

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció szerepe
szívizomsejtek ionáramainak szabályozásában**

Veress Roland

Témavezető: Dr. Horváth Balázs



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

Tartalomjegyzék

1. Alkalmazott rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1. A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és ionáramai	7
3.2. A kamrai repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitása.....	9
3.3. A szívizomsejtek kalcium homeosztázisa	10
3.4. A szívizomsejtek kalciumfüggő kloridárama	12
3.5. A kalciumfüggő kloridáram pro- vagy antiaritmiás szerepe	13
3.6. A kalciumfüggő kloridáramért felelős fehérjék.....	13
3.7. Intracelluláris kalcium koncentráció befolyásolása.....	14
3.8. A szívizomsejtek TRPM4 árama	17
4. Célkitűzés.....	20
5. Anyagok és módszerek.....	21
5.1. Kutya szívizomsejtek izolálása.....	21
5.2. Elektrofiziológia	23
5.2.1. Akciós potenciálok mérése hegyes mikroelektróda technikával	25
5.2.2. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával	26
5.3. Az AP repolarizáció variabilitásának elemzése.....	28
5.4. Fehérjeminta előkészítés és Western blot analízis	29
5.5. Statisztikai elemzés.....	30
5.6. Kísérleteinkhez használt oldatok összetétele.....	30
6. Eredmények.....	32
6.1. A 9-AC a $I_{Cl(Ca)}$ mérésének alkalmas eszköze	32
6.2. A $I_{Cl(Ca)}$ hozzájárulása az AP alakjának különbségeihez a kutya bal kamrai miokardium transzmurális rétegeiben	33
6.3. A 9-AC hatása a szívcsúcs és a szívbázis sejteinek AP paramétereire	35

6.4. A négyszögimpulzusokkal vizsgált $I_{Cl(Ca)}$ áramsűrűségek, valamint a TMEM16A és Bestrophin-3 expressziós szintek közel azonosak különböző bal kamrai régiókból nyert szívműsejtekben.....	36
6.5. A $I_{Cl(Ca)}$ profilok transzmurális heterogenitása APVC segítségével mérve	38
6.6. Az AP alakjának hatása az $I_{Cl(Ca)}$ profilokra	39
6.7. A $I_{Cl(Ca)}$ szerepe az EAD-k létrejöttében és a repolarizáció rövid távú variabilitásában.....	41
6.8. A BAPTA-AM hatása az akciós potenciál morfológiájára	43
6.9. A BAPTA-AM hatása az I_{Kr} áramra.....	47
6.10. A BAPTA-AM hatása az I_{Kr} áramra (APVC)	48
6.11. A 9-phenanthrol hatása a szívműzat fontosabb ionáramaira	50
6.12. A 9-phenanthrol hatása az akciós potenciál morfológiájára.....	54
7. Megbeszélés	58
8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények	69
9. Összefoglalás.....	70
10. Summary	71
11. Irodalomjegyzék.....	72
12. Saját közlemények listája	85
13. Tárgyszavak	87
14. Keywords	87
15. Köszönetnyilvánítás	88
16. Függelék	90

1. Alkalmazott rövidítések jegyzéke

[Ca²⁺]_i	intracelluláris kalcium koncentráció
4-AP	4-aminopiridin
9-AC	antracén-9-karboxilsav
A23187	calcimycin
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
AP	akciós potenciál
APD₉₀	AP kezdetétől mért azon időtartam, mely az AP amplitúdójához képest mért 90 %-os repolarizációig telt el
BAPTA	1,2-Bisz(2-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav
BAPTA-AM	1,2-Bisz(2-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav tetrakis (acetoximetilészter)
BAY K8644	1,4-Dihidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-(2-[trifluorometil]fenil)piridin-3-karbonsav metilészter
CL	ciklushossz (cycle length)
DAD	késői utódepolarizáció (delayed afterdepolarization)
DIDS	4,4'-diizotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav
E4031	N-[4-[[1-[2-(6-Metil-2-piridinil)etil]-4-piperidinil]karbonil]fenil]metánszulfonamid dihidroklorid
EAD	korai utódepolarizáció (early afterdepolarization)
EGTA	Etilén glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
ENDO	szubendokardiális
EPI	szubepikardiális
HMR-1556	N-[(3R,4S)-3,4-Dihidro-3-hidroxi-2,2-dimetil-6-(4,4,4-trifluorobutoxi)-2H-1-benzopirán-4-il]-N-metilmetánszulfonamid
I_{9-AC}	9-AC szenzitív áram
I_{Ca,L}	L-típusú kalciumáram (L-type calcium current)
I_{Cl(Ca)}	Ca ²⁺ -függő Cl ⁻ áram
I_{K1}	befelé egyenirányító káliumáram (inward rectifier potassium current)
I_{Kr}	késői egyenirányító káliumáram gyors komponense (rapid component of delayed rectifier potassium current)
I_{Ks}	késői egyenirányító káliumáram lassú komponense (slow component of delayed rectifier potassium current)

I_{Na}	nátriumáram (sodium current)
I_{NCX}	Na ⁺ /Ca ²⁺ ioncserélő (Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger) áram
ISO	isoproterenol
I_{to1}	tranziens kifelé irányuló káliumáram (transient outward potassium current)
I_{to2}	Ca ²⁺ -függő kloridáram (transient outward chloride current)
JMM	Joklik által módosított Minimum Essential Medium
MEM	Minimum Essential Medium (szintetikus sejtenyésztő oldat)
MID	midmiokardiális
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ cseremechanizmus (Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger)
plató₅₀	platópotenciál, az APD ₉₀ felénél mérhető membránpotenciál
RMP	nyugalmi membránpotenciál
SEM	középérték közepes hibája (standard error of the mean)
SR	szarkoplazmatikus retikulum
SV	rövidtávú variabilitás (short term beat-to-beat variability of APD)
TRPM4	Tranziens receptorpotenciál kationcsatorna 4, „M”-alcsalád
V_{max}	depolarizáció maximális sebessége
V̇_{max}	terminális repolarizáció maximális meredeksége

2. Bevezetés

Szervezetünkben a vért egy életen át a szívünk tartja keringésben. A szív egy elektromechanikus pumpa, benne spontán ritmikusan keletkező akciós potenciálok (AP) hatására összehúzódás és ellazulás váltakozik egymás után. A szív tömegének nagy részét pitvari és kamrai szívimomsejtek alkotják, amelyek kontrakciós erőt generálnak és a pumpafunkciót látják el („munkaizomzat”)²⁵.

A kamrai szívimomsejtek AP-ja számos ionáram együttes működése alapján jön létre. Ezen ionáramok az AP eltérő fázisaiban aktiválódnak, és különböző mértékben járulnak hozzá annak kialakításához¹²⁴.

Az alapállapotban lévő, nem aktivált sejtekben a sejt plazma szabad Ca^{2+} -koncentrációja $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 10 és 100 nM között változik. A Ca^{2+} -szint emelkedése eltérő, akár párhuzamos folyamatokat indukálhat, amelyek számos sejt funkció aktiválásához vezetnek, mint például a szívimomsejtek összehúzódása is. A szívimomzat kontrakciójának erőssége bizonyos határok között függ a Ca^{2+} -jel nagyságától, a szarkoplazma Ca^{2+} -szintjének emelkedésétől. Magasabbra emelkedő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint az összehúzódás erejének fokozódását okozza²⁵.

A membrán feszültségváltozásaival párhuzamosan a kalcium szint oszcillációja figyelhető meg, aminek direkt, azonnali hatása van a kalcium-függő áramokra. A szívben az ionáramok széles skálájáról ismert, hogy Ca^{2+} -függőek, beleértve a $\text{Na}^{+74, 104}$, a $\text{Ca}^{2+22, 58}$, a $\text{K}^{+77, 109}$, a $\text{Cl}^{-39, 46}$, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélő^{88, 119} és nem specifikus kation áramokat^{32, 33}. Fontos a kalciumfüggő ionáramok élettani és patofiziológiai működésének megismerése.

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

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

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A kamrai szívmembránok akciós potenciálja és ionáramai

Az élő sejtek membránjának két oldala között potenciálkülönbség van, az intracelluláris tér negatívabb az extracelluláris térhez viszonyítva. A nyugalmi membránpotenciál értéke sejtípustól függően -50 és -90 mV közötti értéket vehet fel.

A nyugalmi membránpotenciál mérhető elektrofiziológiai módszerekkel, illetve kiszámítható a Goldman-Hodgkin-Katz egyenlet (*1. egyenlet*) alapján. Ennek értelmében a nyugalmi membránpotenciál értéke azon ion egyensúlyi potenciáljához áll közel, amelyre nézve a sejtmembrán permeabilitása a legnagyobb.

$$V_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{p_K [K^+]_e + p_{Na} [Na^+]_e + p_{Cl} [Cl^-]_i}{p_K [K^+]_i + p_{Na} [Na^+]_i + p_{Cl} [Cl^-]_e}$$

1. egyenlet.

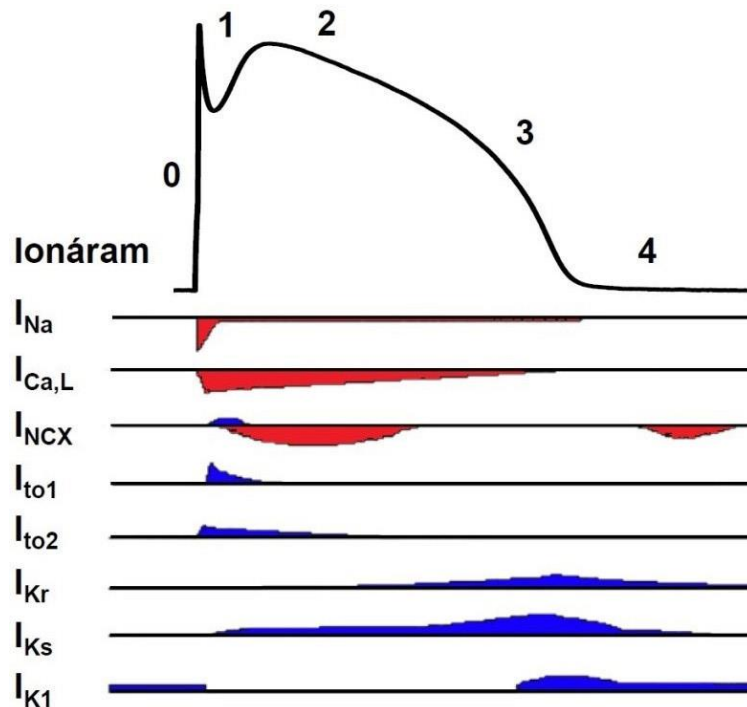
ahol V_m az aktuális membránpotenciál, R az egyetemes gázállandó, T a hőmérséklet, F a Faraday-állandó, P a sejtmembrán adott ionra vonatkoztatott permeabilitása, illetve az $[ion]_e$ és $[ion]_i$ az adott ion extra- (e) illetve intracelluláris (i) koncentrációja^{30, 42}.

A kamrai szívmembránok AP-ja számos ionáram együttes működése alapján jön létre. Ezen ionáramok az AP eltérő fázisaiban aktiválódnak (*1. ábra*), és különböző mértékben járulnak hozzá annak kialakításához¹²⁴.

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

Az 1. fázis egy gyors, rövid ideig tartó részleges repolarizáció, melyet a tranziens kifelé irányuló áram hoz létre. Ennek van egy 4-aminopiridin érzékeny komponense (tranziens kifelé irányuló káliumáram – transient outward potassium current, I_{to1}) valamint egy Ca^{2+} -

függő kloridáram komponense (tranziens kifelé irányuló kloridáram – transient outward chloride current, I_{to2}).



1. ábra. A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és ionáramai. Az ábrán felül az AP fázisai, alul az azt kialakító ionáramok láthatóak. A piros kitérések az inward áramok, a kék kitérések az outward áramok. I_{Na} : gyors nátriumáram; $I_{Ca,L}$: L-típusú kalciumáram; I_{NCX} : Na^+/Ca^{2+} csereáram; I_{to1} és I_{to2} : tranziens kifelé irányuló áramok; I_{Kr} és I_{Ks} : késői egyenirányító káliumáram gyors és lassú komponense; I_{K1} : befelé egyenirányító káliumáram. Varró és munkatársa által közölt ábra módosítva¹¹².

A 2. fázis során aktiválódik az L-típusú kalciumáram (L-type calcium current, $I_{Ca,L}$) és a késői káliumáramok. A plató fázis alatt nincsen jelentős nettó mérhető membránáram és repolarizáció az I_{to} gyors inaktíválódása és a különböző repolarizáló K^+ csatornák lassú aktivációja miatt.

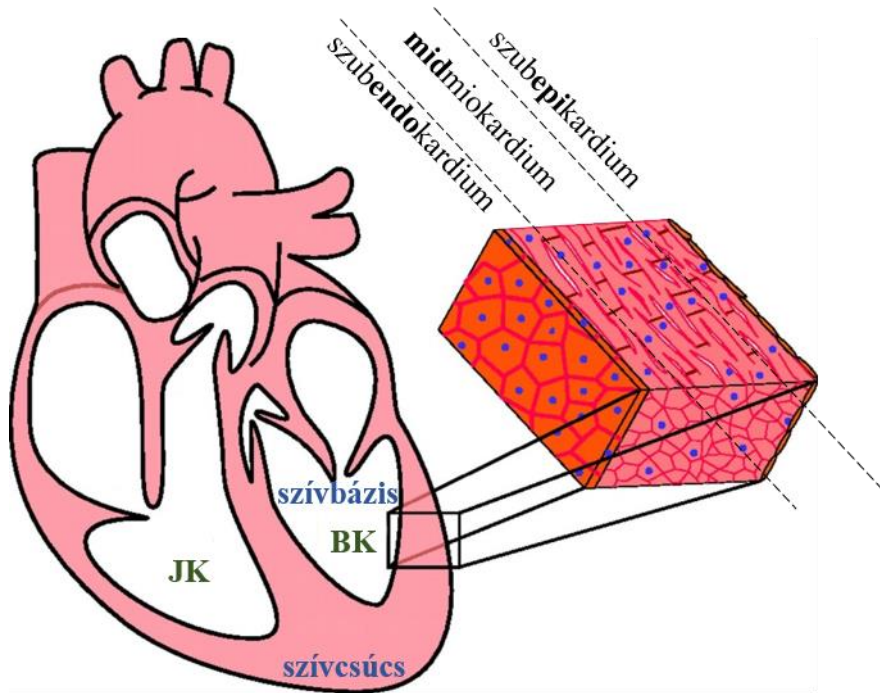
A 3. fázis során az $I_{Ca,L}$ inaktíválódik és több káliumáram párhuzamosan, fokozatosan aktiválódik. Fontos ionáramok az AP ezen szakaszában a késői egyenirányító káliumáram lassú és gyors komponense (slow/rapid component of delayed rectifier potassium current, I_{Ks}/I_{Kr}) és végül a terminális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

A 4. fázis a nem ingerelt kamrai szívizomsejtek elektromos diasztole szakasza, a nagy I_{K1} konduktancia tartja fenn, megegyezik a nyugalmi membránpotenciállal, értéke -80 mV^{19} .

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

3.2. A kamrai repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitása

A szív AP eltérő a munkaizomzat különböző régiói között (2. ábra). A repolarizáció térbeli inhomogenitása magában foglalja a repolarizáció apiko-bazális gradiensét¹⁰⁰, illetve a transmuralis diszperzióját⁶⁶, továbbá a két kamra közötti különböző repolarizációs időket¹¹⁷.



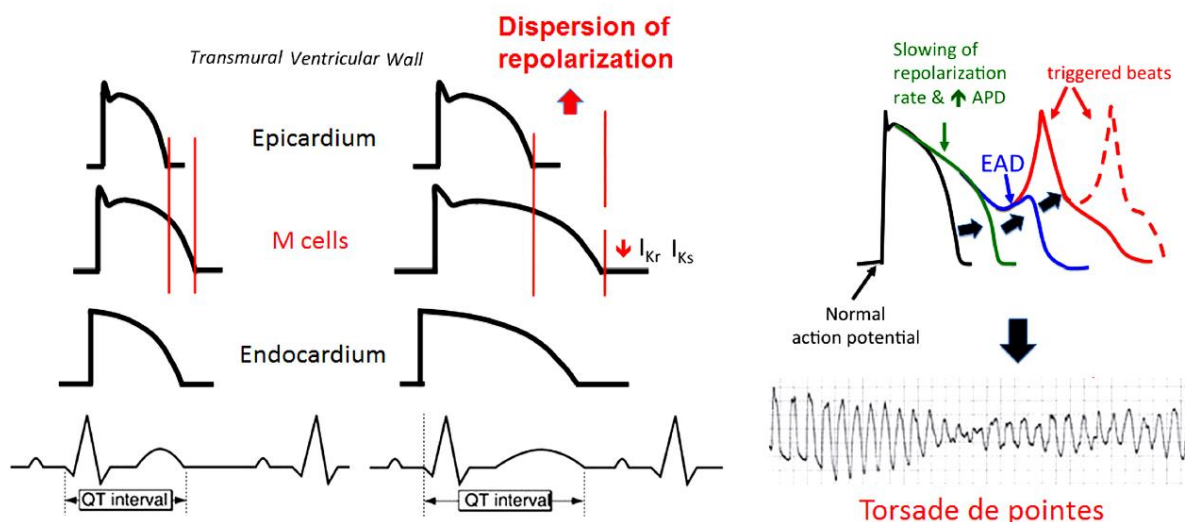
2. ábra. A szív bal kamrájának repolarizációjára jellemző a térbeli inhomogenitás. Az ábrán a szívcsúcs és szívbasz, a jobb (JK) és bal (BK) kamra vannak kiemelve. Szaggatott vonal választja el a szubendokardiumot, midmiokardiumot és szubepikardiumot. Lin és munkatársai által közölt ábra módosítva⁶⁴.

A szívcsúcs felé eső, ún. „apikális” szívizomterületek akciós potenciálja rövidebb, mint az annulus fibrosus felé eső, ún. „bázis” részen. Ezt a különböző káliumáramok eltérő aránya okozhatja⁸⁰. Az apiko-bazális inhomogenitás mellett transmuralis AP inhomogenitás is megfigyelhető. A kamrai szívizomzat az AP alakjának szempontjából három, szubepikardiális (EPI), szubendokardiális (ENDO) és a kettő között elhelyezkedő midmiokardiális (MID) régióra osztható¹²⁴. Az epikardiális sejtek ún. „tüske és kupola” konfigurációjúak, ami a kifejezett 1. fázis repolarizáció következménye (3. ábra). A midmiokardiális vagy M-sejteken kisebb a korai repolarizáció, endokardiális sejteken a legkisebb. Az akciós potenciálok időtartama (APD) is különbözik a kamrafal eltérő rétegeiben. A MID sejtek akciós potenciálja a leghosszabb, az EPI sejteké viszont rövid. A transmuralis eltérések okozója lehet az I_{to} különböző denzitása⁶¹, illetve a kalciumcsatornák újrainyílása EPI sejteken²⁶. A regionális

heterogenitás befolyásolja az EKG hullámok alakját², míg a heterogenitás növekedése reentry kialakítása miatt aritmogén^{3, 111}.

A szívben állandó szívfrekvencia esetén az egymást követő ütések időtartama ütésről ütésre változik, a jelenség neve a „beat-to-beat” variabilitás, vagy másnéven rövidtávú variabilitás (short-term variability, SV). Számos faktornak tulajdonítanak szerepet a SV létrehozásában, mint pl. az ioncsatornák sztochasztikus viselkedése^{59, 86}, az ingerlési frekvencia és farmakológiai behatások⁵², az AP alakja és időtartama⁴⁰, az ioncsatorna denzitás⁵⁰, vagy az intracelluláris Ca^{2+} -szint szabályozás⁵¹ is részt vesz annak kialakításában.

A QT-intervallum megnyúlását a szívritmuszavarok rizikófaktorának tekintik, mivel elősegítheti a korai utódepolarizációk (EAD-k) és a torsades de pointes kamrai tachycardia (TdP)⁶⁰ kialakulását (3. ábra). A SV megfigyelhető az AP-ok időbeli és térbeli variabilitásaként, helyi aktivációs és recovery intervallumokban vagy a testfelszíni EKG QT-intervallumának variabilitásaként. A QT-intervallum rövid távú variabilitásának növekedése azonban magasabb prediktív értékkel rendelkezik, mint a QT-intervallum abszolút hosszának megnyúlása^{63, 82, 108, 121}.

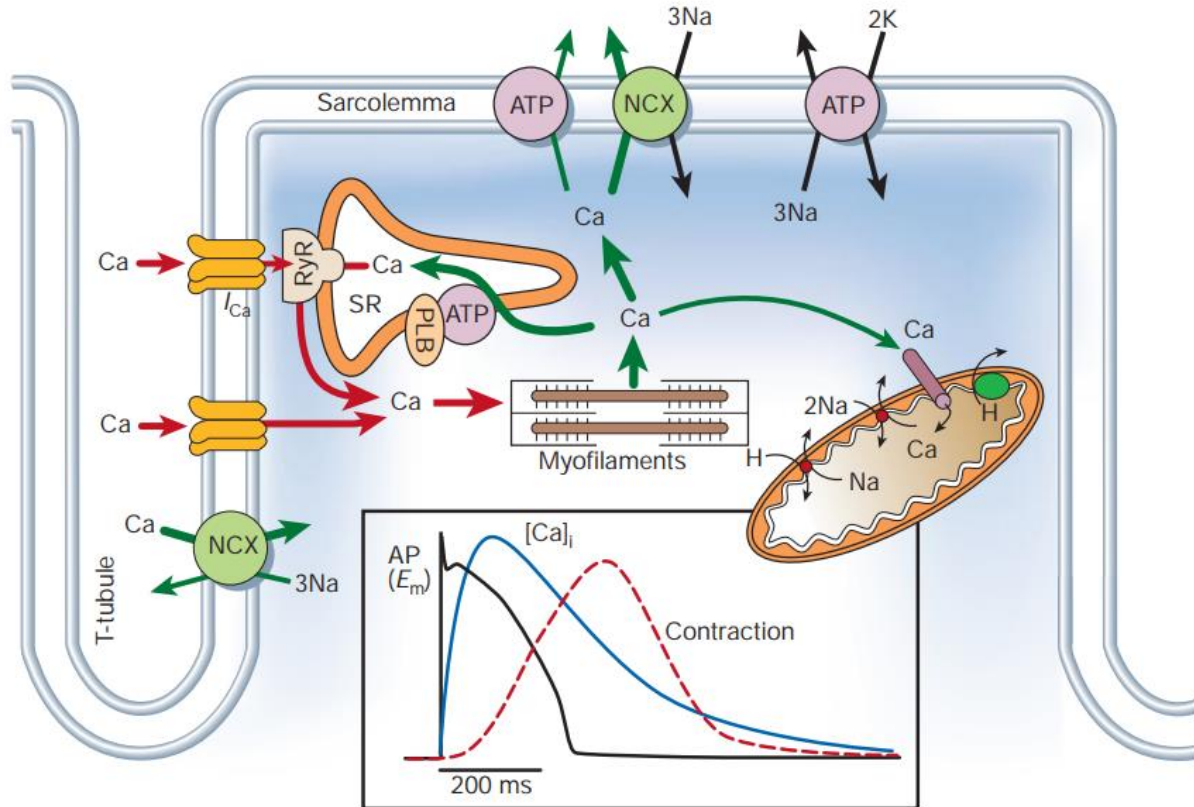


3. ábra. A repolarizáció diszperziója a QT-intervallum megnyúlásához vezet, ezért szívritmuszavarok rizikófaktorának tekintik. Bal oldalon láthatóak a szívizomzat eltérő transzmurális rétegeire jellemző akciós potenciálok, továbbá a repolarizáció heterogenitásának szerepe a QT-intervallum megnyúlásában. Az ábra jobb oldalán figyelhető meg a korai utódepolarizáció (EAD) hozzájárulása a torsades de pointes kamrai tachycardia létrejöttéhez. Barra és munkatársai által közölt ábra módosítva¹⁰.

3.3. A szívizomsejtek kalcium homeosztázisa

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

A szívizom excitációs-kontrakciós kapcsolata az elektromos jel mechanikai válasszá alakítása. A Ca^{2+} elengedhetetlen a sejtek elektromos aktivitásához és a kontrakcióhoz (4. ábra), az utóbbi teljes mértékben függ a környezet Ca^{2+} -koncentrációjától. A szív ciklus során a felszabaduló, majd eltávolított Ca^{2+} mennyiségnek azonosnak kell lennie, mivel ellenkező esetben szívizomsejt Ca^{2+} -nal túltöltődne vagy kiürülne.



4. ábra. A kamrai szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisa. Az ábrán kamrai szívizomsejt akciós potenciálja és Ca^{2+} tranziense látható. NCX: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélő, RyR: rianodin receptor, PLB: foszfolambán, SR: szarkoplazmatikus retikulum. Bers által közölt ábra¹³.

A kontrakciót kiváltó teljes Ca^{2+} -jel kb. 30%-a származik az extracelluláris folyadékból és mintegy 70%-a a szarkoplazmatikus retikulumból (SR). Az AP plató fázisa során depolarizációt követően Ca^{2+} -ok lépnek be az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ és a reverz módú $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ csereáram (I_{NCX}) áramokkal a szívizomsejtekbe, ahol az SR-ből rianodin receptorokon keresztül további Ca^{2+} -ot szabadít fel. A jelenség neve Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulás. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció átmeneti növekedése, majd csökkenése a Ca^{2+} tranziens²⁵.

A $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ depolarizációra aktiválódik, majd idő- és Ca^{2+} -függő módon inaktiválódik. Az ioncsatornán át a sejtbe jutó Ca^{2+} -ok mellett a SR-ből történő Ca^{2+} felszabadulás szintén hozzájárul a Ca^{2+} csatorna Ca^{2+} -függő inaktivációjához⁹⁴. A nagy mértékű Ca^{2+} beáramlás

vagy felszabadulás további Ca^{2+} beáramlást csökkent, megakadályozva ezáltal a proaritmiás hatású Ca^{2+} túltöltődést.

A szívizomsejtek relaxációjához a Ca^{2+} -ot el kell távolítani a szarkoplazmából. A Ca^{2+} eltávolításában résztvevő folyamatok egymáshoz viszonyított aránya fajfüggést mutat¹¹. A kontrakció lecsengésekor a szarkoplazma emelkedett Ca^{2+} -tartalmának 70%-át a SR Ca^{2+} -pumpája juttatja vissza a SR-ba. A maradék 30% eltávolítását az extracelluláris folyadékba a plazmalemma $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélő transzportere és a plazmalemma Ca^{2+} -pumpája végzi²⁵.

3.4. A szívizomsejtek kalciumfüggő kloridárama

A $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ részt vesz az AP repolarizációjában nyúl^{93, 127}, birka¹¹⁴, sertés⁶² és kutya¹²⁶ szívizomsejtekben. Korábban már leírtam az akciós potenciált létrehozó ionáramok jellemzésekor, hogy az 1. fázis repolarizációért szívizomsejtekben a tranziens kifelé irányuló áramok, a I_{to1} és I_{to2} felelősek. A I_{to2} a pillanatnyi membránpotenciáltól és a Cl^- egyensúlyi potenciáljától (E_{Cl^-} : -50 mV és -30 mV között^{18, 75}) függően depolarizálja vagy repolarizálja a membránt. Az akciós potenciál plató fázisa alatt a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ a membránpotenciált negatív irányba tolja, repolarizáló áramként van jelen, csökkenti az APD-át. A Cl^- egyensúlyi potenciáljától negatívabb membránpotenciálok (nyugalomban) azonban a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ depolarizáló hatású és ezáltal EAD és késői utódepolarizációk (DAD) létrejöttét segítheti elő³⁸.

Munkacsoportunk korábban megállapította, hogy kutya és humán szívizomzatban a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ az AP során az 1. fázis és terminális repolarizáció alatt aktiválódik. Ezen munka során a munkatársaim azt is meghatározták, hogy a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktiválásában alapvető jelentőségű a csatorna közelében elhelyezkedő L-típusú Ca^{2+} csatornákon át történő Ca^{2+} belépés, a szarkoplazmatikus retikulumból felszabaduló Ca^{2+} csak felerősíti a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktivációját⁴⁶.

A kalciumfüggő kloridáram gátlószere, 9-AC

A Ca^{2+} -függő Cl^- csatornák vizsgálatára több eltérő szerkezetű gátlószert is használnak. Korábban munkacsoportunk megvizsgálta kutya izolált szívizomsejteken a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot két, széleskörűen alkalmazott Cl^- csatorna gátlószert, antracén-9-karboxilsav (9-AC) és 4,4'-diizotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav (DIDS) segítségével⁹⁵. Akkor munkatársaim bebizonyították, hogy a 9-AC-érzékeny áram Ca^{2+} -függő és a Cl^- a töltéshordozó. A két inhibitor közül a 9-AC előnyösebb a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ élettani szerepének a vizsgálatára, mert az általunk vizsgált koncentrációban nem gátolta az AP-t létrehozó fontosabb ionáramokat (I_{Na} , $I_{\text{Ca,L}}$, I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}).

3.5. A kalciumfüggő kloridáram pro- vagy antiaritmiás szerepe

A szívritmuszavarokban a szív elektromos aktivitása megváltozik. Ezen ritmuszavarok némelyike lehet életveszélyes tachyaritmia, mint TdP és kamrafibrilláció. Ezek a tachyaritmiák hirtelen szívhalált okozhatnak, amely vezető halálok Európában és az Amerikai Egyesült Államokban^{24, 48}.

Az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis rendellenességei (Ca^{2+} túlterhelés és spontán Ca^{2+} felszabadulás a SR-ból) szintén elősegíthetik TdP kialakulását¹⁰⁶. A spontán SR Ca^{2+} felszabadulás aktiválja a sejt Ca^{2+} eltávolító mechanizmusait, és egy tranziens befelé irányuló áramot hoz létre, ami DAD-hoz vezet és triggerelt aktivitást okoz. A tranziens befelé irányuló áram forrása lehet a forward üzemmódban működő I_{NCX} , vagy a $I_{Cl(Ca)}$ aktiválódása^{103, 128}.

A $I_{Cl(Ca)}$ Ca^{2+} -túlterhelt sejtekben DAD kialakulását okozhatja^{20, 128}, így aritmogén hatású lehet. Ennek ellentmond, hogy bizonyos körülmények között kiváltott EAD-k és DAD-k előfordulása nőtt, ha kutya kamrai sejtekben gátolták az $I_{Cl(Ca)}$ -t 9-AC segítségével²⁷, ami az $I_{Cl(Ca)}$ szívritmuszavarokat mérséklő szerepét mutatja. Hasonlóképpen, az $I_{Cl(Ca)}$ fontos szerepet játszhat az aritmiák megelőzésében acidózisban nyúl kamrai szívizomsejtekben⁴¹. Ez az antiaritmiás funkció azonban elmaradt juhok EAD modelljében, ahol a DIDS alig volt hatással¹¹³. Ezek az ellentétes eredmények további vizsgálatokat igényelnek az $I_{Cl(Ca)}$ pro- vagy antiaritmiás szerepének meghatározásához.

3.6. A kalciumfüggő kloridáramért felelős fehérjék

Az $I_{Cl(Ca)}$ molekuláris identitása még mindig nem teljesen tisztázott; a TMEM16A és a Bestrophinok a legvalószínűbb jelöltek, az utóbbiak legalábbis mint a Ca^{2+} -érzékeny csatorna alegységek⁹⁷.

A Transmembrane protein 16 (TMEM16) család fehérjéi anion csatornák 8 transzmembrán doménnel, innen származik a fehérjecsalád másik elnevezése: az Anoctamin1 vagy röviden Ano1⁴⁷. Egyre több információ áll rendelkezésre a TMEM16 fiziológiai funkcióiról simaizomban²¹, valamint neuronális és más szövetekben⁸⁴. A TMEM16A rágcsálók kamrájában expresszálódik, és valószínűleg ez a fehérje felelős a kamrai szívizomsejtek $I_{Cl(Ca)}$ -áért¹²². A TMEM16A-t vizsgálva több munkacsoport is a klasszikus $I_{Cl(Ca)}$ -hoz nagyon hasonló ionáramot regisztrált^{12, 72, 103}.

A Bestrophin-t először a Best-féle vitelliform macula dystrophiáért felelős génként írták le⁸⁵. A Best-1 génmutációt hordozó knock-in egerek retinális pigment epitél sejtjeinek Cl^- konduktanciája változatlan volt, azonban a mutáció az emberi megbetegedésekhez hasonló

retinális elváltozásokat okozott¹²⁵. Mindent egybevetve, feltételezhetjük, hogy a Bestrophin-ok anion csatornák, viszont funkciójuk a $I_{Cl(Ca)}$ létrehozásában még nem tisztázott.

Korábban munkacsoportunk kimutatta a TMEM16A és a Bestrophin-3 expresszióját mind kutya, mind emberi izolált bal kamrai szívműködésben⁴⁶. Immuncitokémiai kísérletekkel bizonyítottuk továbbá, hogy ez a két fehérje és a $Ca_v1.2$ csatorna a sarcolemmában kolokalizált, ami azt sugallja, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatornán keresztül bejutó Ca^{2+} közvetlenül szabályozza a $I_{Cl(Ca)}$ -t kutya kamrai szívműködésben⁴⁶.

3.7. Intracelluláris kalcium koncentráció befolyásolása

A sejtszintű elektrofiziológiai kísérletekben az intracelluláris kalciumkoncentrációt gyakran puffereljük ún. kalcium kelátorokkal, melyek közül gyakran alkalmazott az EGTA és a BAPTA. A BAPTA sokkal gyorsabb Ca^{2+} kötési kinetikával bír⁷⁶ (1. táblázat), ezért a két szer a különböző szubcelluláris kompartmentekben eltérő módon képes a Ca^{2+} pufferelésére⁸³.

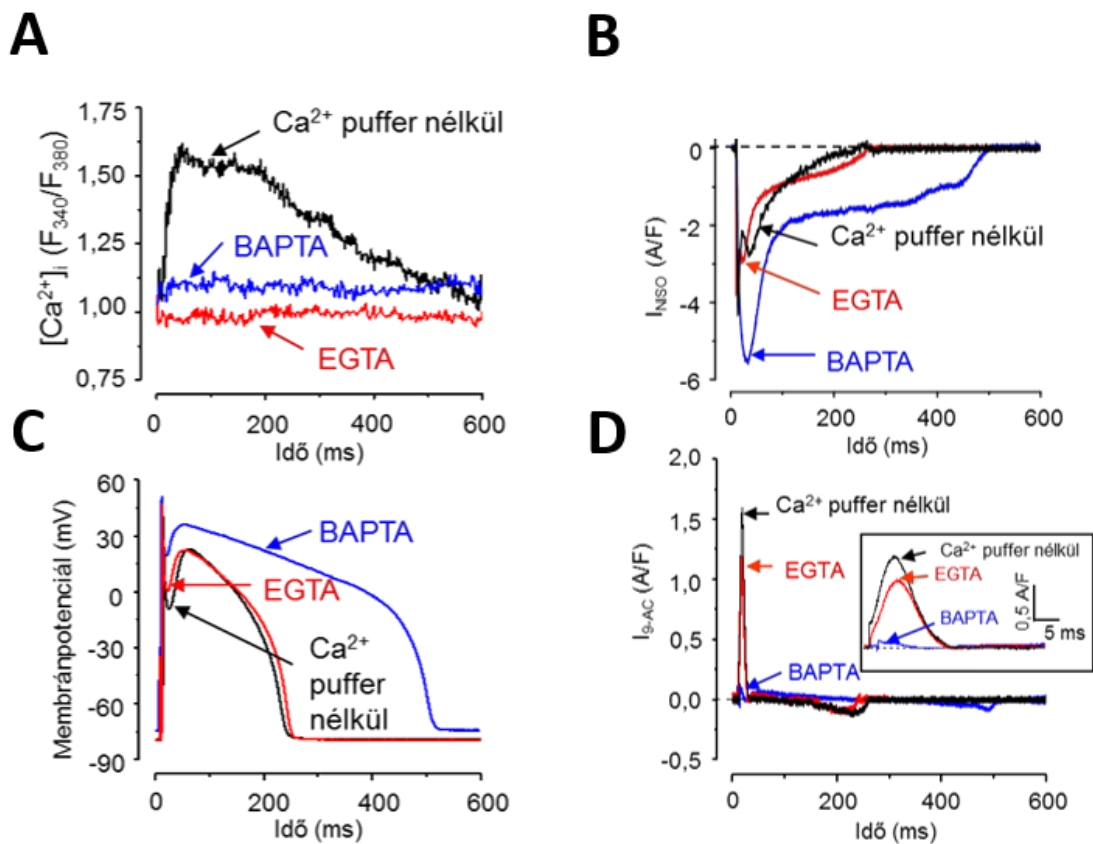
1. táblázat. Kalcium kelátorok kinetikai tulajdonságainak összehasonlítása. Pirossal kiemelve a BAPTA és az EGTA látható. A kelátor- Ca^{2+} kötés kialakulási sebessége (k_{on}), visszaalakulási sebessége (k_{off}) és a disszociációs állandó (K_d) vannak feltüntetve. Naraghi által közölt, módosítva⁷⁶.

Table Summary of the results

Buffer	k_{on} (1/(M.s))	k_{off} (1/s)	K_D (μ M)
Calcium-Green-1	$(7.5 \pm 0.25) \times 10^8$	120 \pm 12	0.16*
Fluo-3	$(7.1 \pm 0.31) \times 10^8$	369 \pm 25	0.52*
Calcium-Green-5N	$(4.0 \pm 0.14) \times 10^8$	9259 \pm 190	23.1*
Calcium-Orange-5N	$(2.1 \pm 0.23) \times 10^8$	11 670 \pm 273	55.6*
Fura-2	$(4.0 \pm 0.18) \times 10^8$	103 \pm 7	0.258*
Bis-Fura-2	$(5.5 \pm 0.21) \times 10^8$	257 \pm 14	0.467*
Fura-2/AM	$(7.5 \pm 1.15) \times 10^8$	26 760 \pm 1800	35.7*
BAPTA	$(4.5 \pm 0.15) \times 10^8$	79 \pm 4	0.176*
EGTA	$(2.7 \pm 0.25) \times 10^6$	0.5*	0.180*
H-EDTA	$(4.5 \pm 0.27) \times 10^6$	20*	4.4*
DPTA	$\geq 4.0 \times 10^7$	≥ 3200	80*

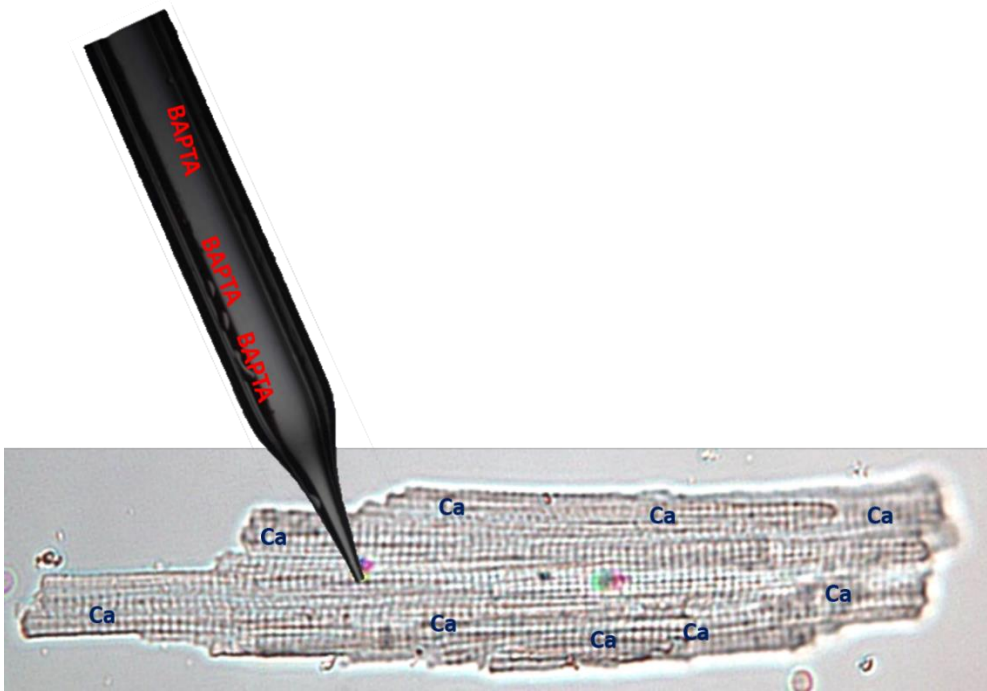
A szarkolemma és a SR közötti ún. juncionális résben (az L-típusú Ca^{2+} csatornák és a rianodin receptorok közötti térben) a Ca^{2+} koncentrációja sokkal magasabb értéket érhet el, és kinetikailag gyorsabban változik a citoplazmában mérhető globális Ca^{2+} koncentráció változásokhoz viszonyítva^{1, 23, 42}. Nagyon fontos a megfelelő kinetikával rendelkező kalcium kelátor megválasztása az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez, különösen igaz ez a Ca^{2+} -függő áramok vizsgálata esetén. A szívben az ionáramok széles skálájáról ismert, hogy Ca^{2+} -függőek, beleértve a $Na^{+74, 104}$, a $Ca^{2+ 22, 58}$, a $K^{+77, 109}$, a $Cl^{-39, 46}$, Na^+/Ca^{2+} cserélő^{88, 119} és nem specifikus kation áramokat, pl. TRPM4 áramot^{32, 33}.

Korábban munkacsoportunk megvizsgálta a BAPTA és az EGTA $I_{Cl(Ca)}$ -ra és $I_{Ca,L}$ -ra gyakorolt hatása közötti különbséget (5. ábra). Annak ellenére, hogy egyik puffer jelenlétében sem volt Ca^{2+} tranziens, csak a BAPTA volt képes hatékonyan csökkenteni az $I_{Ca,L}$ Ca^{2+} -függő inaktivációját, ami nagyobb I_{NISO} (megegyezik az L-típusú kalciumárammal) amplitúdót és áram által szállított ösztötlést okozott, valamint hosszabb akciós potenciált is eredményezett. BAPTA jelenlétében a I_{9-AC} (megegyezik a Ca^{2+} -függő kloridárammal) megszűnt, viszont EGTA hatására csak csökkent az áram amplitúdója és az áram által szállított ösztötlés.



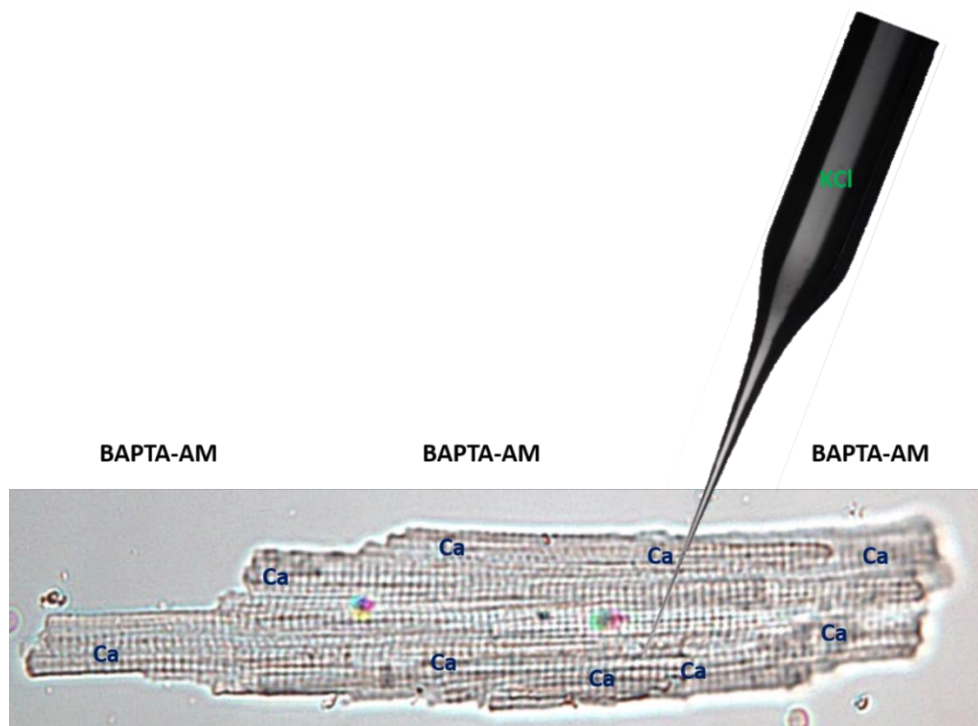
5. ábra. A BAPTA és EGTA hatásának vizsgálata a $I_{Ca,L}$ -ra és $I_{Cl(Ca)}$ -ra. Ca^{2+} kelátor nélküli és Ca^{2+} kelátor tartalmú (10 mM BAPTA vagy EGTA) pipetta oldatokkal mért reprezentatív (A) Ca^{2+} tranziensek (B) nisoldipine szenzitív áramgörbék (I_{NISO}) (C) akciós potenciálok (D) 9-AC szenzitív áramgörbék (I_{9-AC}). Horváth és munkatársai által közölt ábra módosítva⁴⁶.

Feszültség-clamp kísérletekben a $[Ca^{2+}]_i$ pufferelése viszonylag egyszerű, mivel az intracelluláris kompartment BAPTA Ca^{2+} kelátképzővel történő dialízisét könnyen elvégezhetjük nagy csúcsátmérőjű (tipikusan $>2 \mu m$) patch pipettával (6. ábra).



6. ábra. Szívizomsejt intracelluláris kalcium tartalmának pufferelése BAPTA-t tartalmazó patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében mikropipetta segítségével. A pipettabelsőben lévő kalcium kelátor ebben az esetben a viszonylag nagy csúcsátmérő következtében képes a sejtbe jutni és ott Ca^{2+} -hoz kötődni.

Az akciós potenciálok fiziológias körülmények közötti rögzítése hagyományos hegyes mikroelektrodákkal történik, azonban ekkor a kelátor pipettán keresztüli sejtbe juttatása nem lehetséges a mérőelektrod csúcsának kis átmérője miatt. Ebben az esetben a Ca^{2+} kelátképző sejt-permeábilis acetoxi-metilészter formáját (BAPTA-AM, EGTA-AM) alkalmazhatjuk a $[Ca^{2+}]_i$ redukálására (7. ábra). Ilyen kísérleteket évtizedek óta végeznek, és a kapott eredményeket kizárólag a $[Ca^{2+}]_i$ puffereléssel értelmezték^{14, 15, 81, 118, 123} annak ellenére, hogy ismert: a BAPTA-AM (és az EGTA-AM is) kölcsönhatásba lép a HEK sejtekben kifejezett K^+ csatornákkal¹⁰⁵.

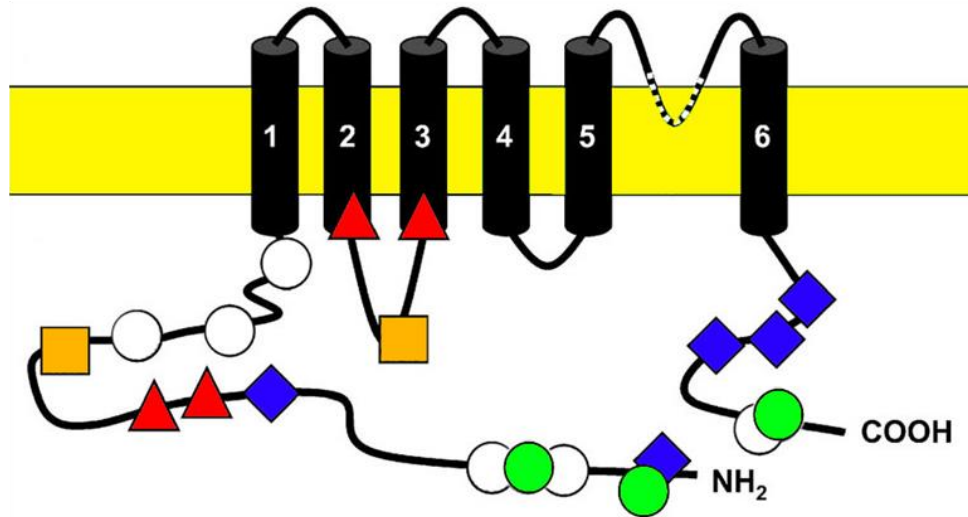


7. ábra. Szívizomsejt intracelluláris kalcium tartalmának pufferelése extracellulárisan alkalmazott BAPTA-AM használatával hegyes mikroelektroda technika esetén. Ebben a kísérleti elrendezésben az akciós potenciálok elvezetésére magas KCl-tartalmú mikroelektrodát kell használnunk, a belső oldat nem módosítható, továbbá a csúcsátmérő rendkívül kicsi, ami lehetetlenné teszi a BAPTA használatát a hagyományos feszültség-clamp kísérletekben alkalmazott módon. A BAPTA sejt-permeábilis acetoxi-metilészter formáját használhatjuk ilyen kísérletekben a kalcium pufferelésére.

3.8. A szívizomsejtek TRPM4 árama

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

A TRPM4 fehérje szerkezetét (8. ábra) hat transzmembrán domén alkotja⁵⁷. A fehérje N- és C-terminális végein a csatorna több PKA és PKC foszforilációs helyet, ABC-motívumot (ATP-binding cassette, ATP-kötő kazetta), kalmodulin kötőhelyet, Walker B motívumot (ATP kötőhelyként tartják számon), PiP2 (foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát) kötőhelyet és ún. „feltekereselt tekercs” (coiled coil) domént tartalmaz^{36, 70, 98}.



8. ábra. A TRPM4 csatorna szerkezete. A TRPM4 fehérje hat transzmembrán doménből épül fel. Jelmagyarázat: fehér kör: PKC foszforilációs hely, zöld kör: PKA foszforilációs hely, kék négyzet: kalmodulin kötőhely, narancssárga négyzet: ABC-motívum, piros háromszög: Walker B motívum.

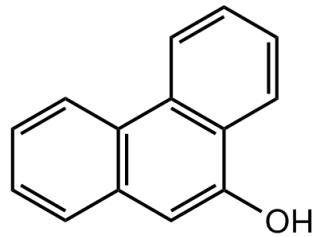
A TRPM4 csak egyértékű kationokra permeábilis, permeabilitási sorrendje: $\text{Na}^+ \sim \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$ ⁷⁹. Fiziológias körülmények között, az intracelluláris kalcium növelésével történő aktiválás ($K_d=400 \text{ nM}$) után a TRPM4 indukálja a nátrium bejutását, ami membrán depolarizációhoz vezet^{57, 78}.

TRPM4 csatornák jelenlétét leírták patkány, egér, szarvasmarha és humán szívben expressziós, vagy elektrofiziológiai vizsgálatokkal³². A TRPM4 génfüggő mutációi az I. típusú familiáris szívbetegséghez köthető^{56, 68}. Továbbá a TRPM4 gén genetikai elváltozásai pitvar-kamrai szívblokkhoz, jobb Tawara-szár-blokkhoz, bradycardiához és Brugada-szindrómához vezetnek^{67, 96}. A TRPM4 áram patkányban, egérben és nyúlban hozzájárul a pacemaker funkcióhoz is, valószínűsíthetően bradycardia elleni védő funkció céljából⁴⁴. A TRPM4 áram hatására növekszik az APD pitvari izomban és izolált szívizomsejtekben egyaránt⁹¹. Rágcsálók kamrai izmaiban a β -adrenerg stimuláció inotróp hatásának közvetítésében a TRPM4 is részt vesz⁷¹. Az áramról leírták, hogy képes az angiotenzin II indukált hipertrófia csökkentésére⁵⁴.

Mivel a Ca^{2+} -függő csatornák Na^+ és K^+ ionok között nem válogatnak, többnyire inward áramot hoznak létre, ami növeli az aritmiára való hajlamot. Ellentétben ezzel, az esetleges TRPM4 gátlás antiaritmiás hatású^{33, 34, 91, 92}.

A TRPM4 áram gátlószere, 9-phenanthrol

Jelenleg a TRPM4 farmakológiája még viszonylag ismeretlen. Kísérletekben leggyakrabban flufenaminsavat, vagy 9-phenanthrolt (*9. ábra*) alkalmaznak az áram gátlására, azonban a flufenaminsav bizonyítottan nem szelektív, a 9-phenanthrol TRPM4 szelektivitása pedig szívben eddig nem nyert hiteles bizonyítást^{17, 35, 91, 92}. Fontos megjegyezni, hogy a 9-phenanthrol szívelektrofiziológiai hatásait eddig csak egerekben vizsgálták^{91, 92}, egy olyan fajban, amely akciós potenciálja és az azt létrehozó ionáramai nagy mértékben eltérnek az emberétől.



9. ábra. A 9-phenanthrol szerkezeti képlete.

4. Célkitűzés

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

Munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy a kalcium kelátor BAPTA-AM és I_{Ks} illetve I_{Kr} kálium csatornát gátló vegyületek együttes alkalmazásakor a BAPTA-AM akciós potenciál morfológiájára gyakorolt hatása függött az alkalmazott kálium csatorna gátlószer szelektivitásától⁴⁵. A 3.7. fejezetben említettem, hogy a BAPTA-AM és az EGTA-AM is kölcsönhatásba lép HEK sejtekben kifejezett K^+ csatornákkal¹⁰⁵. Ismert továbbá, hogy a hatóanyag-csatorna kölcsönhatások jelentősen eltérőek lehetnek natív és expresszált ioncsatornák esetén¹⁰². Ezek miatt célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a BAPTA-AM befolyásolja-e a bal kamrai szívizomsejtek akciós potenciálját, illetve I_{Kr} áramát.

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

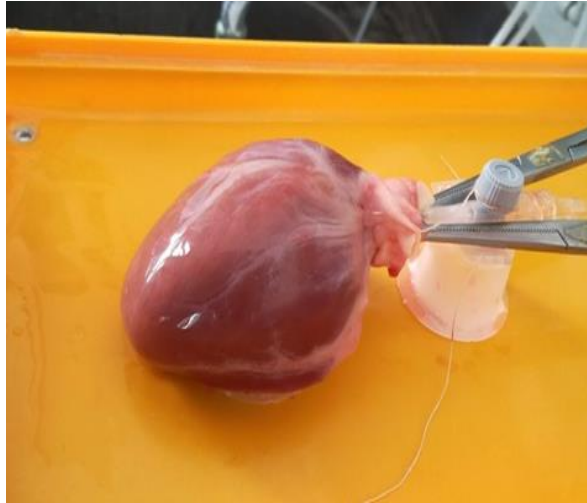
Valamennyi vizsgálatunkhoz kutya kamrai sejteket választottunk, mert ennek a preparátumnak az elektrofiziológiai tulajdonságai hasonlítanak a legjobban a humán szívizomzathoz^{99, 100}.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Kutya szívizomsejtek izolálása

Elektrofiziológiai és génexpressziós kísérleteinket kutyaszív bal kamrájából enzimatikusan izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket kísérleti célra tenyésztett vegyes nemű, ivarérett kutyák szívéből nyertük anterográd szegmensperfúziós technika használatával⁶⁹. Az elvégzett kísérletek összhangban voltak a „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (US NIH publication No 85-23. revised 1996), „*Guide to the Care and Use of Experimental Animals*” (Vol. 1, 2nd ed., 1993, and Vol. 2, 1984, Canadian Council on Animal Care) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (engedélyek számai: 10/2011 és 18/2012 DE-MÁB). A laboratóriumi állatokat felhasználó összes kísérlet jelentésre került, összhangban az ARRIVE irányelvekkel⁷². A kutatás összhangban volt a „*Good Publishing Practice in Physiology*” elveivel is.

A 10–16 kg tömegű állatokat intramuszkulárisan, 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország) és 1 mg/kg xylazin-hidroklorid (Sedaxylane, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Hollandia) injektálásával altattuk el. A mellkas megnyitása után a szívet gyorsan kiemeltük, majd hideg Tyrode oldattal mostuk át (összetételét lásd a 5.6. *Kísérleteinkhez használt oldatok összetétele* fejezetnél). A bal elülső leszálló koszorúér ágat kanüláltuk (10. ábra), így ezen artéria által vérrel ellátott miokardium területét perfundáltuk Langendorff-apparátus segítségével. A perfúzió első 5 percében Ca^{2+} -mentes, szobahőmérsékletű JMM oldat (összetételét lásd a 5.6. *Kísérleteinkhez használt oldatok összetétele* fejezetnél) használatával a szövet Ca^{2+} - és vértartalmát eltávolítottuk. Az oldatot folyamatosan karbogén gázzal (95 % O_2 és 5 % CO_2) ekvilibráltuk.



10. ábra. *A szív bal elülső leszálló koronária ága által ellátott terület perfundálása. Az emésztés során figyeljük a perfundált terület hőmérsékletét, színét, keménységét, a perfúziós oldat áramlási sebességét.*

Az emésztést ezt követően kollagenázzal kiegészített JMM oldattal végeztük, a szívet 35-42 percig perfundáltuk ezen emésztő oldattal (összetételét lásd a 5.6. *Kísérleteinkhez használt oldatok összetétele* fejezetnél) 37 °C-on.

Bal kamra eltérő régióiból történő szívizomsejt izolálás

Az enzimes emésztés hatására a szívizom elfolyósodott, sejtjeire esett szét. Az emésztési idő letelte után a bal kamra falának midmiokardiális rétegében vezetett, U alakú bemetszéssel szabaddá tettük a sejteket (*11. ábra*). A sejtizolálás jellegéből adódóan a méréseink többsége MID sejteken történt.

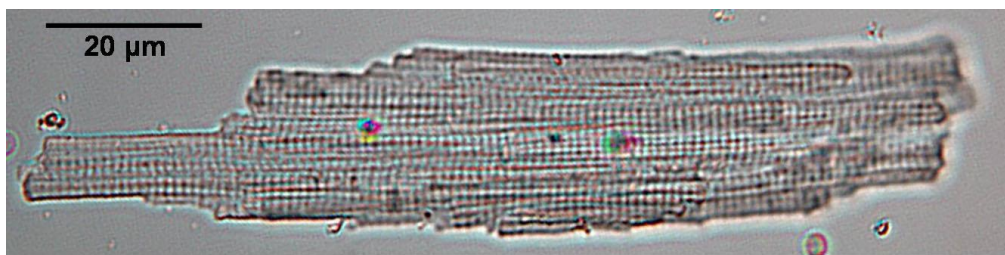


11. ábra. *A megemésztett bal kamra szövetéből szike használatával szabadítjuk fel a szívizomsejteket. Az emésztési idő letelte után precíz, óvatos vágásokkal daraboljuk fel a szívizomzat kollagenáz enzim által elfolyósított részeit, majd a felszabadított sejteket tápoldatban gyűjtjük össze.*

Azonban egyes kísérleteinkhez a bal kamra szabad falának EPI és ENDO régióiból izolált szívizomsejteket használtunk. Ezekben az esetekben dermatóm (Bard Medical Division, Covington, GA, USA) segítségével 0,5 mm vastagságú EPI és ENDO szeleteket nyúztunk le a kamra legkülső és legbelső rétegéből. Ezen szeleteket külön kezeltük, apró darabokra vágtuk és a sejteket enyhe mozgatóval szabadítottuk fel. A szabad kamrai fal maradék középső részét, ami főleg MID sejteket tartalmaz, egy szike segítségével apró darabokra vágtuk, majd óvatos mozgatóval szabadítottuk fel ezen sejteket is.

A kísérletek egy külön csoportjához bal kamrai fal MID rétegének apikális és bazális részeiből gyűjtöttünk sejteket.

Függetlenül a sejtek eredetétől és az emésztést követően alkalmazott, sejteket felszabadító izolálási lépés módjától, az ezt követő izolálási lépések minden esetben megegyeztek. A sejteket 50 μM Ca^{2+} -tartalmú JMM oldatban szuszpendáltuk. A sejtsuszpenziót négy lépcsős, ismétlődő ülepítési, szűrési és mosási folyamat során, növekvő Ca^{2+} koncentrációjú módosított JMM oldattal tisztítottuk. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on tároltuk 2,5 mM Ca^{2+} koncentrációjú MEM oldatban (összetételét lásd a 5.6. *Kísérleteinkhez használt oldatok összetétele* fejezetnél), amely oldatot felhasználásig folyamatosan karbogen gázzal ekvilibráltuk. A végleges sejtsuszpenzióban a sejtek szabályos téglalap alakúak, éles szélűek, citoplazmájuk tiszta, épen harántcsíkozottak (12. ábra). A sejteket legkésőbb 36 órával az izolálás után használtuk fel mérésekhez.

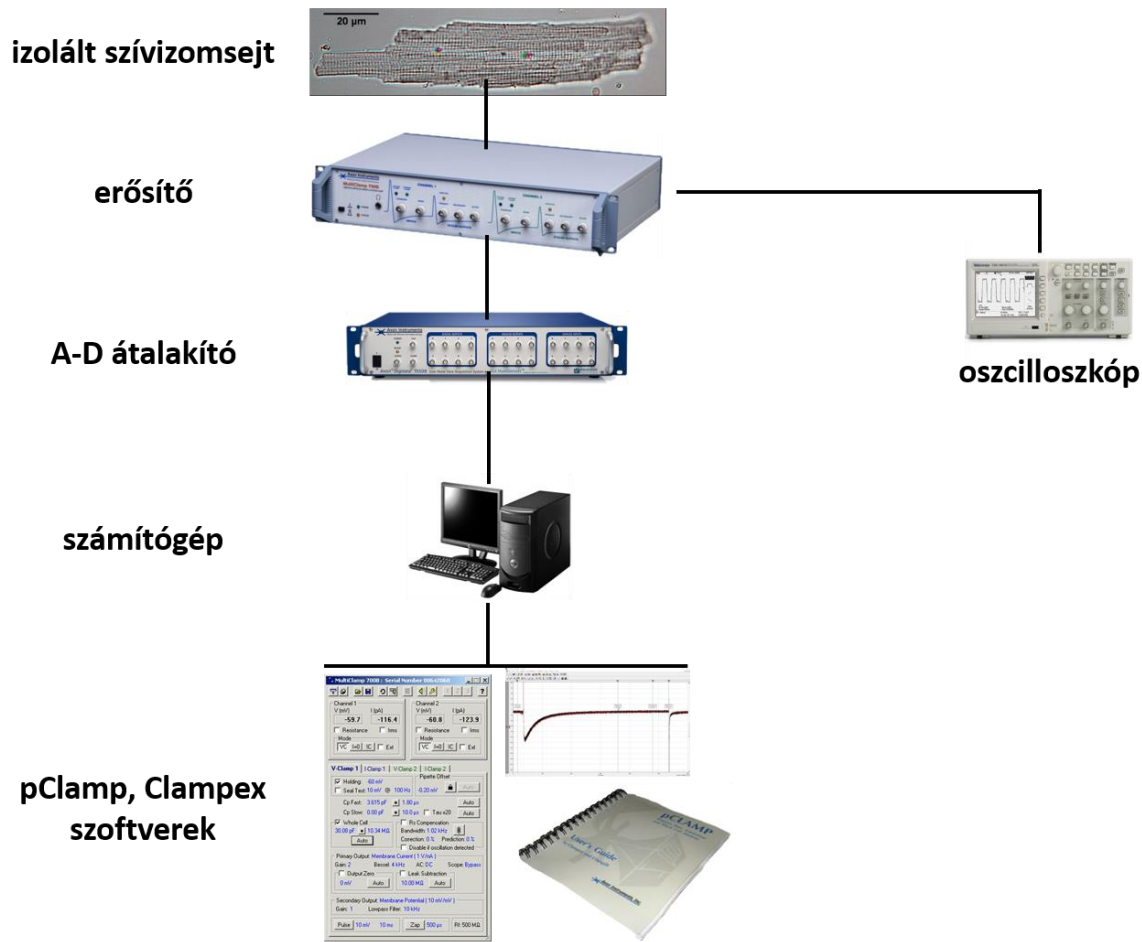


12. ábra. Az elektrofiziológiai mérésekhez használt szívizomsejt. A sejtizolálás végeredményeként a sejtsuszpenzióban a sejtek többsége szabályos téglalap alakú, éles szélű, tiszta citoplazmájú, harántcsíkozott.

5.2. Elektrofiziológia

A sejtsuszpenzió 2-3 cseppjét egy 1 ml térfogatú plexi mérőkádba helyeztük, és folyamatosan perfundáltuk Tyrode oldattal (összetételét lásd a 5.6. *Kísérleteinkhez használt oldatok összetétele* fejezetnél), amelyet egy gravitáció-hajtott rendszer szolgáltatott 2 ml/perces sebességgel. Kísérleteink során az állandó 37 °C-ot hőmérséklet szabályozóval (NBD Tc2 BIP, Cell MicroControls, USA) állítottuk be. A sejteket egy Faraday-kalitkában

elhelyezett antivibrációs asztalon (LW3036B-OPI, Newport Corporation, USA) lévő invertált mikroszkóppal (CK2, Olympus Corporation, Japán) tettük láthatóvá. A sejteket mikropipettával, vagy hegyes mikroelektróddal szűrtük meg, a későbbi AP, illetve ionáram regisztrálásának céljából. Ezeket kapilláris húzó (P-2000, Sutter Instrument, USA) használatával készítettük el. A mikroelektródák és mikropipetták sejtekhez érintését mechanikus makromanipulátorral és három irányba mozgatható, piezoelektromos mikromanipulátorral (Burleigh PCS-250, Thorlabs Inc., USA) végeztük. A sejtekből elvezetett elektromos analóg jeleket fejegységen (CV-7B, Molecular Devices, USA) keresztül elvezettük, erősítettük (MultiClamp 700A vagy 700B, Molecular Devices, USA). Az erősített analóg jeleket oszcilloszkópon (TDS1001B, Tektronix Inc., USA) is nyomon követtük. A számítógép általi vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 10 (Molecular Devices, USA) szoftvert használtunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot digitalizáló (Digidata 1332, 1440A, vagy 1550B, Molecular Devices, USA) tette lehetővé. A nyers adatok kiértékeléséhez Microsoft Excel (Microsoft, USA) szoftvert, a kiértékelés során kapott adatokból az ábrák készítéséhez Origin (Microcal, USA) és PowerPoint (Microsoft, USA) grafikus szoftvereket használtunk. Az elektrofiziológiai mérőrendszer vázlata a *13. ábrán* látható.

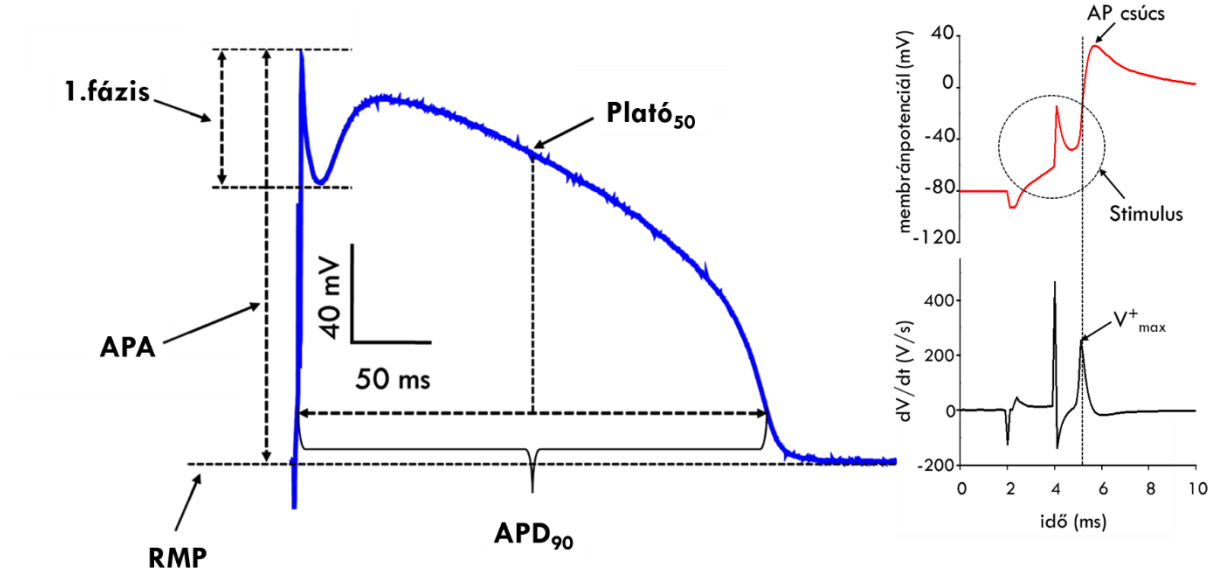


13. ábra. Az elektrofiziológiai mérőrendszer vázlatja.

5.2.1. Akciós potenciálok mérése hegyes mikroelektroda technikával

A membránpotenciál mérésekhez az egysejtes rendszerre kidolgozott, nagyellenállású üveg mikroelektroda technikát használtuk¹¹⁶. Az AP-ok elvezetésére 3 M KCl-dal töltött, nagy ellenállású (25–40 MΩ) mikroelektrodát használtunk. Az erősítőt áram-clamp módban használtuk, a mintavételezés gyakorisága 50 kHz volt. A sejtek ingerlése impulzus generátorral (DS-R3; Főnixcomp Ltd, Magyarország) történt, az általa biztosított négyszögimpulzusok időtartama kb. 2 ms, amplitúdója az ingerküszöb 120–130 %-a volt. Az elvégzett kísérlettől függően az ingerlés a mérőelektrodon keresztül 0,3 és 5 s közötti ciklushosszon (CL) folyamatosan történt. Az ingerlési frekvenciák változtatásakor mindig megvártuk az egyensúlyi állapot beálltát, ami kb. 50 akciós potenciál lezajlása után történt meg. A rögzített AP-ok kiértékelését egy, a munkacsoportunk által programozott Microsoft Excel makróval végeztük. A szoftver által kiszámított paraméterek: nyugalmi membránpotenciál (RMP), a depolarizáció maximális sebessége (V_{\max}^+ , maximum dV/dt), az AP amplitúdója (APA), csúcának abszolút értéke, az 1. fázis repolarizáció amplitúdója

(feszültségkülönbség az AP csúcsa és a kupolát megelőző notch között) és meredeksége, az AP 90 %-os repolarizációjához tartozó időtartama (APD_{90}), az APD_{90} felénél mérhető membránpotenciál ($Plat_{50}$) értéke, valamint a terminális repolarizáció meredeksége (V_{max}^-) (14. ábra).



14. ábra. Az adatelemzéssel meghatározott főbb AP paraméterek. RMP: nyugalmi membránpotenciál, APA: akciós potenciál amplitúdó, 1. fázis: 1. fázis repolarizáció, APD_{90} : 90 %-os repolarizációhoz tartozó akciós potenciál időtartam, $Plat_{50}$: APD_{90} felénél mérhető membránpotenciál érték, V_{max} : felszálló szár maximális meredekség.

5.2.2. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában³⁷ mértük, amihez az erősítőt feszültség-clamp üzemmódban használtuk. A mérések kivitelezéséhez mikropipettát (patch pipetta, 2-3 M Ω) használtunk. A sejtek patch pipettával történő megérintése után enyhe szívás után létrejött egy nagy ellenállású (>1 G Ω) kapcsolat, kialakult az ún. „gigaseal”. Ezt követően két lehetőségünk van a teljes-sejtes elrendezés létrehozására, azaz a mikropipetta hegye alatti membránfolt átszakítására. Alkalmazhatunk erősebb, pillanatnyi szívást vagy néhány 1 ms időtartamú 1,5 V-os elektromos impulzust. Az ionáramok mérése során a soros ellenállás rendszerint 4-8 M Ω volt. A soros ellenállás nagymértékű emelkedése esetén a mérést elvetettük.

A patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében a mikropipetta belső oldata közlekedik a sejtek intracelluláris terével. A belső oldat összetételének változtatásával, kalcium kelátor segítségével lehetőségünk volt befolyásolni a sejtek szabad Ca^{2+} koncentrációját.

Az ionáramokat minden esetben a sejt kapacitására normáltuk, amelyet egy 15 ms hosszú 10 mV-ról -10 mV-ra történő hiperpolarizáló négyszögimpulzus segítségével határoztunk meg. Méréseink során a sejt kapacitás átlagértéke kb. 125-128 pF volt.

5.2.2.1. Konvencionális feszültség-clamp technika

A **kalciumfüggő kloridáramot ($I_{Cl(Ca)}$)** 200 ms időtartamú, -40 mV tartófeszültségről aktiváltuk -100 mV-ról $+100$ mV-ra 20 mV léptékekkel depolarizáló impulzusokkal, 0,2 Hz frekvencián.

A **befelé egyenirányító káliumáramot (I_{K1})** hiperpolarizáló, 200 ms időtartamú -80 mV-ról -130 mV-ra tartó impulzusok alkalmazásával regisztráltuk 0,05 Hz frekvencián.

A **gyors késői egyenirányító káliumáramot (I_{Kr})** 500 ms időtartamú, -80 mV tartófeszültségről $+40$ mV-ra depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk 0,05 Hz frekvencián. Méréseink során az $I_{Ca,L}$ -t és az I_{Ks} -t farmakológiailag gátoltuk.

Az **L-típusú kalciumáramot ($I_{Ca,L}$)** 200 ms időtartamú, -80 mV tartófeszültségről $+10$ mV-ra depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk 1 Hz frekvencián. A tesztimpulzust egy rövid időtartamú (20 ms) -40 mV-ra történő depolarizáció előzte meg a Na^+ áram megszüntetése céljából. Méréseink során az I_{Kr} -t és az I_{Ks} -t és I_{to1} -et farmakológiailag gátoltuk.

A **tranziens kifelé irányuló káliumáramot (I_{to1})** $+40$ mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk -80 mV-os tartófeszültségről 0,05 Hz frekvencián. A tesztpotenciálra lépés előtt 10 ms-ig tartó -40 mV prepulzust alkalmaztunk a gyors Na^+ áram inaktiválásához, míg az $I_{Ca,L}$ és I_{Ks} áramokat $1 \mu M$ nisoldipinnel és $1 \mu M$ HMR-1556-mal gátoltuk.

9-phenanthrol hatása a teljes sejt áram-feszültség kapcsolatra és 9-phenanthrol által indukált ismeretlen „egyenletes” kifelé irányuló áram vizsgálata:

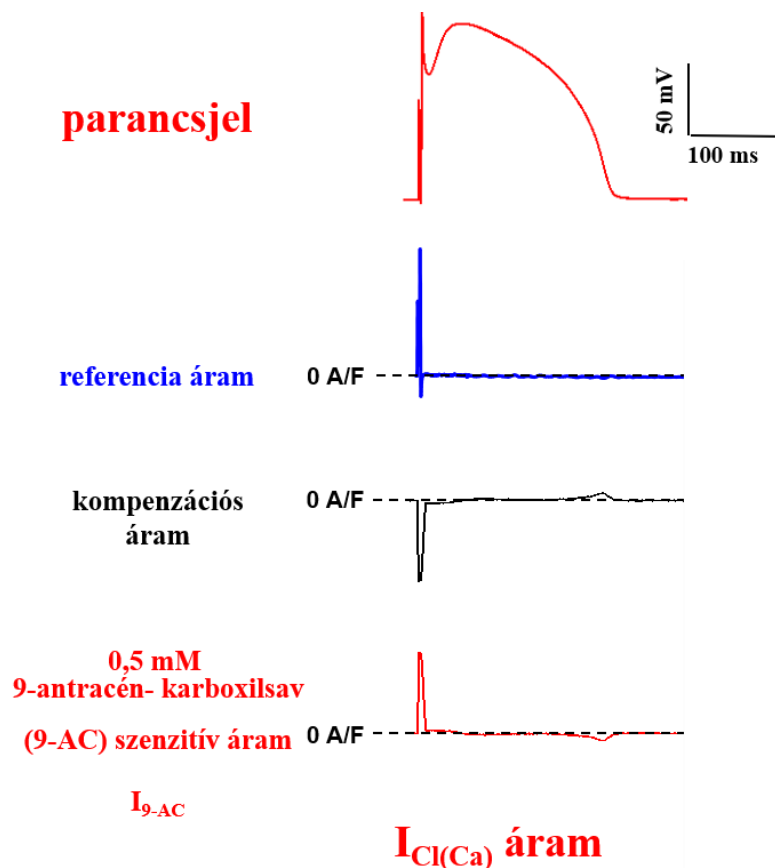
1. 200 ms időtartamú $+5$ és -120 mV közötti feszültséggrámpa segítségével;
2. -40 mV, $+10$ mV, $+40$ mV feszültség lépcsők segítségével történt.

Az áram amplitúdók meghatározási módjait az eredmények fejezetnél részletezem.

5.2.2.2. Akciós potenciál feszültség-clamp technika

Az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramok fiziológias körülmények közötti vizsgálatára a legalkalmasabb módszer az akciós potenciál feszültség-clamp (APVC, action

potential voltage-clamp) technika (15. ábra). Ilyen méréseink során a Tyrode oldattal perfundált szívizomsejtek akciós potenciálját a patch-clamp technika teljes sejtes elrendezésében áram-clamp üzemmódban rögzítettük a korábban már leírt módon (lásd az 5.2.1. *Akciós potenciálok mérése hegyes mikroelektroda technikával* fejezetnél). Minden sejten 10 egymást követő AP-t rögzítettünk és azokat átlagoltuk. A következő lépés során az erősítő feszültség-clamp módjában a korábban kiválasztott, átlagolt AP-hoz legjobban hasonlító AP-t használtuk változatlan ingerlési frekvencián feszültségparancsként. A sejt saját AP-ját használva parancsjelként a kapott referencia áramjel zérus (kivéve egy rövid idejű szakaszt, ami az ingerlési artefaktum és az AP felszálló szára alatt mérhető), hiszen ilyenkor a sejtnak nincsen szüksége az erősítő részéről külső áramra az AP-ja fenntartásához.



15. ábra. Az APVC technika lényege sematikus ábrázolással az $I_{Cl(Ca)}$ gátlószer 9-antracén-karboxilsav (9-AC) példáján keresztül bemutatva. Piros jelzi a parancsjelként használt akciós potenciált, kék a referencia, fekete a kompenzációs, piros pedig a 9-AC szenzitív áramként meghatározott $I_{Cl(Ca)}$ -t.

5.3. Az AP repolarizáció variabilitásának elemzése

A rövidtávú variabilitás meghatározásához 50 egymást követő, 1 Hz-es steady-state ingerléssel kiváltott akciós potenciál sorozatot a korábban leírt módon regisztráltunk, majd

analizáltunk a repolarizáció rövidtávú variabilitásának meghatározására a következő képlet használatával:

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

2. egyenlet.

ahol SV a rövid távú variabilitás, az APD_n és az APD_{n-1} az n-edik és n-1-edik APD_{90} értékeit jelöli, és n pedig az egymást követő ütések száma^{52, 101}. Az 50 egymást követő APD_{90} értékből készült Poincaré-diagramokat a szer által kiváltott SV változások megjelenítésére használtuk.

A repolarizáció variabilitásának további analízise érdekében az APD_{90} értékeket ms tartományba csoportosítottuk, és az egyes sejtekben kiszámítottuk a teljes megjelenési (kumulatív) valószínűségüket. Ezután az adatok átlagát ábráztuk az APD rövidtávú variabilitásában bekövetkező változások bemutatására. A kumulatív valószínűségi görbe jobbra tolódása, az egymást követő APD értékek közötti különbségek növekedése aritmogén hatást jelez. A kumulatív valószínűségi görbe balra tolódása antiaritmias hatást jelez.

5.4. Fehérjeminta előkészítés és Western blot analízis

A bal kamra különböző transzmurális régióiból (EPI, ENDO, MID), valamint a bal kamra midmiokardiális rétegének apikális és bazális régiójából nyert, enzimatikusan izolált szívmiokardialis sejteket molekuláris biológiai vizsgálatokhoz is használtuk. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze és ultrahang kezeléssel lizáltuk lizáló pufferben (20 mM TRIS-HCl, 5 mM EGTA, pH=7,4, kiegészítve 1% proteáz inhibitor koktéllal). Nátrium dodecil-szulfátot és merkapto-etanol adtunk megfelelő mennyiségben, és a mintákat 10 percig 100 °C-ra melegítettük. A gélelektroforézishez 7,5%-os gélt készítettünk, amelyekre, 40 µg/vályú fehérjét vittünk fel. Az elektroforézis után a fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) transzferáltuk. Ezután a membrán szabad kötőhelyeit 5% tejet tartalmazó foszfátpufferolt sóoldatban blokkoltuk (PBS; pH=7,4), majd a következő elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk: anti-TMEM16A (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-135235; nyúl, 1:200), anti-Bestrophin 3 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-70147, kecske, 1:200). Az elsődleges antitestektől függetlenül, a másodlagos antitestek torma-peroxidázzal konjugált kecske anti-nyúl IgG és szamár anti-kecske IgG (1:1000, Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) voltak. Az immunreaktív sávokat erősített kemilumineszcenciás Western blotting Pico vagy Femto detektáló kit segítségével (Thermo

Scientific, Rockford, IL, USA) vizualizáltuk egy Fujifilm Labs-3000-es sötét dobozban (Fujifilm, Tokió, Japán). Az expresszió kvantitatív meghatározásához háttér-korrekciós denzitometriát végeztünk ImageJ szoftver alkalmazásával (NIH, Bethesda, MD, USA). A TMEM16A- és a Bestrophin 3-specifikus sávok optikai sűrűségét normáltuk a minták β -aktin-specifikus sávjainak optikai sűrűségére (1:200; Santa Cruz).

5.5. Statisztikai elemzés

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

5.6. Kísérleteinkhez használt oldatok összetétele

Izoláláshoz használt oldatok

JMM tápoldat (Joklik-féle módosított MEM tápoldat): Ca^{2+} -mentes, taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l), NaH_2PO_4 -tal (200 mg/l) és NaHCO_3 -mal (1,4 g/l) kiegészített JMM oldat (Joklik-féle módosított Minimum Essential Medium Eagle, Sigma, termékszám: M0518; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (pH=6,8).

MEM tápoldat: 2,5 mM Ca^{2+} koncentrációjú Minimum Essential Medium Eagle (MEM, termékszám: M0643, Sigma-Aldrich Co.) oldat, melyet taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l), NaH_2PO_4 -tal (200 mg/l) és NaHCO_3 -mal (2,2 g/l) egészítettük ki (pH=7,3).

Emésztő oldat: JMM oldat, amely kollagenázt (0,66 g/l, Type II., 245 U/mg; Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA), borjú albumint (2 g/l, Fraction V.; Sigma-Aldrich Co.) és CaCl_2 -ot (50 μM) tartalmazott.

Perfúziós alapoldatok

normál Tyrode oldat: 144 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 2,5 mM CaCl_2 ; 1,2 mM MgCl_2 ; 5 mM HEPES és 10 mM glükóz (pH=7,4)

bikarbonátos Tyrode oldat: 121 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,3 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 25 mM NaHCO_3 , 10 mM glükóz (pH=7,35)

Pipetta belső oldatok:

hegyes mikroelektróda technika:

AP mérésére: 3 M KCl, 3 mM K₂-ATP (pH=7,3)

hagyományos feszültség-clamp:

I_{9-AC} mérésére: (puffermentes): 110 mM K-aszpartát, 45 KCl, 3 mM K₂-ATP, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES (pH=7,2)

I_{Kr}, I_{Ca,L}, I_{to1}, I_{K1} áram mérésére: (BAPTA tartalmú): 100 mM K-aszpartát, 45 KCl, 3 mM K₂-ATP, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM BAPTA (pH=7,2)

akciós potenciál feszültség-clamp:

I_{9-AC} mérésére: (puffermentes): 110 mM K-aszpartát, 45 KCl, 3 mM K₂-ATP, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES (pH=7,2)

I_{Kr}, I_{BAPTA-AM} mérésére: (puffermentes): 130 mM K-aszpartát, 30 KCl, 3 mM MgATP, 10 mM HEPES, 3 mM Na₂-foszfokreatin, 0,01 mM EGTA, 0,002 mM cAMP (pH=7,3)

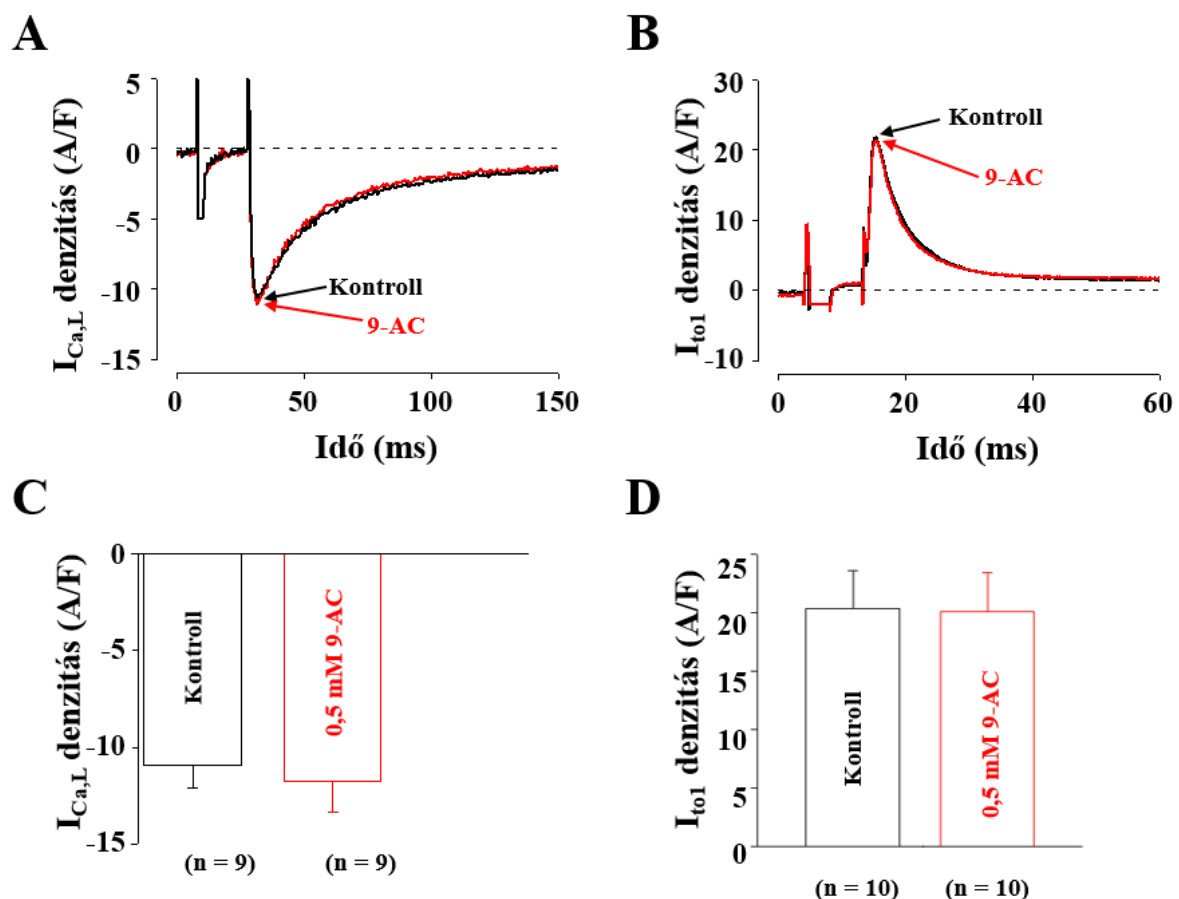
2. táblázat. Alkalmazott szerek és koncentrációjuk.

Használt szer	Alkalmazott koncentráció	Hatás
4-aminopiridin	1 mM	nem szelektív I _{to1} gátlószer
9-AC	0.5 mM	I _{Cl(Ca)} gátlószer
9-phenanthrol	1, 3, 10, 30 μM	TRPM4 gátlószer
A23187	1 μM	Ca ²⁺ ionofór
BAPTA	5 μM	Ca ²⁺ kelátor
BAPTA-AM	5 μM	Ca ²⁺ kelátor
Bay K8644	200 nM	I _{Ca,L} aktiváló szer
dofetilide	100 nM	I _{Kr} gátlószer
E4031	300 nM és 1 μM	I _{Kr} gátlószer
HMR-1556	1 μM	I _{Ks} gátlószer
isoproterenol	10 nM	nem szelektív β-receptor agonista
nisoldipine	1 μM	I _{Ca,L} gátlószer

6. Eredmények

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

Megvizsgáltuk, hogy a 9-AC gátolja-e az $I_{Ca,L}$ illetve az I_{to1} áramokat. Erre azért volt szükség, hogy meggyőződjünk a 9-AC $I_{Cl(Ca)}$ -ra vonatkozó teljes szelektivitásáról a tervezett APVC kísérleteinkhez. Ahhoz, hogy megakadályozzuk bármiféle $I_{Cl(Ca)}$ aktiválódást, mindkét áram mérése során 10 mM BAPTA tartalmú belsőoldatot, továbbá az I_{to1} mérése során nisoldipine tartalmú perfúziós oldatot használtunk (16. ábra). Korábban megmutattuk, hogy a pipetta belsőben használt 10 mM BAPTA alkalmas az $I_{Cl(Ca)}$ kikapcsolására, mivel gyorsan és nagy kapacitással képes a $I_{Cl(Ca)}$ kalcium általi aktivációjának megakadályozására⁴⁶. Kísérleteink során 0.5 mM 9-AC jelenlétében sem az $I_{Ca,L}$ sem a I_{to1} nem különbözött a kontrollhoz képest.



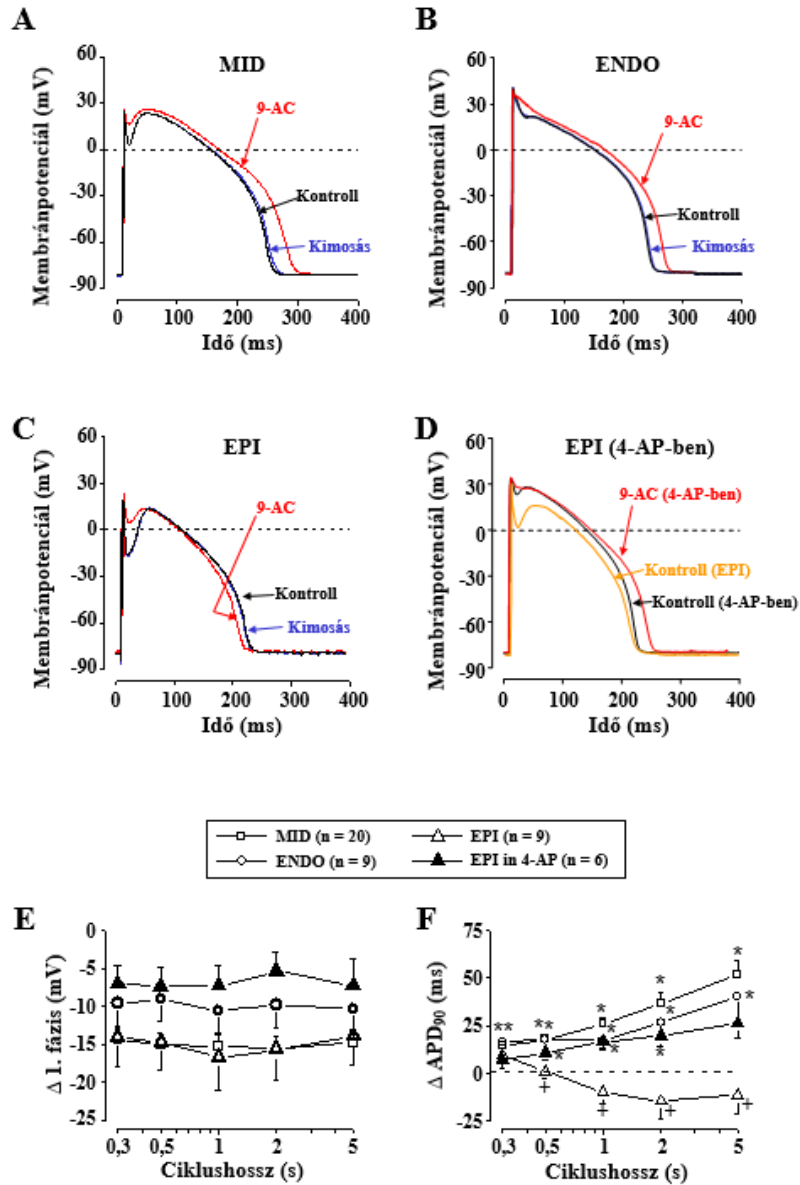
16. ábra. A 9-AC nem hat az $I_{Ca,L}$ és I_{to1} áramokra. Reprezentatív $I_{Ca,L}$ (A) és I_{to1} (B) áramok kontrollban (fekete) és 0.5 mM 9-AC jelenlétében (piros) sejtkapacitásra történő normálás után. $I_{Ca,L}$ (C) és I_{to1} (D) átlagértékei kontrollban (fekete oszlop) és 9-AC jelenlétében (piros oszlop). Az oszlopok és hibajelek az átlag \pm SEM értékeket jelzik, n mutatja a kísérletek számát.

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

Megvizsgáltuk 0,5 mM 9-AC-vel elért $I_{Cl(Ca)}$ gátlás hatását a bal kamra elülső falának különböző rétegeiből származó izolált szívizomsejtekben (17. ábra). Az AP-okat alakjuk stabilizálódását követően („egyensúlyi állapot”-ban) rögzítettük kontroll oldatban, elsőként 5 s ciklushosszon (CL), majd fokozatosan csökkenő CL-akon (2s, 1s, 500 ms, 300 ms). Ezután a CL-t 5 másodpercre váltottuk vissza és 9-AC-vel perfundáltuk a sejteket. Megvártuk, amíg a 9-AC hatása teljesen kifejlődött (jellemzően 7-8 perc), majd az AP-k változó CL-on történő rögzítését a korábbiakhoz hasonlóan megismételtük. Végül a gátlószer kimosását végeztük el a 9-AC által létrehozott változások visszafordíthatóságának tesztelésére.

A 9-AC csökkentette az AP 1. fázisának amplitúdóját az összes vizsgált sejttypusban (17. A-C, E ábrák). Az $I_{Cl(Ca)}$ gátlás a MID és ENDO sejtekben megnövelte az APD_{90} -et (17. A-B, F ábrák), de nem változtatta meg szignifikánsan az EPI sejtek APD_{90} értékeit (17. C, F ábrák). Az akciós potenciál időtartamát a 9-AC fordított frekvencia-függő módon növelte meg a MID és ENDO sejtekben, tehát a legkifejezettebb AP nyújtó hatás a legkisebb ingerlési frekvencián (a legnagyobb ingerlési ciklushossznál; 5 s) jött létre (17. F ábra). Minden 9-AC-indukált AP paraméter változás visszafordítható volt a kimosás 10-15. percén belül (17. A-C ábrák). A nyugalmi membránpotenciál (RMP) és a V_{max} értékeit nem változtatta meg a 9-AC.

A megfigyelt 9-AC-indukált AP-változás transzmurális különbségeinek lehetséges okainak tanulmányozása céljából EPI sejteken 1 mM 4-aminopiridint (4-AP, I_{to1} inhibitor) alkalmaztunk az 1. fázis csökkentésére. A beavatkozás által az EPI sejtek AP profilja hasonlónak vált az ENDO sejtek AP-jához (17. D ábra). A 9-AC a 4-AP folyamatos jelenlétében az AP paramétereit hasonló módon változtatta meg, mint amit az ENDO sejtekben figyeltünk meg (17. E-F ábrák), azaz például a 9-AC meghosszabbította az AP-t 4-AP előkezelt EPI sejtben. A 9-AC hiányában és jelenlétében mért AP paramétereket (átlag \pm SEM értékek) a 3. táblázatban foglaltam össze.



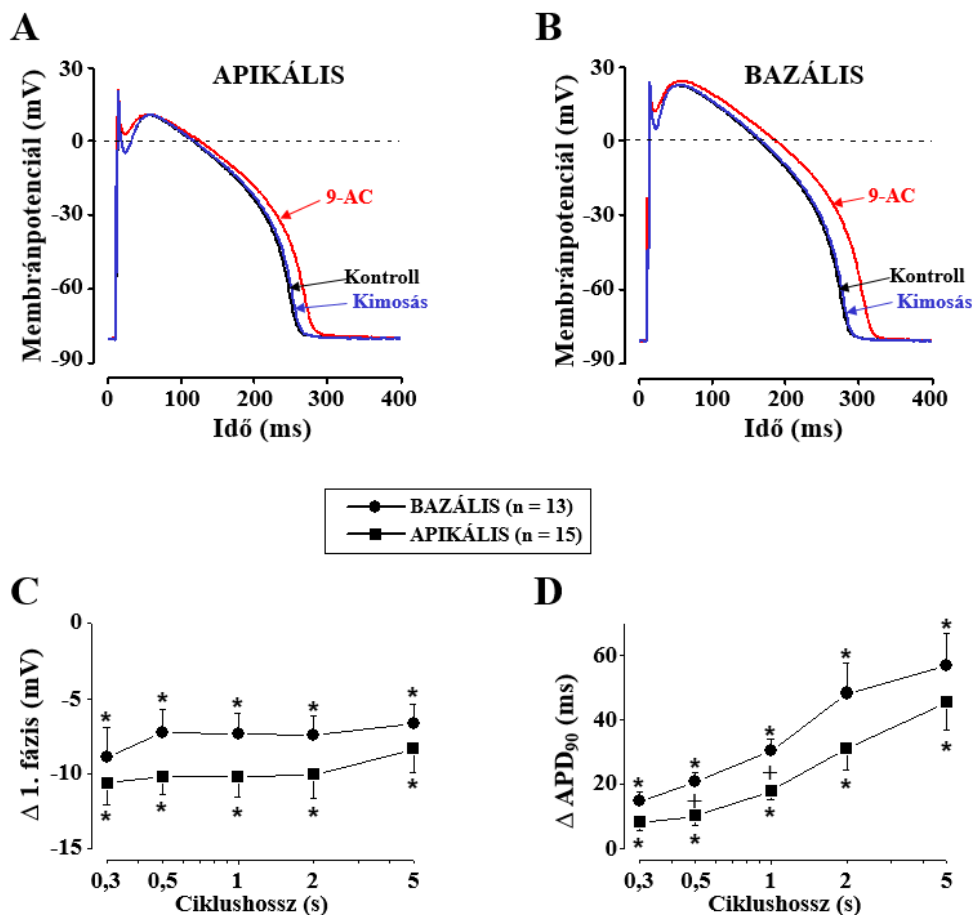
17. ábra. A I_{Ca} AP alakjához való hozzájárulása különböző transzmurális elhelyezkedésű sejteken. Reprezentatív AP-ok kontroll (Tyrode), 0,5 mM 9-AC jelenlétében és annak kimosása után a midmiokardium (A), szubendokardium (B) és szubepikardium (C) sejtein. A D panel reprezentatív ábráján a 9-AC-t 1 mM 4-AP jelenlétében alkalmaztuk egy EPI sejten. 9-AC-indukált első fázis (E) és APD₉₀ (F) változások. Az oszlopok és a hibajelek a számtani átlagot ± SEM-t jelölik, n jelzi a kísérletek számát. Az E panelen minden 9-AC-indukált első fázis változás szignifikáns volt. Az F panelen a + jelek az EPI és EPI (4-AP-ben) csoport közötti szignifikáns változásokat jelölik.

3. táblázat. AP paraméterek 1 Hz-es stimulációs sebességgel különböző transzmurális rétegek sejteiben.

	EPI (n=9)		ENDO (n=9)		EPI 4-AP-ben (n=6)		MID (n=20)	
	Kontroll	9-AC	Kontroll	9-AC	Kontroll	9-AC	Kontroll	9-AC
APD ₉₀ (ms)	219±9	208±8	225±10	243±11	225±16	241±17	261±9	287±9
1. fázis (mV)	34.7±2.6	18.1±4.2	12.0±2.7	1.4±0.9	10.8±2.7	3.5±1.1	24.8±1.7	9.4±2.2
RMP (mV)	-80.2±0.8	-80.5±0.8	-79.5±1.2	-81.5±1.2	-79.3±0.8	-80.1±1.1	-80.8±0.8	-81.8±0.8
V _{max} (V/s)	193±16	190±16	184±23	181±21	178±15	176±15	190±13	188±12

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

Hasonló kísérleteket végeztünk a bal kamrai midmiokardium szívcsúcsához közeli (apikális) és a pitvarok felé eső (bazális) részeiből izolált sejteken. A 9-AC mindkét sejttypusban az APD₉₀ növekedését és az AP 1. fázis amplitúdójának csökkenését okozta (18. ábra). Az AP fordított frekvencia-függő hosszabbodása kifejezettebb volt a bazális sejtekben, és ez a különbség szignifikánsnak adódott 0,5 és 1 s CL-on (18. D ábra). A különböző transzmurális rétegekből izolált sejtekkel végzett kísérleteink eredményeivel összhangban a 9-AC nem befolyásolta a RMP és V_{max} értékeket, és az AP paraméterekre gyakorolt hatásai visszafordíthatóak voltak (18. A, B ábrák). Az apikális és bazális sejtekben mért AP paramétereket (átlag ± SEM értékek) a 4. táblázatban foglalom össze.



18. ábra. Az $I_{Cl(Ca)}$ gátlás eredményének apikobazális különbségei. Reprezentatív AP mérések 1 Hz-en apikális (A) és bazális (B) sejten. 9-AC indukált 1. fázis (C) és APD₉₀ (D) változás. Az oszlopok és a hibajelek a számtani átlagot ± SEM-t jelölik. A *-ok a 9-AC által indukált statisztikailag szignifikáns változást jelölik, a + pedig az apikális és bazális sejtek közötti szignifikáns eltérést jelzik.

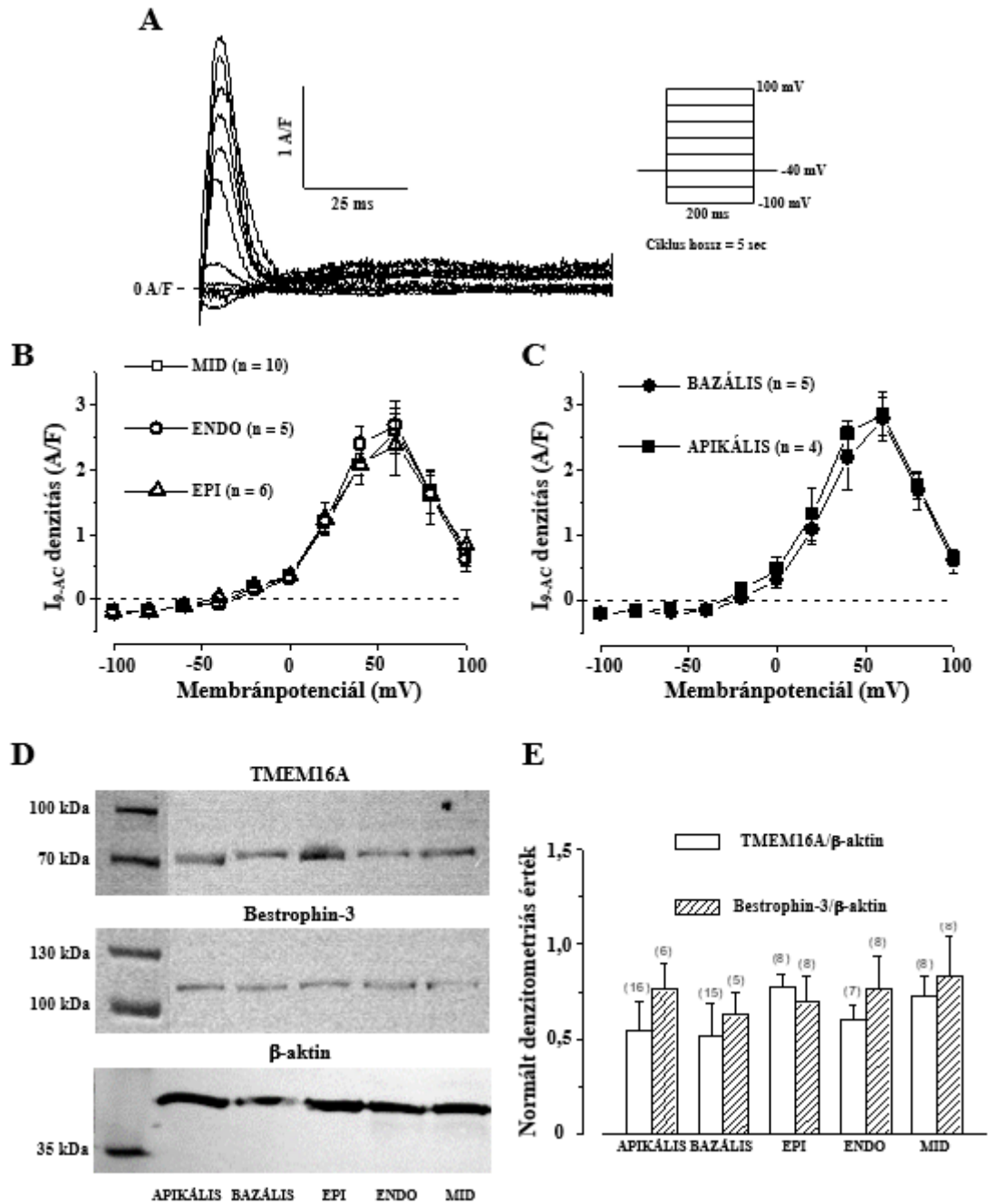
4. táblázat. AP paraméterek 1 Hz-es stimulációs sebességgel apikális és bazális sejtekből nyert sejtekben

	Apikális (n=15)		Bazális (n=13)	
	Kontroll	9-AC	Kontroll	9-AC
APD ₉₀ (ms)	234±9	252±10	252±12	282±11
1. fázis amplitúdó (mV)	26.3±2.4	16.1±2.5	23.1±2.0	14.0±2.4
nyugalmi membránpotenciál (mV)	-82.6±0.7	-81.6±0.7	-81.3±0.8	-81.4±0.9
V _{max} (V/s)	205±7	202±8	176±8	174±9

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

A 9-AC különböző módon változtatta meg az AP-kat a bal kamra különböző régióiból származó sejteken. A különbségek okának felderítése céljából megvizsgáltuk, hogy az egyes régiók sejtjei között van-e különbség az I_{Cl(Ca)} áramsűrűségében, illetve a legvalószínűbb I_{Cl(Ca)}-ért felelős fehérjék (TMEM16A és Bestrophin-3) expressziós szintjeiben. A 9-AC-érzékeny áramokat a bal kamra különböző eredetű sejtjeiben hagyományos négyszögimpulzusok segítségével mértük (19. ábra). A legnagyobb I_{Cl(Ca)} áramsűrűségek egyenlők voltak a vizsgált sejt eredetétől függetlenül. Ez nem csak a transzmurális (19. ábra), hanem az apiko-bazális (19. ábra) gradiens esetében is így volt. Az I_{Cl(Ca)} -20 mV-nál kezdett aktiválódni, és legmagasabb értéke +60 mV volt minden vizsgált sejt típusban (19. ábra), hasonlóan a korábbi közleményekben leírtakhoz^{46, 110}.

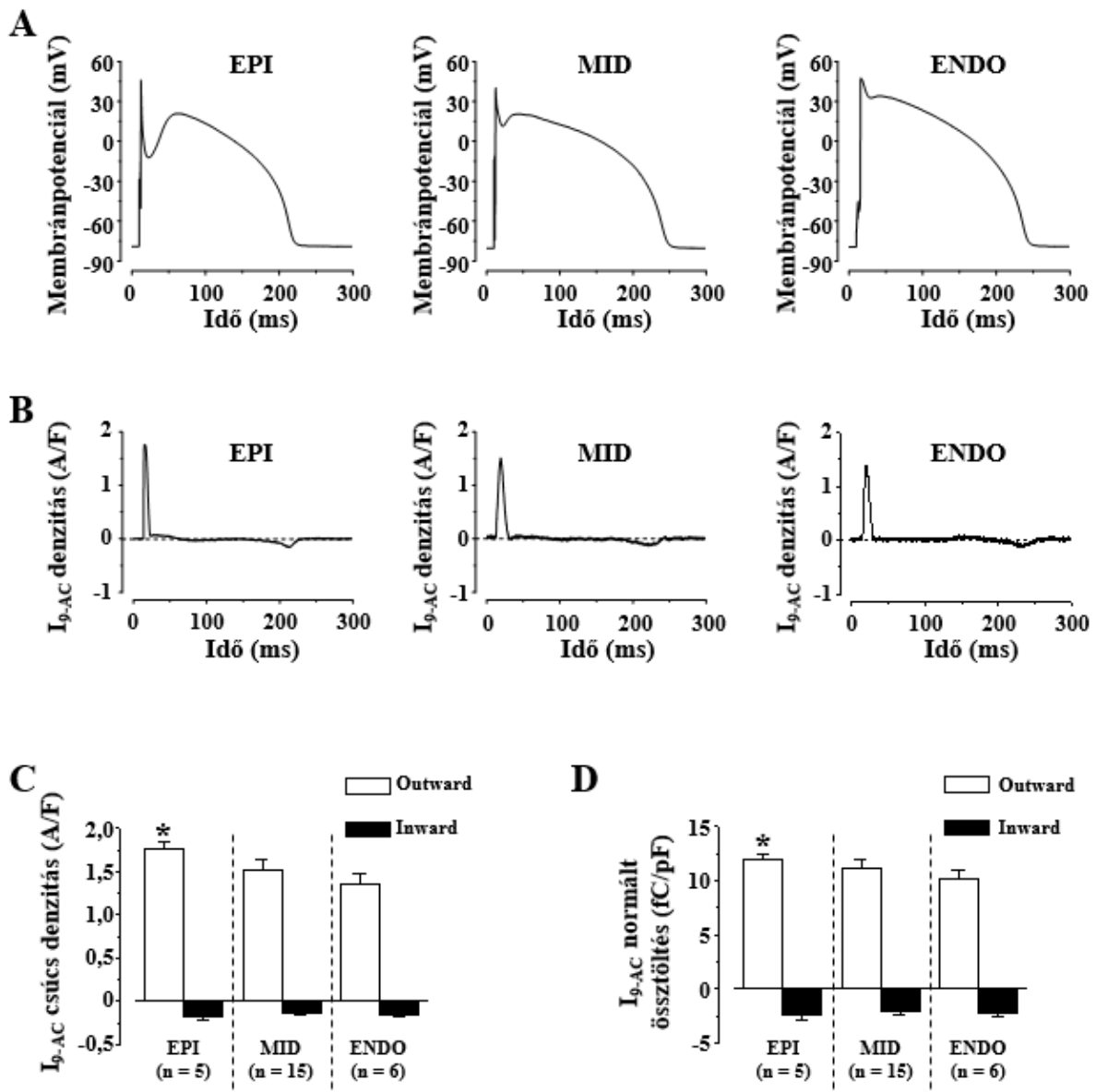
A TMEM16A és a Bestrophin-3 expressziós szintjeit a β-aktinével együtt detektáltuk (19. ábra), és arra normáltuk. A vizsgált sejtekben – a maximális áramsűrűséghez hasonlóan – mind a TMEM16A, mind a Bestrophin-3 esetében azonos normált expressziós szinteket figyeltünk meg (19. ábra). A hagyományos feszültség-clamp adatok és a fehérjeexpressziós eredmények alapján a 9-AC által létrehozott AP változások regionális eltérései nem a csatornák expressziójának különbségei miatt következtek be.



19. ábra. A $I_{Ca(Ca)}$ denzitás és a TMEM16A és Bestrophin-3 normált expressziójának regionális megoszlása. A négyszögimpulzusokkal (A) aktivált 500 nM 9-AC-érzékeny áramok feszültségfüggése a bal kamra különböző transzmurális rétegeiben (B) és a bal kamrai midmiokarium apikális és bazális régióinak sejtein (C). Reprerentatív Western blot (D) a TMEM16A, Bestrophin-3 és β -aktin expresszióról (fentről lefelé). β -aktinra normált TMEM16A (üres) és Bestrophin-3 (csíkos) denzitometriás értékek. Átlagai az oszlopok feletti számú mérésből \bar{x} . Az oszlopok és a hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t jelölik, n jelzi a kísérletek számát.

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

A különböző régiókból származó bal kamrai sejtekben a 9-AC eltérően befolyásolta az AP alakját és paramétereit. Ezen különbségek megmagyarázására $I_{Cl(Ca)}$ áramprofilokat vizsgáltunk, amihez I_{9-AC} -t rögzítettük APVC-vel. Ezzel a technikával az $I_{Cl(Ca)}$ -t az egyes sejtek korábban rögzített saját AP-ja, mint feszültségparancs során vizsgáltuk, hogy teszteljük az AP alakjának fontosságát az áram aktiválásában. Mivel a pipettaoldat nem tartalmazott kalcium-puffereket vagy Ca^{2+} -ot, így a sejtek $[Ca^{2+}]_i$ homeosztázisát nem módosítottuk mesterségesen. A I_{9-AC} profilok dinamikájukban hasonlítottak a bal kamrai fal különböző transzmurális régióiból származó minden egyes sejt típusban (20. ábra), függetlenül az AP-k alakjában jól ismert különbségektől (20. ábra). Az I_{9-AC} profilok tartalmaztak egy korai, nagy és gyors kifelé irányuló komponenst, amely megfelel az AP-ok 1. fázisának, majd a végső repolarizáció (3. fázis) során egy késői, kicsi és befelé irányuló komponenst figyelhettünk meg (20. ábra). Azonban a kifelé irányuló komponens csúcsának áramsűrűsége, továbbá a normált osztott értéke is statisztikailag nagyobb volt EPI sejtekben az ENDO sejtekhez képest (20. C, D ábrák).

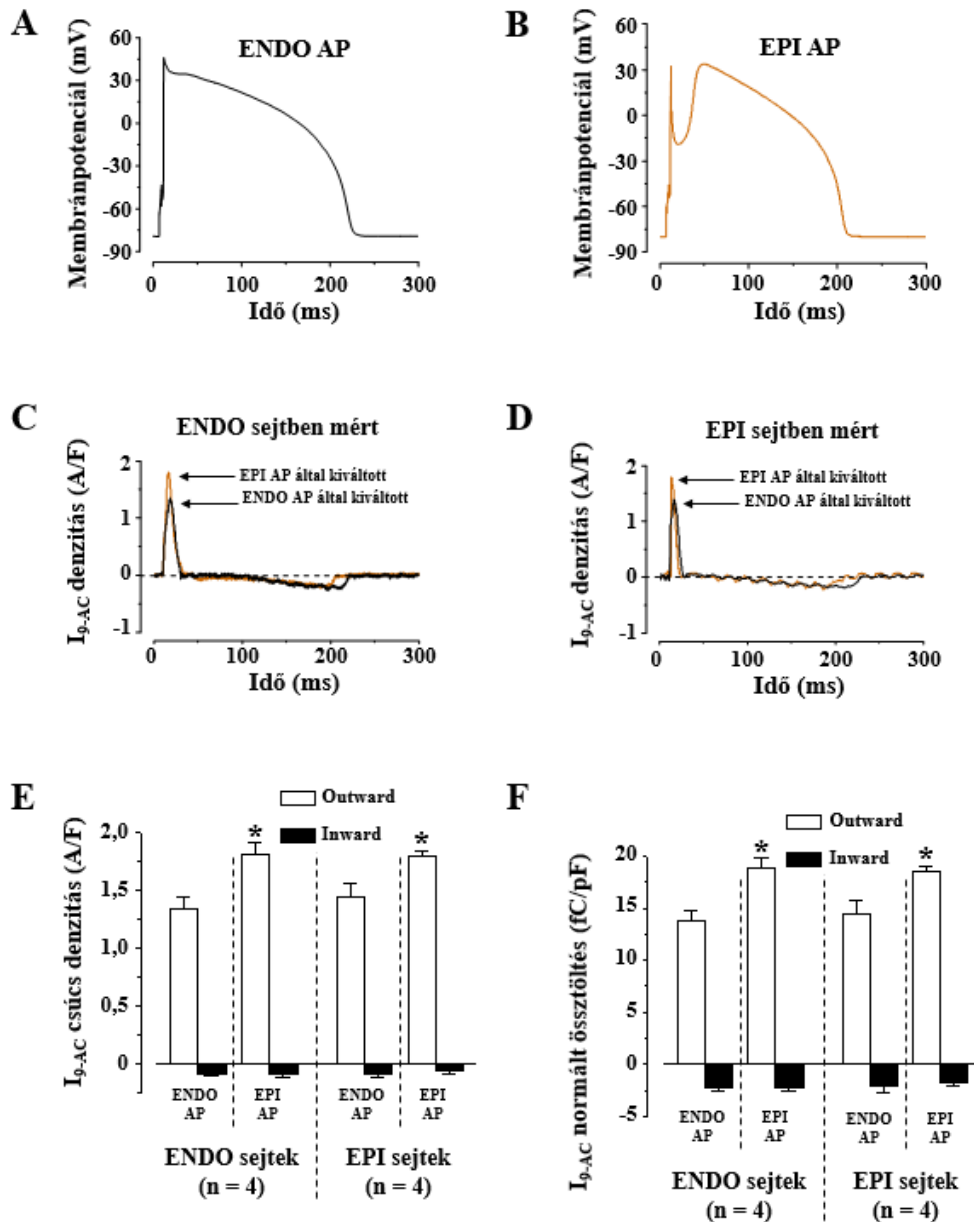


20. ábra. Az $I_{Cl(Ca)}$ transzurális eltérései APVC technikával mérve. Reprezentatív AP-ok EPI, MID és ENDO (A) sejtekben mérve, és a hozzájuk tartozó 0.5 mM 9-AC szenzitív áramként (I_{9-AC}) mért $I_{Cl(Ca)}$ profilok (B). A I_{9-AC} outward (fehér téglalap) és inward (fekete téglalap) áramainak csúcs denzitásai (C) és össztöltései (D). Az oszlopok és a hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t jelölik. A *-ok az EPI és ENDO sejtek közötti statisztikailag szignifikáns változást jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

6.6. Az AP alakjának hatása az $I_{Cl(Ca)}$ profilokra

Az EPI és ENDO sejtek között jelentős különbséget találtunk mind a 9-AC AP alakjára gyakorolt hatásában, mind az APVC-vel mért I_{9-AC} profilok (maximális áramsűrűség és össztöltés) tekintetében. A jelenségek háttérében az EPI és ENDO AP-ok eltérő alakját sejtettük, ezért teszteltük az AP parancs alakjának szerepét az $I_{Cl(Ca)}$ aktiválásában. Tipikus

ENDO és EPI AP-kat (21. A, B ábrák) választottunk és használtunk feszültségparancsként APVC kísérletekben mind ENDO, mind EPI sejteken. A I_{9-AC} profilok mind az ENDO sejteken (21. C ábra) mind az EPI sejteken (21. D ábra) mindkét stimulus parancsjellel hasonlóak voltak. Azonban különbség mutatkozott a korai kifelé irányuló komponens maximális áramsűrűségének és össztöltésének értékei között, mivel az EPI parancsjelekkel aktivált $I_{Cl(Ca)}$ mindig nagyobb értékeket eredményezett, függetlenül attól, hogy melyik sejtípust használtuk $I_{Cl(Ca)}$ rögzítésére (21. E, F ábrák).



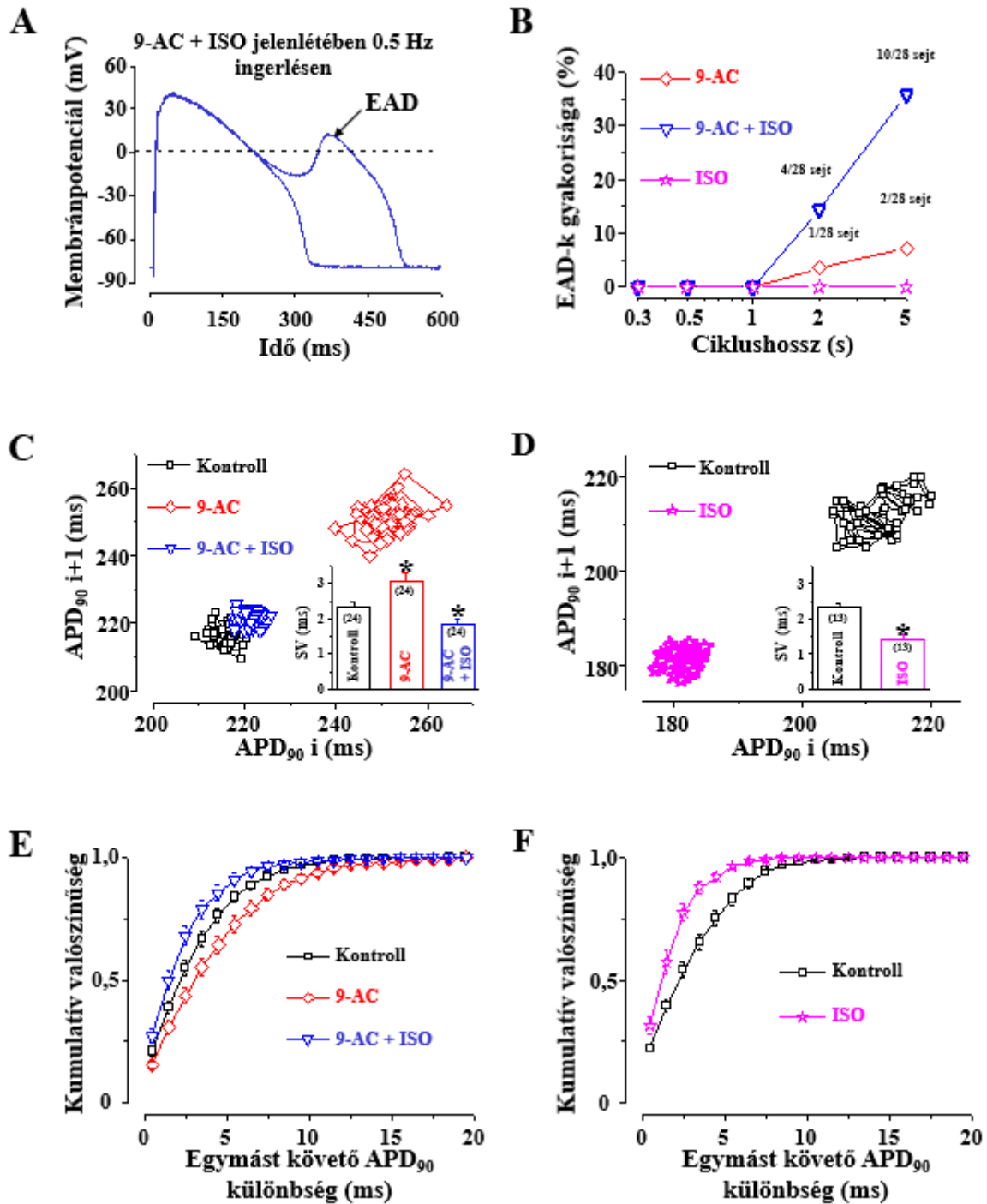
21. ábra. AP alakjától függő $I_{Cl(Ca)}$ áramprofilok APVC technikával mérve. Parancsjelként tipikus ENDO (A) és EPI (B) AP-t használtunk ENDO és EPI sejteken. A $I_{Cl(Ca)}$ áramprofilokat 0,5 mM 9-AC-szenzitív áramként (I_{9-AC}) mértük ENDO (C) és EPI (D) sejteken mindkét tipikus parancsjelet használva. A I_{9-AC} outward (fehér téglalap) és inward (fekete téglalap) áramainak csúcs denzitásai (E) és normált össztöltései (F). Az oszlopok és a hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t jelölik. A *-ok az EPI és ENDO AP által kiváltott I_{9-AC} változásai közötti statisztikailag szignifikáns változást jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

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

Az EAD egy teljes repolarizáció előtti depolarizáció, az AP plató fázisa során, és felelősnek tekinthető a malignus szívritmuszavarok kialakulásáért⁸⁷. Kísérleteink során 0,5 mM 9-AC csak a sejtek kis százalékában indukált EAD-t és csak hosszú CL stimulálás esetén (22. A, B ábrák). A nem specifikus β -adrenerg agonista isoproterenol (ISO, 10 nM) alkalmazásával elért $[Ca^{2+}]_i$ növekedés nem mutatott EAD-t egyik vizsgált CL-on sem 9-AC hiányában, viszont a két vegyület egyidejű alkalmazása sokkal gyakoribb EAD előfordulást eredményezett, különösen hosszú CL-ok esetén (22. B ábra).

A QT-intervallum rövid távú variabilitása jobb prediktív értéket mutat a szívritmuszavarok kialakulásával kapcsolatban, mint maga a QT-intervallum időtartama^{60, 108}. Mivel a QT-intervallum megfelel a kamrai AP időtartamának, a QT-intervallum rövid távú variabilitását az AP időtartam rövid távú variabilitásaként (SV) lehet reprezentálni sejtszinten. Hangsúlyozni kell, hogy ezeket a kísérleteket 1 Hz-es egyensúlyi ingerléssel végeztük, ezért az APD vagy SV változásai nem lehetnek az EAD előfordulása miatt. Az SV legjobb ábrázolására a Poincaré diagram alkalmas, melyeken az AP-k (APD_{90}) vagy a QT-intervallumok időtartamát ábrázoljuk a korábbi APD_{90} vagy QT-intervallum időtartam értékek függvényében. A 9-AC növelte az APD_{90} értéket, míg az ISO hozzáadása megszüntette ezt az AP megnyúlást (22. C ábra). A 24 vizsgált sejtben a SV értékek átlaga nagyobb volt 9-AC jelenlétében ($3,1 \pm 0,2$ ms), de az ISO hozzáadása lecsökkentette az SV értéket ($1,8 \pm 0,2$ ms) a kontroll állapotban számított érték ($2,3 \pm 0,1$ ms) alá (22. C ábra). Azonban 9-AC előkezelés nélkül az ISO még alacsonyabb értékre csökkentette le a SV-t ($1,4 \pm 0,1$ ms) (22. D ábra).

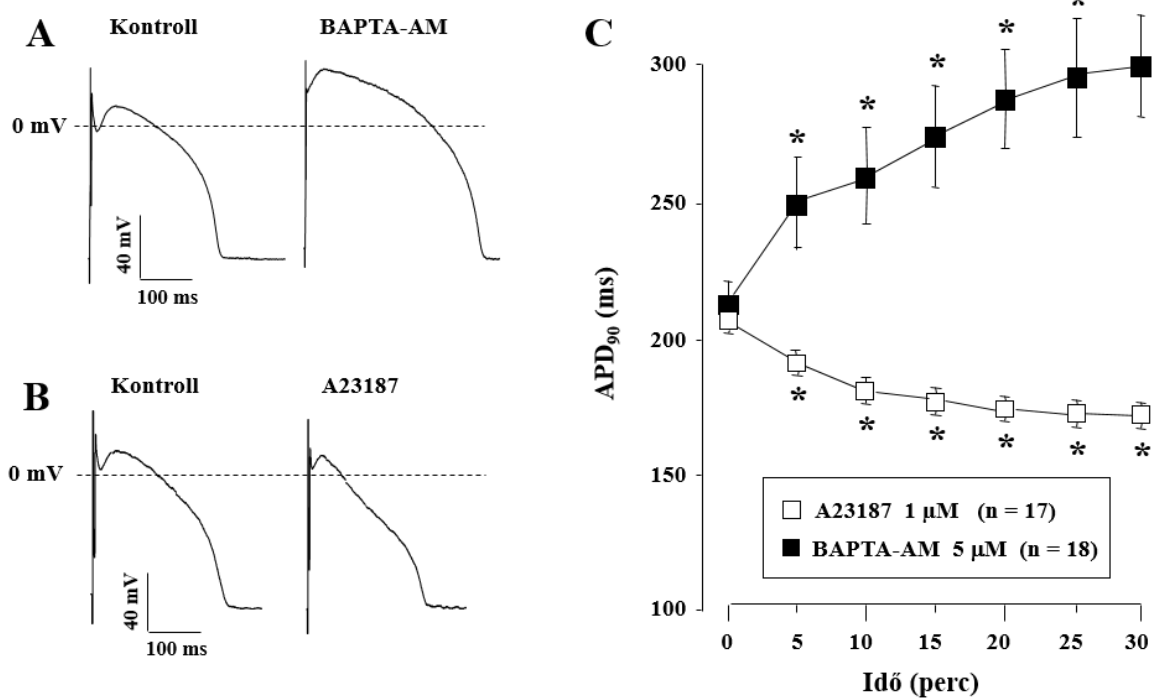
Az egymást követő APD értékek közötti különbséget 1 ms-os tartományonként csoportosítottuk, és kiszámítottuk a megjelenésük kumulatív valószínűségét (22. ábra) az 50 elemzett AP között esetlegesen előforduló szokatlanul rövid vagy szokatlanul hosszú AP-k érzékenyebb észlelése érdekében. A kumulatív valószínűségi görbe jobbra tolódása, az egymást követő APD értékek közötti különbségek növekedése aritmogén hatást jelez. A kumulatív valószínűségi görbe balra tolódása antiaritmiás hatást jelez. 9-AC jelenlétében az egymás utáni APD_{90} -értékek közötti különbségek diszpergálásának értékelésénél a kumulatív eloszlási görbe a nagyobb beat-to-beat variabilitás irányába tolódott, jelezve az egymást követő APD_{90} értékek közötti különbségek növekedését (22. E, F ábrák).



22. ábra. A $I_{Cl(Ca)}$ hozzájárulása a repolarizáció rövidtávú variabilitására (SV) és korai utódepolarizációkra (EAD). Reprezentatív AP-ok 2 s-os ciklushossz ingerléssel 0,5 mM 9-AC és 10 nM isoproterenol (ISO) együttes jelenlétében (A). EAD előfordulás 9-AC és ISO önálló, valamint 9-AC+ISO együttes jelenlétében a steady-state ingerlési ciklushossz függvényében (B). Reprezentatív Poincaré diagrammok 50 egymást követő AP-ból kontroll (fekete négyzetek), 9-AC (piros rombuszok) és 9-AC+ISO (kék háromszögek) esetében (C). A C panel ábrabetéten az SV értékek átlaga látszik. Reprezentatív Poincaré diagrammok egy másik sejt 50 egymást követő AP-jaiból kontroll (fekete négyzetek) és ISO jelenlétében (rózsaszín csillagok) és az SV átlagai a betétben. (D). Az egymást követő APD₉₀ különbségek kumulatív valószínűségei 24 mérésből kontroll (fekete négyzetek), 9-AC (piros rombuszok), és 9-AC+ ISO (kék háromszögek) körülmények között (E). Az egymást követő APD₉₀ különbségek kumulatív valószínűségei 13 mérésből kontrollban (fekete négyzetek) és ISO-ban (rózsaszín csillagok) (F). Az oszlopok, a szimbólumok és a hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t jelölik. A *-ok a kontrolltól statisztikailag szignifikánsan eltérő változást jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

6.8. A BAPTA-AM hatása az akciós potenciál morfológiájára

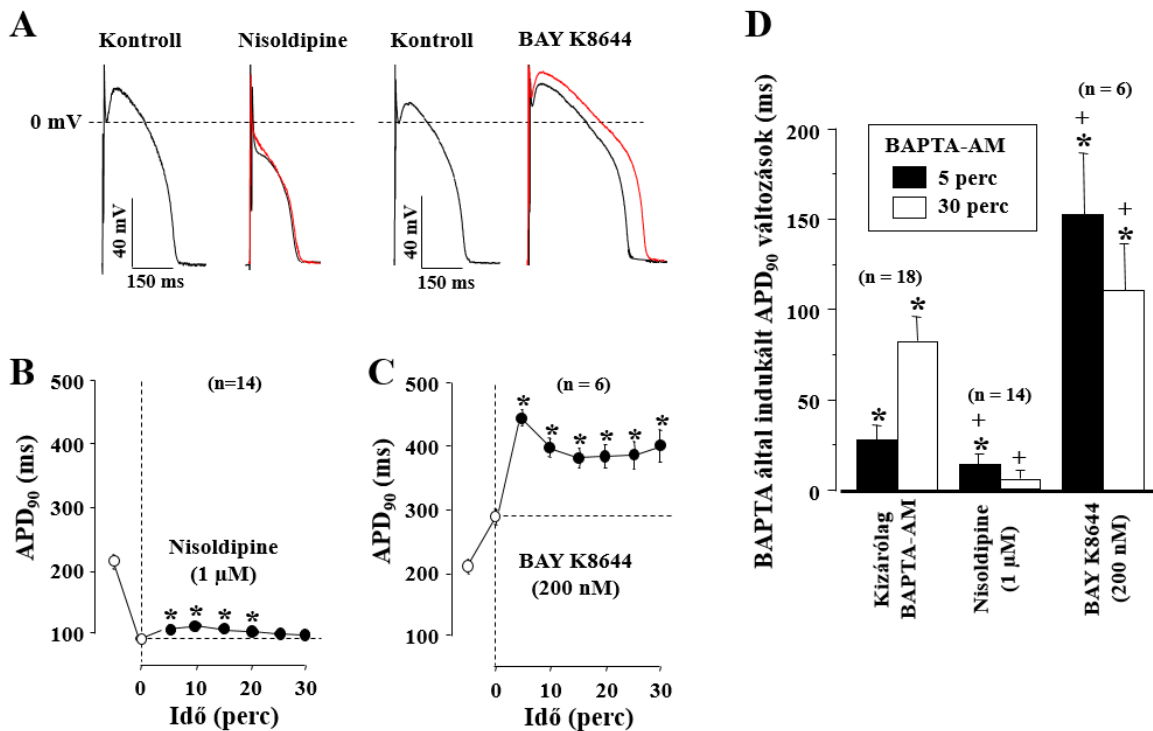
A $[Ca^{2+}]_i$ változás akciós potenciál konfigurációjára gyakorolt hatásának tanulmányozására a két legkézenfekvőbb módszer a $[Ca^{2+}]_i$ csökkentése kalciumkelátorral (pl. BAPTA), illetve a $[Ca^{2+}]_i$ növelése kalcium-ionofór (A23187) alkalmazásával. Sejtjeinket a BAPTA sejt-permeáns acetoxi-metilészter formájával ($5 \mu M$ BAPTA-AM) kezelve meghosszabbodott, míg az $1 \mu M$ A23187 esetében rövidült a repolarizáció 90 % -nál mért akciós potenciál időtartam (APD_{90}). Ezek a változások fokozatosan alakultak ki (23. C ábra), bár a BAPTA-AM esetében az APD_{90} kezdeti gyors növekedését figyeltük meg. Az APD_{90} változásai mellett az akciós potenciál általános morfológiájában is jellemző változások következtek be. A $[Ca^{2+}]_i$ csökkentése (BAPTA-AM-mel) a plató potenciálját pozitívabb feszültségekre tolta, miközben a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése a platópotenciál jelentős csökkenését eredményezte (23. A, B ábrák).



23. ábra. Az intracelluláris kalcium koncentráció változásának akciós potenciál morfológiájára kifejtett hatása. Kutyá bal kamrai szívizomsejtben mért reprezentatív akciós potenciálok $5 \mu M$ BAPTA-AM (A) és $1 \mu M$ A23187 (B) jelenlétében, 30 perces expozíciós idővel, illetve az APD_{90} időfüggése (C). A szimbólumok és hibajelek a számtani átlagot $\pm SEM$ -t jelölik. A *-ok az A23187 és BAPTA-AM hatása közötti statisztikailag szignifikáns változást jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

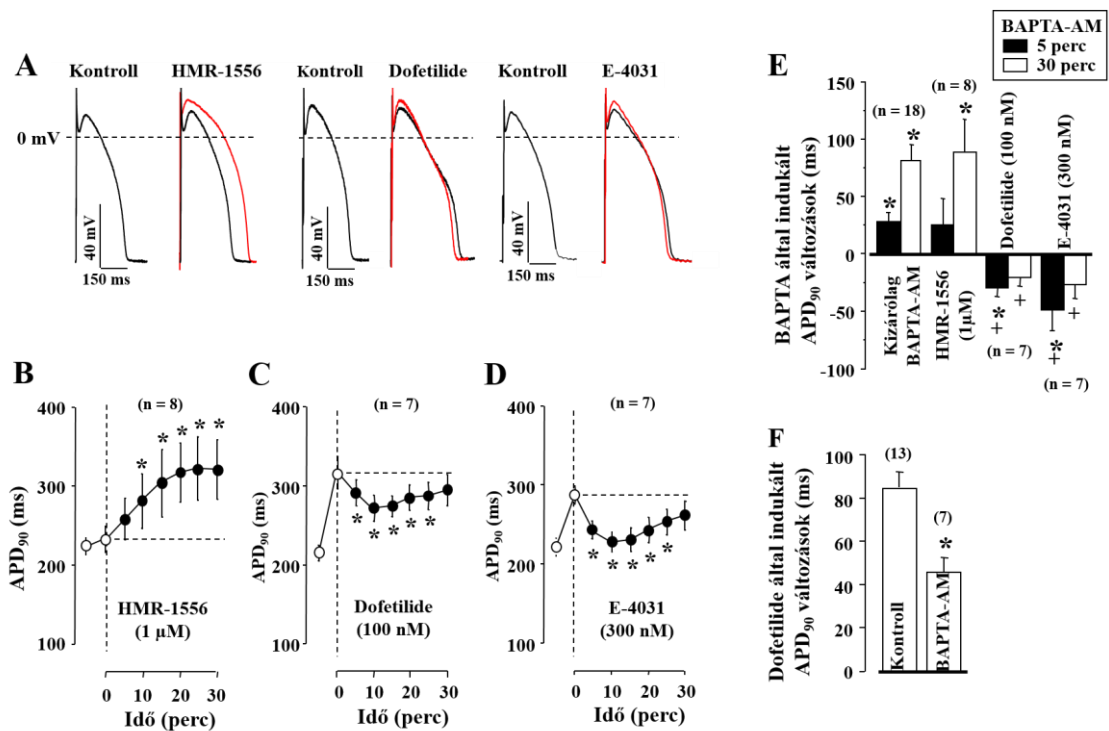
A BAPTA-AM hatását korábban tanulmányozták olyan körülmények között, ahol az $I_{Ca,L}$ nagyságát manipulálták. Ca^{2+} -csatorna-blokkoló nisoldipine⁸⁹ jelenlétében a BAPTA-AM által létrehozott APD-hosszabbítás kismértékű, bár statisztikailag szignifikáns volt 5 perc után, és átmenetinek bizonyult, mivel 20 percnyi BAPTA-AM expozíció után megszűnt (24. B, D ábrák). Ezzel szemben az $I_{Ca,L}$ növelése BAY K8644-gyel⁹⁰ jelentősen növelte a BAPTA-AM által előidézett APD₉₀ nyújtó hatást (24. C, D ábrák). Érdeemes megjegyezni, hogy a BAPTA-AM hatása kétfázisú volt BAY K8644 jelenlétében: a BAPTA-AM 5 percnyi alkalmazása után az APD₉₀ elérte a maximális értékét, és ezután az APD₉₀ fokozatosan csökkent, majd a BAPTA-AM alkalmazás 15. percében érte el a minimumát (24. C ábra).

A $I_{Ca,L}$ gátló nisoldipine által okozott platópotenciál csökkenés, illetve a $I_{Ca,L}$ -ot megnövelő BAY K8644 által létrehozott plató emelkedés hasonlít az A23189 és a BAPTA-AM esetében látottakhoz. Ezeket az eredményeket (23. és 24. ábra) egybevetve arra a következtetésre juthatunk, hogy a $[Ca^{2+}]_i$ csökkentése megnyújtja, míg növelése rövidíti az akciós potenciált; és ezeket a hatásokat valószínűleg a $I_{Ca,L}$ Ca^{2+} -függő inaktivációja hozza létre⁵⁵.



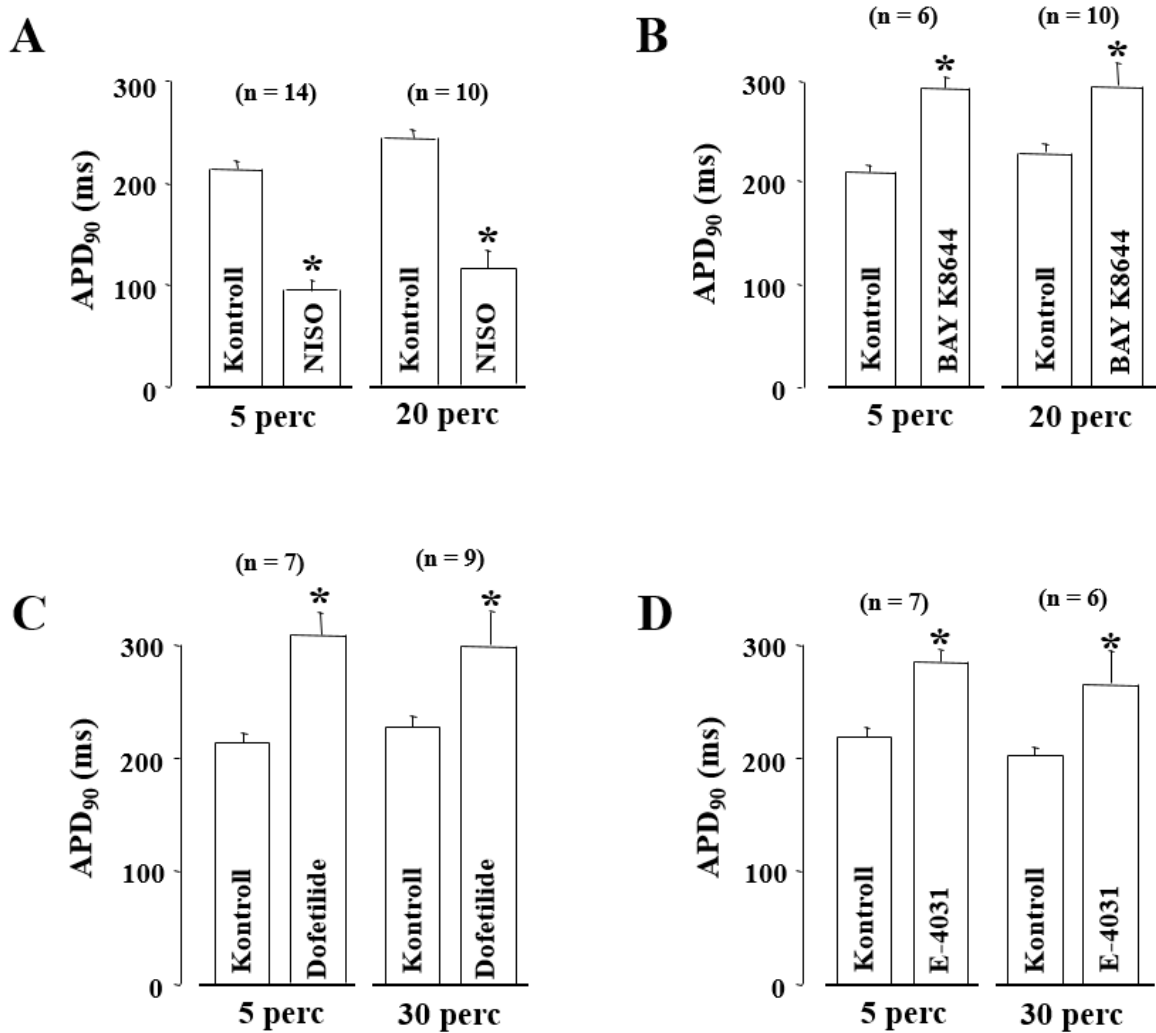
24. ábra. A BAPTA-AM akciós potenciálra gyakorolt hatása L-típusú kalciumáram gátlószer és aktiválószer jelenlétében. Reprezentatív AP-ok kontroll, majd 5 perc nisoldipine, illetve BAY K8644 jelenlétében (fekete) (A). Nisoldipine, illetve a BAY K8644 folyamatos alkalmazása mellett BAPTA-AM hatást (30 perces expozíciós idő után) jelzi a piros szín. Az expozíciós idő függvényében vizsgált 1 μM nisoldipine (B) és 200 nM BAY K8644 (C) APD₉₀-ra gyakorolt hatása. Az üres körök a BAPTA-AM kezelés előtti állapotot jelzik (első a kontroll, a második az 5 perces nisoldipine vagy BAY K8644 előkezelés), a fekete pontok pedig a nisoldipine és BAY K8644 jelenlétében történő BAPTA-AM kezelés hatását jelentik. Az 5, illetve 30 percnél mért APD₉₀ értékeit a D panel mutatja. A szimbólumok és hibajelek a számtani átlagot ±SEM-t jelölik. A *-ok a szermentes (kontroll) állapothoz viszonyított szignifikáns változást, míg a +-ek a BAPTA-AM előkezeléshez viszonyított szignifikáns különbséget jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

A fenti eredményekkel szemben, amikor gátoltuk a sejtek I_{Kr} áramát (100 nM dofetiliddel vagy 300 nM E4031-el), a BAPTA-AM rövidítette az AP-kat, amint azt a 25. C, D, E ábrákon mutatom. Az I_{Kr} gátlószerek az általunk alkalmazott koncentrációkban az I_{Kr} áram több, mint 75 %-át gátolják⁵³. A BAPTA-AM APD₉₀ rövidítő hatása azonban átmenetinek bizonyult, hasonlóan a BAY K8644 jelenlétében alkalmazott BAPTA-AM 5 perc és 20 perc között tapasztalt átmeneti APD₉₀ rövidítési tendenciájához (24. D ábra). A kísérleteket elvégeztük úgy is, hogy fordított sorrendben alkalmaztuk a szereket, tehát BAPTA-AM előkezeléssel, illetve annak hiányában vizsgáltuk 100 nM dofetilide hatását. A dofetilide mindkét esetben megnövelte az APD₉₀ értékét, ám a szer AP meghosszabbító hatása szignifikánsan kisebbnek bizonyult 5 μ M BAPTA-AM jelenlétében (25. F ábra). Az önmagában alkalmazott BAPTA-AM AP időtartamot növelő hatását kizárólag az I_{Kr} gátlása változtatta ellentétes, AP időtartamot csökkentő hatássá. A sejteket az I_{Ks} gátló 1 μ M HMR-1556-tal¹⁰⁷ előkezelve ugyanis a BAPTA-AM hozzáadása ugyanúgy az AP időtartam további növekedését okozta, mint az önmagában alkalmazott BAPTA-AM (25. B, E ábrák).



25. ábra. A BAPTA-AM akciós potenciálra gyakorolt hatása különböző késői egyenirányító káliumáram gátlószerek jelenlétében. Reprezentatív AP-ok kontroll, majd 5 perc HMR-1556, dofetilide és E4031 jelenlétében (fekete) (A). HMR-1556, dofetilide, illetve E4031 folyamatos alkalmazása mellett BAPTA-AM hatást (30 perces expozíciós idő után) jelzi a piros szín. Az expozíciós idő függvényében vizsgált 1 μ M HMR-1556, 100 nM dofetilide és 300 nM E4031 APD₉₀-ra gyakorolt hatása (B-D). Az üres körök a BAPTA-AM kezelés előtti állapotot jelzik (első a kontroll, a második az 5 perces HMR-1556, dofetilide, illetve E4031 előkezelés), a fekete pontok pedig a HMR-1556, dofetilide, illetve E4031 jelenlétében történő BAPTA-AM kezelés hatását jelentik. Az 5, illetve 30 percnél mért APD₉₀ értékeit az E panel mutatja. Az (F) panelen a * a BAPTA-AM nélküli dofetilide hatáshoz viszonyított szignifikáns változást jelöli. A szimbólumok és hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t jelölik. A *-ok a szermentes (kontroll) állapothoz viszonyított szignifikáns változást, míg a +-ek a BAPTA-AM előkezeléshez viszonyított szignifikáns különbséget jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

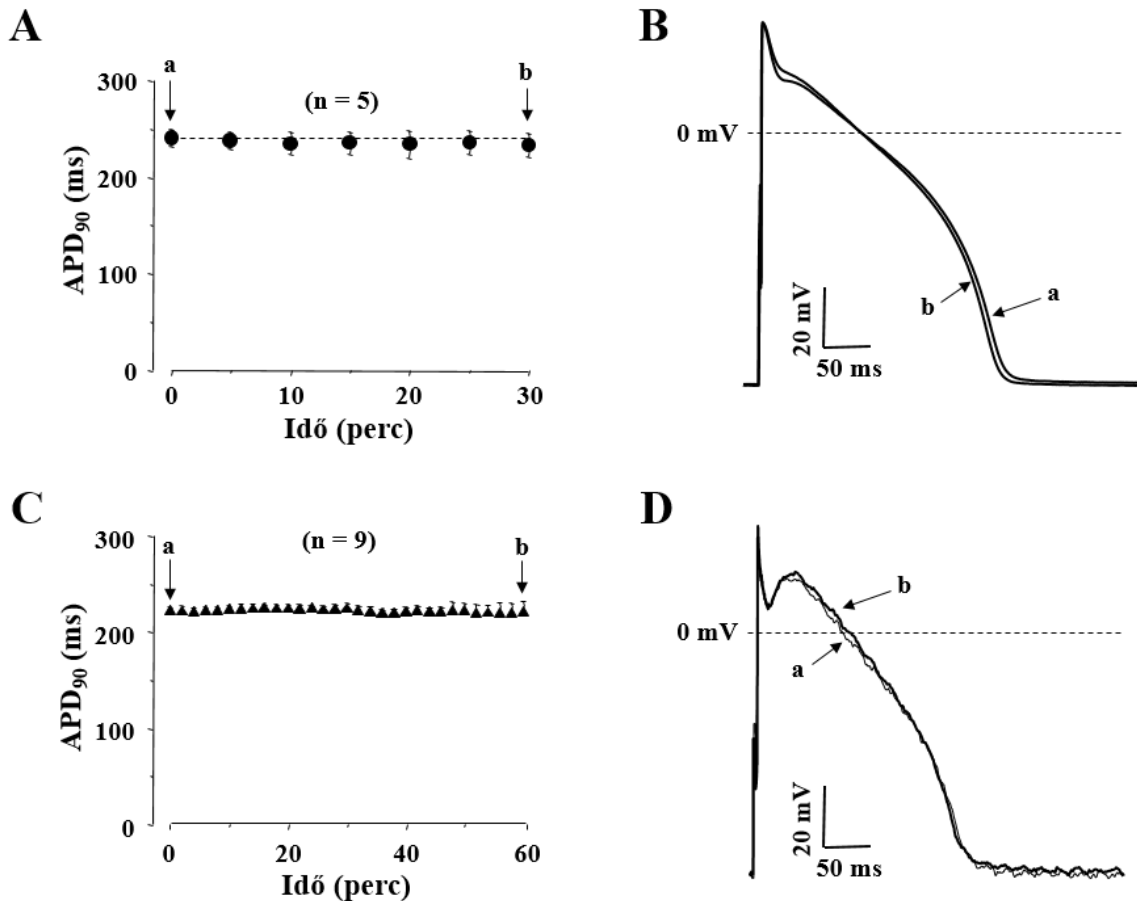
Megvizsgáltuk a nisoldipine, BAY K8644, dofetilide és E4031 (szerek, melyeket BAPTA-AM alkalmazása előtt használtunk, a 24. és 25. ábrákon látható) időfüggő hatását 20-30 percig tartó kísérletekben (26. ábra). Így bizonyosodtunk meg arról, hogy a BAPTA-AM által előidézett bármilyen APD₉₀ változás nem tulajdonítható az előkezelés során alkalmazott szer időfüggő hatásának.



26. ábra. 1 μ M nisoldipine (A), 200 nM BAY K8644 (B), 100 nM dofetilide (C) és 300 nM E4031 (D) hatása az APD₉₀-re rövid (5 perc) és hosszú (20-30 perc) távon. Az oszlopok és hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t, a *-ok a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbséget jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

Annak vizsgálatára, hogy a BAPTA-nak kizárólag az AM formája változtatja meg az akciós potenciál morfológiáját, a szívizomsejteket 5 μ M BAPTA-val perfundáltuk. 30 percig tartó BAPTA-expozíció során nem figyeltünk meg változást sem az akciós potenciál időtartamában, sem más paraméterében (27. A, B ábrák). Ez azt sugallja, hogy az acetoximetil csoport jelenléte szükséges a BAPTA-AM akut APD-növelő hatásának kialakulásához. Az akciós potenciálok stabilitását kontroll körülmények között az 27. C és D ábrákon mutatom

be. Az akciós potenciálok időtartama és konfigurációja sem változott szignifikánsan a kezeletlen kutya kamrai sejtekben a 60 perces rögzítési idő alatt, hasonlóan a BAPTA jelenlétében tapasztaltakhoz.

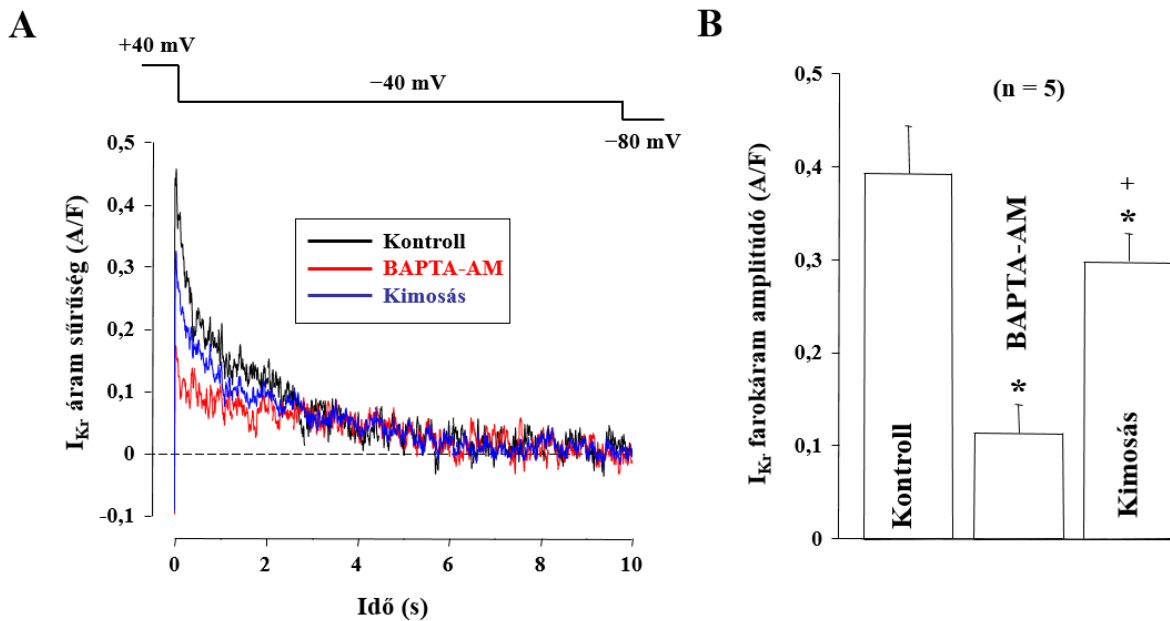


27. ábra. 5 μM BAPTA hatása az APD_{90} -re (A) és az AP morfológiájára (B), illetve egy kezeletlen szívizomsejt akciós potenciáljának időbeli stabilitása (C, D). A B és D paneleken ugyanazon sejt egymásra illesztett reprezentatív AP-jai láthatóak kezdetben (a), illetve 60 perc után (b). A szimbólumok, hibajelek és oszlopok a számtani átlagot \pm SEM-t, a zárójelben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

6.9. A BAPTA-AM hatása az I_{Kr} áramra

Az első kísérletsorozatban a perfúziós oldatban külsőleg alkalmazott BAPTA-AM I_{Kr} -re gyakorolt hatását vizsgáltuk 5 kamrai szívizomsejtben hagyományos feszültség-clamp technikával. Az I_{Kr} áramsűrűségét a -40 mV-ra történő repolarizáció után mért I_{Kr} farokáram amplitúdóból számítottuk. Amint a 28. ábrán látható, a sejtek I_{Kr} áramsűrűségét 5 μM BAPTA-AM a kontroll körülmények között mért érték 32 ± 8 % -ára csökkentette ($0,39 \pm 0,05$ és $0,12 \pm 0,03$ A/F, $p < 0,05$, $n=5$). Ez a hatás részlegesen reverzibilis volt, mivel BAPTA-AM-mentes perfúziós oldatban az 5 perces kimosási idő alatt az áram amplitúdó visszatért a kontroll értékének 76 ± 5 % -ára. Ezekben a kísérletekben a pipetta belső oldat 10 mM

BAPTA-t tartalmazott, így tehát az extracellulárisan alkalmazott BAPTA-AM I_{Kr} -t csökkentő hatása független volt a BAPTA-AM intracelluláris Ca^{2+} -ot keláló hatásától.

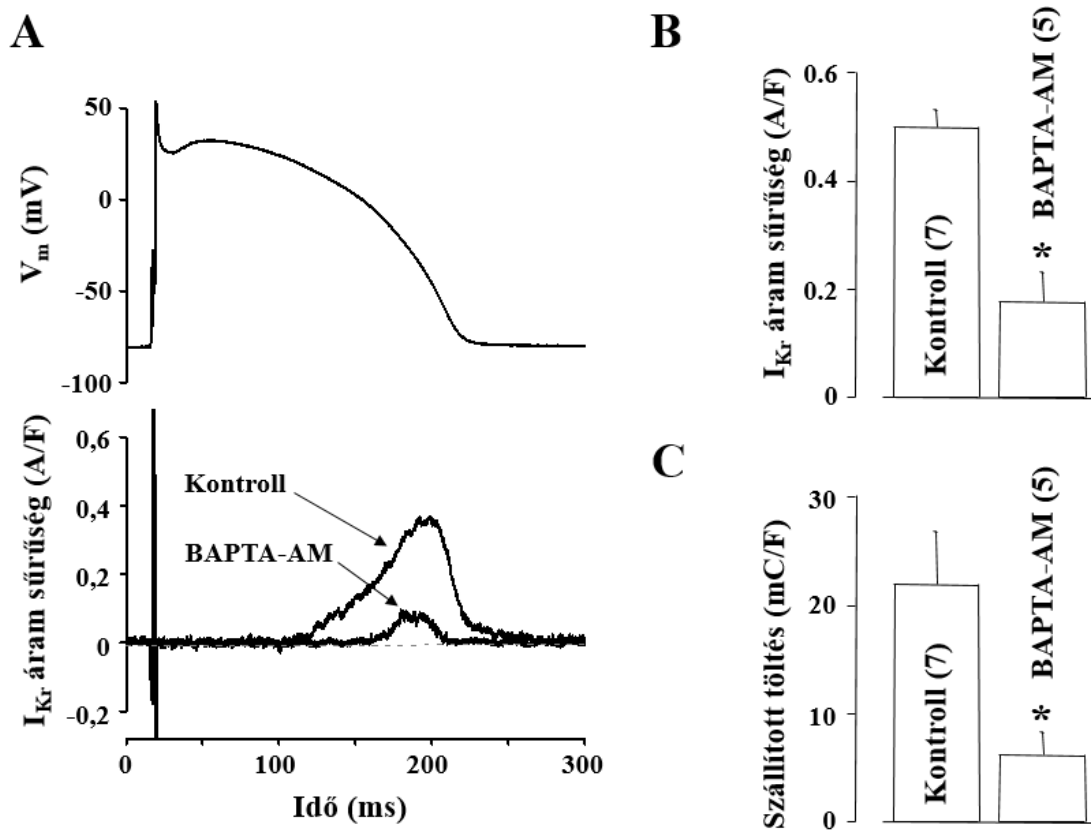


28. ábra. A BAPTA-AM I_{Kr} -re gyakorolt hatása VC körülmények között. (A): I_{Kr} farokáramok a sejt repolarizációja során, -40 mV-os feszültséglépcső alatt. Az áram 500 ms alatt, $+40$ mV-on aktiválódott. Az $5 \mu\text{M}$ BAPTA-AM 5 perc utáni hatását piros szín jelzi, a kék szín jelenti az 5 perc kimosás eredményét. (B): I_{Kr} farokáram amplitúdójának átlagai láthatók kontroll körülmények között és BAPTA-AM jelenlétében, illetve a BAPTA-AM kimosása után. A szimbólumok és hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t jelölik. A *-ok a kontrollhoz viszonyított hatásbeli statisztikailag szignifikáns különbséget jelölik, a + pedig a BAPTA-AM kimosását követő szignifikáns változást mutatja, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

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

A hagyományos feszültség-clamp kísérletek nem ideálisak az ionáram gátlás következményeinek vizuális megjelenítésére az akciós potenciál során. Ezért akciós potenciál feszültség clamp kísérleteket is terveztünk, hogy vizsgálni tudjuk az $5 \mu\text{M}$ BAPTA-AM hatását az AP alatti I_{Kr} áramprofilra (29. ábra). Mivel ez a technika az I_{Kr} farmakológiai kivonásán alapul ($1 \mu\text{M}$ E4031 alkalmazásával), a méréseket szívizomsejtek két populációjában kellett elvégeznünk. Az I_{Kr} áramsűrűsége BAPTA-AM hiányában (kontroll) és jelenlétében rendre $0,50 \pm 0,03$ és $0,17 \pm 0,06$ A/F ($n=7$ és $n=5$, $p < 0,05$) volt, ami 66% -os amplitúdócsökkenésnek felel meg. Még nagyobb különbség mutatkozott az akciós potenciál alatti, I_{Kr} által szállított töltés mennyiségében: kontroll körülmények között 22 ± 5 mC/F, míg BAPTA-AM-ben 6 ± 2 mC/F ($n=7$ és $n=5$, $p < 0,05$) értékeket kaptunk, mely a kontroll érték 27% -ával egyenlő. A BAPTA-AM Ca^{2+} -pufferelő hatását kizárhatjuk ezekben a

kísérletekben is, mert a sejteket a külső BAPTA-AM alkalmazása előtt előzetesen BAPTA-val töltöttük fel (lásd a Módszerek részt).

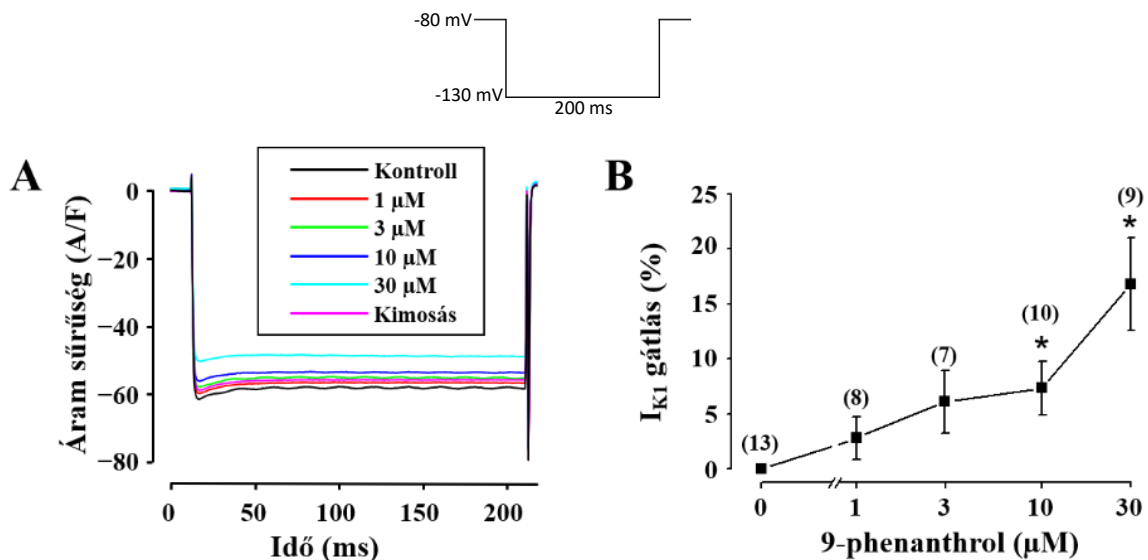


29. ábra. BAPTA-AM I_{K_r} -re gyakorolt hatása az APVC körülmények között. (A): A parancsjelként használt „kanonikus” akciós potenciál (felül), az I_{K_r} áram (kontroll), illetve $5 \mu\text{M}$ BAPTA-AM hatása az I_{K_r} -re. Mérések előtt mindkét sejtcsoport 20 perces BAPTA-AM előkezelésen esett át. (B), (C): Az I_{K_r} áramsűrűség, illetve a szállított összetöltés kontroll körülmények között és $5 \mu\text{M}$ BAPTA-AM jelenlétében. Az oszlopok és a hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t, a *-ok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik az extracelluláris BAPTA-AM kezelt és kezelés nélküli sejtcsoportok között, a zárójelben feltüntetett számok pedig a vizsgált sejtek számát jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

6.11. A 9-phenanthrol hatása a szívizomzat fontosabb ionáramaira

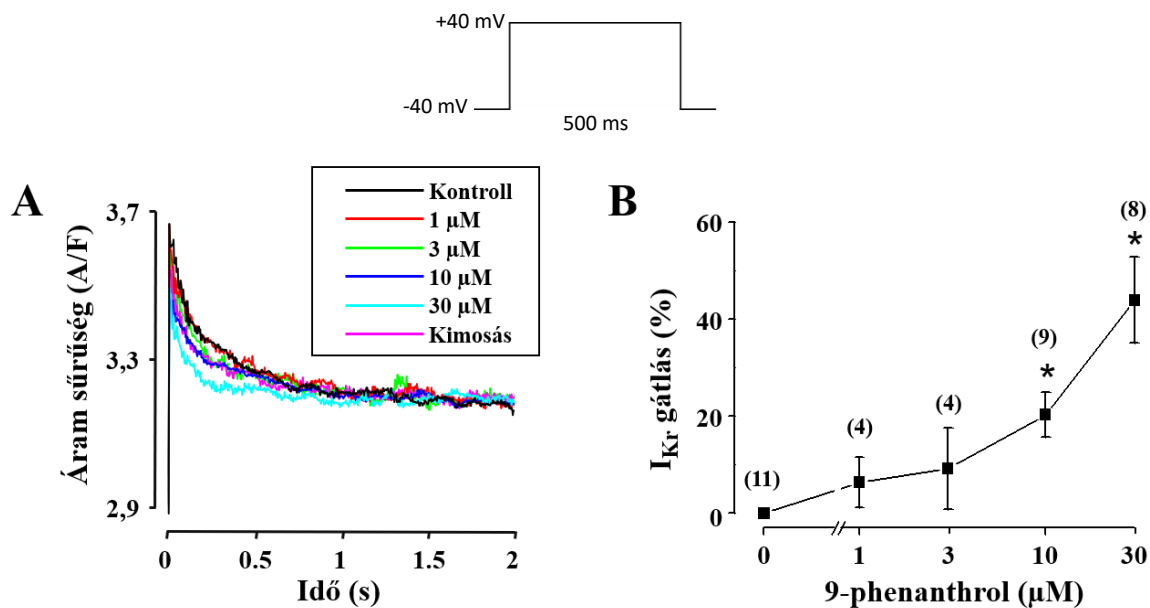
A 9-phenanthrol ionáramokra gyakorolt koncentrációfüggő hatását vizsgáltuk 1, 3, 10 és 30 μM koncentrációban hagyományos feszültség-clamp technikával. Minden egyes koncentrációt 5 percen át alkalmaztunk, a kísérlet végén a kimosás 10 percig tartott. Kísérleteink során célunk a TRPM4 csatornák Ca^{2+}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

A befelé egyenirányító K^+ áramot (I_{K1}) hiperpolarizáló, -80 mV-ról 200 ms-ig -130 mV-ra tartó impulzusok alkalmazásával regisztráltuk 0,05 Hz frekvencián. Az áramot a -130 mV-os feszültségimpulzus végén határoztuk meg. A 9-phenanthrol 10 μM -os vagy annál magasabb koncentrációban szignifikánsan csökkentette az I_{K1} -et részben reverzibilis módon (30. A, B ábra).



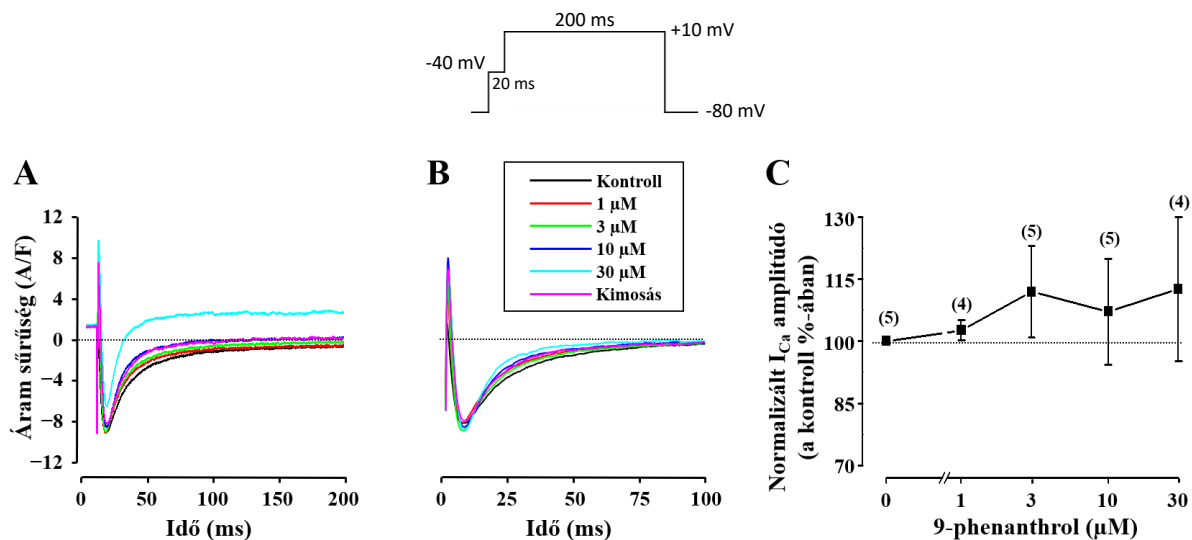
30. ábra. A 9-phenanthrol koncentráció-függő hatása az I_{K1} -re. Reprezentatív egymásra vetített I_{K1} áramok (A) és az I_{K1} gátlás mértékét jellemző B panel. Az I_{K1} áramot -130 mV-on mértük. A fekete négyzetek és hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t, a *-ok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik a kontrollhoz viszonyítva, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

A gyors késői egyenirányító K^+ áramot (I_{Kr}) 0,5 s időtartamú, -40 mV tartófeszültségről $+40$ mV-ra depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Az I_{Kr} -t a -40 mV-ra történő repolarizáció során megjelenő farokáramokként értékeltük. Méréseink során az L-típusú kalciumáramot ($I_{\text{Ca,L}}$) és az I_{Ks} -t farmakológiailag gátoltuk. Amint az a 31. ábra látható, az I_{Kr} farokáramok amplitúdói fokozatosan csökkentek a 9-phenanthrol koncentrációjának növelésével párhuzamosan, amely hatás csak részben volt reverzibilis.



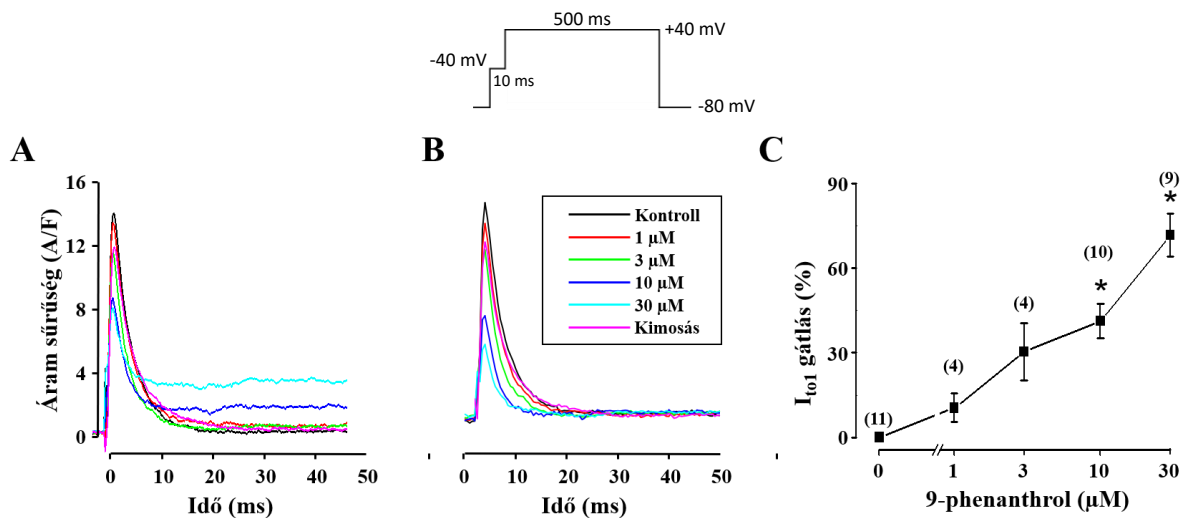
31. ábra. A 9-phenanthrol koncentráció-függő hatása az I_{Kr} -re. Reprezentatív egymásra vetített I_{Kr} áramok (A) és az I_{Kr} gátlás mértékét jellemző B panel. Az I_{Kr} farokáramokat -40 mV-nál ($+40$ mV-on történő aktiválás után) mértük. A fekete négyzetek és hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t, a *-ok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik a kontrollhoz viszonyítva, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

Az L-típusú kalciumáramot ($I_{Ca,L}$) $+10$ mV-on rögzítettük -80 mV tartófeszültségről 200 ms-ig tartó depolarizációval 1 Hz frekvencián. A tesztimpulzust egy rövid időtartamú (20 ms) -40 mV-ra történő depolarizáció előzte meg a Na^+ áram megszüntetése céljából. A 9-phenanthrol jelenlétében $+10$ mV-on egy koncentráció-függő módon növekvő, de egy adott koncentrációnál a tesztpotenciál fennállása alatt állandó amplitúdójú (a továbbiakban „steady”) kifelé irányuló áramot tapasztaltunk, ami csak részben volt reverzibilis a szer kimosása során (32. A ábra). A csúcstartó és a depolarizáló impulzus végén mért áram közötti különbséggént meghatározott $I_{Ca,L}$ amplitúdót a 9-phenanthrol nem befolyásolta 30 μM koncentrációig (32. B, C ábrák).



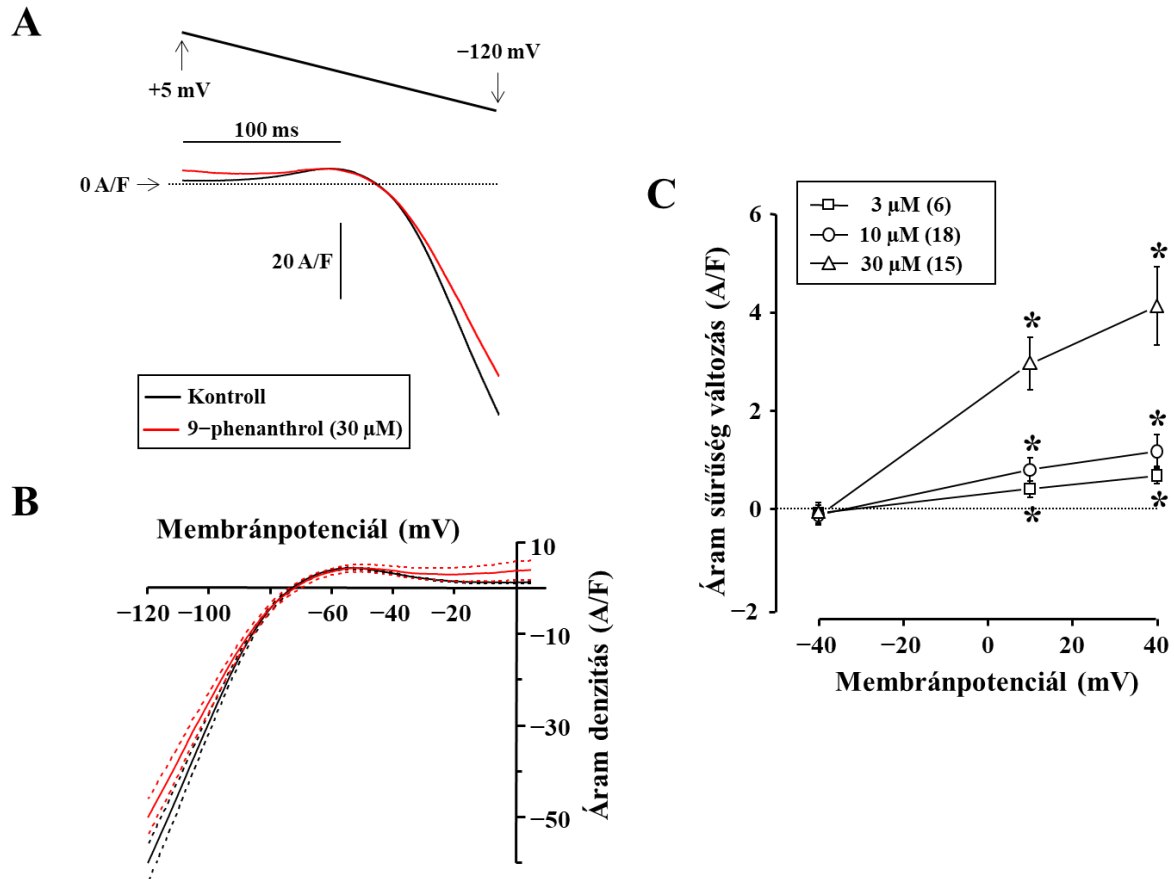
32. ábra. A 9-phenanthrol koncentráció-függő hatása az $I_{Ca,L}$ -ra. Repräsentatív egymásra vetített $I_{Ca,L}$ áramok (A). Az A testimpulzus végén mért áramértékeket tekintettük zérusnak a panelek analóg rekordjainak beállításakor (B). Az $I_{Ca,L}$ gátlás mértékét jellemző C panel. Az $I_{Ca,L}$ -t 200 ms-on keresztül +10 mV-on aktiváltuk. Az áram amplitúdóját az áramcsúcs és a testimpulzus végén mért áramértékek közötti különbséggént határoztuk meg. A fekete négyzetek és hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t, a *-ok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik a kontrollhoz viszonyítva, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

A tranziens kifelé irányuló káliumáramot (I_{to1}) +40 mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk -80 mV-os tartófeszültségről 0,05 Hz frekvencián. A testpotenciálra lépés előtt 10 ms-ig tartó -40 mV prepulzust alkalmaztunk a gyors Na^+ áram inaktiválásához, míg az $I_{Ca,L}$ és I_{Ks} áramokat 1 μ M nisoldipinnel és 1 μ M HMR-1556-mal gátoltuk. Hasonlóan az $I_{Ca,L}$ mérések során tapasztaltakhoz, a 9-phenanthrol jelenlétében megfigyelhetünk egy „steady” kifelé irányuló áramot (33. A ábra). Az I_{to1} -et a csúcsáram és a teljes inaktiváció után mért fenntartott áramkomponens (40 ms-mal a +40 mV depolarizáció kezdetét követően) közötti különbséggént határoztuk meg. A 9-phenanthrol szignifikánsan gátolta az I_{to1} -t 10 és 30 μ M koncentrációban, és ez a hatás nagyrészt reverzibilisnek bizonyult (33. B, C ábrák).



33. ábra. A 9-phenanthrol koncentráció-függő hatása az I_{to1} -ra. Reprezentatív egymásra vetített I_{to1} áramok (A). Az A tesztimpulzus végén mért áramértékeket tekintettük zérusnak a panelek analóg rekordjainak beállításakor (B). Az $I_{Ca,L}$ gátlás mértékét jellemző C panel. Az I_{to1} -ot +40 mV-on rögzítettük. Az áram amplitúdóját az áramcsúcs és a tesztimpulzus végén mért áramértékek közötti különbségként határoztuk meg. A fekete négyzetek és hibajelek a számtani átlagot \pm SEM-t, a *-ok a statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik a kontrollhoz viszonyítva, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

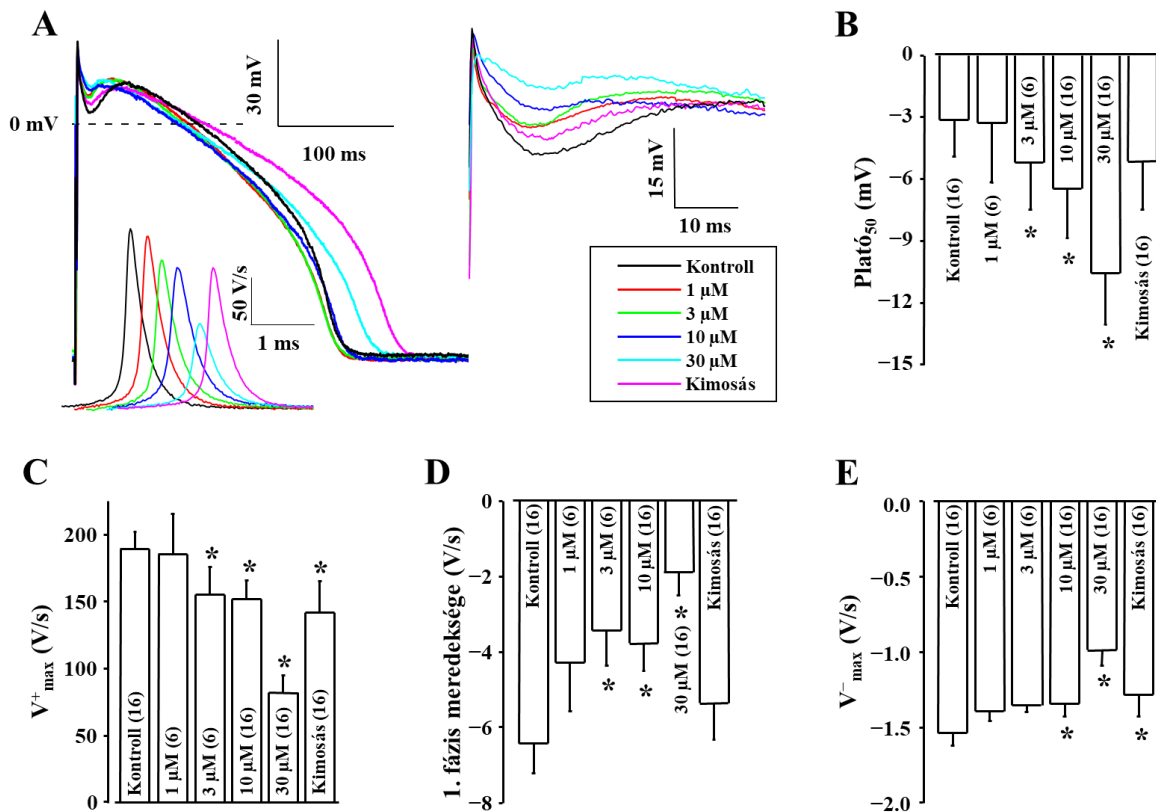
Amint azt korábban is említettem, 9-phenanthrol jelenlétében +10 mV (32. ábra) és +40 mV (33. ábra) potenciálon egy „steady” kifelé irányuló áramot rögzítettünk. Megkíséreltük ezt az áramot közvetlenül is megjeleníteni egy 200 ms hosszú, +5 és -120 mV közötti feszültséggrámpa segítségével. A rámpát először 9-phenanthrol hiányában, majd annak jelenlétében alkalmaztuk, 1 Hz ingerlés mellett (34. A ábra). Amint a 34. B ábrán látható, 9-phenanthrol jelenlétében a rámpa segítségével kapott áram-feszültség összefüggés a negatív ágában (valószínűsíthetően az I_{K1} gátlásának következtében) és a -40 mV-nál nagyobb potenciál tartományban is eltért a kontroll körülmények között rögzítettől. Annak ellenőrzésére, hogy ez az áram nem csak feszültséggrámpa során tapasztalható, megmértük a 9-phenanthrol által indukált „steady” áramot állandó, -40, +10 és +40 mV membránpotenciálokon is. Ezek az eredmények a 34. C ábrán láthatóak. A „steady” kifelé irányuló áram 3 μ M 9-phenanthrol koncentráció fölött +10 és +40 mV-os tesztpotenciálon is megjelent, az amplitúdója a 9-phenanthrol koncentrációjával arányosan növekedett, és fontos, hogy -40 mV-on nem tapasztaltunk ilyen „steady” áramot.



34. ábra. A 9-phenanthrol hatása a teljes sejt áram-feszültség kapcsolatra. **A:** Kontroll körülmények között (fekete) és 30 μM 9-phenanthrol jelenlétében (piros) kapott reprezentatív mérési eredmények 200 ms-os feszültséggráppákkal +5; -120 mV feszültség tartományban. **B:** A 9-phenanthrol hatása az egész sejt áram-feszültség kapcsolatára kontroll körülmények között (fekete) és 30 μM 9-phenanthrol mellett (piros). Az egyenes vonalak a 10 sejtben regisztrált áramok mérési eredmények számtani átlagát; a szaggatott vonalak a középérték körüli átlagos szórást jelentik. **C:** 3, 10 és 30 μM 9-phenanthrol által generált stabil áramok, -40, +10 és +40 mV membránpotenciálon. A szimbólumok és hibajelek a számtani átlagot $\pm\text{SEM}$ -t jelölik. A *-ok a kontrollhoz viszonyított hatásbeli statisztikailag szignifikáns különbséget jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

6.12. A 9-phenanthrol hatása az akciós potenciál morfológiájára

Az akciós potenciálokat KCI-t tartalmazó hegyes mikroelektrodákkal rögzítettük. Így nem avatkoztunk bele a sejtek normál Ca^{2+} homeosztázisába. 16 sejtet kumulatíván növekedő koncentrációjú 9-phenanthrollal kezeltünk. Ezen sejtek közül 6 sejtet 1, 3, 10 és 30 μM koncentrációjú 9-phenanthrollal kezeltünk, míg 10 sejtet csak 10 és 30 μM koncentrációjú kezelésnek vetettük alá. Mindegyik koncentrációt 5 percig perfundáltuk, és a kísérlet végén 10 perces kimosást végeztünk. Az eredményeket az 35. és 36. ábrákon mutatom be.



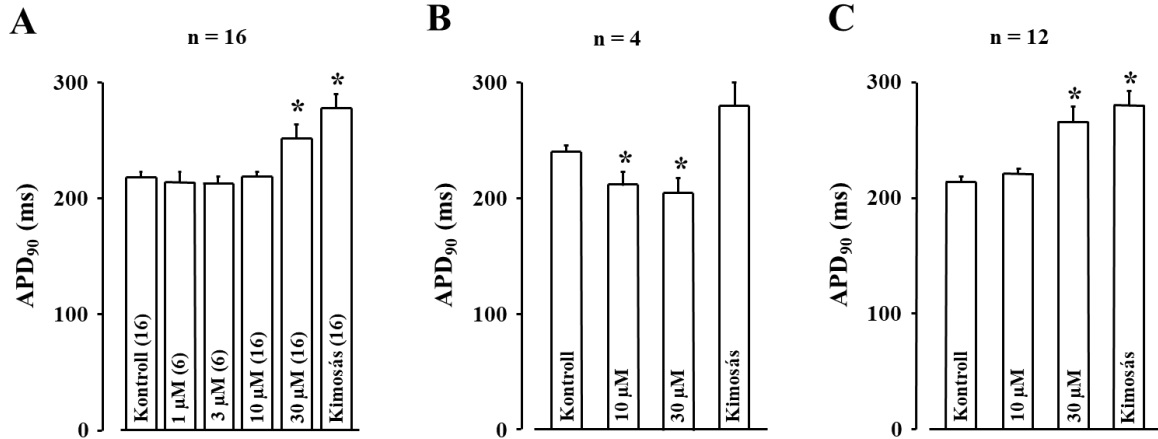
35. ábra. A 9-phenanthrol koncentrációfüggő hatása az akciós potenciál konfigurációra. A: Repräsentatív egymásra helyezett akciós potenciálok expozíció előtt; 1, 3, 10 és 30 μM 9-phenanthrol jelenlétében, illetve a szerből való kimosás után. Az akciós potenciál felszálló szára (és az idő szerinti első deriváltja) és az 1. fázis repolarizációja növekedett. A piros ellipszissel kiemelt rész látható az AP-k mellett kinagyítva B-E: Az akciós potenciál paraméterek 9-phenanthrol hatására kapott átlageredményei (B: az akciós potenciál időtartamának 50 %-ában mért platófeszültség, Plat_{50} ; C: maximális depolarizációs sebesség, V_{max}^+ ; D: az 1. fázis repolarizációjának meredeksége; E: maximális terminális repolarizáció sebessége, V_{max}^-). Az oszlopok és hibajelek a mérési eredmények számtani átlagát $\pm\text{SEM}$ -t jelölik. A *-ok a kontrollhoz viszonyított hatásbeli statisztikailag szignifikáns különbséget jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

A 9-phenanthrol az akciós potenciál időtartamának 50 %-ánál mért platópotenciál (Plat_{50}) koncentrációfüggő csökkenését okozta. Ez a hatás 3 μM fölötti koncentrációnál szignifikáns, és kimosás során reverzibilis volt (35. A, B ábrák). A depolarizáció maximális sebessége (V_{max}^+), ami arányos a gyors Na^+ áram áramsűrűségével, szintén szignifikáns mértékben csökkent 1 μM -nál nagyobb koncentrációk esetén, de csak részben volt visszafordítható a kimosás során (35. A, C ábrák). 30 μM 9-phenanthrol nem változtatta meg szignifikáns mértékben a nyugalmi membránpotenciált ($-82,2 \pm 0,9$ versus $-80,5 \pm 1,2$ mV a 9-phenanthrol távollétében és jelenlétében, $n = 16$, nem szignifikáns), azonban szignifikánsan csökkentette a csúcspotenciál értékét, és így az akciós potenciál amplitúdóját is. (rendre $25,3 \pm 1,8$ mV-ról $9,2 \pm 2,3$ mV-ra; illetve $107,5 \pm 1,6$ -ról $99,7 \pm 2,1$ mV-ra, $n=16$, $p < 0,05$).

A 9-phenanthrol szignifikánsan csökkentette a korai repolarizáció (1. fázis) meredekségét. Az AP ezen fázisa az I_{to1} áramsűrűségét tükrözheti. A szernek az akciós potenciál

konfigurációjára gyakorolt hatásai közül ez volt a legjellemzőbb: már 3 μM koncentráció esetén szignifikáns volt, és teljesen reverzibilisnek bizonyult (35. A, D ábrák). Az első fázis repolarizáció amplitúdója, amit a csúcspotenciál és az incisura bemélyedése között mértünk, szintén szignifikánsan csökkent 30 μM 9-phenanthrol hatására ($22,5 \pm 2,0$ -ról $6,0 \pm 1,7$ mV-ra, $n = 16$, $p < 0,05$). A terminális repolarizáció sebességét (V_{max}^-), ami jól korrelál az I_{K1} sűrűségével⁸, szintén szignifikánsan csökkentette 10 és 30 μM 9-phenanthrol (35. E ábra), azonban ez a jelenség kevésbé volt kifejezett az 1. fázisra gyakorolt hatásokhoz viszonyítva, és csak részben volt visszafordítható kimosás során.

A 9-phenanthrol hatása az akciós potenciál 90 %-os repolarizációjához tartozó időtartamra (APD_{90}) nem volt egységes a vizsgált szívműködő sejtekben. Az 36. A ábrán bemutatott, valamennyi (16 db) sejtnél megfelelő APD_{90} átlagértékek nem mutattak szignifikáns változást 10 μM 9-phenanthrol koncentrációig, azonban 30 μM jelenlétében az APD_{90} növekedni kezdett, ami a kimosás alatt is folytatódott. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a 16 vizsgált szívműködő sejtől 12 esetén (36. C ábra), azonban 4 szívműködő sejt az APD_{90} jelentős csökkenésével reagált a kezelésre. A kimosás során azonban az APD_{90} az említett 4 sejtben a kontrollnál hosszabb lett (36. B ábra). A többi vizsgált akciós potenciál paramétert hasonlóan befolyásolta a 9-phenanthrol a szívműködő sejtek mindkét csoportjában. A 9-phenanthrol alkalmazása előtt, kontroll körülmények között mért akciós potenciál paramétereket közül, az alábbiak voltak statisztikailag szignifikánsan eltérőek a két sejtcsoporthoz: a plató_{50} és az 1. fázis végén mért legnegatívabb feszültségek magasabbak voltak; míg az APD_{90} rövidebb volt az akciós potenciál megnyúlásával reagáló sejtekben, mint a 9-phenanthrol kezelést követően AP rövidülésével reagáló sejtekben (5. táblázat).



36. ábra. A 9-phenanthrol hatása az akciós potenciál tartamának a repolarizáció 90 %-os szintjén (APD₉₀) mérve. **A:** A 6. ábrán bemutatott kísérleteknek megfelelő adatok, ahol 16 sejt 10 és 30 μ M 9-phenanthrol hatásnak volt kitéve (ebből 6 sejt 1 és 3 μ M koncentrációnak is). **B:** 4 sejtől származó adatok, ahol az APD₉₀ 9-phenanthrol hatására reverzibilis módon rövidült. **C:** A fennmaradó 12 sejt adatai, ahol az APD₉₀-et fokozatosan meghosszabbította a szer. Az oszlopok és hibajelek a mérési eredmények számtani átlagát \pm SEM-t jelölik. A *-ok a kontrollhoz viszonyított hatásbeli statisztikailag szignifikáns különbséget jelölik, az n pedig a kísérletek számát jelzi.

5. táblázat. Szignifikánsan különböző kiindulási AP paraméterek a sejtek azon két csoportjában, ahol az APD₉₀ értékek eltérően változtak 9-phenanthrol kezelésre. *Szignifikánsan különbözik a másik csoporttól.

	APD ₉₀ (ms)	Plató ₅₀ (mV)	Legnegatívabb 1. fázis feszültség (mV) kontrollban
n=4, mikor APD ₉₀ csökkent 9-phenanthrol által	237.5 \pm 5.8	-10.1 \pm 1.0	-7.0 \pm 8.0
n=12, mikor APD ₉₀ nőtt csak 30 μ M 9-phenanthrol által	212.3 \pm 4.1*	-0.8 \pm 1.9*	6.1 \pm 2.5*

7. Megbeszélés

A kalciumfüggő-kloridáram szerepe a repolarizáció térbeli és időbeli heterogenitásában

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

A korábbi vizsgálathoz¹¹⁰ hasonlóan a 9-AC nem módosította a V_{max} -ot egyik vizsgált sejttypusban sem (3. és 4. táblázatok), jelezve, hogy a szer nincs hatással a gyors Na^+ áramra. Ezáltal a szer alkalmas a $I_{Cl(Ca)}$ szerepének tanulmányozására AP mérések során is. A 9-AC meghosszabbította az AP-t ENDO és MID sejtekben is (17. ábra) a korábbi eredményekkel összehangban^{27, 110}. EPI sejtekben azonban nem okozott AP megnyúlást (17. ábra). Ez az I_{Kr} felhalmozódása által kiváltott esetleges rövidítő hatásnak, valamint a kisebb Ca^{2+} -beáramlásnak köszönhető a kifejezett tüske és kupola AP konfiguráció hiányában⁵. Ez az AP rövidítő hatás úgy tűnik, kiegyenlíti a 9-AC által okozott $I_{Cl(Ca)}$ gátlás miatt várható AP megnyúlást.

A repolarizáció 1. fázisának nagyságát a 9-AC minden vizsgált sejttypusban csökkentette (17. ábra). Az 1. fázis előzetes csökkentése után (az I_{to1} részleges, 1 mM 4-AP-vel történő gátlásával) az EPI sejtek AP alakja hasonlónak vált az ENDO-okéhoz. Amikor a 9-AC-t ilyen körülmények között alkalmaztuk, akkor az AP paraméterek változása gyakorlatilag azonos volt az ENDO sejtekben megfigyeltekkel (17. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 9-AC APD-re gyakorolt hatásának hiánya EPI sejteken a nagy I_{to1} sűrűség által létrehozott kifejezett tüske és kupola AP konfigurációnak tulajdonítható⁶⁵. Ez összehangban áll a Zygmunt és mtsai. által leírtakkal, akik szintén fontos szerepet tulajdonítottak az I_{to1} -nek a későbbi ionáramok aktiválásában, mint például a $I_{Cl(Ca)}$ és $I_{Ca,L}$ ¹²⁹.

Eredményeink jól illeszkednek egy korábbi tanulmányhoz¹¹⁴ a kísérleti körülmények közötti különbségek ellenére is. Verkerk és mtsai. az AP méréseiket nyúl bal kamrai szívműködésben, patch-clamp konfigurációban végezték, és DIDS-et használták a $I_{Cl(Ca)}$ gátlására, miközben mi 9-AC-t alkalmaztunk kutya bal kamrai szívműködésben, hegyes mikroelektroda technikával. Mindazonáltal AP megnyúlást ők sem találtak az EPI sejtekben, kivéve a leggyorsabb stimulációs sebességen, 3,33 Hz-en. Ezenkívül, a mi megfigyelésünkhöz hasonlóan a $I_{Cl(Ca)}$ DIDS-el történő gátlása az EPI sejtek AP-ját 1 Hz-en csak I_{to1} gátlás jelenlétében hosszabbította meg¹¹⁴. Eredményeinkkel összehangban egy szintén

kutya sejteken végzett vizsgálatban¹²⁹ az APD csak akkor növekedett, amikor a repolarizáció 1. fázisa lassú és csekély volt (mint a MID és ENDO sejtekben).

A MID, az ENDO és a 4-AP-nel előkezelt EPI sejtekben a $I_{Cl(Ca)}$ gátlása fordított frekvencia-függő módon hosszabbította az AP-t (17. ábra). Ez megegyezik a kutya⁷ és más emlősfajok⁴ APD-ának frekvencia-függő változásairól szóló korábbi megállapításainkkal. Ezen kívül két másik tényező is hozzájárulhat a 9-AC-indukált, frekvenciafüggő AP megnyúláshoz. Az egyik a $[Ca^{2+}]_i$ frekvenciafüggő ingadozása, ami nagyobb mértékű magasabb ingerlési frekvencia esetén mind egyensúlyi¹¹⁰, mind nem-egyensúlyi állapotban⁶⁵. Ezenkívül a $[Ca^{2+}]_i$ jól korrelál a I_{9-AC} -ként, négyszögimpulzusokkal mért $I_{Cl(Ca)}$ -mal¹¹⁰. Egy másik tényező az I_{to1} áramsűrűség frekvenciafüggő viselkedése, mivel az aktiválható csatornák száma nagy ingerlési frekvencián csökken az I_{to1} viszonylag lassú inaktivációból történő visszatérése miatt⁶⁵. Ez abban tükröződött, hogy a repolarizáció 1. fázisa frekvenciafüggő tulajdonságokat mutatott kontroll körülmények között, mivel nagyobb volt hosszú CL-nál. Ezenkívül, ez a frekvenciafüggés jelen volt akkor is, amikor a $I_{Cl(Ca)}$ -t 9-AC-vel gátoltuk mind az 5 vizsgált sejttypusban (nem ábrázoltuk). Emiatt az 1. fázis frekvenciafüggését inkább befolyásolja az I_{to1} inaktivációs kinetikája, mint a $I_{Cl(Ca)}$ nagysága. Ez hangsúlyozza a fordított frekvencia-függésnek, mint a szívizom belső tulajdonságának a tényét⁴. Ezért a $I_{Cl(Ca)}$ szerepe a APD transzmurális heterogenitásának csökkenésében lassú szívverésnél erőteljesebb, mint ahogy azt nyúl szívizomsejteken végzett kísérletek is bizonyították¹¹⁴. Ez még fontosabbá teszi az $I_{Cl(Ca)}$ repolarizációhoz történő hozzájárulását, mivel a repolarizáció heterogenitása alacsony frekvencián a legnagyobb¹²⁰.

Vizsgálatunk elsőként írja le az $I_{Cl(Ca)}$ apiko-bazális hozzájárulását az AP konfigurációhoz (18. ábra). A kiindulási AP paramétereink hasonlóak voltak a korábban publikált értékeinkhez¹⁰⁰, és a 9-AC-indukált AP paraméterek apiko-bazális irányú változásai hasonlóak voltak a transzmurális irányban tapasztaltakhoz. Ismét, az AP repolarizáció heterogenitását $I_{Cl(Ca)}$ -mal csökkentettük, és ez a hatás a legerősebb a lassú stimulációs sebességeknél volt (18. ábra).

A $I_{Cl(Ca)}$ és annak ionsatorna fehérjei közötti transzmurális különbség

A I_{9-AC} felhasználható a $I_{Cl(Ca)}$ AP-hoz való hozzájárulásának feltárására közel fiziológias körülmények között (APVC-vel, megtartott intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis mellett)⁴⁶, ennek ellenére a $I_{Cl(Ca)}$ regionális különbségeit még nem vizsgálták ilyen módon. Két hasonló vizsgálat történt, az egyikben egy "tipikus" AP-t alkalmaztak parancsjelként perforált patch mérésekben, nem specifikus $I_{Cl(Ca)}$ gátlószereket használva¹²⁹ a másokban pedig a fiziológias

kalcium homeosztázisba avatkoztak bele, ugyanis a pipetta belső 10 mM EGTA-t tartalmazott²⁷. Méréseinkben a I_{9-AC} korai kifelé irányuló komponensének áramsűrűsége statisztikailag szignifikánsan nagyobb volt az EPI sejtekben az ENDO értékekhez képest (20. ábra). Ez az EPI-ENDO különbség váratlan volt, mivel Zygmunt által végzett korábbi vizsgálat nem számolt be a $I_{Cl(Ca)}$ áramsűrűségének transzmurális különbségéről kutya bal kamrájában¹²⁶. Az idézett vizsgálat EPI és MID sejtek $I_{Cl(Ca)}$ áramsűrűségét összehasonlító eredményei teljes mértékben egybehangzóak a jelen értekezésben taglalt kísérleti eredményekkel. Azonban ők a $I_{Cl(Ca)}$ -t nem vizsgálták ENDO sejtekben, és hagyományos négyszögimpulzusokat alkalmaztak az áram nem-specifikus gátlószerének (DIDS) használatával¹²⁶. Jelen kísérleteink alkalmával 9-AC-t használtunk mind az APVC, mind a hagyományos feszültség-clamp mérések során, azonban az utóbbi esetben nem találtunk szignifikáns különbséget a $I_{Cl(Ca)}$ sűrűségében sem a különböző transzmurális rétegekből származó, sem az apikális vagy bazális eredetű midmiokardiális sejtek összehasonlításakor (19. ábra). Az értekezésben bemutatott eredményekkel ellentétben, a hagyományos feszültség-clampmál mért $I_{Cl(Ca)}$ amplitúdó szignifikánsan nagyobb volt macska EPI sejtekben az ENDO sejtekhez képest²⁸, ami fajok közötti különbséget sugall a $I_{Cl(Ca)}$ transzmurális eloszlásában.

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

A 9-AC-indukált AP megnyúlás erőteljesebb volt ENDO sejtekben, mint EPI sejtekben (17. ábra). Továbbá a I_{9-AC} korai kifelé irányuló komponensének áramsűrűsége is nagyobb volt EPI sejtekben, mint ENDO sejtekben APVC-körülmények között (20. ábra). Ezzel szemben a I_{9-AC} áramsűrűségben nem tapasztaltunk transzmurális különbségeket hagyományos feszültség-clamp kísérletek során (19. ábra). Megjegyzendő, hogy az ingerlőjel formája jelentősen különbözik a hagyományos feszültség-clamp (négyzetjel) és az APVC esetén (saját, fiziológias AP). Ezért vizsgáltuk azt a hipotézist, hogy az ingerlőjel (ingerlő AP) alakja lehet felelős az EPI-sejtek nagyobb $I_{Cl(Ca)}$ sűrűségéért. Ehhez korábban rögzített tipikus ENDO (21. ábra) és EPI (21. ábra) AP-t használtunk ingerlőjelként. Az ENDO AP csak lassú és kis amplitúdójú 1. fázissal rendelkezik (21. ábra), míg az EPI AP 1. fázisa gyors és nagy, amit egy kifejezett kupola követ (21. ábra). A jellegzetes EPI ingerlő AP nagyobb korai kifelé irányuló $I_{Cl(Ca)}$ -t indukált, mint az ENDO AP, függetlenül attól, hogy APVC során az ingerlőjelet EPI vagy ENDO sejteken alkalmaztuk (21. ábra). Ezek az eredmények hasonlóak a csoportunk által korábban kutya és humán bal kamrai szívműködésben mért nisoldipine-érzékeny áram esetében tapasztaltakhoz^{5, 26}. Kimutattuk, hogy a nisoldipine-érzékeny áram

töltése jelentősen nagyobb volt az EPI AP során az ENDO-hoz képest⁵. Ez a $I_{Cl(Ca)}$ erőteljesebb aktiválódását eredményezheti az AP korai fázisában. Nehéz megjósolni a pontos mechanizmust, mivel a $[Ca^{2+}]_{rés}$ mellett a membránpotenciál is befolyásolja a $I_{Cl(Ca)}$ aktiválódását. Az EPI AP jellegzetes 1. fázisa kettős hatást gyakorol a $I_{Cl(Ca)}$ -ra. Az 1. fázis során folyamatosan csökkenő membránpotenciál egyrészt csökkenti Cl^- elektrokémiai grádiensét, és így közvetlenül gátolja a Cl^- beáramlását, másrészt viszont elősegíti a Ca^{2+} beáramlását a Ca^{2+} megnövekedett hajtóereje és az LTCC-k I-V karakterisztikája miatt. Kísérleteink alapján a hangsúlyosabb 1. fázis (EPI AP) hatása összességében az $I_{Cl(Ca)}$ korai kifelé irányuló komponensének növekedését eredményezi. Ez a nagyobb áram biztosan nem az EPI sejtekben lévő csatornafehérjék nagyobb sűrűségének tulajdonítható, mivel a TMEM16A és a Bestrophin-3 expressziója mind transzmurális, mind apiko-bazális irányban egyenlő volt (19. ábra). Bár a $Ca_v1.2$, az LTCC-k pórusképző alegységének expressziós szintjét nem vizsgáltuk ENDO sejtekben, a kifejeződés mértékét egyenlőnek találtuk EPI és MID sejtekben⁹⁹, hasonlóan a jelen munkánkban leírt egyenlő TMEM16A és Bestrophin-3 sűrűséghez.

Az $I_{Cl(Ca)}$ hatása a bal kamrai repolarizáció időbeli változékonyságára és az EAD képződésre

A repolarizáció megnyúlása növeli a szívritmuszavarok előfordulását, mivel EAD-okhoz és TdP-hez vezethet⁶⁰. Azonban az Európai Szívritmus Társaság (European Heart Rhythm Association) és az Európai Sejtszintű Szívelektrofiziológiai Munkacsoport (European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology) állásfoglalása és irányelvei¹² szerint a repolarizáció rövid távú variabilitása (SV) a szívritmuszavarok előrejelzésében fontosabb, mint önmagában a repolarizáció megnyúlása.

A korábban említett vizsgálatok szerint bármely SV csökkentő beavatkozásnak lehet antiaritmiás tulajdonsága. Az értekezésben tárgyalt SV számítások alapját képező kísérleteinket 1 Hz-es steady-state ingerléssel végeztük, és ezen körülmények között nem tapasztaltunk EAD-t, ezért az APD vagy SV változásai nem lehetnek az EAD előfordulása miatt. A 9-AC az SV növekedését indukálta (a 22. ábra bemutatott kisebb melléklet), ami a $I_{Cl(Ca)}$ antiaritmiás szerepét sugallja. A $I_{Cl(Ca)}$ lehetséges antiaritmiás tulajdonságát tovább erősíti, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ gátlásakor EAD-eket detektáltunk 1 Hz-nél alacsonyabb ingerlési frekvencián (9-AC jelenlétében, 6. B ábra). Az $I_{Cl(Ca)}$ antiaritmiás szerepét alátámasztó további bizonyíték, hogy 9-AC és ISO egyidejű jelenlétében nagyobb EAD incidenciát tapasztaltunk, mint kizárólag 9-AC jelenlétében. Az ISO $I_{Ca,L}$ növelő hatása jól ismert, ezáltal

ISO jelenlétében növekszik a $[Ca^{2+}]_{rés}$, ami nagyobb $I_{Cl(Ca)}$ -hez vezet⁴⁶. Ha ezt a megnövekedett – és feltehetően antiaritmiás hatása – $I_{Cl(Ca)}$ -t 9-AC-vel gátoljuk, logikusan nagyobb EAD előfordulás várható, csakúgy, mint amit kísérleteinkben láttunk (22. ábra).

A jelen értekezésben és korábbi publikációkban^{52, 101} is az SV érték számítására használt képlet nem érzékeny módszer annak vizsgálatára, ha csak néhány AP hosszúsága különbözik erősen az átlagtól. Az átlagtól való nagymértékű eltérés annál valószínűbb, minél több egymást követő AP-t használunk. Az egymást követő APD értékek hirtelen nagymértékű változásának előfordulása azonban nem feltétlenül homogén a miokardium különböző eredetű sejtjeiben. Egy ilyen változás hatékonyabban válthat ki szívritmuszavart, mint egy hatóanyag a fokozatos és egyidejű APD növelő hatásának kifejtése során¹¹¹. Ezért az egymást követő APD értékek közötti különbséget 1 ms-os tartományonként csoportosítottuk, és kiszámítottuk a megjelenésük kumulatív valószínűségét (22. ábra) az 50 elemzett AP között esetlegesen előforduló szokatlanul rövid vagy szokatlanul hosszú AP-k érzékenyebb észlelése érdekében. Ezt az elemzést használva, a 9-AC jobbra tolta a kumulatív valószínűségi görbét, ami az egymást követő APD értékek közötti különbségek növekedését, tehát aritmogén hatást jelez. Az ISO önmagában antiaritmiás hatása, mivel a kumulatív valószínűségi görbét balra tolta. Ez az antiaritmiás hatás azonban kisebb volt 9-AC jelenlétében, mert a kumulatív valószínűségi görbét az ISO kisebb mértékben tolta balra 9-AC jelenlétében, mint önmagában. Hasonlóképpen, a 9-AC és az ISO együttes jelenlétében az SV értéke nagyobbak adódtak, mint az önmagában alkalmazott ISO esetén (22. ábra). Ezek alapján úgy tűnik, hogy az $I_{Cl(Ca)}$ hozzájárul az ISO által okozott SV csökkenéshez. Eredményeink mindegyike alátámasztja az $I_{Cl(Ca)}$ szívritmuszavarral szembeni védő szerepét, az APD heterogenitásának fent említett térbeli csökkenésével együtt.

A jelen értekezésben bemutatott eredmények összhangban vannak munkacsoportunk korábbi tanulmányával, mely a $I_{Cl(Ca)}$ védő szerepét a cézium és az ouabain által indukált kutya kamrai szívizomsejt EAD modellekben is feltételezte²⁷. Ezzel szemben juh kamrai sejteken a DIDS alig volt hatással az EAD-k paramétereire¹¹³. A különböző fajoktól eltekintve, a juhokon végzett vizsgálatban noradrenalin alkalmaztak EAD kiváltására, illetve a DIDS, egy nem specifikus $I_{Cl(Ca)}$ gátlószer (amely gátol Na^+ csatornákat is¹¹⁰) EAD paraméterekre gyakorolt hatását tanulmányozták. A jelenlegi vizsgálatban EAD-eket nem idéztünk elő, de előfordulási gyakoriságukat 9-AC, a $I_{Cl(Ca)}$ specifikus gátlószerének hiányában vagy jelenlétében vizsgáltuk. E különbségek miatt nehéz összehasonlítani ezeket a vizsgálatokat.

Megemlítendő továbbá a DAD és a $I_{Cl(Ca)}$ kapcsolata. Ismert, hogy a DAD szívritmuszavarokat provokálhat TdP¹⁰⁶ elindításával. A DAD-kat nem csak az I_{NCX} forward módja, hanem az $I_{Cl(Ca)}$ is létrehozhatja, legalábbis bizonyos fajokban és sejttípusokban. Korábban kimutatták a $I_{Cl(Ca)}$ aktiválásának szerepét Ca^{2+} -túltöltött kutya kamrai¹²⁸, nyúl pitvari, kamrai és Purkinje¹⁰³, valamint juh Purkinje és kamrai¹¹⁵ sejtek DAD-inak előidézésében. Az ISO által indukált kloridáram (és DAD-k) jelenlétét nem figyelték meg kutya kamrai sejtekben⁹⁵, de ugyanolyan kísérleti körülmények között tengerimalac kamrai szívizomsejtekben kimutatták a membrán depolarizációját⁹⁵. Lehetséges, hogy az 1 μ M ISO 20 másodpercig történő alkalmazása nem volt elegendő Ca^{2+} -túlterhelés indukálására, és ezáltal az $I_{Cl(Ca)}$ és a DAD-k aktiválására a kutyákból származó szívizomsejteken⁹⁵. Hasonlóképpen, ISO jelenlétében DAD-kat nem észleltük kísérleteink során, jelezve, hogy a 10 nM ISO nem okoz Ca^{2+} túlterhelést kutya kamrai szívizomsejtekben. Lehetséges DAD-k létrehozása kutya sejtekben Ca^{2+} -túlterheléssel, de az ISO-t ehhez 100-szor magasabb koncentrációban, és ouabainnal együtt kellett alkalmazni²⁰.

Összefoglalás és lehetséges relevancia

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

A BAPTA-AM akciós potenciál időtartamára kifejtett hatása

A jelen vizsgálatban egyértelműen kimutattuk a Ca^{2+} kelátképző BAPTA-AM reverzibilis I_{Kr} -t gátló hatását kutya kamrai szívműködő sejtekben. Eredményeink megegyeznek Tang és mtsai. eredményeivel¹⁰⁵, akik szerint a BAPTA-AM IC_{50} értéke $1,3 \mu\text{M}$ volt HEK 293 sejtekben expresszált HERG-csatornákon (és más expresszált K^+ csatornán is hasonlóan adódott). A szerzők úgy találták, hogy a BAPTA-AM a nyitott hERG csatornához kötődik. Ezért kissé meglepő, hogy hasonló mértékű gátló hatást figyeltek meg a hagyományos feszültség clamp és akciós potenciál feszültség clamp körülmények között (az I_{Kr} áram a kontroll értékek rendre 32 és 34% -ára csökkent). A hasonló mértékű gátló hatás valószínűleg annak a következménye, hogy a hagyományos feszültség-clamp kísérletekben +40 mV-os aktivációs feszültséget alkalmaztunk lassabb frekvencián, amit APVC elrendezésben ellensúlyozott a kevésbé pozitív akciós potenciál platófeszültség és a magasabb ingerlő frekvencia. Mindkét feszültség clamp kísérlet legfontosabb üzenete, hogy amikor olyan sejtekben vizsgáljuk a szív ionáramainak Ca^{2+} függését, amelyek hERG csatornát (és néhány más K^+ -csatornát) expresszálnak, a külső oldatban BAPTA-AM nem használható kísérleti Ca^{2+} kelátképzőként a BAPTA-AM közvetlen, K^+ áramokat gátló hatása miatt.

Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy az aktuális kísérleti elrendezéstől függően a BAPTA-AM időben változó és nagyon összetett hatást gyakorolhat az APD_{90} -re, így az eredmények magyarázata szükségszerűen spekulatív. A BAPTA-AM gyorsan (5 perc alatt) kialakuló hatása, az APD_{90} szignifikáns megnyújtása hátterében nagyon valószínű, hogy az I_{Kr} BAPTA-AM általi gátlása áll. Ezt az egyszerű képet árnyalja, hogy a BAPTA-AM akut AP hosszabbító hatását csökkentette a nisoldipine és növelte a BAY K8644, ami a I_{Ca} változásának a BAPTA-AM által létrehozott APD_{90} változásban betöltött szerepére utal. Figyelembe kell vennünk továbbá, hogy a BAY K8644 és a nisoldopin hatására nem csak a I_{Ca} növekedett vagy csökkent, hanem a BAPTA-AM kezelés előtti APD_{90} valamint a plató potenciál értéke is. Az I_{Kr} -gátlás AP-t nyújtó hatása sokkal kifejezettebb, ha az APD_{90} hosszabb^{7,9}, mint ahogy azt a BAY K8644 jelenlétében is tapasztaltuk, és sokkal kisebb, ha az APD_{90} rövidebb, amint azt nisoldipine jelenlétében megfigyeltük. Ezenkívül az I_{Kr} relatív fontossága az APD_{90} szabályozásában erősen növekszik a plató pozitívabb potenciálok felé tolódásával, mivel az I_{Kr} gyorsabban aktiválódik pozitívabb feszültségeken⁵³. Ez szintén hozzájárulhat ahhoz, hogy BAY K8644 jelenlétében a BAPTA-AM kifejezettebben megnyújtotta az AP-t, mint nisoldipine jelenlétében.

Amikor a sejteket I_{Kr} -gátló szerekkel (dofetilide vagy E4031) előkezeltük, a BAPTA-AM nem tud további I_{Kr} gátló hatást kifejteni. Ilyenkor a BAPTA-AM csökkentette az APD_{90} -et, amely hatás valószínűleg a $[Ca^{2+}]_i$ csökkenéséhez köthető. Ennek a BAPTA-AM által indukált rövidülésnek a legvalószínűbb magyarázata a fiziológiás körülmények között befelé irányuló Na^+/Ca^{2+} csere áram (NCX) kifelé irányulóvá válása a csökkent $[Ca^{2+}]_i$ következtében. Ezzel összhangban, a BAY K8644-gyel előkezelt szívműködő sejtekben a BAPTA-AM kezdetben az APD_{90} növekedését okozta, majd 5 perc után az APD_{90} tendenciózus csökkenése következett be. Ennek oka valószínűleg az, hogy a hosszú AP és pozitívabbá váló platópotenciál reverz módú, kifelé irányuló NCX áram létrejöttének kedvez^{16, 29}. Ez a hatás összefügghet a $[Ca^{2+}]_i$ pufferelemése következtében tapasztalt szignifikáns APD_{90} rövidüléssel patkány, tengerimalac és görény szívműködő sejtekben^{49, 73}.

Amint az a 25. ábra látható, a BAPTA-AM által létrehozott APD_{90} rövidítő hatás csak átmeneti volt, a hosszan tartó BAPTA-AM expozíció a progresszív AP megnyúlást okozott. Ez az AP nyújtó hatás nyilvánvaló volt kontroll körülmények között is, ahol nem észleltünk átmeneti rövidülést (csak egy kis bemetszést 5 perc után). Az APD_{90} meghosszabbodását egy vagy néhány Ca^{2+} -függő kifelé irányuló áram kikapcsolása is okozhatja. Ilyen lehet például a Ca^{2+} -függő Cl^- áram^{39, 46}, és a $I_{Ca,L}$ Ca^{2+} -függő inaktiválódásának megszüntetése szintén hozzájárulhat ezen jelenséghez. Összefoglalva, amikor a sejteket I_{Kr} -gátló szerekkel kezeltük, tehát a BAPTA-AM nem tudott további I_{Kr} gátló hatást kifejteni, akkor a $[Ca^{2+}]_i$ pufferelemése az APD_{90} kétfázisú válaszát eredményezte: az AP tranziens kezdeti rövidülését az AP fokozatos meghosszabbodása követte.

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

Munkánk során a TRPM4 gátlószer 9-phenanthrol akciós potenciál konfigurációra és a legfontosabb, azt létrehozó ionáramokra gyakorolt hatásait vizsgáltuk kutya bal kamrai szívizomsejteken. Feszültség-clamp méréseinkhez 10 mM BAPTA-tartalmú pipetta belsejét használtunk a TRPM4 csatornák Ca^{2+} -függő aktivációjának kikapcsolása érdekében azért, hogy vizsgálhassuk a 9-phenanthrol Ca^{2+} -tól független, direkt csatorna hatásait. A 9-phenanthrol a koncentráció függvényében az általunk vizsgált K^+ áramokat (I_{to1} , I_{Kr} és I_{K1}) gátolta, azonban a $I_{\text{Ca,L}}$ -ra nem volt befolyással. Rágcsálók kamrai szívizomsejtjeiben a 9-phenanthrol 10 μM koncentrációban nem hatott az $I_{\text{Ca,L}}$ -ra és a teljes K^+ áramra (I_{K}), de 100 μM koncentrációban már ezen áramokat jelentősen gátolta⁹². Méréseink eredményei egybevágóak az előbb említett kutatás adataival, a 9-phenanthrol az általunk használt legmagasabb koncentrációban (30 μM) sem volt az $I_{\text{Ca,L}}$ -ra hatással. Azonban a kutya kamrai szívizomsejtek K^+ csatornái érzékenyebbek tűnnek a rágcsálókénál 9-phenanthrolra, mivel a mi mérési eredményeink alapján az I_{to1} , I_{Kr} és I_{K1} áramokat a szer már 10 μM koncentrációban is szignifikánsan gátolta. Az eredmények összehasonlításakor fontos megjegyezni, hogy a rágcsálók és a kutyák I_{K} -ai különbözőek, az adatok fajok közötti különbségre utalnak.

A 9-phenanthrol félhatásos gátló koncentrációja a TRPM4 tekintetében 17 μM és 21 μM ³¹,⁹¹ a szakirodalom szerint. Eredményeinket értelmezve arra a következtetésre juthatunk, hogy a 9-phenanthrol nem szelektív TRPM4 gátlószer izolált kutya kamrai szívizomsejtjeiben, mivel a TRPM4 csatornák gátlásához szükséges IC_{50} értéknél a 9-phenanthrol már a K^+ áramok szignifikáns gátlását okozta.

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

A fent említett AP paraméterek létrejöttéért egy-egy ionáram felelős, azonban az APD befolyásolásában számos különböző ionáram is részt vesz. Ezért a 9-phenanthrol APD₉₀-ra gyakorolt hatásának értelmezése során számos szempontot figyelembe kell venni. A sejtek

populációja két csoportot alkotott a 9-phenanthrol APD₉₀-változtató hatásának tekintetében. Az első csoportban a szer hatására szignifikáns és reverzibilis AP rövidülést, míg a második csoportban AP megnyúlást tapasztaltunk. Mint azt az előbb leírtam, a 9-phenanthrol befolyással van az inward és outward áramokra egyaránt, amiért az individuális sejt-sejt ionáram denzitás különbségek felelhetnek⁶. Ezen eredményeink ellentétesek egy egerek kamrai szívizomzatában végzett kutatással szemben, mivel az általuk alkalmazott modellben V⁺_{max} és az AP amplitúdója egyaránt nem csökkent 100 μM 9-phenanthrol hatására⁹¹. Kamrai és pitvari sejtekben eltérő hatású volt a 9-phenanthrol, előbbiben az APD-ának kis mértékű rövidülését okozta, míg utóbbiban az AP amplitúdóját és időtartamát egyaránt jelentősen csökkentette. Eredményeik arra utalnak, hogy a 9-phenanthrol hatása a pitvari sejtekben kifejezettebb, mint a kamrai szívizom sejtekben (legalábbis egerekben), amit az alacsonyabb kamrai TRPM4 csatorna kifejeződéssel magyaráznak. Érdeemes megjegyezni, hogy a TRPM4 knockout egerek pitvari AP-jai rövidebbek voltak a vad típusú állatok hasonló sejtjeiben tapasztaltakhoz képest^{71, 91}. Nyulak esetében a 9-phenanthrol rövidítette a Purkinje rostok AP-ját, de szemben a mi eredményeinkkel, 30 μM koncentrációban a kamrai rostok AP-jára nem volt hatással⁴³.

Méréseink során 9-phenanthrol jelenlétében +10 mV és +40 mV membránpotenciálon megjelent egy időben állandónak tűnő, kifelé irányuló áram. Hasonló megfigyelést eddig nem írtak le 9-phenanthrollal végzett kutatásokban. Mivel a pipetta belsőben használt 10 mM BAPTA alkalmazásával a Ca²⁺ függő TRPM4 csatorna aktivációját lehetetlenné tettük, az állandó áram elméletileg nem jöhet létre a 9-phenanthrol TRPM4 csatornákon történő hatás eredményeként. Az áram reverzál potenciálja -40 mV-hoz közeli (34. ábra), messze van a TRPM4 áram közel 0 mV-os reverzál potenciáljától⁴³. Az áram természetének kiderítésére további vizsgálatokra van szükség, jelenlegi ismereteink alapján csak spekulálhatunk az áramot létrehozó ioncsatornákat és a töltéshordozó ionokat illetően.

Kifelé irányuló áram kifelé irányuló áram aktiválásával vagy befelé irányuló áram gátlásával jöhet létre. A késői Na⁺ áram gátlása elméletileg felelőssé tehető a 9-phenanthrol alkalmazása során megjelenő kifelé irányuló áramért. A 9-phenanthrol késői Na⁺ áramot gátló hatása jelenleg nem ismert, a szakirodalomban nem található erre utaló közvetlen kísérletes adat. Kifelé irányuló áramként a K⁺ áram aktivációja is összeköthető az áram létrejöttével. Azonban nem tűnik valószínűnek ez a magyarázat, mivel a 9-phenanthrol az I_{K1}, az I_{Kr} és az I_{to1} gátlását is okozta, illetve a méréseinkben az I_{Ks} áramot pedig annak gátlószerével, HMR-1556-tal blokkoltuk. További jelölt lehet egy Cl⁻ áram növekedése, ami szintén kifelé irányuló áramot hoz létre. Kísérleteinkben a Cl⁻ számított reverzál potenciálja -32 mV, ami jól

illeszkedik a 34. ábra látható adatokhoz. Fontos megjegyeznünk, hogy a szakirodalom alapján a 9-phenanthrol gátló hatással bír a TMEM16A Cl⁻ csatornákra¹⁷. Ennek tükrében, továbbá annak tudatában, hogy méréseink során Ca²⁺ kelátort (BAPTA) használtunk, szinte biztosan kizárhatjuk, hogy a 9-phenanthrol által indukált kifelé irányuló áramért a Ca²⁺-érzékeny TMEM16A csatornák aktivációja lenne felelőssé tehető. Nem kizárható az sem, hogy a 9-phenanthrol aktiválhat egy Ca²⁺-tól független Cl⁻ csatornát. Az egyik lehetséges jelölt lehet CFTR Cl⁻ csatorna. Igaz, hogy a CFTR 2x6 transzmembrán domént, míg a TRPM4 4x6 transzmembrán domént tartalmaz, a két csatorna több szerkezeti eleme – mint például a Walker B motívum vagy az ATP-kötő kazetta (8. ábra) – is megegyezik³¹. A CFTR csatornák lehetséges, 9-phenanthrol jelenlétében mért kifelé irányuló áram létrehozásában betöltött szerepét megkérdőjelezi az a tény, hogy kutyaszívben kérdéses a CFTR által mediált isoproterenol indukálta Cl⁻ áram jelenléte⁹⁵. Annyit biztosan állíthatunk, hogy ezen 9-phenanthrol által indukált áram elektrofiziológiai viselkedésének meghatározására további kísérletek kivitelezésére van szükség.

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

8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények

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

1. Karakterizáltam a 9-AC (antracén-9-karboxilsav) segítségével a különféle, bal kamrai kutya szívműködésében az $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ szerepét az akciós potenciál kialakításában, az aritmiák kialakulásában játszott lehetséges szerepét megállapítottam: feltételezhetően antiaritmiás hatása van.
2. Megvizsgáltam az intracelluláris Ca^{2+} hatását az bal kamrai szívműködés AP alakjára és I_{Kr} (hERG) áramokra, majd kimutattam, hogy az intracelluláris Ca^{2+} BAPTA-AM-mel történő csökkentése az I_{Kr} áram gátlása révén módosíthatja az AP jellemzőit.
3. Karakterizáltam a 9-phenanthrol, a TRPM4 csatorna egy specifikusnak vélt antagonistájának hatását számos, szívműködésben kifejeződő ionáram esetén, és eredményeim alapján arra a következtetésre jutottam, hogy egyáltalán nem szelektív gátlószer, sokféle egyéb ioncsatornát is képes a TRPM4-nél hatásos koncentrációban gátolni.

9. Összefoglalás

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

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

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

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

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

10. Summary

Oscillations of calcium levels are observed in cardiomyocytes in parallel with changes in transmembrane potentials. A wide range of ion currents in the heart are known to be Ca^{2+} -dependent. In cellular electrophysiological experiments, intracellular calcium concentration is often buffered by a so-called calcium chelators to study Ca^{2+} -dependent ion currents. In some experiments, the cell-permeable, acetoxymethyl ester form of the Ca^{2+} chelating agents are used to reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Such experiments have been conducted for decades and the results obtained have been interpreted solely by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ buffering despite the fact that BAPTA-AM interacts with K^+ channels expressed in HEK cells.

We investigated the role of $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ in the spatial and temporal heterogeneity of cardiac left ventricular repolarization by conventional microelectrode technique, conventional and action potential voltage clamp (APVC) technique, and protein expression determination. We also aimed to investigate whether BAPTA-AM influences left ventricular myocardial action potential (AP) and I_{Kr} current. We wanted to investigate the role of the TRPM4 current in the formation of AP morphology and the behavior of the current under AP by action potential clamp measurements with 9-phenanthrol. As this method requires as much selective ion channel blocking agent as possible, it was first of all designed to perform the selectivity test for 9-phenanthrol.

Our results show that $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ reduces regional (transmural and apico-basal) and temporal (short-term variability in AP length) repolarization, suggesting that current has an antiarrhythmic role. Neither the density of $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ recorded with the rectangular pulses nor the normalized expression of TMEM16A and Bestrophin-3 proteins differed significantly between the cells of different origin. The $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ density measured by APVC in subepicardial cells was higher than in subendocardial cells, probably due to the greater Ca^{2+} influx by LTCCs in subepicardial APs.

Our studies demonstrated the inhibitory effect of BAPTA-AM I_{Kr} on ventricular myocardial cells.

Our experiments have shown that 9-phenanthrol is not a selective TRPM4 channel blocker in canine ventricular myocytes. Therefore, the use of 9-phenanthrol as a TRPM4 inhibitor is desirable only in expression systems and not in native cardiac cells.

11. Irodalomjegyzék

- 1 K. Acsai, G. Antoons, L. Livshitz, Y. Rudy, and K. R. Sipido, 'Microdomain [Ca(2)(+)] near Ryanodine Receptors as Reported by L-Type Ca(2)(+) and Na+/Ca(2)(+) Exchange Currents', *J Physiol*, 589 (2011), 2569-83.
- 2 C. Antzelevitch, W. Shimizu, G. X. Yan, S. Sicouri, J. Weissenburger, V. V. Nesterenko, A. Burashnikov, J. Di Diego, J. Saffitz, and G. P. Thomas, 'The M Cell: Its Contribution to the Ecg and to Normal and Abnormal Electrical Function of the Heart', *J Cardiovasc Electrophysiol*, 10 (1999), 1124-52.
- 3 B. Balati, A. Varro, and J. G. Papp, 'Pharmacological Modification of the Dispersion of Repolarization in the Heart: Importance of the M Cells', *Cardiovasc Drugs Ther*, 13 (1999), 491-505.
- 4 T. Banyasz, L. Barandi, G. Harmati, L. Virag, N. Szentandrassy, I. Marton, A. Zaza, A. Varro, and P. P. Nanasi, 'Mechanism of Reverse Rate-Dependent Action of Cardioactive Agents', *Curr Med Chem*, 18 (2011), 3597-606.
- 5 T. Banyasz, L. Fulop, J. Magyar, N. Szentandrassy, A. Varro, and P. P. Nanasi, 'Endocardial Versus Epicardial Differences in L-Type Calcium Current in Canine Ventricular Myocytes Studied by Action Potential Voltage Clamp', *Cardiovasc Res*, 58 (2003), 66-75.
- 6 T. Banyasz, B. Horvath, Z. Jian, L. T. Izu, and Y. Chen-Izu, 'Sequential Dissection of Multiple Ionic Currents in Single Cardiac Myocytes under Action Potential-Clamp', *J Mol Cell Cardiol*, 50 (2011), 578-81.
- 7 T. Banyasz, B. Horvath, L. Virag, L. Barandi, N. Szentandrassy, G. Harmati, J. Magyar, S. Marangoni, A. Zaza, A. Varro, and P. P. Nanasi, 'Reverse Rate Dependency Is an Intrinsic Property of Canine Cardiac Preparations', *Cardiovasc Res*, 84 (2009), 237-44.
- 8 T. Banyasz, J. Magyar, N. Szentandrassy, B. Horvath, P. Birinyi, J. Szentmiklosi, and P. P. Nanasi, 'Action Potential Clamp Fingerprints of K⁺ Currents in Canine Cardiomyocytes: Their Role in Ventricular Repolarization', *Acta Physiol (Oxf)*, 190 (2007), 189-98.
- 9 L. Barandi, L. Virag, N. Jost, Z. Horvath, I. Koncz, R. Papp, G. Harmati, B. Horvath, N. Szentandrassy, T. Banyasz, J. Magyar, A. Zaza, A. Varro, and P. P. Nanasi, 'Reverse Rate-Dependent Changes Are Determined by Baseline Action Potential

- Duration in Mammalian and Human Ventricular Preparations', *Basic Res Cardiol*, 105 (2010), 315-23.
- 10 S. Barra, S. Agarwal, D. Begley, and R. Providencia, 'Post-Acute Management of the Acquired Long Qt Syndrome', *Postgrad Med J*, 90 (2014), 348-58.
- 11 J. W. Bassani, R. A. Bassani, and D. M. Bers, 'Relaxation in Rabbit and Rat Cardiac Cells: Species-Dependent Differences in Cellular Mechanisms', *J Physiol*, 476 (1994), 279-93.
- 12 M. Baumert, A. Porta, M. A. Vos, M. Malik, J. P. Couderc, P. Laguna, G. Piccirillo, G. L. Smith, L. G. Tereshchenko, and P. G. Volders, 'Qt Interval Variability in Body Surface Ecg: Measurement, Physiological Basis, and Clinical Value: Position Statement and Consensus Guidance Endorsed by the European Heart Rhythm Association Jointly with the Esc Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology', *Europace*, 18 (2016), 925-44.
- 13 D. M. Bers, 'Cardiac Excitation-Contraction Coupling', *Nature*, 415 (2002), 198-205.
- 14 G. E. Billman, 'Intracellular Calcium Chelator, Bapta-Am, Prevents Cocaine-Induced Ventricular Fibrillation', *Am J Physiol*, 265 (1993), H1529-35.
- 15 G. E. Billman, B. McIlroy, and J. D. Johnson, 'Elevated Myocardial Calcium and Its Role in Sudden Cardiac Death', *Faseb j*, 5 (1991), 2586-92.
- 16 P. Birinyi, A. Toth, I. Jona, K. Acsai, J. Almassy, N. Nagy, J. Prorok, I. Gherasim, Z. Papp, Z. Hertelendi, N. Szentandrassy, T. Banyasz, F. Fulop, J. G. Papp, A. Varro, P. P. Nanasi, and J. Magyar, 'The Na⁺/Ca²⁺ Exchange Blocker Sea0400 Fails to Enhance Cytosolic Ca²⁺ Transient and Contractility in Canine Ventricular Cardiomyocytes', *Cardiovasc Res*, 78 (2008), 476-84.
- 17 S. K. Burris, Q. Wang, S. Bulley, Z. P. Neeb, and J. H. Jaggar, '9-Phenanthrol Inhibits Recombinant and Arterial Myocyte Tmem16a Channels', *Br J Pharmacol*, 172 (2015), 2459-68.
- 18 J. P. Caille, E. Ruiz-Ceretti, and O. F. Schanne, 'Intracellular Chloride Activity in Rabbit Papillary Muscle: Effect of Ouabain', *Am J Physiol*, 240 (1981), C183-8.
- 19 E. Carmeliet, 'Cardiac Transmembrane Potentials and Metabolism', *Circ Res*, 42 (1978), 577-87.
- 20 M. L. Collier, P. C. Levesque, J. L. Kenyon, and J. R. Hume, 'Unitary Cl⁻ Channels Activated by Cytoplasmic Ca²⁺ in Canine Ventricular Myocytes', *Circ Res*, 78 (1996), 936-44.

- 21 V. S. Dam, D. M. Boedtker, J. Nyvad, C. Aalkjaer, and V. Matchkov, 'Tmem16a Knockdown Abrogates Two Different Ca²⁺-Activated Cl⁻ Currents and Contractility of Smooth Muscle in Rat Mesenteric Small Arteries', *Pflugers Arch*, 466 (2014), 1391-409.
- 22 C. D. DeMaria, T. W. Soong, B. A. Alseikhan, R. S. Alvania, and D. T. Yue, 'Calmodulin Bifurcates the Local Ca²⁺ Signal That Modulates P/Q-Type Ca²⁺ Channels', *Nature*, 411 (2001), 484-9.
- 23 S. Despa, B. Shui, J. Bossuyt, D. Lang, M. I. Kotlikoff, and D. M. Bers, 'Junctional Cleft [Ca²⁺(+)]_i Measurements Using Novel Cleft-Targeted Ca²⁺(+) Sensors', *Circ Res*, 115 (2014), 339-47.
- 24 G. I. Fishman, S. S. Chugh, J. P. Dimarco, C. M. Albert, M. E. Anderson, R. O. Bonow, A. E. Buxton, P. S. Chen, M. Estes, X. Jouven, R. Kwong, D. A. Lathrop, A. M. Mascette, J. M. Nerbonne, B. O'Rourke, R. L. Page, D. M. Roden, D. S. Rosenbaum, N. Sotoodehnia, N. A. Trayanova, and Z. J. Zheng, 'Sudden Cardiac Death Prediction and Prevention: Report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop', *Circulation*, 122 (2010), 2335-48.
- 25 A Fonyó, *Az Orvosi Élettan Tankönyve* (Medicina Könyvkiadó Zrt., 2011).
- 26 L. Fulop, T. Banyasz, J. Magyar, N. Szentandrassy, A. Varro, and P. P. Nanasi, 'Reopening of L-Type Calcium Channels in Human Ventricular Myocytes During Applied Epicardial Action Potentials', *Acta Physiol Scand*, 180 (2004), 39-47.
- 27 L. Fulop, E. Fiak, N. Szentandrassy, J. Magyar, P. P. Nanasi, and T. Banyasz, 'The Role of Transmembrane Chloride Current in Afterdepolarisations in Canine Ventricular Cardiomyocytes', *Gen Physiol Biophys*, 22 (2003), 341-53.
- 28 T. Furukawa, R. J. Myerburg, N. Furukawa, A. L. Bassett, and S. Kimura, 'Differences in Transient Outward Currents of Feline Endocardial and Epicardial Myocytes', *Circ Res*, 67 (1990), 1287-91.
- 29 K. S. Ginsburg, C. R. Weber, and D. M. Bers, 'Cardiac Na⁺-Ca²⁺ Exchanger: Dynamics of Ca²⁺-Dependent Activation and Deactivation in Intact Myocytes', *J Physiol*, 591 (2013), 2067-86.
- 30 D. E. Goldman, 'Potential, Impedance, and Rectification in Membranes', *J Gen Physiol*, 27 (1943), 37-60.
- 31 T. Grand, M. Demion, C. Norez, Y. Mettey, P. Launay, F. Becq, P. Bois, and R. Guinamard, '9-Phenanthrol Inhibits Human Trpm4 but Not Trpm5 Cationic Channels', *Br J Pharmacol*, 153 (2008), 1697-705.

- 32 R. Guinamard, P. Bouvagnet, T. Hof, H. Liu, C. Simard, and L. Salle, 'Trpm4 in Cardiac Electrical Activity', *Cardiovasc Res*, 108 (2015), 21-30.
- 33 R. Guinamard, A. Chatelier, M. Demion, D. Potreau, S. Patri, M. Rahmati, and P. Bois, 'Functional Characterization of a Ca(2+)-Activated Non-Selective Cation Channel in Human Atrial Cardiomyocytes', *J Physiol*, 558 (2004), 75-83.
- 34 R. Guinamard, M. Demion, C. Magaud, D. Potreau, and P. Bois, 'Functional Expression of the Trpm4 Cationic Current in Ventricular Cardiomyocytes from Spontaneously Hypertensive Rats', *Hypertension*, 48 (2006), 587-94.
- 35 R. Guinamard, T. Hof, and C. A. Del Negro, 'The Trpm4 Channel Inhibitor 9-Phenanthrol', *Br J Pharmacol*, 171 (2014), 1600-13.
- 36 R. Guinamard, L. Salle, and C. Simard, 'The Non-Selective Monovalent Cationic Channels Trpm4 and Trpm5', *Adv Exp Med Biol*, 704 (2011), 147-71.
- 37 O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth, 'Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches', *Pflugers Arch*, 391 (1981), 85-100.
- 38 C. Hartzell, I. Putzier, and J. Arreola, 'Calcium-Activated Chloride Channels', *Annu Rev Physiol*, 67 (2005), 719-58.
- 39 B. Hegyi, B. Horvath, K. Vaczi, M. Gonczi, K. Kistamas, F. Ruzsnavszky, R. Veress, L. T. Izu, Y. Chen-Izu, T. Banyasz, J. Magyar, L. Csernoch, P. P. Nanasi, and N. Szentandrassy, 'Ca(2+)-Activated Cl(-) Current Is Antiarrhythmic by Reducing Both Spatial and Temporal Heterogeneity of Cardiac Repolarization', *J Mol Cell Cardiol*, 109 (2017), 27-37.
- 40 J. Heijman, A. Zaza, D. M. Johnson, Y. Rudy, R. L. Peeters, P. G. Volders, and R. L. Westra, 'Determinants of Beat-to-Beat Variability of Repolarization Duration in the Canine Ventricular Myocyte: A Computational Analysis', *PLoS Comput Biol*, 9 (2013), e1003202.
- 41 Y. Hirayama, A. Kuruma, M. Hiraoka, and S. Kawano, 'Calcium-Activated Cl- Current Is Enhanced by Acidosis and Contributes to the Shortening of Action Potential Duration in Rabbit Ventricular Myocytes', *Jpn J Physiol*, 52 (2002), 293-300.
- 42 A. L. Hodgkin, and B. Katz, 'The Effect of Sodium Ions on the Electrical Activity of Giant Axon of the Squid', *J Physiol*, 108 (1949), 37-77.

- 43 T. Hof, L. Salle, L. Coulbault, R. Richer, J. Alexandre, R. Rouet, A. Manrique, and R. Guinamard, 'Trpm4 Non-Selective Cation Channels Influence Action Potentials in Rabbit Purkinje Fibres', *J Physiol*, 594 (2016), 295-306.
- 44 T. Hof, C. Simard, R. Rouet, L. Salle, and R. Guinamard, 'Implication of the Trpm4 Nonselective Cation Channel in Mammalian Sinus Rhythm', *Heart Rhythm*, 10 (2013), 1683-9.
- 45 B. Horvath, B. Hegyi, K. Kistamas, K. Vaczi, T. Banyasz, J. Magyar, N. Szentandrassy, and P. P. Nanasi, 'Cytosolic Calcium Changes Affect the Incidence of Early Afterdepolarizations in Canine Ventricular Myocytes', *Can J Physiol Pharmacol*, 93 (2015), 527-34.
- 46 B. Horvath, K. Vaczi, B. Hegyi, M. Gonczi, B. Dienes, K. Kistamas, T. Banyasz, J. Magyar, I. Baczko, A. Varro, G. Seprenyi, L. Csernoch, P. P. Nanasi, and N. Szentandrassy, 'Sarcolemmal Ca(2+)-Entry through L-Type Ca(2+) Channels Controls the Profile of Ca(2+)-Activated Cl(-) Current in Canine Ventricular Myocytes', *J Mol Cell Cardiol*, 97 (2016), 125-39.
- 47 F. Huang, X. Wong, and L. Y. Jan, 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Lxxxv: Calcium-Activated Chloride Channels', *Pharmacol Rev*, 64 (2012), 1-15.
- 48 H. V. Huikuri, A. Castellanos, and R. J. Myerburg, 'Sudden Death Due to Cardiac Arrhythmias', *N Engl J Med*, 345 (2001), 1473-82.
- 49 N. C. Janvier, S. O. McMorn, S. M. Harrison, P. Taggart, and M. R. Boyett, 'The Role of Na(+)-Ca²⁺ Exchange Current in Electrical Restitution in Ferret Ventricular Cells', *J Physiol*, 504 (Pt 2) (1997), 301-14.
- 50 D. Jeyaraj, S. M. Haldar, X. Wan, M. D. McCauley, J. A. Ripperger, K. Hu, Y. Lu, B. L. Eapen, N. Sharma, E. Ficker, M. J. Cutler, J. Gulick, A. Sanbe, J. Robbins, S. Demolombe, R. V. Kondratov, S. A. Shea, U. Albrecht, X. H. Wehrens, D. S. Rosenbaum, and M. K. Jain, 'Circadian Rhythms Govern Cardiac Repolarization and Arrhythmogenesis', *Nature*, 483 (2012), 96-9.
- 51 D. M. Johnson, J. Heijman, E. F. Bode, D. J. Greensmith, H. van der Linde, N. Abi-Gerges, D. A. Eisner, A. W. Trafford, and P. G. Volders, 'Diastolic Spontaneous Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum Increases Beat-to-Beat Variability of Repolarization in Canine Ventricular Myocytes after Beta-Adrenergic Stimulation', *Circ Res*, 112 (2013), 246-56.

- 52 D. M. Johnson, J. Heijman, C. E. Pollard, J. P. Valentin, H. J. Crijns, N. Abi-Gerges, and P. G. Volders, 'I(Ks) Restricts Excessive Beat-to-Beat Variability of Repolarization During Beta-Adrenergic Receptor Stimulation', *J Mol Cell Cardiol*, 48 (2010), 122-30.
- 53 N. K. Jurkiewicz, and M. C. Sanguinetti, 'Rate-Dependent Prolongation of Cardiac Action Potentials by a Methanesulfonanilide Class Iii Antiarrhythmic Agent. Specific Block of Rapidly Activating Delayed Rectifier K⁺ Current by Dofetilide', *Circ Res*, 72 (1993), 75-83.
- 54 M. Kecskes, G. Jacobs, S. Kerselaers, N. Syam, A. Menigoz, P. Vangheluwe, M. Freichel, V. Flockerzi, T. Voets, and R. Vennekens, 'The Ca(2+)-Activated Cation Channel Trpm4 Is a Negative Regulator of Angiotensin Ii-Induced Cardiac Hypertrophy', *Basic Res Cardiol*, 110 (2015), 43.
- 55 K. Kistamas, N. Szentandrassy, B. Hegyi, K. Vaczi, F. Ruzsnavszky, B. Horvath, T. Banyasz, P. P. Nanasi, and J. Magyar, 'Changes in Intracellular Calcium Concentration Influence Beat-to-Beat Variability of Action Potential Duration in Canine Ventricular Myocytes', *J Physiol Pharmacol*, 66 (2015), 73-81.
- 56 M. Kruse, E. Schulze-Bahr, V. Corfield, A. Beckmann, B. Stallmeyer, G. Kurtbay, I. Ohmert, E. Schulze-Bahr, P. Brink, and O. Pongs, 'Impaired Endocytosis of the Ion Channel Trpm4 Is Associated with Human Progressive Familial Heart Block Type I', *J Clin Invest*, 119 (2009), 2737-44.
- 57 P. Launay, A. Fleig, A. L. Perraud, A. M. Scharenberg, R. Penner, and J. P. Kinet, 'Trpm4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization', *Cell*, 109 (2002), 397-407.
- 58 A. Lee, S. T. Wong, D. Gallagher, B. Li, D. R. Storm, T. Scheuer, and W. A. Catterall, 'Ca²⁺/Calmodulin Binds to and Modulates P/Q-Type Calcium Channels', *Nature*, 399 (1999), 155-9.
- 59 M. Lemay, E. de Lange, and J. P. Kucera, 'Effects of Stochastic Channel Gating and Distribution on the Cardiac Action Potential', *J Theor Biol*, 281 (2011), 84-96.
- 60 C. Lengyel, A. Varro, K. Tabori, J. G. Papp, and I. Baczko, 'Combined Pharmacological Block of I(Kr) and I(Ks) Increases Short-Term Qt Interval Variability and Provokes Torsades De Pointes', *Br J Pharmacol*, 151 (2007), 941-51.
- 61 G. R. Li, J. Feng, L. Yue, and M. Carrier, 'Transmural Heterogeneity of Action Potentials and Ito1 in Myocytes Isolated from the Human Right Ventricle', *Am J Physiol*, 275 (1998), H369-77.

- 62 G. R. Li, H. Sun, J. To, H. F. Tse, and C. P. Lau, 'Demonstration of Calcium-Activated Transient Outward Chloride Current and Delayed Rectifier Potassium Currents in Swine Atrial Myocytes', *J Mol Cell Cardiol*, 36 (2004), 495-504.
- 63 Y. Li, P. Li, X. Wang, C. Karmakar, C. Liu, and C. Liu, 'Short-Term Qt Interval Variability in Patients with Coronary Artery Disease and Congestive Heart Failure: A Comparison with Healthy Control Subjects', *Med Biol Eng Comput*, 57 (2019), 389-400.
- 64 C. J. Lin, C. Y. Lin, C. H. Chen, B. Zhou, and C. P. Chang, 'Partitioning the Heart: Mechanisms of Cardiac Septation and Valve Development', *Development*, 139 (2012), 3277-99.
- 65 S. H. Litovsky, and C. Antzelevitch, 'Transient Outward Current Prominent in Canine Ventricular Epicardium but Not Endocardium', *Circ Res*, 62 (1988), 116-26.
- 66 D. W. Liu, G. A. Gintant, and C. Antzelevitch, 'Ionic Bases for Electrophysiological Distinctions among Epicardial, Midmyocardial, and Endocardial Myocytes from the Free Wall of the Canine Left Ventricle', *Circ Res*, 72 (1993), 671-87.
- 67 H. Liu, S. Chatel, C. Simard, N. Syam, L. Salle, V. Probst, J. Morel, G. Millat, M. Lopez, H. Abriel, J. J. Schott, R. Guinamard, and P. Bouvagnet, 'Molecular Genetics and Functional Anomalies in a Series of 248 Brugada Cases with 11 Mutations in the Trpm4 Channel', *PLoS One*, 8 (2013), e54131.
- 68 H. Liu, L. El Zein, M. Kruse, R. Guinamard, A. Beckmann, A. Bozio, G. Kurtbay, A. Megarbane, I. Ohmert, G. Blaysat, E. Villain, O. Pongs, and P. Bouvagnet, 'Gain-of-Function Mutations in Trpm4 Cause Autosomal Dominant Isolated Cardiac Conduction Disease', *Circ Cardiovasc Genet*, 3 (2010), 374-85.
- 69 J. Magyar, T. Banyasz, P. Szigligeti, A. Kortvely, A. Jednakovits, and P. P. Nanasi, 'Electrophysiological Effects of Bimocloamol in Canine Ventricular Myocytes', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 361 (2000), 303-10.
- 70 I. Mathar, G. Jacobs, M. Kecskes, A. Menigoz, K. Philippaert, and R. Vennekens, 'Trpm4', *Handb Exp Pharmacol*, 222 (2014), 461-87.
- 71 I. Mathar, M. Kecskes, G. Van der Mieren, G. Jacobs, J. E. Camacho Londono, S. Uhl, V. Flockerzi, T. Voets, M. Freichel, B. Nilius, P. Herijgers, and R. Vennekens, 'Increased Beta-Adrenergic Inotropy in Ventricular Myocardium from Trpm4^{-/-} Mice', *Circ Res*, 114 (2014), 283-94.

- 72 J. C. McGrath, G. B. Drummond, E. M. McLachlan, C. Kilkenny, and C. L. Wainwright, 'Guidelines for Reporting Experiments Involving Animals: The Arrive Guidelines', *Br J Pharmacol*, 160 (2010), 1573-6.
- 73 M. R. Mitchell, T. Powell, D. A. Terrar, and V. W. Twist, 'The Effects of Ryanodine, Egta and Low-Sodium on Action Potentials in Rat and Guinea-Pig Ventricular Myocytes: Evidence for Two Inward Currents During the Plateau', *Br J Pharmacol*, 81 (1984), 543-50.
- 74 M. Mori, T. Konno, T. Ozawa, M. Murata, K. Imoto, and K. Nagayama, 'Novel Interaction of the Voltage-Dependent Sodium Channel (Vdsc) with Calmodulin: Does Vdsc Acquire Calmodulin-Mediated Ca²⁺-Sensitivity?', *Biochemistry*, 39 (2000), 1316-23.
- 75 A. W. Mulvaney, C. I. Spencer, S. Culliford, J. J. Borg, S. G. Davies, and R. Z. Kozlowski, 'Cardiac Chloride Channels: Physiology, Pharmacology and Approaches for Identifying Novel Modulators of Activity', *Drug Discov Today*, 5 (2000), 492-505.
- 76 M. Naraghi, 'T-Jump Study of Calcium Binding Kinetics of Calcium Chelators', *Cell Calcium*, 22 (1997), 255-68.
- 77 S. Nattel, and X. Y. Qi, 'Calcium-Dependent Potassium Channels in the Heart: Clarity and Confusion', *Cardiovasc Res*, 101 (2014), 185-6.
- 78 B. Nilius, F. Mahieu, J. Prenen, A. Janssens, G. Owsianik, R. Vennekens, and T. Voets, 'The Ca²⁺-Activated Cation Channel Trpm4 Is Regulated by Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate', *Embo j*, 25 (2006), 467-78.
- 79 B. Nilius, J. Prenen, T. Voets, and G. Droogmans, 'Intracellular Nucleotides and Polyamines Inhibit the Ca²⁺-Activated Cation Channel Trpm4b', *Pflugers Arch*, 448 (2004), 70-5.
- 80 János Magyar Norbert Szentandrásy, Péter Pál Nánási, 'Electrical Inhomogeneity in Mammalian Ventricular Myocardium', in *Advances in Cardiomyocyte Research*, ed. by Péter Pál Nánási (Transworld Research Network, Kerala, 2009), pp. 76-79.
- 81 M. Ogawa, S. F. Lin, J. N. Weiss, and P. S. Chen, 'Calcium Dynamics and Ventricular Fibrillation', *Circ Res*, 102 (2008), e52.
- 82 A. Orosz, I. Bacsko, S. Nyiraty, A. E. Korei, Z. Putz, R. Takacs, A. Nemes, T. T. Varkonyi, L. Balogh, G. Abraham, P. Kempler, J. G. Papp, A. Varro, and C. Lengyel, 'Increased Short-Term Beat-to-Beat Qt Interval Variability in Patients with Impaired Glucose Tolerance', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8 (2017), 129.

- 83 M. Pasek, J. Simurda, and C. H. Orchard, 'Effect of Ca²⁺ Efflux Pathway Distribution and Exogenous Ca²⁺ Buffers on Intracellular Ca²⁺ Dynamics in the Rat Ventricular Myocyte: A Simulation Study', *Biomed Res Int*, 2014 (2014), 920208.
- 84 N. Pedemonte, and L. J. Galletta, 'Structure and Function of Tmem16 Proteins (Anoctamins)', *Physiol Rev*, 94 (2014), 419-59.
- 85 K. Petrukhin, M. J. Koisti, B. Bakall, W. Li, G. Xie, T. Marknell, O. Sandgren, K. Forsman, G. Holmgren, S. Andreasson, M. Vujic, A. A. Bergen, V. McGarty-Dugan, D. Figueroa, C. P. Austin, M. L. Metzker, C. T. Caskey, and C. Wadelius, 'Identification of the Gene Responsible for Best Macular Dystrophy', *Nat Genet*, 19 (1998), 241-7.
- 86 E. Pueyo, A. Corrias, L. Virag, N. Jost, T. Szel, A. Varro, N. Szentandrassy, P. P. Nanasi, K. Burrage, and B. Rodriguez, 'A Multiscale Investigation of Repolarization Variability and Its Role in Cardiac Arrhythmogenesis', *Biophys J*, 101 (2011), 2892-902.
- 87 Z. Qu, L. H. Xie, R. Olcese, H. S. Karagueuzian, P. S. Chen, A. Garfinkel, and J. N. Weiss, 'Early Afterdepolarizations in Cardiac Myocytes: Beyond Reduced Repolarization Reserve', *Cardiovasc Res*, 99 (2013), 6-15.
- 88 B. D. Quednau, D. A. Nicoll, and K. D. Philipson, 'Tissue Specificity and Alternative Splicing of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Isoforms Ncx1, Ncx2, and Ncx3 in Rat', *Am J Physiol*, 272 (1997), C1250-61.
- 89 M. C. Sanguinetti, and R. S. Kass, 'Voltage-Dependent Block of Calcium Channel Current in the Calf Cardiac Purkinje Fiber by Dihydropyridine Calcium Channel Antagonists', *Circ Res*, 55 (1984), 336-48.
- 90 M. C. Sanguinetti, D. S. Krafte, and R. S. Kass, 'Voltage-Dependent Modulation of Ca Channel Current in Heart Cells by Bay K8644', *J Gen Physiol*, 88 (1986), 369-92.
- 91 C. Simard, T. Hof, Z. Keddache, P. Launay, and R. Guinamard, 'The Trpm4 Non-Selective Cation Channel Contributes to the Mammalian Atrial Action Potential', *J Mol Cell Cardiol*, 59 (2013), 11-9.
- 92 C. Simard, L. Salle, R. Rouet, and R. Guinamard, 'Transient Receptor Potential Melastatin 4 Inhibitor 9-Phenanthrol Abolishes Arrhythmias Induced by Hypoxia and Re-Oxygenation in Mouse Ventricle', *Br J Pharmacol*, 165 (2012), 2354-64.
- 93 K. R. Sipido, G. Callewaert, and E. Carmeliet, '[Ca²⁺]I Transients and [Ca²⁺]I-Dependent Chloride Current in Single Purkinje Cells from Rabbit Heart', *J Physiol*, 468 (1993), 641-67.

- 94 ———, 'Inhibition and Rapid Recovery of Ca²⁺ Current During Ca²⁺ Release from Sarcoplasmic Reticulum in Guinea Pig Ventricular Myocytes', *Circ Res*, 76 (1995), 102-9.
- 95 S. Sorota, M. S. Siegal, and B. F. Hoffman, 'The Isoproterenol-Induced Chloride Current and Cardiac Resting Potential', *J Mol Cell Cardiol*, 23 (1991), 1191-8.
- 96 B. Stallmeyer, S. Zumhagen, I. Denjoy, G. Duthoit, J. L. Hebert, X. Ferrer, S. Maugenre, W. Schmitz, U. Kirchhefer, E. Schulze-Bahr, P. Guicheney, and E. Schulze-Bahr, 'Mutational Spectrum in the Ca(2+)-Activated Cation Channel Gene Trpm4 in Patients with Cardiac Conductance Disturbances', *Hum Mutat*, 33 (2012), 109-17.
- 97 H. Sun, T. Tsunenari, K. W. Yau, and J. Nathans, 'The Vitelliform Macular Dystrophy Protein Defines a New Family of Chloride Channels', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002), 4008-13.
- 98 N. Syam, J. S. Rougier, and H. Abriel, 'Glycosylation of Trpm4 and Trpm5 Channels: Molecular Determinants and Functional Aspects', *Front Cell Neurosci*, 8 (2014), 52.
- 99 G. Szabo, N. Szentandrassy, T. Biro, B. I. Toth, G. Czifra, J. Magyar, T. Banyasz, A. Varro, L. Kovacs, and P. P. Nanasi, 'Asymmetrical Distribution of Ion Channels in Canine and Human Left-Ventricular Wall: Epicardium Versus Midmyocardium', *Pflugers Arch*, 450 (2005), 307-16.
- 100 N. Szentadrassy, T. Banyasz, T. Biro, G. Szabo, B. I. Toth, J. Magyar, J. Lazar, A. Varro, L. Kovacs, and P. P. Nanasi, 'Apico-Basal Inhomogeneity in Distribution of Ion Channels in Canine and Human Ventricular Myocardium', *Cardiovasc Res*, 65 (2005), 851-60.
- 101 N. Szentandrassy, K. Kistamas, B. Hegyi, B. Horvath, F. Ruzsnavszky, K. Vaczi, J. Magyar, T. Banyasz, A. Varro, and P. P. Nanasi, 'Contribution of Ion Currents to Beat-to-Beat Variability of Action Potential Duration in Canine Ventricular Myocytes', *Pflugers Arch*, 467 (2015), 1431-43.
- 102 N. Szentandrassy, F. Papp, B. Hegyi, A. Bartok, Z. Krasznai, and P. P. Nanasi, 'Tetrodotoxin Blocks Native Cardiac L-Type Calcium Channels but Not Cav1.2 Channels Expressed in Hek Cells', *J Physiol Pharmacol*, 64 (2013), 807-10.
- 103 G. Szigeti, Z. Rusznak, L. Kovacs, and Z. Papp, 'Calcium-Activated Transient Membrane Currents Are Carried Mainly by Chloride Ions in Isolated Atrial, Ventricular and Purkinje Cells of Rabbit Heart', *Exp Physiol*, 83 (1998), 137-53.

- 104 H. L. Tan, S. Kupersmidt, R. Zhang, S. Stepanovic, D. M. Roden, A. A. Wilde, M. E. Anderson, and J. R. Balser, 'A Calcium Sensor in the Sodium Channel Modulates Cardiac Excitability', *Nature*, 415 (2002), 442-7.
- 105 Q. Tang, M. W. Jin, J. Z. Xiang, M. Q. Dong, H. Y. Sun, C. P. Lau, and G. R. Li, 'The Membrane Permeable Calcium Chelator Bapta-Am Directly Blocks Human Ether a-Go-Go-Related Gene Potassium Channels Stably Expressed in Hek 293 Cells', *Biochem Pharmacol*, 74 (2007), 1596-607.
- 106 R. M. ter Bekke, and P. G. Volders, 'Arrhythmogenic Mechano-Electric Heterogeneity in the Long-Qt Syndrome', *Prog Biophys Mol Biol*, 110 (2012), 347-58.
- 107 G. P. Thomas, U. Gerlach, and C. Antzelevitch, 'Hmr 1556, a Potent and Selective Blocker of Slowly Activating Delayed Rectifier Potassium Current', *J Cardiovasc Pharmacol*, 41 (2003), 140-7.
- 108 M. B. Thomsen, S. C. Verduyn, M. Stengl, J. D. Beekman, G. de Pater, J. van Opstal, P. G. Volders, and M. A. Vos, 'Increased Short-Term Variability of Repolarization Predicts D-Sotalol-Induced Torsades De Pointes in Dogs', *Circulation*, 110 (2004), 2453-9.
- 109 D. Tuteja, D. Xu, V. Timofeyev, L. Lu, D. Sharma, Z. Zhang, Y. Xu, L. Nie, A. E. Vazquez, J. N. Young, K. A. Glatzer, and N. Chiamvimonvat, 'Differential Expression of Small-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Sk1, Sk2, and Sk3 in Mouse Atrial and Ventricular Myocytes', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289 (2005), H2714-23.
- 110 K. Vaczi, B. Hegyi, F. Ruzsnavszky, K. Kistamas, B. Horvath, T. Banyasz, P. P. Nanasi, N. Szentandrassy, and J. Magyar, '9-Anthracene Carboxylic Acid Is More Suitable Than Dids for Characterization of Calcium-Activated Chloride Current During Canine Ventricular Action Potential', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 388 (2015), 87-100.
- 111 A. Varro, and I. Baczko, 'Possible Mechanisms of Sudden Cardiac Death in Top Athletes: A Basic Cardiac Electrophysiological Point of View', *Pflugers Arch*, 460 (2010), 31-40.
- 112 A. Varro, and J. G. Papp, 'The Impact of Single Cell Voltage Clamp on the Understanding of the Cardiac Ventricular Action Potential', *Cardioscience*, 3 (1992), 131-44.

- 113 A. O. Verkerk, H. L. Tan, J. H. Kirkels, and J. H. Ravesloot, 'Role of Ca²⁺-Activated Cl⁻ Current During Proarrhythmic Early Afterdepolarizations in Sheep and Human Ventricular Myocytes', *Acta Physiol Scand*, 179 (2003), 143-8.
- 114 A. O. Verkerk, H. L. Tan, and J. H. Ravesloot, 'Ca²⁺-Activated Cl⁻ Current Reduces Transmural Electrical Heterogeneity within the Rabbit Left Ventricle', *Acta Physiol Scand*, 180 (2004), 239-47.
- 115 A. O. Verkerk, M. W. Veldkamp, L. N. Bouman, and A. C. van Ginneken, 'Calcium-Activated Cl⁽⁻⁾ Current Contributes to Delayed Afterdepolarizations in Single Purkinje and Ventricular Myocytes', *Circulation*, 101 (2000), 2639-44.
- 116 P. G. Volders, A. Kulcsar, M. A. Vos, K. R. Sipido, H. J. Wellens, R. Lazzara, and B. Szabo, 'Similarities between Early and Delayed Afterdepolarizations Induced by Isoproterenol in Canine Ventricular Myocytes', *Cardiovasc Res*, 34 (1997), 348-59.
- 117 P. G. Volders, K. R. Sipido, E. Carmeliet, R. L. Spatjens, H. J. Wellens, and M. A. Vos, 'Repolarizing K⁺ Currents Ito1 and Iks Are Larger in Right Than Left Canine Ventricular Midmyocardium', *Circulation*, 99 (1999), 206-10.
- 118 M. Warren, J. F. Huizar, A. G. Shvedko, and A. V. Zaitsev, 'Spatiotemporal Relationship between Intracellular Ca²⁺ Dynamics and Wave Fragmentation During Ventricular Fibrillation in Isolated Blood-Perfused Pig Hearts', *Circ Res*, 101 (2007), e90-101.
- 119 C. R. Weber, V. Piacentino, 3rd, K. S. Ginsburg, S. R. Houser, and D. M. Bers, 'Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ Exchange Current and Submembrane [Ca⁽²⁺⁾] During the Cardiac Action Potential', *Circ Res*, 90 (2002), 182-9.
- 120 J. Weissenburger, V. V. Nesterenko, and C. Antzelevitch, 'Transmural Heterogeneity of Ventricular Repolarization under Baseline and Long Qt Conditions in the Canine Heart in Vivo: Torsades De Pointes Develops with Halothane but Not Pentobarbital Anesthesia', *J Cardiovasc Electrophysiol*, 11 (2000), 290-304.
- 121 L. Yao, P. Li, C. Liu, Y. Hou, C. Yan, L. Li, K. Li, X. Wang, A. Deogire, C. Du, H. Zhang, J. Wang, and H. Li, 'Comparison of Qt Interval Variability of Coronary Patients without Myocardial Infarction with That of Patients with Old Myocardial Infarction', *Comput Biol Med*, 113 (2019), 103396.
- 122 Z. Ye, M. M. Wu, C. Y. Wang, Y. C. Li, C. J. Yu, Y. F. Gong, J. Zhang, Q. S. Wang, B. L. Song, K. Yu, H. C. Hartzell, D. D. Duan, D. Zhao, and Z. R. Zhang, 'Characterization of Cardiac Anoctamin1 Ca⁽²⁺⁾-Activated Chloride Channels and

- Functional Role in Ischemia-Induced Arrhythmias', *J Cell Physiol*, 230 (2015), 337-46.
- 123 A. Younes, A. E. Lyashkov, D. Graham, A. Sheydina, M. V. Volkova, M. Mitsak, T. M. Vinogradova, Y. O. Lukyanenko, Y. Li, A. M. Ruknudin, K. R. Boheler, J. van Eyk, and E. G. Lakatta, 'Ca²⁺ -Stimulated Basal Adenylyl Cyclase Activity Localization in Membrane Lipid Microdomains of Cardiac Sinoatrial Nodal Pacemaker Cells', *J Biol Chem*, 283 (2008), 14461-8.
- 124 Antonio Zaza, 'An Introduction to Cardiac Cellular Electrophysiology', (Harwood Academic Publishers, Newark, 2000), pp. 59-82.
- 125 Y. Zhang, J. B. Stanton, J. Wu, K. Yu, H. C. Hartzell, N. S. Peachey, L. Y. Marmorstein, and A. D. Marmorstein, 'Suppression of Ca²⁺ Signaling in a Mouse Model of Best Disease', *Hum Mol Genet*, 19 (2010), 1108-18.
- 126 A. C. Zygmunt, 'Intracellular Calcium Activates a Chloride Current in Canine Ventricular Myocytes', *Am J Physiol*, 267 (1994), H1984-95.
- 127 A. C. Zygmunt, and W. R. Gibbons, 'Calcium-Activated Chloride Current in Rabbit Ventricular Myocytes', *Circ Res*, 68 (1991), 424-37.
- 128 A. C. Zygmunt, R. J. Goodrow, and C. M. Weigel, 'I_h and I_{cl}(Ca) Contribute to Isoproterenol-Induced Delayed after Depolarizations in Midmyocardial Cells', *Am J Physiol*, 275 (1998), H1979-92.
- 129 A. C. Zygmunt, D. C. Robitelle, and G. T. Eddlestone, 'I_{to1} Dictates Behavior of I_{cl}(Ca) During Early Repolarization of Canine Ventricle', *Am J Physiol*, 273 (1997), H1096-106.

12. Saját közlemények listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Horváth, B., Szentandrassy, N., **Veress, R.**, Baranyai, D., Kistamás, K., Almássy, J., Tóth, A., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P.: Effect of the intracellular calcium concentration chelator BAPTA acetoxymethyl ester on action potential duration in canine ventricular myocytes.
J. Physiol. Pharmacol. 69 (1), 99-107, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.26402/jpp.2018.1.11>
IF: 2.544
2. **Veress, R.**, Baranyai, D., Hegyi, B., Kistamás, K., Dienes, C., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrassy, N., Horváth, B.: Transient receptor potential melastatin 4 channel inhibitor 9-phenanthrol inhibits K⁺ but not Ca²⁺ currents in canine ventricular myocytes.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 96 (10), 1022-1029, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2018-0049>
IF: 2.041
3. Hegyi, B., Horváth, B., Váczi, K., Gönczi, M., Kistamás, K., Ruzsnavszky, F., **Veress, R.**, Izu, L. T., Chen-Izu, Y., Bányász, T., Magyar, J., Csernoch, L., Nánási, P. P., Szentandrassy, N.: Ca²⁺-activated Cl⁻ current is antiarrhythmic by reducing both spatial and temporal heterogeneity of cardiac repolarization.
J. Mol. Cell. Cardiol. 109, 27-37, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.06.014>
IF: 5.296





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,448

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

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

Debrecen, 2019.09.02.



13. Tárgyszavak

Ca²⁺-aktivált Cl⁻ áram
TMEM16A
Bestrophin-3
repolarizáció térbeli heterogenitása
repolarizáció rövidtávú variabilitása
korai utódepolarizáció
kalcium kelátorok
intracelluláris kalcium koncentráció
akciós potenciál időtartam
szív ion áramok
9-phenanthrol
TRPM4 csatornák
szív akciós potenciálok
kutya kamrai szívizomsejtek

14. Keywords

Ca²⁺-activated Cl⁻ current
TMEM16A
Bestrophin-3
spatial heterogeneity of repolarization
short-term variability of repolarization
early afterdepolarization
calcium chelators
intracellular calcium concentration
action potential duration
cardiac ion currents
9-phenanthrol
TRPM4 channels
cardiac action potentials
canine ventricular myocytes

15. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Horváth Baláznak a szakmai és emberi segítséget, a belém fektetett bizalmat és rengeteg élményt, amit az elmúlt években kaptam tőle.

Köszönettel tartozom a Szívelektrofiziológiai Laboratórium vezetőjének, Prof. Dr. Nánási Péternek a hatékony munkavégzés feltételeinek biztosításáért, valamint a rengeteg segítségéért. A hasznos tanácsokért és bátorításért, Prof. Dr. Bányász Tamásnak és Prof. Dr. Magyar Jánosnak fejezem ki hálámat. Köszönöm Dr. Szentandrassy Norbertnek a rengeteg fáradozást, tanácsot, és hogy mindig figyelemmel kísérte a munkámat.

Hálával tartozom a munkacsoportunk korábbi PhD hallgatóinak, Dr. Hegyi Bencének, Dr. Kistamás Kornélnak, Dr. Ruzsnavszky Ferencnek és Dr. Váczi Krisztinának, akik tanácsokkal láttak el az évek során és munkájukkal segítettek.

Az évek során számos kimagaslóan tehetséges, odaadó és szorgalmas TDK hallgatóval dolgozhattam együtt. Hálásan köszönöm Kovács Zsigmond, Kurtán Bettina, és Lee Yongjin munkáját. A tudomány iránt elkötelezett TDK hallgatók egy része jelenleg már PhD hallgatótársam. Köszönettel tartozom Baranyai Dórának, Dr. Hézső Tamásnak, Dr. Dienes Csabának és Dr. Kiss Dénesnek a kialakított kellemes légkörért, jó hangulatért és segítségért. A kísérletek előkészítése során segítséget nyújtott és derűs légkört teremtett Sági Éva. A munkacsoportom minden tagja mind szakmai, mind emberi szempontból fontos példát mutatott számomra, amire kutatói pályámon szeretnék emlékezni.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, aki 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 megköszönöm barátnőmnek, Perger Fruzsínának, családomnak és barátaimnak a türelmet, megértést és támogatást.

A kísérletes munka kivitelezéséhez „Szív- és vázizom-kutatások az alkalmazkodás, regeneráció és teljesítőkéesség javítása érdekében (MYOTeam)” című GINOP 2.3.2-15-2016-00040, a „LIVE LONGER - Modern orvostudományi diagnosztikus eljárások és terápiák fejlesztése transzlációs megközelítésben: a laboratóriumtól a betegágyig” című EFOP-3.6.2-16-2017-00006 és „Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerészeti tudományos műhelyeinek fejlesztése” című EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 nyújtott támogatást. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

16. Függelék

Az értekezést megalapozó közlemények gyűjteménye