

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Adrenerg stimuláció hatása a szívműködés akciók potenciáljára, és az őket kialakító ionáramokra

Dr. Ruzsnavszky Ferenc

Témavezető: Prof. Dr. Magyar János



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Az értekezésben gyakran használt rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
Irodalmi áttekintés	6
Az adrenerg receptorok	6
A β -adrenerg receptorokhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak.....	9
Az akciós potenciál létrehozásában résztvevő ionáramok	13
A kamrai akciós potenciálok morfológiája; regionális különbségek	15
Akciós potenciálok morfológiájának változása β -adrenerg stimuláció hatására	16
Feszültségfüggő ionáramok és –csatornák a szívizomsejteken.....	17
Feszültségfüggő kalciumáramok a szívizomsejteken	17
Feszültségfüggő káliumcsatornák	21
Célkitűzés	32
Anyagok és módszerek	33
Kutya bal kamrai szívizomsejtek izolálása	33
Elektrofiziológiai mérések izolált sejteken	34
Hagyományos feszültség-clamp mérések	36
Akciós potenciál mérések.....	39
Akciós potenciál voltage clamp	40
Az analízis során felhasznált matematikai formulák.....	41
Statisztikai elemzés	41
Eredmények	42
Izoproterenol hatása az AP morfológiára	42
Az izoproterenol hatása függ az AP morfológiájától és az ingerlési frekvenciától	43
Az izoproterenol módosító hatásában részt vevő ionáramok azonosítása	46
A csatornák foszforiláltságának szerepe a gátlószerek hatékonyságában.....	54
Izoproterenol időfüggő hatásai az akciós potenciál morfológiájára.....	55
Az ISO hatására bekövetkező AP-változások az ionáramok időfüggő változásának a következménye	57
A jelet közvetítő β -adrenerg receptorok azonosítása	58
A β receptorok szerepe az ISO okozta változások kinetikájában.....	60
A foszfodiészteráz barrier szerepének vizsgálata.....	64
Megbeszélés	65
Összefoglalás	71
Summary	72
Irodalomjegyzék	73
Tárgyszavak	83
Köszönetnyilvánítás	85

Az értekezésben gyakran használt rövidítések jegyzéke

AC:	adenilát-cikláz
4-AP:	4-aminopyridin
AP:	akciós potenciál
APD:	az akciós potenciál időtartama
APD _x :	az AP kezdetétől mért azon időtartam, mely az AP amplitúdójához képest mért x%-os repolarizációig telt el
ATP:	adenozin-trifoszfát
cAMP:	ciklikus adenzin monofoszfát
CGP-20712A:	2-hydroxy-5-[2-[[2-hydroxy-3-[4-[1-methyl-4-(trifluoromethyl)imidazol-2-yl]phenoxy]propyl]amino]ethoxy]benzamide
DAG:	diacil-glicerol
E-4031:	1-[2-(6-Methyl-2pyridil)ethyl]-4-(4-methylsulfonyl aminobenzoyl)piperidine
EGTA:	etilén-glikol tetraecetsav, 3,12-bis(carboxymethyl)-6,9-dioxa-3,12-diazatetradecanedioic acid
EPAC:	„Exchange Protein directly Activated by cAMP”, cAMP aktivált kicserélő fehérje
HEPES:	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid
HMR-1556:	N-[(3R,4S)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-6-(4,4,4-trifluorobutoxy)chroman-4-yl]-N-methylethanesulfonamide
IBMX:	izobutil-metilxantin, 1-methyl-3-(2-methylpropyl)-2,3,6,9-tetrahydro-1H-purine-2,6-dione
I _{Ca,L} :	L-típusú kalciumcsatornákon átfolyó áram
I _{NCX} :	Nátrium/kalcium ATPáz által létrehozott áram
ICI 118,551:	(2R,3R)-1-[(7-methyl-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)oxy]-3-(propan-2-ylamino) butan-2-ol; hydrochloride
I _{Kr} :	késői egyenirányító káliumáram gyorsan aktiválódó komponense
I _{Ks} :	késői egyenirányító káliumáram lassan aktiválódó komponense
I _{K1} :	befelé egyenirányító K ⁺ csatornák által létrehozott áram
I _{to} :	tranziens, kifelé irányuló káliumáram („transient outward current”)
ISO:	izoproterenol, (RS)-4-[1-hydroxy-2-(isopropylamino)ethyl]benzene-1,2-diol
LQT:	long QT-szindróma
PKA:	protein kináz A
PKC:	protein kináz C
PLB:	foszfolambán
PLC:	foszfolipáz C

Bevezetés

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

Az adrenerg aktivációra kifejlődő jól ismert pozitív tróphatásokat megelőzően több ionáram jelentősen fokozódik kamrai szívizomsejteken [4], így az L-típusú kalciumáram ($I_{Ca,L}$) [5], a késői egyenirányító káliumáram lassú (I_{Ks}) [6] és gyors (I_{Kr}) komponense [7].

Keveset tudunk az izoproterenol I_{Kr} és I_{Ks} fokozásának kinetikájáról, ugyanakkor a K^+ és Ca^{2+} áramok egymáshoz viszonyított időbeli aktivációja fontos szerepet játszhat az adrenerg aktiváció proaritmias veszélyének létrehozásában [8].

Az adrenerg stimulációra bekövetkező akciós potenciál (AP) változások nem kellően dokumentáltak, és jelentős eltérések vannak a különböző speciesek között. Az akciós potenciál időtartama (APD) nő pl. sertés [9], patkány [10] és tengerimalac [11] kamrai szívizomsejteken, míg az APD csökken nyúl [5], kutya [6], macska [12], és humán [13] 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 a tranziens outward káliumáram (I_{to}) 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 szívműködéseinek használatát a kísérletek során az indokolta, hogy a kutya kardiomiociták ionáramai a humánéhoz nagyon hasonlóak [14].

Eredményeink megmutatták, hogy az izoproterenol akciós potenciál-paramétereit befolyásoló hatása nagymértékben függ a kiindulási AP morfológiájától, emellett a hatás fordított frekvenciafüggő.

Kimutattuk, hogy kutya kamrai szívműködéseken az izoproterenol akciós potenciált rövidítő hatásáért elsősorban az izoproterenol által aktivált I_{Ks} (nem pedig az I_{Kr}) fokozása a felelős. Az ISO okozta I_{Kr} és I_{Ks} amplitúdó változása jelentősen lassabb az I_{Ca} -hoz képest, ami magyarázható a résztvevő jelátviteli útvonalak eltéréseivel, illetve a cAMP intracelluláris kompartmentalizációjával. Megállapítottuk, hogy az ISO káliumáramokat fokozó hatásáért a β_1 , kalciumáramot fokozó hatásáért pedig mind a β_1 , mind pedig a β_2 receptorok által mediált jelátviteli útvonalak felelősek.

Irodalmi áttekintés

Az adrenerg receptorok

Az adrenerg receptorok az úgynevezett 7-transzmembrán (7-TM) receptorok szupercsaládjához tartoznak. Közös tulajdonságuk, hogy a sejtfelszíni membránban helyezkednek el, és azon 7 α -hélix szakasszal lépnek át. A receptorfehérjék intracelluláris C-terminálisa felelős a G-fehérje kötéséért. Agonista kötődésére megváltozik a receptor szerkezete, ami lehetővé teszi a receptor és a G proteinek kapcsolódását [15].

Az adrenerg receptorokat osztályozhatjuk ligandaffinitásuk és aminosav-szekvenciájuk alapján, így α és β -adrenerg receptorokról beszélhetünk [16]. Az alfa-receptorok α_1 , és α_2 receptorokra oszthatóak, de aminosav homológia alapján mindkét típusnak léteznek további altípusai. β receptorok közül β_1 , β_2 és β_3 adrenerg receptorokat ismerünk.

Az α_1 -adrenerg receptorok megtalálhatóak a szívizomsejteken is, bár számuk kicsi a β -adrenerg receptorokhoz viszonyítva. A receptorok a szíven pozitív kronotóp hatást közvetítenek. Fontos szerepük van emellett a simaizomsejtek kontrakciójában. Az α_1 adrenerg receptoroknak további három altípusa ismert, α_{1A} , α_{1B} , és α_{1D} [17]. Valamennyien a G-fehérjék Gq altípusán keresztül aktiválják a foszfolipáz C (PLC), a foszfolipáz A2 (PLA2) és foszfolipáz D jelátviteli útvonalakat [18]. A receptorok emellett befolyásolják a MAPK útvonalakat is. Agonistáik a noradrenalin, fenilefrin, methoxamin, cirazolin, naphazolin és xylometazolin. Antagonistáik közül a prazosin, alfuzosin, doxazosin, phenoxybenzamin és phentolamin a legjelentősebbek [19].

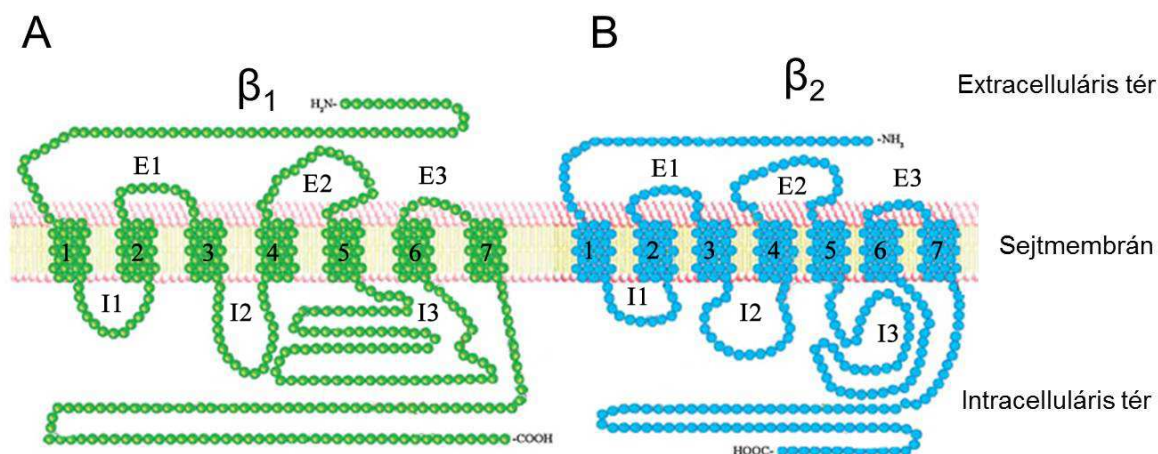
Az α_2 -adrenerg receptoroknak is három altípusuk van, α_{2A} , α_{2B} , és α_{2C} . Valamennyien a G_i fehérjéhez kapcsolódnak és a membránkötött adenilát-cikláz (AC) aktivitását gátolva csökkentik az intracelluláris cAMP szintet. A receptorok központi idegrendszerben sokfelé megtalálhatóak, emellett zsírsejteken, valamint a gasztrointesztinális traktus, és bizonyos erek simaizmain is kimutathatóak. Agonistáik a noradrenalin, dexmedetomidin, a medetomidin, a romifidin, a clonidin és a xylazin. Antagonistái többek között a yohimbin, idazoxan és az α_1 receptorokat is gátló phentolamin. A cirazolin az α_1 receptorok aktiválása mellett gátolja az α_2 receptorokat [19, 20].

A β receptor izomerek, ellentétben az α adrenerg receptorokkal, valamennyien G_s fehérjéhez kapcsolódnak, és növeli a sejtek adenilát-cikláz aktivitását, ezen keresztül az intracelluláris cAMP szintet.

A β_1 adrenerg receptort a 10. kromoszómán (10q24-26) elhelyezkedő ARDB1 gén kódolja (1. ábra). A β_1 receptorok a szervezetben változatos hatásokat közvetítenek. A vese juxtaglomeruláris sejtjein fokozzák a reninválasztást, és a ghrelin elválasztását a gyomor P/D1 sejtjein. A szívizmon a β_1 adrenerg receptor kimutatható a szinuszcsozó, atrioventrikuláris csomó sejtjein, a Purkinje-rostokon, valamint a pitvari és kamrai munkaizomrostokon is. Fiatal felnőtt, egészséges humán szíven a legtöbb β receptor (86%) β_1 , míg a fennmaradó β receptorok túlnyomórészt (mintegy 14%-ban) β_2 [21]. Ez a fiatalkori β_1/β_2 receptor arány szinte megegyezik a kutya szíven megfigyelt β receptor-altípusok 85-15%-os előfordulásával [22]. Idősebb korban a β_1/β_2 arány 1:1-re csökken, feltehetően a β_1 downregulációja miatt [23]. A β_1 adrenerg receptorok aktiválódása a szíven pozitív tróphatásokat közvetít, többek között pozitív chronotróp, dromotróp, inotróp, luzitrop és bathmotróp hatású. Agonistái az adrenalin, izoproterenol, dobutamin, denopamin és xamoterol. Antagonistái közé tartoznak a gyógyszerként használt II. osztályú antiaritmiás szerek. A klinikumban szelektív és nem szelektív antagonistáit egyaránt használják. Szelektív gátlószerei az atenolol, bisoprolol, betaxolol, metoprolol, nebivolol, stb [19]. Kísérletes körülmények között CGP-20712A-val is specifikusan blokkolható.

A β_2 receptorok nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutatnak a β_1 receptorokkal [24] (1. ábra). A receptort az ARDB2 gén kódolja, mely az 5q31-32 locuson helyezkedik el. A β_2 receptor számos helyen előfordul a szervezetben, legismertebb előfordulási helye a különböző elhelyezkedésű simaizom-sejtek, ahol általában relaxációt közvetítenek, így megtalálhatóak a bronchusokban, erekben és üreges szervekben jelen levő simaizomsejteken, de előfordulnak májsejteken, nyálmirigysejteken és szívizomsejteken is. Aktiválódásuk a szívizomrostokon a β_1 receptorokhoz hasonlóan pozitív tróphatásokat közvetít. A β_2 receptorok aktiválása a pitvarokban maximális inotróp választ hoz létre, a kamrákban azonban a maximálisnál kisebb választ eredményez [25]. A receptorokat aktiválja alacsony koncentrációjú adrenalin, és a kísérletekben gyakran használt izoproterenol. Más agonistáit a klinikumban asthmaellenes és tokolitikus gyógyszerekként használják, ilyen például a salbutamol, salmeterol, terbutalin és a ritodrin. Szelektív antagonistái az ICI 118,551 és a butoxamin, de az összes nemszelektív II. osztályú antiaritmiás szer (propranolol, sotalol, nadolol) is gátolja [19].

A β_3 -receptorokat az ARDB3 gén kódolja, ami a 8. kromoszómán (8p12) helyezkedik el. A receptorok legismertebb előfordulási helye a zsír és barnazsír-szövet, szerepük itt a hőtermelés



1. ábra: A humán β_1 -adrenerg receptorok szerkezete. **A:** β_1 adrenerg receptor szerkezete. **B:** β_2 adrenerg receptor szerkezete. A humán β_1 adrenerg receptor 477, míg a β_2 413 aminosavból áll, az ábrán egy kör egy aminosavat jelöl. Mindkét receptornál a C-terminális vég az extracelluláris, míg az N-terminális az intracelluláris térben van. A hidrofób transzmembrán szegmenseket számok jelölik, a ligandkötő zseb kialakításában valamennyi transzmembrán szegmens szerepet játszik. Az I1-3 az intracelluláris, míg az E1-3 az extracelluláris hurkokat jelöli. A G-protein aktiválásért az I3-as hurok, és az N-terminális 7. transzmembrán szegmenshez közeli része felelős. A fehérjék N-terminális végén találhatóak a PKA, és a β -adrenerg receptor kinázok foszforilációs helyei.

A nagymértékű szerkezeti hasonlóság ellenére a két receptor aminosav-sorrendje csak 54%-ban egyezik meg. További különbség a két receptor között, hogy a β_1 adrenerg receptor hasonló affinitású adrenalinra és noradrenalinra is, míg a β_2 receptor a noradrenalinhoz képest mintegy 30-szor nagyobb affinitással köti az adrenalint.

Taylor munkája alapján módosítva [3].

és a lipolízis fokozása. A receptorok valószínűleg előfordulnak neuronokon is, központi idegrendszeri fiziológiás szerepük még nem tisztázott [26]. A β_3 receptorokat kimutatták az epe- és a húgyhólyag falában, ahol relaxáló hatást közvetítenek, valamint az agy zsírszövetében és a szívizomsejteken is. Szívizomsejteken is kimutatták a jelenlétüket, ahol a szívelégtelenség miatti szívizom-átépülés folyamatában vehetnek részt. A receptor funkciója a szívizmon nem tisztázott, egyes szerzők az átépülés okaként, mások a kompenzatórikus, de később kimerülő védőmechanizmusként látják a szerepét [27]. A receptor specifikus agonistái az amibegron, solabegron és nebivolol. Antagonistája a SR 59230A, ami azonban α_1 -gátlással is rendelkezik.

A β -adrenerg receptorokra jellemző az úgynevezett deszenzitizáció, mely során változatlan agonista koncentráció mellett, idővel csökken a kiváltott válasz. A jelátviteli útvonalat rövidtávon gátolja a receptor és G_s -fehérjék interakciójának megakadályozása (uncoupling), hosszú távon pedig a receptorok downregulációja. Az uncoupling a β receptorok foszforilációjával történik. Ezt két fehérje befolyásolja, a protein kináz A (PKA), mely a receptorok heterológ deszenzitizációját okozza, és a β -adrenerg receptor kináz 1-es típusa (β ARK1 vagy GRK2), ami homológ deszenzitizációt közvetít [28].

A β -adrenerg receptorokhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak

A β -adrenerg receptorok szívizomsejteken számos jelátviteli útvonalat aktiválnak, többek között a cAMP/PKA útvonalat, a PLC/PKC útvonalat, a MAPK, EPAC, és PI3K útvonalakat, emellett befolyásolják még a NO szintázokat, és a TGF- β szignalizációt is [27].

Az intracelluláris jelátviteli útvonalak végső közös útja a fehérje-foszforiláció, illetve defoszforiláció. Protein-kinázok katalizálják a foszforilációs folyamatokat, a fehérjék foszforiláltságát különböző foszfatázok szüntetik meg. A két enzimaktivitás eredője határozza meg a fehérjék foszforiláltságát és ezen keresztül azok aktivitását. A csatornafehérjék foszforilációját meghatározó legfontosabb útvonalak a cAMP/PKA útvonal, a PLC/PKC és az EPAC útvonal.

A cAMP/PKA útvonal

A cAMP/PKA útvonal a G_s és G_i fehérjékhez kapcsolt. A G_s növeli, míg a G_i csökkenti az adenilát cikláz (AC) aktivitását, és ezen keresztül az intracelluláris cAMP koncentrációt (2. ábra).

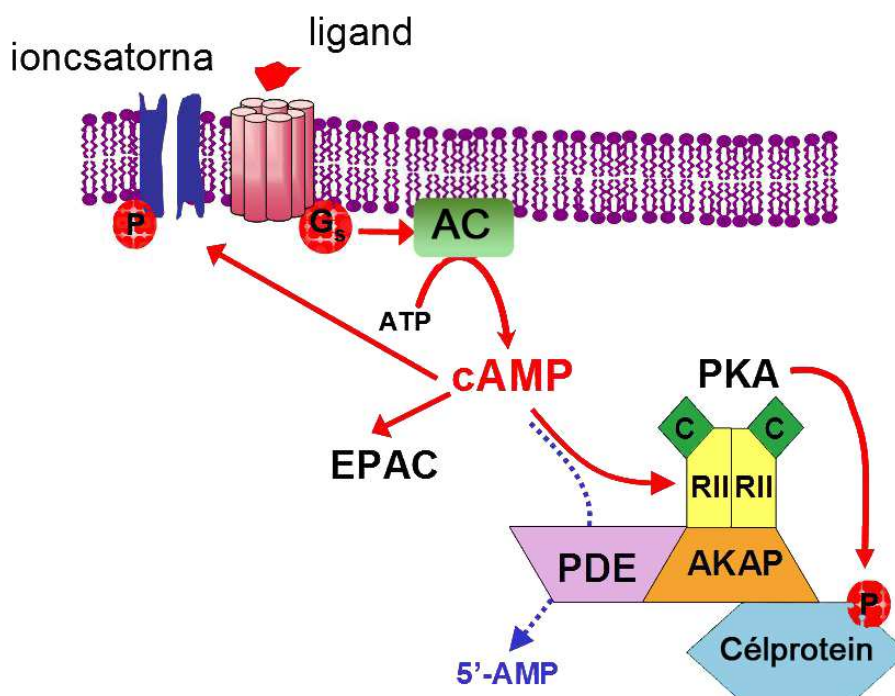
Az adenilát-cikláz enzimek aktivációjukkor az ATP-ből cAMP-t állítanak elő. Az AC enzimsaládnak kilenc membránhoz horgonyzott, [29] és egy szolubilis tagja (AC10) ismert [30]. Az egyes enzimeket 1-től 10-ig terjedő számokkal különböztetik meg.

A G proteinek az adenilát-cikláz membránhoz kötött formáinak (AC1-9) aktivitását szabályozzák míg szolubilis adenilát-cikláz (AC10) működését nem a G-fehérjék, hanem az intracelluláris pH-ra a bikarbonát koncentrációváltozásán keresztül befolyásolja [31].

Egyes adenilát cikláz izoformák (AC1, AC3, AC5, AC6 és AC9) aktivitását az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változása is befolyásolja, így az érintett jelátviteli útvonalakat a kalcium modulálhatja [32].

A szívizomban az AC 4, 5, 6 és 7-es izoformák expresszióját írták le. Közülük a legnagyobb mennyiségben az ötös és hatos izoforma fordul elő szívizomsejteken. Az expresszáldott AC izoformák mennyisége nem állandó, az életkor előrehaladtával az AC5 szintje növekszik, az AC6 szintje nem változik. Ugyanakkor patológiás körülmények között is változhat az izoformák aránya, pl. szívelégtelenségben az AC5 szintje változatlan marad, míg az AC6 expressziója csökken [33].

A cAMP-t a foszfodiészteráz (PDE) enzimek bontják 5'AMP-vé. A két enzimes család tagjai (aktivált adenilát-ciklázok és a foszfodiészterázok) együttesen határozza meg a tényleges cAMP szintet. A foszfodiészterázoknak is számos, eltérő aktivitású izoformája létezik, közülük a szívizomsejtekben a PDE1-4 fordul elő. Azon túl, hogy mindegyik izoforma bontja a cAMP-t, a PDE1 emellett cGMP-t is bont. A foszfodiészterázok speciális szubmembrán elhelyezkedését írták le a szívizomban [34], ezáltal térben behatárolhatják a cAMP függő jelátviteli útvonalakat.



2. ábra: Az adenilát-cikláz útvonal. A sejtmembrán 7-TM receptorai ligandkötésükkor G_s -fehérjéken keresztül aktiválják az adenilát cikláz (AC), ami növeli a sejt cAMP szintjét. A cAMP közvetlen ioncsatorna hatásai mellett aktiválja a protein kináz A-t (PKA), és hozzájárul az EPAC útvonal aktiválásához. A PKA membránköötött formában, vagy AKAP proteinek segítségével a célmolekulához asszociáltan található, így tudja specifikusan foszforilálni az egyes fehérjéket. A cAMP elbomlását a foszfodiészterázok (PDE) biztosítják.

A cAMP aktiválja a protein kináz A enzimeket, amelyek számos sejt folyamatban, így többek között a sejtanyagcserében, génátírásban, a sejtciklus és az apoptózis szabályozásában is részt vesznek. Az inaktív PKA enzimnek két katalitikus (C) alegységből, és a hozzájuk kapcsolt két regulatórikus (R) alegységből áll. A katalitikus fehérjéknek három izoformája ($C\alpha$, $C\beta$ és $C\gamma$), a regulatórikus alegységeknek pedig négy izoformája ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$ és $RII\beta$) ismert. Az R-alegységek homo- vagy heterodimert alkotnak, két-két cAMP kötő helyet tartalmaznak, amelyek kooperálva kötik a cAMP-t. cAMP kötésekor az R-alegységek leválnak a C-alegységekről, így a szabaddá váló katalitikus alegységek a gátlás alól

felszabadulnak. A PKA enzimnek két típusát különböztetjük meg, a PKA1 RI, míg a PKA2-t RII regulatórikus alegységeket alkotják.

A PKA1 főként citoplazmatikus enzim, míg a PKA2 különböző sejtorganellek membránjához kihorgonyozva található. A PKA2 membránhoz kötéséért az AKAP fehérjék felelősek. Ezek a horgonyzó fehérjék lokalizálják az enzim működését, és biztosítják a PKA2 enzim célspecificitását. A kihorgonyozott PKA fehérjék ugyanis csak a közelükben lévő fehérjék működését képesek befolyásolni, köztük a feszültség-függő ioncsatornákét is [35]. A PKA emellett foszforilálja a β_2 receptort [36], az SR membrán ryanodinreceptorát (RyR₂) [37], a foszfolambánt (PLB) [38], a troponin I-t, és a miozinkötő protein C-t is [39]. A PKA mediált foszforiláció rendszerint stimulálja a fehérjék működését, így a RyR₂ foszforilációja növeli a csatorna aktivitását. A PLB – ami a szarkoendoplazmatikus retikulum Ca^{2+} ATP-áz (SERCA2a) egyik legfontosabb regulátora - foszforilációja az általa fenntartott gátlás felfüggesztése révén növeli a SR kalcium-pumpa aktivitását [25]. A foszforiláció hatásai nemcsak aktiválóak, hanem gátlóak is lehetnek, így például a β_2 receptor foszforilációja a receptor G-fehérje kötését csökkenti, és elősegíti a receptor internalizációját is. A K_v1.4, K_v4.2 és K_v4.3 csatornafehérjék foszforilációjakor pedig az I_{to} áram csökken [40].

A PLC/PKC útvonal

Bizonyos 7-TM receptorok, mint például az α_1 adrenerg receptor, és az 1-es, 3-as típusú muszkarinos receptorok Gq fehérjéhez kapcsolnak, ezen keresztül aktiválják a foszfolipáz C-t (PLC).

Az aktivált PLC a membrán foszfionozitol-biszfoszfát (PIP₂) tartalmát inozitol-1,3,5-trifoszfáttá (IP₃) és diacil-glicerollá (DAG) bontja. Az IP₃ a DAG-gal együtt aktiválja a sejt egyes protein kináz C (PKC) enzimeit, emellett növeli az intracelluláris kalcium koncentrációt is. Szívizomsejtekben az így felszabadított kalcium szerepe elhanyagolható a kontrakció kiváltásában, azonban számos sejtfunkció szabályozásában szerepel, ezen kívül szükséges az ún. klasszikus PKC izoformák aktiválásához is. A protein kináz C enzimek szerin/treonin kinázok. Eddig 12 PKC izoenzimet írtak le [41]. Néhány PKC izoforma aktiválásában az IP₃ is részt vehet, egyfelől direkt módon, másrészt indirekt úton, a kalcium koncentráció növelésén keresztül. A DAG lipofil molekula, a sejtmembránhoz kötött PKC fehérjét aktiválja.

A PKC izoenzimok különböző alcsoportokba sorolhatóak [41]. Az első alcsoportba az ún. klasszikus protein kináz C (cPKC) altípusok tartoznak. Közös tulajdonságuk, hogy működésük Ca^{2+} , foszfolipid, és DAG/forbolészter függő [42]. Ebbe a csoportba tartoznak a PKC α , PKC β I, PKC β II (melyek splice variánsok) és PKC γ enzimek. A novel alcsoportba (nPKC) tartozó izoenzimokból hiányzik a C2 kalciumkötő domén, aktiválásukhoz a kalcium nem szükséges, csak DAG és foszfolipidek. Ide sorolják a PKC δ , PKC ϵ , PKC η és PKC θ típusokat.

A harmadik, atípusos PKC alcsoport aktivációja jelentősen eltérő, nem aktiválhatóak sem diacil-glicerollal, sem kalciummal. IP₃ [43], foszfatidil-szerin [44] és angiotenzin II [45] képes őket aktiválni. Közéjük tartozik a PKC λ /I és a PKC ζ .

Létezik egy negyedik PKC alcsoport is, melynek tagjai a vPKC és μ PKC. A vPKC izoformát számos szövetben, így szívizomszövetben is kimutatták. Ubiquitínáltsága és felépítése alapján alapvető „háztartási” funkcióját feltételezik [46].

Az aktivált PKC enzimek számos fehérje foszforilációjára képesek, ezen keresztül befolyásolják a sejtnövekedést, az idegsejtek ingerelhetőségét és az immunfolyamatokat. Aktivációjuk simaizom kontrakcióhoz és különböző szekretoros sejteken szekréciófokozáshoz (nyál, könny) vezet.

A szívizomsejtek PKC izoenzim összetétele faj- és korfüggő. Expressziójukat, illetve aktivitásukat a szívizmot érő károsodások is módosítják. A vizsgálatok eredményei gyakran ellentmondanak egymásnak, humán szíven a klasszikus PKC α , a novel δ , ϵ , θ és az atípusos ζ és λ formákat találták meg. Emellett különböző kórfolyamatokban megjelenik a PKC β is [47].

A legtöbb szívizom-preparátumban a PKC α a legnagyobb mennyiségben megtalálható izoforma. Fiziológias szerepe a kontraktilitás szabályozásában lehet [48]. Expressziója, illetve aktivitása megnövekszik hipertrófiás, szívelégtelen, vagy a szívizomzatot károsító modellekben [41, 49].

A PKC β valószínűleg nem található meg egészséges humán miocitákban, [47] azonban végstádiumú szívelégtelenségben, és kontrollálatlan diabeteszben is kimutatható [49, 50]. A PKC δ szerepét feltételezik a reperfúziós károsodás okozásában, specifikus blokkolása koronária-intervenció során azonban nem váltotta be a hozzáfűzött reményeket [51].

A PKC ϵ szerepét szintén az iszkémiát követő reperfúzióhoz kötik, a PKC δ -val ellentétben védőhatása lehet a reperfúziós károsodással szemben [52].

A ζ forma szintén megjelenik embrionális szívizomsejtekben, de nem zárható ki a PKC λ -val történő keresztreakciója [53].

Emellett a PKC η -t kimutatták tenyésztett embrionális kamrai szívizomsejtekben, és kifejezett nyúl, valamint patkány szívizom lizátumában [47].

Az EPAC útvonal

A cAMP nemcsak a protein kináz A enzimeket, hanem emellett egyéb fehérjéket is képes aktiválni, ilyen fehérje például az EPAC [54]. Az EPAC, vagy „*Exchange Protein directly Activated by cAMP*” a monomer G proteinek GDP disszociációját és GTP kötését katalizálja. Elsősorban membránhoz asszociáltak, de előfordulnak a mikrotubulusok közelében is. Két típusuk ismert, az EPAC1 és EPAC2. A két forma expressziója sejttípustól függ, a szívizomban főként az EPAC1 fordul elő [55].

Az EPAC fehérjék két cAMP kötőhellyel rendelkeznek, egy nagy affinitású cAMP kötőhely mellett egy kis affinitású kötőhelyük is van. Ez a kis affinitású, másodlagos cAMP kötő domén valószínűleg a PKA aktivációban játszik szerepet [56].

A fehérjék fontos funkciója az R-Ras és a Rap1/RhoA monomer G proteinek aktivációja, ezen keresztül szerepük van az integrinek működésében, a sejtpolaritás kialakításában, a sejtadhézióban, a migrációban, és a sejt alakjának megváltoztatásában. A Rap1-en keresztül aktiválhatják a PKC-t is [57]. Az EPAC fehérjék emellett közvetlenül aktiválják a SERCA pumpát és a RyR₂-t, ezáltal modulálhatják az excitációs-kontrakciós kapcsolatot és az intracelluláris kalcium homeosztázist is [58].

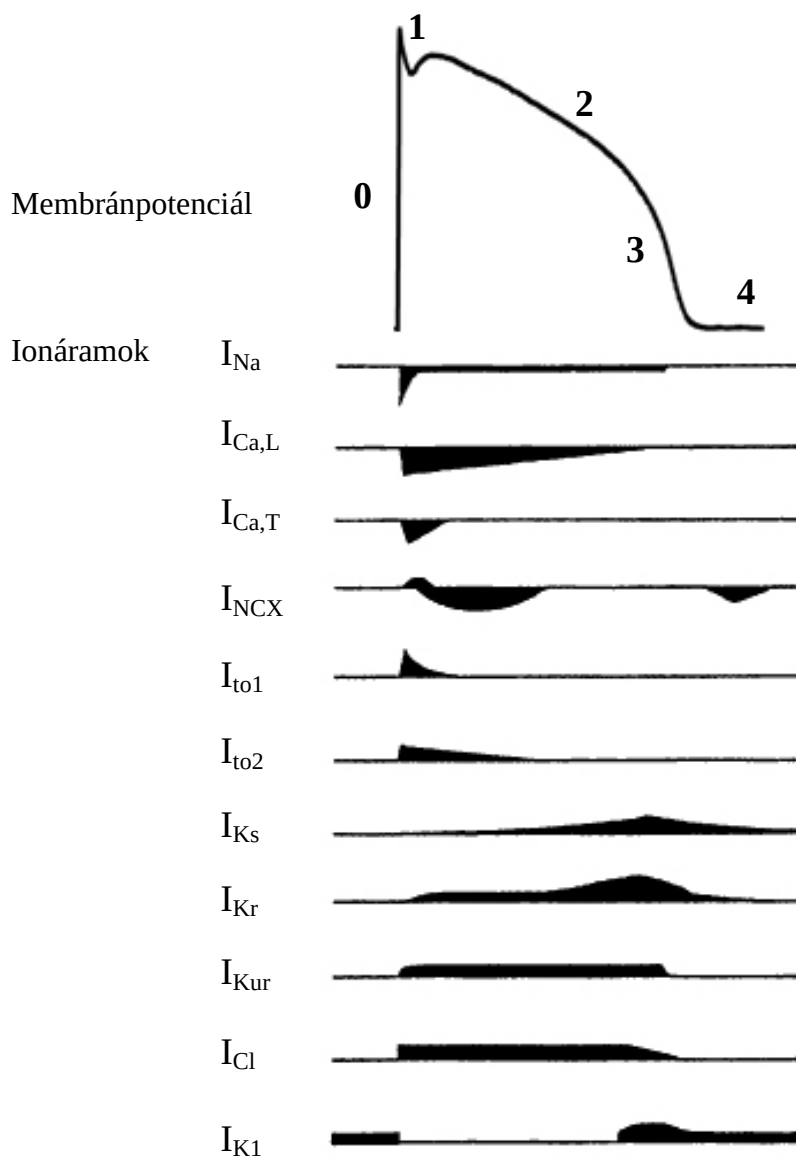
Az akciós potenciál létrehozásában résztvevő ionáramok

A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálját (AP) számos ionáram együttesen alakítja ki (3. ábra) [59]. Ezek az ionáramok az akciós potenciál különböző fázisaiban aktiválódnak, és különböző hatással bírnak annak lefutására.

A kamraizomsejtek elektromos tevékenységét öt fázisra osztjuk (3. ábra). A nem ingerelt kamrai szívizomsejtekre jellemző a nagy nyugalmi K⁺ konduktancia, amiért a befelé egyenirányító káliumcsatornák (I_{K1}) felelősek.

Az akciós potenciál nulladik fázisa alatt idő-, és feszültségfüggő gyors Na⁺ csatornák aktiválódnak, sokszorosára növelve a nyugalomban alacsony Na⁺ konduktanciát. A Na⁺ ionokra jelentős elektrokémiai hajtóerő hat, ezáltal a csatorna nyitása jelentős befelé irányuló

áramot eredményez, így a membránpotenciál értéke a Na^+ egyensúlyi potenciálja felé mozdul el, aminek következtében a sejtmembrán depolarizálódik, ez alkotja az AP felszálló szárát. A gyors Na^+ csatornák a depolarizáció hatására gyorsan inaktiválódnak, az ismételt ingerelhetőséget - a kiindulási zárt állapotukat - csak a membrán repolarizációja során érik el újra.



3. ábra: A kamrai szívizomsejtek akciós potenciáljának fázisai és az ezeket létrehozó ionáramok. Az AP mellett feltüntetett arab számok az AP egyes fázisait jelölik. Varró és munkatársai munkája alapján módosítva [2].

A gyors Na^+ csatornák által okozott depolarizáció következtében bizonyos áramokért felelős ioncsatornák aktiválódnak, míg mások inaktiválódnak. A nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős nagy K^+ konduktancia (befelé egyenirányító K^+ csatornák) lecsökken a befelé történő egyenirányítás miatt, ez megakadályozza repolarizáló hatású K^+ áram létrejöttét

a nulladik fázis alatt. Az akciós potenciál felszálló szárát követő korai, gyors repolarizációt a Na^+ -csatornák gyors inaktivációja és a depolarizációra aktiválódó korai, kifelé irányuló áram („*transient outward current*”, I_{to}) megjelenése teszi lehetővé. Ez a repolarizáló hatású áram a felelős az akciós potenciál 1. fázisának a kialakításáért, mely egy gyors, rövid ideig tartó és csak részleges repolarizáció.

A Na^+ -csatornák által kiváltott depolarizáció tartós fennállása aktiválja a hosszú ideig nyitva tartó („*long lasting*”, $I_{\text{Ca,L}}$) feszültségfüggő kalciumcsatornákat. Ez a depolarizáló hatású áram a membránpotenciált ismét pozitívabb irányba mozdítja (az AP plató fázisa). A plató fázis alatt nincsen jelentősebb mértékű repolarizáció az I_{to} gyors inaktiválódása és a különböző repolarizáló K^+ csatornák lassú aktivációja miatt (2. fázis).

Az AP harmadik fázisában kezdődik meg a repolarizációs folyamat, amely az AP negyedik fázisára visszaállítja a membránpotenciál nyugalmi értékét. A repolarizációban számos áram vesz részt. A repolarizáció kezdetén a feszültségfüggő kalciumcsatornákon keresztül átfolyó áram (I_{Ca}) inaktivációja mellett a késői egyenirányító K^+ áram („*delayed rectifier*”, I_{K}) gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponenseinek egyre nagyobb mértékű aktiválódása figyelhető meg. Az ionáramok egyensúlya lassan a repolarizáló áramok felé tolódik. Az alacsony elektrokémiai hajtóerő miatt a repolarizáció végére a késői K^+ -áram jelentősen lecsökken, így a repolarizáció befejezésében a késői káliumáramok szerepe az I_{K1} mellett nem jelentős [60].

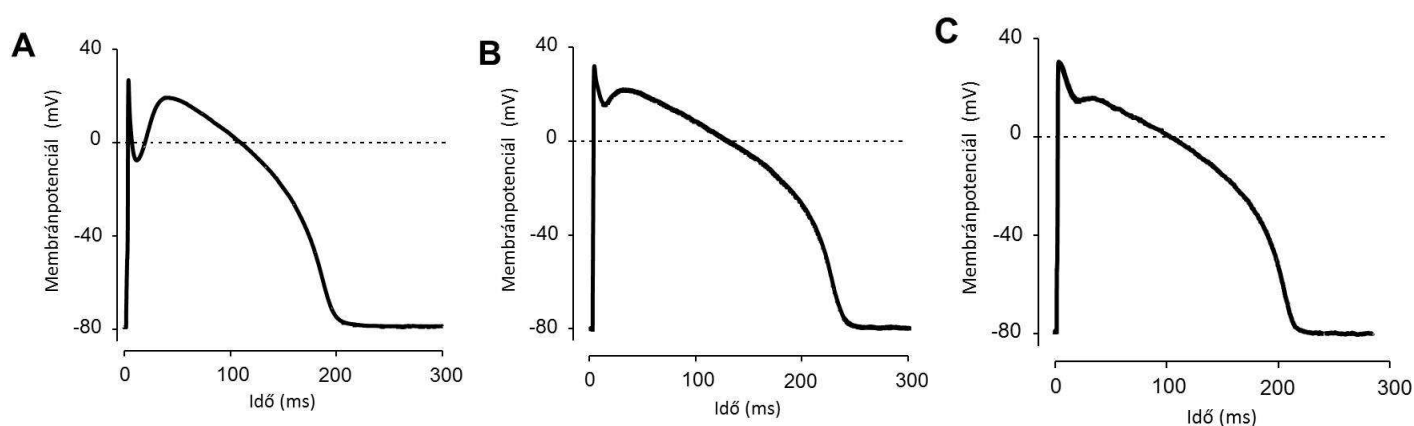
A negyedik fázis (elektromos diasztole) során az extranodális (automáciával nem rendelkező) szívizomsejtek — így a kamrai munkaizomsejtek — membránpotenciálja a nyugalmi értéken marad egy újabb AP kiváltásáig. A negyedik fázist meghatározó nagy K^+ konduktancia (I_{K1}) felelős a nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért.

A kamrai akciós potenciálok morfológiája; regionális különbségek

A kamrai szívizomzatot három rétegre oszthatjuk az egyes régiókban megfigyelhető AP morfológia szempontjából, így megkülönböztethetünk epikardiális, endokardiális és a kettő között elhelyezkedő midmiokardiális régiót [59]. A kamra izomzata azonban nem háromféle sejtből vagy három élesen elkülönülő sejtrétegből épül fel; a köztük levő átmenetek folyamatosak.

Az epikardiális sejtek ún. „*spike and dome*” konfigurációjúak (4. ábra). Igen kifejezett az első fázis repolarizáció, ezután következik a platófázis, amely a nulladik fázisnál lassabb depolarizációval éri el a maximális membránpotenciál-értékét. A midmiokardiális vagy M-sejteken kisebb a korai repolarizáció (1. fázis) mértéke, mint az epikardiális sejteken, az

endokardiális sejteken pedig minimális. Az akciós potenciálok időtartama is eltérő a kamrafal különböző rétegeiből származó sejtek között. A midmiokardiális sejtek akciós potenciálja a leghosszabb, az epikardiális sejteké viszont rövid. A transzmurális különbségeket okozhatja az I_{to} eltérő denzitása [61], vagy a kalciumcsatornák újbóli megnyílása is epikardiális sejteken [62]. A $K_{v4.3}$ csatorna expressziója, így az I_{to} amplitúdója is nagyobb epikardiális, mint midmiokardiális sejteken [63]. A transzmurális AP inhomogenitás mellett egy apiko-bazális inhomogenitás is megfigyelhető. A szívcsúcs felé eső, ún. apikális szívmuszkulaterületek akciós potenciálja rövidebb, mint az annulus fibrosus felé eső, ún. „bázis” részen. Ezt a különböző káliumáramok eltérő aránya okozhatja [64].



4. ábra: Epikardiális (A), midmiokardiális (B) és endokardiális (C) eredetű szívmuszkulaterületek akciós potenciál morfológiája. Az epi- és midmiokardiális sejtekre jellemző az AP ún. „spike and dome” morfológiája.

Akciós potenciálok morfológiájának változása β -adrenerg stimuláció hatására

Annak ellenére, hogy tankönyvi adat az izoproterenol okozta β -adrenerg aktiváció szívmuszkulaterületekre kifejtett hatása, ez a hatás nem kellően tisztázott. Az AP adrenerg stimulációra bekövetkező változása jelentős speciesfüggést mutat. β -adrenerg stimuláció hatására az AP időtartama megnő patkány [10], sertés [9], és tengerimalac [4] preparátumokon, míg rövidül nyúl [5], macska [12], humán [13], valamint kutya [6] sejteken. Emellett az általunk vizsgált kutya kamrai szívmuszkulaterületeken megfigyelhető a platópoteenciálok növekedése is.

A β -adrenerg hatásra bekövetkező AP rövidülést előidéző ionáramok még nem teljesen tisztázottak, és a változások időbeli, egymáshoz viszonyított kinetikája sem ismert, mint

ahogyan az adrenerg stimuláció epi-, illetve endokardiális AP-morfológiát módosító hatása sem. Ismereteink annak ellenére hiányosak, hogy a kardiológiai alap kutatásban a kamrai szívizomsejtek repolarizációjának és az abban szerepet játszó áramok tulajdonságainak és befolyásolhatóságának vizsgálata kiemelt jelentőségű, hiszen bármilyen szer, ami a kamrai szívizomsejtek repolarizációját gátolja, megnyújtja az AP hosszát, és emiatt ún. long QT (LQT) szindróma kialakulásához vezethet [65]. Ezen túl az akciós potenciál időtartamának egyes kamrai területek közötti eltérései reentry-aritmiákra hajlamosítanak.

Feszültségfüggő ionáramok és –csatornák a szívizomsejteken

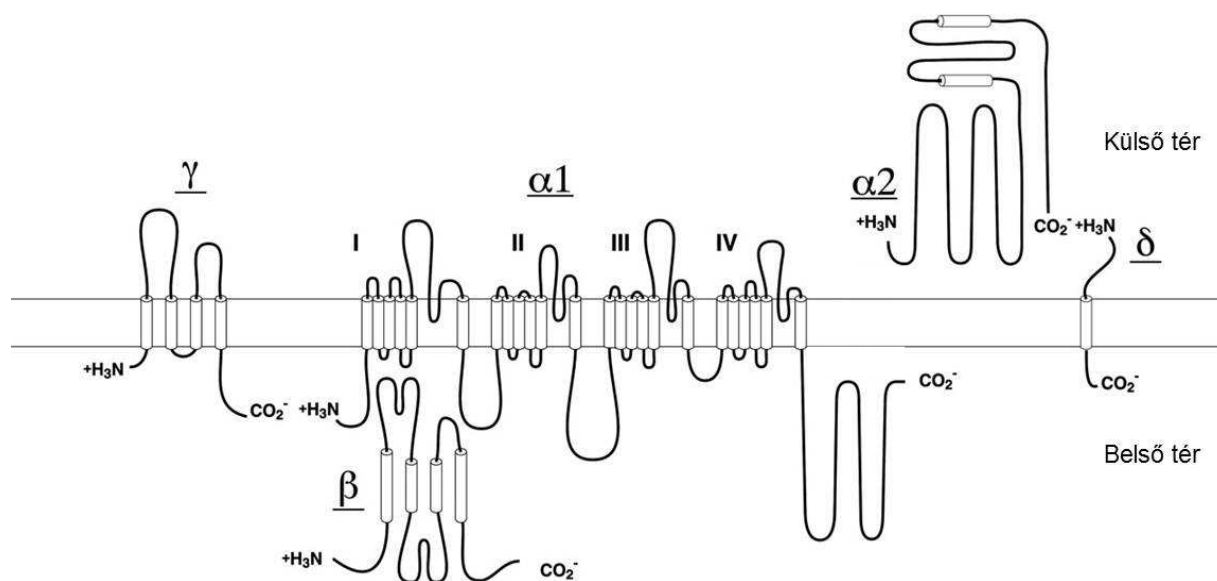
Feszültségfüggő kalciumáramok a szívizomsejteken

Szívizomsejteken a feszültségfüggő kalciumáram két típusát mutatták ki, az L-típusú ($I_{Ca,L}$) és a T-típusú ($I_{Ca,T}$) kalciumáramot.

A T-típusú kalciumáramot alacsony feszültségű (-50 mV-ig történő) depolarizáció aktiválja, az áram aktivációja és inaktivációja is gyors kinetikájú [66]. A T-típusú kalciumáram megtalálható pitvari sejteken, és az ingerületvezetésért felelős szöveteken, de még nem írták le egészséges felnőtt kamrai munkaizomsejteken, viszont az $I_{Ca,T}$ megjelenik krónikus hipertenzív állatmodell kamrai sejtjein, feltételezhetően előfordul hipertrofizált humán kamrai miocitákon is [67].

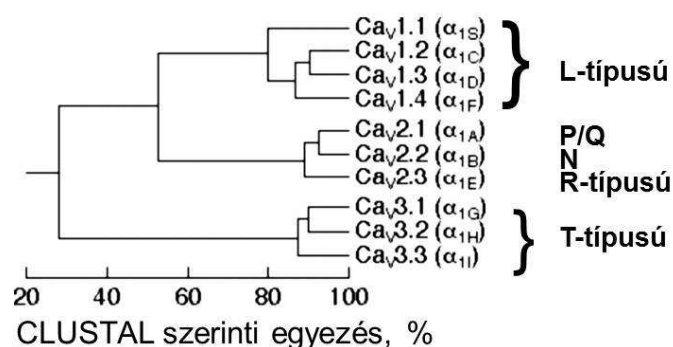
Az L-típusú kalciumcsatornák nagyobb mértékű depolarizáció esetén aktiválódnak, megnyílásuk feszültségfüggő és késleltetett, a csatornaműködés szabályozásában járulékos fehérjék is részt vesznek. Az L-típusú kalciumáram a szív valamennyi területén megtalálható. [68]. A csatornák depolarizációra történő megnyílása jelentősen lassabb a feszültségfüggő Na^+ -csatornákénál, emiatt az áram csak minimális szerepet játszik az AP felszálló szárának kialakításában. A csatornák lassú aktivációja miatt a Ca^{2+} -beáramlás csak a plató alatt lesz jelentős. A beáramló kalciumionok a szarkoplazmatikus retikulumból kalcium indukált kalciumfelszabadulás során tovább növelik a kalciumtranziens amplitúdóját [69].

Az L-típusú kalciumcsatornák heteropentamer fehérjék, egy S4 szupercsaládba tartozó pórusformáló, 220 kDa tömegű α_1 fehérje mellett járulékos α_2 , β , γ és δ alegységekből állnak [1] (5. ábra).



5. ábra: Az L-típusú kalciumcsatornák felépítése. A heteropentamer csatorna pórusformáló α_1 alegységéhez egy intracelluláris β , egy transzmembrán γ és δ alegység csatlakozik, az α_2 alegység extracellulárisan helyezkedik el. Catterall és munkatársai munkája alapján módosítva. [1]

Az α_1 alegységet szerkezete alapján négy családba oszthatjuk, ezek a Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3 és Ca_v4 . Néhány családba több izoforma tartozik, így például a Ca_v1 alcsaládnak négy tagja van ($\text{Ca}_v1.1$ -től 1.4-ig). Az általuk kódolt α_1 alegységek képezik a feszültségfüggő, L-típusú kalciumcsatornákat [70] (6. ábra). Az L-típusú kalciumcsatornák közös tulajdonsága a dihidropiridin-származékokkal szembeni szelektív érzékenység. Humán szívizmon a $\text{Ca}_v1.2$ -es csatorna található meg, melyet a 12p13.33 locus-on található CACNA1C gén kódol [70]. Ugyanezen gén által kódolt splice-variánsok kimutathatóak vaszkuláris simaizomsejteken, és központi idegrendszeri neuronokon is [71].



6. ábra: A feszültségfüggő kalciumcsatornák α_1 alegységeinek szekvencia-homológiája. Az ábra csak az α_1 alegységek membránon áthaladó szegmenseinek és a csatornaformáló huroknak az aminosav-sorrendjét (~350 aminosav) hasonlítja össze, ez alapján 3 alcsaládba (Ca_v1 , Ca_v2 és Ca_v3) oszthatóak be az alfa-alegységek. Közülük a Ca_v1 alcsaládba tartoznak az L-típusú kalciumcsatornák.

A kalciumionok az α_1 alegység által létrehozott póruson lépnek be a sejtbe; ezt a fehérjét négy repetitív transzmembrán domén alkotja. Minden domén hat hidrofób szegmensből áll (S1-S6), a 4-es szegmens feszültségszenzorként funkcionál [72]. Az ötös és hatos szegmens közötti nagymértékben konzervatív hurokban található négy, egymáshoz közel található negatív töltésű glutamát oldallánc (EEEE) felelős a pórus kalcium-szelektivitásáért [73]. Csak kevés típusú bivalens kation (kalcium, stroncium, bárium) képes átlépni a csatornán, Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} és a három vegyértékű La^{3+} is gátolja az L-típusú kalciumáramot [1, 72]. A bivalens kationok a környező térből történő eltávolítása után a kalciumcsatornák nagymértékben permeabilissá válnak monovalens kationokra. Azonban mindaddig, amíg legalább egy Ca^{2+} -ion a csatornában kötve van, megakadályozza az egy vegyértékű kationok belépését a csatorna pórusába. Az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ szerves gátlószerei és a kalciumionok valószínűleg közös kötőhelyekkel rendelkeznek [74], egy vagy két ilyen kötőhely a pórus szelektivitási filterében van (EEEE szekvencia). A gátlás a gátló ion pórusba kötődése utáni lassú disszociáció eredménye, amellyel így a permeábilis ionok elől elzárják a csatorna lumenét [72].

A β alegységek intracelluláris proteinek, négy altípusuk ismert ($\beta 1$ - $\beta 4$). Két, nagymértékben konzervatív régióval rendelkeznek, amelyek kapcsolódnak a csatorna α_1 alegységéhez. A β fehérjék konzervatív régiói mellett megtalálható 3 variabilis domén határozza meg a β fehérje altípusát, és hatását a $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ amplitúdójára, idő- és feszültségfüggésére [75].

Az extracellulárisan elhelyezkedő α_2 és a transzmembrán δ fehérjék diszulfidhidakon keresztül kapcsolódnak egymáshoz; a pórusformáló egységhez történő asszociációjuk megváltoztatja a kapuzási kinetikát, és megnöveli az áramamplitúdókat [76]. Emellett az α_2 fehérje javítja a fehérjekomplex membránba történő kihelyeződését [77].

A $\text{Ca}_v1.2$ -es csatornák depolarizációra aktiválódnak, a pontos félaktivációs feszültségértékek függenek az extracelluláris kalciumkoncentrációtól, és a csatorna járulékos fehérjétől. [1] Szívizomsejteken a félaktiváló feszültség körülbelül -15mV [78]. A csatornák inaktivációja feszültség- és kalciumfüggő folyamat [68, 79]. Az áram inaktivációja fiziológiai körülmények között 100 ms alatt megtörténik [68]. A kalciumfüggő inaktiváció során a csatornán belépő, illetve az SR-ből felszabaduló kalciumionok egy részét megkötik a csatorna α_1 alegységének C-terminálisához kötött kalmodulinmolekulák. A kalcium-kalmodulin komplex a csatorna inaktivációját okozza [80]. A csatorna feszültségfüggő inaktivációja önmagában nagyon lassú ($\tau > 500\text{ms}$), ez azonban csak a fiziológiától eltérő kísérleti

elrendezéssel, pl. extracellulárisan alkalmazott báriumionok mellett érhető el [72]. A fiziológiai körülmények közötti inaktiváció befolyásolja az AP alakját, időtartamát, és a repolarizáció lefolyását is. Az $I_{Ca,L}$ denzitásában és kinetikai jellemzőiben nincsen regionális különbség, ami a létrehozó csatornák hasonló felépítését valószínűsíti [68].

Az $I_{Ca,L}$ gátolható különböző szervetlen kationokkal, a csatornák működése azonban befolyásolható szerves molekulákkal is, ilyenek a különböző dihidropiridinek, benzothiazepinek és fenilalkilaminok is. Ez utóbbiak jelentős része klinikailag is használt kalciumcsatorna-blokkoló.

A kalciumcsatorna-gátlók feltételezhetően három különálló, de allosztérikusan kapcsolt helyhez kötődnek. A fenilalkilaminok intracelluláris pórusblokkolók, melyek feltételezhetően a citoplazmatikus oldal felől lépnek be a pórusba, és elzárják azt. Klinikai gyakorlatban elsősorban a verapamil és a gallopamil használják közülük. Receptoruk a hármás és négyes domén S6 szegmensein megtalálható aminosav-maradványok, hasonlóan helyi érzéstelenítők Na^+ -csatornákon található receptorhelyéhez [81, 82]. A verapamil a $Ca_v1.2$ -es ioncsatornák vaszkuláris és kardiális típusa között kevésbé szelektál, terápiás koncentrációban mindkettőt gátolja. A szíven negatív kronotóp, dromotróp és inotróp hatású, az érrendszeren főleg arteriális vazodilatációt okoz. Használható vérnyomáscsökkentőként, a negatív tróphatások miatt nem okoz tachycardiát. Csökkenti a miokardium oxigénigényét, ezért használható antianginás szerként is. Bizonyos típusú aritmiák, pl. paroxizmális szupraventrikuláris tachycardia és pitvarfibrilláció esetén indikált a használata.

A dihidropiridinek egyaránt lehetnek $I_{Ca,L}$ aktiváló, vagy gátlószerek is; emiatt feltételezhetően nem a pórus blokkolásán keresztül hatnak, hanem a csatornát allosztérikusan módosítják, így a csatorna nagyobb valószínűséggel lesz nyitott, vagy zárt állapotban. Receptorhelyük a hármás domén S5 és S6, valamint a négyes domén S6 szegmensén található, részben átfed a fenilalkilaminok kötőhelyével. Aktiváló dihidropiridin például a Bay K8644, míg a gátlószerek közé tartozik pl. a klinikailag is használt nifedipin, nizoldipin, nitrendipin, amlodipin, felodipin. A legtöbb klinikailag használt dihidropiridin igen szelektív a vaszkuláris kalciumcsatornákra, terápiás koncentrációban a szívizom kalciumcsatornáit alig befolyásolják. Széles körben használt vérnyomáscsökkentők, azonban növelhetik a szívfrekvenciát is, ezért általában kombinált terápiában használják őket.

A benzothiazepinek közül a klinikumban csak a diltiazemet használják. A diltiazem az α alegységen egy harmadik helyhez kötődik, amely azonban nagymértékben átfed a fenilalkilamin kötőhellyel [1]. A verapamilhoz hasonlóan kevésbé szelektív a vaszkuláris kalciumcsatornákra, és indikációi is hasonlóak hozzá. Használható antianginás szerként,

vérnyomáscsökkentőként és bizonyos szupraventrikuláris tachycardiáknál antiaritmiás indikációban is.

Az adrenerg stimuláció széleskörű hatással bír a szívizom L-típusú kalciumcsatornáira. A kalciumcsatornák β -adrenerg modulációját írták le elsőnek, azóta is az egyik legtöbbet tanulmányozott jelátviteli útvonal.

Emlős, illetve kételtű szívizomrostokon a β -adrenerg stimuláció megnöveli a kalciumáramot [83] a cAMP útvonalon aktivált protein kináz A (PKA) segítségével, mely több, a kalciumhomeosztázisban részt vevő fehérjét foszforilál, és működésüket befolyásolja [25]. Így a $\text{Ca}_v1.2$ csatorna α -alegységének C-terminális részén megtalálható 1928-as pozíciójű szerint is foszforilálja. A foszforiláció növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét és a megnyílások időtartamát. A β -adrenerg stimulus valószínűleg nem növeli meg a sejt felszínén levő kalciumcsatornák számát, bár béka miocitákon megnő a funkcionális, depolarizációra aktiválódó csatornák mennyisége. Ennek oka feltételezhetően nem új csatornák membránba történő kihelyeződése, hanem korábban inaktív csatornák kapuzásának megváltoztatása [84]. Bár a cAMP-PKA útvonal növeli az L-típusú kalciumáramot az α -alegység foszforilálásán keresztül, ennek mértéke expressziós rendszerben 35% [85], szemben az izolált sejtekben megfigyelt 2-4 szerez amplitúdó növekedéssel [84]. Ennek egyik oka lehet a különböző, PKA-t kihorgonyozó fehérjék (AKAP; *A-kinase anchor protein*) közül a szívizomzatban kimutatott AKAP-15/18 foszforilálása [86], mely koexpressziós rendszerben növelte az áram amplitúdóját [87]. Emellett a β alegységek PKA útvonal általi foszforilálása is több, mint kétszeres $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ amplitúdófokozást okoz [88].

A protein kináz C aktiváció hatása bifázisos az L-típusú kalciumáramra, egy átmeneti növekedést hosszantartó csökkenés követ [89]. Ezt az α -alegység N-terminálisának közelében levő 2 treonin-maradvány foszforilációja közvetíti, ami csak a szívizomban expresszáldó izoformánál található meg [84].

Feszültségfüggő káliumcsatornák

A feszültségfüggő K^+ csatornákat alfa-alegységük alapján több családba oszthatjuk: K_v1 (Shaker), K_v2 (Shab), K_v3 (Shaw), K_v4 (Shal), K_v5-9 (eag család, eag, elk és erg alcsaláddal) és a $\text{K}_v\text{LQT1}$ család. Szívizomsejtekben a káliumcsatornák közül a feszültségfüggő káliumcsatornák és a rajtuk átfolyó I_{to} , I_{K1} , valamint az I_{K} különböző komponensei a legfontosabbak a kamrai szívizomsejtek akciós potenciáljának kialakításában [90]. Az akciós

potenciál időtartamának meghatározásában az I_K komponensei bírnak jelentős szereppel. Az I_{to} akciós potenciál időtartamára kifejtett hatása jelenleg is vita tárgya. Az I_{K1} -40 mV -nál pozitívabb membránpotenciálokön deaktiválódik, így szerepe csak a terminális repolarizációban, és a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában van.

Az I_{to} és I_K áramokat létrehozó csatornáknak számos közös strukturális és funkcionális tulajdonságuk van, valamennyien az ún. hat transzmembrán (6-TM) egységekből felépülő csoportba tartoznak. Ezek a csatornák négy pórusformáló (α) alegységből, és egy, vagy több járulékos (β) alegységből állnak. A β alegységek funkciója rendszerint a csatorna modulációja. Az α alegységek hozzák létre a pórust, amelyen keresztül a káliumionok át tudnak lépni az elektrokémiai gradiensnek megfelelően. Tartalmazzák a szelektivitási filtert, mely biztosítja a K^+ -szelektivitást, a feszültségszenzort, és a kapuzásért felelős struktúrákat, ami a nyitott és a zárt konformáció között kapcsol. Az α alegységek hat transzmembrán szegmenst tartalmaznak, a C- és az N-terminálisok is intracellulárisan helyezkednek el. Négy α alegység összeszerelődése szükséges egy funkcionális csatorna létrehozásához. A pórusformáló régió az S5 és S6 szegmensek közötti hurok (P-régió), ez a felelős a pórus formálásáért és az ionszelektivitásért. Ennek a régióknak az aminosav-szekvenciája a K_v csatornáknál nagymértékben konzervatív, az itt található treonin-x-glicin-tirozin-glicin (TxGYG) szekvencia lehet felelős a K^+ -szelektivitásért. Az S4 szegmens pozitív töltésekkel rendelkezik, főként ez a régió felelős a kapuzás feszültségfüggéséért. Depolarizáció hatására a csatornák megnyílnak, majd inaktív állapotba kerülnek. Az inaktivációnak két fő típusa van, az N- és a C-típusú inaktiváció. Az N-típusú inaktiváció rendszerint gyors, és a pórus intracelluláris szájadékát zárja el „ball and chain” mechanizmussal, az N-terminálison megtalálható rövid szegmens pórushoz kötődésével. A C-típusú inaktiváció a pórus külső szájadékát zárja el a pórus körüli struktúrák átrendeződésével. Ez az utóbbi, C-típusú inaktiváció érzékeny az extracelluláris tér K^+ koncentrációjára, és farmakológiailag befolyásolható. [91]

Tranziens kifelé irányuló áram (I_{to})

Az I_{to} depolarizáció hatására aktiválódó rövid ideig folyó, repolarizáló hatású áram (innen kapta a nevét; „transient outward current”, I_{to} , azaz átmeneti kifelé irányuló áram). Az I_{to} a szív valamennyi területén megtalálható, a nodalis sejteken is [91].

A tranziens kifelé irányuló áram két komponensét különböztetjük meg. Az I_{to} (vagy I_{to1}) kalciumtól független káliumáram [92], ami nagy koncentrációjú (1-5 mM) 4-aminopyridinnel gátolható. A másik áramkomponens egy kalciumfüggő kloridáram, egy szintén rövid ideig fennálló, repolarizáló hatású áram, melyet ezért I_{to2} -nek is neveznek [93].

Az egyes fajok között eltérések vannak az I_{to} -t létrehozó áramokban, a káliumáram alkotta I_{to1} a legtöbb fajban kimutatható [94], míg az I_{to2} humán szívizmon hiányzik [95], tengerimalacokban pedig egyik áramkomponens sem mutatható ki [96].

Az áram kinetikája alapján a tranziens kifelé irányuló káliumáramnak (a továbbiakban: I_{to}) is két komponensét különböztetjük meg, egy gyors (I_{tof}) és egy lassú (I_{tos}) komponenset.

Az I_{tof} áramot a KCND2 gén által kódolt $K_v4.2$, és a KCND3 gén által kódolt $K_v4.3$ ioncsatornák hozzák létre, az I_{tos} -ért a $K_v1.4$ felelős.

Különböző fajokban eltérhet az egyes csatornafehérjék szerepe, humán szívizomrostokon a legnagyobb szerep a $K_v4.3$ -as ioncsatornáknak jut [97], amelyek homo-, vagy heteromultimereket alkothatnak a $K_v4.2$ csatornákkal [98]. Kuttyákon a $K_v4.2$ nem fejeződik ki, míg rágcsálók szívizmán a $K_v4.2$ előfordulása jellemző [64].

A különböző típusú K_v4 csatornafehérjék KChIP (K_v channel interacting proteins) alegységekkel asszociálódhatnak. Humán szívizmon a $K_v4.2$ és a $K_v4.3$ is asszociálódik a KChIP1 és a KChIP4a alegységekkel [99]. A KChIP1 módosító hatása mindkét csatornafehérjén hasonló; növeli az áram denzitását, késlelteti az inaktivációt, és gyorsítja az inaktivációból való visszatérést, valamint a steady-state inaktiváció feszültségfüggését is pozitívabb membránpotenciálok felé változtatja [98]. A KChIP4a megszünteti a $K_v4.3$ gyors inaktivációját [100].

Az I_{tof} depolarizáció hatására gyorsan aktiválódik, a steady-state aktiváció feszültségfüggése — mint az áram többi biofizikai tulajdonsága is — fajonként kissé eltérő, a teljes csatornapopuláció felét aktiváló feszültségértékek -10 és +20 mV közöttiek [101]. Az I_{to} egy ioncsatornára vonatkozó konduktanciaértéke 10-30 pS közötti [102]. Az inaktiváció időállandói 25-75 ms közöttiek, feszültségtől függetlenek. A csatornák inaktivációból való visszatérése erősen feszültségfüggő, hiperpolarizáció csökkenti a visszatéréshez szükséges időt [103].

Az I_{tos} -t a $K_v1.4$ csatornafehérje hozza létre, amit a 11p14 locuson megtalálható KCNA4 gén kódol. A tranziens kifelé irányuló káliumáram gyors komponensétől főként lassú inaktivációból való visszatérése (1-6s közötti időállandó) különbözteti meg. A $K_v1.4$ moduláló alegységei a KCNAB1 gén által kódolt $K_v\beta1$ és KCNAB2 gén kódolta $K_v\beta2$ fehérjék.

A csatornafehérjék kifejeződése, és az áram denzitása is jelentős eltérést mutat fajok között, valamint a szívizomzat különböző részein is [14, 104, 105].

Humán szívben az I_{tof} és az I_{tos} is megtalálható [106], bár az I_{to} -t létrehozó csatornák sűrűsége a szívizom minden területén meglehetősen alacsony. Az áram nagysága jelentősen eltérhet az egyes területek, illetve rétegek között. A bal kamra epi- és midmiokardiális rétegeiben az áram denzitása nagy, míg az endokardiális rétegben viszonylag kis I_{to} mérhető [104]. Az endokardiális miocitákban az I_{to} inaktivációja és inaktivációból történő visszatérése jelentősen lassabb, ami arra utal, hogy itt főként az I_{tos} fejeződik ki [106]. A csatornafehérjék expressziója az áramhoz hasonlóan változik. A $K_{v4,3}$ -as csatornák nagyobb mennyiségben találhatók meg epikardiális sejteken, mint midmiokardiális, vagy endokardiális sejteken, és a $K_{v1.4}$ expressziója is nagyobb epikardiális sejteken a midmiokardiumhoz viszonyítva [104]. Az I_{to} expressziós mintázatában fellelhető eltérések különbségeket eredményeznek a kamrafal egyes rétegeinek akciós potenciál morfológiájában.

A tranziens kifelé irányuló áram több kórképben is megváltozik. Krónikus pitvarfibrilláció során csökkent az I_{to} csatornafehérjék expressziója a pitvari szívizomsejteken. Szívelégtelen betegekben, illetve pacemakeres kamrai ingerlés során a kamrai munkaizomsejteken csökkent a csatornafehérje expressziója.

Az I_{to} hatása a humán szívizomsejtek akciós potenciáljának időtartamára jelenleg nem egyértelmű. Az endokardium sejtjein az I_{to} igen kicsi, ezért itt az APD-re gyakorolt hatása szinte biztosan elenyésző. A szívizomzat többi rétegében azonban nem ilyen egyszerű a helyzet. Egyes szimulációk szerint az I_{to} gátlása az akciós potenciál hosszát nem változtatja meg, más szimulációk alapján kismértékű I_{to} növelés az első fázis végén negatívabb membránpotenciállal jár, ami az L-típusú kalciumáram lassabb aktiválódását eredményezi, emiatt az akciós potenciál hosszabb lesz. Jelentős I_{to} növelés a membrán idő előtti teljes repolarizációját okozza, így az akciós potenciál a platófázist mintegy „kihagyva” sokkal hamarabb ér véget, mint normál esetben.

Késői káliumáram (I_K)

A késői káliumáramot létrehozó ioncsatornák depolarizáció hatására a Na^+ csatornákhöz képest viszonylag lassan nyílnak meg.

A késői káliumáramnak kinetikai- és egyenirányító tulajdonságok, az egyes farmakonok iránti érzékenység, valamint az intracelluláris moduláció szempontjából három komponensét

különböztethetjük meg [91]. Ezek az ultragyors komponens (I_{Kur}), a gyors komponens (I_{Kr}) és a lassú komponens (I_{Ks}).

A késői káliumáram jelenlétét minden szívműködésben leírták, ám az egyes komponensek kifejeződése jelentősen eltér a különböző fajokat, illetve a miokardium különböző régióit tekintve. Az I_{Ks} és az I_{Kr} mind pitvari, mind kamrai munkaizomrostokon is megtalálható, bár amplitúdójuk (különösen az I_{Ks} -é) kicsi [107]. Az I_{Kur} -t eddig csak patkány, kutya és humán pitvaron írták le.

A késői káliumáram elsődleges szerepet játszik a szívműködés akciós potenciáljának repolarizációjában, azonban az egyes komponensek pontos szerepe az adrenerg stimuláció során még nem pontosan tisztázott. Az áramot létrehozó csatornafehérjék farmakológiai befolyásolása vagy szerkezetének megváltozása az áram — és így az akciós potenciál hosszának — megváltozásához, és így aritmiák kialakulásához vezethet. Ezek közül a legjellemzőbbek a különböző long-QT szindrómák. Ezekben a betegségekben az akciós potenciál időtartamának megnyúlása miatt fokozódik a korai utódepolarizációk és a torsades de pointes kamrai tachycardia kialakulásának valószínűsége, és gyakrabban fordul elő hirtelen szívhalál.

A késői káliumáram ultragyors komponense (I_{Kur})

A késői egyenirányító káliumáram komponensei közül az I_{Kur} aktiválódik a leggyorsabban, és nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik [59]. Az áram osztályba sorolása nem egységes a kutatók között, egyesek a késői káliumáram egyik komponensének tartják, mások szerint az I_{to} nem inaktiválódó komponenséről van szó. Gátlószere az I_{to} -hoz hasonlóan a 4-aminopiridin. Az áram nem szelektíven blokkolható alacsony koncentrációjú nifedipinnel, diltiazemmel, TEA-val és kapszaicinnal is [108]. Humán pitvarban a csatorna α alegysége a $K_v1.5$, melyet a 12p13 locuson megtalálható KCNA5 gén kódol.

Pitvari előfordulása miatt az áram gátlása segíthet a pitvari aritmiák kezelésében, hiszen nem kell kamrai mellékhatással számolni.

A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Humán kamrai szívizomsejteken a késői káliumáram gyors (I_{Kr}) és lassú komponense (I_{Ks}) is megtalálható. Az egyes komponenseket eltérő pórusformáló és járulékos fehérjék hozzák létre, és kinetikájuk is különböző.

Az I_{Kr} α alegysége a $K_v11.1$ -es fehérje, melyet a 7q35-36 régióban megtalálható KCNH2 gén (korábbi nevén: hERG, azaz *human ether-à-go-go-related* gén) kódol. A csatorna β alegysége a MinK-related peptide 1 (MiRP1) [109]. A MiRP1-et a 21q22.12 helyen megtalálható KCNE2 gén kódolja. A MiRP1 fehérje az α alegységek kapuzását és permeabilitását módosítja. A $K_v11.1$ -hez β alegységként a $K_v7.1$ -es csatornák alegysége, a MinK is kapcsolódhat. A MinK fehérjét szintén a 21q22.12 sávban található KCNE1 gén kódolja. A fehérje tartalmaz egy transzmembrán domént, de önmagában nem képez ioncsatornát.

Az I_{Kr} -30 mV-nál pozitívabb membránpotenciálok gyorsan aktiválódik, és gyorsan inaktiválódik. Pozitív membránpotenciálok mellett a csatornák inaktivációja gyorsabb, mint az aktiváció folyamata, és ez befelé egyenirányító karakterisztikájává teszi a csatornákat. A csatornák inaktivációból való visszatérése is gyors és feszültségfüggő [110]. A repolarizáció során a csatorna visszatérése az inaktivációból a nyitott állapoton keresztül valósul meg. Az inaktivációból történő visszatérés gyorsabb, mint a nyitott állapot és zárt állapot közötti átmenet (deaktiváció).

Egészséges humán szívizmon az áram feszültségfüggő aktivációja gyors, időállandója ~ 30 ms (+30 mV depolarizáció esetén). Az áram amplitúdója 0 és 10mV között éri el a maximumát, ennél nagyobb depolarizáció ugyanis az egyre nagyobb mértékű inaktiváció miatt csökkenti a csatornákon átfolyó áramot [111]. A deaktiváció lassú, és biexponenciális karakterisztikájú ($\tau_1 \sim 600$ ms, $\tau_2 \sim 6,8$ s -40mV tartófeszültség mellett) [107]. Kutya kamrai szívizomsejteken az áram aktivációja 50ms alatt megtörténik, a deaktiváció kinetikája a humán csatornákhöz hasonlóan lassú és biexponenciális ($\tau_1 \sim 360$ ms, $\tau_2 \sim 3,3$ s) [112]. Az áram deaktivációja rendszerint elég lassú ahhoz, hogy – különösen magas szívfrekvencia esetén – ne záródhasson be az összes csatorna, ez felveti az áram fordított frekvenciafüggő szerepét a repolarizációban [111].

Az AP platófázisa alatt csak kis I_{Kr} folyik, ez azonban befolyásolhatja az AP hosszát, mert a plató időtartama alatt a szívizomsejtek impedanciája nagy. Az I_{Kr} időbeli lefutása jelentősen

hosszabb az I_{Ks} -nél, ami egy nagy kifelé irányuló áramot eredményez. Ez a kifelé irányuló komponens hozzájárul a 3. fázis repolarizáció folyamatához.

A bal kamra különböző területein a késői káliumáram komponenseinek expressziója eltérő lehet a szívcsúcs és a szívbázis között, valamint az egyes izomrétegek között is [64]. Nyúl szívizomrostokon az I_{Kr} denzitása kisebb a szívcsúcs felé eső, ún. apikális szívizomsejteken, mint az annulus fibrosus felé eső, ún. „bázis” részen. Ezzel ellentétben, munkacsoportunk kutya szívizomsejteken sem az áram sűrűségében, sem a csatornafehérje kifejeződésében nem figyelt meg szignifikáns apiko-bazális vagy transzmurális eltérést [14, 104].

Az áram igen fontos a humán kamrai miociták repolarizációja során, jelentős szerepe van az AP hosszának meghatározásában. A csatornafehérjék, illetve a kapcsolódó járulékos proteinek mutációja öröklött LQT-szindrómát okozhat. A KCNH2 gén mutációja a long-QT szindróma 2. típusát (LQT2) okozhatja, míg a KCNE2 mutációja felelős a long-QT szindróma 6. típusáért (LQT6). Az áram gátlása akár specifikus, akár nem specifikus blokkolókkal ún. szerzett long QT- szindrómát okozhat. A csatornák érzékenyek az extracelluláris káliumkoncentrációra, 5 mM extracelluláris $[K^+]$ mellett egy ioncsatorna konduktanciája 2 pS, 100 mM-ra növelve a káliumkoncentrációt a konduktancia 10 pS-re nő. Az extracelluláris káliumszint csökkenése az áramot csökkenti, vagyis a hipokalémia önmagában okozhatja a QT-szakasz megnyúlását is. Emellett a csökkenő $[K^+]_{ec}$ a csatornákat dofetiliddel szemben is érzékenyebbé teszi. Különböző extracelluláris kationok, így a Ca^{2+} , Mg^{2+} , La^{3+} is gátolják az áramot [113]. A szervezet acidózisa is csökkenti az I_{Kr} -t, ez esetben ugyanis módosul az aktiváció feszültségfüggése, és gyorsul az áram deaktivációja.

A legtöbb III. osztályú antiaritmiás gyógyszer elsősorban I_{Kr} -t gátol. Szelektív gátlószerei (E-4031, dofetilid) metánszulfonanilid szerkezetű vegyületek, a kamrai akciós potenciál hosszát jelentősen növelik.

A $K_v11.1$ nem szelektív gátlószerei között vannak I-es típusú antiaritmiás szerek (disopyramid, flecainid). Az I_{Kr} gátlását nem csak antiaritmiás szereknél figyelhetjük meg, hanem bizonyos gyomor-bélrendszerre ható gyógyszerek (pl. cisaprid), antimikrobiális, antifungális szerek (pl. erythromycin, ketokonazol), antihisztamin ágensek (pl. astemizol, terfenadin, cetirizin), illetve antipszichotikumok (pl. haloperidol) is gátolják [114]. Ezek a szerek a csatornák nyitott pórusába kötődnek, majd a csatorna aktivációs kapujának záródása után bent rekednek és így eldugítják azt.

A β -adrenerg stimuláció a cAMP-n keresztül közvetlen és közvetett módon is befolyásolja a csatornák működését. A cAMP aktiválja a PKA-t, ami foszforilálja a csatornafehérjét. A foszforiláció csökkenti az áram amplitúdóját, az aktiváció feszültségfüggését pozitívabb

membránpotenciálok felé tolja, és gyorsítja a deaktivációt. Emellett a cAMP közvetlenül is kötődik a csatornafehérjéhez, ami csatorna feszültségfüggő aktivációját mozdítja negatívabb membránpotenciálok felé. Az eredő hatás általában az áram amplitúdójának csökkenése. Ezzel szemben kutya és tengerimalac preparátumokon β -adrenerg stimuláció hatására növekszik az I_{Kr} amplitúdója. Kutya kamrai szívműködéseken a β -adrenerg stimuláció a cAMP-PKA útvonalon keresztül az áram 30-50%-os növekedését okozza [7]. Tengerimalac szívműködésén az I_{Kr} valószínűleg a csatornák befelé egyenirányításának csökkenése miatt nő. Ezért feltehetően nem a korábbi mechanizmusok, hanem a $[Ca^{2+}]_{ic}$ növekedés, és az aktivált PKC általi csatornafoszforyláció lehet a felelős [115].

A késői káliumáramot létrehozó csatornák expressziója egyedfejlődés során is változhat. Egér embrióban főként $K_v11.1$ ioncsatornák (I_{Kr}) expresszálódnak, újszülött egerekben az arány megfordul a $K_v7.1$ ioncsatorna (I_{Ks}) javára; ugyanakkor felnőtt egerekben már sem I_{Kr} , sem I_{Ks} nem mutatható ki [116].

Kutya modellen létrehozott teljes AV-blokk, és következményes kamrai hipertrofia során jobb kamrai kardiomiocitákban az I_{Kr} csökkent a kontrollhoz képest, míg bal kamra esetén nem volt szignifikáns eltérés az áram denzitásában [117].

A késői káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

A késői káliumáram lassú komponensét a 11p15.5-ös kromoszómasávban megtalálható KCNQ1 (korábbi nevén K_vLQT1) gén által kódolt $K_v7.1$ α alegység és a MinK (másik nevén I_{SK}), mint β alegység együttes expressziója hozza létre. A KCNQ család K^+ csatornáit a feszültségfüggő K^+ csatornák doménjeinek klasszikus felépítése jellemzi.

A $K_v7.1$ -nek két izoformája létezik, az egyes izoforma az összes aminosavat tartalmazza, míg a kettes forma egy N-terminálison csonkolt fehérje, amelynek beépülése a csatorna konduktanciáját csökkenti, és az aktivációhoz szükséges időt is növeli [111]. Az izoformák kifejeződése befolyásolhatja az áram denzitását. A $K_v7.1$ -es alegységek moduláló β alegység nélkül gyorsan aktiválódnak.

Asszociálódó alegységük a korábban említett MinK fehérje, ami egy 130 aminosavból álló kis protein. Egy transzmembrán doménnel rendelkezik, glikolizált N-terminálisa extracelluláris. Korábban a MinK-t gondolták az I_{Ks} pórusformáló alegységének, nevét is innen, valamint a mérete után kapta; „*Minimum sequence required for a K-current*”, vagyis a káliumáramhoz szükséges legrövidebb szekvencia. A fehérjét a 21q22.12 sávban található

KCNE1 gén kódolja. A MinK transzmembrán doménje a $K_v7.1$ -hez kapcsolódik, növeli a konduktanciát, de az aktiváció sebességét drámaian csökkenti, és az aktiváció feszültségfüggését is pozitívabb membránpotenciálok felé mozdítja el.

Egyetlen $K_v7.1$ -es ioncsatorna konduktanciája 1,8 pS (MinK nélkül) és 5 pS (MinK alegységgel) között változik [118].

Az I_{Ks} -30 mV-nál pozitívabb membránpotenciálok esetén lassan aktiválódik, és a legtöbb fajban gyorsan deaktiválódik. Az áramnak nincs inaktivációs állapota. Az aktiváció feszültségfüggését vizsgálva a félmaximális depolarizáló feszültségértékek -13 mV és +26 mV közöttiek [118]. Az I_{Ks} aktivációja lassú és feszültségtől független, egészséges humán kamrai miocitákon az aktivációs idő körülbelül 900 ms. Deaktivációja gyors, monoexponenciális és a feszültséggel fordítottan arányos (0 mV feszültségen $\tau \sim 350$ ms, -50 mV feszültségen $\tau \sim 90$ ms) [107]. Kutya kamrai szívizomsejteken is hasonló karakterisztikájú az áram, 0 mV-nál nagyobb depolarizáció esetén lassan aktiválódik ($\tau \sim 800$ ms), és gyors, monoexponenciális deaktivációt mutat ($\tau \sim 150$ ms) [112]. Az aktiváció és deaktiváció sebessége más fajokban jelentősen különbözhet; tengerimalac esetén, ahol az áramot először írták le, az aktiváció 5-7 másodperc alatt sem szaturálódik +50 mV feszültség mellett, és az áram deaktivációja is lassú (τ : 500-1000 ms).

Az I_{Ks} specifikus gátlószere a HMR-1556, mely az áramot nanomólos koncentrációban gátolja. Az áram gátlására gyakran használják még a chromanol-293B-t, ami azonban nagyobb koncentrációkban már az I_{to} -t is képes gátolni [119]. Az áram további gátlószerei közé tartozik a mefloquine és az azilimide. Az extracelluláris K^+ koncentráció nincs közvetlen hatással a csatornák vezetőképességére, azonban az intracelluláris Na^+ és Ca^{2+} koncentráció emelkedése növeli az I_{Ks} -t. Amiodaron krónikus szedése, illetve hipotireózis csökkenti az áramot. Az I_{Ks} amplitúdóját növeli a DIDS, mefenaminsav, nifluminsav, és az L364373 R-izomerje (az S-izomer azonban gátolja az I_{Ks} -t).

β -adrenerg stimuláció az I_{Ks} -t is növeli. A csatornát foszforilálja a PKA, ezáltal az áram aktivációjának feszültségfüggése negatívabb membránpotenciálok felé módosul, az aktiváció kinetikája gyorsul, a deaktiváció időfüggése pedig lassul. α -adrenerg hatásra a PKC foszforilálja a MinK alegységet, ami növeli az áram amplitúdóját a feszültségfüggő paraméterek változtatása nélkül [120].

Az I_{Ks} bal kamrán belüli eloszlásában kimutathatóak transzmurális, és apiko-bazális eltérések is. Kutya szívizmán az áram denzitása kisebb a szívbazison a szívcsúcshoz viszonyítva [14]. A miokardium egyes rétegeit tekintve az áram denzitása nagyobb az epikardiális, mint a midmiokardiális sejteken [104].

Az I_{Kr} repolarizációban játszott szerepével szemben, az I_{Ks} hozzájárulása a normál kamrai repolarizációhoz jelenleg is vitatott. A tanulmányok többsége az áram gátlásából következő AP-hosszának változásból próbál következtetni az I_{Ks} szerepére. Az I_{Ks} szerepe az AP repolarizációjában valószínűleg speciesfüggő, azonban egymásnak ellentmondó eredményeket is közöltek. Az áram gátlása az APD-t növeli tengerimalac és humán [121] szívizmon, míg nyúl szívizomban nincs hatása az APD-re [122]. Kutya szívizom esetén az I_{Ks} gátlása során beszámolnak az APD nyújtásáról [123], és nem szignifikáns változásáról is [112].

Humán szívizmon a csatornákat alkotó gének mutációja az AP-t nyújthatja, és hosszú QT-szindrómával járhat együtt. A veleszületett hosszú QT szindróma leggyakoribb formájáért, az 1-es típusú long-QT szindrómáért (LQT1) pont a KCNQ1 gén mutációja a felelős. Emellett a MinK fehérjét kódoló KCNE1 gén mutációja lehet felelős a long-QT szindróma 5. típusáért (LQT5). Bár az áram csak kismértékben járul hozzá a szívizomsejtek repolarizációjához, az akciós potenciál időtartamának növekedése esetén, illetve β -adrenerg stimuláció hatására az I_{Ks} amplitúdója jelentősen fokozódik, megakadályozva az APD túlzott megnyúlását, és csökkentve az aritmiák előfordulásának kockázatát [124].

Az antiaritmiás szerek kutatásában nagy újdonságnak számít az I_{Ks} -t aktiváló szerek fejlesztése. Az I_{Ks} aktiválásával ugyanis — a remények szerint — növelhető a refrakter periódus a kamrai akciós potenciálok hosszának jelentős változása nélkül. Ezáltal csökkenthető lenne az I_{Ks} gátló antiaritmiás szerek proaritmiás kockázata.

A befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})

Az I_{K1} a szívizomsejteken leírt első káliumáram, fő funkciója a nyugalmi membránpotenciál fenntartása a diasztole alatt. Az áram hiányzik a szinuszcsomó és az AV-csomó sejtjein. Az I_{K1} a szív többi sejtjén megtalálható, denzitása legnagyobb a Purkinje-rostokon és a kamrai munkaizomrostokon, kisebb a pitvari izomsejteken. Az I_{K1} legfőbb pórusformáló fehérjéje a $K_{ir}2.1$. Ezt a fehérjét a 17-es kromoszóma q23 régiójában megtalálható KCNJ2 gén kódolja, emellett az áram létrehozásában a $K_{ir}2.2$ és 2.3as alegysége is részt vesz homo- vagy heteromerek formájában. Az I_{K1} alfa alegysége két transzmembrán szegmensből áll, a pórusformáló régió ezek között található. Négy alegység képez egy funkcióképes csatornát.

Egy ioncsatorna konduktanciája 9–45 pS közötti. A csatornák erősen befelé egyenirányító karakterisztikájúak, amelyért Mg^{2+} , valamint poliaminok (spermidin³⁺, spermin⁴⁺, putreszcin²⁺) a csatornák intracelluláris oldalához történő feszültség- és időfüggő kötődése a felelős [125]. Kötődésük -40 mV-nál pozitívabb membránpotenciálok esetén a kifelé irányuló áramot deaktiválja, emiatt az I_{K1} az akciós potenciál felszálló szára alatt gyorsan deaktiválódik. A plató során nem járul hozzá jelentősen a repolarizációhoz, és lehetővé teszi, hogy a kamrai szívizomsejtek platófázisa hosszú legyen [59]. A repolarizáció előrehaladásával a membránpotenciál egyre negatívabb lesz, és így az I_{K1} fokozatosan újra aktiválódhat. Bár a repolarizáció előrehaladása során a K^+ ionokra ható elektrokémiai hajtóerő egyre csökken, a $K_{ir2.1}$ csatornák konduktanciájának növekedése elegendő ahhoz, hogy az I_{K1} növekedjen a nyugalmi membránpotenciál helyreállításáig. Így feltehetően az I_{K1} felelős a terminális repolarizáció viszonylag gyors utolsó szakaszáért, és fenntartja a nyugalmi membránpotenciált a következő akciós potenciál kiváltásáig.

α_1 -adrenerg stimuláció humán pitvari munkaizomsejteken gátolja az I_{K1} áramot PKC útvonalon keresztül. β -adrenerg hatás humán kamrai szívizomsejteken PKA által közvetített foszforiláció révén gátolja az I_{K1} -et [126]. Szívelégtelenségben szenvedő betegeken végzett vizsgálatok során az I_{K1} nagymértékű csökkenését tapasztalták mind pitvari, mind pedig kamrai miocitákon.

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 szívizomsejteken megvizsgáljuk a β -adrenerg stimuláció hatását

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

Vizsgáljuk

- 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 hatások közvetítéséért felelős β receptort.

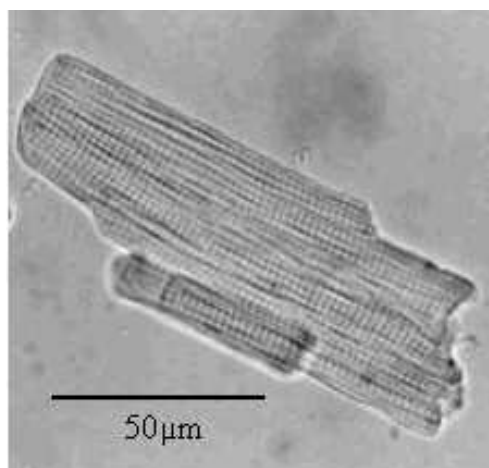
Anyagok és módszerek

Kutya bal kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket ivarérett, kísérleti célra tenyésztett beagle kutyák szívéből nyertük, anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával [14]. A 10-20 kg os állatokat 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon, Magyarország) és 1 mg/kg xylazin-hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV, Hollandia) alkalmazásával altattuk. 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 perfúzió első 5 percében Ca^{2+} mentes, taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l) és NaH_2PO_4 -tal (200 mg/l) módosított JMM oldatot (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, termékszám: M 0518; Sigma) alkalmaztunk a szövet Ca^{2+} és vértartalmának eltávolítása céljából.

Ezt a kimosási fázist követően a preparátumot megközelítőleg 25 percig perfundáltuk kollagenázzal (660 mg/l, 215 u/mg Type II.; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA.), borjú albuminnal (2 g/l, Fraction V.; Sigma) és CaCl_2 -dal kiegészített (50 μM) JMM „emésztő” oldattal. A sejtizolálás során az oldatokat végig karbogénnel (95% O_2 , 5% CO_2) equilibráltuk és a perfúziós oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. Az emésztőoldattal történő perfúzió végén a bal kamra falának midmiokardiális rétegét apró darabokra vágtuk, és az elfolyósodott szövetdarabokat 50 μM kalciumot tartalmazó, a kimosáshoz is használt 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.

A sejtszuspenziókat többször ülepítettük, szűrtük és mostuk egyre növekvő kalciumkoncentrációjú módosított JMM oldattal. Az izolálást követően a szuszpenzióban levő sejtek mintegy 40–80 %-a pálcika alakú volt és tiszta harántcsíkolatot mutatott 2,5 mM kalciumot tartalmazó oldatban (7. ábra). A sejtizolálás befejezése után két-három órával kezdtük meg a kísérleteket. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on tároltuk, Minimum Essential Medium Eagle (MEM) oldatban (pH=7,4).



7. ábra: Izolált kutya bal kamrai szívizomsejt. Tisztán látható a szívizomsejtekre jellemző harántcsíkoltat.

Minden elvégzett kísérlet összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publication No 85-23. revised 1996) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (2/2011/DE MÁB). A laboratóriumi állatokat felhasználó összes kísérlet jelentésre került, összhangban az ARRIVE irányelvekkel [127]. A kutatás összhangban volt a „Good Publishing Practice in Physiology” elveivel is [128].

Elektrofiziológiai mérések izolált sejteken

Kísérleteink során a szívizomsejteket 37 °C hőmérsékleten tartott, 1 ml térfogatú plexiüveg mérőkádba helyeztük. A kádban levő szívizomsejteket Tyrode oldattal (144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM glükóz; pH=7,4), folyamatosan, 10 ml/perc sebességgel perfundáltuk. A mérések során a Tyrode oldatot egészítettük ki a megfelelő ioncsatorna-gátló szerekkel, illetve a vizsgált jelátviteli útvonalakat befolyásoló drogokkal (1. táblázat).

Valamennyi felhasznált vegyszer a Sigma-Aldrich Kft.-től (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) származott a II-es típusú kollagenáz kivételével, mely a Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA terméke. Az izoproterenolt minden kísérlet előtt közvetlenül oldottuk fel Tyrode oldatban.

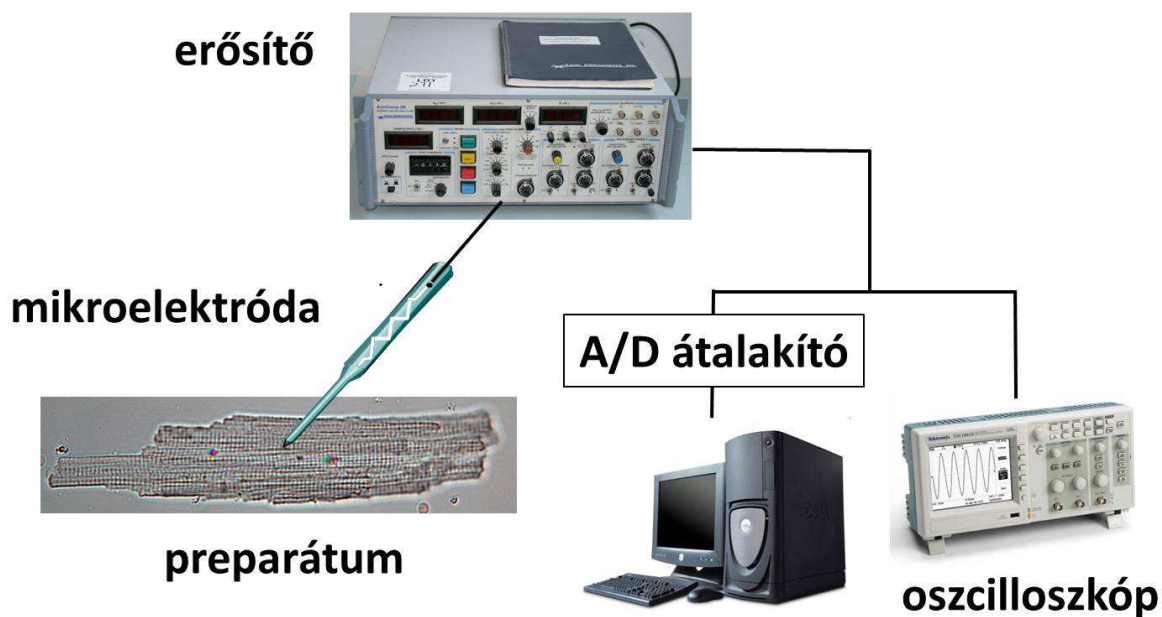
Alkalmazott szer	Alkalmazott koncentráció	Hatás
Nifedipin	5 μ M	$I_{Ca,L}$ gátlószer
Nikkel (II)-klorid	5 mM	$I_{Ca,T}$ gátlószer
HMR 1556	1 μ M	I_{Ks} gátlószer
E-4031	1 μ M	I_{Kr} gátlószer
Forskolin	3 μ M	Adenilát-cikláz 5,6 aktivátor
CGP-20712A	300 nM	Szelektív β_1 -receptor gátlószer
Izoproterenol	1-1000 nM	Nem szelektív β -receptor aktivátor
ICI 118,551	50 nM	Szelektív β_2 -receptor gátlószer
IBMX	10 μ M	Foszfodiészteráz gátlószer
4-AP	3 mM	I_{to1} gátlószer
TEACl	20 mM	Nem szelektív K^+ csatorna gátlószer

1. táblázat: A mérések során használt szerek, a használt koncentrációk és hatásuk

Az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez Axoclamp-2B, Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) és Multiclamp-700A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) erősítőket használtunk. A számítógépes vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 6.0, és pClamp 9.0 szoftvereket (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) alkalmaztunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot Digidata 1200 A/D-D/A (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) jelátalakító teremtette meg. Az erősítóből származó analóg jeleket oszcilloszkópon is megjelenítettük (8. ábra).

Hagyományos feszültség-clamp mérések

A feszültség-clamp és akciós potenciál feszültség-clamp mérésekhez 1,5-2,5 M Ω ellenállású boroszilikát mikroelektrodákat használtunk. A különböző káliumáramok feszültség-clamp méréseihez használt belső pipettaoldat az alábbi anyagokat tartalmazta: 100 mM K-aszpartát, 45 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 3 mM K-ATP, 5 mM HEPES; pH=7,2. Kalciumáram mérésekor a belső pipettaoldat módosult, és a következőket tartalmazta; 110 mM KCl, 40 mM KOH, 20 mM TEACl, 10 mM EGTA, 3 mM K-ATP, 10 mM HEPES; pH=7,2. Az ioncsatornák foszforilálásához a kálium- és kalciumáramok mérésekor használt belső oldatokat kiegészítettük 3 μ M forskolinnal. A szívizomsejteken mérhető ionáramokat farmakológiai és kinetikai sajátásaik alapján különítettük el.



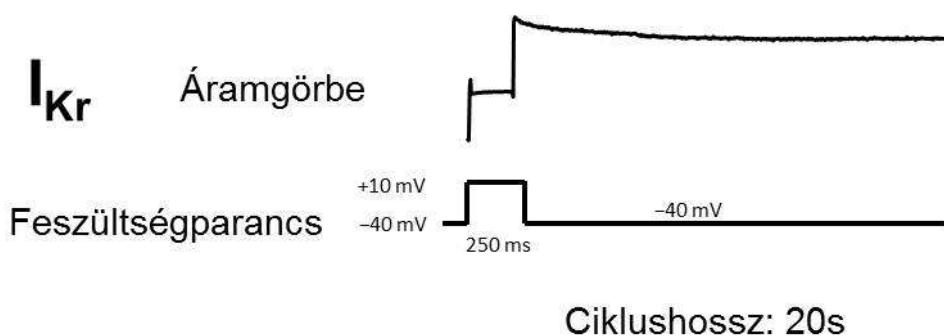
8. ábra: Az elektrofiziológiai mérőrendszer vázlata

Az árammérések a patch-clamp technika egész sejt konfigurációjában történtek. Ehhez a pipetta hegyét a sejt felszínéhez érintve enyhe szívást alkalmaztunk, elősegítve a nagyellenállású kapcsolat (1–10 G Ω ; ún. „gigaseal”) kialakulását. A gigaseal kialakulása után további szívással, vagy 1-5 ms hosszú, 1,5 V nagyságú elektromos impulzus alkalmazásával szakítottuk át a pipetta hegye alatti membrándarabot az egészsejtes elrendezés eléréséhez. A sejtek membránfelületének kapacitását minden kísérlet előtt 10 ms hosszú, -10 mV-ról -20 mV-ra történő hiperpolarizáció segítségével megmértük, és az ionáramokat az így kapott

sejtkapacitásra vonatkoztattuk. A feszültség-clamp kísérletekhez felhasznált szívizomsejtek átlagos kapacitása 137 ± 5 pF volt. A mérési elrendezés teljes soros ellenállása általában 4-8 M Ω -nak adódott, melyet hagyományos feszültség-clamp méréseknél 50–80%-ban kompenzáltunk. Amennyiben a soros ellenállás ennél nagyobb volt, vagy a kísérlet során jelentősen változott, a kísérletet sikertelennek tekintettük. A kapott áramgörbéket 100 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, és számítógépen tároltuk a későbbi értékelésig.

Az I_{Kr} mérése

Az I_{Kr} mérése során a sejteket -40 mV-os tartópotenciálon tartottuk, ami a feszültségfüggő nátrium csatornákat inaktív állapotban tartotta. Az áramot egy 250 ms hosszú, $+10$ mV-ra történő depolarizációs impulzus segítségével aktiváltuk, majd a membránpotenciált visszaállítottuk a -40 mV-os nyugalmi értékre. Az ingerlési frekvencia 0,05 Hz volt. A feszültségfüggő kalciumcsatornák aktivációját 5 μ M nifedipin alkalmazásával gátoltuk, az I_{Ks} aktiválódását 1 μ M HMR-1556-tal akadályoztuk meg. Az áramgörbék analízise során a farokáram amplitúdóját mértük, melyet a -40 mV-ra történő repolarizáció során mért áram csúcserkének és a repolarizációs lépcső végén mért áram különbségéből számoltunk (9. ábra).

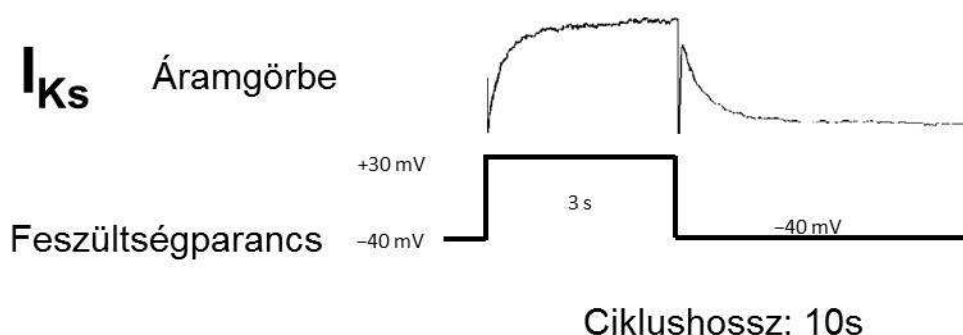


9. ábra: Az I_{Kr} viselkedése depolarizáló négyszögimpulzus hatására. Reprezentatív I_{Kr} áramgörbe az alkalmazott feszültségparancs lefutásával együtt ábrázolva. Az I_{Kr} depolarizáció hatására aktiválódik és ugyanekkor inaktiválódik is, majd a sejtmembránt -40 mV-ra repolarizálva az ioncsatornák gyorsan visszatérnek az inaktivációból. Ezt követően az I_{Kr} lassan deaktiválódik.

Az I_{Ks} mérése

Az I_{Ks} mérése során a feszültségfüggő nátrium csatornák inaktivációja érdekében a sejteket -40 mV-os tartópotenciálon tartottuk. Az I_{Ks} -t egy 3 másodperc hosszú, $+30$ mV-ra történő

depolarizációs impulzus segítségével aktiváltuk. Az impulzust követően a membránpotenciált a nyugalmi értékre állítottuk vissza. Az I_{K_r} -t 1 μM E-4031, míg a feszültségfüggő kalciumcsatornákat ez esetben is 5 μM nifedipin alkalmazásával gátoltuk. Az ingerlési frekvencia 0,1 Hz volt. Az analízis során a farokáram amplitúdóját mértük. A -40 mV-ra történő repolarizáció során az áram csúcsértékének és a repolarizációs lépcső végén mért értékének különbségéből számoltuk a farokáram amplitúdóját (10. ábra).

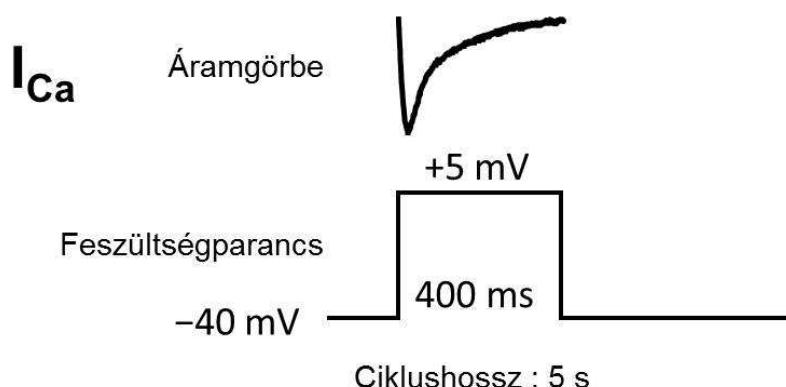


10. ábra: Az I_{K_s} viselkedése depolarizáló négyszögimpulzus hatására. Reprezentatív I_{K_s} áramgörbe az alkalmazott feszültségparancs lefutásával együtt ábrázolva. Az I_{K_s} a depolarizációt követően lassan aktiválódik, majd a -40 mV-ra történő repolarizáció hatására gyorsan deaktiválódik.

Az $I_{Ca,L}$ mérése

Az L-típusú kalciumáram mérésekor -40 mV-os tartófeszültséggel biztosítottuk a feszültségfüggő nátriumcsatornák inaktivációját. Az áramot egy 400 ms hosszú, +5 mV-ra történő depolarizációs impulzus segítségével aktiváltuk.

Az aktiváló impulzust követően a membránpotenciált a nyugalmi értékre állítottuk vissza. A különböző, feszültségfüggő káliumcsatornák gátlására az extracelluláris oldatban 1 μM E-4031 (I_{K_r} gátlószer), 1 μM HMR-1556 (I_{K_s} gátlószer) és 3 mM 4-aminopyridin (I_{to} gátlószer) volt jelen. Az áram amplitúdóját a depolarizáló pulzus során kapott negatív csúcs és a depolarizáló pulzus végén mért értékek különbségéből számoltuk (11. ábra).



11. ábra: Reprezentatív I_{Ca} áramgörbe az alkalmazott feszültségparancs lefutásával együtt ábrázolva. Az I_{Ca} a depolarizációt követően gyorsan aktiválódik, majd inaktiválódik.

Akciós potenciál mérések

Az izolált szívizomsejtek transzmembrán potenciáljait 3 M KCl oldattal töltött boroszilikát mikroelektrodákkal regisztráltuk, melyek ellenállása $20\text{--}40\text{ M}\Omega$ volt. A sejteket folyamatosan 1 Hz frekvenciával, 1 ms szélességű négyszögimpulzusok alkalmazásával ingereltük, melyek amplitúdóját az ingerküszöb $110\text{--}120\%$ -ára állítottuk, így az ingerlés artefaktuma és az AP felszálló szára között $1\text{--}2\text{ ms}$ szünet jött létre. Az AP-okat 200 kHz -es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, és számítógépen tároltuk a későbbi értékelésig. Mivel a citoplazmát nem dializáltuk, az akciós potenciál spontán, időfüggő változása legalább egy óráig elhanyagolható volt ilyen kísérleti feltételek mellett.

Az akciós potenciálok paraméterei közül meghatároztuk a nyugalmi membránpotenciált, a nulladik fázis maximális meredekségét ($V_{\max}$), az akciós potenciál amplitúdóját (APA) és a repolarizáció 20% -áig, feléig és 90% -áig eltelt időket (rendre APD_{20} , APD_{50} és APD_{90}). A nyugalmi membránpotenciál meghatározásakor a diasztolés időtartamból 2 ms -ot átlagoltunk. A $V_{\max}$ meghatározásakor az első fázis deriválásával határoztuk meg a változás maximális sebességét. Az APA-t a nulladik fázis csúcsa és a nyugalmi membránpotenciál különbségéből számoltuk. Az akciós potenciál időtartamának meghatározásához a repolarizáció 90% -áig eltelt időtartamot (APD_{90}) használtuk fel. A platópotenciál értékeit az AP időtartamának felénél ($APD_{90}/2$) mértük ($V_{\text{plató}}$). Az akciós potenciálok mérése során minden vizsgált szerrel legalább 5 percig, vagy a teljes hatás kialakulásáig perfundáltuk a sejteket.

Akciós potenciál voltage clamp

Az akciós potenciál clamp technika a feszültség-clamp technika speciális változata [129]. A módszer lényege, hogy parancsjelként a sejt saját akciós potenciálját alkalmazzuk, nem a hagyományos feszültség-clamp eljárásnál megszokott négyszög alakú feszültségjelet vagy feszültségrámpát. További lényeges eltérés a két eljárás között, hogy a hagyományos feszültség-clamp technika alkalmazása során az extracelluláris, és az intracelluláris tér összetételét úgy állítjuk be, hogy a mérés során a membránon kizárólag az általunk vizsgálni kívánt áram haladjon keresztül. Ehhez sokszor a szervezetben élettani esetben elő sem forduló ionokat (pl. Cs^+ , Ba^{2+}), és ioncsatorna-gátlószereket használunk. Ezzel szemben az akciós potenciál clamp technika alkalmazása során a fiziológiás állapotot a lehető legjobban megközelítő feltételeket biztosíthatjuk a sejtek számára. Az extracelluláris és intracelluláris tér összetétele az élettannal egyező lehet, csak a vizsgált ionáram szelektív gátlószereit kell alkalmaznunk. Az akciós potenciál clamp technika során feltétel, hogy a membránon áthaladó valamennyi nem vizsgált áram a kísérlet teljes időtartama alatt változatlanul a fiziológiás értéken maradjon.

Az akciós potenciálokat egészsejtes elrendezésben, áram-clamp üzemmódban rögzítettük normál Tyrode oldatban. A sejteket folyamatosan 1 Hz-es frekvenciájú 1 ms széles küszöb feletti négyszögjellel ingereltük úgy, hogy az ingerlés amplitúdóját az ingerküszöb 110–120%-ára állítottuk, így az ingerlés artefaktuma és az AP felszálló szára közötti 1–2 ms szünettel a stimulus műtermékét az akciós potenciál felszálló szárától el tudtuk különíteni. Sejtenként tíz egymást követő akciós potenciált rögzítettünk 100 kHz-es mintavételi frekvenciával, majd ezeket átlagoltuk. Feszültség-clamp üzemmódra kapcsolva ezt az átlagolt jelet használtuk ugyanazon a sejten 1 Hz-es ingerlési frekvenciával feszültségparancsként. Az így kapott áramjel — a kezdeti néhány ms kapacitív tranziensének kivételével — a nulla vonalban futó vízszintes görbe volt [129]. Az egyes ionáramokat specifikus gátlószerek alkalmazásával különítettük el. A gátlószer alkalmazása során visszajátszott AP az áramjel lefutását módosította, mert a gátolt áramot az erősítőnek kellett pótolnia. Az ionáramok profilját úgy kaptuk meg, hogy a szerek alkalmazása előtti (végig közel nulla) áramgörbéből kivontuk a szerhatás után mért áramgörbét.

Az analízis során felhasznált matematikai formulák

$$I_{norm} = \frac{1}{1 + \left(\frac{E_{0,5}}{A} \right)^n} \quad 1. \text{ egyenlet}$$

ahol

$E_{0,5}$ a félgátló koncentráció ($I_{norm}=0,5$),

A a vizsgált anyag koncentrációja,

n a görbe meredeksége, a Hill-koefficiens.

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_{0,5} - V}{k}}} \quad 2. \text{ egyenlet}$$

ahol

I/I_{max} a normalizált áram,

V az aktuális membránpotenciál értéke,

$V_{0,5}$ az a membránpotenciál ahol $I=I_{max}/2$,

k a görbe meredeksége.

$$I = A_i (1 - e^{(-t/\tau_i)}) + C \quad 3. \text{ egyenlet}$$

ahol

A az amplitúdó,

τ az időállandó,

C konstans.

Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei $\pm$ a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos variancia-analízist használtunk, 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, melyeket csillag vagy kettőskereszt jelöl.

Eredmények

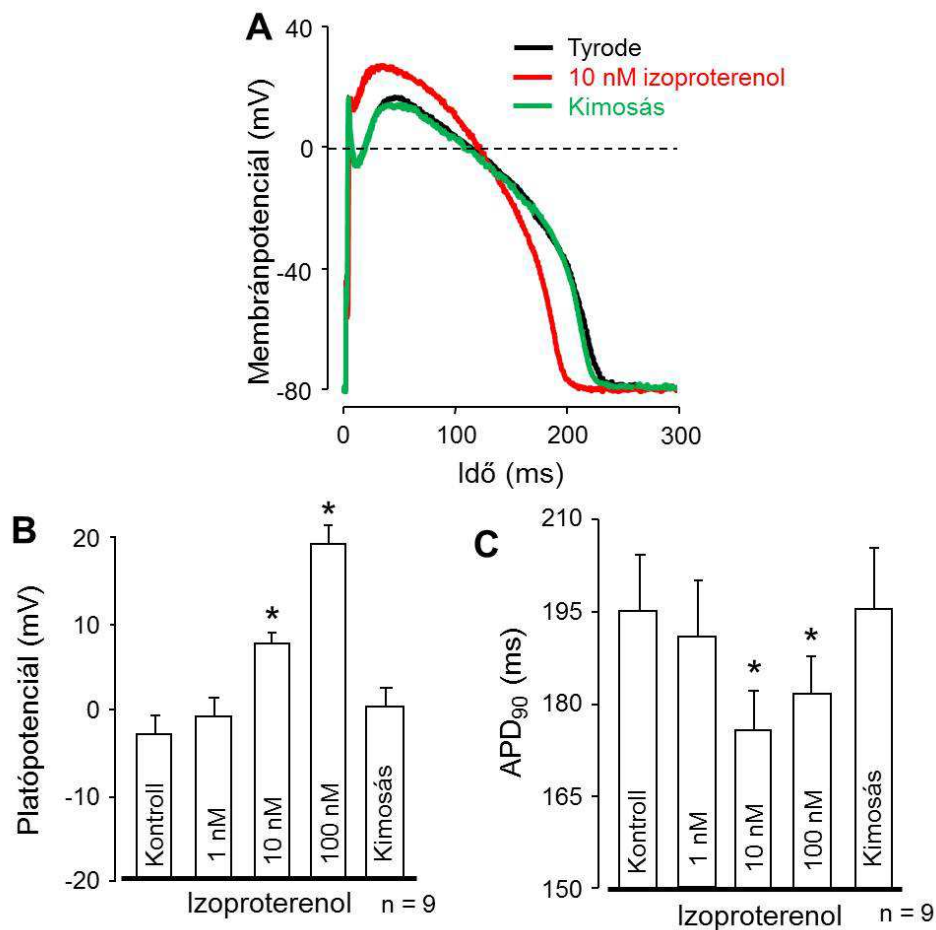
Izoproterenol hatása az AP morfológiára

Az adrenerg stimuláció akciós potenciálra kifejtett hatását enzimatikusan izolált kutya kamrai szívmusclesejteken vizsgáltuk. Munkánk során izoproterenollal (ISO) aktiváltuk a szívmusclesejtek felszínén megtalálható β -adrenerg receptorokat. Az izoproterenol egy nem szelektív β -adrenerg agonista, a szívmusclesejtek α -adrenerg receptorait csak kismértékben aktiválja. Az akciós potenciál mérések a korábban leírt technikával történtek.

Az 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 (12. ábra). Mindkét megfigyelt változás reverzibilisnek bizonyult az izoproterenol kimosása során.

Az ISO dózisfüggő hatásának tanulmányozása során a sejteket kumulatív módon 1, 10, majd 100 nM izoproterenolt tartalmazó Tyrode oldattal perfundáltuk. Az egyes koncentrációkat a teljes hatás kifejlődéséig, 3-4 percig alkalmaztuk. Az izoproterenol által létrehozott AP paraméterek valamennyi kísérlet során a kísérletek befejezéséig – amennyiben nem alkalmaztunk valamiféle gátlószert – nem csökkentek az idő előrehaladtával; ebből arra következtettünk, hogy a mérések ideje alatt nem következett be a β -adrenerg rendszer deszenzitizációja. Megállapítottuk, hogy az átlagosan $215 \pm 9,1$ 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 ($n=9$, $p \leq 0,05$). Ugyanakkor 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 (12. ábra B és C panel) Mind az APD_{90} , mind a platópotenciál változás is szignifikáns 10-100 nM izoproterenol koncentráció mellett ($p \leq 0,05$, $n=9$). Az izoproterenol hatása reverzibilis volt, az APD_{90} és a platópotenciál értékei 5 perc kimosás után rendre $216,8 \pm 9,9$ ms, és $0,2 \pm 2,2$ mV voltak.

A további AP-mérésekhez 10 nM izoproterenolt alkalmaztunk, mert ez a koncentráció közel maximális választ hozott létre, és a 100 nM-al ellentétben nem növelte az utódepolarizációk gyakoriságát. Az izoproterenolnak ez a koncentrációja más fajok szívmusclesein is közel maximális választ vált ki [130].

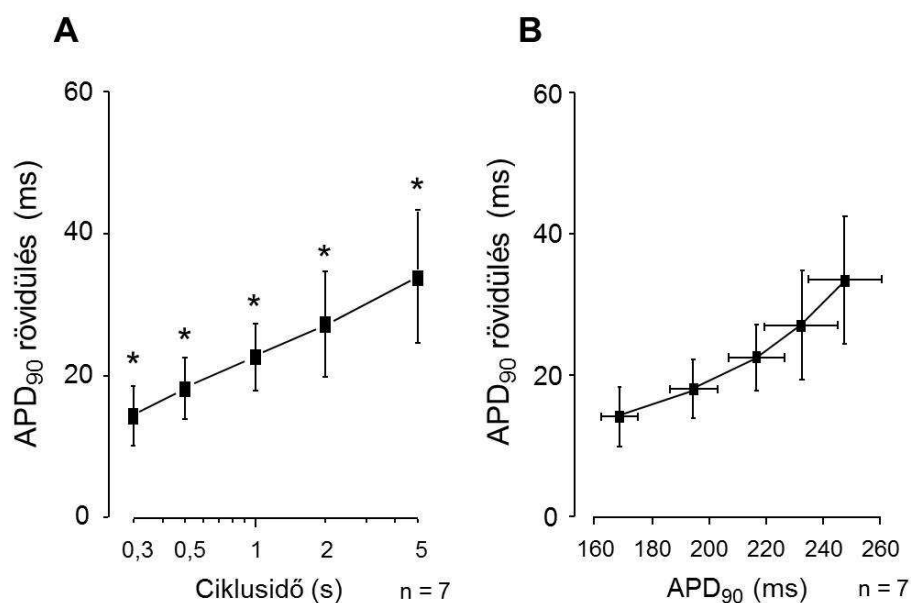


12. ábra: Izoproterenol hatása az akciós potenciál konfigurációjára. **A**; reprezentatív akciós potenciálok Tyrode-oldatban, 10 nM izoproterenol jelenlétében és kimosás után. Szaggatott vonal jelöli a 0 mV feszültséget. **B**, **C**: az ISO koncentráció-függő hatásai az akciós potenciál felénél mért platópotenciálokra (**B**), és a repolarizáció 90%-ánál mért AP-időtartamokra (APD₉₀, **C** panel). A kísérleteket 1Hz-es ingerlőfrekvencián végeztük. A kontrolltól való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést csillag jelzi. Az n jelöli a kísérletek számát.

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 szívizom-rétegekben szintén hozzájárulhat az eltérő eredményekhez. Mivel az akciós potenciál kiindulási morfológiájának szerepe nem kizárható az adrenerg stimuláció által kiváltott hatások esetén, ezért vizsgáltunk az izoproterenol hatását a 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 [131]. Emellett Rochetti és munkatársai kimutatták, hogy tengerimalac szívizomsejteken az izoproterenol AP-re és az azt létrehozó ionáramokra kifejtett hatása is frekvenciafüggő [4], ezért kutya szívizomsejteken vizsgáltuk, hogy az ingerlési frekvencia miként befolyásolja az izoproterenol kezelést. 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.

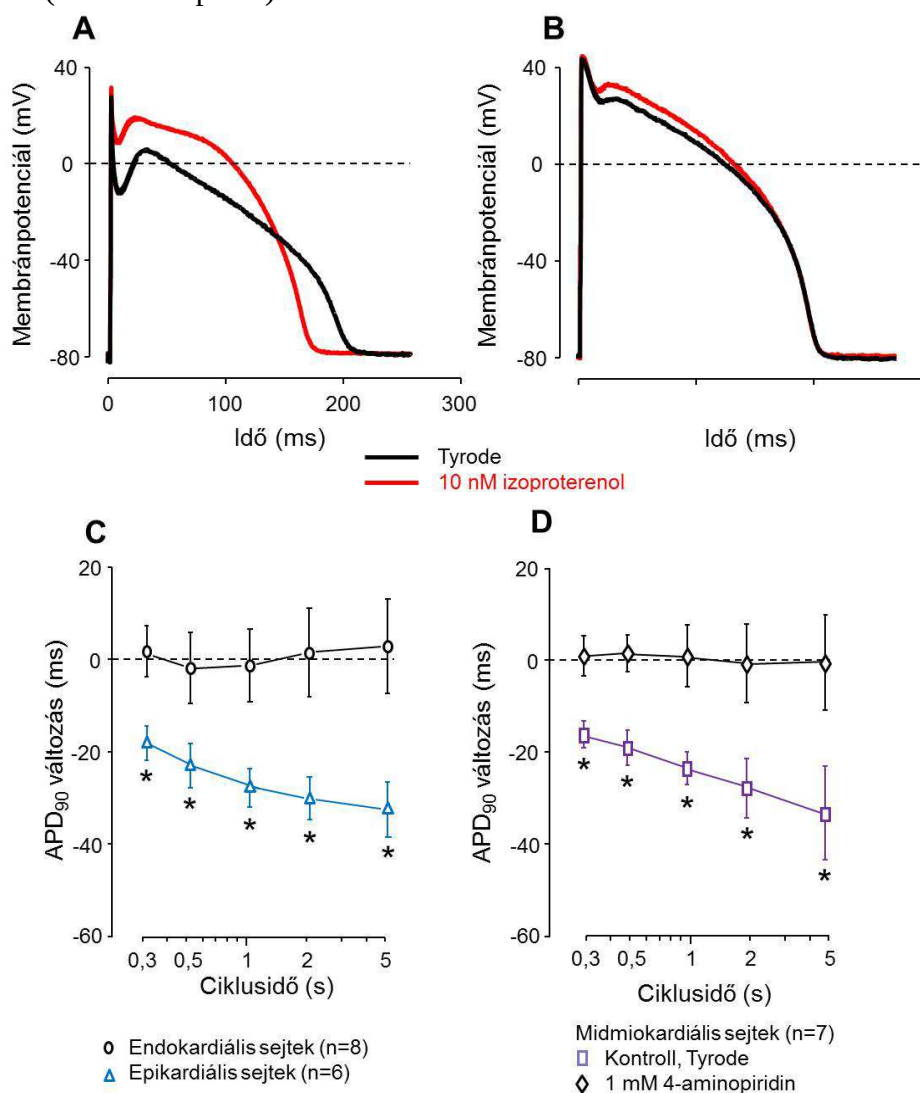


13. ábra: Az izoproterenol hatásának fordított frekvenciafüggése. **A:** 10 nM ISO okozta APD₉₀ csökkenés az alkalmazott ciklusidő függvényében ábrázolva. **B:** Az A panelen bemutatott kísérletek eredményei a kontroll akciós potenciál idejének függvényében ábrázolva. A kontrolltól való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést csillag jelöli, n a kísérletek számát mutatja.

Midmiokardiális sejteken az ISO okozta AP-rövidülés fordított frekvenciafüggőnek bizonyult, a legnagyobb változást alacsony frekvenciáknál, és a leghosszabb kontroll AP esetében tapasztaltuk ($n=6$) (13. ábra). Az ingerlési frekvencia növelésével a ciklushossz és az AP-időtartam csökkenésével párhuzamosan az adrenerg aktiváció okozta változás nagysága is csökkent. A változások mértékét a 13-as ábra B panelje szemlélteti, ahol a β -adrenerg stimuláció rövidítő hatását a kontroll akciós potenciál hosszának függvényében ábrázoltuk.

Az ábra demonstrálja, hogy az ISO APD-rövidítő hatása a leghosszabb AP esetén bizonyult a legnagyobb.

Az ISO hatását megvizsgáltuk epi- és endokardiális sejteken is. Megállapítottuk, hogy epikardiális sejteken – a midmiokardiumból származó sejtekhez hasonlóan – az ISO pozitív irányba mozdította el a platópotenciálokat, emellett frekvenciafüggő módon rövidítette az AP időtartamát (14. ábra A és C panel). Ugyanekkor az endokardiális sejtek esetén az adrenerg stimuláció nem rövidítette az akciós potenciál időtartamát (14. ábra B panel), az általunk vizsgált 0,3-tól 5 másodpercig tartó ciklusidők során az AP időtartama egyszer sem változott szignifikánsan (14. ábra C panel).



14. ábra: Az akciós potenciál morfológiájának szerepe az izoproterenol indukálta változásokban. Reprezentatív akciós potenciálok mutatják az ISO hatását epikardiális (A), valamint endokardiális sejten (B), 1 Hz ingerlési frekvencia mellett. C: epikardiális (körök) és endokardiális sejtek (háromszögek) akciós potenciál hosszának változása különböző ingerlési frekvenciákon vizsgálva. D: Midmiokardiális sejtek APD₉₀ értékének változása ISO hatására különböző ingerlési frekvenciákon vizsgálva kontroll körülmények között (négyzetek), valamint 4-aminopiridin (rombuszok). A kontrolltól való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést csillag jelzi. A kísérletek számát n jelöli.

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 AP első fázisának létrehozásáért az I_{to} felelős, amely midmiokardiális sejteken nagyobb amplitúdójú az endokardium sejtrétegéhez viszonyítva. Az első fázis szerepének tisztázásához midmiokardiális sejteken 1 mM 4-aminopiridinnel gátoltuk az I_{to} -t, ennek hatására a midmiokardiális sejtek akciós potenciálja az endokardiális sejtekéhez vált hasonlón. A 4AP-vel előkezelt midmiokardiális sejteken aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat, a korábbiakhoz hasonlóan 10 nM izoproterenollal. Az ilyen módon megváltoztatott AP-k hossza az ISO kezelés hatására egyetlen vizsgált frekvencián sem csökkent (14. ábra D panel). Ebből arra következtettünk, hogy az akciós potenciál morfológiája befolyásolja a β -adrenerg stimuláció akciós potenciál időtartamát módosító hatását, és a rövidítő hatáshoz szükséges az AP úgynevezett „*spike and dome*” konfigurációja.

Az izoproterenol módosító hatásában részt vevő ionáramok azonosítása

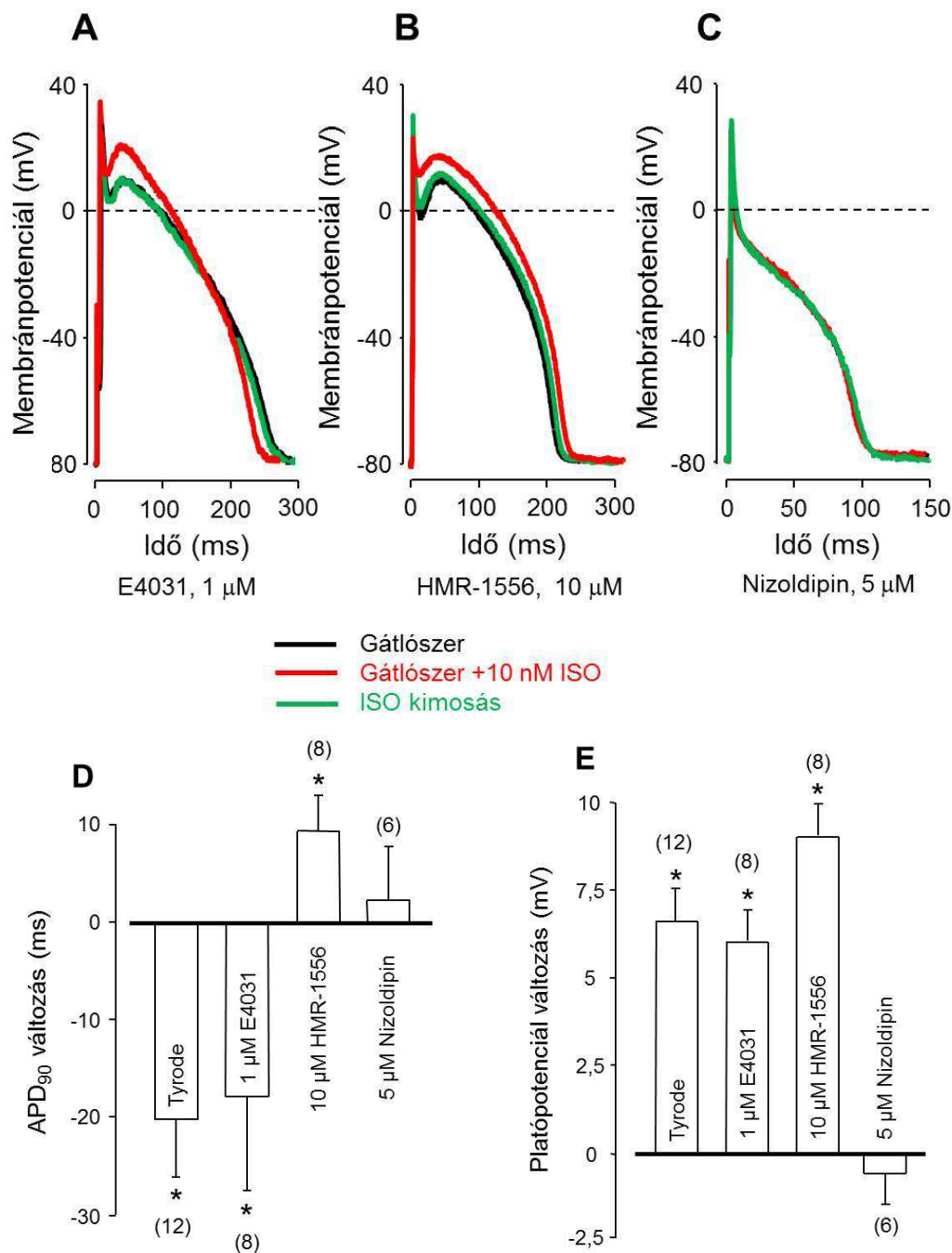
A β -adrenerg stimulus során számos ioncsatorna-fehérje foszforilálódik, ezáltal növelve a csatornán átfolyó ionáram amplitúdóját. Az izoproterenol által befolyásolt áramok közül az L-típusú kalciumáram növelése régóta ismert, Emellett a késői káliumáram komponenseinek, különösen az I_{Kr} -nek tulajdonítanak jelentős szerepet az AP időtartamának meghatározásában. Munkacsoportunk korábban már kimutatta, hogy a késői káliumáram lassú komponense is megnövekszik β -adrenerg stimulusra [7]. Kísérleteinkben ezért kamrai midmiokardiális sejteken vizsgáltuk az ISO hatását az I_{Ca} , az I_{Kr} és I_{Ks} áramokra.

Midmiokardiális sejteken megvizsgáltuk, hogy az I_{Kr} , I_{Ks} , valamint az I_{Ca} előzetes gátlása hogyan módosítja az adrenerg stimuláció hatását az AP lefutására. 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. Kontrollként a különböző gátlószerekben rögzített AP-kat használtuk.

Az I_{Kr} előzetes blokkolására 1 μ M E-4031-et használtunk. 1 μ M E-4031 az akciós potenciált szignifikánsan megnyújtotta, 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. Az ISO hatása reverzibilis volt (15. ábra A panel) A kísérletet nyolc sejten elvégezve azt tapasztaltuk, hogy E-4031 és ISO

jelenlétében kapott APD₉₀ rövidülés (19,1±8,4 ms), és a platópotenciál emelkedése (6,12±0,8 mV) is közel azonos mértékűek voltak a gátlószer nélküli Tyrode oldatban elértekkel.



15. ábra: Izoproterenol hatása az akciós potenciál konfigurációjára ioncsatorna-gátlók jelenlétében. A reprezentatív akciós potenciálokat 1 μ M E-4031 (A), 10 μ M HMR-1556 (B), és 5 μ M nizoldipin (C) alkalmazása mellett rögzítettük. Az izoproterenol okozta átlagos APD₉₀ változásokat a D panel, míg a platópotenciál változásokat az E panel mutatja. A kontrolltól való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést csillag jelzi. A kísérletek számát n jelöli.

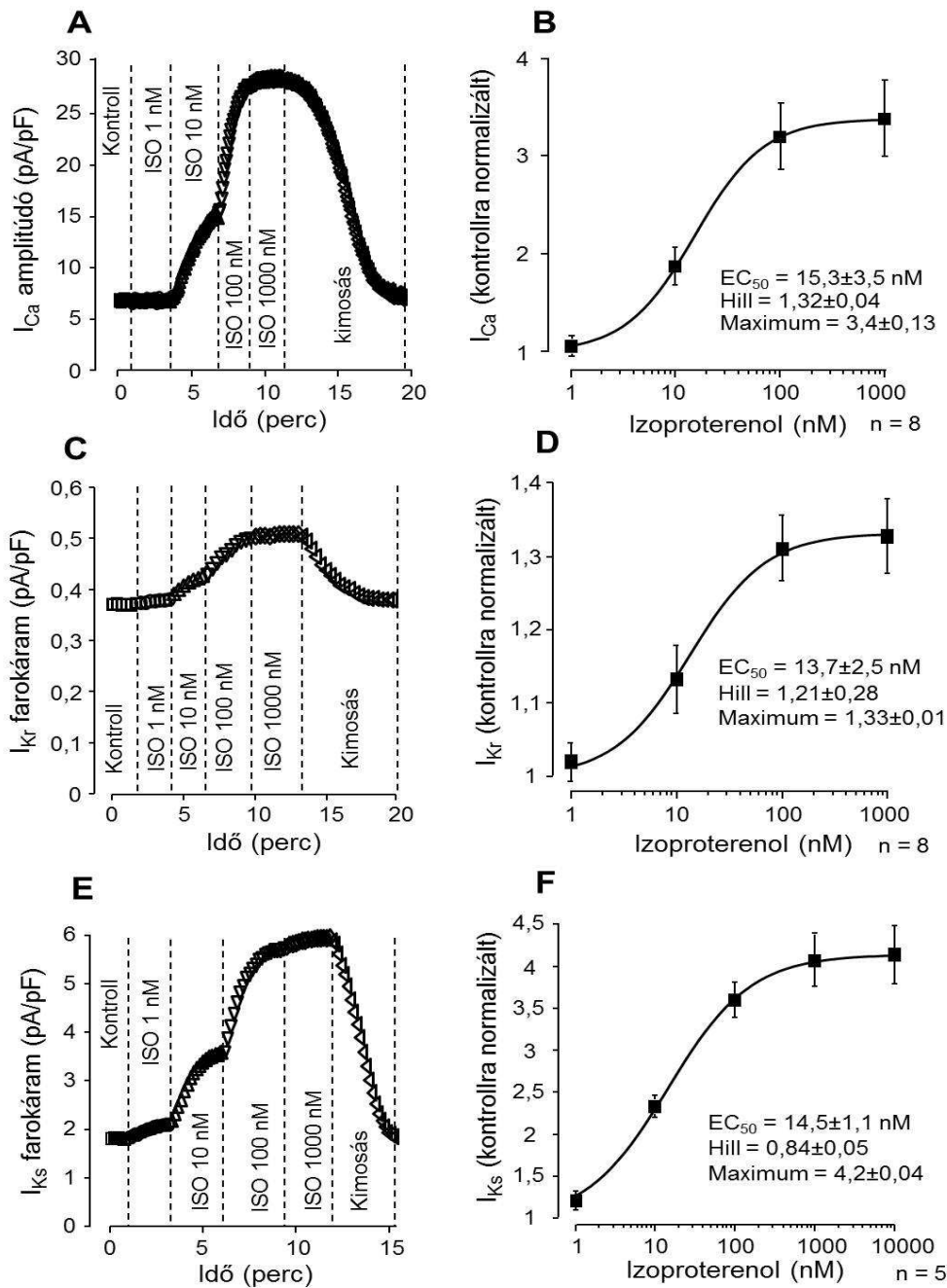
Az I_{Ks} gátlására 10 μ M HMR-1556-t használtunk, és ebben a kísérletsorozatban a HMR-1556 jelenlétében mért AP-t tekintettük kontrollnak. A HMR-1556 önmagában alig befolyásolta az AP paramétereit, azonban ISO hatására a platópotenciál szignifikáns növelése mellett az APD a várakozásainkkal ellentétben nem csökkent, hanem $16,6 \pm 6,3$ ms-al nőtt ($n=8$, $p \leq 0,05$). Az ISO hatása ez esetben is reverzibilis volt (15. ábra B panel). Nyolc mérés átlaga alapján a HMR-1556ot tartalmazó oldatban izoproterenollal elért platópotenciál-emelkedés $8,9 \pm 0,88$ mV-nak adódott. Ezek a platópotenciál-változások némileg nagyobbak voltak, mint a Tyrode-oldatban tapasztaltak, a különbség azonban nem volt szignifikáns ($n=8$, n.s.).

Az L-típusú kalciumcsatornákat 5 μ M nizoldipinnel gátoltuk, amely meggátolta az AP platófázisának kialakulását (15. ábra C panel). 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. $n=6$). Az AP időtartama nizoldipin és izoproterenol jelenlétében annak ellenére nem változott, hogy a késői káliumáram komponenseit ebben az esetben nem blokkoltuk specifikus gátlószerekkel. 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 egészséjtes konfigurációjában mértük I_{Ca} , I_{Kr} és I_{Ks} ionáramokat.

Az ionáramok méréséhez az anyagok és módszerek részben leírt gátlószereket, illetve feszültség-protokollokat használtuk. Az izoproterenol nélkül mért áram amplitúdót tekintettük kontrollnak. A sejteket 1 nM-tól 1 μ M-ig egyre növekvő koncentrációjú izoproterenolt tartalmazó oldattal perfundáltuk, és az ionáramok amplitúdójának változását vizsgáltuk. Az ISO minden koncentrációját 2-3 percig adagoltunk a sejteknek, ennyi idő alatt az ISO kifejtette a maximális hatását. Az áram amplitúdóját a sejtkapacitásra normalizáltuk, és az idő függvényében ábrázoltuk. A kísérleteket követően a kimosás 5-10 percig tartott.

A 16. ábra bal oldalán egy-egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja. A 16. ábra A részén egy reprezentatív I_{Ca} látható. Az I_{Ca} amplitúdója dóziszfüggő módon növekedett. 100 nM izoproterenol közel maximális változást hozott létre, 1 μ M-ra növelve a koncentrációt nem kaptunk további jelentős növekedést.



16. ábra: Az izoproterenol koncentrációfüggő hatásai az I_{Ca} (A, B), I_{Kr} (C, D) és I_{Ks} (E, F) ionáramokra. A baloldali panelek egy-egy reprezentatív árammérést mutatnak, melyeknél a sejtkapacitásra normalizált áramamplitúdókat ábrázoltuk az eltelt idő függvényében. Két pont között az A,C és E paneleknél rendre 5, 20, illetve 10 másodperc telt el. Függőleges szaggatott vonalak jelzik az egyre növekvő koncentrációjú izoproterenol perfúziójának, illetve a kimosásnak a kezdetét. A kontroll áramamplitúdóra normalizált változást a jobb oldali panelek ábrázolják az alkalmazott ISO-koncentráció függvényében, mellettük a Hill egyenlet illesztésével kapott értékeket ábrázoltuk. Az átlagértékeket szimbólumok, a szórást függőleges vonalak mutatják. A kísérletek számát n jelöli.

Öt mérés eredményei alapján meghatároztuk a kalciumáram amplitúdójának ISO-függését (16. ábra B panel). A kontroll körülmények között mért áram amplitúdóját vettük 1-nek, és ehhez viszonyítottuk az áram változásait. Az eredményeket Hill-egyenlettel (1. egyenlet)

illetve a válasz relatív maximuma $3,40 \pm 0,13$ -nak, az izoproterenol félaktíváló koncentrációja $15,3 \pm 3,5$ nanomólnak, a Hill-koefficiens pedig $1,32 \pm 0,04$ -nak adódott.

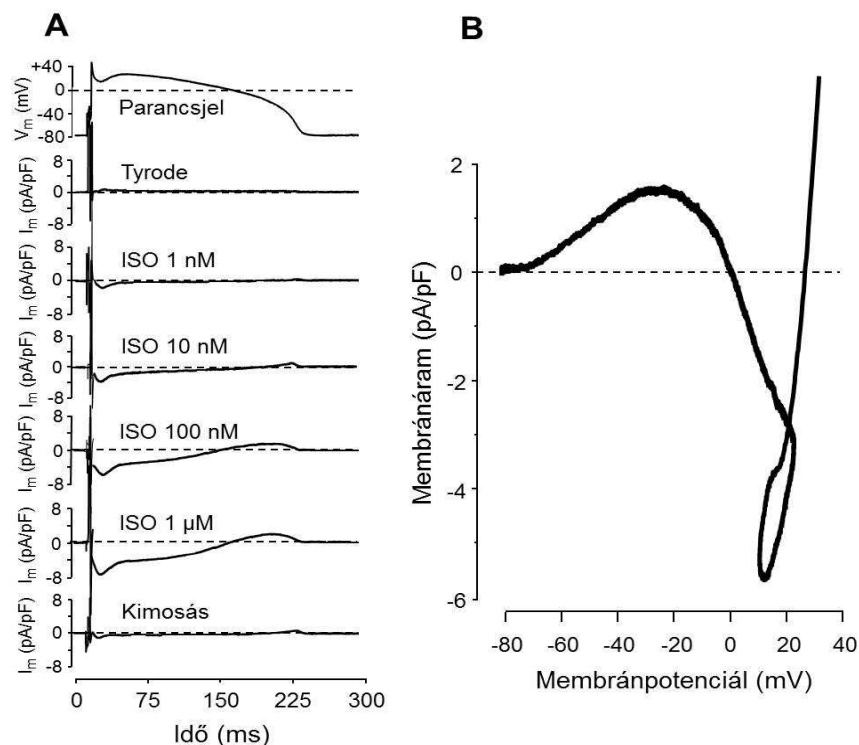
Az I_{Kr} mérése során a farokáram amplitúdójának változásait vizsgáltuk (16. ábra C és D panel). Az ISO ez esetben is koncentrációfüggő módon növelte az I_{Kr} amplitúdóját, ennek mértéke azonban jelentősen elmaradt a kalciumáramnál tapasztaltakhoz viszonyítva. Nyolc kísérlet eredményét az az ISO koncentráció függvényében ábrázoltuk (16. ábra D panel), Hill-egyenlettel illetve a maximális válasz $1,33 \pm 0,01$ volt. 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 dózisfüggő módon nőtt izoproterenol hatására, már 10 nM ISO is közel duplájára növelte az I_{Ks} amplitúdóját (16. ábra E panel). A kumulatív dózis-hatás görbét a korábbiak szerint ábrázoltuk (16. ábra F panel) és illesztettük Hill-egyenlettel. 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.

Az árammérésekkel kapott eredmények összhangban vannak az AP-mérésekkel tapasztaltainkkal, nevezetesen a β -adrenerg stimulusra bekövetkező I_{Ca} és I_{Ks} amplitúdó növekedés lehet felelős a plató emelkedéséért és az AP rövidüléséért. Az egyes kísérletek alapján meghatározott félhatásos koncentrációk és a Hill-koefficiensek alapján feltételeztük, hogy az áramok fokozása egy közös jelátviteli útvonallal valósul meg.

A hagyományos patch-clamp technika alkalmazásakor az ioncsatornákat négyszögimpulzusokkal aktiváljuk, és equilibrium körülmények között vizsgáljuk a viselkedésüket. Az AP alatt azonban a membránpotenciál folyamatosan változik, az ioncsatornák nem egyensúlyi körülmények között működnek. Mivel 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.

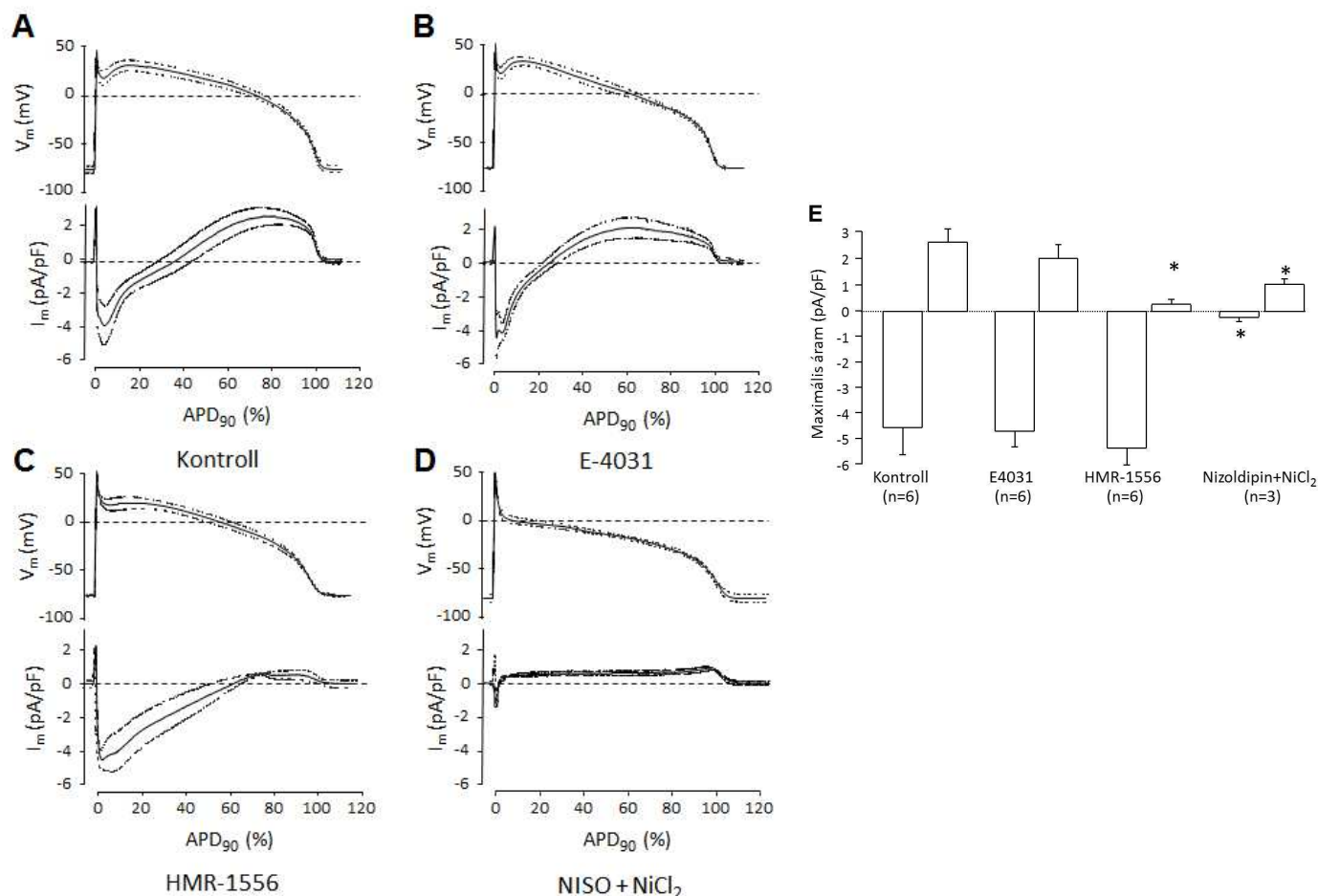
Elsőként a sejteket 1 nM és 1 μ M között növekvő koncentrációjú izoproterenollal perfundáltuk (17. ábra A panel). Az ISO növekvő koncentrációjának hatására két jól elkülöníthető áramcsúcs jelent meg az áramgörbén. Az áramcsúcsok közül az első az AP lefutását tekintve korábban jelenik meg és negatív irányú, vagyis befelé irányuló (inward) áram, míg a később megjelenő pozitív irányú kitérés kifelé irányuló (outward) áramot jelez.



17. ábra: Izoproterenol koncentrációfüggő hatása a sejtek membránáram-változására (I_m) akciós potenciál feszültség clamp mérés során (A). A parancsjelként szolgáló AP a legfelső görbén látható. Alatta a kumulatív ISO dózisok hatásait, míg a legalsó görbén az izoproterenol kimosásának eredményét ábrázoltuk. A lefelé irányuló kitérések befelé, míg a felfelé mutatóak kifelé irányuló ISO-aktivált áramokat jelölnek. A szaggatott vonalak nulla mV-os membránpotenciált, illetve nulla membránáramot jelölnek. B; Áram-feszültség kapcsolat (fázissík diagram); a 100 nM ISO által aktivált membránáramokat az AP időtarama alatt mért aktuális membránfeszültség függvényében ábrázoltuk.

A 17. ábra B panelén látható fázissík-diagram (áram-feszültség görbe) alapján 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, az adrenerg stimulus megszűnte után a kitérések is közel nullára csökkentek. A további AP-clamp kísérletekben a maximális hatás eléréséhez 100 nM koncentrációjú izoproterenolt alkalmaztunk, kombinálva a korábban használt különböző ioncsatorna-blokkolókkal. A mérések menete a következő volt: a sejteket egy specifikus gátlószerezrel perfundáltuk, és áram-clamp módban rögzítettük a sejt saját AP-jét, majd feszültség-clamp módra váltottunk, és a rögzített AP-t használtuk parancsjelként. Ezután a sejteket a gátlószert és 100nM ISO-t tartalmazó oldattal perfundáltuk. A méréseket többször megismételve átlagoltuk a különböző gátlószerekkel mért parancsjeleket, valamint a kapott áramgörbéket is. Minden esetben a görbék átlagait folyamatos, a szórást pedig szaggatott vonalak mutatják, melyeket az APD_{90} függvényében ábrázoltunk (18. ábra A-D panel). Az így kapott áramgörbéket az izoproterenollal aktivált, gátlószert nélküli áramgörbékhez hasonlítottuk (18. ábra A panel), ezt tekintettük kontrollnak. Az 18. ábra B,C,D paneljein

bemutatott áramgörbéket az A panelhez hasonlítva megállapítottuk, hogy az I_{K_r} -t gátló $1\ \mu\text{M}$ E-4031 előzetes alkalmazása nem változtatta meg az ISO által létrehozott áramprofilot. I_{K_s} gátló HMR-1556 esetén az adrenerg stimulus hasonló nagyságú inward, de lényegesen lecsökkentett amplitúdójú outward csúcsot hozott létre a kontrollként szolgáló 18. ábra A panelhez viszonyítva.

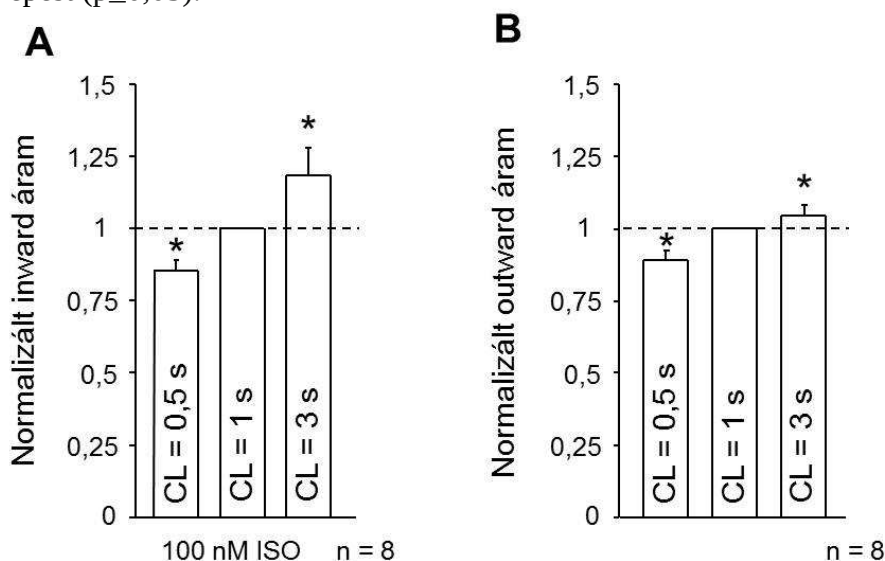


18. ábra: 100 nM ISO membránáramokra kifejtett hatása AP-clamp mérések alatt Tyrode-oldatban (A), $1\ \mu\text{M}$ E-4031 (B), $10\ \mu\text{M}$ HMR-1556 (C), valamint $10\ \mu\text{M}$ nizoldipin és 5mM NiCl₂ jelenlétében (D). A kísérletek feszültségparancsait, illetve a kapott áramgörbéket átlagoltuk és az akciós potenciál időtartamának függvényében (az APD₉₀ értékét 100 százaléknak tekintve) ábráztuk. Folyamatos vonalak jelzik a kísérletek átlagát, pontozott vonalak a szórást. A lefelé irányuló kitérések befelé, míg a felfelé mutatók kifelé irányuló ISO-aktivált áramokat jelölnek. A szaggatott vonalak nulla mV-os membránpotenciált, illetve nulla áramot jelölnek. E: A különböző kísérletek során kapott befelé, és kifelé irányuló áramcsúcsok átlagait az oszlopok mutatják. A kontrolltól való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést csillaggal jelöltük. A kísérletek számát n jelöli.

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 ($n=7$). Ezért kísérleteinkben 10 mikromólosra növeltük a nizoldipin koncentrációját, kiegészítve 5 mM nikkel-kloriddal, az $I_{Ca,T}$ gátlószerével. Ahogyan a 18. ábra D panelje is demonstrálja, 10 μM nizoldipin és 5 mM NiCl_2 jelenlétében elhanyagolható nagyságú a befelé irányuló áram amplitúdója, és a kifelé irányuló áram amplitúdója is elmaradt a kontrollhoz képest.

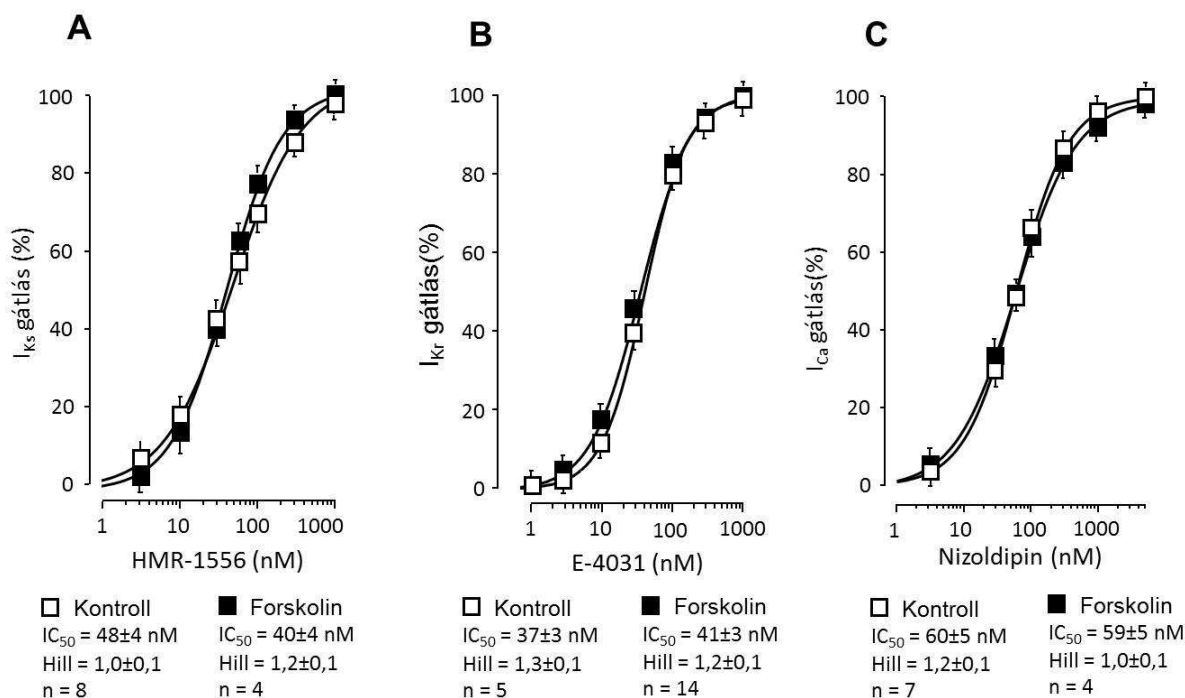
AP-clamp kísérleteink eredményeit a 18. ábra E paneljén foglaltam össze. Meghatároztuk a befelé és kifelé irányuló áramok sejtkapacitásra normalizált csúcsértékét. Kontroll mérések során, amikor csak izoproterenollal perfundáltuk a sejteket, $4,62 \pm 1,08$ pA/pF nagyságú befelé irányuló, és $2,72 \pm 0,53$ pA/pF amplitúdójú kifelé irányuló csúcsot kaptunk ($n=6$). E-4031 esetén nagyon hasonló értékeket kaptunk, az I_{K_r} gátlása esetén az inward áramcsúcs $4,78 \pm 0,6$ pA/pF, míg az outward csúcs $2,1 \pm 0,51$ pA/pF-nak adódott ($n=6$, n.s.). HMR-1556 alkalmazása során a befelé irányuló áramcsúcs $5,55 \pm 0,67$ pA/pF, míg a kifelé irányuló $0,31 \pm 0,14$ pA/pF volt ($n=6$, $p \leq 0,05$). A kontrollnál nagyobb inward áramok összhangban vannak az AP-mérésnél is tapasztalt némileg magasabb platópotenciál-emelkedéssel. A kalciumcsatornák gátlásakor $0,22 \pm 0,16$ pA/pF nagyságú befelé irányuló, és $1,05 \pm 0,21$ pA/pF-os kifelé irányuló áramot mértünk ($n=3$). Mindkét változás szignifikánsan kisebb volt a kontrollhoz képest ($p \leq 0,05$).



19. ábra: 100 nM izoproterenol membránáramokat módosító hatása AP-feszültség clamp módszerrel mérve különböző ciklusidők (0,5, 1 és 3 másodperc) mellett. Az 500 ms-os és 3 másodperces ciklushossz során mért inward (A) és outward (B) áramcsúcsokat az 1 másodperces ciklusidőn kapott áramcsúcsokra normalizáltuk. Az 1 Hz-es értékektől való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést csillaggal jelöltük. A kísérletek számát n jelöli.

A továbbiakban megvizsgáltuk az ingerlési frekvencia változtatásának hatását AP clamp módszerrel mért inward és outward ionáramokra. A sejteket 0,5, 1 és 3s ciklushosszúságú impulzusokkal ingereltük, minden frekvencián rögzítettük az AP-t, amelyeket később

feszültség-clamp üzemmódban parancsjelként használtunk. Az 1 Hz-es ingerléskor kapott kifelé és befelé irányuló csúcsokat tekintettük 100%-nak. Az eredményeket a 19. ábra foglalja össze ($n=8$, $p \leq 0,05$). Megállapítottuk, hogy a ciklushossz növelésével, illetve csökkentésével párhuzamosan nőtt, illetve csökkent mind az inward, mind az outward csúcsok amplitúdója, de a változás a befelé irányuló áramnál nagyobb mértékű volt.



20. ábra: 3 μ M forskolinnal foszforilált (fekete négyzetek), illetve nem foszforilált (üres négyzetek) ioncsatornák farmakológiai gátlásának vizsgálata. Hagyományos feszültség-clamp kísérletekkel meghatározott dózis-hatás görbék 10 μ M HMR 1556 (I_{Ks} gátlás, **A** panel), 1 μ M E-4031 (I_{Kr} gátlás, **B** panel) és 5 μ M nizoldipin (I_{Ca} gátlás, **C** panel) esetén. Mellettük a Hill egyenletek illesztésével kapott értékek láthatóak. A kísérletek számát n jelöli.

A csatornák foszforiláltságának szerepe a gátlószerek hatékonyságában

Az ioncsatornák foszforilációja megváltoztathatja az ioncsatornák fehérjéinek szerkezetét, és így a gátlószerek kötődését, mely így a gátlás mértékének csökkenéséhez vezethet. Korábban már vizsgáltuk az L-típusú kalciumáram-blokkolókat, és az adrenerg stimuláció egymásra hatását. Ennek során megfigyeltük, hogy kutya kamrai szívműködéseken az adrenerg stimulus képes aktiválni a kalciumáramot különböző gátlószerek jelenléte mellett is. Ezért megvizsgáltuk, hogy a csatornafehérjék foszforiláltságának változása milyen mértékben módosíthatja az általunk használt gátlószerek hatékonyságát. Ehhez a forskolinnal előkezelt

sejteken vizsgáltuk a specifikus gátlók 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.

A kapott eredményeket a 20. ábra mutatja be, ahol a szerkoncentráció függvényében ábrázoltuk az elért gátlást. Összehasonlítva a forskolinnal előkezelt és kontroll sejteken kapott eredményeket megállapítottuk, hogy egyik vizsgált ionáram esetén sem kaptunk szignifikáns eltérést sem az elért gátlás maximális értékében, sem a félgátló koncentrációkban, illetve a Hill-koefficiensekben sem. Megállapítottuk, hogy az ioncsatornák foszforilációja nem változtatta meg szignifikánsan az I_{Kr} , I_{Ks} és I_{Ca} áramok HMR-1556, E-4031, nizoldipin érzékenységét.

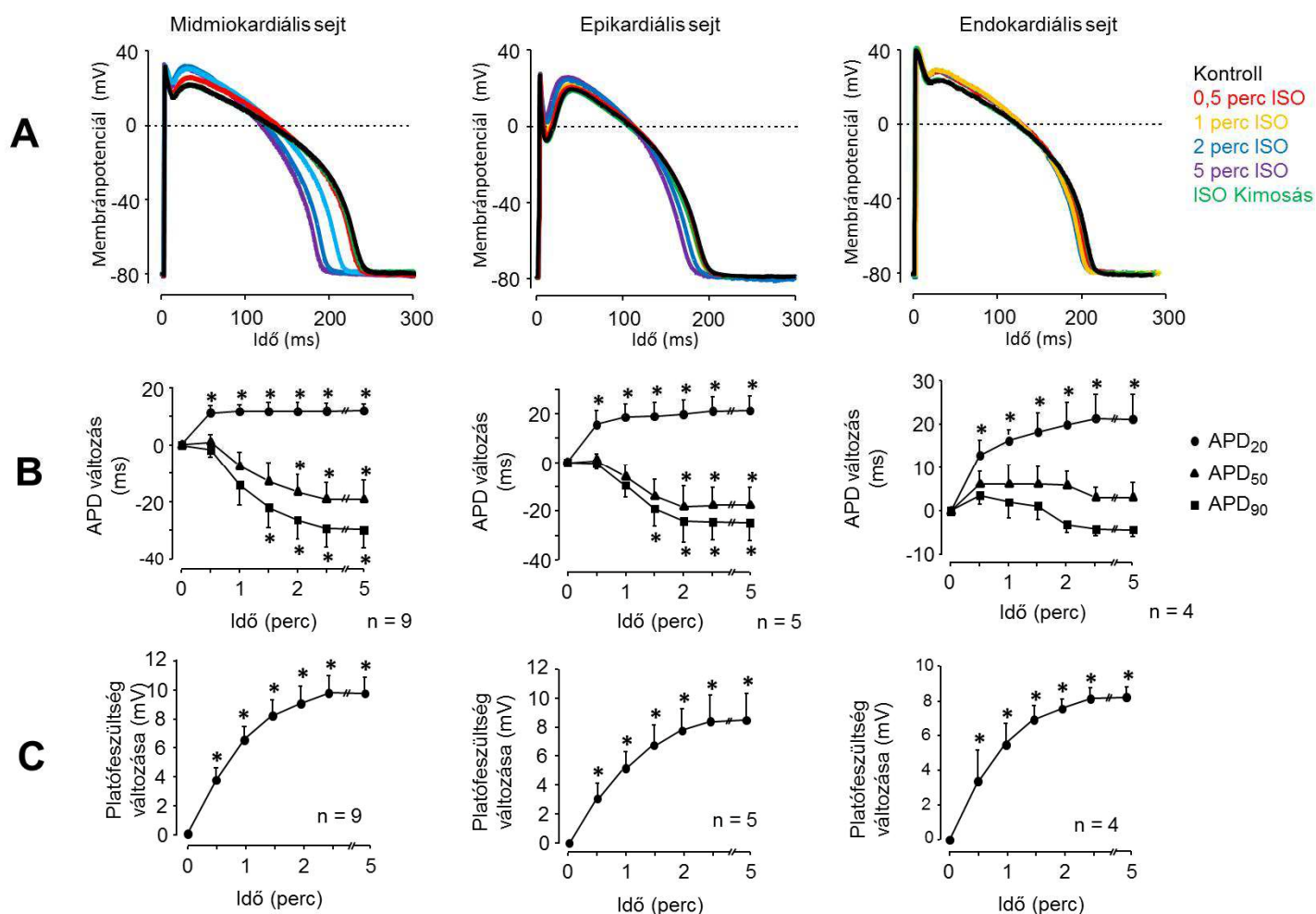
Izoproterenol időfüggő hatásai az akciós potenciál morfológiájára

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 vizsgálatakor a kamrafal különböző rétegeiből származó szívizomsejtek akciós potenciáljait vizsgáltuk. Az AP analízisekor az APD_{90} mellett meghatároztuk a 20 és 50 százalékos repolarizációig eltelt időtartamot is, melyeket rendre APD_{20} -al és APD_{50} -el jelöltünk.

A 21. ábra A panelje 10 nM izoproterenol hatásának kialakulását demonstrálja az idő függvényében epikardiális, midmiokardiális és endokardiális sejteken. 10 nM ISO hatására a platópotenciálok mindhárom sejttípus esetén (epi-, mid-, és endokardiálison is) pozitívabb membránpotenciálok felé mozdultak el, ami statisztikailag szignifikáns volt az ISO perfúzió kezdetétől számított 30 másodpercen belül (21. ábra C panel). 3 perc ISO perfúzió után a platópotenciálok emelkedésének mértéke hasonló mértékű volt mindhárom sejtpopulációnál. Midmiokardiális sejteken $9,2 \pm 2$ mV, epikardiális sejteknél $8,2 \pm 1,5$ mV, és endokardiális sejtpopuláció esetén $8,2 \pm 0,6$ mV-os emelkedést tapasztaltunk öt perc ISO perfúzió után. Egyik sejttípus esetén sem volt jelentős eltérés a platópotenciál változásának kinetikájában, mindhárom sejttípusnál 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. Az ISO okozta APD_{20} növekedés 2,5 perc után midmiokardiális sejteken $11,9 \pm 3,1$ ms, epikardiális sejteken $20,7 \pm 5,4$ ms volt. ISO hatására az endokardiális sejteken is megfigyelhető volt az APD_{20} növekedése (2,5 perc után $22,1 \pm 6$ ms), amely a többi sejtípushoz hasonlóan fél perc után szignifikáns mértékű volt.



21. ábra: 10 nM izoproterenol időfüggő hatása az akciós potenciál morfológiájára midmiokardiális (bal oszlop), epikardiális (középső oszlop) és endokardiális (jobb oszlop) szívizomsejteken. A nulla perc jelenti az izoproterenol perfúziójának kezdetét. Az ingerlési frekvencia valamennyi mérésnél 1 Hz volt.

A: Reprezentatív AP-mérések az ISO hatására kifejlődő változások kinetikájának és reverzibilitásának bemutatására különböző típusú szívizomsejteken. A szaggatott vonal nulla mV-os membránpotenciál-értéket jelöl.

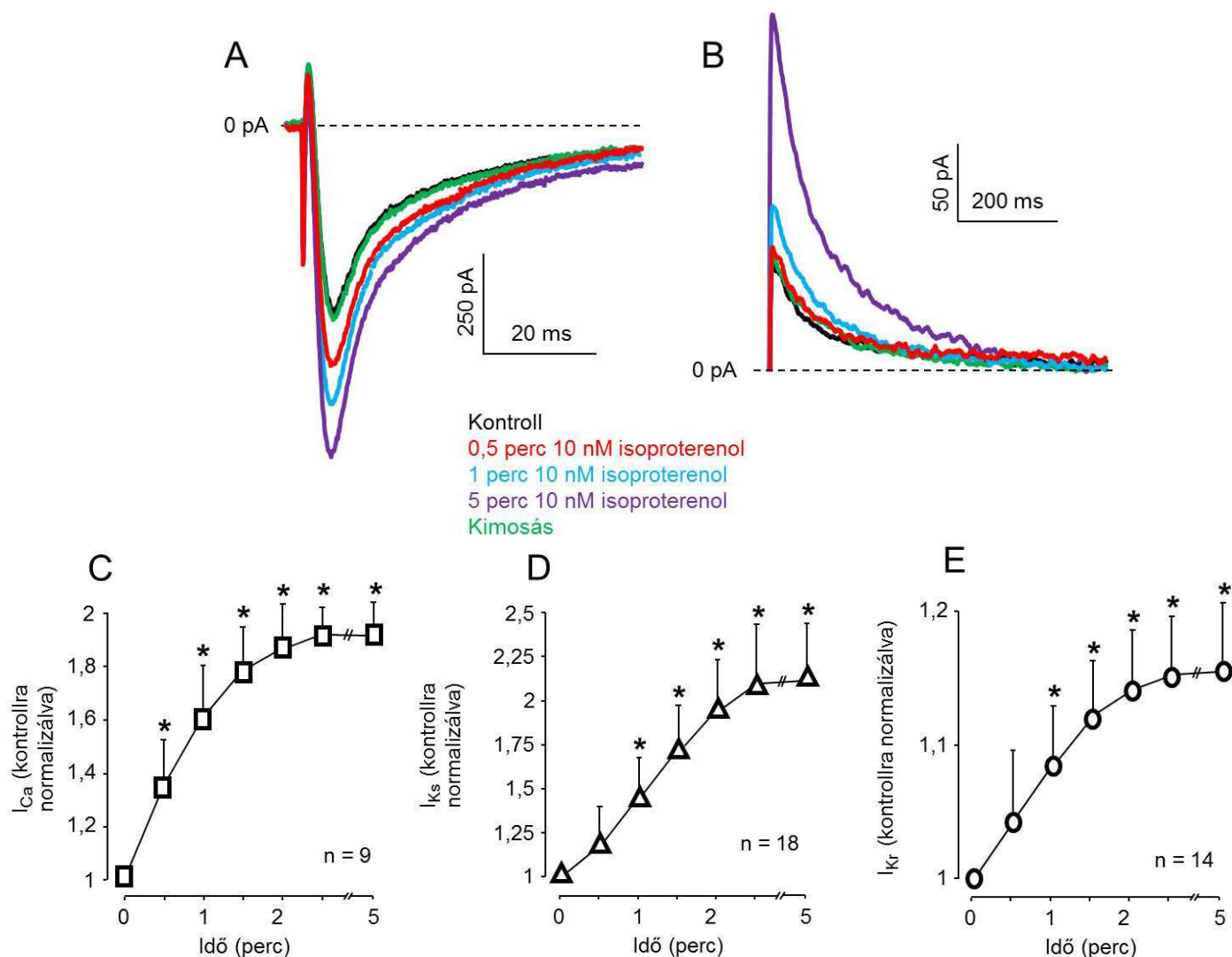
B, C: ISO hatására kifejlődő APD (**B**), illetve platópotenciál (**C**) változások időbeli kinetikája több mérés átlagán bemutatva. A platópotenciált az AP időtartamának felénél mért feszültségként határoztuk meg, míg az APD_{20} , APD_{50} és APD_{90} az akciós potenciál 20, 50, illetve 90%-os repolarizációjáig eltelt időt jelenti. A kontrolltól való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést csillag jelzi. A kísérletek számát n jelöli.

Az APD_{90} rövidülés midmiokardiális sejteken $29,7 \pm 6,6$ ms, epikardiális sejteken pedig $24,6 \pm 7$ ms volt (21. ábra B, C panel). Endokardiális sejteken az izoproterenol nem volt képes csökkenteni sem az APD_{50} , sem pedig az APD_{90} értékeket (APD_{90} -nél $6,6 \pm 1,4$ ms). Az adrenerg stimuláció emellett az endokardiális sejteken egy átmeneti, azonban statisztikailag nem szignifikáns APD_{90} nyúlást okozott röviddel az ISO perfúziójának megkezdése után. Az összes megfigyelt hatás reverzibilis volt az izoproterenol kimosását követő 5 percen belül (21. ábra A panel).

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 az ISO perfúziója során, hogy a perfúziós idő függvényében hogyan változik az I_{Ca} , I_{Ks} és I_{Kr} amplitúdója. Az AP mérések eredményeivel összhangban szignifikáns kalciumáram-amplitúdó növekedést tapasztaltunk 10 nM izoproterenol-expozíciót követő fél percen belül (22. ábra A panel). Két és fél perc elteltével már maximális választ kaptunk, és az ISO alkalmazási idejének további növelése már nem okozott jelentős I_{Ca} amplitúdó változást (22. ábra C panel. $n=9$, $p \leq 0,05$.)

A késői káliumáram mérések során az I_{Kr} méréseknél a korábban használt 20 helyett 30 másodpercre növeltük a ciklusidőt az eredmények jobb összevethetősége miatt. 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 (22. ábra D és E panel. $n=18$ az I_{Ks} , illetve $n=14$ az I_{Kr} esetén. Mindkét esetben $p \leq 0,05$.). A maximális amplitúdó növekedést a káliumáramok esetén is 2-2,5 perccel az ISO perfúziója után tapasztaltuk. A 22. ábra B panelje reprezentatív I_{Ks} farokáram-görbéket mutat be, az I_{Kr} -t az amplitúdó kismértékű változása miatt nem ábrázoltuk. Az izoproterenol által létrehozott változások korábbi kísérleteinkhez hasonlóan reverzibilisek voltak.



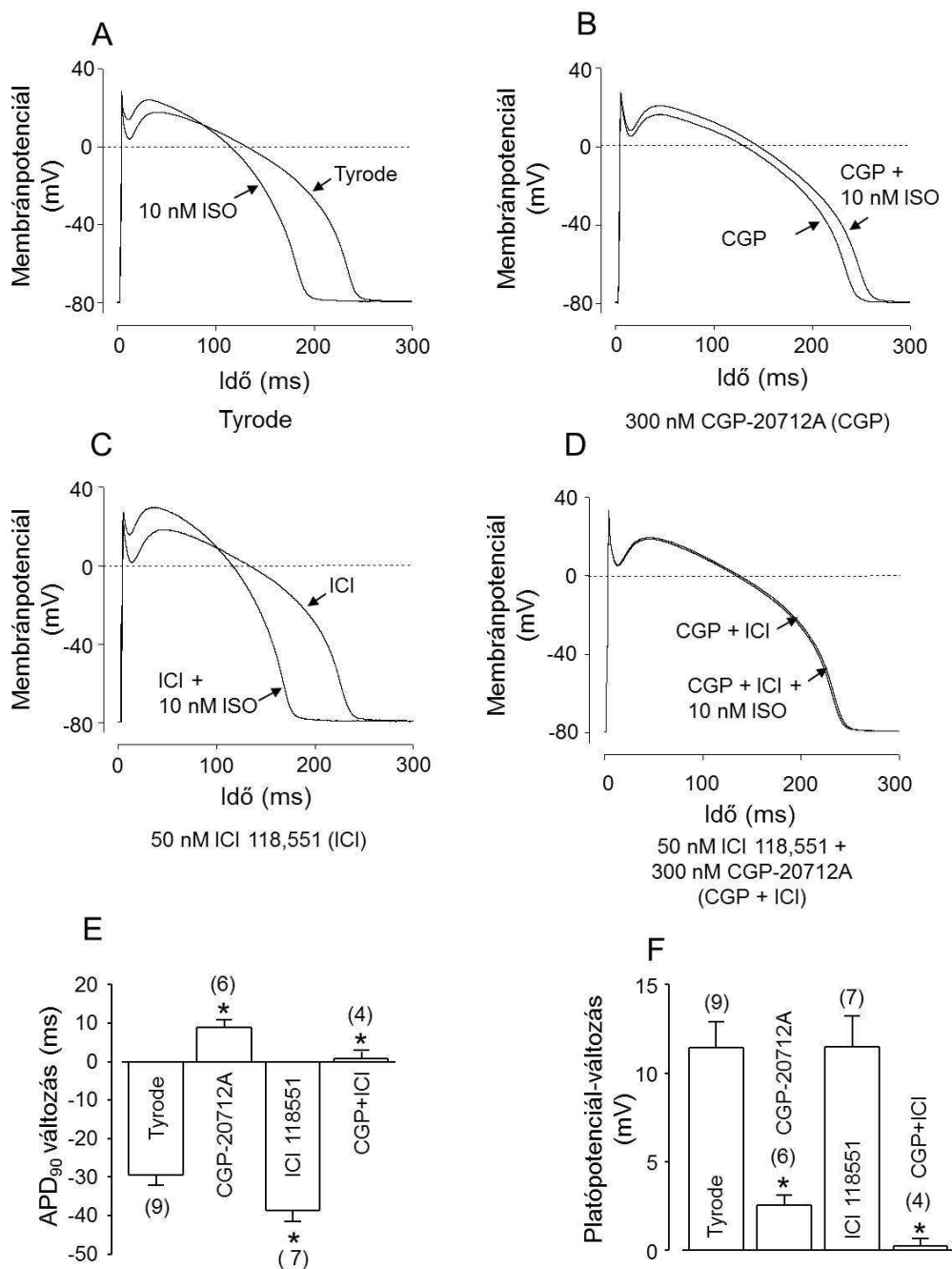
22. ábra: Az I_{Ca} , I_{Kr} és I_{Ks} áramok időfüggő aktivációja 10 nM ISO hatására. Reprezentatív kalciumáram (A) és I_{Ks} farokáram (B) görbék, az ISO perfúziójának kezdete óta eltelt időtartamok jelölésével. Az I_{Kr} farokáramokat az izoproterenollal elért kismértékű változás miatt nem ábrázoltuk.

A kontroll körülmények között mért áram amplitúdójára normalizált kalcium (C), I_{Ks} (D), és I_{Kr} (E) áramok aktivációja az ISO-expozíció idejének függvényében ábrázolva. A kontrolltól való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést csillag jelzi. A kísérletek számát n jelöli.

A jelet közvetítő β -adrenerg receptorok azonosítása

Az ISO aszimmetrikus stimuláló hatásának magyarázata lehet, hogy szívműködéseken 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 [132, 133]. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az izoproterenol által kiváltott karakterisztikus változásokért (az I_{Ca} miatti plató emelkedés,

valamint az APD₉₀ rövidülése, melyért főleg az I_{Ks} áram a felelős) eltérő adrenerg receptorok, és jelátviteli útvonalak aktiválódása felelős.



23. ábra: Izoproterenol hatása akciós potenciálok lefutására kontroll Tyrode-oldatban (A), β_1 blokkolás (300nM CGP-20712A, B panel), β_2 blokad (50 nM ICI 118,551, C panel) valamint kombinált $\beta_1+\beta_2$ (300 nM CGP+50 nM ICI; D panel) gátlás mellett. A midmiokardiális sejteket 5 percig 10 nM izoproterenollal perfundáltuk, az A-D ábra a már kialakult hatást mutatja a megfelelő gátlószerben rögzített AP-k mellett. Az ISO-indukálta APD₉₀ (E) és platópotenciál-változások (F) átlagai különböző gátlószerek jelenlétében. Csillag jelzi a kontrolltól való szignifikáns ($p \leq 0,05$) eltérést. Az elvégzett kísérletek száma zárójelben látható.

Ennek kiderítéséhez a β_1 , illetve β_2 receptorokat specifikus gátlószerekkel gátoltuk. A β_2 - receptorok specifikus gátlására 50nM ICI 118,551-et használtunk [134], míg a β_1 - receptorokat 300 nM CGP-20712A-val blokkoltuk [135]. Ebben a kísérletben kontrollnak a Tyrode-oldatban mért AP paramétereit tekintettük (23. ábra A).

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 (23. ábra B). 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 (23. ábra C). A két gátlószer együttes alkalmazásakor az izoproterenol jelenlétében mért AP nem különbözött a kontrolltól (23. ábra D).

Az akciós potenciál hosszának átlagos változását a különböző kísérletek során a 23. ábra E, a platópotenciál változásait pedig az F panel mutatja. A kapott adatokat kontrollhoz viszonyítva azt tapasztaltuk, hogy β_1 blokkoló alkalmazásával az akciós potenciál időtartama nem csökkent, hanem szignifikánsan növekedett ISO hatására ($n=6$, $p \leq 0,05$). β_2 blokkoló esetén az akciós potenciál rövidülése szignifikánsan meghaladta a β -blokkoló nélküli mérések során tapasztaltakat ($n=7$, $p \leq 0,05$). A platópotenciálok változása β_1 adrenerg receptorok gátlása során szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest, míg a β_2 adrenerg receptor gátlószer nem befolyásolta ezt a paramétert. A β_1 és β_2 adrenerg receptor gátlók együttes használatával az izoproterenol sem az AP időtartamát, sem a platópotenciált nem változtatta meg szignifikáns mértékben ($n=4$, $p \leq 0,05$).

A β_1 és β_2 adrenerg receptorokat gátló szerek együttes alkalmazása mellett nem kaptunk változást ISO perfúziója során. Ebből arra következtettünk, hogy az ICI 118,551 esetén megfigyelt változásokat csak a β_1 , míg CGP-20712A alkalmazása során csak a β_2 receptorok közvetítették. A β_3 receptoroknak – ha ki is mutathatóak kutya kamrai szívizomsejteken – a fiziológiás adaptáció során nincs szerepük.

A β receptorok szerepe az ISO okozta változások kinetikájában

Az izoproterenol időfüggő hatásait megvizsgáltuk akciós potenciál feszültség-clamp módszerekkel is. A méréseket az anyagok és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően végeztük.

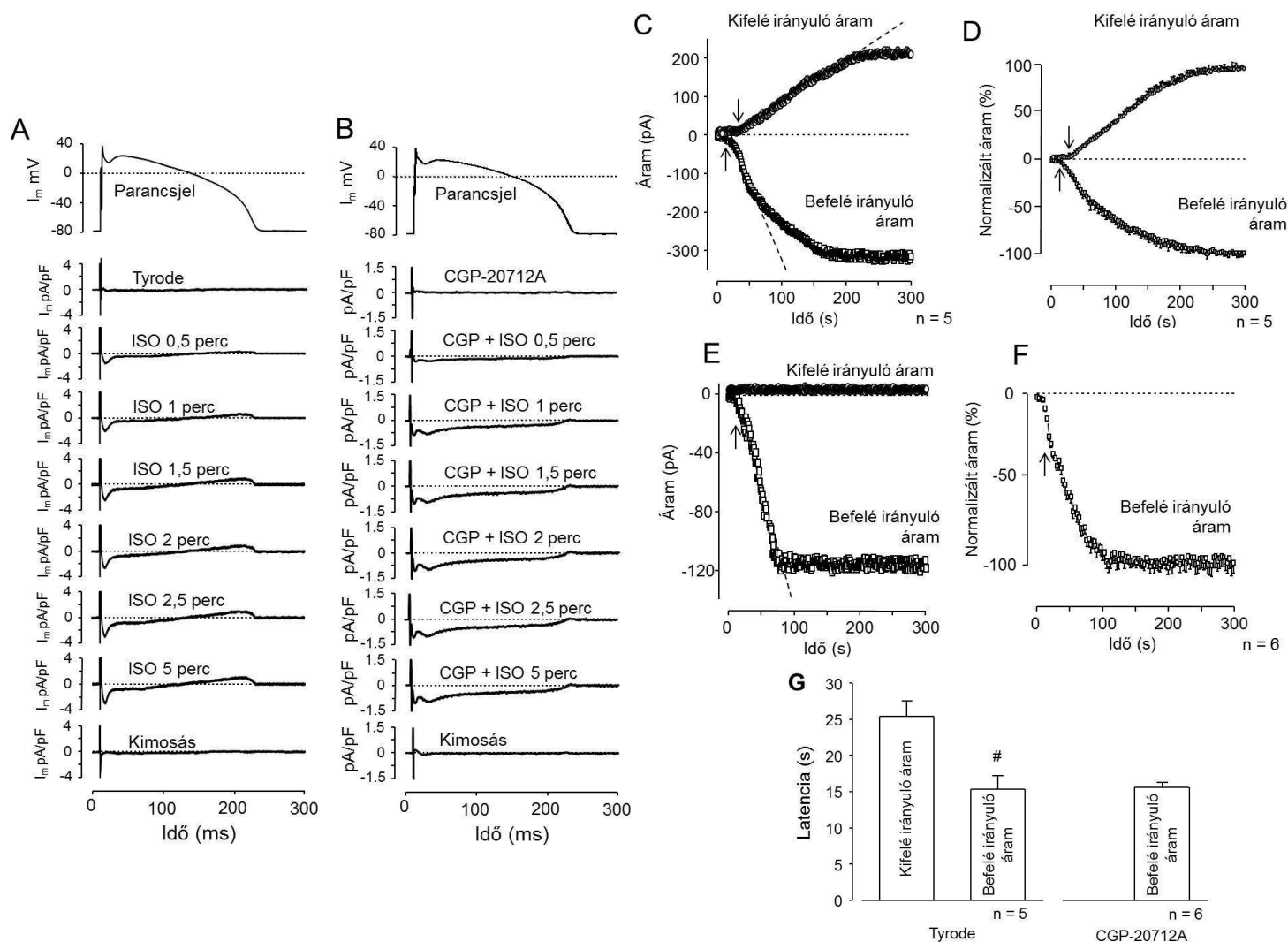
ISO hatására két áramcsúcs jelent meg az áramgörbén. Az áramcsúcsok közül az első az AP lefutását tekintve korábban jelenik meg és negatív irányú, vagyis befelé irányuló (inward) áram, míg a később megjelenő pozitív irányú kitérés kifelé irányuló (outward) áramot jelez. A kezdeti befelé irányuló áramot az I_{Ca} , a későbbi kifelé irányulót pedig az I_{Ks} és az I_{Kr} alkotja. A 24. ábra A panelje egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja. Az egyes áramgörbéket a 10 nM izoproterenol perfúziójának kezdetétől eltelt különböző időpillanatokban mértük. 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 (24. ábra B) 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.

Megmértük az A és B paneleken bemutatott kísérletek során kapott áramgörbék befelé és kifelé irányuló áramok maximális amplitúdóit, majd a kapott értékeket az idő függvényében ábrázoltuk. Két pont közötti időtartam 1 másodpercnek felel meg (24. ábra C-F panel). Nyilak jelölik azt az időpontot, amikor az ISO jelenlétében mért áram eltért a Tyrode-oldatban mérttől. Az ISO az ábrán jelölt 0 időpontban érte el a sejtet, így nyíllal jelölt és a nulla időpont közti különbséget tekintettük latenciának. A szaggatott vonalak a görbék kezdeti, meredek szakaszára kézzel illesztett egyenesek. A 24. ábra D panelje öt, az E pedig hat kísérlet eredménye alapján készült, ahol minden egyes mérés során az elért maximális válaszra normalizáltuk az amplitúdókat, és a befelé és kifelé irányuló áramcsúcsok időbeli változásait ábrázoltuk.

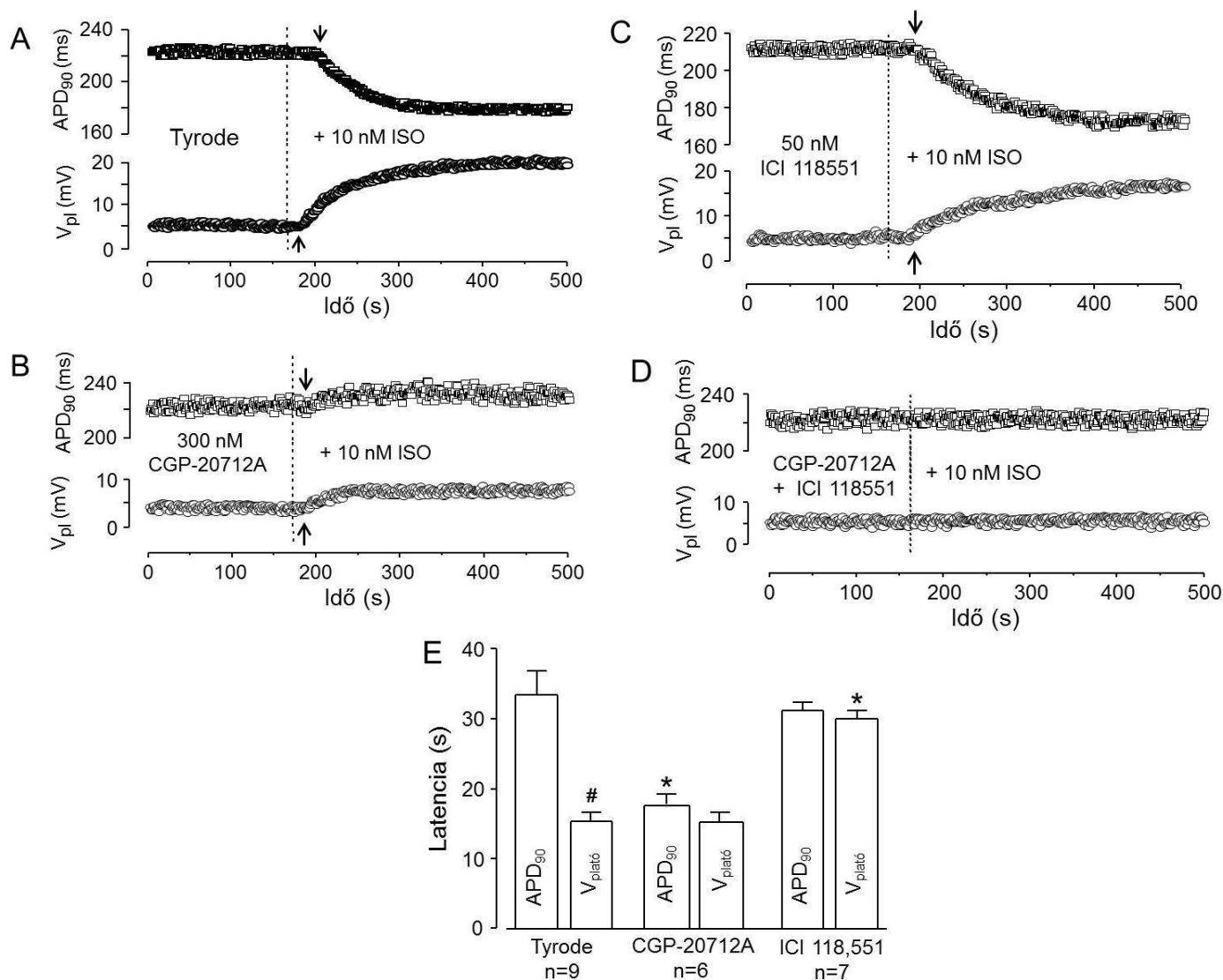
Megállapítottuk, hogy a β_1 receptorok gátlása 300 nM CGP-20712A-val megakadályozta a kifelé irányuló áram megjelenését. Ez arra utal, hogy 300 nM CGP-20712A jelenlétében az izoproterenol valószínűleg csak a kalciumáramot növelte. Megjegyzendő azonban, hogy az így aktivált kalciumáram maximális amplitúdója nem érte el a CGP-20712A-előkezelés nélkül elért amplitúdót.

A befelé, illetve kifelé irányuló áramcsúcsok megjelenésének latenciáját a 24. ábra G panelje mutatja. 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.



24. ábra: Az izoproterenol által befolyásolt áramok időfüggő aktivációja AP-feszültség clamp módszerrel vizsgálva. Az **A** panel egy Tyrode-oldatban felvett reprezentatív mérés áramgörbéit mutatja az ISO expozíció kezdetétől eltelt idő jelölésével. A **B** panel 300nM CGP-20712A alkalmazása során kapott ISO-indukált áramok görbéit mutatja be. Az ingerlési frekvencia mindkét esetben 1 Hz volt. Minden görbénél pontozott vonalak jelölik a nulla áramot, illetve feszültséget. Mindkét panelnél legfelül látható a parancssjelként használt AP, mely mindig a vizsgált sejt saját AP-je volt. Az ISO által aktivált befelé folyó (inward) áramokat lefelé, míg a kifelé folyó (outward) áramokat felfelé irányuló kitérések jelzik. A **C** és az **E** paneleken reprezentatív mérések, a **D** és **F** paneleken pedig több mérés átlagai láthatók nagyobb időbeli felbontással. A görbéket minden esetben az ISO adagolásának kezdetétől ábrázoltuk. A reprezentatív görbék készítése során minden egyes rögzített áramgörbe analízise során meghatároztuk a befelé és kifelé irányuló áramok csúcsértékeit, és ezeket ábrázoltuk az eltelt idő függvényében. A **D** és **F** panelek készítése során a maximális változásra normalizáltuk a mért áramamplitúdókat, majd az így kapott relatív értékeket ábrázoltuk az eltelt idő függvényében. Az izoproterenol módosító hatását Tyrode oldatban a reprezentatív **C** és az átlagokat bemutató **D** panel mutatja. 300nM CGP-20712A előkezelés hatását az **E** és **F** panelek mutatják be. A nyilak jelölik az első jelentős változásig eltelt időtartamot, vagyis a latenciaidőket, melyeket a **G** panel foglal össze. A kísérletek számát n jelzi. A kettős kereszt az inward és outward áramok latenciája közti szignifikanciát jelzi ($p \leq 0,05$).

A további kísérletekben β -adrenerg gátlók jelenlétében vizsgáltuk az izoproterenol hatásait az AP paramétereire. A 25. ábra A-D panelje egy-egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja. Az ábrákon a platópotenciálokat, és az akciós potenciál időtartamát ábrázoltuk az idő függvényében, két pont közötti időtartam 1 másodperc.



25. ábra: Reprezentatív időfüggő változások az akciós potenciál időtartamában (APD₉₀) és a platópotenciálokban (V_{plató}) normál Tyrode-oldatban (A), 300nM CGP-20712A (B), 50nM ICI 118,551 előkezelés során (C), illetve a két gátlószer kombinációja esetén (D) izoproterenol hatására. A függőleges szaggatott vonalak jelzik az ISO adagolásának kezdetét, nyilak jelölik a latenciaidők végét. Az így meghatározott latenciaidőket több kísérlet átlaga alapján az E panel foglalja össze. A kísérletek számát n jelzi. Csillagok jelzik a Tyrode-ban mért kontroll adatoktól való szignifikáns eltérést, és kettőskereszt jelöli az APD₉₀ és V_{plató} közötti szignifikáns különbséget ($p \leq 0,05$ mindkét esetben).

Függőleges szaggatott vonal jelzi az ISO perfúzió kezdetét, míg nyilak mutatják a paraméterek legkorábbi változását izoproterenol hatására. A két pont közötti időtartamból számoltuk a latenciaidőket, amit a 25. ábra E panelje mutat be. A szelektív β -adrenerg receptor-gátlók jelenlétében mért APD₉₀ és platópotenciál-változások megegyeznek a 23. ábrán bemutatottakkal.

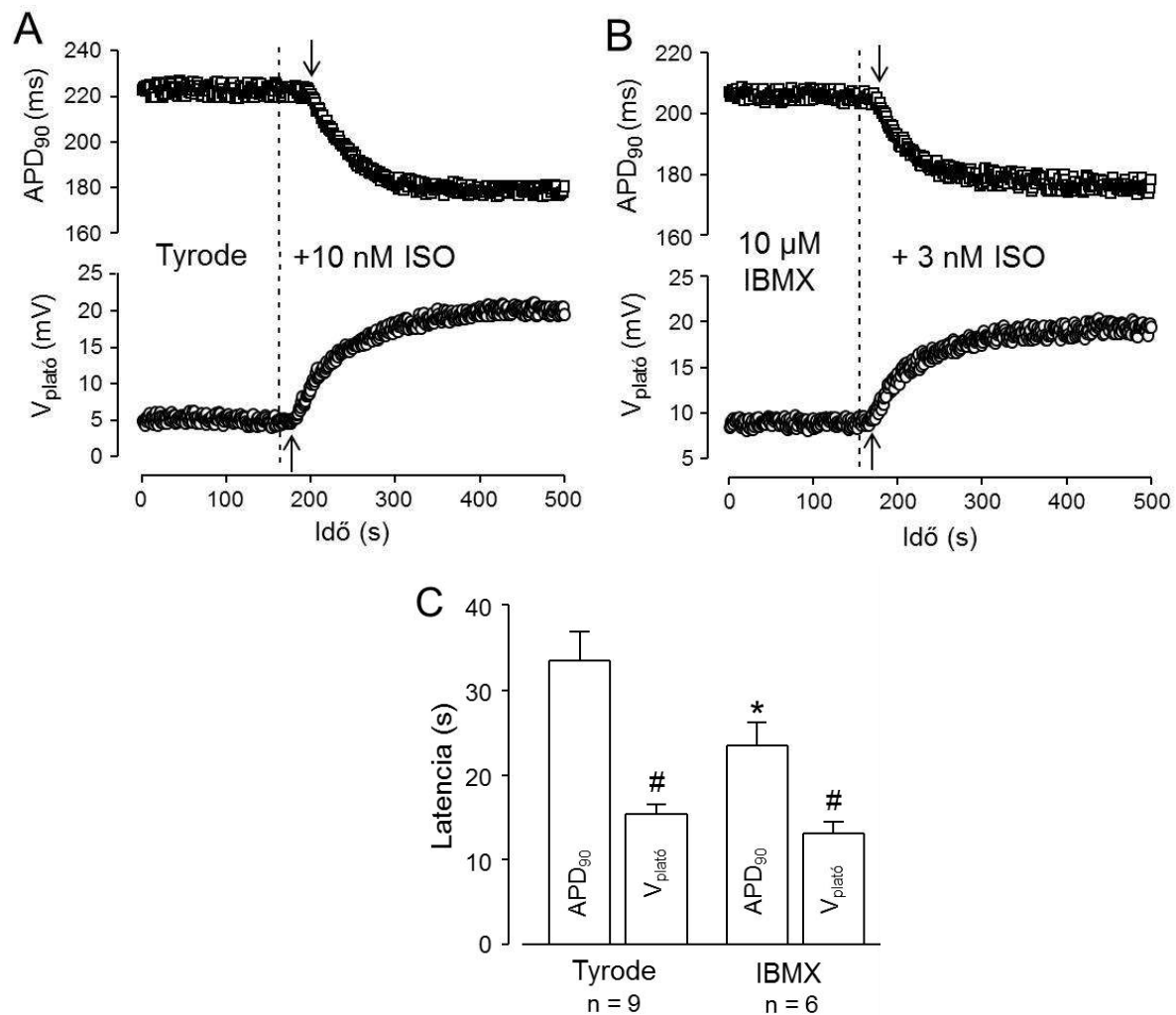
β_1 adrenerg receptor gátló jelenlétében az APD₉₀ latencia szignifikánsan kisebb volt ($17,6 \pm 1,5$ s, $n=6$, $p \leq 0,05$), mint a kontroll APD₉₀ latenciája ($33,4 \pm 3,4$ s, $n=9$), ugyanakkor hasonló volt a kontroll körülmények között mért ($14,1 \pm 1,3$ s, $n=9$), és CGP-20712A előkezelést követő platópotenciál latenciához ($15,1 \pm 1,6$ s, $n=6$). A CGP-20712A-val megfigyeltek ellentéte történt ICI 118,551 előkezelés után; az APD₉₀ 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 (25. ábra D).

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. AP-méréseket a korábbi kísérletekhez hasonlóan kontroll körülmények között (26. ábra A), valamint 10 μ M IBMX kezelés után is (26. ábra B) végeztünk. A reprezentatív ábrákon a platópotenciálokat, és az akciós potenciál időtartamát ábrázoltuk az idő függvényében, két pont között 1 másodperc telt el. Az izoproterenol perfúzióját szaggatott függőleges vonal, a változások kezdetét pedig nyilak jelzik. IBMX jelenlétében csökkentettük az izoproterenol koncentrációt, mert IBMX mellett már 3 nM ISO is akkora mértékű változásokat idézett elő, mint a kontroll esetben használt 10 nM izoproterenol.

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 APD₉₀ változás szignifikánsan gyorsabban kialakult ($23,4 \pm 2,6$ s, $n=6$, $p \leq 0,05$), mint IBMX nélkül ($33,4 \pm 3,4$ s, $n=9$) (26. ábra C panel).

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



26. ábra: Izoproterenol indukálta időfüggő változások az akciós potenciál időtartamában (APD₉₀) és a platópotenciálban (V_{plató}) kontroll körülmények között (A) és 10 μM IBMX előkezelést követően (B). IBMX jelenlétében 3 nM ISO elegendő volt, hogy a kontroll esetben használt 10 nM izoproterenolhoz hasonló nagyságú változásokat okozzon. Függőleges szaggatott vonalak jelzik az izoproterenol perfúziójának kezdetét; nyilak jelölik az első jelentős változásig eltelt időtartamot. Az átlagos latenciaidőket a C ábra oszlopai mutatják. Csillag jelöli a szignifikáns eltérést a Tyrode-oldatban (10 nM ISO) és 10 μM IBMX előkezelés után (3 nM ISO) elért izoproterenol-hatás között ($p \leq 0,05$). Kettőskereszt jelzi a szignifikanciát az APD₉₀ és V_{plató} értékek között ($p \leq 0,05$). A kísérletek számát n jelöli.

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 ($I_{Ca,L}$) 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 amplitúdójának, 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 szervetlen ionok által létrehozott gátlást nem változtatja meg.

Az izoproterenolra adott válaszok jelentősen eltérnek különböző preparátumokon és kísérleti elrendezésekben [136]. Például az APD_{90} ISO hatására csökken nyulakban [5], kutyákban [6], macskákban [12] és humán [13] preparátumokon, míg nyúlík sertés [9], patkány [10] és tengerimalac [11] 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 [6]. 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 [112]. 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 nifedipin 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 fiziológiai platópotenciálok mellett, emiatt a platópotenciál növelése kevésbé befolyásolja a repolarizációban betöltött szerepét, míg az I_{Ks} a platópotenciál emelkedése esetén jelentősen megnő [137], emiatt az I_{Ks} lesz a repolarizáció domináns ionárama. Ez a következtetés egybevág Varró [112] és Volders [6] 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 potenciálokot 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 szívműködéseken, ellentétben a macska, kutya és humán szívműködésekkel [12].

Érdemes megemlíteni, hogy AP clamp kísérleteink során az ISO megváltoztatta a kalciumáram áramprofilját [138]. A kalciumáram folyamatosan aktivált volt a korai plató egész időtartama alatt, és hasonlított a tengerimalacokon akciós potenciál feszültség clamp során regisztrált kalciumáram-profilhoz [139]. Az L-típusú kalciumcsatornák izoproterenol okozta foszforilációja jelentősen megváltoztatja a csatornák kapuzását, a nulla mód valószínűségét csökkenti, a kettes mód valószínűségét pedig növeli. Ennek hatására kisebb ugyan a csúcsáram amplitúdója, de a későbbi, úgynevezett „*window*” áram megnő [140]. Pontosan ezt a hatást figyeltük meg kutya kamrai sejteken akciós potenciál feszültség clamp mérések során.

ISO hatására a kutya kamrai szívizomsejtek akciós potenciál paramétereinek változása nem egyszerre következik be. Megállapítottuk, hogy az ISO okozta platóváltozás (a kalciumáram növelésével együtt) hamarabb jelent meg, mint az APD₉₀ rövidülése. Hasonló eredményről számolt be Liu és munkatársai nyúl szívizomsejteken, ahol az ISO kalciumáram-fokozása szintén gyorsabb volt az I_{Ks}-hez képest [141]. 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 EC₅₀ 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 szívizomsejteken. A szívizomsejteken β_1 adrenerg receptorok mellett β_2 és β_3 receptorok is előfordulnak. Fiatal felnőtt emberekben, és nagyobb termetű emlősökben is a β_1 adrenerg receptorok száma lényegesen nagyobb, mint a β_2 receptoroké [142]. A felszíni membrán β_1 receptorainak aktivációja nagymértékű citoszolikus cAMP szint növekedést, generalizált hatásokat vált ki, melynek része a Ca²⁺ és K⁺-áramok növelése is [143]. Ezzel ellentétben a kisebb számban előforduló β_2 adrenerg receptorok a kaveoláris membránban helyezkednek el, ahol a β_1 receptorok nem mutathatóak ki [144]. 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 [145]. Bár a β_2 adrenerg receptorok G_s és G_i fehérjékhez is kapcsolódhatnak [146], az I_{Ca} növelését valószínűleg a G_s fehérjék által közvetített adenilát-cikláz aktiváció okozza [143]. 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 kifejtsen.

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 szívműködéseken, 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 [147]. Ez magyarázhatja az időbeli eltéréseket az ISO okozta platópoteenciál- 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 szívműködéseken a β_1 gátlása megakadályozta az ISO okozta APD rövidítést [148], és β_1 gátlószer jelenlétében az ISO kutya szívműködéseken sem növelte az I_{Kr} -t [7]. Más szerzők a szívműködés kalcium- és káliumáramainak adrenerg stimulációját is vagy különbözőnek, vagy egymástól függetlennek vélik [149, 150]. Az I_{Ca} kettős adrenerg befolyásolását az támasztja alá, hogy a platópoteenciál, 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 [151].

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 [8]. Számítógépes szimulációk is alátámasztják ezt a feltételezésünket [141]. A torsades de pointes kamrafibrillációval járó hirtelen szívhalál előidézésében jelentős szerepe van erős adrenerg stimulusnak, főleg bradikard szívműködés mellett (pl. a reggeli ébresztőóra hatására) [152]. 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 (19. ábra). Erre a szívizom általános viselkedése ad magyarázatot, nevezetesen a szívizmon az AP időtartama fordított frekvenciafüggő, a változások mértéke függ az akciós potenciál kezdeti időtartamától. Ezt alátámasztják a 13. ábrán bemutatott eredményeink.

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 [153] a csökkent repolarizációs rezerv miatt [154]. A szimpatikus aktivitás önmagában is fokozza a korai utódepolarizációk előfordulását, így a káliumcsatornák gátlása nagyon veszélyessé válhat adrenerg stimuláció mellett [152]. Az I_{Ks} gátlók hármastípusú antiaritmiás szerként történő használata előnyösnek tűnik a frekvenciafüggő tulajdonságuk miatt [155]. 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 μ M nifedipin mellett is. Az izoproterenol azonban nem tudta növelni az I_{Ca} amplitúdóját a pórust elzáró szerves kationok alkalmazása során. Eredményeink alapján a klinikumban használt kalciumcsatornagátló szerek csökkent hatékonyságúak lehetnek megnövekedett szimpatikus tónus esetén, amit a terápia beállításakor figyelembe kell venni.

Összefoglalás

Bevezetés

Az izoproterenolnak (ISO) a kamrai szívműködés ionáramaira, az akciós potenciálra (AP) gyakorolt hatásai nem kellően tisztázottak. Ezért vizsgáltuk az ISO módosító hatását az akciós potenciál konfigurációjára, az L-típusú kalciumáramra ($I_{Ca,L}$), 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 AP méréseket nagy ellenállású mikroelektrodákkal végeztük, izolált kutya kamrai sejteken.

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 amplitúdóváltozást okozott az I_{Ca} és az I_{Ks} esetén. 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 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.

Summary

Background and purpose

Little is known about the role of action potential morphology in the isoproterenol (ISO) induced changes in ion currents. Therefore, the effects of ISO on action potential configuration, L-type Ca^{2+} current (I_{Ca}), slow component (I_{Ks}) and fast component (I_{Kr}) of the delayed rectifier K^{+} current were studied and compared in a frequency-dependent manner, along with the timing of activation of each current.

Experimental approach

Whole cell configuration of the patch-clamp technique in either conventional voltage clamp or action potential voltage clamp modes were used to monitor I_{Ca} , I_{Ks} , and I_{Kr} , while action potentials were recorded using sharp microelectrodes.

Results

In epicardial and midmyocardial cells ISO caused reversible shortening of action potentials accompanied by elevation of the plateau. These effects were associated with multifold enhancement of I_{Ca} and I_{Ks} and moderate stimulation of I_{Kr} . ISO-induced action potential shortening was absent in endocardial cells. I_{Kr} blockade failed to modify the ISO effect, while action potentials were lengthened by ISO in the presence of I_{Ks} blocker. Both action potential shortening and elevation of the plateau were prevented by pretreatment with I_{Ca} blocker. Both I_{Ca} and I_{Ks} currents increased with increasing the cycle length. The ISO-induced plateau shift and I_{Ca} increase developed earlier than the shortening of APD and stimulation of I_{Ks} and I_{Kr} . Blockade of β_1 adrenoceptors converted the ISO-induced shortening of APD to lengthening, decreased the latency of the plateau shift. In contrast, blockade of β_2 receptors augmented the APD-shortening effect and increased the latency of plateau shift. All effects of ISO were prevented by simultaneous blockade of both receptor types. Inhibition of phosphodiesterases decreased the differences observed in the turn on of the ISO induced plateau shift and APD shortening.

Conclusion

The effect of ISO in canine ventricular cells depends critically on action potential configuration, and the ISO-induced activation of I_{Ks} – but not I_{Kr} – may be responsible for the shortening of action potentials. ISO-induced activation of I_{Ca} is turned on faster than the stimulation of I_{Ks} and I_{Kr} in canine ventricular cells due to the involvement of different adrenergic pathways and compartmentalization.

Irodalomjegyzék

1. Catterall, W.A., et al., *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 411-25.
2. Varro, A. and J.G. Papp, *The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential*. Cardioscience, 1992. **3**(3): p. 131-44.
3. Taylor, M.R., *Pharmacogenetics of the human beta-adrenergic receptors*. Pharmacogenomics J, 2007. **7**(1): p. 29-37.
4. Rocchetti, M., et al., *Rate dependency of beta-adrenergic modulation of repolarizing currents in the guinea-pig ventricle*. J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 183-93.
5. Dukes, I.D. and E.M. Vaughan Williams, *Effects of selective alpha 1-, alpha 2-, beta 1-and beta 2-adrenoceptor stimulation on potentials and contractions in the rabbit heart*. J Physiol, 1984. **355**: p. 523-46.
6. Volders, P.G., et al., *Probing the contribution of IKs to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation*. Circulation, 2003. **107**(21): p. 2753-60.
7. Harmati, G., et al., *Effects of beta-adrenoceptor stimulation on delayed rectifier K(+) currents in canine ventricular cardiomyocytes*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(4): p. 890-6.
8. January, C.T. and J.M. Riddle, *Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current*. Circ Res, 1989. **64**(5): p. 977-90.
9. Taggart, P., et al., *Interplay between adrenaline and interbeat interval on ventricular repolarisation in intact heart in vivo*. Cardiovasc Res, 1990. **24**(11): p. 884-95.
10. Ogura, K., et al., *Inhibition of beta-adrenergic signaling by intracellular AMP is independent of cell-surface adenosine receptors in rat cardiac cells*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(5): p. 648-52.
11. Belardinelli, L. and G. Isenberg, *Actions of adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes*. Circ Res, 1983. **53**(3): p. 287-97.
12. Malfatto, G., M. Rocchetti, and A. Zaza, *The role of the autonomic system in rate-dependent repolarization changes*. Heart Rhythm, 2010. **7**(11): p. 1700-3.
13. Taggart, P., et al., *Effect of adrenergic stimulation on action potential duration restitution in humans*. Circulation, 2003. **107**(2): p. 285-9.
14. Szentadrassy, N., et al., *Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(4): p. 851-60.
15. Lameh, J., et al., *Structure and function of G protein coupled receptors*. Pharm Res, 1990. **7**(12): p. 1213-21.
16. Jenkinson, D.H., *Classification and properties of peripheral adrenergic receptors*. Br Med Bull, 1973. **29**(2): p. 142-7.
17. Piascik, M.T. and D.M. Perez, *Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(2): p. 403-10.
18. Perez, D.M., M.B. DeYoung, and R.M. Graham, *Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(4): p. 784-95.
19. Fürst, Z., *Kémiai ingerületátvitel. Kolinerg és adrenerg transzmisszió*, in *Farmakológia*. 2004, Medicina Könyvkiadó Rt: Budapest.

20. Ruffolo, R.R., Jr. and J.E. Waddell, *Receptor interactions of imidazolines: alpha-adrenoceptors of rat and rabbit aortae differentiated by relative potencies, affinities and efficacies of imidazoline agonists*. Br J Pharmacol, 1982. **77**(1): p. 169-76.
21. Stiles, G.L., S. Taylor, and R.J. Lefkowitz, *Human cardiac beta-adrenergic receptors: subtype heterogeneity delineated by direct radioligand binding*. Life Sci, 1983. **33**(5): p. 467-73.
22. Manalan, A.S., H.R. Besch, Jr., and A.M. Watanabe, *Characterization of [³H](+/-)carazolol binding to beta-adrenergic receptors. Application to study of beta-adrenergic receptor subtypes in canine ventricular myocardium and lung*. Circ Res, 1981. **49**(2): p. 326-36.
23. Lohse, M.J., S. Engelhardt, and T. Eschenhagen, *What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?* Circ Res, 2003. **93**(10): p. 896-906.
24. Stiles, G.L., et al., *The cardiac beta-adrenergic receptor. Structural similarities of beta 1 and beta 2 receptor subtypes demonstrated by photoaffinity labeling*. J Biol Chem, 1983. **258**(13): p. 8443-9.
25. El-Armouche, A. and T. Eschenhagen, *Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart*. Heart Fail Rev, 2009. **14**(4): p. 225-41.
26. Skeberdis, V.A., *Structure and function of beta3-adrenergic receptors*. Medicina (Kaunas), 2004. **40**(5): p. 407-13.
27. Yang, J., et al., *A pathway and network review on beta-adrenoceptor signaling and beta blockers in cardiac remodeling*. Heart Fail Rev, 2013.
28. Lefkowitz, R.J., *G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18677-80.
29. Sunahara, R.K., C.W. Dessauer, and A.G. Gilman, *Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 461-80.
30. Buck, J., et al., *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 79-84.
31. Chang, J.C. and R.P. Oude-Elferink, *Role of the bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase in pH sensing and metabolic regulation*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 42.
32. Cooper, D.M., et al., *Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1998. **32**: p. 23-51.
33. Espinasse, I., et al., *Decreased type VI adenylyl cyclase mRNA concentration and Mg(2+)-dependent adenylyl cyclase activities and unchanged type V adenylyl cyclase mRNA concentration and Mn(2+)-dependent adenylyl cyclase activities in the left ventricle of rats with myocardial infarction and longstanding heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(1): p. 87-98.
34. Rochais, F., et al., *A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes*. Circ Res, 2006. **98**(8): p. 1081-8.
35. Thomas, D., et al., *Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27457-62.
36. Wallukat, G., *The beta-adrenergic receptors*. Herz, 2002. **27**(7): p. 683-90.
37. Marx, S.O. and A.R. Marks, *Regulation of the ryanodine receptor in heart failure*. Basic Res Cardiol, 2002. **97 Suppl 1**: p. I49-51.
38. Mattiazzi, A., et al., *Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(3): p. 366-75.

39. Chen, P.P., et al., *Protein kinase A-induced myofilament desensitization to Ca(2+) as a result of phosphorylation of cardiac myosin-binding protein C*. J Gen Physiol, 2010. **136**(6): p. 615-27.
40. van der Heyden, M.A., T.J. Wijnhoven, and T. Opthof, *Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(3): p. 430-42.
41. Rybin, V.O. and S.F. Steinberg, *Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 299-309.
42. Pucoat, M., et al., *Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes*. J Biol Chem, 1994. **269**(24): p. 16938-44.
43. Nakanishi, H., K.A. Brewer, and J.H. Exton, *Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 13-6.
44. Gschwendt, M., et al., *Protein kinase C zeta and eta in murine epidermis. TPA induces down-regulation of PKC eta but not PKC zeta*. FEBS Lett, 1992. **307**(2): p. 151-5.
45. Jalili, T., et al., *PKC translocation without changes in Galphaq and PLC-beta protein abundance in cardiac hypertrophy and failure*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. H2298-304.
46. Hayashi, A., et al., *PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1450**(1): p. 99-106.
47. Erdbrugger, W., et al., *Protein kinase C isoenzymes in rat and human cardiovascular tissues*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(2): p. 177-86.
48. Braz, J.C., et al., *PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 248-54.
49. Bowling, N., et al., *Increased protein kinase C activity and expression of Ca2+-sensitive isoforms in the failing human heart*. Circulation, 1999. **99**(3): p. 384-91.
50. Inoguchi, T., et al., *Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 11059-63.
51. Steinberg, S.F., *Cardiac actions of protein kinase C isoforms*. Physiology (Bethesda), 2012. **27**(3): p. 130-9.
52. Dorn, G.W., 2nd, et al., *Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12798-803.
53. Disatnik, M.H., G. Buraggi, and D. Mochly-Rosen, *Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes*. Exp Cell Res, 1994. **210**(2): p. 287-97.
54. Bos, J.L., *Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 733-8.
55. Kawasaki, H., et al., *A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2275-9.
56. Rehmann, H., et al., *Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(1): p. 26-32.
57. Wang, H., et al., *Phospholipase C epsilon modulates beta-adrenergic receptor-dependent cardiac contraction and inhibits cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2005. **97**(12): p. 1305-13.
58. Pereira, L., et al., *The cAMP binding protein Epac modulates Ca2+ sparks by a Ca2+/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes*. J Physiol, 2007. **583**(Pt 2): p. 685-94.

59. Zaza, A., *An introduction to Cardiac Cellular Electrophysiology*. 2000, Harwood Academic Publishers, Newark. p. 59-82.
60. Shimoni, Y., R.B. Clark, and W.R. Giles, *Role of an inwardly rectifying potassium current in rabbit ventricular action potential*. J Physiol, 1992. **448**: p. 709-27.
61. Li, G.R., et al., *Transmural heterogeneity of action potentials and Ito1 in myocytes isolated from the human right ventricle*. Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 2): p. H369-77.
62. Fulop, L., et al., *Reopening of L-type calcium channels in human ventricular myocytes during applied epicardial action potentials*. Acta Physiol Scand, 2004. **180**(1): p. 39-47.
63. Liu, D.W. and C. Antzelevitch, *Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell*. Circ Res, 1995. **76**(3): p. 351-65.
64. Norbert Szentandrassy, J.M., Péter Pál Nánási, *Electrical inhomogeneity in mammalian ventricular myocardium*, in *Advances in cardiomyocyte research*, P.P. Nánási, Editor. 2009, Transworld Research Network, Kerala. p. 76-79.
65. Drici, M.D. and J. Barhanin, *Cardiac K⁺ channels and drug-acquired long QT syndrome*. Therapie, 2000. **55**(1): p. 185-93.
66. Carbone, E. and H.D. Lux, *Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones*. J Physiol, 1987. **386**: p. 547-70.
67. Benitah, J.P., et al., *Voltage-gated Ca²⁺ currents in the human pathophysiologic heart: a review*. Basic Res Cardiol, 2002. **97 Suppl 1**: p. I11-8.
68. Marbán E, O.R.B., in *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, J.J. Douglas P. Zipes, Editor. 1995, Saunders: Philadelphia. p. 11-21.
69. Fozzard, H.A., *Excitation-contraction coupling in the heart*. Adv Exp Med Biol, 1991. **308**: p. 135-42.
70. Ertel, E.A., et al., *Nomenclature of voltage-gated calcium channels*. Neuron, 2000. **25**(3): p. 533-5.
71. Welling, A., et al., *Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca²⁺ channels*. Circ Res, 1997. **81**(4): p. 526-32.
72. Hille, B., in *Ion channels of Excitable Membranes*. 2001, Sinauer: Dunderland. p. 95-129.
73. Catterall, W.A., *Structure and function of voltage-sensitive ion channels*. Science, 1988. **242**(4875): p. 50-61.
74. Hagiwara, S., J. Fukuda, and D.C. Eaton, *Membrane currents carried by Ca, Sr, and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp*. J Gen Physiol, 1974. **63**(5): p. 564-78.
75. Yamaguchi, H., et al., *Multiple modulation pathways of calcium channel activity by a beta subunit. Direct evidence of beta subunit participation in membrane trafficking of the alpha1C subunit*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 19348-56.
76. Gurnett, C.A., M. De Waard, and K.P. Campbell, *Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction*. Neuron, 1996. **16**(2): p. 431-40.
77. Shistik, E., et al., *Ca²⁺ current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in Xenopus oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level*. J Physiol, 1995. **489 (Pt 1)**: p. 55-62.
78. Benitah, J.P., J.L. Alvarez, and A.M. Gomez, *L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(1): p. 26-36.

79. Findlay, I., *Physiological modulation of inactivation in L-type Ca²⁺ channels: one switch*. J Physiol, 2004. **554**(Pt 2): p. 275-83.
80. Lee, A., et al., *Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels*. Nature, 1999. **399**(6732): p. 155-9.
81. Hockerman, G.H., et al., *Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the alpha1 subunit*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18759-65.
82. Striessnig, J., *Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels*. Cell Physiol Biochem, 1999. **9**(4-5): p. 242-69.
83. Vassort, G., et al., *Effects of adrenaline on membrane inward currents during the cardiac action potential*. Pflugers Arch, 1969. **309**(1): p. 70-81.
84. Catterall, W.A., *Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 521-55.
85. Gao, T., et al., *Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19401-7.
86. Gray, P.C., et al., *Primary structure and function of an A kinase anchoring protein associated with calcium channels*. Neuron, 1998. **20**(5): p. 1017-26.
87. Fraser, I.D., et al., *A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events*. Embo j, 1998. **17**(8): p. 2261-72.
88. Bunemann, M., et al., *Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit*. J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 33851-4.
89. Satoh, H., *Inhibition in L-type Ca²⁺ channel by stimulation of protein kinase C in isolated guinea pig ventricular cardiomyocytes*. Gen Pharmacol, 1992. **23**(6): p. 1097-102.
90. Snyders, D.J., *Structure and function of cardiac potassium channels*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(2): p. 377-90.
91. Nerbonne, J.M., *Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium*. J Physiol, 2000. **525 Pt 2**: p. 285-98.
92. Oudit, G.Y., et al., *The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(5): p. 851-72.
93. Hiraoka, M. and S. Kawano, *Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes*. J Physiol, 1989. **410**: p. 187-212.
94. Jost, N., et al., *Effect of the antifibrillatory compound tedisamil (KC-8857) on transmembrane currents in mammalian ventricular myocytes*. Curr Med Chem, 2004. **11**(24): p. 3219-28.
95. Zygmunt, A.C., et al., *Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(2): p. H689-97.
96. Hirano, Y. and M. Hiraoka, *Barium-induced automatic activity in isolated ventricular myocytes from guinea-pig hearts*. J Physiol, 1988. **395**: p. 455-72.
97. Dixon, J.E., et al., *Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current*. Circ Res, 1996. **79**(4): p. 659-68.
98. Guo, W., et al., *Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents*. Circ Res, 2002. **90**(5): p. 586-93.
99. Roberds, S.L. and M.M. Tamkun, *Developmental expression of cloned cardiac potassium channels*. FEBS Lett, 1991. **284**(2): p. 152-4.

100. Holmqvist, M.H., et al., *Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 1035-40.
101. Campbell, D.L., et al., *The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis*. J Gen Physiol, 1993. **101**(4): p. 571-601.
102. Benndorf, K. and B. Nilius, *Properties of an early outward current in single cells of the mouse ventricle*. Gen Physiol Biophys, 1988. **7**(5): p. 449-66.
103. Gross, G.J., R.P. Burke, and N.A. Castle, *Characterisation of transient outward current in young human atrial myocytes*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(1): p. 112-7.
104. Szabo, G., et al., *Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium*. Pflugers Arch, 2005. **450**(5): p. 307-16.
105. Varro, A., et al., *Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes*. Basic Res Cardiol, 1993. **88**(2): p. 93-102.
106. Nabauer, M., et al., *Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle*. Circulation, 1996. **93**(1): p. 168-77.
107. Iost, N., et al., *Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(3): p. 508-15.
108. Grissmer, S., et al., *Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(6): p. 1227-34.
109. Abbott, G.W., et al., *MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia*. Cell, 1999. **97**(2): p. 175-87.
110. Spector, P.S., et al., *Fast inactivation causes rectification of the IKr channel*. J Gen Physiol, 1996. **107**(5): p. 611-9.
111. László Virág, I.B., *Rapid and slow delayed rectifier potassium currents and the repolarization reserve*, in *Advances in cardiomyocyte research*, P.P. Nánási, Editor. 2009, Transworld Research Network: Kerala. p. 129-130.
112. Varro, A., et al., *The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization*. J Physiol, 2000. **523 Pt 1**: p. 67-81.
113. Ho, W.K., et al., *Voltage- and time-dependent block of delayed rectifier K⁺ current in rabbit sino-atrial node cells by external Ca²⁺ and Mg²⁺*. J Physiol, 1996. **494 (Pt 3)**: p. 727-42.
114. Mitcheson, J.S., et al., *A structural basis for drug-induced long QT syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12329-33.
115. Heath, B.M. and D.A. Terrar, *Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, IKr, through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes*. J Physiol, 2000. **522 Pt 3**: p. 391-402.
116. Wang, L., et al., *Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart*. Circ Res, 1996. **79**(1): p. 79-85.
117. Volders, P.G., et al., *Downregulation of delayed rectifier K(+) currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes*. Circulation, 1999. **100**(24): p. 2455-61.
118. Balser, J.R., P.B. Bennett, and D.M. Roden, *Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Gating kinetics of the delayed rectifier*. J Gen Physiol, 1990. **96**(4): p. 835-63.

119. Thomas, G.P., U. Gerlach, and C. Antzelevitch, *HMR 1556, a potent and selective blocker of slowly activating delayed rectifier potassium current*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **41**(1): p. 140-7.
120. Varnum, M.D., et al., *The min K channel underlies the cardiac potassium current I_{Ks} and mediates species-specific responses to protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11528-32.
121. Bosch, R.F., et al., *Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K^+ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 441-50.
122. Lengyel, C., et al., *Pharmacological block of the slow component of the outward delayed rectifier current (I_{Ks}) fails to lengthen rabbit ventricular muscle QT(c) and action potential duration*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(1): p. 101-10.
123. Nakashima, H., et al., *In vivo electrophysiological effects of a selective slow delayed-rectifier potassium channel blocker in anesthetized dogs: potential insights into class III actions*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(4): p. 705-14.
124. Jost, N., et al., *Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for I_{Ks} in human ventricular muscle*. Circulation, 2005. **112**(10): p. 1392-9.
125. Lopatin, A.N., E.N. Makhina, and C.G. Nichols, *Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 366-9.
126. Koumi, S., et al., *beta-Adrenergic modulation of the inwardly rectifying potassium channel in isolated human ventricular myocytes. Alteration in channel response to beta-adrenergic stimulation in failing human hearts*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2870-81.
127. McGrath, J.C., et al., *Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(7): p. 1573-6.
128. Persson, P.B., *Good publication practice in physiology 2013: revised author guidelines for Acta Physiologica*. Acta Physiologica, 2013. **209**(4): p. 250-253.
129. Fischmeister, R., et al., *Channel currents during spontaneous action potentials in embryonic chick heart cells. The action potential patch clamp*. Biophys J, 1984. **46**(2): p. 267-71.
130. Katsube, Y., et al., *Differences in isoproterenol stimulation of Ca^{2+} current of rat ventricular myocytes in neonatal compared to adult*. Eur J Pharmacol, 1996. **317**(2-3): p. 391-400.
131. Banyasz, T., et al., *Reverse rate dependency is an intrinsic property of canine cardiac preparations*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 237-44.
132. Chen-Izu, Y., et al., *$G(i)$ -dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca^{2+} channels*. Biophys J, 2000. **79**(5): p. 2547-56.
133. Kuschel, M., et al., *$G(i)$ protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 22048-52.
134. Lemoine, H., B. Ehle, and A.J. Kaumann, *Direct labelling of beta 2-adrenoceptors. Comparison of binding potency of 3H-ICI 118,551 and blocking potency of ICI 118,551*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1985. **331**(1): p. 40-51.
135. Kaumann, A.J. and H. Lemoine, *Beta 2-adrenoceptor-mediated positive inotropic effect of adrenaline in human ventricular myocardium. Quantitative discrepancies with binding and adenylate cyclase stimulation*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1987. **335**(4): p. 403-11.
136. Levesque, P.C., et al., *Anion and cation modulation of the guinea-pig ventricular action potential during beta-adrenoceptor stimulation*. Pflugers Arch, 1993. **424**(1): p. 54-62.

137. Jost, N., et al., *Contribution of I_{Kr} and I_{K1} to ventricular repolarization in canine and human myocytes: is there any influence of action potential duration?* Basic Res Cardiol, 2009. **104**(1): p. 33-41.
138. Banyasz, T., et al., *Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp.* Cardiovasc Res, 2003. **58**(1): p. 66-75.
139. Linz, K.W. and R. Meyer, *Control of L-type calcium current during the action potential of guinea-pig ventricular myocytes.* J Physiol, 1998. **513** (Pt 2): p. 425-42.
140. Kamp, T.J. and J.W. Hell, *Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C.* Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1095-102.
141. Liu, G.X., et al., *Differential conditions for early after-depolarizations and triggered activity in cardiomyocytes derived from transgenic LQT1 and LQT2 rabbits.* J Physiol, 2012. **590**(Pt 5): p. 1171-80.
142. Post, S.R., H.K. Hammond, and P.A. Insel, *Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 343-60.
143. Xiao, R.P. and E.G. Lakatta, *Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca²⁺, and Ca²⁺ current in single rat ventricular cells.* Circ Res, 1993. **73**(2): p. 286-300.
144. Davare, M.A., et al., *A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2.* Science, 2001. **293**(5527): p. 98-101.
145. Nikolaev, V.O., et al., *Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation.* Science, 2010. **327**(5973): p. 1653-7.
146. Xiao, R.P., X. Ji, and E.G. Lakatta, *Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes.* Mol Pharmacol, 1995. **47**(2): p. 322-9.
147. Best, J.M. and T.J. Kamp, *Different subcellular populations of L-type Ca²⁺ channels exhibit unique regulation and functional roles in cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(2): p. 376-87.
148. Zhu, Y., et al., *Sex differences in repolarization and slow delayed rectifier potassium current and their regulation by sympathetic stimulation in rabbits.* Pflugers Arch, 2013. **465**(6): p. 805-18.
149. Harada, K. and T. Iijima, *Differential modulation by adenylate cyclase of Ca²⁺ and delayed K⁺ current in ventricular myocytes.* Am J Physiol, 1994. **266**(4 Pt 2): p. H1551-7.
150. Walsh, K.B., T.B. Begenisich, and R.S. Kass, *Beta-adrenergic modulation in the heart. Independent regulation of K and Ca channels.* Pflugers Arch, 1988. **411**(2): p. 232-4.
151. Heijman, J., et al., *Local control of beta-adrenergic stimulation: Effects on ventricular myocyte electrophysiology and Ca(2+)-transient.* J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(5): p. 863-71.
152. Nalivaiko, E., C.G. De Pasquale, and W.W. Blessing, *Ventricular arrhythmias triggered by alerting stimuli in conscious rabbits pre-treated with dofetilide.* Basic Res Cardiol, 2004. **99**(2): p. 142-51.
153. Roden, D.M., *Pharmacogenetics and drug-induced arrhythmias.* Cardiovasc Res, 2001. **50**(2): p. 224-31.
154. Biliczki, P., et al., *Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve.* Br J Pharmacol, 2002. **137**(3): p. 361-8.
155. Salata, J.J., et al., *A novel benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K⁺ currents.* Mol Pharmacol, 1998. **54**(1): p. 220-30.



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

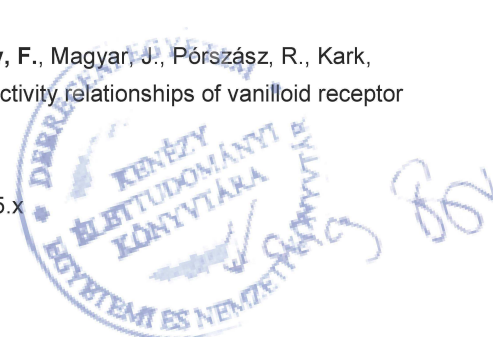
1. **Ruzsnavszky, F.**, Hegyi, B., Kistamás, K., Váczi, K., Horváth, B., Szentandrassy, N., Bányász, T., Nánási, P.P., Magyar, J.: Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 387 (5), 457-467, 2014.
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., Szeben, 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

Tárgyszavak

Akciós potenciál, β -adrenerg receptorok, I_{Kr} , I_{Ks} , izoproterenol, késői káliumáram, kalciumáram, kalciumcsatorna-blokkolók, kutya kamrai szívizomsejtek, kamrai repolarizáció, patch clamp.

Keywords

Action potential, β -adrenergic receptors, I_{Kr} , I_{Ks} , isoproterenol, late potassium current, calcium current, calcium channel blockers, canine ventricular myocytes, ventricular repolarisation, patch clamp.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki dr. Csernoch László professzor úrnak, aki az Élettani Intézet igazgatójaként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Magyar János professzor úrnak áldozatkész segítségét, bátorítását, elméleti és gyakorlati tanácsait, amelyekkel bevezetett a laboratórium mindennapi életébe, valamint az értekezés megírásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönettel tartozom az Szív-elektrofiziológia Laboratórium vezetőjének, dr. Nánási Péter professzor úrnak a hasznos tanácsokért és bátorításért. Emellett szeretnék köszönetet mondani dr. Szentandrassy Norbertnek, dr. Bányász Tamásnak és dr. Horváth Balázsnak, akik számtalan elméleti és gyakorlati útmutatással segítettek. Köszönettel tartozom jelenlegi és volt munkatársaimnak, dr. Bárándi László Viktornak, dr. Hegyi Bencének, dr. Vácsi Krisztinának és Kistamás Kornélnak a mérések kivitelezésében nyújtott segítségükért, emellett az Élettani Intézet minden jelenlegi és volt munkatársának, hogy támogattak és segítettek munkámat.

A kísérletek előkészítése során nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak Víghné Horváth Katalin és Sági Éva asszisztensek.

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