

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Adrenerg stimuláció hatása a szívizomsejtek akciós potenciáljára,
és az őket kialakító ionáramokra**

Dr. Ruzsnavszky Ferenc

Témavezető: Prof. Dr. Magyar János



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2014

Adrenerg stimuláció hatása a szívizomsejtek akciós potenciáljára, és az őket kialakító ionáramokra

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

Írta: Dr. Ruzsnavszky Ferenc okleveles orvos

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

Témavezető: Prof. Dr. Magyar János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Dr. Fülöp László, PhD
Dr. Virág László, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
2014. szeptember 30. 11:00 óra.

Az értekezés bírálói:

Dr. Jost Norbert László, PhD
Dr. Juhász Béla, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Dr. Jost Norbert László, PhD
Dr. Juhász Béla, PhD
Dr. Fülöp László, PhD
Dr. Virág László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK Belgyógyászati Intézet
„A épület” tanterme
2014. szeptember 30. 13:00 óra.

Bevezetés

A szívizomszövet adrenerg aktivációja az emlősszív egyik legfontosabb adaptációs mechanizmusa. Ezt a hatást elsősorban β -adrenerg receptorok, és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli útvonalak közvetítik.

Az adrenerg aktivációra kifejlődő jól ismert pozitív tróphatásokat megelőzően több ionáram is jelentősen fokozódik kamrai szívizomsejteken, így az L-típusú kalciumáram, ($I_{Ca,L}$) a késői egyenirányító káliumáram lassú (I_{Ks}) és gyors (I_{Kr}) komponense.

Annak ellenére, hogy a β -adrenerg aktiváció szívizomra kifejtett hatása tankönyvi adat, keveset tudunk az izoproterenol I_{Kr} és I_{Ks} fokozásának kinetikájáról, ugyanakkor a kálium- és kalciumáramok egymáshoz viszonyított időbeli aktivációja fontos szerepet játszhat az adrenerg aktiváció proaritmiás veszélyének létrehozásában.

Az adrenerg stimulációra bekövetkező akciós potenciál (AP) változások sem kellően dokumentáltak, és jelentős eltérések vannak a különböző speciesek között. Az akciós potenciál időtartama (APD) nő pl. sertés, patkány és tengerimalac kamrai szívizomsejteken, míg az APD csökken nyúl, kutya, macska és humán preparátumokon.

Az eltérő β -adrenerg válasz hátterében a különböző speciesekben az eltérő AP-morfológia állhat, amit a nem azonos mértékben expresszálandó ionáramok okoznak. Kíváncsiak voltunk, hogy miként befolyásolja a kalcium- és a késői káliumáram komponenseit a β -adrenerg stimuláció, valamint az I_{Kr} szerepére az adrenerg stimuláció okozta kalciumáram-növekedés ellensúlyozásában. Megvizsgáltuk és összehasonlítottuk az I_{Kr} , I_{Ks} és I_{Ca} áramok időbeli aktivációját. A mérések során az áramok amplitúdóinak változása mellett a β -adrenerg válasz kinetikai sajátosságait is vizsgáltuk.

A β -adrenerg stimuláció hatásait az AP-konfigurációra akciós potenciál mérésekkel, feszültség-clamp és akciós potenciál feszültség clamp módszerekkel vizsgáltuk kutya kamrai izolált szívizomsejteken. A β -adrenerg receptorok

aktiválására izoproterenolt (ISO) alkalmaztunk. Az AP morfológiájának szerepét epi-, és endokardiális eredetű kutya kamrai sejtek segítségével vizsgáltuk, emellett midmiokardiális sejtek AP-ját az endokardiális sejtekéhez hasonlóvá alakítottuk az I_{to} káliumkomponensének gátlásával. Az AP morfológiájának vizsgálata során a platópotenciál emelkedését, és az akciós potenciál időtartamának rövidülését vizsgáltuk – az előbbi paramétert a kalcium, az utóbbit pedig az I_{Kr} és I_{Ks} áramok markerének tekintettük. Az AP-mérések során kitértünk a változások frekvenciafüggésének vizsgálatára is, és megkerestük a hatást közvetítő β receptor altípust is. A kutya kamrai szívműködősejtek vizsgálatának fontosságát az támasztja alá, hogy a kutya kardiomiociták ionáramai az emberéhez nagyon hasonlóak.

Célkitűzés

Számos kutató vizsgálta már az adrenerg aktiváció szívre kifejtett hatását. A nagyszámú közölt adat ellenére a β -adrenerg aktiváció egyes részletei még mindig feltáratlanok és ellentmondásosak. Ezért célul tűztük ki, hogy kutya kamrai szívműködősejteken megvizsgáljuk a β -adrenerg stimuláció hatását:

- az akciós potenciál morfológiájára epi-, mid- és endokardiális sejteken,
- az akciós potenciál változások frekvencia-függését.

Vizsgáltuk

- az egyes ionáramok (I_{Ks} , I_{Kr} , I_{Ca}) szerepét a β -adrenerg stimulusra adott válaszban,
- az egyes ionáramok szerepét az adaptáció során,
- az ionáram-változások időbeli kialakulását a stimulus során,
- a hatások közvetítéséért felelős β -adrenerg receptort.

Anyagok és módszerek

Kutya bal kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával, enzimatis emésztéssel nyertük. A módszer lényege, hogy a mellkas megnyitása után a szívet gyorsan kiemeltük, és a bal elülső leszálló koronária ágat kanüláltuk. Az artéria vérellátási területének megfelelően Langendorff apparátus segítségével perfundáltuk a miokardiumot. A preparátumot megközelítőleg 25 percig perfundáltuk kollagenázzal, albuminnal és CaCl_2 -dal kiegészített JMM „emésztő” oldattal. Az emésztőoldattal történő perfúzió végén a bal kamra falának midmiokardiális rétegét apró darabokra vágtuk, és az elfolyósodott szövetdarabokat $50\text{ }\mu\text{M}$ kalciumot tartalmazó módosított JMM oldatban szuszpendáltuk. Egyes kísérleteinknél a bal kamrai epi-, illetve endokardiális rétegeket használtuk fel, ebben az esetben az emésztés végén a kamrafal legkülső, illetve legbelső vékony rétegét vágtuk le, és szuszpendáltuk JMM oldatban. Felhasználásig a sejteket $14\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk, Minimum Essential Medium Eagle oldatban

Elektrofiziológiai mérések izolált sejteken

Kísérleteink során a szívizomsejteket 1 ml térfogatú plexiüveg mérőkádba helyeztük. A kádban levő szívizomsejteket $37\text{ }^\circ\text{C}$ -os Tyrode oldattal perfundáltuk. A mérések során a Tyrode oldatot kiegészítettük a megfelelő ioncsatorna-gátló szerekkel, illetve a vizsgált jelátviteli útvonalakat befolyásoló molekulákkal.

Akciós potenciál mérések

Az izolált szívizomsejtek transzmembrán potenciáljait 3 M KCl oldattal töltött boroszilikát mikroelektrodákkal regisztráltuk, melyek ellenállása 20–40 M Ω volt. A sejteket folyamatosan 1 Hz frekvenciával, 1 ms szélességű négyszögimpulzusok alkalmazásával ingereltük, melyek amplitúdóját az ingerküszöb 110–120%-ára állítottuk.

Feszültség-clamp mérések

A feszültség-clamp és akciós potenciál feszültség-clamp mérésekhez 1,5-2,5 M Ω ellenállású boroszilikát mikroelektrodákat használtunk. A szívizomsejteken mérhető ionáramokat farmakológiai és kinetikai sajátásaik alapján különítettük el. Az árammérések a patch-clamp technika egész sejtes konfigurációjában történtek.

Az akciós potenciál clamp a feszültség-clamp technika egy speciális módja, ahol parancsjelként a sejt saját akciós potenciálját alkalmazzuk. Az akciós potenciál clamp technika alkalmazása során a fiziológias állapotot a lehető legjobban megközelítő feltételeket biztosíthatjuk a sejtek számára. Ezen kísérletek során áram-clamp üzemmódban rögzítettük a normál Tyrode oldatban tartott sejtek akciós potenciálját, majd feszültség-clamp üzemmódra kapcsolva ezeket az AP-kat használtuk ugyanazon a sejten feszültségparancsként.

Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei $\pm$ a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos variancia-analízist, melyet Bonferroni-teszt követett, vagy Student-féle kétmintás t-próbát, illetve önkontrollos t-próbát alkalmaztunk az adott

statisztikai kérdéseknek megfelelően. Az adatok közötti korrelációk meghatározásához lineáris regressziót használtuk. Az eltéréseket $p \leq 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Izoproterenol hatása az AP morfológiára

A nem szelektív β -adrenerg receptor agonista izoproterenol hatására két karakterisztikus változás jött létre kutya kamrai midmiokardiális sejtek akciós potenciálján. Egyrészt emeli, vagyis pozitívabb membránpotenciálok irányába mozdítja el az akciós potenciál platóját, másrészt rövidíti az akciós potenciál teljes időtartamát.

Az ISO dóziszfüggő hatásának tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a $215 \pm 9,1$ ms hosszú kontroll akciós potenciálokat 1 nM izoproterenol $201,7 \pm 9,2$ ms-ra, 10 nM izoproterenol $195,6 \pm 6,6$ ms-ra, 100 nM izoproterenol pedig $201,6 \pm 6,1$ ms-ra rövidítette ($n=9$, $p < 0,05$). Ugyanekkor a platópotenciál a kontroll $-3,3 \pm 2$ mV értékről 1 nM ISO hatására $2,05 \pm 2,5$ mV-tal, 10 nM ISO esetén $14,7 \pm 2,3$ mV-tal, és 100 nM ISO alkalmazása során 22 ± 2 mV-tal emelkedett. Mind a repolarizáció 90%-ánál mért AP-időtartam (APD_{90}), mind a platópotenciál változás is szignifikáns volt 10-100 nM izoproterenol koncentráció tartományban ($p < 0,05$, $n=9$). Az izoproterenol hatása reverzibilis volt.

Az izoproterenol hatása függ az AP morfológiájától és az ingerlési frekvenciától

A különböző fajok eltérő AP-morfológiája részben magyarázhatja az adrenerg stimuláció már említett fajfüggő AP-időtartam változásait. Emellett a kamrai

szívizomzat AP-jának transzmurális inhomogenitása az egyes szívizomrétegekben szintén hozzájárulhat az eltérő eredményekhez. Az akciós potenciál kiindulási morfológiájának szerepe nem kizárható az adrenerg stimuláció által kiváltott hatások esetén, ezért vizsgáltunk az izoproterenol hatását különböző transzmurális régiókból származó sejteken is. A sejt származási helye önmagában nem biztosíték annak epi-, mid- vagy endokardiális jellegére, de az akciós potenciál morfológiájával együtt vizsgálva az egyes sejtek besorolása egyértelmű volt. Munkacsoportunk korábbi kutatásai során kimutatta, hogy a szívizom akciós potenciáljának időtartama fordított frekvenciafüggést mutat, azaz alacsonyabb ingerlési frekvencia mellett az AP időtartama megnyúlik, míg rövidebb ciklusidő esetén megrövidül, ezért megvizsgáltuk, hogy az ingerlési frekvencia miként befolyásolja az izoproterenol hatását. Az ingerlési frekvenciát a kísérletek során 0,2 és 3 Hz között változtattuk. Egy adott frekvencián a Tyrode-oldatban mért akciós potenciál időtartamát tekintettük kontrollnak, és ehhez a kiindulási időtartamhoz viszonyítottuk az ISO hatására bekövetkező APD₉₀ változást.

Midmiokardiális sejteken az ISO okozta AP-rövidülés fordított frekvenciafüggőnek bizonyult, a legnagyobb változást alacsony frekvenciáknál, és a leghosszabb kontroll AP esetében tapasztaltuk (n=6).

Megállapítottuk, hogy epikardiális sejteken – a midmiokardiumból származó sejtekhez hasonlóan – az ISO pozitív irányba mozdította el a platópotenciálokat, emellett frekvenciafüggő módon rövidítette az AP időtartamát. Ugyanekkor az endokardiális sejtek esetén az adrenerg stimuláció nem rövidítette szignifikáns mértékben az akciós potenciál időtartamát.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az általunk megfigyelt változások mennyiben függenek az első fázis amplitúdójától, hiszen az epikardiális és endokardiális AP-k között ez az egyik legszembetűnőbb különbség. Az első fázis szerepének tisztázásához midmiokardiális sejteken 1 mM 4-aminopyridinnel gátoltuk az I_{to}-t, ennek hatására a midmiokardiális sejtek akciós

potenciálja az endokardiális sejtekéhez vált hasonlóvá. Az ilyen módon megváltoztatott AP-k hossza az ISO kezelés hatására egyetlen vizsgált frekvencián sem csökkent. Ebből arra következtettünk, hogy a β -adrenerg stimuláció akciós potenciál időtartamának rövidítő hatásához szükséges az AP úgynevezett „*spike and dome*” konfigurációja.

Az izoproterenol módosító hatásában részt vevő ionáramok azonosítása

A β -adrenerg stimulus során számos ioncsatorna-fehérje foszforilálódik, ezáltal növelve a csatornán átfolyó ionáram amplitúdóját. Az izoproterenol által befolyásolt áramok közül az L-típusú kalciumáram növelése régóta ismert. Emellett a késői káliumáram komponenseinek, különösen az I_{Kr} -nek tulajdonítanak jelentős szerepet az AP időtartamának meghatározásában. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a késői káliumáram lassú komponense is megnövekszik β -adrenerg stimulusra. Kísérleteinkben ezért vizsgáltuk az I_{Ca} , az I_{Kr} és I_{Ks} áramok szerepét az ISO válasz kialakulásában.

Bal kamrai midmiokardiális sejteken vizsgáltuk, hogy az I_{Kr} , I_{Ks} , valamint az I_{Ca} előzetes gátlása hogyan módosítja az adrenerg stimuláció hatását. Az eredményeket a csak izoproterenol jelenlétében, 1 Hz frekvencián mért eredményekhez hasonlítottuk, ahol az ISO $6,8 \pm 0,9$ mV-os platónövekedést, és $20,4 \pm 5,8$ ms-os APD₉₀-rövidülést okozott.

Az I_{Kr} előzetes blokkolására 1 μ M E-4031-et használtunk, ami szignifikánsan nyújtotta az akciós potenciál időtartamát, majd a sejteket 10 nM ISO és 1 μ M E-4031-el perfundáltuk. A kísérlet végén az izoproterenolt kimostuk a rendszerből.

Megállapítottuk, hogy az I_{Kr} előzetes gátlása nem befolyásolta az izoproterenol akciós potenciált módosító hatását; az akciós potenciál időtartama rövidült, és a platópotenciál is emelkedett az E-4031et tartalmazó kontrollhoz képest. A kísérletet nyolc sejten elvégezve azt tapasztaltuk, hogy E-4031 és ISO jelenlétében kapott APD₉₀ rövidülés ($19,1 \pm 8,4$ ms), és a platópotenciál

emelkedése ($6,12 \pm 0,8$ mV) is közel azonos mértékűek voltak a gátlószer nélküli Tyrode oldatban elértekkel.

Az I_{Ks} gátlására $10 \mu\text{M}$ HMR-1556-t használtunk. A HMR-1556 önmagában alig befolyásolta az AP paramétereit, azonban ISO hatására a platópotenciál szignifikáns növelése mellett az APD a várakozásainkkal ellentétben nem csökkent, hanem $16,6 \pm 6,3$ ms-al nőtt ($n=8$, $p<0,05$). A HMR-1556ot tartalmazó oldatban izoproterenollal elért platópotenciál-emelkedés $8,9 \pm 0,88$ mV-nak adódott ($n=8$, $p<0,05$).

Az L-típusú kalciumcsatornákat $5 \mu\text{M}$ nizoldipinnel gátoltuk, amely meggátolta az AP platófázisának kialakulását. β -adrenerg stimuláció hatására a nizoldipin által módosított AP platópotenciálja nem változott jelentősen, hat mérés átlaga alapján $0,58 \pm 0,8$ mV-os platópotenciál-csökkenést figyeltünk meg (n.s. $n=6$). A nizoldipinnel gátolt akciós potenciál hossza sem változott szignifikánsan, $3,9 \pm 5,6$ ms-os nyúlást tapasztaltunk (n.s. $n=6$). Egyik eltérés sem volt szignifikáns, és az ISO kimosása során sem kaptunk jelentős változást.

Az egyes ionáramok β -adrenerg stimulációban betöltött szerepének pontosabb meghatározásához hagyományos patch-clamp technika egészsejtes konfigurációjában mértünk I_{Ca} , I_{Kr} és I_{Ks} ionáramokat. Az izoproterenol nélkül mért áram amplitúdót tekintettük kontrollnak. A sejteket 1 nM -tól $1 \mu\text{M}$ -ig egyre növekvő koncentrációjú izoproterenolt tartalmazó oldattal perfundáltuk, és az ionáramok amplitúdójának változását vizsgáltuk. Az áramok amplitúdóját a sejtkapacitásra normalizáltuk.

ISO hatására az I_{Ca} amplitúdója dózisfüggő módon növekedett, 100 nM izoproterenol közel maximális változást hozott létre. A kontroll körülmények között mért áram amplitúdóját vettük 1-nek, és ehhez viszonyítottuk az áram változásait, és ábrázoltuk az ISO koncentráció függvényében. Az adatokat Hill-egyenlettel illesztve a válasz relatív maximuma $3,40 \pm 0,13$ -nak, az izoproterenol félaktiváló koncentrációja $15,3 \pm 3,5$ nanomólnak, a Hill-koefficiens pedig $1,32 \pm 0,04$ -nak adódott.

Az ISO az I_{Kr} amplitúdóját is koncentrációfüggő módon növelte, ennek mértéke azonban jelentősen elmaradt a kalciumáramnál tapasztaltakhoz viszonyítva. Nyolc kísérlet eredményét Hill-egyenlettel megillesztve a maximális válasz $1,33 \pm 0,01$ -nak adódott. A félhatásos ISO koncentráció $13,7 \pm 2,5$ nM, a Hill koefficiens pedig $1,21 \pm 0,28$ volt.

Az I_{Ks} amplitúdója is dóziszfüggő módon nőtt izoproterenol hatására, már 10 nM ISO is közel duplájára növelte az I_{Ks} amplitúdóját. A β -adrenerg stimuláció - az I_{Kr} -el ellentétben - jelentősen növelte az I_{Ks} -t, $4,20 \pm 0,04$ -re fokozva a farokáram amplitúdóját. Az ISO I_{Ks} -t növelő félhatásos koncentrációja a többi áramhoz hasonlóan $14,5 \pm 1,1$ nM volt, a Hill koefficiens $0,84 \pm 0,05$ -nak adódott.

A vizsgált ionáramok viselkedése jelentősen eltérhet az equilibrium és nem-equilibrium állapotok között - azaz a hagyományos feszültség-clamp négyszögimpulzusa és az AP lefutása alatt - ezért az izoproterenol ionáramokat módosító hatását AP feszültség-clamp módszerrel is megvizsgáltuk.

Elsőként a sejteket 1 nM és 1 μ M között növekvő koncentrációjú izoproterenollal perfundáltuk. Az ISO növekvő koncentrációjának hatására két jól elkülöníthető áramcsúcs jelent meg az áramgörbén. Az áramcsúcsok közül az első az AP lefutását tekintve korábban jelenik meg és negatív irányú, vagyis befelé irányuló (inward) áram, míg a később megjelenő pozitív irányú kitérés kifelé irányuló (outward) áramot jelez. Megállapítottuk, hogy a kezdeti befelé irányuló áramot az I_{Ca} , a későbbi kifelé irányulót pedig az I_{Ks} és az I_{Kr} alkotja. A megfigyelt változások reverzibilisek voltak.

A további AP-clamp kísérletekben 100 nM koncentrációjú izoproterenolt a korábban használt különböző ioncsatorna-blokkolókkal kombinálva alkalmaztuk.

Megállapítottuk, hogy az I_{Kr} -t gátló 1 μ M E-4031 előzetes alkalmazása nem változtatta meg az ISO által létrehozott áramprofilt. I_{Ks} gátló HMR-1556 esetén az adrenerg stimulus hasonló nagyságú inward, de lényegesen lecsökkentett amplitúdójú outward csúcsot hozott létre.

A kalciumcsatornák gátlása során ($10\ \mu\text{M}$ nizoldipin és $5\ \text{mM}$ NiCl_2) elhanyagolható nagyságú a befelé irányuló áram amplitúdója, és a kifelé irányuló áram amplitúdója is elmaradt a kontrollhoz képest.

AP-clamp kísérleteinknél meghatároztuk a befelé és kifelé irányuló áramok sejtkapacitásra normalizált csúcsértékét. Kontroll mérések során, amikor csak izoproterenollal perfundáltuk a sejteket, $4,62 \pm 1,08\ \text{pA/pF}$ nagyságú befelé irányuló, és $2,72 \pm 0,53\ \text{pA/pF}$ amplitúdójú kifelé irányuló csúcsot kaptunk ($n=6$). Az I_{Kr} gátlása esetén az inward áramcsúcs $4,78 \pm 0,6\ \text{pA/pF}$, míg az outward csúcs $2,1 \pm 0,51\ \text{pA/pF}$ -nak adódott ($n=6$). I_{Ks} gátlása során a befelé irányuló áramcsúcs $5,55 \pm 0,67\ \text{pA/pF}$, míg a kifelé irányuló $0,31 \pm 0,14\ \text{pA/pF}$ volt ($n=6$). A kontrollnál nagyobb inward áramok összhangban vannak az AP-mérésnél is tapasztalt némileg nagyobb mértékű platópotenciál-emelkedéssel. A kalciumcsatornák gátlásakor $0,22 \pm 0,16\ \text{pA/pF}$ nagyságú befelé irányuló, és $1,05 \pm 0,21\ \text{pA/pF}$ -os kifelé irányuló áramot mértünk ($n=3$). Mindkét változás szignifikánsan kisebb volt a kontrollhoz képest.

A csatornák foszforiláltságának szerepe a gátlószerek hatékonyságában

Kalciumáram-mérések során tapasztaltuk, hogy a β -adrenerg stimuláció hatásosan csökkenti a különböző L-típusú kalciumcsatorna-blokkolók hatékonyságát. $5\ \mu\text{M}$ nizoldipin $96 \pm 1\%$ -os I_{Ca} amplitúdó csökkenést okoz, $100\ \text{nM}$ ISO jelenlétében a gátlás mértéke $89 \pm 2\%$ -ra csökken ($n=7$). Az ioncsatornák foszforilációja ugyanis megváltoztathatja az ioncsatornák fehérjéinek szerkezetét, és így a gátlószerek kötődését, mely így a gátlás mértékének csökkenéséhez vezethet. Ezért megvizsgáltuk, hogy a csatornafehérjék foszforiláltságának változása milyen mértékben módosíthatja az általunk használt gátlószerek hatékonyságát. Ehhez forskolinnal előkezelt sejteken vizsgáltuk a specifikus gátlószerek ionáramokra kifejtett dóziszfüggő hatását. A forskolin közvetlenül, receptorfüggetlen módon aktiválja az adenilát-cikláz ötös

és hatos altípusát, így elkerülhető a deszenzitizáció. Minden áramnál a gátlószermentes oldatban mért áramot tekintettük 100%-nak.

Megállapítottuk, hogy az ioncsatornák foszforilációja nem változtatta meg az elért gátlás maximális értékét, a félgátló koncentrációkat, illetve a Hill-koefficienseket sem, azaz nem módosította az I_{Kr} , I_{Ks} és I_{Ca} áramok HMR-1556, E-4031, nizoldipin érzékenységét.

Izoproterenol időfüggő hatásai az akciós potenciál morfológiájára

Az eddig elvégzett kísérletek során megfigyeltük, hogy bár az APD_{90} rövidülése és a platópotenciál változása 3 percen belül kialakul, a két folyamat nem egyszerre következik be. A jelenség tanulmányozására a kamrafal különböző rétegeiből származó szívműködő sejtek akciós potenciáljait vizsgáltuk.

10 nM ISO hatására a platópotenciálok mindhárom sejtípus esetén (epi-, mid- és endokardiálison is) pozitívabb membránpotenciálok felé mozdultak el, ami statisztikailag szignifikáns volt az ISO perfúzió kezdetétől számított 30 másodpercen belül. 3 perc ISO perfúzió után a platópotenciálok emelkedésének mértéke hasonló mértékű volt mindhárom sejtpopulációnál. Egyik sejtípus esetén sem volt jelentős eltérés a platópotenciál változásának kinetikájában, mindhárom sejtípusnál 2,5 percet kellett várni a maximális hatás kifejlődéséhez.

Korábbi eredményeinkhez hasonlóan az epikardiális és midmiokardiális eredetű sejtek izoproterenolra jelentős AP-rövidüléssel válaszoltak; mind az APD_{50} , mind pedig az APD_{90} csökkent, azonban az APD_{20} növekedett a kontrollhoz képest. A platópotenciál változásához hasonlóan, az APD_{20} növekedése már az izoproterenol perfúziójának kezdetétől számítva 30 másodpercen belül szignifikáns volt, míg az APD_{90} és APD_{50} rövidülése csak 1,5-2 perccel az ISO perfúziója után volt szignifikáns mértékű. Endokardiális sejteken az izoproterenol nem volt képes csökkenteni sem az APD_{50} , sem pedig az APD_{90} értékeket, de ezeken a sejteken is megfigyeltük az APD_{20} növekedését,

amely a többi sejttípushoz hasonlóan fél perc után szignifikáns mértékű volt. Az összes megfigyelt hatás reverzibilis volt az izoproterenol kimosását követő 5 percen belül.

Az ISO hatására bekövetkező AP-változások az ionáramok időfüggő változásának a következménye

Az AP alakja és karakterisztikus paraméterei szigorúan függenek a létrehozó ionáramok amplitúdójától és időbeli aktivációjától. Az izoproterenol az I_{Ca} -t és az I_{Ks} -t jelentősen, míg az I_{Kr} -t kevéssé növeli. Ezért hagyományos patch-clamp technika egész sejt konfigurációjában vizsgáltuk, hogy az ISO perfúziója során hogyan változik az I_{Ca} , I_{Ks} és I_{Kr} amplitúdója a perfúziós idő függvényében. Az AP mérések eredményeivel összhangban, szignifikáns kalciumáram-amplitúdó növekedést tapasztaltunk az izoproterenol-expozíciót követő fél percen belül. Két és fél perc elteltével már maximális választ kaptunk, és az ISO alkalmazási idejének további növelése már nem okozott jelentős I_{Ca} amplitúdó változást. ($n=9$, $p<0,05$.)

Az I_{Ks} és I_{Kr} amplitúdói is folyamatosan növekedtek az ISO perfúzió során, azonban szignifikáns mértékű amplitúdó növekedést csak 1 perccel az ISO perfúzió kezdete után kaptunk. A maximális amplitúdó növekedést a káliumáramok esetén is 2-2,5 perccel az ISO perfúziója után tapasztaltuk. Az izoproterenol által létrehozott változások korábbi kísérleteinkhez hasonlóan reverzibilisek voltak.

A jelet közvetítő β -adrenerg receptorok azonosítása

Az ISO aszimmetrikus ionáram-stimuláló hatásának magyarázata lehet, hogy szívműködő sejteken a β_2 adrenerg stimuláció egy lokális cAMP emelkedést idéz elő, ami a kalciumcsatornák egy kis populációjának a működését befolyásolja,

ugyanakkor a β_1 adrenerg jelátvitel generalizált cAMP-növelést hoz létre, ami már nemcsak a kalciumcsatornákat, hanem számos egyéb ionáram működését is befolyásolja.

Ennek kiderítéséhez a β_1 receptorokat 300 nM CGP-20712A-val, a β_2 receptorokat pedig 50nM ICI 118,551-el gátoltuk.

Megállapítottuk, hogy önmagában vagy kombináltan alkalmazva sem a CGP, sem az ICI nem változtatta meg az akciós potenciálok morfológiáját. A β_1 receptorok előzetes gátlása az izoproterenol által létrehozott AP-rövidítést nyújtássá változtatta, emellett csökkentette a kiváltott platópotenciál-emelkedést is. β_2 receptorokat gátló ICI 188,551 jelenlétében az izoproterenol nagyobb mértékű APD-rövidülést okozott, mint a gátlószer nélkül. Ugyanakkor a β_2 adrenerg receptorok gátlása nem befolyásolta az ISO platópotenciálra kifejtett hatását. A két gátlószer együttes alkalmazásakor az izoproterenol jelenlétében mért AP nem különbözött a kontrolltól.

A β receptorok szerepe az ISO okozta változások kinetikájában

Az izoproterenol időfüggő hatásait megvizsgáltuk akciós potenciál feszültség-clamp módszerekkel is. ISO hatására két áramcsúcs jelent meg az áramgörbén. A befelé és kifelé irányuló komponensek amplitúdója az időben előrehaladva körülbelül 2,5 percig folyamatosan nőtt, ezt követően állandó szinten maradt. A hatás teljesen kimosható volt.

β_1 blokkoló 300 nM CGP-20712A jelenlétében elvégezve a kísérletet megállapítottuk, hogy az ISO hatását 2,5 perc alatt ez esetben is teljesen kifejtette. Azonban a β_1 blokkolóval történt előkezelés során nem jelent meg a kifelé irányuló áramcsúcs. Ez arra utal, hogy 300nM CGP-20712A jelenlétében az izoproterenol valószínűleg csak a kalciumáramot növelte. Megjegyzendő azonban, hogy az így aktivált kalciumáram maximális amplitúdója nem érte el a CGP-20712A-előkezelés nélkül elért amplitúdót.

Előzetes adrenerg gátlás nélkül a befelé irányuló áram az ISO adagolását követően $15,6 \pm 2,2$ másodperc múlva kezdett el növekedni, a kifelé irányuló áram megjelenése pedig $25,4 \pm 2,3$ másodperc elteltével jelent meg először. Bár az izoproterenol CGP-20712A jelenlétében nem aktivált kifelé irányuló áramokat, az inward áramcsúcs latenciája ($15,3 \pm 1$ s) a kontrollhoz hasonló volt.

β_1 adrenerg receptor gátló jelenlétében az APD_{90} változás latenciaideje szignifikánsan kisebb volt ($17,6 \pm 1,5$ s, $n=6$, $p<0,05$), mint a kontroll APD_{90} latenciája ($33,4 \pm 3,4$ s, $n=9$), ugyanakkor hasonló volt a kontroll körülmények között mért ($14,1 \pm 1,3$ s, $n=9$), és CGP-20712A előkezelést követő platópotenciál latenciához ($15,1 \pm 1,6$ s, $n=6$). A CGP-20712A-val megfigyeltek ellentéte történt ICI 118,551 előkezelés után; az APD_{90} latenciája ($31,1 \pm 1,1$ s, $n=7$) a kontrollhoz viszonyítva nem változott, de a platópotenciál emelkedésének késése megduplázódott ($30,2 \pm 1,2$ másodpercre, $n=7$), emiatt a két vizsgált paraméter hasonló késéssel változott. β_1 és β_2 együttes gátlása a korábbiakhoz hasonlóan megakadályozta az ISO módosító hatását.

A foszfodiészteráz barrier szerepének vizsgálata

Az izoproterenol indukált APD és platópotenciál-változások időben eltérő kialakulásának a hátterében állhat a cAMP kompartmentalizációja. A kompartmentalizáció esetleges szerepének vizsgálatához izobutil-metilxantinnal (IBMX), egy ismert nem-szelektív foszfodiészteráz-gátlóval kezelt sejteket vizsgáltunk.

A platópotenciál változás latenciája IBMX jelenlétében ($13 \pm 1,4$ s, $n=6$) hasonló volt a kontrollban kapott értékekhez ($14,1 \pm 1,3$ s, $n=9$), viszont az APD_{90} változás szignifikánsan gyorsabban kialakult ($23,4 \pm 2,6$ s, $n=6$, $p<0,05$), mint IBMX nélkül ($33,4 \pm 3,4$ s, $n=9$).

Eredményeink valószínűsítik, hogy a Ca^{2+} és K^{+} -csatornákat befolyásoló β -adrenerg jelátviteli utakat legalább egy foszfodiészteráz barrier elválasztja egymástól.

Megbeszélés

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a β -adrenerg stimulus akciós potenciált (AP) rövidítő hatásához szükséges az akciós potenciál úgynevezett „*spike and dome*” konfigurációja. A β -adrenerg receptorok stimulálására izoproterenolt (ISO) használtunk, ami növeli az L-típusú kalciumáram ($I_{\text{Ca,L}}$) és a késői egyenirányító káliumáram gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponensének amplitúdóját. Megállapítottuk, hogy az izoproterenol félhatásos koncentrációja közel azonos mindhárom ionáram esetén. β -adrenerg stimulusra a „*spike and dome*” konfigurációjú akciós potenciálok frekvenciafüggő módon rövidülnek a plató megemelkedése mellett. A rövidítésért elsősorban az I_{Ks} felelős. Megállapítottuk, hogy izoproterenol hatására az akciós potenciál paramétereinek változása nem egyszerre következik be. A kalciumáram amplitúdójának növelése, a plató megemelkedésével együtt időben megelőzi a káliumáramok amplitúdóinak, illetve az akciós potenciál hosszának (APD_{90}) megváltozását. Megállapítottuk, hogy az adrenerg stimuláció a kalciumáram fokozását a β_1 és β_2 receptorokon keresztül hozza létre, míg a káliumáramok fokozása a β_1 adrenerg receptorokon keresztül történik. A β -adrenerg stimuláció csökkenti a szerves kalciumcsatorna-blokkolók hatékonyságát, míg a szerves ionok által létrehozott gátlást nem változtatja meg.

Az izoproterenolra adott válaszok jelentősen eltérnek különböző preparátumokon és kísérleti elrendezésekben. Például az APD_{90} ISO hatására csökken nyulakban, kutyákban, macskákban és humán preparátumokon, míg nyúlík sertés, patkány és tengerimalac preparátumokon.

Ezek a megfigyelések összhangban vannak eredményeinkkel, nevezetesen a „spike and dome” konfigurációjú akciós potenciál, ami jellemző a kutya, macska és humán szívizomból származó epi- és midmiokardiális sejtekre, előfeltétele a β -adrenerg hatásra bekövetkező APD_{90} rövidülésnek. Emellett minden emlős szívizom-preparátum közös tulajdonsága a platópotenciál megemelkedése ISO hatására. A kalciumáram növekedését és a platópotenciál emelkedését is megfigyeltük kutya epi- és midmiokardiális sejteken, és kisebb mértékben az endokardiális sejteken is. A plató emelkedése szükségesnek tűnik az AP rövidülésében, mert I_{Ca} gátló nizoldipin jelenlétében a platópotenciál-változás nem volt megfigyelhető, és az AP időtartamát sem változtatta meg az ISO. Nizoldipin jelenléte mellett, az I_{Ca} gátlása miatt az ISO nagyobb mértékű rövidítő hatását vártuk, de ez elmaradt.

A β -adrenerg aktiváció hatására pozitívabbá váló platópotenciál segítheti a kifelé irányuló áramok, az I_{Kr} és I_{Ks} aktivációját. Azonban az I_{Ks} gátlása megakadályozta az ISO rövidítő hatásának kifejlődését, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy az ISO rövidítő hatásáért elsősorban az I_{Ks} áram aktiválása lehet felelős. Ez némileg meglepő, hiszen a normál repolarizáció során az I_{Ks} áram amplitúdója 10 pA alatti, míg az I_{Kr} -é közel tízszer nagyobb, körülbelül 80-90 pA. Kísérleteink során az ISO az I_{Ks} áramot 4,2-szeresére emelte, miközben az I_{Kr} csak 1,33-szorosára növekedett, ezért a két áram ISO-indukálta hányada összehasonlítható nagyságú lehet. Ha azt is számításba vesszük, hogy az ISO a kalciumcsatorna gátló nizoldipin jelenlétében nem rövidítette az AP-t, nyilvánvaló, hogy valami további változás is szükséges a rövidítő hatáshoz az I_K áramok stimulálása mellett. Ez nagy valószínűséggel a kalciumáram növelése miatt fellépő platóemelkedés lehet. Az I_{Kr} szinte teljesen aktivált a fizioiógias platópotenciálok mellett, emiatt a platópotenciál növelése kevésbé befolyásolja a repolarizációban betöltött szerepét, míg az I_{Ks} a platópotenciál emelkedése esetén jelentősen megnő, emiatt az I_{Ks} lesz a repolarizáció domináns ionárama. Ez a következtetés egybevág Varró (2000) és

Volders (2003) feltételezésével, miszerint az I_{Ks} repolarizációban betöltött szerepe nyugalomban elhanyagolható, de jelentősen megnő szimpatikus stimuláció alatt.

Az egyik legfontosabb eredményünk az, hogy az ISO csak a „*spike and dome*” konfigurációjú akciós potenciálokat rövidíti. Nem figyeltünk meg ugyanis rövidülést endokardiális, vagy 4-aminopyridinnel előkezelt midmiokardiális sejteken sem. Ezt a jelenséget magyarázhatja az ISO-indukált indirekt változás az I_{Ks} kinetikájában. Epikardiális sejteken a plató végén jóval pozitívabb feszültségérték mérhető az endokardiális sejtekhez viszonyítva, ami az epikardiális sejteken valószínűleg nagyobb amplitúdójú I_{Ks} -t okoz. Ez megmagyarázhatja, miért képes az ISO az akciós potenciál időtartamát növelni tengerimalac szívműködéseknél, ellentétben a macska, kutya és humán szívműködésekkel.

ISO hatására a kutya kamrai szívműködés akciós potenciál paramétereinek változása nem egyszerre következik be. Megállapítottuk, hogy az ISO okozta platóváltozás (a kalciumáram növelésével együtt) hamarabb jelent meg, mint az APD_{90} rövidülése. A jelenség egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy az izoproterenol félaktiváló koncentrációja kisebb a kalciumáram esetén, mint a káliumáramok esetén. Eredményeink alapján ezt a lehetőséget ki lehet zárni, mert méréseink szerint az ISO EC_{50} értéke és Hill-koefficiense mindhárom áramnál közel azonos volt, csak az aktiváció nagyságában figyeltünk meg eltérést. Ez arra utal, hogy a megfigyelt különbségeket nem az ISO kötődésének különbségei okozzák. A jelenség magyarázata feltételezi két párhuzamos, részben független adrenerg jelátviteli útvonal létezését a szívműködésben. A szívműködésben β_1 adrenerg receptorok mellett β_2 és β_3 receptorok is előfordulnak. A felszíni membrán β_1 receptorainak aktivációja nagymértékű citoszolikus cAMP szint növekedést, generalizált hatásokat vált ki, melynek része a Ca^{2+} és K^+ -áramok növelése is. Ezzel ellentétben a kisebb számban előforduló β_2 adrenerg receptorok a kaveoláris membránban helyezkednek el,

ahol a β_1 receptorok nem mutathatók ki. A kaveoláris β_2 receptorok mellett megtalálható a jelátvitelhez szükséges összes fehérje és az L-típusú kalciumcsatorna is. A kaveoláris β_2 receptorok stimulációja lokális cAMP növekedést okoz, ami csak a szomszédos kalciumcsatornákat aktiválja. Bár a β_2 adrenerg receptorok G_s és G_i fehérjékhez is kapcsolódhatnak, az I_{Ca} növelését valószínűleg a G_s fehérjék által közvetített adenilát-cikláz aktiváció okozza. A β_3 adrenerg receptorok fiziológias szerepe elhanyagolható, mert kísérleteink során az egyidejű β_1 és β_2 gátlás megakadályozta, hogy az ISO bármilyen hatást kifejtson.

A β_1 és β_2 adrenerg receptorok aktivációja különböző módon változtatja az AP morfológiáját. A β_1 adrenerg receptorok aktiválása (β_2 gátlás mellett) a platópotenciál emelkedését és az AP rövidülését is előidézte. Ezzel ellentétben a β_2 adrenerg receptorok izolált aktivációja (egyidejű β_1 gátlás mellett) az APD növekedését okozta (rövidülés helyett) a plató kisebb mértékű emelkedése mellett. Ezt a kalciumáram izolált növelése okozhatja a káliumáramok növelése nélkül. Emellett a szelektív β_1 adrenerg receptorok által közvetített hatás lassabban alakult ki, mint a szelektív β_2 adrenerg aktiváció hatásai. Végül, az időbeli eltérések eltűntek akár β_1 , akár β_2 szelektív gátlása során, és a foszfodiészteráz barriert megszüntető IBMX is jelentősen csökkentette a hatások megjelenése közötti időt.

Szelektív β_1 és β_2 adrenerg receptor gátlószerekkel elvégzett kísérleteink eredményei alátámasztják az ISO kettős szignalizációját kutya kamrai szívizomsejteken, nevezetesen, az ISO indukált kalciumáram növekedés jelentős része, és a K^+ -áramok - az I_{Kr} -t és I_{Ks} -t is beleértve - növelése a lassabb β_1 útvonalon keresztül történik. A gyorsan aktiválódó, kaveoláris β_2 receptor aktiválódása is növeli a kalciumáramot, de a káliumáramok fokozása nélkül. Ez magyarázhatja az időbeli eltéréseket az ISO okozta platópotenciál- és APD_{90} változások kinetikájában, és a szelektív β_1 gátlás során megfigyelt AP időtartam növekedést is. Ez összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal, hiszen nyúl

szívizomsejteken a β_1 gátlása megakadályozta az ISO okozta APD rövidítést, és β_1 gátlószer jelenlétében az ISO kutya szívizomsejteken sem növelte az I_{Kr} -t. Más szerzők a szívizom kalcium- és káliumáramainak adrenerg stimulációját is vagy különbözőnek, vagy egymástól függetlennek vélik. Az I_{Ca} kettős adrenerg befolyásolását az támasztja alá, hogy a platópotenciál, és az APD változása közti időbeli különbség eltűnt akár a β_1 , akár a β_2 adrenerg receptorok blokkolása esetén. A különbségek szignifikánsan csökkentek IBMX jelenlétében, amiből arra következtettünk, hogy a foszfodiészteráz barrierekkel körülhatárolt cAMP-kompartmentek szintén felelősek lehetnek a megfigyelt különbségekért. IBMX jelenlétében az ISO okozta APD_{90} rövidülés korábbi megjelenéséért a cAMP-nek a kaveoláris kompartmentekből a citoplazma többi részébe történő diffúziója lehet felelős (amit az intakt foszfodiészteráz barrier egyébként megakadályozna). Azonban nem zárható ki az IBMX közvetlen hatása a citoplazma egyéb kompartmentjeiben sem. Hejman et al. (2011) nemrégiben közölt *in silico* modelljében az adrenerg receptorok, kompartmentek és jelátviteli útvonalak nagyban hasonlítanak az általunk feltételezethez.

A kalciumáramnak a káliumáramok növeléséhez viszonyított gyorsabb emelkedése hasznos, ha a szív gyorsan akarja fokozni a teljesítményét. Ez azonban a káliumáramok későbbi aktivációjával jelentős proaritmiás veszélyt is hordoz, mert növeli a korai utódepolarizációk esélyét, amelyek adrenerg aktivációkor egyébként is nagyobb eséllyel fordulnak elő. Számítógépes szimulációk is alátámasztják ezt a feltételezésünket. A torsades de pointes kamrafibrillációval járó hirtelen szívhalálok előidézésében jelentős szerepe van erős adrenerg stimulusnak, főleg bradikard szív működés mellett (pl. a reggeli ébresztőóra hatására). Az ISO aszimmetrikus hatása (epikardiális sejteken rövidít, endokardiálison viszont nem) szimpatikus stimuláció során megnövelheti a transzmurális inhomogenitást, így az aritmiák előfordulását is. Említésre méltó még, hogy az ISO fordított frekvenciafüggő hatása talán nem kapcsolódik a befolyásolt ionáramok ismert fordított frekvenciafüggéséhez, mert

kísérleteinkben a ciklushossz növelésével a kalciumáram fokozása nagyobb volt, mint az I_{Ks} áram növelése. Erre a szívizom általános viselkedése ad magyarázatot, nevezetesen a szívizmon az AP időtartama fordított frekvenciafüggő, a változások mértéke függ az akciós potenciál kezdeti időtartamától.

Eredményeink alapján a szelektív β_2 gátlók alkalmazása valószínűleg megszüntetné a kalcium-és káliumáramok késése közti különbséget, így az utódepolarizációk veszélyét csökkenthetik. Ez hasznos lehet a klinikai gyakorlatban is az egyedi β -blokkoló terápia beállítása során.

Az ISO aktiválta I_{Kr} -nek kutya – és valószínűleg humán – kamrai szívizomsejteken fontos klinikai következményei lehetnek. A hármastípusú antiaritmiás szerek, melyek rendszerint az I_{Kr} -t gátolják, a korai utódepolarizációk esélyét növelhetik, a korai utódepolarizációk pedig torsades de pointes aritmiát idézhetnek elő a csökkent repolarizációs rezerv miatt. A szimpatikus aktivitás önmagában is fokozza a korai utódepolarizációk előfordulását, így a káliumcsatornák gátlása nagyon veszélyessé válhat adrenerg stimuláció mellett. Az I_{Ks} gátlók hármastípusú antiaritmiás szerként történő használata előnyösnek tűnik a frekvenciafüggő tulajdonságuk miatt. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy I_{Ks} gátló szerek nagyobb veszélyt hordoznak öröklött vagy szerzett long-QT szindrómában szenvedő betegeknél, mint a „klasszikus”, I_{Kr} -t gátló hármastípusú antiaritmiás szerek, mert szimpatikus aktiváció során elvész a repolarizációhoz szükséges mechanizmus. Ez fontos lehet annak ellenére is, hogy az I_{Ks} -nek fiziológiai körülmények között a repolarizációban nincs jelentős szerepe. Új antiaritmiás szerek, vagy kezelési stratégiák kidolgozásánál ezt figyelembe kell venni.

Az ioncsatornák foszforilációja megváltoztathatja az ioncsatornák fehérjéinek szerkezetét, és így a gátlószerek kötődését, mely így a gátlás mértékének csökkenéséhez vezethet. Ezért vizsgáltuk az L-típusú kalciumáram-blokkolókat, és az adrenerg stimuláció egymásra hatását. Megfigyeltük, hogy az adrenerg

stimulus képes aktiválni kutya kamrai szívizomsejteken a kalciumáramot különböző szerves gátlószerek, például 5 μM nifedipin mellett is. Az izoproterenol azonban nem tudta növelni az I_{Ca} amplitúdóját a pórust elzáró szervetlen kationok alkalmazása során. Eredményeink alapján a klinikumban használt kalciumcsatorna-gátló szerek csökkent hatékonyságúak lehetnek megnövekedett szimpatikus tónus esetén, amit a terápia beállításakor figyelembe kell venni.

Összefoglalás

Bevezetés

Az akciós potenciál (AP) morfológiájának szerepe nem kellően tisztázott a β -adrenerg stimuláció okozta változásokban. Ezért megvizsgáltuk az izoproterenol (ISO) módosító hatását az akciós potenciál konfigurációjára, az L-típusú kalciumáramra (I_{Ca}), valamint a késői egyenirányító áram lassú (I_{Ks}) és gyors (I_{Kr}) komponensére. Kitértünk a változások kinetikájának és frekvenciafüggésének vizsgálatára is.

Anyagok és módszerek

Az I_{Ca} , I_{Ks} , és I_{Kr} mérésekhez hagyományos feszültség-clamp technika egészsejtes konfigurációját, valamint akciós potenciál feszültség-clamp méréseket végeztünk. Az akciós potenciál méréseket nagy ellenállású mikroelektrodákkal végeztük, izolált kutya kamrai szívizomsejteken 37 °C-on.

Főbb eredmények

Az ISO epikardiális és midmiokardiális sejteken az akciós potenciálok reverzibilis rövidülését okozta a plató emelésével együtt. Ezek a változások az I_{Ks} és I_{Ca} amplitúdóinak többszörös növekedésével jártak, az I_{Kr} mérsékelt fokú stimulálása mellett. Endokardiális sejteken az ISO nem okozott AP-rövidülést. Az I_{Kr} előzetes gátlása nem módosította az ISO hatását, de I_{Ks} blokkolásakor az akciós potenciál ISO hatására megnyúlt. A kalciumcsatornák előzetes gátlása mind az akciós potenciál rövidülését, mind a plató emelését megakadályozta.

Megfigyeltük, hogy az ingerlési frekvencia csökkentésével az ISO nagyobb mértékű amplitúdóváltozást okozott az I_{Ca} és az I_{Ks} esetén a kontrollhoz képest. Az ISO okozta platónövekedés és az I_{Ca} növekedése hamarabb következett be, mint az akciós potenciál rövidülése, az I_{Kr} , vagy az I_{Ks} stimulálása. β blokkolókkal végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy a β_1 receptorok gátlása az ISO okozta rövidülést nyújtássá változtatta, a platóváltozás latenciája pedig csökkent. Ezzel ellentétben, a β_2 receptorok gátlása fokozta az AP rövidülését, és növelte a plató változásának latenciáját. Mindkét receptortípus egyidejű blokkolása meggátolta az ISO hatásának kifejlődését. A foszfodiészterázok gátlása csökkentette az időbeli különbséget a platópotenciál változása és az AP rövidülés megjelenése között.

Összefoglalás

Az ISO hatásai kutya kamrai sejteken nagyban függenek az akciós potenciál konfigurációjától, és az ISO-indukálta I_{Ks} és nem az I_{Kr} lehet a felelős az akciós potenciálok rövidüléséért. Az ISO az I_{Kr} , illetve az I_{Ks} változtatásánál gyorsabban, rövidebb latenciával növelte a kalciumáramot, a jelenségért a különböző adrenerg útvonalak, illetve a kompartmentalizáció lehet felelős.



Iktatószám: DEENKÉTK/96/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Ruzsnavszky Ferenc

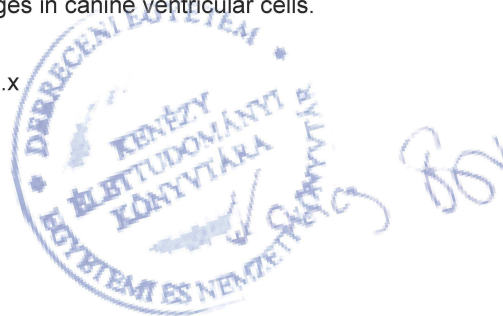
Neptun kód: SJNUH3

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10036808

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

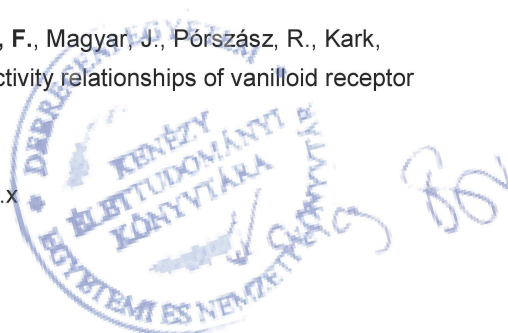
1. **Ruzsnavszky, F.**, Hegyi, B., Kistamás, K., Váczi, K., Horváth, B., Szentandrassy, N., Bányász, T., Nánási, P.P., Magyar, J.: Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 387 (5), 457-467, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-0964-6>
IF:2.147 (2012)
2. Farkas, V., Szentandrassy, N., Bárándi, L., Hegyi, B., **Ruzsnavszky, F.**, Ruzsnavszky, O., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Márton, I., Nánási, P.P.: Interaction between Ca²⁺ channel blockers and isoproterenol on L-type Ca²⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes.
Acta Physiol. 206 (1), 42-50, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02448.x>
IF:4.382
3. Szentandrassy, N., Farkas, V., Bárándi, L., Hegyi, B., **Ruzsnavszky, F.**, Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Márton, I., Nánási, P.P.: Role of action potential configuration and the contribution of Ca²⁺ and K⁺ currents to isoprenaline-induced changes in canine ventricular cells.
Br. J. Pharmacol. 167 (3), 599-611, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02015.x>
IF:5.067





További Közlemények

4. Hegyi, B., Komáromi, I., Kistamás, K., **Ruzsnavszky, F.**, Váczi, K., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P.P., Szentandrassy, N.: Tetrodotoxin Blockade on Canine Cardiac L-Type Ca²⁺ Channels Depends on pH and Redox Potential.
Mar Drugs. 11 (6), 2140-2153, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md11062140>
IF:3.978 (2012)
5. Jenes, Á., Szigeti, G.P., **Ruzsnavszky, F.**, Varga, A., Lőrincz, L., Csernoch, L.: Nicotine interferes with purinergic signaling in smooth muscle cells isolated from urinary bladders of patients with lower urinary tract symptoms.
Gen. Physiol. Biophys. 32 (3), 295-302, 2013.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2013033
IF:0.852 (2012)
6. Kistamás, K., Szentandrassy, N., Hegyi, B., **Ruzsnavszky, F.**, Váczi, K., Bárándi, L., Horváth, B., Szebeni, A., Magyar, J., Bányász, T., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of pioglitazone on cardiac ion currents and action potential morphology in canine ventricular myocytes.
Eur. J. Pharmacol. 710 (1-3), 10-19, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.047>
IF:2.592 (2012)
7. Szabó, L., Szentandrassy, N., Kistamás, K., Hegyi, B., **Ruzsnavszky, F.**, Váczi, K., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Pál, B., Nánási, P.P.: Effects of tacrolimus on action potential configuration and transmembrane ion currents in canine ventricular cells.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 386 (3), 239-246, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0823-2>
IF:2.147 (2012)
8. Czikora, Á., Lizanecz, E., Bakó, P., Rutkai, I., **Ruzsnavszky, F.**, Magyar, J., Pórszász, R., Kark, T., Facskó, A., Papp, Z., Édes, I., Tóth, A.: Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1.
Br. J. Pharmacol. 165 (6), 1801-1812, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01645.x>
IF:5.067





9. Jenes, Á., **Ruzsnavszky, F.**, Telek, A., Szigeti, G.P., Csernoch, L.: A possible role of the cholinergic and purinergic receptor interaction in the regulation of the rat urinary bladder function.
J. Muscle Res. Cell Motil. 32 (6), 421-431, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-012-9285-x>
IF:1.358
10. Harmati, G., Papp, F., Szentandrassy, N., Bárándi, L., **Ruzsnavszky, F.**, Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Panyi, G., Krasznai, Z., Nánási, P.P.: Effects of the PKC inhibitors chelerythrine and bisindolylmaleimide I (GF 109203X) on delayed rectifier K(+) currents.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 383 (2), 141-148, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0584-8>
IF:2.647
11. Magyar, J., Jenes, Á., Kistamás, K., **Ruzsnavszky, F.**, Nánási, P.P., Satin, J., Szentandrassy, N., Bányász, T.: Long term regulation of cardiac L-type calcium channel by small G proteins.
Curr. Med. Chem. 18 (24), 3714-3719, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796642436>
IF:4.859
12. Szentandrassy, N., Nagy, D., **Ruzsnavszky, F.**, Harmati, G., Bányász, T., Magyar, J., Szentmiklósi, J.A., Nánási, P.P.: Powerful technique to test selectivity of agents acting on cardiac ion channels: The action potential voltage-clamp.
Curr. Med. Chem. 18 (24), 3737-3756, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796642418>
IF:4.859

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 39.955

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11.596

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.05.06

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



SZÉCHENYI TERV
