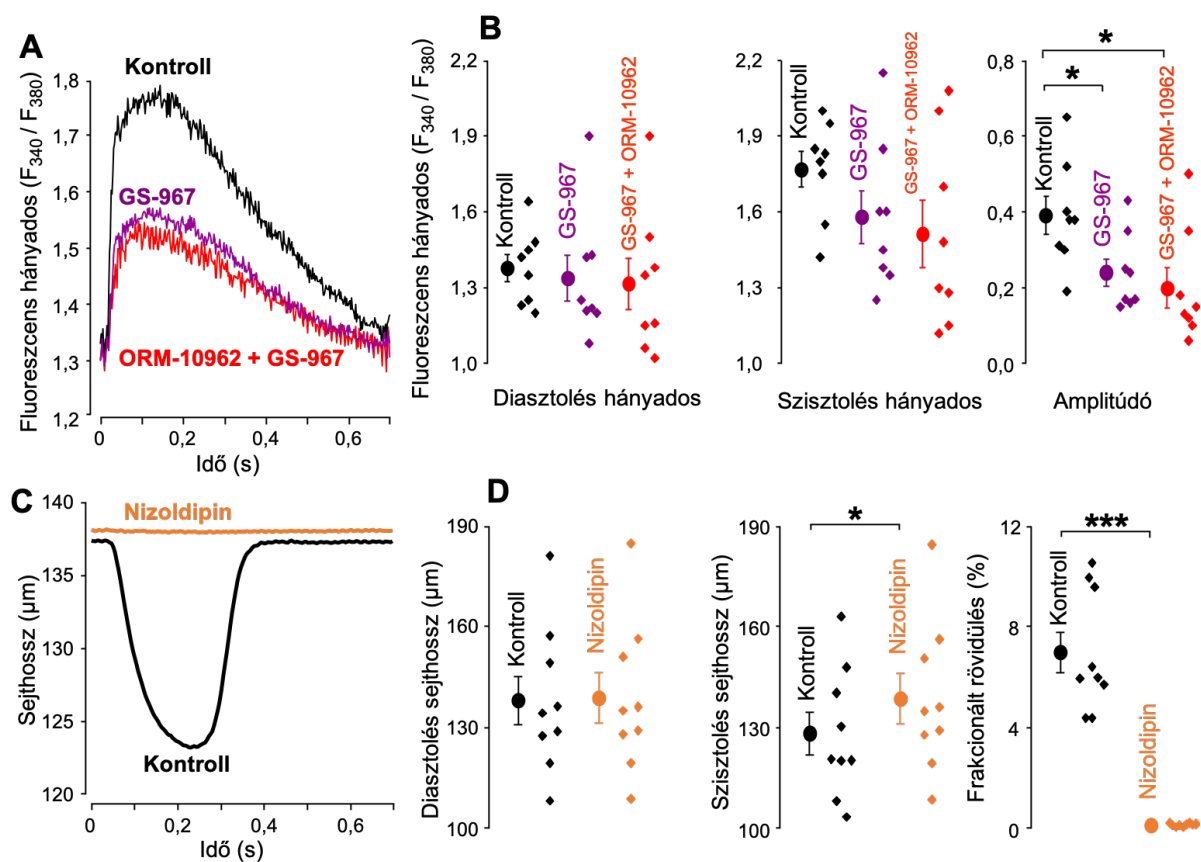


21. ábra: A I_{Kr} és a I_{K1} profilja szabad és gátolt ($I_{Ca,L}$ gátlás) kalciumciklus mellett. A I_{Kr} -t (A panel) és I_{K1} -ot (F panel) APVC technikával mértük. Parancsjelként a paneleken bemutatott kanonikus AP-t alkalmaztuk. A I_{Kr} (B-E panel) és I_{K1} (G-J panel) paraméterei nem változtak az $I_{Ca,L}$ gátlásának hatására. A rombusz alakú szimbólumok az egyes mérési eredményeket, míg a kitöltött körök azok átlagát jelölik.

5.4. Az ionáramok gátlásának hatása a szívizomsejtek intracelluláris kalciumtranzienseire

A késői nátriumáram, a nátrium-kalcium csereáram, illetve az L-típusú kalciumáram gátlásának intracelluláris kalcium koncentrációra kifejtett hatását is vizsgáltuk. Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásaira a sejtek kalciumtranziensei alapján következtettünk. Méréseket végeztünk gátlószer-mentes, kontroll körülmények között, 1 μ M GS-967, valamint 1 μ M GS-967 + 0,5 μ M ORM-10962-vel történő előkezelést követően. Megállapítottuk, hogy sem a $I_{Na,L}$ sem a I_{NCX} gátlása nem változtatta meg szignifikánsan a diasztolés és szisztolés fluoreszcens hányados értékét. Az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek amplitúdói (Ca^{2+} szisztole és diasztole során mért fluoreszcens hányados értékének különbsége) szignifikánsan csökkentek a késői nátriumáram gátlószer, a GS-967 hatására. A GS-967 alkalmazását követően a fluoreszcens hányados amplitúdója $0,4 \pm 0,05$ ről $0,23 \pm 0,03$ -ra csökkent, közöttük a t-próba alapján kapott p-érték kisebb, mint 0,05. A GS-967 után kumulatív

módon alkalmazott ORM-10962 (I_{NCX} gátlószer) nem idézett elő további csökkenést a Ca²⁺ tranziensekben (22. ábra A-B panel).



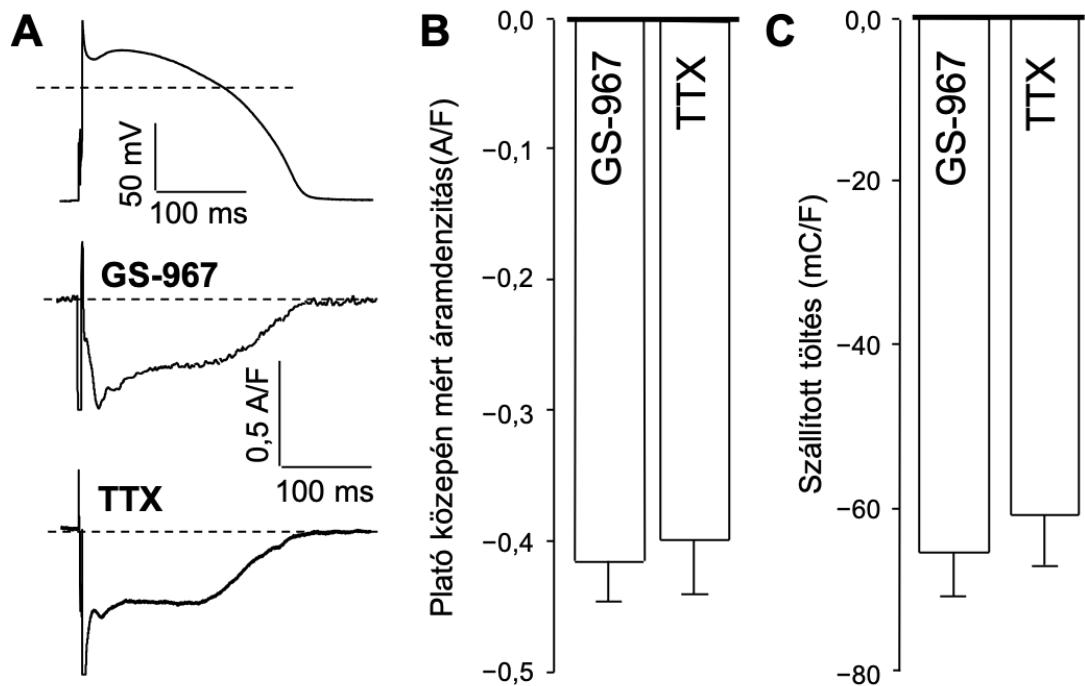
22. ábra: Az ioncsatornagátlás hatása a szívműködés kalciumtranzienzeire. A panel: A téringlerléssel stimulált, FURA-2-vel feltöltött, izolált szívműködés fluoreszcens hányadosának változásai kontroll körülmények között, valamint 1 μM GS-967 és 1 μM GS-967 + 0,5 μM ORM-10962 jelenlétében. B panel: A fluoreszcens hányados értékei a diasztole és a szisztole során, valamint a két érték különbségeként számított amplitúdó értékek. C-D panel: A téringlerléssel stimulált, izolált szívműködés rövidülési görbéi és azok paraméterei. A frakcionált rövidülést a diasztolés és a szisztolés sejthossz különbségéből számolhatjuk ki. A rombusz alakú szimbólumok az egyes mérési eredményeket, míg a kitöltött körök azok átlagát jelölik. (*= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$).

Mivel a nifedipin UV fény hatására pillanatok alatt elbomlik, így Ca²⁺ tranziens mérésével a nifedipin intracelluláris kalcium koncentrációra kifejtett hatását nem tudtuk tanulmányozni. Ahhoz, hogy a nifedipin Ca²⁺ koncentrációt befolyásoló hatását megvizsgáljuk más módszert kellett alkalmazni, nevezetesen a sejtrövidülést választottuk indikátornak. A kezeletlen (kontroll) szívműködés sejthossz rövidülését összehasonlítottuk a

nizoldipin alkalmazását követően mért sejthossz rövidüléssel. Megállapítottuk, hogy a nyugalmi, diasztolés sejthossz nem változott szignifikánsan nizoldipin hatására. A szisztolés sejthossz azonban szignifikánsan nagyobb volt a nizoldipinnel kezelt sejteken, mint a kezeletlen, szabad kalciumciklusú sejtek esetén. A szívizomsejtek frakcionált rövidülése pedig közel nullára csökkent 1 μM nizoldipin hatására. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az intracelluláris, maximális Ca^{2+} -koncentráció is jelentősen csökken a nizoldipin alkalmazását követően (22. ábra C-D panel).

5.5. A késői nátriumáram kalciumfüggése

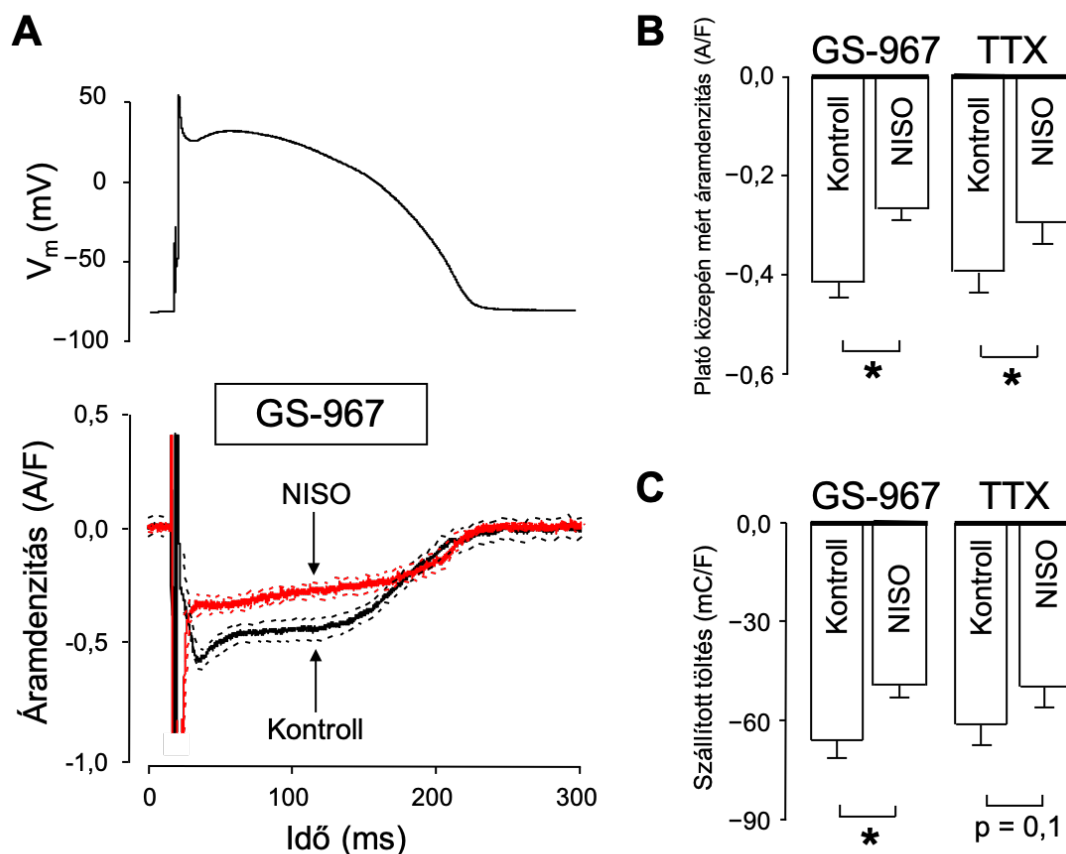
A késői nátriumáramot szintén APVC technikával vizsgáltuk. Az áram megjelenítéséhez két különböző, szelektív nátriumcsatorna blokkoló szert alkalmaztunk: 1 μM GS-967, 10 μM tetrodotoxin (TTX). A két gátlószerrel kapott áramprofil alakja nagymértékben hasonló volt (23. ábra).



23. ábra: A késői nátriumáram profilja és a vizsgált paraméterek. A panel: Az APVC-módszerrel mért késői nátriumáram profilok. A szívizomsejteket a mérések során a panelen feltüntetett kanonikus AP-val stimuláltuk. A $I_{Na,L}$ -t két különböző, szelektív nátriumcsatorna blokkolóval jelenítettük meg ($1 \mu\text{M}$ GS-967, $10 \mu\text{M}$ tetrodotoxin (TTX)). B panel: A $I_{Na,L}$ áramdenzitása a plató fázis közepén. C panel: A $I_{Na,L}$ által szállított töltés mennyisége.

A $I_{Na,L}$ kalciumfüggését úgy vizsgáltuk, hogy előzetesen $1 \mu\text{M}$ nizoldipinnel gátoltuk az L-típusú kalciumáramot. Nizoldipin hatására mind a GS-967-szenzitív ($n=8$; $p<0,05$), mind pedig a TTX-szenzitív áram ($n=7$; $p<0,05$) plató közepén mért denzitása szignifikánsan csökkent (24. ábra A és B panel).

A szállított töltésmennyiség esetén a nizoldipin csak a GS-967-szenzitív áramnál idézett elő szignifikáns csökkenést ($n=8$; $p<0,05$) (24. ábra C panel).

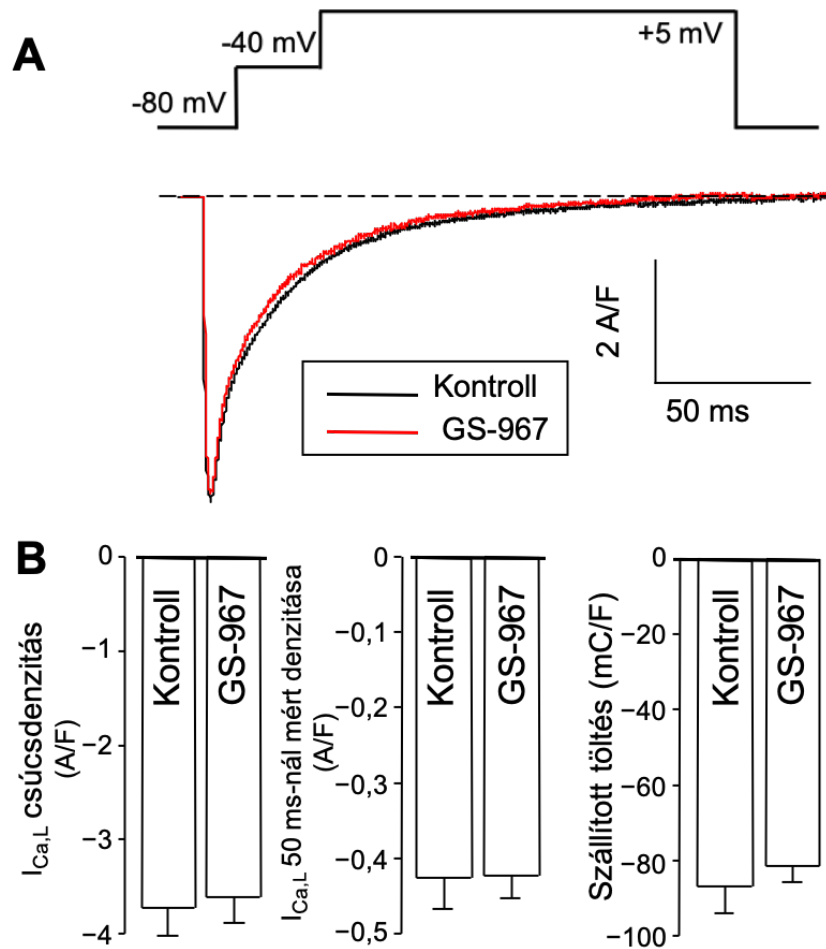


24. ábra: A $I_{Na,L}$ kalciumfüggésének vizsgálata. A panel: Az APVC-módszerrel mért $I_{Na,L}$ kontroll körülmények között és nizoldipin jelenlétében. Parancsjelként a panel felső részében bemutatott kanonikus AP-t használtuk. A $I_{Na,L}$ -t GS-967 és TTX alkalmazásával is megjelenítettük. Az AP alatti áramgörbéken a vastag vonal az átlagot, a vékonyabb vonal pedig a szórást jelöli. B panel: A GS-967 és TTX szenzitív áramok plató közepén mért áramdenzítása kontroll körülmények között és nizoldipin alkalmazása mellett. C panel: A GS-967 és TTX szenzitív áramok által szállított töltésmennyiség kontroll körülmények között és gátolt $I_{Ca,L}$ mellett. (*= $p < 0,05$)

Ez az eredmény arra utalhat, hogy az általunk alkalmazott $1 \mu\text{M}$ GS-967 nem teljesen szelektív, a GS967-szenzitív áram a $I_{Na,L}$ mellett az $I_{Ca,L}$ egy kis frakcióját is tartalmazza. További lehetőség, hogy az intracelluláris kalciumkoncentráció változtatása modulálhatja a $I_{Na,L}$ működését.

A fentiek eldöntésére megvizsgáltuk a GS-967 hatását az L-típusú kalciumáramra. A méréseket hagyományos feszültség-clamp technikával végeztük.

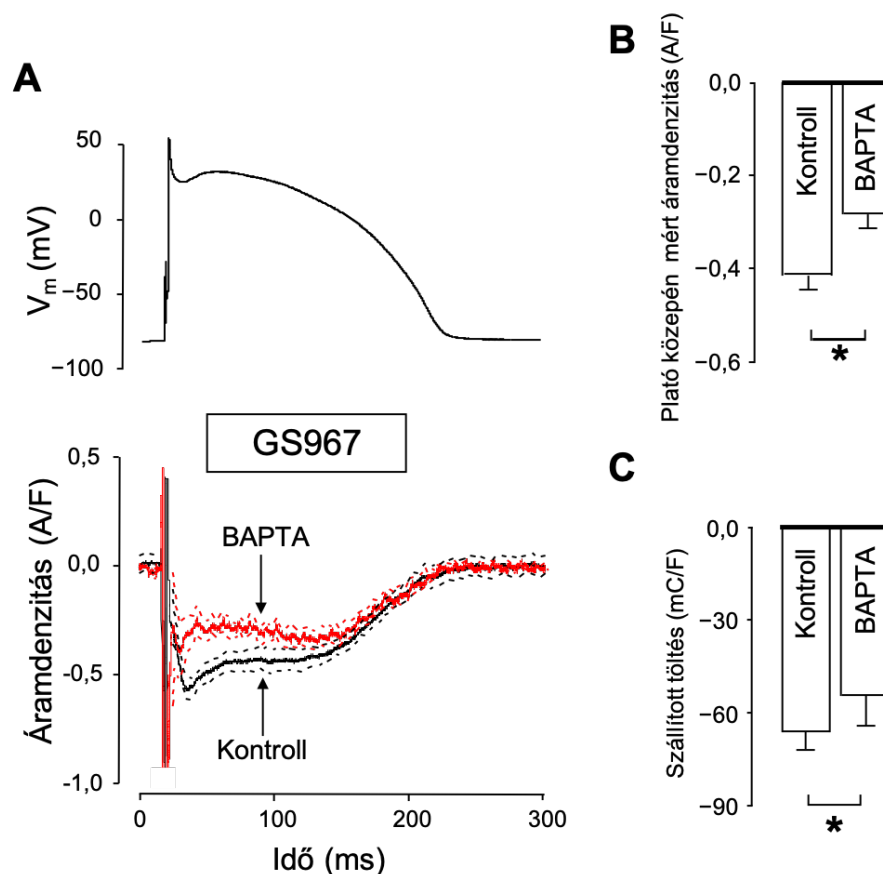
Sem az $I_{Ca,L}$ maximális amplitúdója, sem az 50 ms-al az áramjel kezdete után mért áramdenzitás nem változott 1 μ M GS-967 alkalmazását követően. Nem tapasztaltunk változást az áram által szállított töltés mennyiségében sem (25. ábra). Ezen eredmények alapján elvethető az a feltételezésünk, hogy az APVC mérések során regisztrált GS-szenzitív ionáram a késői nátriumáram mellett kalciumáramot is tartalmaz. Ez egyben azt is jelenti, hogy a 23. ábrán bemutatott eredmények háttérében a késői nátriumáram kalciumfüggő viselkedése áll.



25. ábra: A GS-967 hatása az L-típusú kalciumáramra. A panel: A $I_{Ca,L}$ -t egy kombinált négyzetimpulzus segítségével mértük, hagyományos feszültség-clamp módszerrel. A -80 mV-os tartófeszültségről induló teszimpulzus tartalmazott egy 15 ms hosszúságú -40 mV-ra depolarizáló előimpulzust. A teszimpulzus teljes hossza 200 ms volt. B panel: A $I_{Ca,L}$ amplitúdóját a nulla vonalhoz viszonyított maximális kiterésként (áramcsúcs) definiáltuk. Ezen kívül meghatároztuk 50 ms-mal az impulzus kezdete után mérhető denzitást, valamint az áramgörbe integrálját, mely a szállított töltésmennyiségnek felel meg.

Ennek igazolására újabb kísérleteket végeztünk, az intracelluláris kalciumkoncentrációt egy kalcium kelátor segítségével csökkentettük, a pipetta belső oldatát 1 mM koncentrációjú BAPTA-val egészítettük ki. A méréseket a sejtmembrán átszakítását követően körülbelül 10 perccel kezdtük meg. Erre azért volt szükség, hogy a kalcium kelátornak legyen ideje bejutni a pipetta belsejéből az intracelluláris térbe. Meghatároztuk a plató fázis felénél (90%-os repolarizációnál mért AP időtartam felénél) mérhető áramdenzitást, valamint az áram által szállított töltés mennyiségét.

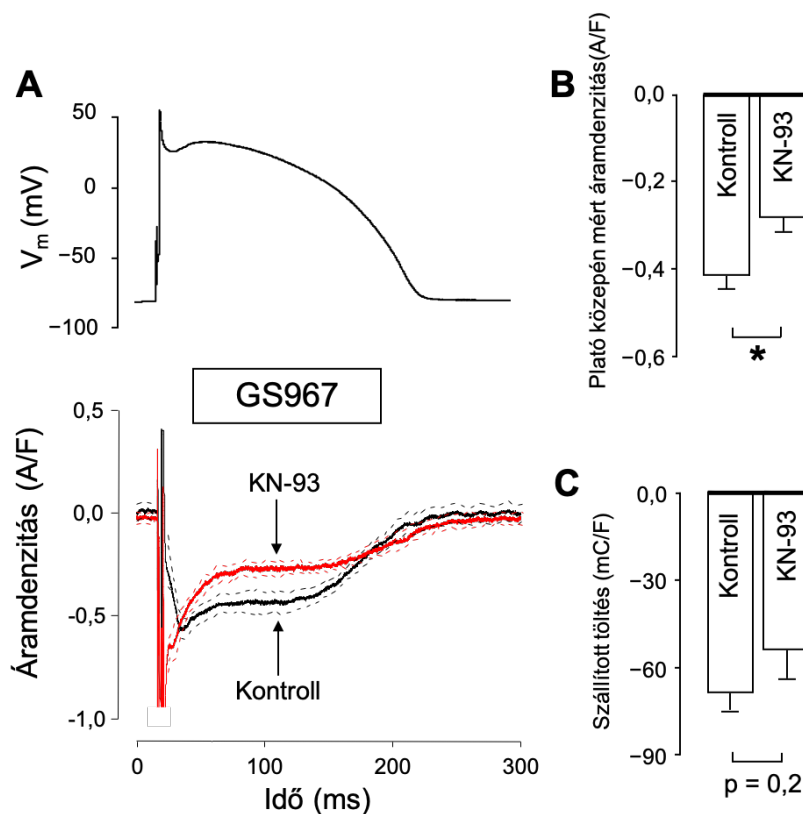
Megállapítottuk, hogy BAPTA jelenlétében, a plató fázis felénél mért késői nátriumáram denzitása és az áram által szállított töltés mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint kontroll körülmények között (26. ábra).



26. ábra: A BAPTA hatása a $I_{Na,L}$ -ra. A panel: Az APVC-technikával mért $I_{Na,L}$ morfológiája a kanonikus akciós potenciál alatt, kontroll körülmények között és intracelluláris BAPTA jelenlétében. Az AP alatti áramgörbéken a vastag vonal az átlagot, a vékonyabb, szaggatott vonal pedig a szórást jelöli. B panel: A $I_{Na,L}$ plató közepén mért denzitását az APD_{90} felénél mérhető áramsűrűségként definiáltuk. C panel: A szállított töltésmennyiséget az áramgörbék integráljaként határoztuk meg. (*= $p < 0,05$)

5.6. A CaMKII útvonal szerepe a $I_{Na,L}$ szabályozásában

Az irodalomból ismert, hogy az egyes ionáramok kalciumfüggő szabályozása a CaMKII-útvonal működéséhez kapcsolódik. További kísérleteink során ezért a CaMKII szerepét vizsgáltuk a késői nátriumáram szabályozásában. Ezen mérések során a pipetta belső oldata a CaMKII útvonal specifikus gátlószereként ismert KN-93-mat tartalmazott ($1 \mu\text{M}$). A méréseket a sejtmembrán áttörésétől számítva 10 perccel később kezdtük, hogy a KN-93 hatása kialakulhasson. Az plató felénél mért áramdenzitás, szignifikánsan kisebb volt KN-93 alkalmazása mellett, mint a kontroll csoportban (27. ábra). Az áram által szállított töltés mennyisége csökken ugyan KN-93 hatására, de ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($P=0,2$).



27. ábra: A késői nátriumáram a CaMKII útvonal szabályozása alatt áll. A panel: Az APVC-technikával mért $I_{Na,L}$ áramprofilok kontroll körülmények között és KN-93 alkalmazása mellett. A parancsjel a panel felső részén bemutatott kanonikus AP volt. Az AP alatti áramgörbéken a vastag vonal az átlagot, a vékonyabb vonal pedig a szórás jelöli. B panel: A $I_{Na,L}$ plató közepén mért denzitását az APD_{90} felénél mérhető áramsűrűségként definiáltuk. C panel: A szállított töltésmennyiséget az áramgörbék integráljaként határoztuk meg. (*= $p < 0,05$)

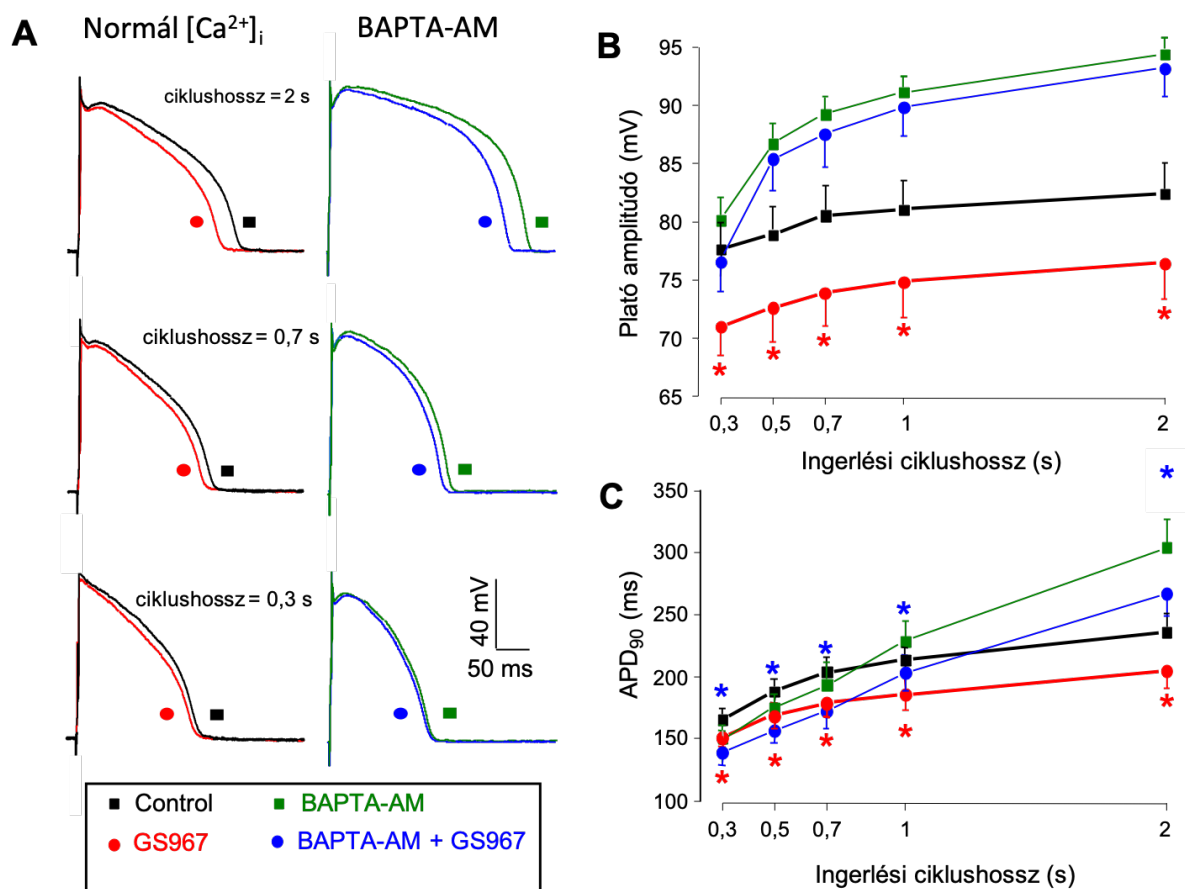
A KN-93 alkalmazása mellett mért eredményeinket összevetettük a nizoldipinnel, illetve a BAPTA-val kapott értékekkel és a következőt találtuk: sem a plató felénél mért áramsűrűség ($-0,28 \pm 0,04$, $-0,29 \pm 0,04$ és $-0,30 \pm 0,03$ A/F), sem pedig az áram által szállított töltésmennyiség ($-54,6 \pm 9,9$, $-48,2 \pm 3,6$ és $-46,7 \pm 5,2$ mC/F) nem különbözött szignifikánsan. Eredményeink alapján valószínű, hogy nizoldipin, illetve BAPTA jelenlétében a CaMKII aktivitása csökken, ami magyarázhatja, hogy ezen kísérleteknél a normál kalciumhomeosztázis mellett mért áramhoz viszonyítva a $I_{Na,L}$ szignifikánsan kisebb.

Megvizsgáltuk, hogy a sejten belüli szabad kalmodulinnak van-e hatása a késői nátriumáramra. A mérések során a pipetta belső oldatát 100 nM koncentrációjú kalmodulinnal egészítettük ki. A $I_{Na,L}$ -t TTX szenzitív áramként határoztuk meg. Sem az áramsűrűség, sem pedig az áram által szállított töltés mennyiségében nem találtunk szignifikáns változást a kalmodulin hatására.

5.7. A GS-967 hatása az akciós potenciál morfológiájára

A GS-967 szenzitív áramként definiált késői nátriumáram kalciumfüggő viselkedését AP méréssel is bizonyítottuk. Az izolált szívizomsejtek akciós potenciálját hegyes mikroelektrodával mértük. Megállapítottuk, hogy 1 μ M GS967 hatására szignifikánsan rövidült az AP időtartama (APD_{90}) ($n=12$, $p<0,05$). Ez a jelenség fordított frekvenciafüggést mutatott, nevezetesen az APD_{90} csökkenés mértéke kisebb volt a stimuláló impulzusok frekvenciájának növelésével. Ezen felül plató felénél mért amplitúdó is szignifikánsan csökkent a GS-967 hatására. A GS-967 által kiváltott plató amplitúdó csökkenés szignifikánsan kisebb volt abban az esetben, amikor a sejteket előzetesen 5 μ M BAPTA-AM-mel kezeltük. Ezzel szemben a GS-967 APD_{90} rövidítő hatását nem befolyásolta a BAPTA-AM-mel történő előkezelés.

A BAPTA-AM hatása erős frekvenciafüggést mutatott: az APD_{90} szignifikánsan megnőtt magasabb ingerlési ciklushossz mellett (alacsonyabb frekvenciánál), alacsonyabb ingerlési ciklushosszok esetén pedig nem tapasztaltunk jelentős változást.



28. ábra: A GS-967 hatása az AP morfológiájára. A panel: A GS-967 hatása a szívizomsejtek AP-jára fiziológias és gátolt kalciumciklus mellett, különböző ingerlési frekvenciák mellett. B panel: A plató amplitúdó változása GS-967, BAPTA-AM, illetve BAPTA-AM+ GS-967 alkalmazása mellett különböző ingerlési ciklushosszokon. C panel: Az APD₉₀ érték változása GS-967, BAPTA-AM és BAPTA-AM+GS-967 alkalmazása mellett. (*= $p < 0,05$)

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a GS-967 jelenlétében megfigyelt „plató-depresszió”, ami a $I_{Na,L}$ csökkenésének tulajdonítható, kalciumfüggést mutat, mivel csak szabad kalciumciklus mellett tapasztaltuk. Némileg meglepő módon az APD₉₀ rövidülés a GS-967 hatására hasonló volt BAPTA-AM jelenlétében és anélkül. Ennek háttérében a BAPTA-AM APD₉₀-et nyújtó hatását feltételezzük. Mivel több szívre ható gyógyszer APD₉₀-re gyakorolt

hatása arányos a kiindulási APD₉₀ értékkel, ez kompenzálhatja az előzetesen várt, GS-967 által kiváltott APD₉₀ rövidülést a BAPTA-AM-mel történő előkezelést követően.

6. Megbeszélés

Elsőként írtuk le, a humán szív legjobb elektrofiziológiai modelljének tartott kutyaszíven (21), az AP kialakításában részt vevő ionáramok paraméterei, az ionáramok által szállított töltésmennyiség és az áramok amplitúdója közötti összefüggéseket. Kísérletsorozatunk abban is egyedülálló, hogy méréseinket a fiziológias körülményeket jól modellező APVC technikával végeztük, az ionáramok szeparálására az onion-peeling eljárást alkalmaztuk, mely lehetővé teszi, hogy ugyanazon a szívizomsejten hasonlítsuk össze a különböző áramokat. Ugyancsak elsőként írtuk le a I_{Ks} és a $I_{Na,L}$ kalciumfüggését kutya kamrai szívizomsejteken.

6.1. Az akciós potenciál kialakításában részt vevő ionáramok paraméterei közötti korrelációk és azok jelentősége szívizomsejteken

Az inward ionáramok paramétereit összevetve megállapítottuk, hogy az $I_{Ca,L}$ és a I_{NCX} által szállított töltésmennyiség szignifikáns korrelációt ($r=0,75$) mutat, ugyanakkor a többi depolarizáló és repolarizáló áramot összevetve nem találtunk jelentős kapcsolatot.

Az áramok működése alapján azt várnánk, hogy a $I_{Na,L}$ és a I_{NCX} paraméterei között is szoros korreláció van, hiszen a belépő nátrium mennyiségének változása módosítja a I_{NCX} funkcióját az egyensúlyi potenciál és a nátrium terhelés változása révén. Azonban az $I_{Ca,L}$ és a I_{NCX} között tapasztalt szignifikáns korrelációval szemben, a Pearson féle korrelációs koefficiens ($r=0,42$) alapján nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a $I_{Na,L}$ és a I_{NCX} által szállított töltésmennyiségek között. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az egészséges, stimulált szívizomsejtek nátriumbelépéséért csupán körülbelül 22%-ban felelősek a nátriumcsatornák (ennek is kb. fele a késői nátriumáram), ezzel szemben a nátrium-kalcium cserélő forward módja, körülbelül 60%-ban felelős a szívizomsejtek nátriumbeáramlásáért (26). Ezek alapján feltételezhető, hogy az egészséges szívizomsejtek nátriumháztartása elsősorban a sejtbe belépő- és ilyen módon a I_{NCX} által eltávolított Ca^{2+} mennyiségétől függ. Ezenfelül a sejtben belüli Na^+ -homeosztázisban bekövetkező változásokat egyéb, Na^+ -hoz kapcsolt transzport mechanizmusok is kompenzálni képesek, mint például a Na^+-K^+ pumpa, a Na^+-H^+ cserélő vagy

a $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotranszporter. Ezeket együttvéve nem várható szignifikáns korreláció a késői nátriumáram és a nátrium-kalcium cserélő által szállított töltések mennyisége között.

Nem találtunk szignifikáns korrelációt a repolarizáló outward ionáramok paraméterei között sem. Azonban amikor az inward és outward ionáramok paramétereit egymással hasonlítottuk össze, megállapítottuk, hogy a késői egyenirányító káliumáram gyors komponense (I_{Kr}) és az L-típusú kalciumáram valamennyi paramétere, így a szállított töltésmennyiség, az áramamplitúdó és a plató közepén mért áramamplitúdó tekintetében is szignifikáns korreláció áll fenn. A jelenség hátterében az L-típusú kalciumcsatorna és a I_{Kr} -ért felelős KCNH2 fehérje ko-expressziója állhat (156), valamint az, hogy ezen fehérjék térszerkezetének kialakulása (folding) és a felszíni membránba történő kihelyeződése (trafficking) közösen történik. Ezeknek a mechanizmusoknak a megismerése azonban további vizsgálatokat igényel. Az $I_{Ca,L}$ és a I_{Kr} a plató fázis legnagyobb inward és outward áramai, a közöttük megfigyelt korrelációnak szerepe lehet az AP időtartamának kialakításában és így az APD heterogenitásának csökkentésében.

6.2. Az akciós potenciál terminális repolarizációja alatti ionáramprofilok időfüggése

Az akciós potenciál terminális repolarizációja alatt lezajló események időzítése, kiemelt jelentőséggel bír, hiszen a repolarizáció zavara, inhomogenitása szívritmuszavarok szubsztrátja lehet.

Az APVC technikával végzett kísérleteink eredményei (19. ábra) kiemelik a I_{Kr} jelentőségét a szívizomsejtek repolarizációjában. Az AP 2. fázisa során a I_{Kr} még a V_{max}^- érték elérése előtt, míg a I_{K1} maximuma csak ez után figyelhető meg. Ezen felül a I_{Kr} áramcsúcsa kevésbé negatív membránpotenciál-értéknél következik be, mint a I_{K1} csúcs. Ebből arra következtethetünk, hogy a I_{Kr} , és nem pedig a I_{K1} az elindítója a terminális repolarizáció folyamatának, annak ellenére, hogy a I_{K1} jóval nagyobb áramdenzitással bír ebben a periódusában az akciós potenciálnak (19. ábra).

Ezt támasztják alá különböző farmakológiai vizsgálatok is: a I_{Kr} szelektív gátlószerei (E-4031 vagy dofetilid) kifejezett növekedést idéznek elő az 50%-os repolarizációnál mért AP hossz (APD_{50}) értékben. Ezzel szemben a I_{K1} gátló Ba^{2+} inkább az APD_{90} értéket nyújtotta, ezáltal az AP háromszög-alakúvá vált, ugyanakkor az APD_{50} értékre alig volt hatással.

Meg kell említeni továbbá, hogy a I_{Kr} és a I_{K1} paraméterei függetlenek az akciós potenciálok morfológiájától, illetve a frekvenciától kutyá és humán kamrai szívizomsejteken

(157). Ezt fontos szem előtt tartani, mivel az AP és az ionáramok kapcsolatának bármilyen torzulása, ami például a kanonikus akciós potenciállal történő (sejtek saját AP-ja helyett) ingerlésből ered, nem változtatja meg a I_{Kr} és a I_{K1} időbeli alakulását.

Nem példa nélküli, hogy egy domináns outward áram arányos egy domináns inward árammal. Tengerimalacokban például, ahol a kutyával ellentétben a plató fázis során a fő repolarizáló áram a I_{Ks} (82), az L-típusú kalciumáram a I_{Ks} -vel korrelál és nem a I_{Kr} -vel (2). Más állatból származó preparátumokon, például sertésből vagy nyúlból származó kardiomiocitákon erős pozitív korrelációt figyeltek meg a késői nátriumáram és a I_{Kr} között (158). Ezek az eredmények ellentétesek az általunk, kutyákból származó szívizomsejteken mért eredményekkel. Úgy tűnik, hogy nyúl szívizomsejteken a $I_{Na,L}$ ellensúlyozhatja a I_{Kr} -t az AP platója során (159), azonban ezt a jelenséget kutyák szívizomsejtjein nem láttuk. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az egyes ionáramok közötti kapcsolatokban, korrelációkban szintén nagy interspecies különbségek lehetnek. A fő kérdés azonban, ami a humán kamrai miokardium ionáramai közötti korrelációkat érinti egyelőre megválaszolatlan.

Az ionáramok profiljának vizsgálatakor a I_{Ks} hamarabb aktiválódott és hamarabb érte el csúcsát, mint a I_{Kr} . Az, hogy a I_{Ks} miért aktiválódik hamarabb, mint a I_{Kr} , némi magyarázatra szorulhat. A jelenség különösen annak fényében érdekes, hogy a I_{Kr} -hez viszonyítva a I_{Ks} pozitívabb feszültségtartományokban aktiválódik, és az aktivációs időállandója is nagyságrendekkel nagyobb (82). Depolarizáció során a I_{Kr} gyorsan aktiválódik, majd azonnal inaktíválódik, így a I_{Kr} amplitúdója megközelítőleg nulla a kutya AP első 40-50 milliszekundumában. A I_{Kr} csak ezt követően, amikor a membránpotenciál értéke kellően negatív, jelenik meg ténylegesen, mert ekkorra az ionsatornák már visszatérnek inaktív állapotukból (160). Fiziológias körülmények között azonban a I_{Ks} szerepe elhanyagolható a terminális repolarizációban, hiszen az L-735,821 nevű szelektív I_{Ks} gátlószer nem befolyásolta szignifikánsan az APD értékeket nyugalmi körülmények között (107).

6.3. Az ionáramok kalciumfüggése

Kutatásunk során megvizsgáltuk három káliumáram, a I_{Kr} , a I_{Ks} és a I_{K1} , valamint a $I_{Na,L}$ kalciumion-függését. Az IC. kalciumkoncentráció változtatása nem befolyásolta sem a I_{K1} , sem pedig a I_{Kr} paramétereit, a I_{Ks} azonban kalciumérzékenynek bizonyult. A I_{Ks} gyorsabban érte el árammaximumát, az áram denzitása, illetve az áram által szállított töltés mennyisége szignifikánsan nagyobb volt fiziológias kalciumciklus mellett, mint amit az $I_{Ca,L}$ gátlásakor mértünk. Kutya szívizomsejteken a I_{Ks} kalciumszenzitivitását magyarázó mechanizmusok

valószínűleg összetettek. A humán szívhez kevésbé hasonló állatmodelleken (pl. nyúl) a I_{Ks} kalciumérzékenységének háttérében a kalmodulin aktivitását írták le (62). Egy másik tanulmányban CHO sejtvonalon expresszált $K_v7.1$ csatornákon a kalmodulin és a PIP_2 vetélkedéséről számoltak be (161).

A I_{Ks} kalciumfüggése magyarázhatja, hogy az általunk mért I_{Ks} amplitúdók miért nagyobbak, mint az irodalmi adatok. Varró és munkatársai kísérleteiben az intracelluláris térrel kapcsolatba kerülő pipetta oldat kalcium-keletorokat tartalmazott, szemben a mi kísérleteinkkel, ahol ez nem volt jelen. Varró és munkatársai ilyen körülmények között 0,1 és 0,15 A/F I_{Ks} amplitúdót mértek (107,162), ezek az értékek megfelelnek az általunk $I_{Ca,L}$ gátlást követően mért eredményeknek. Ez kevesebb, mint a fele a fiziológias kalciumciklus mellett mért értékeinknek.

Néhány korábbi kísérleti eredménnyel szemben, kísérleteink során a befelé egyenirányító káliumáramot nem befolyásolta az $I_{Ca,L}$ gátlása. Tengerimalacból származó szívizomsejteken az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció csökkentése növelte a I_{K1} áramot (163). Ennek háttérében az állhat, hogy a csökkent intracelluláris Ca^{2+} koncentráció hatására csökken a csatorna befelé egyenirányító képessége. A mi eredményeinkkel szemben, Nagy és munkatársai arról számoltak be, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése is megnövekedett I_{K1} áramot eredményez kutya kamrai szívizomsejteken (164). Ez a hatás a CaMKII kalciumfüggő aktiválódásának és a I_{K1} ezzel egyidejű növekedésének tulajdonítható. Fontos azonban itt megjegyeznünk, hogy Nagy és munkatársainak kísérletei során az intracelluláris kalciumszintet különböző koncentrációjú EGTA-oldatokkal változtatták, ezzel szemben mi, a kísérleteink során, nem alkalmaztunk kalcium puffereket. Nagy és munkatársainak eredményeit áttekintve kitűnik, hogy I_{K1} amplitúdó növekedést csak az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció tartós, kb. 900 nM koncentrációra történő emelése esetén tapasztalták. Tartósan magas intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mellett ugyanis várható a CaMKII aktivitásának növekedése. Az is lehetséges, hogy a méréseink során a kalciumtranziensek hatására aktiválódó CaMKII I_{K1} növelő hatását ellensúlyozza az ioncsatorna kalciumfüggő befelé egyenirányító képességének az átmeneti növekedése, és ezért nem tapasztaltuk a I_{K1} kalciumfüggését.

Elsőként írtuk le, hogy fiziológias körülmények között az intracelluláris kalcium koncentráció jelentős hatással van a $I_{Na,L}$ -re. A sejten belüli Ca^{2+} koncentráció 10 mM BAPTA intracelluláris alkalmazásával történő csökkentése, illetve az $I_{Ca,L}$ 1 μ M nifedipinnel történő gátlása is egyaránt szignifikánsan csökkentette mind a késői nátriumáram denzitását, mind pedig az áram által szállított töltés mennyiségét. Az APVC és a hagyományos feszültség-clamp

körülmények között végzett mérések egyaránt igazolták a $I_{Na,L}$ kalciumfüggését. Ezen felül megállapítottuk azt is, hogy a késői nátriumáram kalciumfüggő szabályozása a CaMKII jelátviteli útvonalhoz kapcsolódik. A CaMKII jelátviteli útvonal KN-93-mal történő gátlása ugyanis a kalciumciklus megváltoztatásához (BAPTA vagy nizoldipin alkalmazása) hasonló módon szignifikánsan csökkentette az áram denzitását.

A késői nátriumáram CaMKII útvonalhoz kapcsolódó stimulációja egészséges kutya szívműködéseken hasonló, mint amit már korábban megfigyeltek nyúl (165–167), egér (167–169), kutya (39,134) és humán (134) sejteken különböző kórélettani folyamatokban, mint például szívelégtelenség, szívműködés hipertrófia, iszkémia és hipoxia esetén. Az értekezésben bemutatott eredményekből következik az is, hogy folyamatosan stimulált kutya kamrai szívműködéseken, intakt kalciumciklus mellett, a CaMKII aktivitása viszonylag magas, hiszen a késői nátriumáram amplitúdója csökkent a CaMKII gátlása és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésekor. Ez a megállapítás fontos, mivel egy korábbi tanulmányban, melyet szobahőmérsékleten végeztek kutyákból származó szívműködéseken, csupán a nullához közeli (BAPTA-val kelált) és magas (1 μ M) kalciumkoncentráció mellett mért $I_{Na,L}$ -t hasonlították össze (39). Hasonló következtetést vontak le Erickson és munkatársai (170), akik a FRET alapú Camui bioszenzort alkalmazták a CaMKII aktiváció vizsgálatára. Megállapították, hogy a Ca^{2+}/CaM alkalmazása szignifikánsan növelte a CaMKII aktivitását a Camuit expresszáló HEK-sejtek lizátumaiban.

Mind a szívműködéseken, mind pedig a HEK sejteken 1 μ M KN-93 alkalmazása gátolta a Camui aktivitással összefüggő FRET változásokat, ami arra enged következtetni, hogy a KN-93 gátolja a fiziológiás excitációs-kontrakciós kapcsolatból eredő CaMKII aktivációt, ahogyan azt a saját kísérleteinkben is megfigyeltük.

Wood és munkatársai leírták nyulból származó szívműködések lizátumában, hogy a CaMKII dependens foszforilációja a CaMKII-nek (autofoszforiláció), a rianodin receptorok és a foszfolambán aktivitása szignifikánsan nagyobb az elektromosan stimulált sejteken, mint a nem ingereltekben (171). Ez azt is sugallja, hogy a CaMKII aktivitása magasabb lehet a fiziológiásan stimulált szívműködésekben, mint a teljesen nyugalmi állapotúakban. Egy másik, szintén nyúl szívműködéseken végzett vizsgálatban megállapították, hogy a bazális $I_{Na,L}$ nagy része a CaMKII aktivitásnak tulajdonítható (24). Ellentétben az általunk kutyákból származó szívműködéseken mért adatokkal, nyúl kamrai sejteken kontroll körülmények között a kiindulási $I_{Na,L}$ sűrűséget nem befolyásolta az intracelluláris Ca^{2+} csökkenése vagy a CaMKII gátlása, azonban hipoxiás szívműködéseken igen (165). Ennek az ellentmondásnak a háttére további tisztázásra vár.

Általánosan elfogadott, hogy a KN-93 közvetlenül kötődik a CaMKII-höz, és ezáltal megakadályozza a kináz aktiválását a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -mal való versengéssel. A legújabb adatok azonban arra utalnak, hogy a KN-93 közvetlenül a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -hoz kötődik, és nem a CaMKII-höz (172). Bár a Wong és munkatársai által bemutatott hatásmechanizmus (172) összhangban van azzal, hogy a KN-93-at funkcionális CaMKII-gátlónak tekintik, a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ szabályozás számos helyen való jelenléte felveti azt a kérdést, hogy a KN-93-mal végzett megfigyelések (mint például a mi eredményeink is) részben vagy egészben megmagyarázhatók-e $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -függő, de CaMKII-független gátlással.

Adatok vannak arról, hogy a Ca^{2+} maga szabályozhatja a nátriumcsatornákat (173), míg mások szerint a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplex szabályozza a feszültségfüggő nátriumcsatornák működését (174,175). Abban azonban konszenzus van, hogy a nátriumcsatornák egyensúlyi inaktivációs görbéje a pozitívabb feszültségértékek felé tolódik el, magasabb intracelluláris Ca^{2+} koncentráció esetén (176). Egy kis mértékű változás az egyensúlyi inaktivációs görbén elegendő lehet egy nagyobb $I_{\text{Na,L}}$ előidézéséhez a fiziológiás kalciumháztartású szívizomsejteken, szemben a nifedipinnel, BAPTA-val vagy KN-93-mal előkezelt szívizomsejtekkel.

Az L-típusú kalciumcsatorna gátló szereket (például nifedipin) gyakran használják különböző szívre specifikus L-típusú kalciumáramot célzó farmakonok hatásának egymástól való elkülönítésére. Ebben az esetben érdemes észben tartani, hogy ezek a gátlószerek nem csak az $I_{\text{Ca,L}}$ -t gátolják önmagában, hanem megváltoztathatják a szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját is. Ebből következik, hogy az L-típusú kalciumcsatornát blokkoló farmakonok módosíthatják az összes Ca^{2+} -függő folyamatot, például a CaMKII-aktivitást és ezzel együtt a Ca^{2+} -függő ionáramok paramétereit, beleértve a $I_{\text{Na,L}}$ -t is.

6.4. A kísérletek limitációi

Bár az eredményeink azt bizonyítják, hogy szoros korreláció áll fenn az inward és outward ionáramok integráljai között, fontos megjegyezni, hogy a kísérleteink során nem tudtuk megvizsgálni az AP kialakításában részt vevő valamennyi ionáramot. A $I_{Na, early}$ nem vizsgálható APVC technikával a nagyon gyors aktivációs kinetikája, illetve nagy amplitúdója miatt. Szelektív gátlószerek hiányában nem vizsgáltuk a kloridáramokat és a I_{to1} -ot sem.

A szelektív gátlószerek sem idéznek elő teljes mértékű csatornagátlást. Például 50 μ M $BaCl_2$ alkalmazása körülbelül 88%-át gátolja a I_{K1} -nek (177). Ehhez hasonlóan 1 μ M GS-967 is csupán a $I_{Na,L}$ körülbelül 80%-át gátolja (42), és az ORM-10962 alkalmazása sem okoz teljes mértékű I_{NCX} gátlást. Mindezek ellenére úgy gondoljuk, hogy az alkalmazott ioncsatorna-blokkolók elég szelektívek ahhoz, hogy az eredményeink alapján levont következtetések helytállóak.

További korlátja a kísérleteinknek, hogy a $I_{Na,L}$ -t nem vizsgáltuk olyan körülmények között, amikor a CaMKII útvonal maximálisan aktiválva van magas intracelluláris Ca^{2+} szint mellett, így a $I_{Na,L}$ CaMKII-függő frakciója nem megbecsülhető.

7. Az értekezésben szereplő új kutatási eredmények

1. A humán szívizom legjobb elektrofiziológiai modelljének tartott kutya szívizomsejteken elsőként írtuk le, hogy szignifikáns korreláció van az $I_{Ca,L}$ és a I_{NCX} által szállított töltésmennyiség, továbbá az $I_{Ca,L}$ és a I_{Kr} által szállított töltésmennyiség, valamint maximális- és plató közepén mért áramdenzitás tekintetében.

2. Kutya kamrai szívizomsejteken igazoltuk, hogy a késői egyenirányító káliumáram lassú komponense (I_{Ks}) erőteljes kalciumfüggést mutat.

3. Megállapítottuk, hogy a depolarizáló ionáramok közül a késői nátriumáram ($I_{Na,L}$) szintén jelentős kalciumfüggő viselkedést mutat, melynek hátterében a CaMKII útvonal aktivitásának változása állhat.

4. Megállapítottuk, hogy kutya kamrai szívizomsejteken a terminális repolarizáció során a V_{max}^- -hoz viszonyítva a I_{Kr} 11 ms-mal előbb, míg a I_{K1} attól 3,5 ms-al később érte el maximumát. Ezek alapján feltételezzük, hogy fiziológias körülmények között a terminális repolarizáció elindításáért a I_{Kr} lehet a felelős, mely így meghatározza az AP hosszát.

8. Összefoglalás

A szívimozgás elektromos működését számos ioncsatorna finoman összehangolt működése alakítja ki. Ha ez a szorosan szabályozott rendszer valami miatt megbomlik, az súlyos, sokszor fatális kimenetelű szívritmuszavarokhoz vezethet. Az arritmia-kutatások sora foglalkozik a szívimozgás ionáramaival. Ezek a kísérletek azonban többnyire rágsálómodelleken készültek, hagyományos, négyszögimpulzusokat alkalmazó elektrofiziológiai technikákkal. Ezen felül sokszor a fiziológiai környezettől eltérő körülmények mellett zajlottak ezek a mérések (pl. szobahőmérséklet, Ca^{2+} -kelátor alkalmazása stb.).

Munkánk célja volt, hogy megvizsgáljuk a kamrai szívimozgás AP-ját kialakító ionáramok profilját, és azok egymáshoz való viszonyát, paramétereik között korrelációk után kutatva. Vizsgáltuk továbbá az egyes ionáramok működését fiziológiai kalciumciklus mellett, valamint gátolt L-típusú kalciumáram esetén. Mindezt a fiziológiai körülményeket a lehető legjobban szimulálva végeztük, a humán szív legjobb elektrofiziológiai modelljeként számotartott kutyaszíven.

A kísérletek során akciós potenciál feszültség clamp technikával meghatároztuk az egyes ionáramok AP alatti profilját. Az onion-peeling módszer segítségével ugyanazon a szívimozgáson több ionáramot tudunk vizsgálni, így még pontosabb képet kapva működésükről. Az AP időtartamának változásait hagyományos hegyes elektródás akciós potenciál mérésekkel vizsgáltuk. Kalciumtranziens- és sejt-hossz-rövidülés méréseket végeztünk a kalciumciklus változásainak regisztrálására.

Kutatásaink során szignifikáns korrelációt találtunk a késői egyenirányító káliumáram gyors komponense (I_{Kr}) és az L-típusú kalciumáram ($I_{Ca,L}$) által szállított töltésmennyiség, valamint az áramamplitúdó és a plató közepén mért áramdenzitás tekintetében. A nátrium-kalcium csereáram (I_{NCX}) és az $I_{Ca,L}$ által szállított töltésmennyiség között szintén szignifikáns kapcsolat igazolódott. Megállapítottuk, hogy a késői egyenirányító káliumáram lassú komponense (I_{Ks}), valamint a késői nátriumáram ($I_{Na,L}$) erős kalciumfüggést mutat. A késői nátriumáram esetében az áram kalciumfüggésének hátterében a CaMKII útvonal szerepét igazoltuk.

Eredményeink rávilágítanak a szív elektromos működésének komplexitására. A vizsgált áramok pontosabb ismerete közelebb vihet ahhoz, hogy még jobban megismerjük az aritmia kórlelettanát és megfelelő terápiás célpontot találjunk a különböző szívritmuszavarok kezelésére.

9. Summary

The electric activity of cardiomyocytes is shaped by the concert of ion channels. If this tightly regulated system breaks down for some reason, it can cause severe conditions such as arrhythmias. The former studies about the ion channels of the cardiomyocytes were mostly performed on rodent models using conventional electrophysiological techniques. In addition, these measurements were often performed under conditions other than the physiological environment (room temperature, the presence of Ca^{2+} -chelators).

The aim of our scientific work was to investigate the profiles of the ion currents of ventricular myocardial cells during the ventricular action potential, under physiological conditions. We also investigated the correlations among parameters of these ionic currents. We did experiments to investigate the calcium dependence of the ionic currents as well. Canine ventricular cardiomyocytes were used, because their electrophysiological properties under the AP are similar to those of human ones.

The profile of the ionic currents were determined by action potential voltage clamp technique. The so-called onion peeling technique were used to obtain multiple ion current data from the same cell. Action potential measurements were used to examine the changes of AP duration. Changes in the calcium cycle were confirmed by measuring calcium transient and cell length shortening.

We found a significant correlation between amplitude and mid-plateau density of fast component of the delayed rectifier potassium current (I_{Kf}) and the L-type calcium current ($I_{Ca,L}$). There were significant correlation between the carried charge by the I_{Kf} and $I_{Ca,L}$, and by the sodium-calcium exchange current (I_{NCX}) and the L-type calcium current ($I_{Ca,L}$). We found that the slow component of the delayed rectifier potassium current (I_{Ks}) and the late sodium current ($I_{Na,L}$) shows a strong calcium dependence. In the case of $I_{Na,L}$, the role of the CaMKII pathway was confirmed in the background of the calcium dependence.

Our results emphasize the complexity of the electrical functioning of the heart. Even more accurate knowledge about these currents may bring us closer to understand the pathophysiology of arrhythmias and to find a suitable therapeutic target for the treatment of various arrhythmic diseases.

10. Köszönetnyilvánítás

Ez a dolgozat nem készülhetett volna el a szerzőt támogató személyek munkája nélkül. A legnagyobb köszönet dr. Magyar János Professzor Urat illeti, aki folyamatosan támogatott, végig figyelemmel kísérte egyetemi pályafutásomat és bármikor számíthattam rá mind szakmailag, mind pedig emberileg a nehéz egyetemi évek és a PhD-képzés során.

Köszönet illeti dr. Horváth Balázs Adjunktus Urat, illetve dr. Szentandrassy Norbert Tanár Urat, akik bevezettek a szívelektrofizológia és a tudományos munka világába. Szakmai segítségükre, baráti tanácsaikra mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom a Szívelektrofiziológiai Laboratórium vezetőjének, dr. Nánási Péter Professzor Úrnak, aki megteremtette a hatékony munkavégzés feltételeit. A hasznos tanácsokért és bátorításért, dr. Bányász Tamás Professzor Úrnak fejezem ki hálámat.

Hálával tartozom a munkacsoportunk korábbi PhD hallgatóinak, dr. Kistamás Kornélnak, dr. Veress Rolandnak és dr. Váczi Krisztinának, akik tanácsokkal láttak el az évek során és munkájukkal segítettek.

Köszönettel tartozom dr. Hézsó Tamásnak, dr. Dienes Csabának és dr. Kovács Zsigmondnak a kialakított kellemes légkörért, jó hangulatért és segítségért. A kísérletek előkészítése során segítséget nyújtott és derűs légkört teremtett Sági Éva.

Az évek során számos kiemelkedően tehetséges TDK-hallgatót ismertem meg. Közülük külön kiemelném Török Zsoltot, aki által megtapasztalhattam a tanítás örömét, barátsága és a közös munka élménye mindvégig elkísér majd a továbbiakban.

Külön köszönettel tartozom dr. Csernoch László Professzor Úrnak, aki szemináriumvezetőként másodéves medikus koromban felkeltette az érdeklődésemet az élettan iránt, ezt követően pedig a Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola vezetőjeként és az Élettani Intézet igazgatójaként lehetővé tette számomra a munka elvégzését.

Köszönöm az Élettani Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, hogy támogattak és segítettek munkámat.

Végül, de nem utolsósorban az életemben a legfontosabbaknak mondok köszönetet. Szüleimnek az útmutatást, melyet gyermekkoromtól kezdve kaptam, testvéreimnek, nagyszüleimnek a gondoskodást és a támogatást. Külön szeretném kiemelni páromat, dr. Vilmos Fruzsínát, aki végig mellettem volt és támogatott a legnehezebb pillanatokban. Hálás vagyok barátaim támogatásáért is.

Jelen dolgozat megírását és PhD tanulmányaimat az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-3 és ÚNKP-20-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja, valamint az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 című projekt támogatta.

11. Irodalomjegyzék

1. Fischmeister R, DeFelice LJ, Ayer RK, Levi R, DeHaan RL. Channel currents during spontaneous action potentials in embryonic chick heart cells. The action potential patch clamp. *Biophysical Journal*. 1984 Aug;46(2).
2. Banyasz T, Horvath B, Jian Z, Izu LT, Chen-Izu Y. Sequential dissection of multiple ionic currents in single cardiac myocytes under action potential-clamp. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [Internet]. 2011 Mar;50(3):578–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282811000046>
3. Chen-Izu Y, Izu LT, Nanasi PP, Banyasz T. From Action Potential-Clamp to “Onion-Peeling” Technique – Recording of Ionic Currents Under Physiological Conditions. In: Kaneez FS, editor. *Patch Clamp Technique*. Rijeka: InTech; 2012. p. 143–62.
4. Zaza A. The cardiac action potential. In: Zaza A, editor. *An introduction to Cardiac Cellular Electrophysiology*. Newark: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 59–82.
5. Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*. 1989 Mar 1;410(1).
6. Varró A, Papp JG. The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. *Cardioscience*. 1992 Sep;3(3):131–44.
7. Scanley BE, Hanck DA, Chay T, Fozzard HA. Kinetic analysis of single sodium channels from canine cardiac Purkinje cells. *Journal of General Physiology*. 1990 Mar 1;95(3).
8. Mitsuiye T, Noma A. Inactivation of Cardiac Na⁺ Channel Simply through Open States as Revealed by Single-Channel Analysis in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *The Japanese Journal of Physiology*. 2002;52(5).
9. Horváth B, Hézsó T, Kiss D, Kistamás K, Magyar J, Nánási PP, et al. Late Sodium Current Inhibitors as Potential Antiarrhythmic Agents. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
10. Gellens ME, George AL, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, et al. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992 Jan 15;89(2).
11. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacological Reviews*. 2005 Dec;57(4).
12. de Lera Ruiz M, Kraus RL. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015 Sep 24;58(18).
13. Maier SKG, Westenbroek RE, Schenkman KA, Feigl EO, Scheuer T, Catterall WA. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Mar 19;99(6).
14. HAUFE V, CORDEIRO J, ZIMMER T, WU Y, SCHICCITANO S, BENNDORF K, et al. Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current is greater in dog heart Purkinje fibers than in ventricles. *Cardiovascular Research*. 2005 Jan 1;65(1).
15. Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, et al. Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2005 Mar;38(3).

16. Biet M, Barajas-Martínez H, Ton A-T, Delabre J-F, Morin N, Dumaine R. About half of the late sodium current in cardiac myocytes from dog ventricle is due to non-cardiac-type Na⁺ channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012 Nov;53(5).
17. Yang T, Atack TC, Stroud DM, Zhang W, Hall L, Roden DM. Blocking Scn10a Channels in Heart Reduces Late Sodium Current and Is Antiarrhythmic. *Circulation Research*. 2012 Jul 20;111(3).
18. Kistamás K, Hézsó T, Horváth B, Nánási PP. Late sodium current and calcium homeostasis in arrhythmogenesis. Vol. 15, *Channels*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021. p. 1–19.
19. MALTSEV V, UNDROVINAS A. A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*. 2006 Jan;69(1).
20. Horváth B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nánási PP, Bányász T. Contribution of I_{Ks} to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2006 Sep 4;452(6).
21. Horváth B, Hézsó T, Szentandrassy N, Kistamás K, Árpádfy-Lovas T, Varga R, et al. Late sodium current in human, canine and guinea pig ventricular myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2020 Feb;139.
22. Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A. Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1979 Apr 1;236(4).
23. Kiyosue T, Arita M. Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation Research*. 1989 Feb;64(2).
24. Hegyi B, Bányász T, Izu LT, Belardinelli L, Bers DM, Chen-Izu Y. β-adrenergic regulation of late Na⁺ current during cardiac action potential is mediated by both PKA and CaMKII. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018 Oct;123.
25. Horvath B, Banyasz T, Jian Z, Hegyi B, Kistamas K, Nanasi PP, et al. Dynamics of the late Na⁺ current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013 Nov;64.
26. Despa S, Bers DM. Na⁺ transport in the normal and failing heart — Remember the balance. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013 Aug;61.
27. Janvier NC, Boyett MR. The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Cardiovasc Res*. 1996;32(1):69–84.
28. Fujioka Y, Hiroe K, Matsuoka S. Regulation kinetics of Na⁺-Ca²⁺ exchange current in guinea-pig ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*. 2000 Dec;529(3).
29. Sipido K, Bito V, Antoons G, Volders PG, Vos MA. Na/Ca exchange and cardiac ventricular arrhythmias. In: Herchuelz A., Blaustein MP, Lytton J, Philipson KD, editors. *Sodium-Calcium Exchange and the Plasma Membrane Ca²⁺-Atpase in Cell Function: Fifth International Conference*. Annals of the New York Academy of Sciences; 2007. p. 339–48.
30. Ginsburg KS, Weber CR, Bers DM. Cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger: dynamics of Ca²⁺-dependent activation and deactivation in intact myocytes. *The Journal of Physiology*. 2013 Apr;591(8).
31. BANYASZ T, FULOP L, MAGYAR J, SZENTANDRASSY N, VARRO A, NANASI P. Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. *Cardiovascular Research*. 2003 Apr 1;58(1).

32. Banyasz T, Horvath B, Jian Z, Izu LT, Chen-Izu Y. Profile of L-type Ca^{2+} current and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current during cardiac action potential in ventricular myocytes. *Heart Rhythm*. 2012 Jan;9(1).
33. Fülöp L, Bányász T, Magyar J, Szentandrassy N, Varró A, Nánási PP. Reopening of L-type calcium channels in human ventricular myocytes during applied epicardial action potentials. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2004 Jan;180(1).
34. Linz KW, Meyer R. Control of L-type calcium current during the action potential of guinea-pig ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*. 1998 Dec;513(2).
35. Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2000 Mar;439(5).
36. Bers DM. CaMKII Inhibition in Heart Failure Makes Jump to Human. *Circulation Research*. 2010 Oct 29;107(9).
37. Maier LS. CaMKII regulation of voltage-gated sodium channels and cell excitability. *Heart Rhythm*. 2011 Mar;8(3).
38. Scheuer T. Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2011 Apr;22(2).
39. Maltsev VA, Reznikov V, Undrovinas NA, Sabbah HN, Undrovinas A. Modulation of late sodium current by Ca^{2+} , calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008 Apr;294(4).
40. Maltsev VA, Kyle JW, Undrovinas A. Late Na^+ current produced by human cardiac Na^+ channel isoform Nav1.5 is modulated by its $\beta 1$ subunit. *The Journal of Physiological Sciences*. 2009 May 3;59(3).
41. Alexander SP, Catterall WA, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, et al. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels. *British Journal of Pharmacology*. 2015 Dec;172(24).
42. Hézsó T, Naveed M, Dienes C, Kiss D, Prorok J, Árpádfy-Lovas T, et al. Mexiletine-like cellular electrophysiological effects of GS967 in canine ventricular myocardium. *Scientific Reports*. 2021 Dec 5;11(1).
43. Egan TM, Noble D, Noble SJ, Powell T, Spindler AJ, Twist VW. Sodium-calcium exchange during the action potential in guinea-pig ventricular cells. *The Journal of Physiology*. 1989 Apr 1;411(1).
44. Reeves JP, Condrescu M. Ionic regulation of the cardiac sodium-calcium exchanger. Vol. 2, Channels. Taylor and Francis Inc.; 2008. p. 322–8.
45. Qiu Z, Nicoll DA, Philipson KD. Helix Packing of Functionally Important Regions of the Cardiac $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ Exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jan;276(1).
46. DiPolo R. Calcium influx in internally dialyzed squid giant axons. *Journal of General Physiology*. 1979 Jan 1;73(1).
47. BERS DM, GINSBURG KS. Na:Ca Stoichiometry and Cytosolic Ca-Dependent Activation of NCX in Intact Cardiomyocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007 Feb 15;1099(1).
48. Hilgemann DW, Matsuoka S, Nagel GA, Collins A. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. *Journal of General Physiology*. 1992 Dec 1;100(6).
49. Matsuoka S, Nicoll DA, He Z, Philipson KD. Regulation of the Cardiac $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ Exchanger by the Endogenous XIP Region. *Journal of General Physiology*. 1997 Feb 1;109(2).
50. Hafver TL, Hodne K, Wanichawan P, Aronsen JM, Dalhus B, Lunde PK, et al. Protein Phosphatase 1c Associated with the Cardiac Sodium Calcium Exchanger 1 Regulates

- Its Activity by Dephosphorylating Serine 68-phosphorylated Phospholemman. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Feb;291(9).
51. Siegl PK, Cragoe EJ, Trumble MJ, Kaczorowski GJ. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange in membrane vesicle and papillary muscle preparations from guinea pig heart by analogs of amiloride. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984 May 1;81(10).
 52. Li Z, Nicoll DA, Collins A, Hilgemann WD, Filoteo AG, Penniston JT, et al. Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem*. 1991 Jan 15;266:1014–20.
 53. Sipido KR, Varro A, Eisner D. Sodium Calcium Exchange as a Target for Antiarrhythmic Therapy. In: *Handb Exp Pharmacol*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 159–99.
 54. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *British Journal of Pharmacology*. 1996 Oct;119(3).
 55. Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *British Journal of Pharmacology*. 2002 Mar;135(5).
 56. Yoshiyama M, Hayashi T, Nakamura Y, Omura T, Izumi Y, Matsumoto R, et al. Effects of Cellular Cardiomyoplasty on Ventricular Remodeling Assessed by Doppler Echocardiography and Topographic Immunohistochemistry. *Circulation Journal*. 2004;68(6).
 57. Nagy ZA, Virág L, Tóth A, Biliczki P, Acsai K, Bányász T, et al. Selective inhibition of sodium-calcium exchanger by SEA-0400 decreases early and delayed afterdepolarization in canine heart. *British Journal of Pharmacology*. 2004 Dec;143(7).
 58. Kohajda Z, Farkas-Morvay N, Jost N, Nagy N, Geramipour A, Horváth A, et al. The Effect of a Novel Highly Selective Inhibitor of the Sodium/Calcium Exchanger (NCX) on Cardiac Arrhythmias in In Vitro and In Vivo Experiments. *PLOS ONE*. 2016 Nov 10;11(11).
 59. Szlovák J, Tomek J, Zhou X, Tóth N, Veress R, Horváth B, et al. Blockade of sodium-calcium exchanger via ORM-10962 attenuates cardiac alternans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2021 Apr;153.
 60. Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW. L-Type CaV1.2 Calcium Channels: From In Vitro Findings to In Vivo Function. *Physiological Reviews*. 2014 Jan;94(1).
 61. Fozzard HA. Excitation-Contraction Coupling in the Heart. In 1991.
 62. Bartos DC, Morotti S, Ginsburg KS, Grandi E, Bers DM. Quantitative analysis of the Ca²⁺ -dependent regulation of delayed rectifier K⁺ current I_{Ks} in rabbit ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*. 2017 Apr 1;595(7).
 63. Hosey MM, Chien AJ, Puri TS. Structure and Regulation of L-Type Calcium Channels. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1996 Nov;6(8).
 64. Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000 Apr;26(1).
 65. Abernethy DR, Schwartz JB. Calcium-Antagonist Drugs. *New England Journal of Medicine*. 1999 Nov 4;341(19).
 66. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, et al. Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron*. 2000 Mar;25(3).
 67. Abernethy DR, Soldatov NM. Structure-Functional Diversity of Human L-Type Ca²⁺ Channel: Perspectives for New Pharmacological Targets. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002 Mar 1;300(3).

68. Hille B. Voltage-Gated Calcium Channels. In: Hille Bertil, editor. Ion Channels of Excitable Membranes. Sunderland: Sinauer Associates; 2001. p. 95–129.
69. Catterall W. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science*. 1988 Oct 7;242(4875).
70. Yamaguchi H, Hara M, Strobeck M, Fukasawa K, Schwartz A, Varadi G. Multiple Modulation Pathways of Calcium Channel Activity by a β Subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 1998 Jul;273(30).
71. Gurnett CA, de Waard M, Campbell KP. Dual Function of the Voltage-Dependent Ca^{2+} Channel $\alpha 2\delta$ Subunit in Current Stimulation and Subunit Interaction. *Neuron*. 1996 Feb;16(2).
72. Findlay I. Physiological modulation of inactivation in L-type Ca^{2+} channels: one switch. *The Journal of Physiology*. 2004 Jan;554(2).
73. Morales D, Hermosilla T, Varela D. Calcium-dependent inactivation controls cardiac L-type Ca^{2+} currents under β -adrenergic stimulation. *Journal of General Physiology*. 2019 Jun 3;151(6).
74. Lee A, Wong ST, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T, et al. Ca^{2+} /calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature*. 1999 May;399(6732).
75. Kecskeméti V. Antiarrhythmias szereke. In: Zsuzsanna Fürst, editor. *Farmakológia*. Budapest: Medicina ; 2001. p. 473–93.
76. Hockerman GH, Peterson BZ, Johnson and, BD, Catterall WA. MOLECULAR DETERMINANTS OF DRUG BINDING AND ACTION ON L-TYPE CALCIUM CHANNELS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1997 Apr;37(1).
77. Carmeliet E. Voltage- and time-dependent block of the delayed K^{+} current in cardiac myocytes by dofetilide. *J Pharmacol Exp Ther* . 1992;809–17.
78. Gintant GA. Regional differences in I_{K} density in canine left ventricle: role of I_{Ks} in electrical heterogeneity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1995 Feb 1;268(2).
79. Liu D-W, Antzelevitch C. Characteristics of the Delayed Rectifier Current (I_{Kr} and I_{Ks}) in Canine Ventricular Epicardial, Midmyocardial, and Endocardial Myocytes. *Circulation Research*. 1995 Mar;76(3).
80. Chinn K. Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;264(2):553–60.
81. Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac Ultrarapid Delayed Rectifiers. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1999;9(4–5).
82. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K^{+} current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *Journal of General Physiology*. 1990 Jul 1;96(1).
83. Varró A, Baczkó I. Cardiac ventricular repolarization reserve: A principle for understanding drug-related proarrhythmic risk. Vol. 164, *British Journal of Pharmacology*. 2011. p. 14–36.
84. Long SB. Voltage Sensor of $\text{Kv}1.2$: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science*. 2005 Aug 5;309(5736).
85. Roden DM, Balsler JR, George Jr AL, Anderson ME. Cardiac Ion Channels. *Annual Review of Physiology*. 2002 Mar;64(1).
86. Choe S. Potassium channel structures. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002 Feb;3(2).
87. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell*. 1995 Apr;81(2).
88. Gintant GA. Two Components of Delayed Rectifier Current in Canine Atrium and Ventricle. *Circulation Research*. 1996 Jan;78(1).

89. Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *Journal of General Physiology*. 1996 May 1;107(5).
90. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of external Ca^{2+} and K^{+} in gating of cardiac delayed rectifier K^{+} currents. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1992 Feb;420(2).
91. Yang T, Snyders DJ, Roden DM. Rapid Inactivation Determines the Rectification and $[K^{+}]_o$ Dependence of the Rapid Component of the Delayed Rectifier K^{+} Current in Cardiac Cells. *Circulation Research*. 1997 Jun;80(6).
92. Guo J, Massaelli H, Xu J, Jia Z, Wigle JT, Mesaelli N, et al. Extracellular K^{+} concentration controls cell surface density of I_{Kr} in rabbit hearts and of the HERG channel in human cell lines. *Journal of Clinical Investigation*. 2009 Sep 1;119(9).
93. Carmeliet E, Mubagwa K. Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanisms of action. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1998 Jul;70(1).
94. Hondeghem LM, Snyders DJ. Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation*. 1990 Feb;81(2).
95. Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC. Class III Antiarrhythmic Drugs Block HERG, a Human Cardiac Delayed Rectifier K^{+} Channel. *Circulation Research*. 1996 Mar;78(3).
96. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Oct 24;97(22).
97. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature*. 1996 Nov;384(6604).
98. Virág L. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*. 2001 Mar;49(4).
99. Salata JJ, Jurkiewicz NK, Jow B, Folander K, Guinosso PJ, Raynor B, et al. IK of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for I_{Ks} . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996 Dec 1;271(6).
100. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K^{+} current by dofetilide. *Circulation Research*. 1993 Jan;72(1).
101. Lengyel C, Iost N, Virág L, Varró A, Lathrop DA, Papp JG. Pharmacological block of the slow component of the outward delayed rectifier current (I_{Ks}) fails to lengthen rabbit ventricular muscle QTc and action potential duration. *British Journal of Pharmacology*. 2001 Jan;132(1).
102. Li G-R, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for Two Components of Delayed Rectifier K^{+} Current in Human Ventricular Myocytes. *Circulation Research*. 1996 Apr;78(4).
103. Hirano Y, Hiraoka M. Changes in K^{+} currents induced by Ba^{2+} in guinea pig ventricular muscles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1986 Jul 1;251(1).
104. Bennett PB, Begenisch TB. Catecholamines modulate the delayed rectifying potassium current (IK) in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1987 Sep;410(1-2).
105. Han W, Wang Z, Nattel S. Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001 Mar 1;280(3).

106. Shugg T, Johnson DE, Shao M, Lai X, Witzmann F, Cummins TR, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of I_{Ks} during sustained β -adrenergic receptor stimulation. *Heart Rhythm*. 2018 Jun 1;15(6):895–904.
107. Varró A, Baláti B, Jost N, Takács J, Virág L, Lathrop DA, et al. The role of the delayed rectifier component I_{Ks} in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *The Journal of Physiology*. 2000 Feb;523(1).
108. Jost N, Virág L, Bitay M, Takács J, Lengyel C, Biliczki P, et al. Restricting Excessive Cardiac Action Potential and QT Prolongation. *Circulation*. 2005 Sep 6;112(10).
109. Carmeliet E. Repolarization reserve in cardiac cells. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 2006;26(3):97–105.
110. Akar FG, Yan G-X, Antzelevitch C, Rosenbaum DS. Unique Topographical Distribution of M Cells Underlies Reentrant Mechanism of Torsade de Pointes in the Long-QT Syndrome. *Circulation*. 2002 Mar 12;105(10).
111. Johnson DM, Heijman J, Pollard CE, Valentin J-P, Crijns HJGM, Abi-Gerges N, et al. I_{Ks} restricts excessive beat-to-beat variability of repolarization during beta-adrenergic receptor stimulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010 Jan;48(1).
112. Bosch R. Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K^+ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*. 1998 May;38(2).
113. SCHREIECK J, WANG Y, GJINI V, KORTH M, ZRENNER B, SCHÖMIG A, et al. Differential Effect of β -Adrenergic Stimulation on the Frequency-Dependent Electrophysiologic Actions of the New Class III Antiarrhythmics Dofetilide, Ambasilide, and Chromanol 293. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1997 Dec;8(12).
114. Gerlach U, Brendel J, Lang H-J, Paulus EF, Weidmann K, Brüggemann A, et al. Synthesis and Activity of Novel and Selective I_{Ks} -Channel Blockers. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2001 Nov;44(23).
115. Gögelein H, Brüggemann A, Gerlach U, Brendel J, Busch AE. Inhibition of I_{Ks} channels by HMR 1556. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2000 Nov 20;362(6).
116. Volders PGA, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Spätjens RLHMG, Beekman JDM, et al. Probing the Contribution of I_{Ks} to Canine Ventricular Repolarization. *Circulation*. 2003 Jun 3;107(21).
117. Nakashima H. In vivo electrophysiological effects of a selective slow delayed-rectifier potassium channel blocker in anesthetized dogs: potential insights into class III actions. *Cardiovascular Research*. 2004 Mar 1;61(4).
118. Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987 Apr 1;84(8).
119. Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature*. 1987 Jan;325(6100).
120. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: “long-pore plugging” by cytoplasmic polyamines. *Journal of General Physiology*. 1995 Nov 1;106(5).
121. Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K^+ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *The Journal of Physiology*. 2001 Jun;533(3).
122. Payet MD, Rousseau E, Sauvé R. Single-channel analysis of a potassium inward rectifier in myocytes of newborn rat heart. *The Journal of Membrane Biology*. 1985 Jun;86(2).

123. Bertran GC, Biagetti MO, Valverde ER, Quinteiro RA. Effects of Amiodarone and Desethylamiodarone on the Inward Rectifying Potassium Current (I_{K1}) in Rabbit Ventricular Myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1998 Jun;31(6).
124. Matsuura H, Shattock MJ. Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1991 Nov 1;261(5).
125. Ito H, Vereecke J, Carmeliet E. Intracellular protons inhibit inward rectifier K^+ channel of guinea-pig ventricular cell membrane. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1992 Dec;422(3).
126. Sato T, Arita M, Kiyosue T. Differential mechanism of block of palmitoyl lysophosphatidylcholine and of palmitoylcarnitine on inward rectifier K^+ channels of guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 1993 Aug;7(S3).
127. Pérez-Riera AR, Barbosa-Barros R, Daminello Raimundo R, da Costa de Rezende Barbosa MP, Esposito Sorpreso IC, de Abreu LC. The congenital long QT syndrome Type 3: An update. Vol. 18, *Indian Pacing and Electrophysiology Journal*. Indian Pacing and Electrophysiology Group; 2018. p. 25–35.
128. Chadda KR, Jeevaratnam K, Lei M, Huang CL-H. Sodium channel biophysics, late sodium current and genetic arrhythmic syndromes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2017 Jun 6;469(5–6).
129. Clancy CE, Kass RS. Inherited and Acquired Vulnerability to Ventricular Arrhythmias: Cardiac Na^+ and K^+ Channels. *Physiological Reviews*. 2005 Jan;85(1).
130. Coppini R, Ferrantini C, Yao L, Fan P, del Lungo M, Stillitano F, et al. Late Sodium Current Inhibition Reverses Electromechanical Dysfunction in Human Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*. 2013 Feb 5;127(5).
131. Pourrier M, Williams S, McAfee D, Belardinelli L, Fedida D. CrossTalk proposal: The late sodium current is an important player in the development of diastolic heart failure (heart failure with a preserved ejection fraction). *The Journal of Physiology*. 2014 Feb 1;592(3).
132. Horvath B, Bers DM. The late sodium current in heart failure: pathophysiology and clinical relevance. *ESC Heart Failure*. 2014 Sep 30;1(1).
133. Undrovinas AI, Maltsev VA, Kyle JW, Silverman N, Sabbah HN. Gating of the Late Na^+ Channel in Normal and Failing Human Myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2002 Nov;34(11).
134. Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: Implications for repolarization variability. *European Journal of Heart Failure*. 2007 Mar;9(3).
135. Maier LS, Sossalla S. The late Na current as a therapeutic target: Where are we? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013 Aug;61.
136. Nattel S, Harada M. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014 Jun;63(22).
137. Zaza A, Belardinelli L, Shryock JC. Pathophysiology and pharmacology of the cardiac “late sodium current.” *Pharmacology & Therapeutics*. 2008 Sep;119(3).
138. Zaza A, Rocchetti M. The Late Na^+ Current - Origin and Pathophysiological Relevance. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2013 Feb 29;27(1).
139. Shryock JC, Song Y, Rajamani S, Antzelevitch C, Belardinelli L. The arrhythmogenic consequences of increasing late I_{Na} in the cardiomyocyte. *Cardiovascular Research*. 2013 Sep 1;99(4).
140. Yu S, Li G, Huang CL-H, Lei M, Wu L. Late sodium current associated cardiac electrophysiological and mechanical dysfunction. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2018 Mar 10;470(3).

141. Wang DW, Desai RR, Crotti L, Arnestad M, Insolia R, Pedrazzini M, et al. Cardiac Sodium Channel Dysfunction in Sudden Infant Death Syndrome. *Circulation*. 2007 Jan 23;115(3).
142. Marcantoni A, Calorio C, Hidisoglu E, Chiantia G, Carbone E. Cav1.2 channelopathies causing autism: new hallmarks on Timothy syndrome. Vol. 472, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. Springer; 2020. p. 775–89.
143. Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, et al. CaV1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. *Cell*. 2004 Oct;119(1).
144. Mohler PJ, le Scouarnec S, Denjoy I, Lowe JS, Guicheney P, Caron L, et al. Defining the Cellular Phenotype of “Ankyrin-B Syndrome” Variants. *Circulation*. 2007 Jan 30;115(4).
145. Tester DJ, Ackerman MJ. Genetics of long QT syndrome. 2014.
146. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, et al. Spectrum of Mutations in Long-QT Syndrome Genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*. 2000 Sep 5;102(10).
147. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005 May;2(5).
148. Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, Thorstad K, Duff HJ. Novel Gain-of-Function Mechanism in K⁺ Channel–Related Long-QT Syndrome: altered gating and selectivity in the HERG1 N629D mutant. *Circulation Research*. 2000 Mar 17;86(5).
149. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics*. 1996 Jan;12(1).
150. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genetics*. 1997 Feb;15(2).
151. Bellocq C, van Ginneken ACG, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MMAM, et al. Mutation in the KCNQ1 Gene Leading to the Short QT-Interval Syndrome. *Circulation*. 2004 May 25;109(20).
152. Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, et al. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *Journal of Clinical Investigation*. 2002 Aug 1;110(3).
153. Priori SG, Pandit S v., Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, et al. A Novel Form of Short QT Syndrome (SQT3) Is Caused by a Mutation in the KCNJ2 Gene. *Circulation Research*. 2005 Apr 15;96(7).
154. Magyar J, Bányász T, Sziligeti P, Körtvély Á, Jednákovits A, Nánási PP. Electrophysiological effects of bimocloamol in canine ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*. 2000 Feb 7;361(3).
155. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 1981 Aug;391(2).
156. Ballouz S, Mangala MM, Perry MD, Heitmann S, Gillis JA, Hill AP, et al. Co-expression of calcium and hERG potassium channels reduces the incidence of proarrhythmic events. *Cardiovascular Research*. 2021 Aug 29;117(10).
157. Jost N, Acsai K, Horváth B, Bányász T, Baczkó I, Bitay M, et al. Contribution of I_{Kr} and I_{K1} to ventricular repolarization in canine and human myocytes: is there any influence of action potential duration? *Basic Research in Cardiology*. 2009 Jan 5;104(1).

158. Hegyi B, Chen-Izu Y, Izu LT, Rajamani S, Belardinelli L, Bers DM, et al. Balance Between Rapid Delayed Rectifier K⁺ Current and Late Na⁺ Current on Ventricular Repolarization. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2020 Apr;13(4).
159. Wu L, Ma J, Li H, Wang C, Grandi E, Zhang P, et al. Late Sodium Current Contributes to the Reverse Rate-Dependent Effect of I_{Kr} Inhibition on Ventricular Repolarization. *Circulation*. 2011 Apr 26;123(16).
160. Altomare C, Bartolucci C, Sala L, Bernardi J, Mostacciolo G, Rocchetti M, et al. I_{Kr} Impact on Repolarization and Its Variability Assessed by Dynamic Clamp. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2015 Oct;8(5).
161. Tobelaim WS, Dvir M, Lebel G, Cui M, Buki T, Peretz A, et al. Ca²⁺-Calmodulin and PIP2 interactions at the proximal C-terminus of Kv7 channels. *Channels*. 2017 Nov 2;11(6).
162. Jost N, Virág L, Comtois P, Ördög B, Szuts V, Seprényi G, et al. Ionic mechanisms limiting cardiac repolarization reserve in humans compared to dogs. *The Journal of Physiology*. 2013 Sep 1;591(17).
163. Zaza A, Rocchetti M, Brioschi A, Cantadori A, Ferroni A. Dynamic Ca²⁺-Induced Inward Rectification of K⁺ Current During the Ventricular Action Potential. *Circulation Research*. 1998 May;82(9).
164. Nagy N, Acsai K, Kormos A, Sebök Z, Farkas AS, Jost N, et al. [Ca²⁺]_i-induced augmentation of the inward rectifier potassium current (I_{K1}) in canine and human ventricular myocardium. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2013 Nov 27;465(11).
165. Fu C, Hao J, Zeng M, Song Y, Jiang W, Zhang P, et al. Modulation of late sodium current by Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II, protein kinase C and Ca²⁺ during hypoxia in rabbit ventricular myocytes. *Experimental Physiology*. 2017 Jul 1;102(7).
166. Hashambhoy YL, Winslow RL, Greenstein JL. CaMKII-dependent activation of late I_{Na} contributes to cellular arrhythmia in a model of the cardiac myocyte. In: 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE; 2011.
167. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *Journal of Clinical Investigation*. 2006 Dec 1;116(12).
168. Howard T, Greer-Short A, Satroplus T, Patel N, Nassal D, Mohler PJ, et al. CaMKII-dependent late Na⁺ current increases electrical dispersion and arrhythmia in ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018 Oct 1;315(4).
169. Toischer K, Hartmann N, Wagner S, Fischer TH, Herting J, Danner BC, et al. Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013 Aug;61.
170. Erickson JR, Patel R, Ferguson A, Bossuyt J, Bers DM. Fluorescence Resonance Energy Transfer–Based Sensor Camui Provides New Insight Into Mechanisms of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activation in Intact Cardiomyocytes. *Circulation Research*. 2011 Sep 16;109(7).
171. Wood BM, Simon M, Galice S, Alim CC, Ferrero M, Pinna NN, et al. Cardiac CaMKII activation promotes rapid translocation to its extra-dyadic targets. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018 Dec;125.

172. Wong MH, Samal AB, Lee M, Vlach J, Novikov N, Niedziela-Majka A, et al. The KN-93 Molecule Inhibits Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Activity by Binding to Ca^{2+} /CaM. *Journal of Molecular Biology*. 2019 Mar;431(7).
173. Wingo TL, Shah VN, Anderson ME, Lybrand TP, Chazin WJ, Balsemer JR. An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004 Mar 22;11(3).
174. Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AAM, et al. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*. 2002 Jan;415(6870).
175. Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass RS, Pitt GS. Calmodulin Mediates Ca^{2+} Sensitivity of Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Oct;279(43).
176. Sarhan MF, Tung C-C, van Petegem F, Ahern CA. Crystallographic basis for calcium regulation of sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Feb 28;109(9).
177. Shieh R-C, Chang J-C, Arreola J. Interaction of Ba^{2+} with the Pores of the Cloned Inward Rectifier K^+ Channels Kir2.1 Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Biophysical Journal*. 1998 Nov;75(5).



Nyilvántartási szám: DEENK/531/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kiss Dénes Zsolt
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10072706

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Horváth, B.* **Kiss, D. Z.***, Dienes, C., Hézső, T., Kovács, Z., 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>
* These authors contributed equally this work.
IF: 5 (2020)
2. **Kiss, D. Z.***, Horváth, B.*, Hézső, T., Dienes, C., Kovács, Z., Topal, L., Szentandrassy, N., Almássy, J., Prorok, J., Virág, L., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P., Magyar, J.: Late Na⁺ Current Is [Ca²⁺]_i-Dependent in Canine Ventricular Myocytes.
Pharmaceuticals (Basel). 14 (11), 1-16, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14111142>
* These authors contributed equally this work.
IF: 5.863 (2020)





További közlemények

3. 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: 5.923 (2020)
4. Hézső, T., Naveed, M., Dienes, C., **Kiss, D. Z.**, Prorok, J., Árpádfy, L. T., Varga, R., Fujii, E., Mercan, T., Topal, L., Kistamás, K., Szentandrassy, N., Almássy, J., Jost, N., Magyar, J., Bányász, T., Baczkó, I., Varró, A., Nánási, P. P., Virág, L., Horváth, B.: Mexiletine-like cellular electrophysiological effects of GS967 in canine ventricular myocardium. *Sci. Rep.* 11, 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-88903-3>
IF: 4.379 (2020)
5. Horváth, B., Hézső, T., **Kiss, D. Z.**, Kistamás, K., Magyar, J., Nánási, P. P., Bányász, T.: Late Sodium Current Inhibitors as Potential Antiarrhythmic Agents. *Front. Pharmacol.* 11, Article 413, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.00413>
IF: 5.81

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,975

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
10,863**

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

Debrecen, 2021.12.16.



12. Kulcsszavak

szívelektrofiziológia, késői nátriumáram, I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1} , NCX, L-típusú kalciumáram, szívizomsejt, APVC, CaMKII, kamrai ritmuszavarok

13. Keywords

cardiac cellular electrophysiology, late sodium current, I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1} , NCX, L-type calcium current, cardiomyocyte, APVC, CaMKII, ventricular arrhythmias

14. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények