

Az emlős szívizom frekvencia-függő sajátságai

Dr. Szigligeti Péter

Témavezető: Dr. Nánási Péter

**Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet**

Debrecen, 2000

BEVEZETÉS

Az emlős kardiális akciós potenciál egyik legfontosabb tulajdonsága annak szokatlanul hosszú időtartama. Szívizomsejteken ugyanis a depolarizációt nem követi a nyugalmi membránpotenciálra történő gyors repolarizáció, hanem egy elnyújtott depolarizált állapot, az akciós potenciál platófázisa alakul ki, amelyet csak 200-300 ms múlva követ a teljes repolarizáció. Ennek a kizárólag szívizomra jellemző tulajdonságnak a hátterében számos ioncsatorna (nátrium, kalcium, kálium és klorid csatornák) összerendezett működése áll. Ezen ioncsatornák hormonális kontroll alatt állnak, feszültség- és idő-függő kapuzó mechanizmusokkal rendelkeznek, és számos szívre ható gyógyszer támadáspontját képezik. Az akciós potenciál időtartama és platójának magassága a sejtbe belépő kalcium mennyiségét, és ezen keresztül, a szívösszehúzódások erejét szabályozza. Az intracelluláris kalcium koncentrációjának változásai ugyanakkor a felszíni membrán elektromos folyamataira visszahatva mélyreható változásokat okoznak az ingerképzés és ingerületvezetés folyamatában, amelyek ismét az akciós potenciálok alakváltozásaiban tükröződnek.

A különböző kardiális preparátumok alapvető sajátága, hogy akciós potenciáljuk időtartama jellegzetes frekvencia-függést mutat. Ez részben azt jelenti, hogy a változatlan ingerlőfrekvencia mellett elvezetett akciós potenciálok időtartama az ingerlési frekvencia függvényében változik (steady-state frekvencia-függés). Ezen túlmenően, az akciós potenciál időtartama függ az azt megelőző diasztolés intervallum hosszától változatlan ingerlőfrekvencia esetén is. Az akciós potenciál időtartamának diasztolés intervallumtól való függését elektromos restitúciónak nevezzük, amelynek sajátosságait feltételezések szerint a plató alatt folyó ionáramok feszültség- és idő-függő kinetikai tulajdonságai együttesen szabják meg. Annak megfelelően, hogy a különböző emlősfajok ioncsatornáinak típusai, denzitásuk és kinetikai sajátágaik jelentős különbségeket mutatnak, az egyes speciesek szívizmának restitúciós kinetikájában is jelentős diverzitás tapasztalható.

Az emlősök és az ember miokardiumának restitúciós sajátosságainak hátterében komplex elektrofiziológiai változások állnak, amelyek ismerete klinikai szempontból is fontos lehet. A humán medicinában az életet veszélyeztető szívritmuszavarok egyik legfontosabb kiváltó oka a szívizomsejtek akciós potenciál időtartamának megnövekvő diszperziója. Kamrai, vagy pitvari extraszisztolét követően az extrainger időpontjának függvényében fokozódhat az akciós potenciál repolarizációjának heterogenitása, ami újabb malignus ritmuszavar forrása lehet.

A patkány szívműködésének sajátosságai - összehasonlítva a többi emlőssel - számos egyéni jellegzetességet mutatnak. Ilyen a negatív erő-frekvencia összefüggés, a szokatlanul rövid akciós potenciál időtartam és a relatíve magas intracelluláris nátriumkoncentráció. Mindemellett jól ismert, hogy patkány szívműködésében a szarkoplazmatikus retikulum igen fejlett, így itt az intracelluláris kalcium fő forrása a szarkoplazmatikus retikulum. Ezek a tulajdonságok különösen alkalmassá teszik a patkány szívműködését az intracelluláris kalciumszint restitúciós folyamatra gyakorolt szabályozó szerepének vizsgálatára.

Emlősök kamrai szívműködése a fent említett akciós potenciál időtartam frekvencia-függésén túl a kontrakciós erő tekintetében is jellegzetes frekvencia-függést mutat. A legtöbb emlős species (tengerimalac, nyúl, kutya, macska) valamint az ember kamrai szívműködésének kontraktilitása az ingerlési frekvencia növelésekor fokozódik (pozitív erő-frekvencia összefüggés). Ezzel éles ellentétben, patkányban negatív erő-frekvencia összefüggés figyelhető meg, tehát az ingerlési frekvencia növelése a kontrakciós erő progresszív csökkenésével jár. A pozitív erő-frekvencia összefüggést mutató speciesek akciós potenciáljának időtartama hosszú (átlagosan 200 ms), míg patkány esetében ez az érték jóval alacsonyabb (kb. 20-40 ms). Mindez arra utal, hogy az akciós potenciál időtartama önmagában is fontos meghatározója lehet a kontrakciós erő nagyságának. Mivel a patkány szívműködésében az intracelluláris nátriumkoncentráció magasabb, mint a többi vizsgált speciesben, felvetődik a lehetőség, hogy a patkányra jellemző fordított erő-frekvencia összefüggés a magas intracelluláris nátriumtartalom és a rövid akciós potenciál időtartam kombinációjának következménye.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célul tűztem ki az emlős és humán szívműködés frekvencia-függő sajátosságainak vizsgálatát a következő szempontok szerint:

1. Vizsgáltam a kamrai szívműködés kontrakciós erejének és az akciós potenciál időtartamának steady-state frekvencia-függését különböző speciesekben és megpróbáltam magyarázatot találni a patkány valamint a többi emlős szívére jellemző eltérő frekvencia-függés mechanizmusára.

2. A szívizomsejtek akciós potenciál időtartamának frekvencia-függő sajátosságait vizsgáltam különös hangsúlyt helyezve az akciós potenciál időtartam restitúciós kinetikájának tanulmányozására. Kísérleteim során kutya, nyúl, tengerimalac, patkány és humán preparátumok restitúciós kinetikáját vizsgáltam és megkísértem magyarázatot adni a restitúciós kinetika háttérében álló fontosabb mechanizmusokra és a fellelhető interspecies különbségekre.

MÓDSZEREK

A multicelluláris preparátumokon végzett kísérleteink során vegyes nemű tengerimalacokat, nyulakat, patkányokat és kutyákat használtunk. A humán vizsgálatok bal kamrai papilláris izmokon és jobb pitvari trabekulákon történtek, amelyeket nyitott szívűtéten átesett páciensek szívéből távolítottak el. Vékony (0.2-0.5 mm átmérőjű) papilláris izomkötegeket preparáltunk ki mindkét kamrából és humán minták esetén a pitvarból, majd azokat egy plexiüveg kádban rögzítettük, amelyet 37 °C hőmérsékletű, 100% oxigénnel áramoltatott Tyrode oldattal folyamatosan perfundáltunk. A **membránpotenciál-változásokat** konvencionális mikroelektrodák segítségével követtük. A **kontrakciós erő** nagyságát a preparátum végéhez rögzített kapacitív elektro-mechanikus transzducerrel mértük izometriás körülmények között. Megfelelő erősítés és digitalizálás után az elektromos és mechanikai válaszokat személyi számítógépen rögzítettük és analizáltuk. A **restitúciós kinetikát** az alábbiak szerint vizsgáltuk. A preparátumokat egy 20 vagy 30 impulzusból álló kondicionáló sorozattal ingereltük, majd az utolsó kondicionáló impulzust egy megfelelően időzített extraimpulzus követte. A restitúciós görbéket úgy nyertük, hogy az extrastimulus által kiváltott akciós potenciál időtartamát a diasztolés intervallum függvényében ábrázoltuk. A kapott görbéket 1, 2, 3 vagy esetenként 4 exponenciális komponens összegeként illesztettük.

A nyulból, kutyából, tengerimalacból és patkányból **izolált kamrai szívizomsejteket** coronaria perfúzióval kombinált enzimatisz emésztéssel (kollagenáz + proteáz) nyertük. A sejteket Tyrode oldatban szuszpendáltuk, majd a méréseket a patch-clamp technika whole-cell konfigurációjának alkalmazásával áram- vagy feszültség-clamp üzemmódban végeztük. Az akciós potenciálokat az ingerküszöb kétszeresének megfelelő amplitúdójú depolarizáló áramimpulzusokkal váltottuk ki áram-clamp üzemmódban. Izolált szívizomsejteken a restitúciós kinetikát és a kalciumáram reaktivációját egyaránt páros impulzusok segítségével határoztuk meg. A **kalciumáram** reaktivációs kinetikájának vizsgálatakor egy-egy -50 mV

holding potenciálról alkalmazott +10 mV-ra depolarizáló feszültségimpulzust fokozatosan növekvő diasztolés időtartamokkal választottunk el. A kalciumáram reaktivációját a második és az első impulzus alatt mért csúcsáramok hányadosaként jellemeztük, amit a diasztolés időtartam függvényében ábrázoltunk. A **nátrium-kalcium csereáram** amplitúdóját egy 50 ms hosszú 0 mV-ra történő depolarizációt követő farokáramként mértük -40 mV membránpotenciálon. Az erősítő kimenetén megjelenő jelet digitalizáltuk, majd az eredményeket a pClamp 5.03 program segítségével analizáltuk.

A nyúlból izolált kamrai szívműködősejtek akciós potenciáljait és **intracelluláris kalciumtranzienseit** 1 perces ingerlés-mentes periódust követően regisztráltuk az első nyolc stimulus során. Az akciós potenciálokat áram-clamp üzemmódban vezettük el a fent leírt körülmények között. Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásait Fura-2 fluoreszcens festék segítségével mértük. A sejteket váltakozva világítottuk meg 340 és 380 nm hullámhosszú fénnel, miközben a sejtek két dimenziós képét videokamerával folyamatosan monitoroztuk és a kibocsátott fluoreszcens jelet fotoelektronsokszorozóval detektáltuk. Az intracelluláris kalciumkoncentrációt a háttér fluoreszcenciára korrigált fluoreszcens hányados (F_{340}/F_{380}) formájában fejeztük ki. Patkányból izolált kamrai szívműködősejteken az intracelluláris kalciumtranzienseket Indo-1 fluoreszcens festék segítségével mértük, a festéket a sejtmembránon könnyen átlépő lipidoldékony acetoxymetilészter formában juttattuk a sejtbe. A sejteket 340 nm hullámhosszú gerjesztőfénnel világítottuk meg, majd a kibocsátott fluoreszcens jelet 400 és 500 nm-en regisztráltuk. Az intracelluláris kalciumkoncentrációt a 400 és 500 nm-en történt fluoreszcens emisszió hányadosaként fejeztük ki.

A mérési eredményeket átlag $\pm$ SEM formában fejeztük ki, a szignifikanciát Student féle t-tesztel számítottuk. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket, ha a P értéke kisebb volt mint 0.05.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A kontrakciós erő frekvencia-függésének vizsgálata

1. Tengerimalac és nyúl kamrai preparátumok akciós potenciálját az ATP-szenzitív káliumcsatorna aktivátor levkromakalim és pinacidil segítségével olyan mértékben rövidítettük, hogy az összevethető legyen a patkány akciós potenciál időtartamával. Levkromakalim hatására a kontrakciós erő nagysága minden vizsgált frekvencián (0.33–3.3 Hz) csökkent, miközben a kontroll körülmények között megfigyelhető pozitív erő-frekvencia

összefüggés az alacsonyabb frekvenciákon megfordult. Az akciós potenciál időtartam frekvencia-függését a levkromakalim nem változtatta meg.

2. A levkromakalim jelenlétében alkalmazott Na/K-pumpa gátló acetylstrophanthin növekvő koncentrációinak hatására az erő frekvencia-függésének megfordulása egyre kifejezettebbé vált, miközben a kontrakciók nagyságát az acetylstrophanthin minden frekvencián szignifikánsan növelte. Az acetylstrophanthin kezelés hatására az akciós potenciál időtartama nem változott lényegesen. A kontrakciós erő frekvencia-függését az acetylstrophanthin kezelés önmagában nem változtatta meg, de a görbék inflexiós pontját balra tolta.

3. A patkány rövid akciós potenciálját a káliumcsatorna blokkoló 4-aminopyridin és tetraethylammonium együttes alkalmazásával megnyújtottuk úgy, hogy azok megközelítsék a nyúl és tengerimalac preparátumokra jellemző értékeket. A 4-aminopyridin és tetraethylammonium együttes jelenléte minden frekvenciánál növelte a kontrakciós erő nagyságát, miközben a kontroll körülmények között 1 Hz alatti frekvenciákon megfigyelhető negatív erő-frekvencia összefüggést megszüntette.

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a kontrakciós erő frekvencia-függésének megfordulása nincs összefüggésben az erő abszolút nagyságában bekövetkezett változással. Az erő-frekvencia összefüggés jellegét elsősorban az akciós potenciál időtartama határozza meg, míg az intracelluláris nátriumkoncentráció nagyságának ezirányú hatása másodlagos, de nem elhanyagolható.

Patkány kamrai szívizom restitúciós kinetikájának vizsgálata

1. Patkány szívizom restitúciós kinetikája Tyrode oldatban 37°C-on három exponenciális komponens összegeként volt jellemezhető (egy korai pozitív és két negatív komponens), amelyek időállandóinak értéke rendre 21.9 ± 1.9 , 73.1 ± 6 és 1053 ± 61 ms volt.

2. A tranziens kifelé irányuló káliumáram és a késői káliumáram blokkolása 4-aminopyridinnel és tetraethylammoniummal szignifikánsan megnövelte az akciós potenciál időtartamát, de nem változtatta meg a restitúció kinetikáját. A kalcium-függő kloridcsatorna specifikus gátlószereként használt SITS sem befolyásolta érdemlegesen a restitúciós kinetikát.

3. A kalciumáram gátlása nifedipinnel, vagy mangán-kloriddal teljesen eltüntette az első két komponenst, míg a harmadik komponens lényegében változatlan maradt. Koffein kezelés növelte az akciós potenciál időtartamát és hatására a restitúciós görbe első, gyors pozitív valamint a második, gyors negatív komponensének időállandója szignifikánsan csökkent, míg a görbe harmadik szakasza alig változott.

4. A bifázisos restitúciós görbe első két komponense jó időbeli egyezést mutatott az extraingert megelőző kontrakciós görbével.

5. A restitúciós görbe második komponensének időállandója (a hőmérsékletkülönbségből adódó korrekciót figyelembe véve) jól egyezett a nátrium-kalcium csereáram relaxációs időállandójával (139.6 ± 4.5 ms) valamint a kalciumtranziens relaxációjának időállandójával (151 ± 12.3 ms), míg a harmadik komponensé a kalciumtranziens reaktivációs időállandójának (1575 ± 326 ms) felelt meg.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a kalciumáram és az intracelluláris kalciumszint tranziens változásai jelentős mértékben, ugyanakkor komplex módon, szabályozzák az elektromos restitúció kinetikáját patkány kamrai szívműködésénél, míg a káliumáramok részvétele elhanyagolható.

Elektromos restitúció vizsgálata nyúl, kutya és tengerimalac kamrai preparátumokon

1. A kutyából és tengerimalacból izolált multicelluláris preparátumok esetén az akciós potenciál időtartam monoton növekedett a diasztolés időtartam növelésekor. A kapott restitúciós görbék illesztett paramétereit összehasonlítva nem találtunk lényeges különbséget a két species között. Ezzel szemben, a nyúl szívműködésének restitúciós görbéje bifázisos kinetikát követett: az akciós potenciál időtartama kezdetben nőtt, majd a későbbiekben folyamatosan csökkent a diasztolés időtartam növelésekor.

2. Multicelluláris nyúl kamrai preparátumokon a kalciumáram gátlása nifedipinnel minden diasztolés intervallum esetén jelentősen rövidítette az akciós potenciál időtartamát és megakadályozta mind az első gyors pozitív, mind az azt követő negatív komponens kialakulását. Ha az akciós potenciál időtartamát nicorandillal, az ATP-szenzitív kálium csatorna gátlószerekkel ugyanilyen mértékben rövidítettük, a restitúciós görbe bifázisos jellege

megmaradt. Ugyanígy nem változott a görbe bifázisos lefutása az I_{to} gátlószereként használt 4-aminopyridin hatására sem.

3. Mindhárom speciesből izolált kamrai szívizomsejteken azonos kísérleti feltételek mellett határoztuk meg és hasonlítottuk össze a kalciumáram reaktivációs és az akciós potenciál időtartam restitutionós kinetikáját. A kalciumáram monoexponenciális reaktivációs időállandója hibahatáron belül egyezett a három vizsgált species szívizomsejtjein. Az akciós potenciál (szintén monoexponenciális) restitutionós kinetikája mindhárom esetben valamivel gyorsabb volt, mint a kalciumáram reaktivációjának kinetikája.

4. Nyúl kamrai sejteken az intracelluláris kalciumszint pufferelése a sejtbe juttatott kalcium-kelátor (EGTA vagy BAPTA) segítségével növelte az akciós potenciál időtartamát minden diasztolés időtartam mellett. A restitutionós kinetika nyúlra jellemző lassú negatív komponense kalcium-kelátor kezelés hatására eltűnt, míg a gyors pozitív komponens időállandója lényegesen nem változott.

5. Az intracelluláris térbe juttatott kalcium-kelátor (BAPTA) eltérő változást okozott kutya kamrai szívizomsejteken attól függően, hogy azok endokardiális, vagy epi-midmiokardiális eredetűek voltak. Az epi-midmiokardiális sejteken BAPTA hatására az akciós potenciál időtartam csökkent, míg endokardiális sejteken enyhén növekedett. Az endokardiális és epi-midmiokardiális sejtek restitutionós görbéi kontroll körülmények között kutyában hasonló kinetikát követtek, mindkét sejtípus esetén két (egy gyors és egy lassú) pozitív komponens összegeként voltak leírhatók. BAPTA kezelés hatására az epi-midmiokardiális sejteken az első, gyors pozitív komponens eltűnt, míg a második, lassú pozitív komponens előjelet váltott. Ezzel szemben endokardiális sejteken a restitutionós kinetika bifázissá vált BAPTA jelenlétében.

6. A restitutionós görbe lefutása függött az extrainger előtt alkalmazott kondicionáló ingerlés frekvenciájától („memory effect”). Multicelluláris nyúl kamrai preparátumokon az azonos diasztolés időtartamokat követően kiváltott extra akciós potenciálok időtartama 3.3 Hz kondicionáló frekvencia esetén mindig rövidebb volt, mint a 0.2 vagy 1 Hz kondicionáló frekvenciák mellett kapott értékek.

7. Hosszabb ingerlés-mentes periódus követően alkalmazott repetitív ingerlés után az akciós potenciál időtartama és a kalciumáram csúcsamplitúdója a másodiktól a nyolcadik stimulusig folyamatosan csökkent, míg az intracelluláris kalciumszint (szisztolés és diasztolés) ezzel párhuzamosan nőtt.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a nyúl kamrai restitúciós görbe fiziológias körülmények között tapasztalható bifázisos jellegének kialakulásához funkcióképes kalciumcsatorna valamint normális intracelluláris kalciumszint egyaránt szükséges. Az intracelluláris kalciumszint növekedése (pl. nagyfrekvenciájú ingerlés hatására) a kalciumáram gátlását és az akciós potenciál időtartamának csökkenését vonja maga után nyúl kamrai szívműködése során.

Elektromos restitúció vizsgálata humán kamrai és pitvari szívműködésben

1. A humán kamrai szívműködés restitúciós kinetikáját 4 exponenciális komponens összegeként illesztettük 42.5 ± 3.4 ms, 147 ± 6.5 ms, 1.44 ± 0.14 s és 14.4 ± 0.51 s időállandókkal. A pitvari szívműködés restitúciós görbét 3 exponens összegeként illesztettük (154 ± 9.9 ms, 1.52 ± 0.19 s és 25.5 ± 1.2 s időállandókkal). Tehát a kamrai szívműködés restitúciós kinetikájában megfigyelt első gyors komponens pitvari preparátumokon hiányzott, a pitvari preparátumok restitúciós kinetikájának első és második komponense megegyezett a kamrai preparátumok második és harmadik komponensével, míg a pitvari preparátumok restitúciós kinetikájának harmadik komponense szignifikánsan hosszabb volt, mint a kamrai preparátumok restitúciós kinetikájának negyedik komponense.

2. A kamrai restitúció első komponensét a kalciumáram idő-függő reaktivációjával, míg második komponensét a késői káliumáram deaktivációjával azonosítottuk. A pitvari első komponens hiányát a kalciumárammal párhuzamosan reaktiválódó – a pitvari preparátumokon hagyományosan intenzív - tranziens kálium áram jelenlétével magyarázzuk.

MEGBESZÉLÉS

A jelen értekezésben taglalt kísérletes munka arra a – meglehetősen komplex – kérdésre próbált választ keresni, hogy milyen tényezők (és milyen mértékben) szabályozzák a szívműködés elektromos és mechanikai paramétereinek frekvencia-függő változásait. Ellentétben

a hagyományos közvélekedéssel, amely az akciós potenciál időtartamának frekvencia-függő változásainak okát elsősorban a különböző preparátumokon expresszált káliumcsatornák heterogenitásában látja, megmutattuk, hogy ezekben a folyamatokban kiemelt szerep jut a kalciumcsatornáknak valamint az intracelluláris kalciumkoncentráció tranziens változásainak.

Emlősök kamrai szívmájában három főbb mechanizmus ismert, amely az intracelluláris kalciumkoncentráció függvényében módosítani képes az akciós potenciál időtartamát: (1) a nátrium-kalcium cseremechanizmus, (2) a kalcium-függő kloridáram, valamint (3) az L-típusú kalciumáram kalcium-függő inaktivációja és abból való visszatérése. A kloridáram aktiválódása rövidíti, a nátrium-kalcium cseremechanizmus aktiválódása nyújtja az akciós potenciált. A magas intracelluláris kalcium szint csökkenti az L-típusú kalciumáramot annak kalcium-függő inaktivációja miatt, azonban alacsony intracelluláris kalciumszint mellett annak mérsékelt emelkedése növelheti is a kalciumáramot.

Nyúl kamrai szívmáján végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az intracelluláris kalciumszint emelkedése az akciós potenciál időtartamának masszív csökkenésével járt együtt. Ezen eredmények tehát nem magyarázhatóak a nátrium-kalcium cseremechanizmus esetleges aktivációjával. A kalcium-függő kloridáram szerepe is kizárható, mert (1) a kloridcsatornákat gátló SITS nem befolyásolta érdemben sem az akciós potenciál időtartamát, sem magát a restitúciós folyamatot, (2) az áram aktiválódása során a plátófázis alatt egy kifelé irányuló, míg az akciós potenciál 90%-os repolarizációjánál egy befelé folyó áram jelenik meg, ami az APD_{50} és APD_{30} érték csökkenésben, és ezzel együtt az APD_{90} érték növekedésben nyilvánulna meg, azonban méréseink során ilyen jellegű eltéréseket egyetlen esetben sem láttunk.

Fentiek értelmében az egyetlen mechanizmus, amely az intracelluláris kalciumszint emelkedésekor csökkenteni képes az akciós potenciál időtartamát az L-típusú kalciumáram kalcium-függő inaktivációja. Az emelkedő intracelluláris kalciumszint általában gátolja az L-típusú kalciumáramot, de az L-típusú kalciumáram reaktivációja az intracelluláris kalciumkoncentráció bonyolult függvénye. Irodalmi adatok szerint a kalciumáram reaktivációs kinetikája egy korai szupernormális túllövést mutat kutya kamrai sejteken, amely kalcium-kelátor jelenlétében hiányzik. A nyúl kamrai szívmáj restitúciós kinetikájának vizsgálatakor (a konvencionális mikroelektrodatechnikával végzett kísérletekben a pipetta oldata mindig EGTA-mentes volt) a kontroll körülmények között tapasztalt bifázisos jelleg legalább részben magyarázható az L-típusú kalciumáram reaktivációjának túllövésével. Nyúlra a BAPTA hatására kialakuló restitúciós kinetikaváltozások alátámasztani látszanak ezt a feltevést.

Az intracelluláris kalciumszint restitúciós kinetikára kifejtett illetén szabályozó szerepének és a patkány kamrai szívműsejteken nifedipinnel végzett kísérleteink eredményeinek ismeretében nyilvánvaló, hogy a patkány kamrai szívmű restitúciós kinetikájában is kiemelt szerepet játszanak az intracelluláris kalciumszint-változások. Feltételezhető, hogy az első komponens időállandóját a kalciumáram inaktivációból történő visszatérése határozza meg, amelyet folyamatosan modulál az intracelluláris kalciumkoncentráció szimultán változása, míg a restitúció második fáziséért feltételezhetően az extrastimulust megelőző utolsó akciós potenciál által kiváltott kalciumtranziens relaxációja lehet felelős. A restitúciós görbe harmadik, lassú negatív komponensének mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Kísérleteinkben a harmadik komponens időállandója jól egyezett a kalciumtranziensek reaktivációs időállandójával. Ezek szerint a harmadik, késői negatív komponensért a fokozatosan növekvő kalciumtranziens okozta kalciumáram-csökkenés lehet felelős, amelynek rövidítő hatása erőteljesebb, mint az emelkedő intracelluláris kalciumszint okozta nátrium-kalcium csereáram intenzitásfokozódása miatt bekövetkező akciós potenciál időtartam-növekedés.

A patkány, nyúl, tengerimalac és kutya kamrai szívműn végzett kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a restitúciós kinetika alakításában az intracelluláris kalciumkoncentráció tranziens változásainak mindkét irányú hatása valószínűsíthető. Egyrészt az extrastimulust megelőző akciós potenciál által kiváltott kalciumtranziens csökkenti az L-típusú kalciumáram nagyságát, másrészt növeli a nátrium-kalcium csereáram intenzitását s ezen két áram aktuális aránya határozza meg a restitúciós kinetika alakulását. A kalciumáram intracelluláris kalciumkelátor jelenlétében meghatározott reaktivációs kinetikájában nem találtunk olyan különbségeket, amelyekkel az akciós potenciál időtartam restitúciójában észlelt nagyfokú heterogenitást meg lehetne magyarázni. A nyúl és patkányon végzett kísérleteink arra utalnak, hogy az észlelt diverzitás nem magyarázható a különböző típusú káliumcsatornák preparátumonkénti sajátos megoszlásával sem. Az intracelluláris kalciumkoncentráció által szabályozott – korábban már említett – ionáramok fajokénti megoszlása sajnálatos módon nincs kellően feltérképezve, ennek ellenére valószínűnek látszik, hogy az emlős szívmű restitúciós kinetikájában észlelt heterogenitás háttérben az intracelluláris kalcium kezelésében és a szarkoplazmatikus retikulum funkcionális és morfológiai tulajdonságaiban fellelhető különbségeknek jelentős szerepet kell tulajdonítanunk.

A kontrakciós erő frekvencia-függését különböző speciesekben vizsgálva azt találtuk, hogy a nyúlban és tengerimalacban kontroll körülmények között megfigyelt pozitív erő-

frekvencia összefüggés az akciós potenciál időtartamának rövidítésekor részlegesen megfordult, ami az intracelluláris nátriumkoncentráció növelésekor még kifejezettebbé vált. A patkányból származó preparátumok erő-frekvencia összefüggése kontroll körülmények között hasonló lefutást mutatott azzal, amit nyúl és tengerimalac preparátumokon észleltünk az akciós potenciál időtartamának rövidítése után. Azokban az esetekben, amikor az akciós potenciál időtartama lényegesen rövidebb, mint a kontrakciós idő, megnő a nátrium-kalcium cserediffúzió hajtóereje, mivel a sejtmembrán a kalciumtranziens tetőzésekor már jelentős mértékben repolarizálódott. Mindez a citoplazma - és ebből következően a szarkoplazmatikus retikulum - csökkent kalciumtartalmához vezet, ami a kontrakciós erő csökkenését vonja maga után.

Az akciós potenciál rövidítésekor megfigyelt kontrakciós erő-csökkenés a fenti jelenséggel magyarázható, azonban az erő-frekvencia összefüggés reverziója további magyarázatra szorul. A szívizom kontrakciója a citoplazmatikus kalciumkoncentráció átmeneti növekedésének következménye. A magasabb ingerlési frekvenciáknál észlelt pozitív erő-frekvencia összefüggés megjelenéséért részben az L-típusú kalciumcsatornák, részben a gyors nátrium csatornák gyakoribb megnyílása lehet felelős. Az ily módon megnövekedett kalcium beáramlás közvetlenül, míg a nátrium beáramlás a nátrium-kalcium cserediffúzió közvetítésével vezet az intracelluláris kalciumtartalom növekedéséhez. Az alacsonyabb ingerlési frekvenciák mellett patkányban észlelt negatív erő-frekvencia összefüggés megjelenéséért két további mechanizmus tehető felelőssé: a szarkoplazmatikus retikulum kalciumcsatornáinak (ryanodine-receptorainak) idő-függő reaktivációja, valamint a kalcium idő-függő továbbítása a szarkoplazmatikus retikulumon belül a felvevőhelyekről a kibocsájtó helyekre.

Az még nem világos, hogy ezen mechanizmusok viszonylagos jelentősége hogyan változik meg az ingerlési frekvencia módosításakor, de a levkromakalimmal nyert eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy, hogy az akciós potenciál időtartam változásai döntő szerepet játszanak az erő-frekvencia összefüggés alakításában is. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a patkányban észlelt fordított erő-frekvencia összefüggés nem eredendően interspecies különbség, hanem a patkányszívre jellemző rövid akciós potenciál és magasabb intracelluláris nátriumkoncentráció kombinációjának következménye. Emlős szívizomban mindkét tényező a kontraktilis erő frekvencia-függésének fontos szabályozója. Úgy tűnik, hogy e két tényező közül az akciós potenciál időtartam változásaink kell nagyobb jelentőséget tulajdoníthatunk.

A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK

1. Szigligeti P, Pankucsi C, Bányász T, Varró A, Nánási PP: Action potential duration and force-frequency relationship in isolated rabbit, guinea pig and rat cardiac muscle. *J Comp Physiol B* 1996;166:150-155.
2. Nánási PP, Pankucsi C, Bányász T, Szigligeti P, Papp JG, Varró A: Electrical restitution in rat ventricular muscle. *Acta Physiol Scand* 1996;158:143-153.
3. Bányász T, Magyar J, Szigligeti P, Pankucsi C, Varró A, Nánási PP: Frequency-dependent characteristics of human cardiac muscle. *Exp Clin Cardiol* 1997;2:205-209.
4. Szigligeti P, Bányász T, Magyar J, Szigeti Gy, Papp Z, Varró A, Nánási PP: Intracellular calcium and electrical restitution in mammalian cardiac cells. *Acta Physiol Scand* 1998;163:139-147.
5. Szigligeti P, Bányász T, Magyar J, Varró A, Nánási PP: Effect of chelation of cytosolic calcium on action potential duration and electrical restitution in dog rabbit and rat ventricular myocytes. XIII. World Congress of Cardiology - Free Papers 1998, 207-211.