

Dr. Szigeti Gyula Péter: $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok szerepe az aritmiák kialakításában (Ph.D. Tézisek, 2001)

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

$[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok szerepe az aritmiák kialakításában

Dr. Szigeti Gyula Péter

Programvezető: Dr. Kovács László

Témavezetők: Dr. Kovács László és Dr. Papp Zoltán

Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Élettani Intézet
Debrecen, 2001

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2. oldal
2. Bevezetés, nemzetközi előzmények	3. oldal
2.1. A szívizomsejtek [Ca ²⁺] _i regulációja élettani körülmények között	3. oldal
2.2. [Ca ²⁺] _i -függő ionáramok	3. oldal
2.3. Patológiás folyamatok a szívizomsejtek [Ca ²⁺] _i regulációjában:	5. oldal
3. Célkitűzések	7. oldal
4. Eszközök, Módszerek	8. oldal
4.1. Szívizomsejtek izolálása	8. oldal
4.1.1. Nyúl szívizomsejtek izolálása	8. oldal
4.1.2. Humán pitvari szívizomsejtek izolálása	9. oldal
4.1.3. Humán kamrai szívizomsejtek izolálása	10. oldal
4.2. Ionáramok és akciós potenciálok mérése	11. oldal
4.3. [Ca ²⁺] _i -mérés	11. oldal
4.4. A kísérletek során alkalmazott oldatok	12. oldal
4.5. Kísérleti protokollok és a junkciós potenciál problematikája	13. oldal
4.6. Az adatok kiértékelése	15. oldal
5. Eredmények	16. oldal
5.1. I _{TI} tanulmányozása nyúl pitvar, kamra és Purkinje sejteken	16. oldal
5.1.1. A koffein alkalmazása az I _{TI} vizsgálatában	16. oldal
5.1.2. A koffeinnel kiváltott áram feszültség-függése és a töltéshordozó megállapítása ionszubsztitúcióval	16. oldal
5.1.3. A töltéshordozó megállapítása a csatorna farmakológiája alapján	21. oldal
5.2. I _{TI} tanulmányozása humán pitvari sejteken	23. oldal
5.2.1. A koffeinnel kiváltott áram feszültség-függése és a töltéshordozó megállapítása ionszubsztitúcióval	23. oldal
5.2.2. A nemspecifikus kationcsatorna [Ca ²⁺] _i -függése	25. oldal
5.2.3. A csatorna farmakológiája	28. oldal
5.3. I _{TI} tanulmányozása humán kamrai sejteken Na ⁺ és K ⁺ mentes környezetben	30. oldal
5.4. Koffein-által aktivált áramok hatása az akciós potenciál konfigurációjára nyúl kamrai szívizomsejteken	30. oldal
5.4.1. Az akciós potenciál alakjának Ca ²⁺ indukált változásai	30. oldal
5.4.2. Az L-típusú Ca ²⁺ áram Ca ²⁺ függő modulációja	33. oldal
5.4.3. Az akciós potenciál lefutásának Ca ²⁺ függő viselkedése az L-típusú Ca ²⁺ áram gátlása után	35. oldal
5.4.4. Az Na ⁺ -Ca ²⁺ cseremechanizmus szerepe az akciós potenciál konfiguráció változásban	35. oldal
5.5. Koffein-által aktivált áram(ok) lehetséges szerepe az aritmogenezisben	38. oldal
6. Megbeszélés	41. oldal
7. Összefoglalás	45. oldal
8. Köszönetnyilvánítás	46. oldal
9. Irodalomjegyzék	47. oldal
10. Publikációk	53. oldal
11. Dr. Szigeti Gyula Péter tudományos önéletrajza	57. oldal

2. Bevezetés, nemzetközi előzmények

2.1. Az szívműködés $[Ca^{2+}]_i$ regulációja élettani körülmények között

A ritmikus szívműködést a sinuscsomóban kialakuló és onnan az ingerületvezető rendszeren, majd a munkaizomzaton tovaterjedő akciós potenciálok hozzák létre. Az akciós potenciál (AP), a sejten belüli kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) tranziens emelkedését idézi elő, amely a kontraktilis rendszert aktiválja. A $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése elsősorban a kalcium raktárakból (szarkoplazmatikus retikulum, SR) történő felszabadulás eredménye (Beuckelmann és Wier, 1988; Jorgensen és mtsai, 1988; Sipido és Wier, 1991), ami az SR Ca^{2+} -csatornák (rianodin-receptorok) megnyílása révén jön létre. A sejten belül szabaddá váló Ca^{2+} nagy része specializált Ca^{2+} -kötő fehérjékhez kapcsolódik, melyek konformációváltozása közvetít a sejten belüli Ca^{2+} szintben beálló változás és az élettani funkció között (Fabiato, 1983; Bers, 2000). Az összehúzódást a vékony filamentumon elhelyezkedő troponin komplex szabályozza, amely a Ca^{2+} -ok kötése útján biztosítja a vékony- és a vastag filamentumok ciklikus kapcsolatát, ezáltal a sejt megrövidülését (Bers, 2001). Az energiaigényes ciklus akkor zárul le, amikor a Ca^{2+} szint az összehúzódás előtti nyugalmi értékre tér vissza (De Clerck, 1991). Az $[Ca^{2+}]_i$ csökkentésében kiemelkedő szereppel bír az SR-be történő aktív visszavétel (Beuckelmann és Wier, 1988; Callewaert, 1992), amely szintén energiaigényes folyamat, valamint a sejtmembránon keresztül lezajló Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus. Ez a folyamat transsarcolemmalis ionáramot eredményez, mivel egy Ca^{2+} transzportját három Na^+ ellentétes irányú mozgása kíséri (Kimura és mtsai, 1986; Mechmann és Pott; Beuckelmann és Wier, 1988).

2.2. $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok

A Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmuson kívül az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése más membránáramok megjelenését is eredményezi. Különböző szívműködés preparátumokon ismertté vált egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő nemspecifikus kation áram (Kass és mtsai, 1978; Cannell és Lederer, 1986; Ehara és mtsai, 1988), egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő kálium áram (Callewaert és mtsai, 1986), és egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő klorid áram is (Zygmunt és Gibbons, 1991, 1992; Sipido és mtsai, 1993). Élettani körülmények között ezek az ioncsatornák elvileg hozzájárulhatnak az AP kialakulásához. Ugyanezen áramok a sejtek Ca^{2+} -túltöltöttsége esetén (Ca^{2+} -overload) ritmuszavarokat is létrehozhatnak. Ez akkor következik be, amikor a szívműködés oxidatív anyagcseréje elégtelenné válik és az energiaigényes folyamatok

zavart szenvednek (pl. ischaemiás szívbetegségek, ischaemiás-reperfúziós anyagcserezavarok, szívelégtelenség). Ilyenkor a raktárakból a Ca^{2+} spontán felszabadul és a sejten belüli nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ megemelkedik (Beuckelmann, 1992). Ez a Ca^{2+} -felszabadulás a nyugalmi membránpotenciállal rendelkező sejtben befelé irányuló, depolarizáló áramokat (inward áramokat) aktívál, amelyek sinus-inger hiányában is kiválthatják a károsodott szívizomsejt és környezete ingerületét. Ilyen tranziens inward áramok (I_{TI}) jól ismertek a spontán kialakuló, sejten belüli $[Ca^{2+}]_i$ inhomogén felszabadulások kapcsán (Sipido és mtsai, 1993; Papp és mtsai, 1995), igazolva a Ca^{2+} -anyagcsere sérülésének jelentőségét a ritmuszavarok keletkezésében. Kevés ismeret áll ugyanakkor rendelkezésre ezen I_{TI} relatív összetételére és azok sejt szintű szabályozására vonatkozólag. A szívizomsejtek intracelluláris és az intersticiális tér ionösszetételét figyelembe véve a nyugalmi membránpotenciálon a $[Ca^{2+}]_i$ -függő klorid csatornák, a $[Ca^{2+}]_i$ -függő nemspecifikus kation csatornák és a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus eredményezhet depolarizáló áramokat, míg a $[Ca^{2+}]_i$ -függő kálium csatornák inward áramot nem generálnak. Jelen munkánkban az inward áramot létrehozó csatornaműködések vizsgálatának kiemelt figyelmet szenteltünk.

A $[Ca^{2+}]_i$ -függő klorid áramot nyúl pitvari és kamrai sejtjeiben, mint tranziens hyperpolarizáló (outward) áramot ismerték fel, depolarizáló feszültséglépcsők alkalmazása kapcsán (Zygmunt és Gibbons, 1991, 1992). Ezen klorid (Cl^-) áram és a sejten belüli Ca^{2+} -tranziens kapcsolatát nyúlból izolált Purkinje-sejteken írták le először (Sipido és mtsai, 1993). A tranziens áram hamarabb alakul ki és szűnik meg, mint ahogy a sejten belüli Ca^{2+} -tranziens eléri a csúcát. Nagy amplitúdóval rendelkező (koffeinnel kiváltott, vagy spontán kialakuló) Ca^{2+} -tranzienseket kísérő membránáramok tanulmányozása polarizált membránon egy kinetikailag gyors, valamint egy lassú $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- -áram azonosítását eredményezte (Papp és mtsai, 1995). Szemben a gyors kinetikát mutató Cl^- -árammal, a lassú komponens ugyanabban az időben éri el a csúcát, mint a Ca^{2+} -tranziens. Míg a gyors kinetikát követő Cl^- -áramot minden bizonnyal azok a csatornafehérjék hozzák létre, amelyek tranziens outward áramot eredményeznek depolarizáló impulzusok alatt, addig a lassú komponens eredete ismeretlen. Lehetséges, hogy ez a lassú áram egy eltérő Ca^{2+} affinitással rendelkező csatorna megnyílásának eredménye. Azonban az is elképzelhető, hogy csak egyféle Cl^- -csatorna található a Purkinje-sejtek membránjában és a kétfázisú áramkinetika a sejtmembrán alatti lokális $[Ca^{2+}]_i$ -t tükrözi ('fuzzy space' teória: Lederer és mtsai, 1990; Papp és mtsai, 1995). Ez utóbbi nézetet támogatja az a tény, hogy a Purkinje-sejtek

sajátos morfológiája (Sommer és Jennings, 1992) jelentős $[Ca^{2+}]_i$ -beli eltéréseket tesz lehetővé a sejten belül. Ismeretes, hogy a Purkinje-sejteken hiányoznak a kamrai sejteken jól ismert membránbetüremkedések (transzverzális tubulusok). Kamrai sejteken az AP a transzverzális tubulusokon végigfutva a mélyebb sejtrétegeket is eléri, egyenletes Ca^{2+} felszabadulást hozva létre a sejt teljes keresztmetszetében. Érdekes tény, hogy a pitvari sejteken a transzverzális tubulusok a Purkinje-sejtekhez hasonlóan szintén hiányoznak. Lassú kinetikájú $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl-áramot nyúl pitvari, kamrai sejtjein még nem mutattak ki. Ugyanezen sejteken mindeddig csak depolarizációval váltottak ki Ca^{2+} -ranzienseket, amelyek Purkinje sejteken is elégtelenek a lassú áramkomponens aktiválására. Az utóbbi időben egyre több nagytestű állat (kutya, bika, disznó, vadászgörény) ventrikuláris sejtjein demonstrálták a $[Ca^{2+}]_i$ -függő klorid áram jelenlétét (Kim és mtsai, közlésre beküldve), azonban eddig még senki nem próbálta meg ezen áramtípust humán szívizomsejtekben kimutatni.

A nyúl Purkinje-sejteken megismert $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl-áramokhoz hasonlóan tengeri malac pitvari sejtjein a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus által létrehozott membránáram is két komponensre mutatott (Lipp és mtsai, 1992). A Na^+ - Ca^{2+} csere jelenlétét nyulak izolált szívizomsejtjein szintén demonstrálták (Sipido és mtsai, 1993), $[Ca^{2+}]_i$ -függő analízisre azonban csak az utóbbi években került sor (Pogwizd és mtsai, 1999, 2001). Nem ismert azonban, hogy a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus milyen mértékben járul hozzá azon membránáramokhoz, amelyek a sejten belüli Ca^{2+} -overload kapcsán alakulnak ki.

2.3. Patológias folyamatok a szívizomsejtek $[Ca^{2+}]_i$ regulációjában

$[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok aktiválódása nem csak a nyugalmi membránpotenciál, hanem az AP lefutás modulációja révén is ritmuszavarokat kelthet. A sejten belüli térben kórosan megemelkedő $[Ca^{2+}]_i$, valamint a spontán kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ ingadozások és a $[Ca^{2+}]_i$ -függő ioncsatornák közti kapcsolat, valamint ezek AP-okkal való összefüggései ma még részletesen nem ismertek. A kapcsolatrendszer tanulmányozása közelebb vezethet különböző szívbetegségeket kísérő ritmuszavarok sejt szintű megismeréséhez (Levy, 1989).

Izolált szívizomsejtek elektrofiziológiai vizsgálata segítséget nyújthat az ingerületi folyamatokat kialakító ionáramok Ca^{2+} -függésének tanulmányozásában. A sejtmembrán potenciálváltozásai és ionáramai elektromos úton mérhetők, a $[Ca^{2+}]_i$ változásai optikai úton követhetők (Bers, 2000). Az elektromosan ingerelt szívizomsejtek az ingerlések alatt AP-t

generálnak, az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedik: a sejtek összehúzódnak. A diasztolés periódus alatt a $[Ca^{2+}]_i$ alacsony, a sejtek relaxált állapotban vannak. Kóros körülmények között a $[Ca^{2+}]_i$ szabályozatlanná válik, elsősorban emelkedik (Bers, 2001). Az ischaemiás viszonyok közötti emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ modellezésére rövid ideig tartó koffein alkalmazásokkal (koffein-pulzus) nyílik lehetőség (Lipp és Niggli, 1994), amely az SR-ből az elektromos ingerléstől függetlenül bármikor Ca^{2+} -felszabadulást idéz elő. Mivel a koffein igen erélyesen hat a sejten belüli raktárakra, a koffeinnel kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója a normál szisztolék alattit jelentősen meghaladja. Így, a koffeinnel kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ - és a következményes ingerületi folyamat-változások a $[Ca^{2+}]_i$ -függő folyamatok tanulmányozására megfelelő lehetőséget biztosítanak.

3. Célkitűzések

I. Azonos működésűek-e a koffeinnel aktivált, $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok a nyúl pitvari, kamrai és Purkinje-sejtjeiben Na^+ és K^+ mentes környezetben? Nyúlszív Purkinje-sejtjein korábban leírásra került egy koffeinnel aktiválható ionáram, melynek a töltéshordozója a Cl^- . Feladatul tűztük ki az áram jelenlétének bizonyítását, $[Ca^{2+}]_i$ -függő regulációjának, valamint farmakológiai befolyásolhatóságának igazolását nyúl pitvari és kamrai szívizomsejtjein is.

II. Ugyanaz-e a töltéshordozója a humán pitvari szívizomsejtekben regisztrálható koffein-aktivált $[Ca^{2+}]_i$ -függő áramnak, mint nyúlban? Vajon a humán pitvari izomsejteken is kimutathatók-e a nyúl szívizomsejteken talált Cl^- -áramok? Lehet-e szerepük az aritmogenezisben? Az általunk végzett kísérletekig még nem közöltek emberi szívizomsejtekben koffeinnel indukált ionáramokat. Célunk a koffein-dependens ionáram kimutatása, karakterizálása, valamint a nyúl szívizomsejteken megismert áramokkal történő összevetése volt.

III. Kimutatható-e $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáram jelenléte humán kamrai izomsejteken Na^+ és K^+ mentes környezetben? Mérhető-e $[Ca^{2+}]_i$ -függő áram a Na^+ - Ca^{2+} csere és a K^+ -áramok hiányában humán kamrai sejteken?

IV. Mi a szerepe a koffeinnel aktivált ionáramoknak a kardiomiociták akciós potenciállal kapcsolatos ingerületi folyamataiban? A $[Ca^{2+}]_i$ -dependens áramokat elektromosan ingerelt szívizomsejteken tanulmányoztuk. Azt vizsgáltuk, hogy hogyan változtatja meg koffein alkalmazása az AP-ok lefutását. Ilyen vizsgálatokban választ kaptunk arra is, hogy a fiziológias $[Ca^{2+}]_i$ -változások milyen mértékben indukálnak $[Ca^{2+}]_i$ -függő áramokat, valamint, hogy a különböző mértékű $[Ca^{2+}]_i$ -változások hogyan érintik a sejtek ingerületi folyamatait.

4. Eszközök, Módszerek

4.1. Szívizomsejtek izolálása

A kísérleteinkhez szükséges izomsejteket nyulak és emberek szívéből nyertük. A nyulakon végzett kísérletek a Debreceni Orvostudományi Egyetem Állatetikai Bizottságának jóváhagyásával és az NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* kiadványban írottak teljeskörű betartásával történtek.

A humán szövetmintákkal kapcsolatos kísérleteinkben teljes mértékben tiszteletbe tartottuk a Helsinki Egyezményben foglaltakat, valamint a Kölni Egyetem Etikai Bizottságának előírásait. A páciensek minden esetben tájékoztatást kaptak arról, hogy a műtétek alatt eltávolításra kerülő szövetdarabok egy része tudományos kísérletekben kerül felhasználásra.

4.1.1. Nyúl szívizomsejtek izolálása

Izolált pitvari, kamrai és Purkinje-sejteket 1,3-1,8 kg testtömegű új-zélandi fehér nyulakból enzimatikus szeparálási módszer alkalmazásával nyertük (Papp és mtsai, 1995). Az állatokat fülvénaiba adott nátrium pentobarbitállal altattuk (40mg/tskg, Nembutal, Phylaxia-Sanofi), és az esetleges koronária trombózis megelőzése érdekében az altatószerrel egyidejűleg heparint is injektáltunk 1000 IU/tskg mennyiségben. Az állatok altatását követően a mellkast megnyitottuk és a szíveket gyorsan kimetszettük. Az ischaemiás károsodás elkerülése végett a mellkasból eltávolított szívek aortáját alacsony környezeti hőmérsékleten (3°C) kanuláltuk, így lehetővé vált a szívek Langendorff-szerinti perfúziója. A felfüggesztést követően a szív aktivitása néhány másodperc alatt visszatért, és a spontán szív működéssel párhuzamosan a szív üregeiből és ereiből a maradék vér távozott. Ezt a kimosást oxigén telített normál Tyrode-oldattal (130 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 6 mM HEPES, 1,8 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM Mg₂SO₄, 10 mM glükóz, pH 7,2) 40 vízcentiméteres töltőnyomás mellett 37°C-on valósítottuk meg. A mosási periódust követően az áramoltatást 10 percig Ca²⁺ mentes Tyrode-oldattal (literenként 130 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 6 mM HEPES, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM Mg₂SO₄, 10 mM glükóz, pH=7,2 NaOH-val) végeztük, aminek hatására a szív működés leállt. A Ca²⁺ mentesítés után Ca²⁺ mentes Tyrode-oldattal, mely literenként 0,2 g kollagenáz B-t (Boehringer Mannheim) és 0,1 g XIV típusú proteázt (Sigma) tartalmazott, 10-15 percig perfundáltunk. Ezt követően a szíveket a Langendorff-rendszerrel eltávolítottuk, és a kamrákat felnyitottuk. Az így kiterített szívből mikroszkóp alatt kipreparáltuk a Purkinje-sejtek által létrehozott hálózatot és a szövetdarab emésztését az enzim tartalmú Ca²⁺ mentes Tyrode-oldatban szobahőmérsékleten mindaddig folytattuk amíg izolált

sejteket nem kaptunk. A kamrai izomsejtekhez a bal kamra papilláris izmából 1-2 mm vastagságú csíkokat metszettünk ki, és az így nyert szövetdarabok emésztését is addig folytattuk amíg izolált szívizomsejteket nem kaptunk. A szívből eltávolított pitvarszövetet a papilláris izomhoz hasonlóan csíkokra vágtuk és továbbemésztettük. Az izolált sejtek környezetéből a proteolitikus enzimeket többszöri mosás révén távolítottuk el, majd az extracelluláris Ca^{2+} koncentrációt két lépésben 1,8 mM-ra emeltük. Az így nyert sejteket szobahőmérsékleten (22-23°C) tároltuk.

4.1.2. Humán pitvari szívizomsejtek izolálása

A jobb pitvari szövetminták olyan 46 betegből származtak (átlagéletkor 60 ± 3 év; 31 férfi és 15 nő), akik nyitott szív műtéten estek keresztül (33 aorto-koronária bypass, 5 aorta billentyű behelyezés, 8 egyéb jellegű szív műtét). Ezeknél a műtéteknél a jobb pivar egy kicsiny darabja rutinszerűen eltávolításra került. 44 betegnél szinuszritmus, míg 2 esetben pitvarfibrilláció volt jelen a műtét megkezdésekor. A legtöbb páciens a műtétet megelőzően már tartósan szedett valamilyen kardiovaszkuláris rendszerre ható gyógyszerkészítményt: hosszú hatású nitrát-készítményt 23-an, bétablokkolót 21-en, vízhajtót 19-en, ACE-gátlót 14-en, Ca^{2+} -csatorna gátlót 8-an, lipidszint csökkentőt 8-an, aspirint 6-an, míg szív glikozidokat 4-en használtak. 18 olyan páciens volt, akik tartósan szedtek valamilyen kardiovaszkuláris rendszerre közvetlenül nem ható gyógyszert.

A kimetszett izomdarabkák a hozzávetőleg 4 °C-os Bretschneider-féle kardioplégiás oldatban (15 mM NaCl, 9 mM KCl, 1 mM K-H-2-ketoglutarát, 4 mM MgCl, 18 mM hisztidin*HCl*H₂O, 180 mM hisztidin, 2 mM triptofán, 30 mM mannitol, 0,015 mM CaCl₂) tárolva jutottak a kísérleti laboratóriumba, ahol a Bustamante és mtsai (1982) által közölt eljáráshoz hasonlóan történt a pitvari sejtek izolálása. A myocardium darabkákat ollóval apró (<1 mm³) darabokra vágtuk, majd 37 °C-s 10 ml-nyi módosított, nominálisan Ca^{2+} mentes Tyrode oldatba (135 mM NaCl, 10 mM glükóz, 10 mM HEPES-NaOH, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,33 mM NaH₂PO₄, pH= 7,3 NaOH-al) raktuk. Ezután a szövetdarabokat folyamatos mechanikus agitációnak tettük ki, és a folyadékokat tiszta O₂-nel állandóan buborékolattuk. A szövetdarabkákat először a vértől mentesítettük. A következő lépésben 10 ml-nyi Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatban oldottunk fel 11 mg CLS-II típusú Worthington-kollagenázt (347 U/mg, Sigma, St. Louis, USA) és 0,8 mg XIV típusú proteázt (Sigma, St. Louis, USA) és a mintákat ebben inkubáltuk. 30 perc elteltével a részlegesen emésztett izomhoz 20 ml Ca^{2+} mentes Tyrode oldatot adtunk és 2 db 15 ml-es zárható tubusba öntöttük át. Ezután a tubusokat 1 percen keresztül 500 g-

vel centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk, míg a maradék izommasszához újra nominálisan Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatot adva a centrifugálást megismételtük. A felülúszó újbóli eltávolítása után az izmot tartalmazó részt 10 ml-nyi 11 mg CLS-II típusú Worthington-kollagenázt tartalmazó Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatba helyeztük. A szövetdarabok emesztődésétől függően 10-20 perc elteltével a sejtszuspenziót az előzőekben ismertetett kétlépéses centrifugálást alkalmaztunk. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 20-22 °C-on Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatban tároltuk a kísérletek megkezdéséig, amikor a mérőedénybe áthelyezve 2 mM Ca^{2+} tartalmazó Tyrode-oldattal perfundáltuk. Ennek hatására a sejtek jelentős hányada vagy spontán kontrakciókat mutatott, vagy irreverzibilis kontraktúrába került. A méréseket azokon a sejteken végeztük, amelyek 2 mM Ca^{2+} jelenlétében spontán kontrakciókat, kontraktúrát nem mutattak és a sejtfelszíni membrán mentes volt mindenféle kidomborodástól.

4.1.3. Humán kamrai szívizomsejtek izolálása

A humán bal kamrai myocardiumból származó sejtek 22 páciens szívéből kerültek izolálásra. A páciensek közül 17-en a szívelégtelenség végső stádiumában kerültek szívtranszplantációra és a műtét alatt eltávolított beteg szíveket használtuk fel kísérleteinkben. A szívelégtelenségben szenvedő betegek közül 12 ischaemiás, míg 5 dilatatív cardiomyopathiában szenvedett. További 5 szív olyan egészséges donor szív volt, amelyek különböző technikai okok miatt nem kerülhettek szívtranszplantációra.

Az eltávolított szíveket 4 °C-os Bretschneider oldatba helyeztük és a laboratóriumba szállítottuk. A sejtizolációhoz a Beuckelmann és mtsai (1992) által leírt szegmentperfúziós eljárást alkalmaztuk. A bal kamra egy 10-20 cm²-es darabját a hozzátartozó coronariaággal együtt kimetsztük és az eret kanuláltuk. A kanulón 30 percen keresztül 37 °C-os, O₂-nel folyamatosan buborékoltatott Ca^{2+} mentes módosított Tyrode-oldatot perfundáltunk a vér és a Ca^{2+} eltávolítása végett. A kimosást követően a szíveket 40 percen keresztül 25,5 mg/50 ml CLS II típusú Worthington-kollagenázt és 3 mg/50 ml XIV típusú proteázt tartalmazó Ca^{2+} mentes Tyrode-oldattal emesztettük. Ezt követően az izomdarabkákat 15 percen át mostuk enzimeket és 200 μM Ca^{2+} -t tartalmazó módosított Tyrode-oldattal. A kimosás után a sejteket a midmyocardialis régióból metsztük ki és nylon szűrőn történő átfiltrálás után 200 μM Ca^{2+} tartalmú Tyrode-oldatban tároltuk. Ezt követően a tároló oldat Ca^{2+} koncentrációját 15 percenként 0,5 mM-al emeltük a 2 mM-os Ca^{2+} koncentráció eléréséig. A sejteket szobahőmérsékleten tartva 5 órán keresztül

felhasználhatók voltak elektrofiziológiai mérésekhez. A kísérleteinkhez kizárólag harántcsíkolattal rendelkező, spontán kontrakciókat és granulációt nem mutató sejteket választottunk.

4.2. Ionáramok és akciós potenciálok mérése

Az izolált szívmuscle sejtek ingerületi folyamatait teljes-sejt (whole-cell) patch-clamp technikával (Hamill és mtsai, 1981) szobahőmérsékleten tanulmányoztuk. A módszer előnye, hogy segítségével az izolált sejt extra- és intracelluláris ionösszetétele egyaránt szabályozható, a diffúziós problémák minimálisak, és az ingerületi folyamatokban résztvevő ionáramok elkülönítetten mérhetők. A nyúl szívmuscle sejteken történt kísérletekhez Axopatch-1D erősítőt (Axon Instruments, USA) használtunk. A sejtkontaktus létrehozásához szükséges ún. mikropipettákat vékony üveg kapillárisokból (Science Products GmbH, Germany) izzítást követően készítettük. A mérésekhez használt mikropipetták elektromos ellenállása 1,2-3,4 M Ω között volt. A sejtek ionáramait a mérőrendszer feszültség-rögzítés (voltage-clamp) módozatának alkalmazásával, míg a membránpotenciál változásokat áram-rögzítés (current-clamp) módban követtük. A sejtek elektromos ingerlését és a mintavételezést a pClamp 6.0.2 szoftver (Axon Instruments, USA) révén valósítottuk meg. Az elektromos jelek mintavételezése 400 Hz-es gyakorisággal történt. A mért áramjeleket 2 kHz-es Bessel szűrővel szűrtük és nem korrigáltuk lineáris leak áramra. Az adatokat PC kompatibilis számítógépen tároltuk. A humán izomsejteken történt méréseket hasonló technikával, de egy EPC 7 (List-Medical, Germany) bázisú rendszeren végeztük el.

A membránkapacitások nyúl pitvari sejtek esetén 46 ± 3 pF (N=60), a kamrai sejteknél 150 ± 14 pF (N=37), míg a Purkinje sejtek esetében 65 ± 8 pF (N=16) értéknek adódtak. A humán pitvari sejtek kapacitása 81 ± 8 pF (N=74), míg a kamraiaké 135 ± 12 pF (N=42) volt.

4.3. $[Ca^{2+}]_i$ -mérés

A kísérleti apparátus egy invertáló mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Japán) köré épült. A mikroszkóp tárgyasztalára helyezett sejtek elektromos kontrollját és a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció változások követését egyidejűleg valósítottuk meg. A Ca^{2+} koncentráció megítélését a mikroszkóp köré épített optikai rendszer segítette. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásainak mérését fluoreszcens indikátorral (100 μ M K_5 Fura-2, Molecular Probes, USA) oldottuk meg. Az izolált sejtbe a mikropipettán keresztül bejuttatott Fura-2 fluoreszcenciájának Ca^{2+} -függő viselkedését 340 nm és 380 nm gerjesztési hullámhosszokon vizsgáltuk. Az excitációs

hullámhosszokat egy Deltascan-1 készülék (Photon Technology International, USA) kettős monokromátor rendszere különítette el. A kibocsájtott fluoreszcenciát a mikroszkóp látótérének csak azon területéről gyűjtöttük össze, mely a sejt kétdimenziós képét takarta. Az emittált fluoreszcencia intenzitását 510 nm-en fotoelektronsokszorozó felhasználásával erősítettük, és a jeleket analóg/digitális konverzió után számítógépen rögzítettük. A mért fluoreszcencia háttérintenzitásokat mindig kivontuk a sejteken mért értékekből. Az optikai rendszer irányítását és a mért jelek rögzítését OSCAR szoftver (Photon Technology International, USA) segítségével valósítottuk meg. Az optikai mintavétel frekvenciája 200-400 Hz volt. A humán izomsejteken történt mérések hasonló technikával, de egy Zeiss-Axiovert 35 (Zeiss, Németország) bázisú rendszeren történtek.

Jelen munkában az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásait, egyes esetekben, mint a háttérre korrigált fluoreszcens hányadost ($F_{340}/380$) jelenítettük meg, más esetekben pedig a fluoreszcens hányadosból számítható közvetlen Ca^{2+} koncentráció változásokat tüntettük fel (Grynkiewicz és mtsai, 1985). A számításokhoz *in vitro* kalibrációs adatokat használtunk fel, ahol a $K_D=76$ nM, $R_{min}=0,42$, $R_{max}=8,6$, $F_{380(min)}/F_{380(max)}=15,3$ volt.

4.4. A kísérletek során alkalmazott oldatok

A kísérletek során használt extracelluláris oldatok összetevői a következők voltak:

Normál Tyrode-oldat: 137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 11,8 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz, pH=7,4 NaOH-val.

Alacsony Cl^- Tyrode-oldat: 110 mM Na-glutamát, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 0,5 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz, pH=7,4 NaOH-val.

NMDG-Cl oldat: 110 mM NMDG-Cl, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz, pH=7,4 TEAOH-val.

NMDG-glutamát oldat: 110 mM NMDG-glutamát, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz, pH=7,4 TEAOH-val.

Na^+Li^+ Tyrode-oldat: 70 mM NaCl, 67 mM LiCl, 5,4 mM KCl, 11,8 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz, pH=7,4 NaOH-val.

CsCl oldat: 110 mM CsCl, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz, pH=7,4 TEAOH-val.

LiCl oldat: 110 mM LiCl, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz, pH=7,4 TEAOH-val.

A kísérletek során használt intracelluláris oldatok összetevői a következők voltak:

Standard pipetta oldat: 10 mM NaCl, 110 mM K⁺-aszpartát, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgATP, 0,1 mM EGTA, pH=7,2 KOH-val.

0 mM Na⁺ pipetta oldat: 110 mM K⁺-aszpartát, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgATP, 0,1 mM EGTA, pH=7,2 KOH-val.

CsCl pipetta oldat: 110 mM CsCl, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 4 mM MgATP, pH=7,2 CsOH-val.

LiCl pipetta oldat: 110 mM LiCl, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 4 mM MgATP, pH=7,2 TEAOH-val.

Cs-glutamát pipetta oldat: 110 mM Cs-glutamát, 20 mM TEACl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 4 mM MgATP, pH=7,2 CsOH-val.

A koffeint, valamint az összes extracellulárisan alkalmazott szert (SITS, DIDS, anthracén-9-karboxilát) közvetlenül az extracelluláris folyadékban oldottuk. A pipetta oldatokhoz minden esetben 50-100 μM K_s-fura-2 tettünk.

4.5. Kísérleti protokollok és a junkciós potenciál problematikája

A kiválasztott sejtet a közvetlen környezetében elhelyezett (sejttől mért távolság <100 μm) házilag készült perfúziós rendszerrel folyamatosan mostuk, amely a vegyszerek igen gyors cseréjét (időtartam kb. 500 ms alatt) is biztosította (Callewaert és mtsai., 1989). A [Ca²⁺]_i-függő ionkonduktancia-változásokat 10 mM koffein gyors, pulzusszerű (300 ms) adagolásával idéztük elő. Bár a koffeinről ismert, hogy az a [Ca²⁺]_i tranziens változtatásain kívül lényegesen lassabb kinetikával az intracelluláris foszforilációs folyamatokra is hat, viszont épp a kinetikai különbségek miatt ez nem játszhatott lényeges szerepet az általunk vizsgált sajátságokban (Zahradnik és Palade, 1993).

A sejtek membránpotenciálját rendszerint -60 mV-os kiindulási értéken tartottuk. A [Ca²⁺]_i-függő ionáramok áram-feszültség karakterisztikáját és az áram megfordulási potenciálját (E_{rev}) egyrészt +30 mV-os feszültséglépcsők segítségével, másrészt 200 ms hosszú (0,7 Vs⁻¹) -60 mV-tól +80 mV-ig tartó folyamatosan emelkedő feszültséggel (feszültségrámpák) segítségével, a Ca²⁺-áram spontán megszűnése után határoztuk meg. Kísérleteinkben három feszültségrámpát alkalmaztunk, az elsőt a koffein alkalmazása előtt, a másodikat a koffein-által kiváltott áram aktiválódásakor, míg a harmadikat az áram megszűnése után. A [Ca²⁺]_i-függő ionáramok áram-feszültség karakterisztikáját úgy határoztuk meg, hogy a második feszültségrámpa alatt mért áramértékekből kivontuk az első és a harmadik feszültségrámpa alatti áramértékek átlagát. A humán sejteken végzett kísérleteinkben inverz feszültségrámpákat is alkalmaztunk (+80 mV-tól -80 mV-ig), amire a feszültségfüggő Ca²⁺ csatorna aktiválódás kiküszöbölése miatt volt szükségünk.

A pipetták szájadékánál kialakuló junkciós potenciál értékét (Neher, 1992) 7-10 mV-nak találtuk, amely aktuális értéke attól függően változott, hogy az adott pillanatban milyen oldatkombinációt alkalmaztunk. A külső oldatcsere szintén junkciós potenciál kialakulásával járt. Ilyenkor az alábbi módon jártunk el: Az első feszültséglépcsőt még normál Tyrode-oldatban regisztráltuk -60 mV-os tartófeszültség mellett. Ezután áttértünk valamelyik Na⁺ mentes oldatra, de a sejteket továbbra is -60 mV-on tartottuk. A harmadik feszültségrámpát a koffeinnel kiváltott a [Ca²⁺]_i-függő ionáram megszünése után alkalmaztuk, úgy hogy a sejt továbbra is a Na⁺ mentes oldatban volt. A mért megfordulási- és membránpotenciál értékeket a megfelelő junkciós potenciálokkal korrigáltuk.

Akciós potenciál méréseinket az áram-rögzítés technika alkalmazásával végeztük. Ilyenkor rövid ideig tartó (3 ms), 0,2 Hz-es áramimpulzusokkal 15 egymást követő akciós potenciált (AP₁₋₁₅) váltottunk ki. Az AP alakbeli stabilizálódását, és steady-state szarkoplazmatikus Ca²⁺ telítettség kialakulását (azonos Ca²⁺-tranziensek) 3-5 ingerlést követően tapasztaltuk. Annak érdekében, hogy a diasztolés periódus alatti membránpotenciál, és a steady-state AP plató fázis [Ca²⁺]_i-függő viselkedését tanulmányozhassuk, a perfúziós rendszer segítségével koffein-pulzusokat alkalmaztunk. A gyors koffein kezelés az akciós potenciálok által keltett Ca²⁺ tranziensekhez viszonyítva nagyobb amplitúdójú Ca²⁺ tranzienseket és egyidejűleg a membránpotenciál és az AP-ok lefutásának jellegzetes változásait eredményezte. Munkánkban a koffein által előidézett membránpotenciál-változások háttérét a diasztolés és szisztolés periódusok alatt egyaránt vizsgáltuk. Amennyiben a plató [Ca²⁺]_i-függő viselkedésére voltunk kíváncsiak, úgy a koffein alkalmazására a 9. akciós potenciál (AP₉) felszálló szárát követően került sor. Ennek megfelelően AP₉ alatt szemmel láthatóan is erősebb kontrakció alakult ki, mint az azt megelőző (AP₈), és az azt követő ingerületi folyamat alatt (AP₁₀). Sőt, AP₁₀ alatt a kontrakciók rendszerint teljesen hiányoztak. Ez arra utalt, hogy a koffein kezelést közvetlenül követő AP alatt az intracelláris Ca²⁺-raktárak átmenetileg kiürültek. A nyolcadik akciós potenciált (AP₈) és az ahhoz tartozó Ca²⁺-tranzienst kontrollnak tekintettük. A kilencedik AP a magas amplitúdóval rendelkező Ca²⁺-tranziens hatását tükrözte (AP₉), míg AP₁₀ az intracelluláris Ca²⁺-deplécio hatásairól árulkodott. Azért, hogy az akciós potenciál [Ca²⁺]_i-függő sajátságait jobban szemléltessük, az akciós potenciál időtartamokat különböző repolarizációs feszültség (30, 50 és 90 %-os) szinteknél is meghatároztuk.

4.6. Az adatok kiértékelése

A számszerű eredmények az „N” sejten történt mérések átlagait, valamint a hozzátartozó standard hibákat (S.E.M.) jelölik. A statisztikai vizsgálatokhoz t-póbat és ANOVA- tesztet használtunk.

5. Eredmények

5.1. I_{T1} tanulmányozása nyúl pitvari, kamrai és Purkinje sejteken

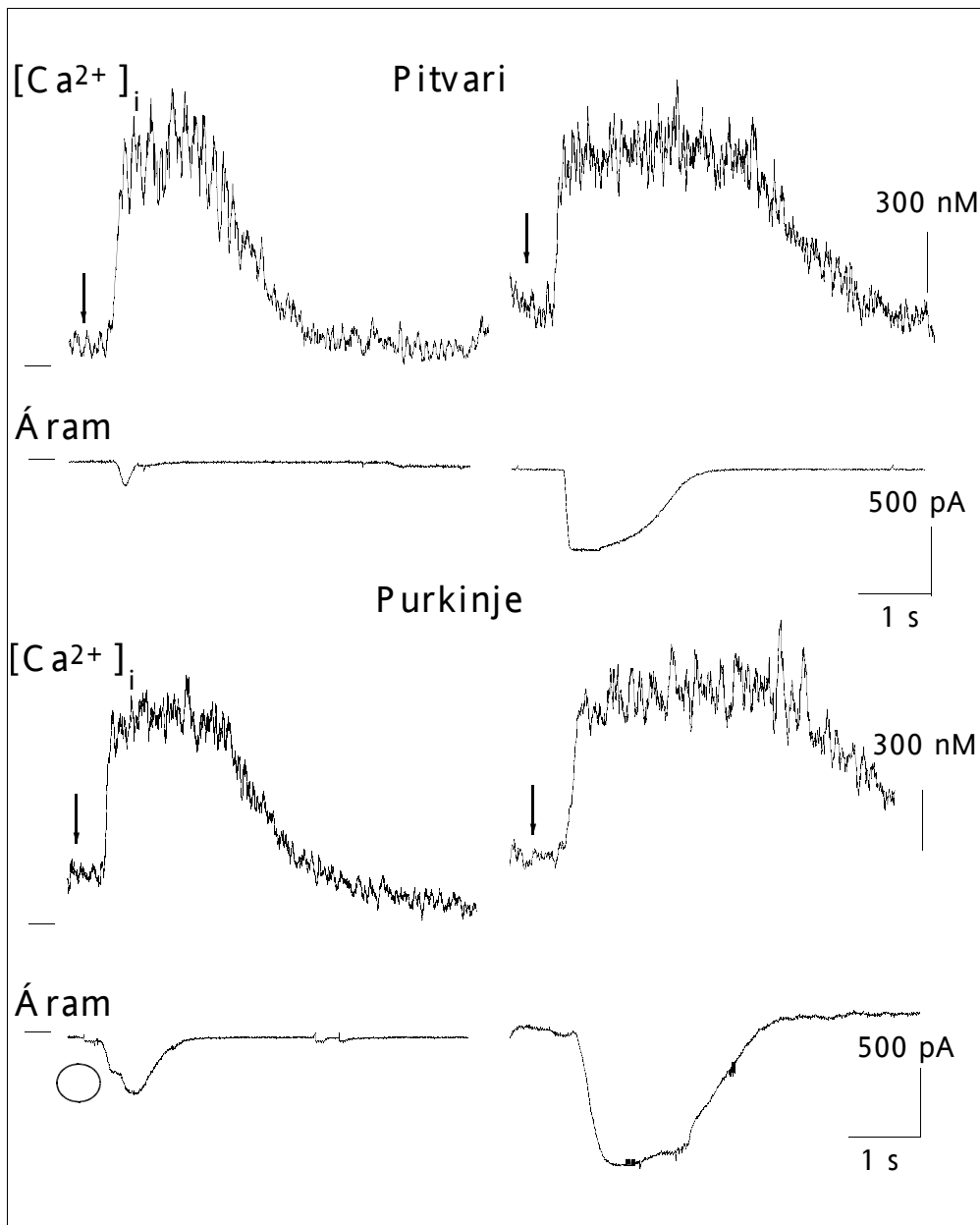
Papp és munkatársai 1995-ben nyúl Purkinje sejteken egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáram jelenlétét mutatták ki. Kísérleteikben koffein adagolását követően az $[Ca^{2+}]_i$ változásával szinkron egy kétszűcsú transziens membránáram kialakulását figyelték meg (1.ábra) és megállapították, hogy ez egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- áram.

5.1.1. A koffein alkalmazása az I_{T1} vizsgálatában

Kísérleteinkben először arra kerestünk választ, hogy nyulak pitvari és kamrai sejtjein is kimutatható-e a Purkinje sejteken Papp és mtsai (1995) által demonstrált koffeinnel kiváltott áram. Az 1. ábrán nyúl pitvari és Purkinje-sejteken mért, koffein pulzusszerű alkalmazását követően kialakuló, $[Ca^{2+}]_i$ -függő, a sejtek belsejébe irányuló ionáramok (transziens inward áram, I_{T1}) és velük párhuzamosan regisztrált Ca^{2+} transziensek láthatók, -60 mV-os membránpotenciál esetén. Kamrai myocytákon is ki tudtuk mutatni ezt a koffeinnel aktiválható áramot. Külső oldatként NMDG-Cl oldatot, míg a belső oldatként CsCl pipetta oldatot használtunk. A koffein hatására kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok és Ca^{2+} transziensek jelentős variabilitást mutattak. Egyes esetekben egy gyorsan normalizálódó $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést és egy kis amplitúdójú, rövid idő alatt megszűnő I_{T1} -t regisztráltunk, míg máskor egy elhúzódó $[Ca^{2+}]_i$ növekedést és ennek következményeként egy tartósabb áramaktivációt sikerült kimutatnunk. A sejtek kapacitására normalizált csúcsáramok pitvari sejtek esetén (N=28) -1,86 és -22,79 pA/pF, kamrai sejtek esetén (N=7) -0,28 és -7,82 pA/pF, míg Purkinje sejteknél (N=5) -2,78 és -41,52 pA/pF közötti értékeknek adódtak. Az amplitúdókhöz hasonlóan az áramok időtartama is széles határok között változott, azonban a Ca^{2+} -transziensek minden esetben az áramaktivációval egyidejűleg jöttek létre és rendszerint tovább is tartottak.

5.1.2. A koffeinnel kiváltott áram feszültségfüggése és a töltéshordozó megállapítása ionszubsztitúcióval

Továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy milyen töltéshordozó állhat a koffeinnel aktivált I_{T1} háttérében. Elvileg a szarkoplazmatikus retikulumból (SR) felszabaduló Ca^{2+} (1) $[Ca^{2+}]_i$ -függő

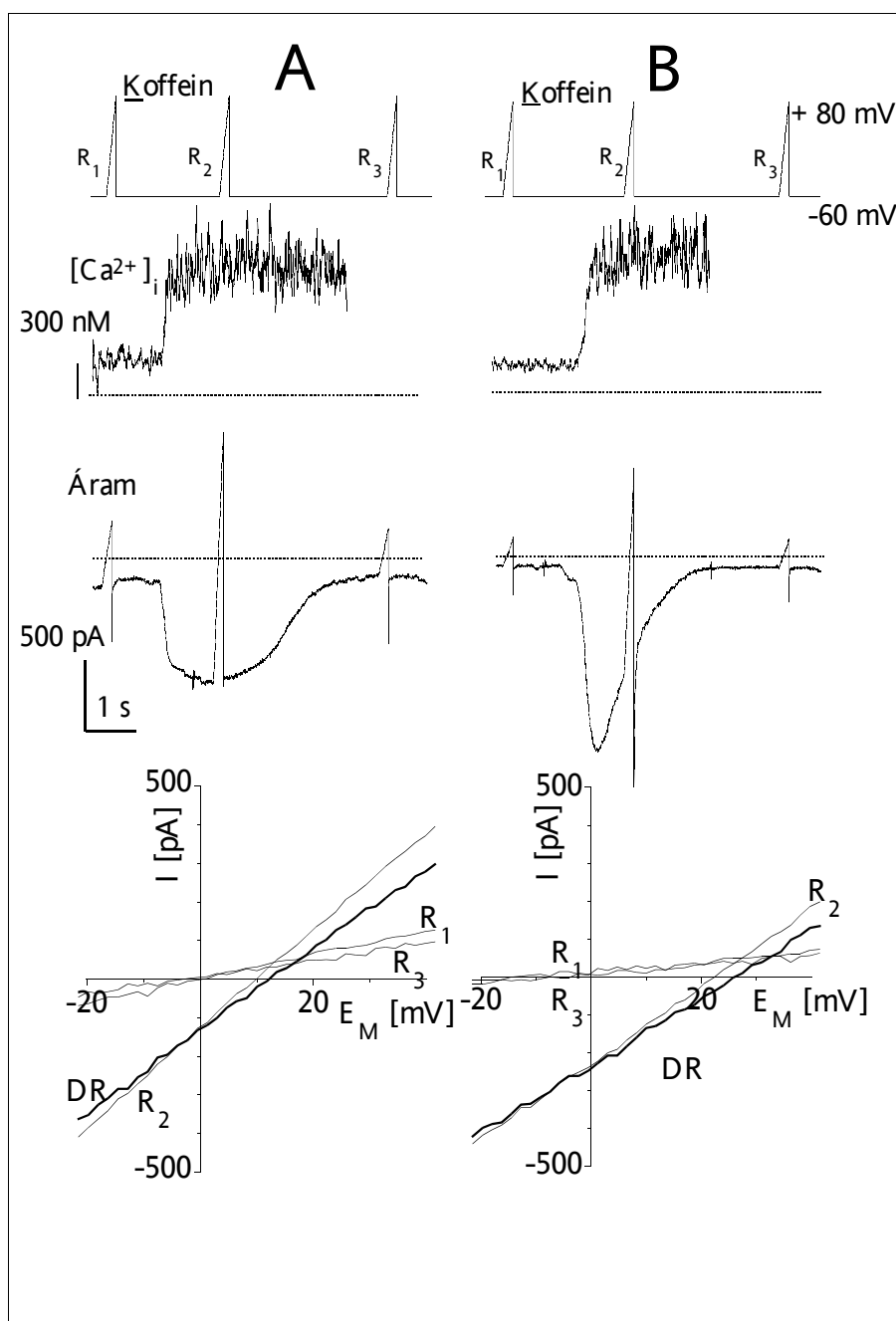


1. ábra

10 mM koffein hatására kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok és Ca^{2+} tranziensek -60 mV-os membránpotenciál esetén nyúl pitvari és Purkinje sejteken. A bemutatott kísérletekben a Na^+/Ca^{2+} cseremechanizmus és a K^+ áramok zavaró hatásának kiküszöbölése végett külső oldatként NMDG-Cl oldatot, míg a belső oldatként CsCl pipetta oldatot használtunk. A sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -nak emelését 10 mM koffein 300 ms hosszú alkalmazásával idéztük elő (nyilakkal jelölve). A sejtek válaszreakcióiban jelentős különbségeket találtunk. Egyes esetekben egy relatíve gyorsan normalizálódó $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést és egy kis amplitúdójú, rövid idő alatt megszűnő a sejtek belsejébe irányuló ionáramot regisztráltunk (bal oldali regisztrátumok), míg máskor egy elhúzódó $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést és ennek következményeként egy tartósabb áramkomponenst sikerült kimutatnunk (jobb oldali regisztrátumok). A Purkinje sejteken egyes esetekben az áramgörbén két csúcs látható (o-val jelölve). A vízszintes vonalak az $[Ca^{2+}]_i$, illetve áramszintek nulla értékét jelölik.

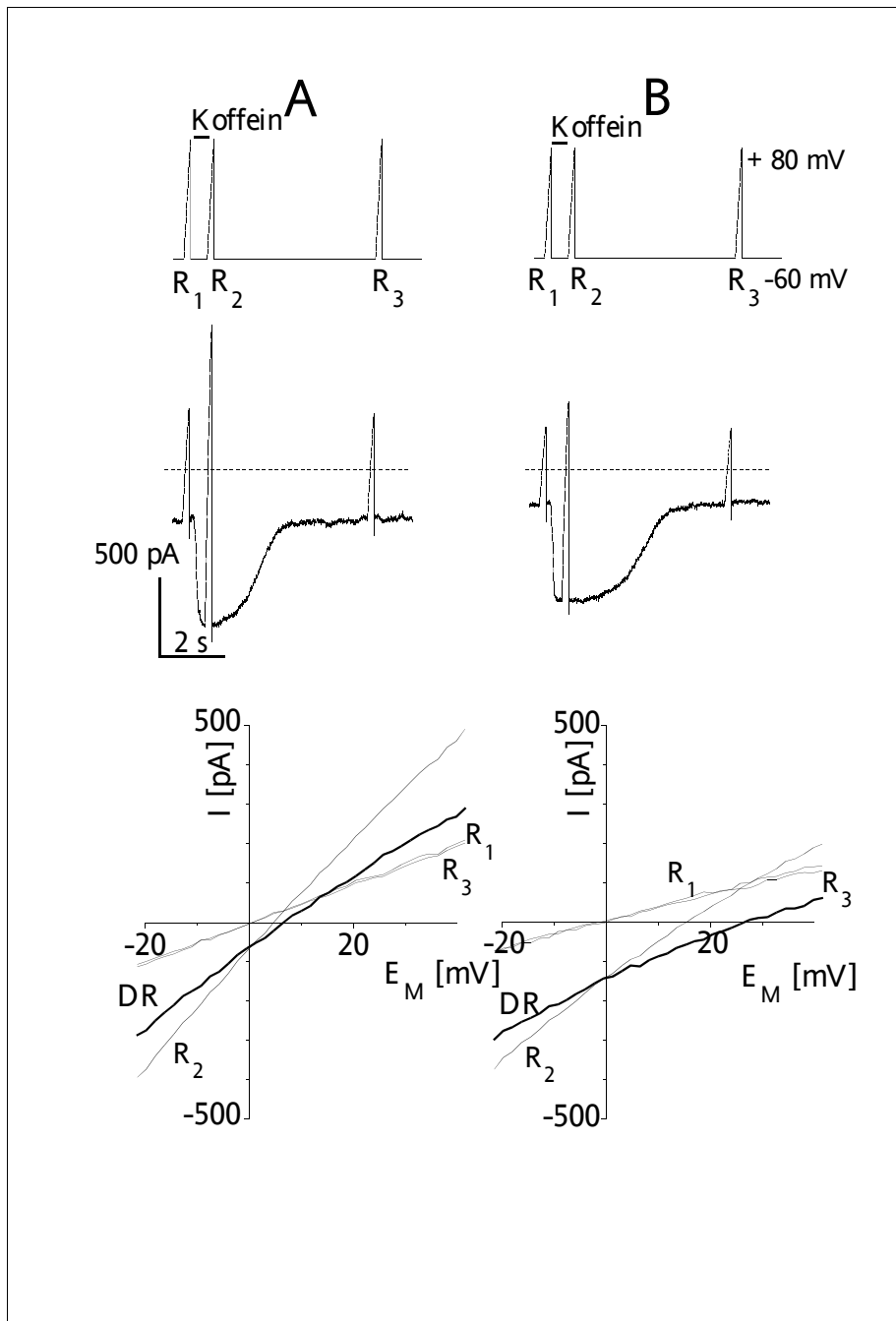
Cl⁻-áramot (Zygmunt és Gibbons, 1991, 1992; Sipido és mtsai, 1993; Zygmunt 1994; Papp és mtsai, 1995), (2) $[Ca^{2+}]_i$ -függő nonspecifikus kation áramot (Kass és mtsai 1978a, b) és (3) Na⁺-Ca²⁺ csereáramot (Sheu és Blaustein 1992; Levesque és mtsai 1994) generálhat. Az általunk használt oldatkombináció (NMDG-Cl⁻ külső és CsCl belső oldatok) esetén azonban a lehetséges töltéshordozók száma kettőre csökkent. Mivel a Na⁺ szubsztituenseként használt NMDG⁺ membrán-impermeabilis, így a Na⁺-Ca²⁺ cseremechanizmus I_{TI}-ban betöltött szerepét az alkalmazott Na⁺ mentes környezetben kizárhattuk. A K⁺ szubsztituens Cs⁺ viszont lehetséges töltéshordozóként merült fel. Ezt az iont kizárólag a pipetta oldat tartalmazza, így bármilyen membránpotenciált alkalmaztunk, annak egy kifelé irányuló áramot kellett volna létrehoznia. A Cl⁻ töltéshordozó szerepének bizonyítására Cl⁻ szubsztitúciós kísérleteket végeztünk először Na⁺ mentes (2. ábra), majd Na⁺ tartalmazó (3. ábra) oldatokban. Na⁺ mentes külső oldat esetén a külső és belső oldat Cl⁻ koncentrációjából számított megfordulási potenciál ($E_{rev(Cl)}$) értéke kezdetben -1 mV volt. A feszültségrámpákkal meghatározott I_{TI} megfordulási potenciál értékek ($E_{rev(ITI)}$) (2A. ábra) pitvari sejteknél $+8\pm 1$ mV-nak (N=30), kamrai miocitáknál $+12\pm 1$ mV-nak (N=6), míg Purkinje sejteknél $+7\pm 1$ mV-nak (N=6) adódtak, amelyek jó egyezést mutattak a számított $E_{rev(Cl)}$ értékkel. Amikor a Na⁺ mentes külső oldat Cl⁻ koncentrációját lecsökkentettük (NMDG-glutamát, 2B. ábra), akkor a számított $E_{rev(Cl)}$ értéke $+42$ mV-ra változott. A kísérleteinkből meghatározott $E_{rev(ITI)}$ értékek (2B. ábra) is pozitív irányba tolódtak el, pitvari sejteknél $+24\pm 1$ mV-ra (N=39), kamrai myocytáknál $+25\pm 3$ mV-ra (N=11), míg Purkinje sejteknél $+21\pm 1$ mV-ra (N=14) módosultak, ami igazolta a Cl⁻ részvételét az I_{TI} kialakításában.

A továbbiakban a Na⁺-Ca²⁺ cseremechanizmus I_{TI}-ban betöltött lehetséges szerepét Na⁺-t tartalmazó környezetben vizsgáltuk. Ennek érdekében Cl⁻ szubsztitúciós kísérleteinket normál Tyrode és "alacsony Cl⁻ Tyrode"-oldatokban is megismételtük (3. ábra). A szimmetrikus Cl⁻ megoszlást biztosító normál Tyrode oldatban a számított $E_{rev(Cl)}$ -3 mV, míg alacsony Cl⁻ Tyrode oldatban $+43$ mV volt. A feszültségrámpákkal meghatározott $E_{rev(ITI)}$ megfordulási potenciál értékek (3A. ábra) pitvari sejteknél $+6\pm 1$ mV-nak (N=10), kamrai myocytáknál $+6\pm 1$ mV-nak (N=10), míg Purkinje sejteknél $+3\pm 1$ mV-nak (N=4) adódtak. Amikor a külső oldat Cl⁻ koncentrációját lecsökkentettük (alacsony Cl⁻ Tyrode), akkor a kísérletesen meghatározott $E_{rev(ITI)}$ értékek (3B. ábra) megváltoztak. Pitvari sejteknél $+23\pm 1$ mV-t (N=7), kamrai myocytáknál $+26\pm 1$ mV-t (N=5), míg Purkinje sejteknél $+18\pm 3$ mV-t (N=4) kaptunk. Két mintás Student t-próbával összehasonlítva a Na⁺ hiányában és jelenlétében meghatározott megfordulási potenciál értékeket,



2.ábra

Nyúl Purkinje sejten regisztrált feszültségrámpák (R_1 , R_2 , R_3), koffeinnel kiváltott Ca^{2+} tranziensek, $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok és feszültség-áramerősség karakterisztikák (fentről lefelé) NMDG-Cl⁻ (A), illetve NMDG-glutamát (B) oldatokban. A $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok -60 és +80 mV közötti feszültség-áramerősség karakterisztikáit (DR) az $R_2 - ((R_1 + R_3)/2)$ összefüggés felhasználásával határoztuk meg. A bemutatott sejtnél a junciós potenciálokkal korrigált megfordulási potenciálok szimmetrikus Cl⁻ megoszlást biztosító NMDG-Cl⁻ oldatban +12 mV-nak, míg a csökkentett külső Cl⁻ koncentrációt létrehozó NMDG-glutamát oldatban +27 mV-nak adódtak. A 10 mM koffein 300 ms-ig történő alkalmazását vízszintes vonallal jelöltük. A pontozott vonalak az $[Ca^{2+}]_i$ - illetve áramszenetek nulla értékét jelölik.



3.ábra

Nyúl kamrai sejten regisztrált feszültségrámpák (R_1 , R_2 , R_3), koffeinnel kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok és feszültség-áramerősség karakterisztikák (fentről lefelé) normál Tyrode (A), illetve alacsony Cl^- Tyrode (B) oldatokban. A $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok feszültség-áramerősség karakterisztikáit (DR) az $R_2 - ((R_1 + R_3)/2)$ összefüggés felhasználásával határoztuk meg a -60 és $+80$ mV közötti tartományban. A megfordulási potenciálok a szimmetrikus Cl^- megoszlást biztosító normál Tyrode oldatban $+6,5$ mV-nak, míg csökkentett külső Cl^- koncentrációt létrehozó alacsony Cl^- Tyrode oldatban $+28$ mV-nak adódtak. A 10 mM koffein 300 ms-ig történő alkalmazását vízszintes vonallal jelöltük. A pontozott vonalak a áramsintek nulla értékét jelölik.

sem szimmetrikus, sem pedig aszimmetrikus Cl^- megoszlások esetén sem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni.

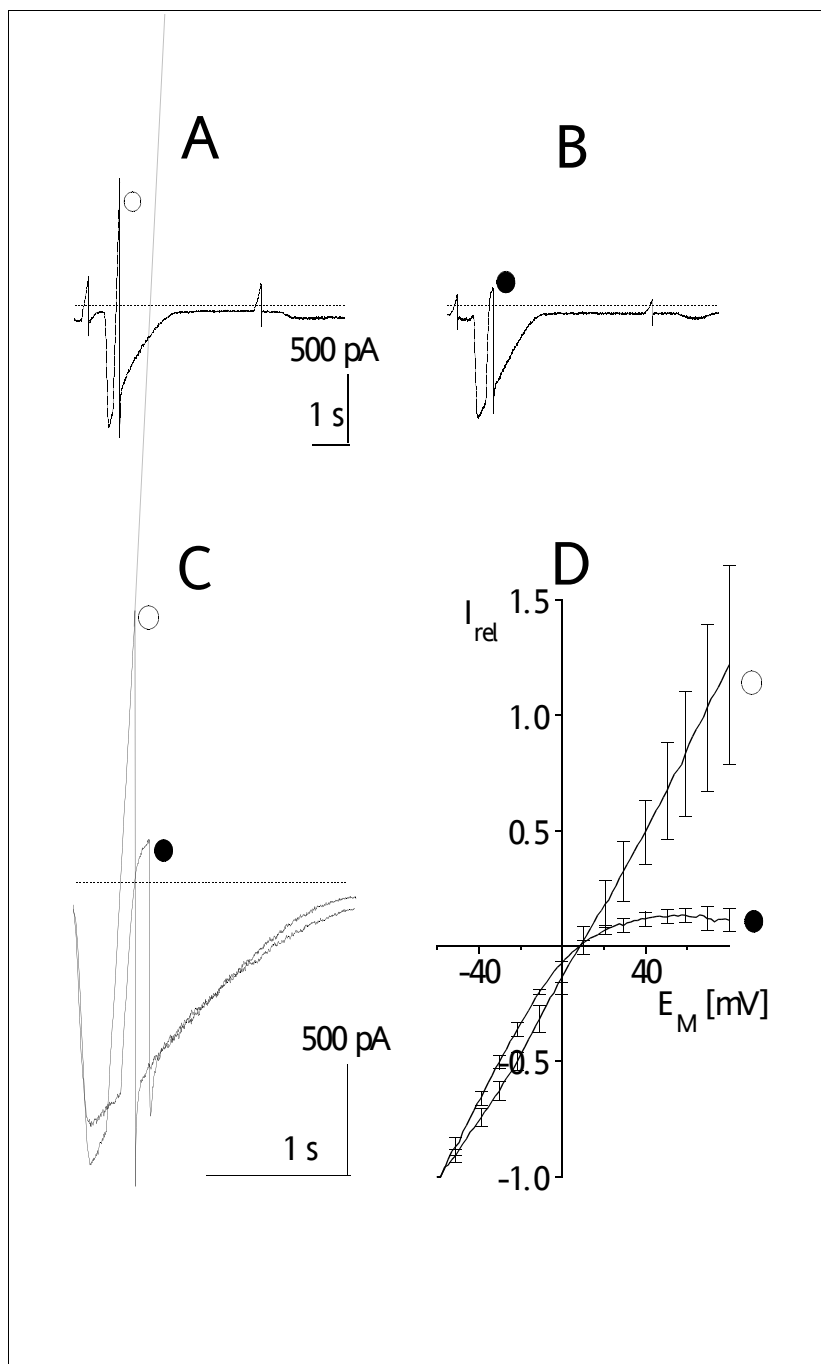
A Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus I_{TI} -ban betöltött lehetséges szerepét úgy is tanulmányoztuk, hogy a Tyrode oldatokban végzett kísérleteinket az antiporter gátlójaként ismert Ni^{2+} (5 μ M) jelenlétében is megismételtük. A kísérleteket három pitvari sejten elvégezve, nem találtunk sem az áram megjelenésében, sem más paramétereiben kimutatható különbségeket. A szubsztitúciós és a Ni^{2+} felhasználásával kapott eredmények ismeretében megállapítható, hogy a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus I_{TI} -ben betöltött szerepe csekély. Cl^- szubsztitúciós kísérleteink arra utalnak, hogy nyúlban a koffeinnel kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ -függő I_{TI} jelentős töltéshordozója a Cl^- , tehát itt döntően egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- áramról ($I_{Cl(Ca)}$) van szó.

Mi okozhatja azonban az alacsony Cl^- tartalmazó oldatokban kialakuló $E_{rev(Cl)}$ és a $E_{rev(ITI)}$ közötti jelentős különbséget? A junkciós potenciállal történt korrekciót követően még mindig hozzávetőleg 15 mV különbség adódott az $E_{rev(Cl)}$ és a $E_{rev(ITI)}$ értékek között, ami leginkább azzal magyarázható, hogy a Cl^- szubsztitúciós kísérleteinkben használt glutamát is képes áthaladni a $I_{Cl(Ca)}$ -on. Ha feltételezzük, hogy az ionok csatornán történő átlépése egymástól független, akkor a csatorna glutamát- és Cl^- vonatkoztatott permeabilitási hányadosa ($P_{glutamát}/P_{Cl}$) a Goldman-Hodgkin-Katz egyenletből meghatározható. Ezek alapján a $P_{glutamát}/P_{Cl}$ értéke pitvari sejteknél 0,423-nak, kamrai sejteknél 0,505-nak, Purkinje sejteknél pedig 0,471-nak adódott.

5.1.3. A töltéshordozó megállapítása a csatorna farmakológiája alapján

Az ionszubsztitúciós kísérletek mellett különböző Cl^- csatorna gátlók hatását is vizsgáltuk a koffeinnel kiváltott I_{TI} -ra. A 4. ábrán NMDG- Cl^- oldatban, külsőleg alkalmazott 0,5 mM anthracén-9-karboxilát (9-AC) hatását tüntettük fel a tranziens membránáramra. Az ábra D részén 3 pitvari sejten mért 9 áramjelből számított, a -60 mV-os értékre normalizált, majd átlagolt feszültség-áramerősség karakterisztikák láthatók. A 9-AC jelentős mértékben gátolta a $I_{Cl(Ca)}$ kifelé irányuló komponensét. Ez a gátlás +80 mV-on a 90%-ot is elérte, miközben sem a megfordulási potenciál értéke, sem pedig a befelé irányuló áramkomponens nem változott. Hasonló hatásokat tudtunk kimutatni 4 kamrai és 1 Purkinje sejten is.

A 9-AC hatását az intracelluláris oldal felől adagolva is megvizsgáltuk 6 pitvari és 11 kamrai sejt esetén. Ilyenkor mind a kifelé, mind a befelé irányuló áramkomponens nagymértékben csökkent, sőt összesen 10 sejt esetén egyáltalán nem tudtunk $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramot kimutatni. A rendszerünk sajnos nem tette lehetővé a kísérlet közben történő belső oldatcserét, ezért önkontrollos



4.ábra

0,5 mM anthracén-9-karboxilát (9-AC) hatása a tranziens membránáramra nyúl pitvari sejteken NMDG-Cl oldatban. A koffein által létrehozott $[Ca^{2+}]_i$ változások és ionáramok láthatók kontroll körülmények között (A), valamint 0,5 mM 9-AC adagolását követően, a szer alkalmazásának 90. másodpercében (B). C: Az 9-AC hiányában (üres kör) és jelenlétében (tele kör) regisztrált tranziens áramok és a második feszültségrámpák. D: 3 pitvari sejten mért 9 áramjelből számított a -60 mV-os értékre normalizált, majd átlagolt értékekből meghatározott feszültség-áramerősség karakterisztikák. A görbéken a szórásokat 10 mV-onként jelöltük. A pontozott vonalak a $[Ca^{2+}]_i$, illetve áramszintek nulla értékét jelölik.

kísérlet végzésére nem volt lehetőségünk. További nehézséget jelentett, hogy a 9-AC saját fluoreszcenciája meggátolta a paralell optikai mérést, ezért utóbbi kísérleteinkben az $[Ca^{2+}]_i$ és az áramjelek nem voltak összevethetők.

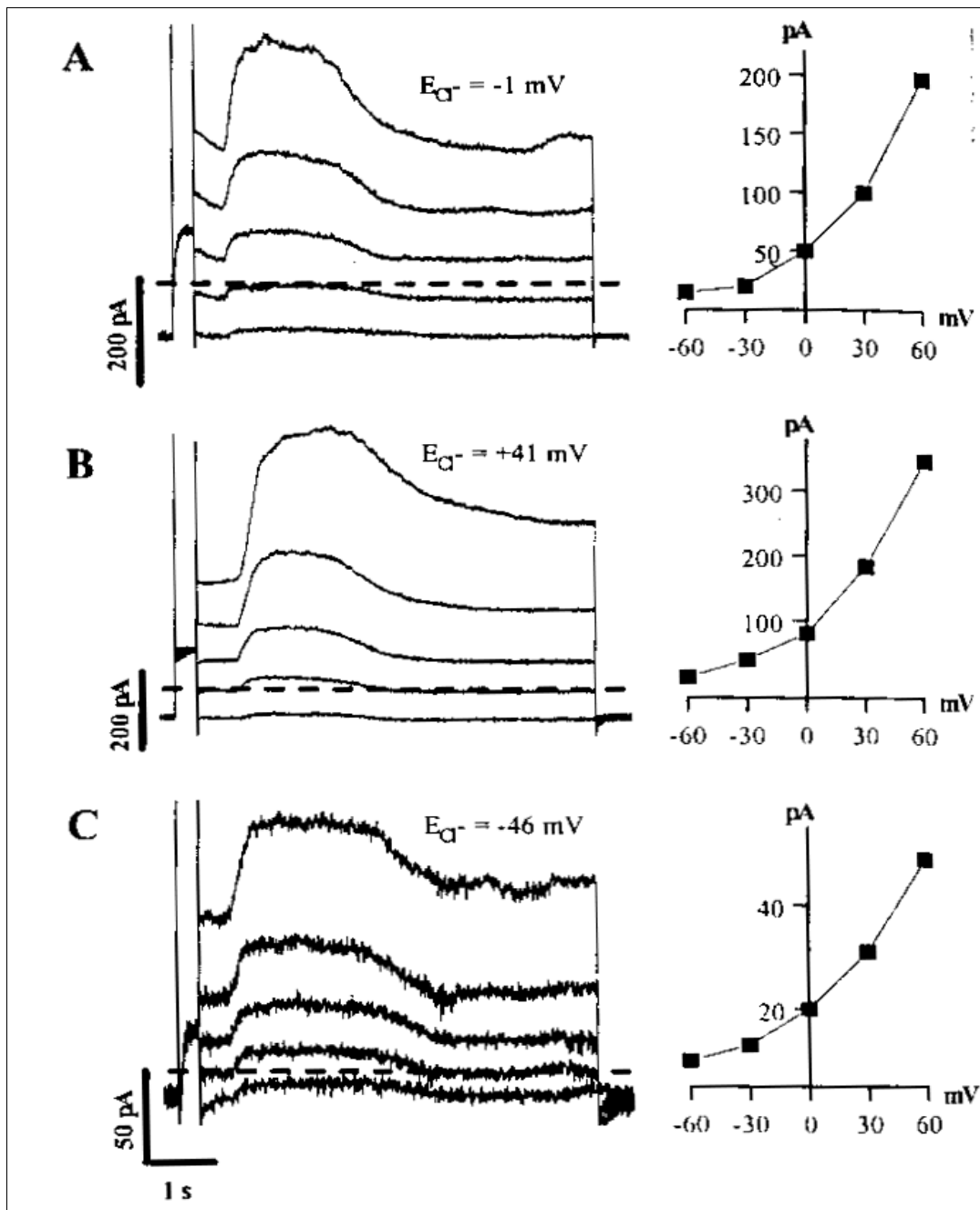
A $I_{Cl(Ca)}$ működésének gátlására stilbén-származékokat is használtunk, mivel ezekről ismert az, hogy gátolni képesek a $I_{Cl(Ca)}$ működését (Zygmunt és Gibbons, 1991, 1992; Zygmunt 1994; Kawano és mtsai, 1995). Kétségtelen azonban, hogy bizonyos esetekben a DIDS (Sipido és mtsai, 1993) és a DNDS (Laflamme és Becker, 1996) által létrehozott gátlás nem volt teljes. Saját kísérleteinkben 2 mM SITS és 0,1 mM DIDS hatását vizsgáltuk, azonban számottevő gátlást nem sikerült kimutatnunk.

5.2. I_{T1} tanulmányozása humán pitvari sejteken

A humán sejteken végzett méréseinket, a pitvari és kamrai izomsejtek könnyebb elérhetősége miatt, Dr. Dirk J. Beuckelmannal kollaborációban a Kölni Egyetem Szívelektrofiziológiai Laboratóriumában végeztük. A németországi mérőrendszer különbségei miatt a mérési protokoll módosítására volt szükség. Mivel az emésztést követően a humán szívizomsejtekben lévő SR Ca^{2+} telítettsége igen variabilis volt, ezért a koffein alkalmazása előtt 5 db -60 mV-ról +10 mV-ra történő depolarizáló pulzussorozattal (1 Hz) egy konstansnak tekinthető SR Ca^{2+} telítettséget hoztunk létre (5-6. ábra). Az 5. depolarizáló lépcső után különböző teszt-pulzusok (-60, -30, 0, +30 és +60 mV az 5. ábrán, vagy -40, -20, 0, +20 és +40 mV a 6. ábrán) segítségével meghatároztuk a különböző membránpotenciáloknál kialakuló membránáramokat koffein alkalmazása nélkül, illetve 10 mM koffein pulzusszerű (300 ms) alkalmazásakor. A különbségi áramokat koffein által kiváltott áramként értelmeztük és ezeket ábrázoltuk a feszültség-áramerősség diagrammokon (5-6. ábra).

5.2.1. A koffeinnel kiváltott áram feszültség-függése és a töltéshordozó megállapítása ionszubsztitúcióval

Kísérleteinket először NMDG-Cl⁻ külső és CsCl belső oldatokat használva végeztük el. Bár ez közel szimmetrikus Cl⁻ megoszlást jelentett ($E_{Cl} = -1$ mV, 5A. ábra), minden membránpotenciálnál kifelé irányuló áramot tudtunk kimutatni. A Cl⁻ megfordulási potenciáljának megváltoztatása a külső illetve a belső oldat Cl⁻ koncentrációjának megváltoztatásával (NMDG-glutamát külső, vagy Cs-glutamát belső oldat használata) nem befolyásolta a koffein által kiváltott



5.ábra

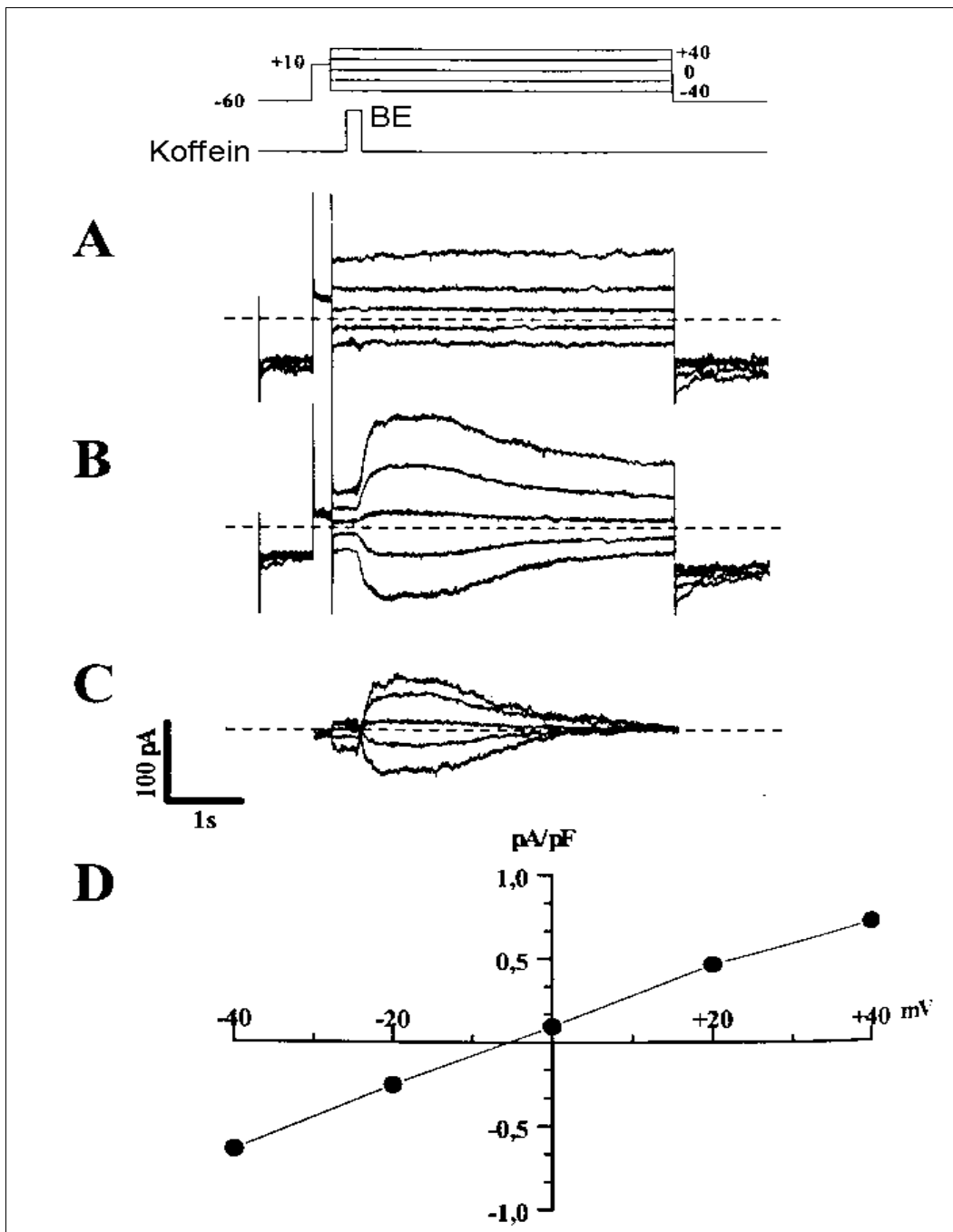
A különböző Cl^- megoszlások hatása a koffeinnel kiváltott membránáramra humán pitvari izomsejteken. **A:** 300 ms hosszú, 10 mM koffein-pulzus alkalmazásával kiváltott membránáramok és az áram feszültségfüggése szimmetrikus Cl^- megoszlás esetén (NMDG- Cl^- külső és CsCl belső oldat). Ilyenkor az E_{Cl^-} számított értéke -1 mV, míg a koffeinnel aktivált áram megfordulási potenciálja nem határozható meg. **B:** A koffein által létrehozott áramok NMDG-glutamát külső oldatban. A pipettaoldat továbbra is CsCl oldat volt, ezáltal az E_{Cl^-} számított értéke +41 mV-ra módosult. **C:** NMDG- Cl^- külső és Cs-glutamát belső oldatok esetén koffein alkalmazását követően regisztrált membránáramok. E_{Cl^-} számított értéke ekkor -46 mV volt. A koffeinnel aktivált áram megfordulási potenciálja továbbra sem határozható meg.

áram irányultságát ($E_{Cl} = +41$ mV, 5B. ábra, illetve $E_{Cl} = -46$ mV, 5C. ábra). Az így kiváltott áram megfordulási potenciálját nem sikerült meghatározni még -120 mV-os tesztpotenciál használatával sem. Az általunk alkalmazott oldatok esetén a csatorna lehetséges töltéshordozóinak száma ezáltal egyre csökkent, ezekben az esetekben csak a Cs^+ lehet a töltéshordozó. Mivel ezt az iont kizárólag a pipetta oldat tartalmazta, így bármilyen membránpotenciált alkalmaztunk, annak egy kifelé irányuló áramot kellett létrehozni és ezért humán pitvari sejteken egy nonspecifikus áramkomponensről lehetett szó a koffein adagolását követően.

Továbbiakban ezt a hipotézisünket teszteltük. A nonspecifikus kation csatorna fiziológiai körülmények között Na^+ -ra és K^+ -ra mutat vezetőképességet (Kass és Mtsai 1978a, b), azonban ha ezek az ionok hiányoznak, akkor egyéb monovalens kationok (Li^+ és Cs^+) is képesek áthaladni az megnyílt csatornán. Oldatainkból továbbra is mellőzve a Na^+ és K^+ -t, szimmetrikus Cs^+ megoszlást ($CsCl$ külső és belső oldat használatával, $N=7$), illetve szimmetrikus Li^+ megoszlást ($LiCl$ külső és belső oldat alkalmazásával, $N=6$) hoztunk létre (6. ábra). Ilyenkor a koffein hatására Li^+ esetén $-7,1 \pm 1,5$ mV, Cs^+ esetén pedig $-3,3 \pm 2,5$ mV körüli megfordulási potenciállal rendelkező áram keletkezett. A csatorna (I_{CAN}) különböző vezetőképességet mutatott Li^+ -ra és Cs^+ -ra, mivel a -60 mV-os membránpotenciálokon a kapacitásra vonatkoztatott áramsűrűségek jelentősen különböztek egymástól ($-1,13 \pm 0,26$ pA/pF Li^+ esetén, illetve $-0,66 \pm 0,15$ pA/pF Cs^+ használatakor).

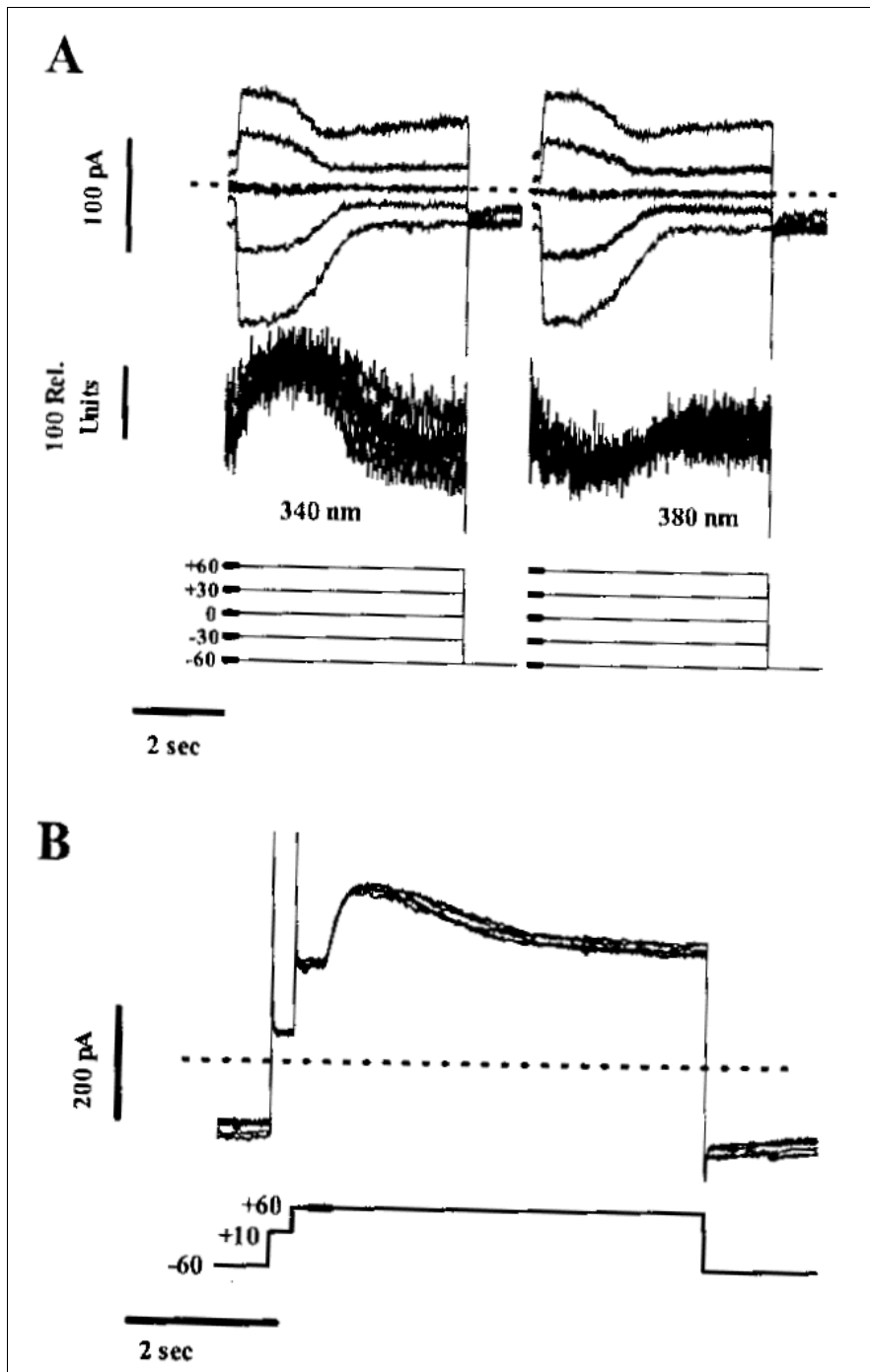
5.2.2. A nonspecifikus kation csatorna $[Ca^{2+}]_i$ függése

A csatorna töltéshordozójának meghatározása után további két kérdésre kerestünk választ: (1) Tényleg $[Ca^{2+}]_i$ -függő a koffein-által létrehozott áram? (2) A lépcsős árammérési protokollok miatt alkalmazott többszörös koffeinkezelés minden esetben azonos Ca^{2+} tranzienseket hoz létre? Az első kérdés megválaszolásához a pipetta oldatba Ca^{2+} megkötő EGTA-t (10 mM) juttattunk, így az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés gátlásán keresztül, minden esetben ($N=7$) megakadályoztuk a koffeinnel aktiválható áram kialakulását. A 7. ábra A részén a repetitív koffein adagolás hatására, különböző membránpotenciáloknál kialakuló Ca^{2+} tranzienseket tüntettük fel. Mérési eredményeink alapján lényegi különbségek nem voltak kimutathatók a 340, illetve a 380 nm-es hullámhosszúsnál mért Fura-2 jelekben. Az ismételt alkalmazott koffein azonos membránpotenciálok esetén sem befolyásolta számottevően a kialakult Ca^{2+} tranziens és áramkomponens sajátosságait (7B. ábra).



6.ábra

Szimmetrikus Li^+ megoszlás alkalmával koffeinnel kiváltott membránáramok humán pitvari izomsejteken. **A:** 5 db -60 mV-ról +10 mV-ra történő depolarizáló 1 Hz-es impulzussorozattal egy konstansnak tekinthető SR Ca^{2+} telítettséget hoztunk létre, majd az 5. depolarizáló lépcső után különböző tesztpulzusokkal (-40, -20, 0, +20 és +40 mV) meghatároztuk a koffein alkalmazása nélkül kialakuló ionáramokat. **B:** Ugyanazon a sejten, ugyanolyan feszültségimpulzusokkal, de 10 mM koffein pulzusokkal kiváltott áramok. **C:** A koffein-által kiváltott ionáramokat a B és A részen bemutatott áramok különbségeként értelmeztük. **D:** A koffeinnel aktivált áram feszültségfüggése. Az áram megfordulási potenciálja -6 mV, ami igen közel áll a számított $E_{rev(Li)}$ 0 értékéhez. A szaggatott vonalak a áramok nulla értékét jelölik.

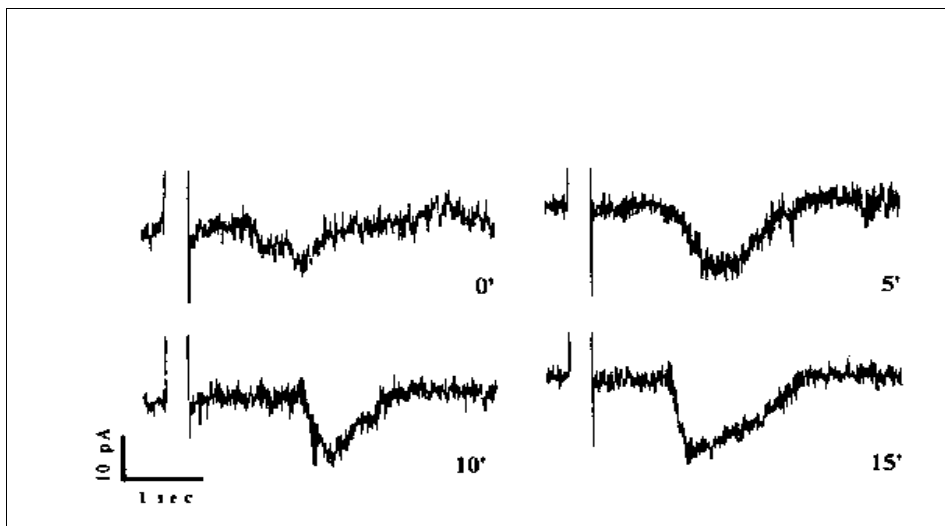


7.ábra

Szimmetrikus Li^+ megoszlás alkalmával, repetitív koffein adagolással kiváltott membránáramok humán pitvari izomsejteken. **A:** 50 μ M Fura-2-t tartalmazó LiCl belső és külső oldatok alkalmazásakor regisztrált koffeinnel aktivált ionáramok és a szinkron megjelenített $[Ca^{2+}]_i$ -al korreláló 340 és 380 nm-es Fura-2 fluoreszcencia-változások. Az egymást követő koffein pulzusok közel hasonló Ca^{2+} tranzienseket hoztak létre. **B:** Az ismételt koffein pulzusok hatására +60 mV-on kialakuló membránáramok. Nem találtunk jelentős különbségeket az ionáramokban sem a repetitív koffein adagolást követően. A szaggatott vonalak az áramok nulla értékét jelölik.

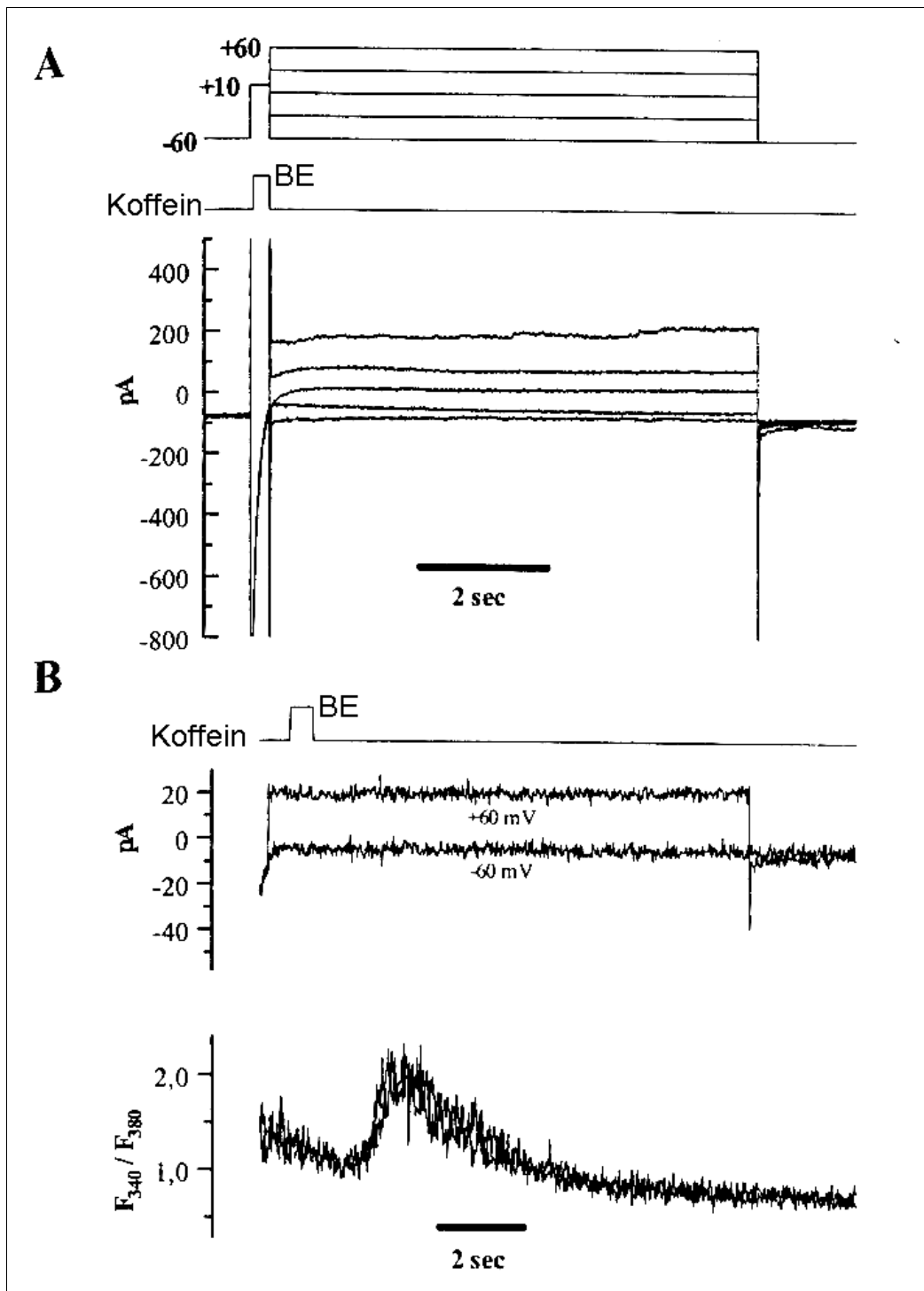
5.2.3. A csatorna farmakológiája

Az eddigiek során bemutatott kísérletes eredményeink bizonyítják, hogy humán pitvari sejteken egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő nemspecifikus kation csatorna (I_{CAN}) működése mutatható ki. Ezt a csatornát, úgy tekintik, mint a legtöbb emlős sejten kimutatható $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ csatorna evolúciós módosulását (Blatz és Magleby, 1987). A $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ csatornának single-channel mérésekből meghatározott konduktancia-értékek alapján 2 altípusa ismert, amelyek farmakológiai lag is különbözőek (Romey és Lazdunski, 1984). Az egyik (BK-típus) működése TEA^+ -val gátolható (0,1-1 mM a külső és 50-100 mM a belső oldalon alkalmazva) és apaminra érzéketlen, míg az SK-típus TEA^+ -ra inszenzitív, de az apamin (100 nM külső oldalon alkalmazva) gátolja a működését. Mivel az általunk használt külső és belső oldatokban egyaránt 20 mM TEA^+ volt, ezért kizárhatjuk, hogy esetleg a BK-típusú $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ csatorna működését látnánk a koffein alkalmazásakor. Megnéztük, hogy az apamin gátolja-e a humán pitvari sejteken található I_{CAN} működését (8. ábra). A vizsgált 4 sejt esetén semmilyen apamin hatást nem tudtunk kimutatni, ami alapján bizonyítottnak vehető, hogy a humán pitvari sejtekben Na^+ és K^+ mentes környezetben az I_{CAN} képes az $[Ca^{2+}]_i$ növekedés következtében aktiválódni, és ez nem azonos a $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ árammal.



8.ábra

Apamin hatása a koffeinnel kiváltott membránáramra humán pitvari izomsejteken. 1 mM koffein hatására -60 mV-on kialakuló membránáramok 100 nM apamin jelenlétében. A feltüntetett idő az apamin expozíciót jelöli. Az SK típusú $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ áram gátlószereként ismert apamin nem gátolta az I_{CAN} működését.



9.ábra

Szimmetrikus Cs^+ megoszlás alkalmával koffein adagolással kiváltott membránáramok humán kamrai izomsejteken. **A:** Az 5. -60+10 mV-os depolarizáló pulzust követő -60, -30, 0, +30 és +60 mV-os teszt-pulzusokon koffein alkalmazása nélkül kialakuló ionáramok. **B:** Ugyanazon a sejten, -60 és +60 mV-on regisztrált koffein-pulzust követő membránáramok és Ca^{2+} tranziensek. Humán kamrai izomsejteken Na^+ és K^+ hiányában nem mutatható Ca^{2+} -függő membránkonduktancia-változás.

5.3. I_{T1} tanulmányozása humán kamrai sejteken Na^+ és K^+ mentes környezetben

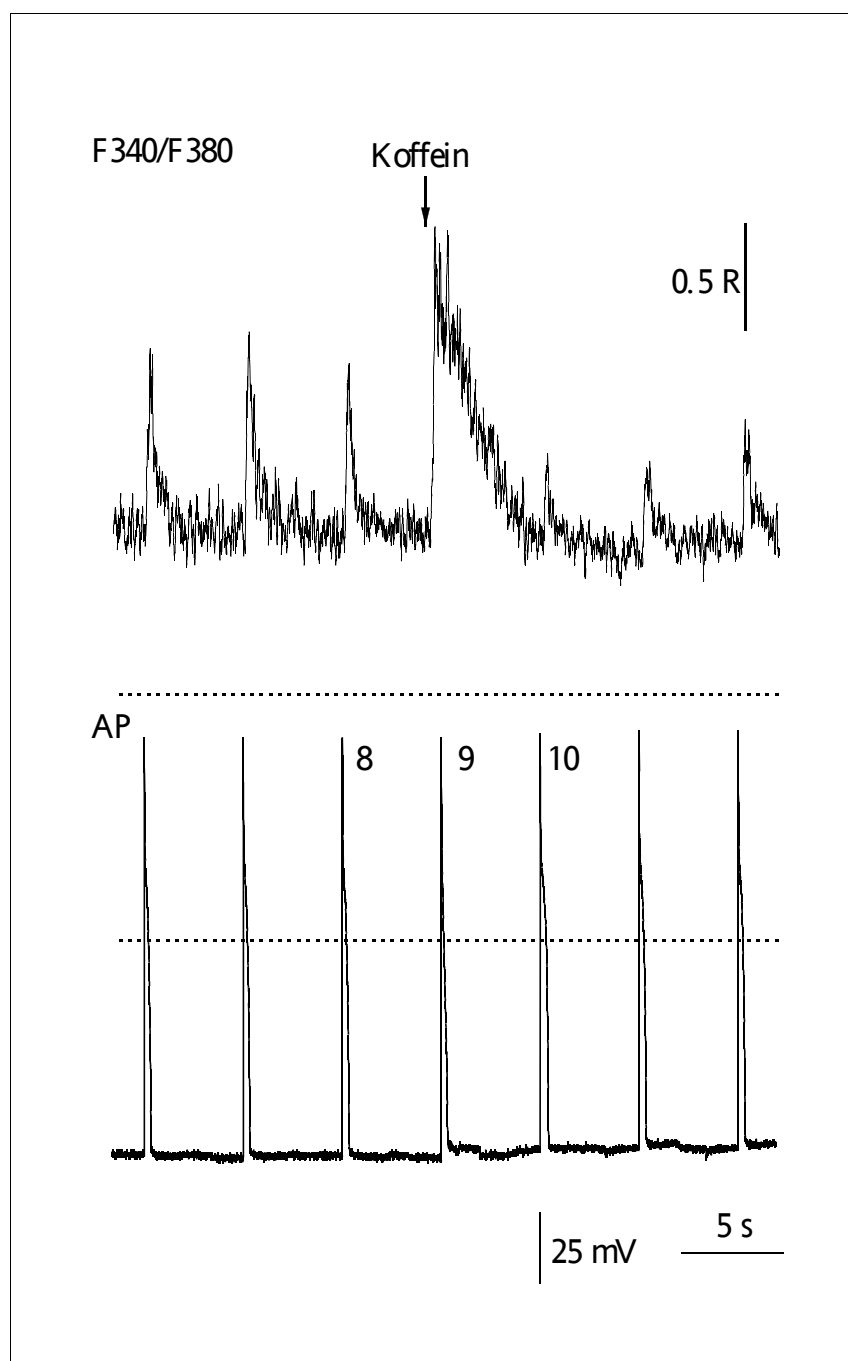
Kísérleteinket humán kamrai sejteken is megismételtük (9. ábra) szimmetrikus Cs^+ oldatösszetétel esetén. Bár pitvari sejteknél már 1 mM koffein alkalmazásakor kimutatható a I_{CAN} , addig kamrai sejtek esetén a koffein nagy dózisu (10 mM) alkalmazása sem váltott ki semmilyen áramaktivációt (N=15, 1 mM koffein esetén, és N=25, 10 mM koffein alkalmazásakor), miközben az $[Ca^{2+}]_i$ konzekvensen megemelkedett.

5.4. Koffeinnel kiváltott áramok hatása az akciós potenciál lefutására nyúl kamrai izomsejteken

5.4.1. Az akciós potenciálok alakjának Ca^{2+} -indukált változásai

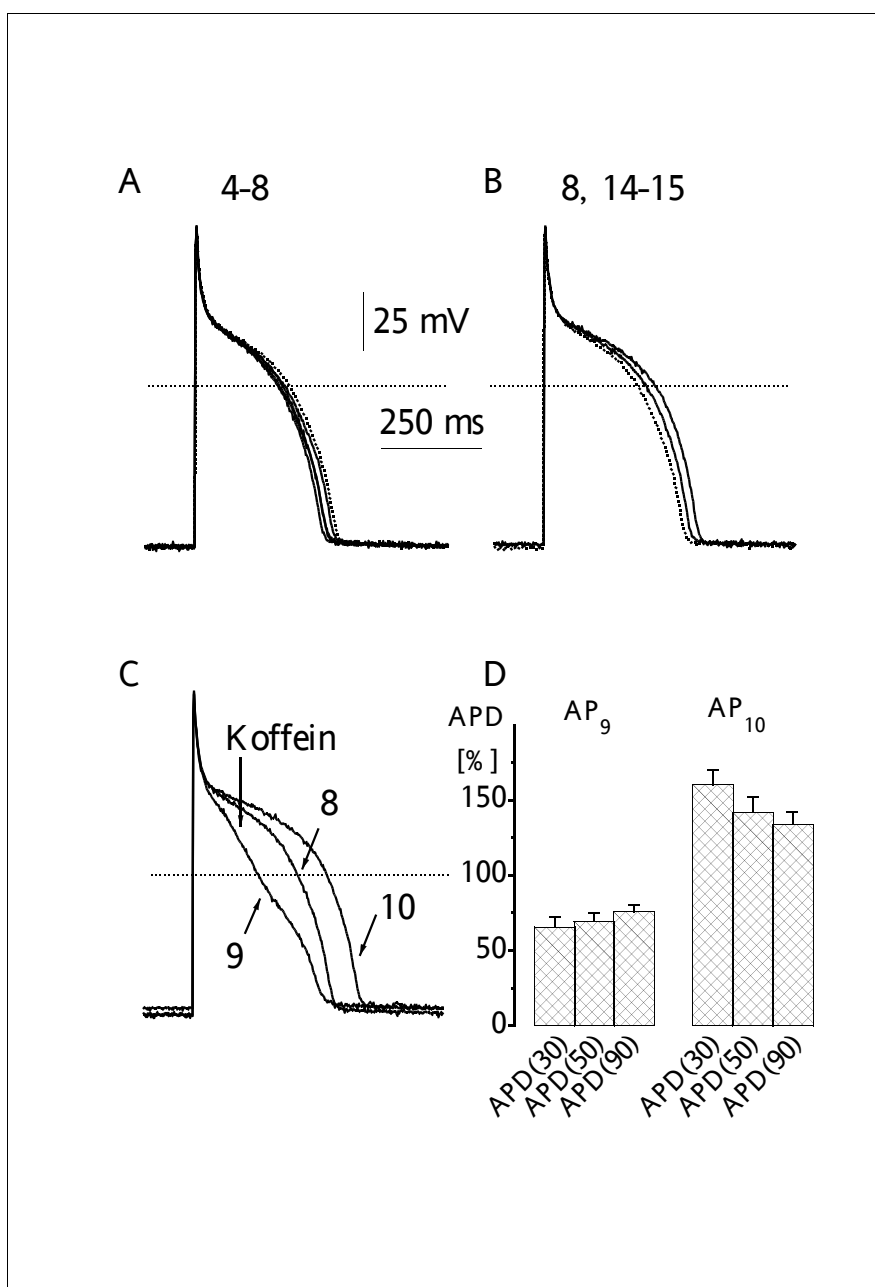
A 10. ábra felső részén Ca^{2+} tranzienseket, míg az alsón a velük egyidejűleg regisztrált akciós potenciálokat tüntettük fel. Az akciós potenciálokat rövid (3 ms), állandó frekvenciájú (0,2 Hz) küszöb feletti (1500 pA) depolarizáló áram impulzusokkal váltottuk ki. A kezdeti pulzusok hatására a szarkoplazmatikus retikulumban (SR) steady-state Ca^{2+} töltöttség alakult ki, amit közel azonos lefutású akciós potenciál formák követtek. A 9. akciós potenciál plató fázisa alatt alkalmazott koffein pulzus segítségével a kontrollhoz képest jelentősebb Ca^{2+} felszabadulást váltottunk ki. A koffein használata után a SR részlegesen kiürült, ezért a 10. 11. és 12. akciós potenciálok alatt alacsonyabb amplitúdójú Ca^{2+} tranziensek voltak mérhetőek. A steady-state állapotnak megfelelő Ca^{2+} tranziens (és akciós potenciál lefutás) csak később, a 14.-15. inger alatt tért vissza.

Az akciós potenciálok lefutása az egyszeri koffein alkalmazásakor mellett jellegzetesen megváltozott. A 10. ábrán feltüntetett akciós potenciálokat rövidebb időlépték mellett, valamint a 20 azonos körülmények között mért akciós potenciál sorozat statisztikai feldolgozásának eredményeit a 11. ábrán tüntettük fel. A 11. ábra A és B részein a kontroll akciós potenciált (AP_8) szaggatott vonallal jelöltük. Itt az is jól látható, hogy a steady-state akciós potenciál lefutás a koffein alkalmazását megelőzően (AP_4 - AP_8), és a koffein pulzust követő, sorrendben 14. és 15. akciós potenciálok esetében érvényesült. A C ábrarész mutatja, hogy -a koffein közvetlen hatására (AP_9) és ezt követően (AP_{10})- hogyan változtak az akciós potenciálok időbeli lefutásai. Látható, hogy a koffein által emelt $[Ca^{2+}]_i$ gyorsította a repolarizációt, valamint deprimálta a platót (AP_9). Ez a korai hatás az akciós potenciál valamennyi repolarizációs szintjén érvényesült. A 11. ábra D



10. ábra

Akciós potenciálok (alul) és sejten belüli Ca^{2+} koncentrációváltozások (felül) egy izolált kamrai szívizomsejtben, koffein (nyíl) adása előtt, alatt és után. Az elektromos impulzusokkal kiváltott akciós potenciálok (AP) kisebb amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienseket eredményeztek, mint a koffeinnel előidéztet Ca^{2+} -felszabadulás. A koffeint a 9. akciós potenciál plató fázisa alatt 300 ms-ig alkalmaztuk (koffein „pulzus”). A 9.-ket követő akciós potenciálok csökkent amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienseket váltottak ki.



11.ábra

A koffeinnel kiváltott Ca^{2+} tranziensek akciós potenciál-lefutást módosító hatásai. Az elektromos impulzusokkal kiváltott akciós potenciálok a koffein alkalmazását megelőzően és azt követően steady-state lefutással rendelkeztek (A és B). Koffeinnel kiváltott nagy amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienst hatására az akciós potenciál repolarizációja a kontrollhoz (AP₈) viszonyítva gyorsult (AP₉), míg csökkent Ca^{2+} felszabadulás mellett lassult (AP₁₀) (C). A D részen feltüntetett akciós potenciál időtartamok (APD) a repolarizáció különböző %-os szintjein (a zárójelekben) szemléltetik, hogy a kontrollhoz viszonyítva (AP₈ = 100 %) milyen mértékben alakult ki akciós potenciál rövidülés (AP₉) és hosszabbodás (AP₁₀) (N=20).

része 20 kísérlet átlagai alapján demonstrálja, hogy az AP₉ hosszának a csökkenése a kontroll akciós potenciálhoz képest a 30, 50, és 90%-os repolarizációs szinteken egyaránt érvényesült. Meglepő viszont, hogy a 10. akciós potenciál (AP₁₀) a steady-state akciós potenciálhoz képest hosszabb időtartamú volt. Ez a kései koffein hatás a 12. ábra D részén szintén jól érzékelhető. Az akciós potenciál időtartamok, mind a 9., mind a 10. akciós potenciálok eseteiben szignifikánsan különböztek a kontrolltól.

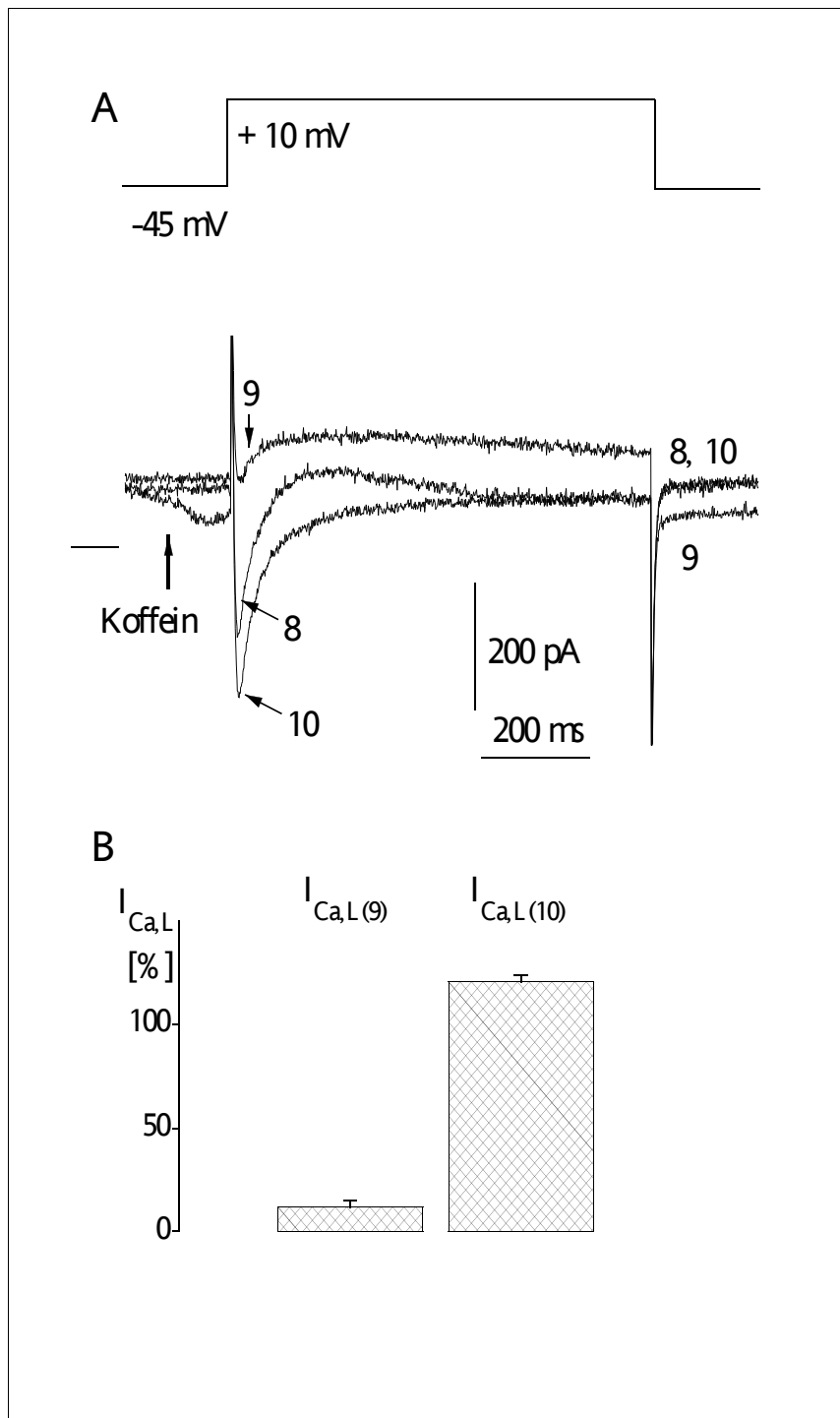
A nagyobb amplitúdójú Ca²⁺ tranziens hatására bekövetkező gyorsult repolarizáció egyaránt lehet fokozott outward áramok, és csökkent inward áramok következménye, míg a csökkent Ca²⁺ felszabadulás alatt a plató megnyúlása az inward áramok dominanciájára utalt.

5.4.2. Az L-típusú Ca²⁺-áram Ca²⁺-függő modulációja

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy vajon a koffein adását követően megfigyelt közvetlen (AP₉) és kései változások (AP₁₀) korrelálnak-e az L-típusú Ca²⁺-áram valószínűsített eltéréseivel.

Az L-típusú Ca²⁺-áramokat feszültség-rögzített körülmények között tanulmányoztuk. Az akciós potenciálok vizsgálatához hasonlóan 15 egymást követő depolarizáló feszültségimpulzust alkalmaztunk, melyek időtartama 800 ms, frekvenciája 0,2 Hz volt. Ezek a pulzusok tehát követték az áram-rögzített körülmények között mért akciós potenciálok időbeli gyakoriságát és hasonló SR telítettséget eredményeztek. Az ismétlődő membránpotenciál lépcső -45 mV feszültségről indult és +10 mV-ra érkezett. Ilyen körülmények között az SR steady-state telődése, valamint az inward áramok stabilizálódása a 3 - 5 pulzus alatt jött létre. Az inward áram amplitúdóját, melyet a korai negatív csúcs és a depolarizáló lépcső végén mért steady áram különbségként értelmeztünk az L-típusú Ca²⁺-áram jellemzésére használtuk. A koffein alkalmazása és időzítése megegyezett a korábban leírtakkal.

Ahogy azt az 12. ábra A része demonstrálja koffein hatására a 9. Ca²⁺-áram (I_{Ca,L(9)}) a kontrollhoz képest nagymértékben csökkent, a 10. Ca²⁺-áram (I_{Ca,L(10)}) viszont jelentősen fokozódott. A Ca²⁺-tranziensek viselkedése kvalitatív szempontból megegyezett a 11. ábrán feltüntetett sajátságokkal, így annak ábrázolásától a továbbiakban eltekintettünk. A 12. ábra B jelű részén 11 azonos körülmények között végrehajtott mérés eredményeit összegeztük. Látható, hogy a 9. feszültséglépcső alatt az I_{Ca,L} amplitúdója a kontrollhoz (I_{Ca,L(8)}) viszonyítva 12±2%-ra csökkent, míg a 10. feszültséglépcső alatt 122±2%-ra emelkedett (p < 0,05). A következőkben arra



12.ábra

A koffeinnel kiváltott Ca^{2+} tranziensek L-típusú Ca^{2+} -áramot módosító hatásai. **A:** A feszültséglépcsőkkel kiváltott L-típusú Ca^{2+} -áramot az akciós potenciálokhoz hasonlóan koffeinnel moduláltuk. Koffeinnel kiváltott nagy amplitúdójú Ca^{2+} -tranziens hatására az L-típusú Ca^{2+} -áram amplitúdója a kontrollhoz ($I_{Ca,L(8)}$) képest jelentősen csökkent ($I_{Ca,L(9)}$), a koffein adását követően ($I_{Ca,L(10)}$) jelentősen nőtt. **B:** A 9. és 10. Ca^{2+} -áram amplitúdók a kontroll %-ában kifejezve (N=11).

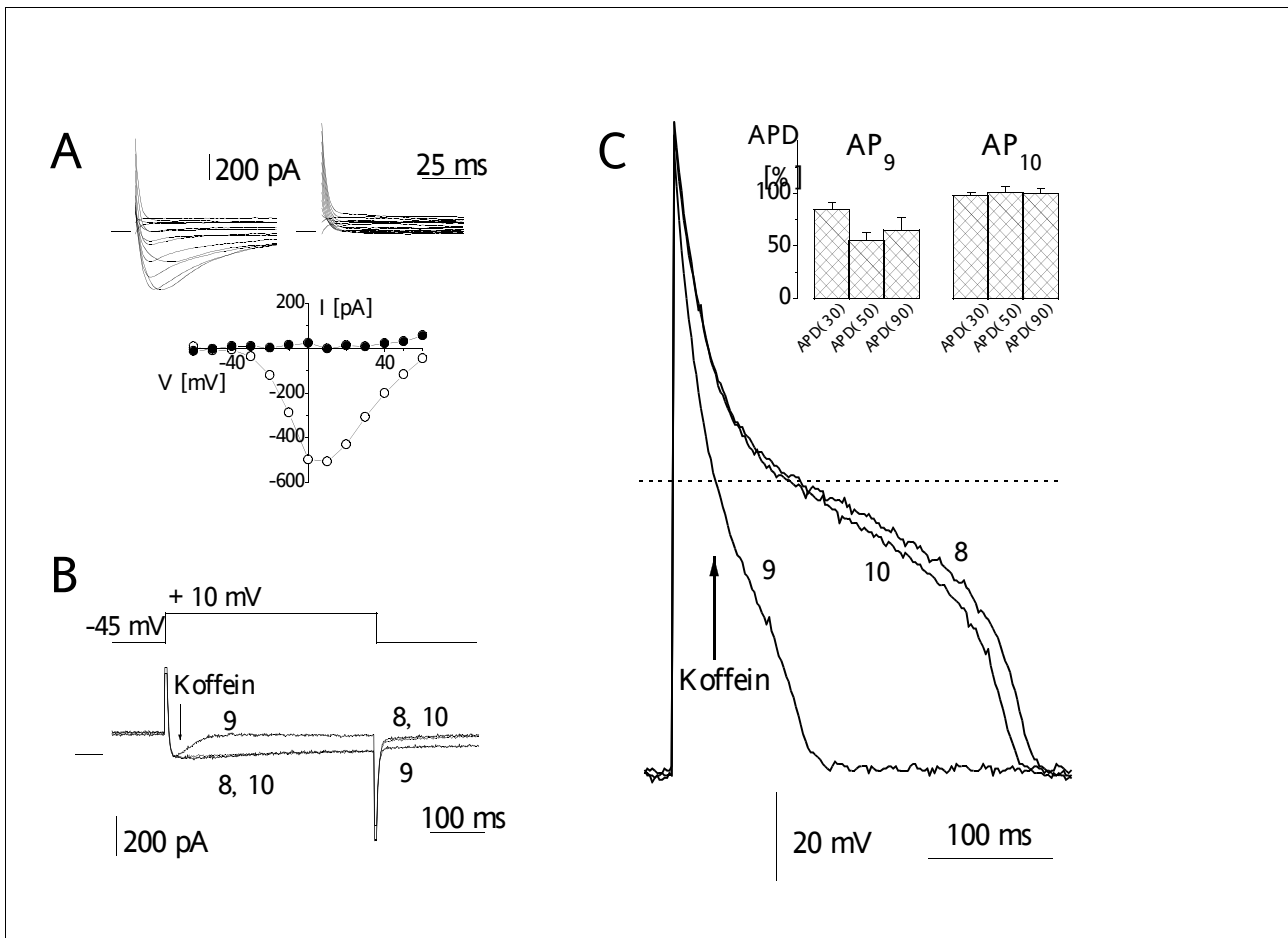
kerestünk választ, hogy a $I_{Ca,L}$ áramon kívül más ionáramok szerepet kapnak-e még a plató fázis Ca^{2+} -függő modulálásában.

5.4.3. Az akciós potenciál lefutásának Ca^{2+} -függő viselkedése az L-típusú Ca^{2+} -áram gátlása után

Az 1-4. ábrán már demonstráltuk, hogy kísérleti körülményeink között a tranzienst inward áram (I_{TI}) aktiválható. Mivel ez az áram nem csak diasztolé, hanem szisztolé alatt is kialakulhat ezért célunk az volt, hogy annak feltételezett hatásait az L-típusú Ca^{2+} -áramtól izoláljuk. A különválasztás érdekében, olyan kísérleteket végeztünk, melyekben az L-típusú Ca^{2+} -áramot 0,5 mM Cd^{2+} alkalmazásával blokkoltuk. A Ca^{2+} -áram gátlását feszültség-clamp körülmények között ellenőriztük (13. ábra A része). Ezt követően a koffein hatását feszültség- és áram-rögzített körülmények között egyaránt tanulmányoztuk (13. ábra B és C részei). A 13. ábra B részén jól látható, hogy a Ca^{2+} -áram gátlását követően a feszültség-lépcsőkkel előidézett áramok koffeinérzékenysége a korábbiakhoz (12. ábra) képest jellegzetesen megváltozott. Ilyenkor ugyanis a koffeinkezelés ellenére a 8. és a 10. depolarizáló lépcsők alatt gyakorlatilag megegyező áramokat mértünk. A 9. pulzus alatt, a koffein alkalmazását közvetlenül követve azonban érzékelhető volt egy extra áramkomponens megjelenése (+10 mV-on outward, -45 mV-on inward). Az L-típusú Ca^{2+} -áram gátlását követően áram-clamp körülmények között továbbra is lehetőség volt akciós potenciálok kiváltására (13. ábra C része). Az ilyenkor kialakuló akciós potenciálok az L-típusú Ca^{2+} -áram hiányában jelentősen rövidebbek voltak és a plató negatívabb potenciálokra alakult ki. Koffein alkalmazására a 9. akciós potenciál időtartama csökkent a 10. akciós potenciál lefutása azonban megegyezett a 8. akciós potenciáléval. Ezek a mérések arra utaltak, hogy az akciós potenciál plató fázisának Ca^{2+} -függő modulálásában az L-típusú Ca^{2+} -áramon kívül egy olyan áram is szerepet kapott, mely csak a kifejezetten magas Ca^{2+} koncentrációknál (AP_9) aktiválódott. Mivel, ez az áram -45 mV membránpotenciálon inward jellegű volt (13. ábra B része) az valószínűleg megfelelt a Ca^{2+} -aktivált tranzienst inward áramnak.

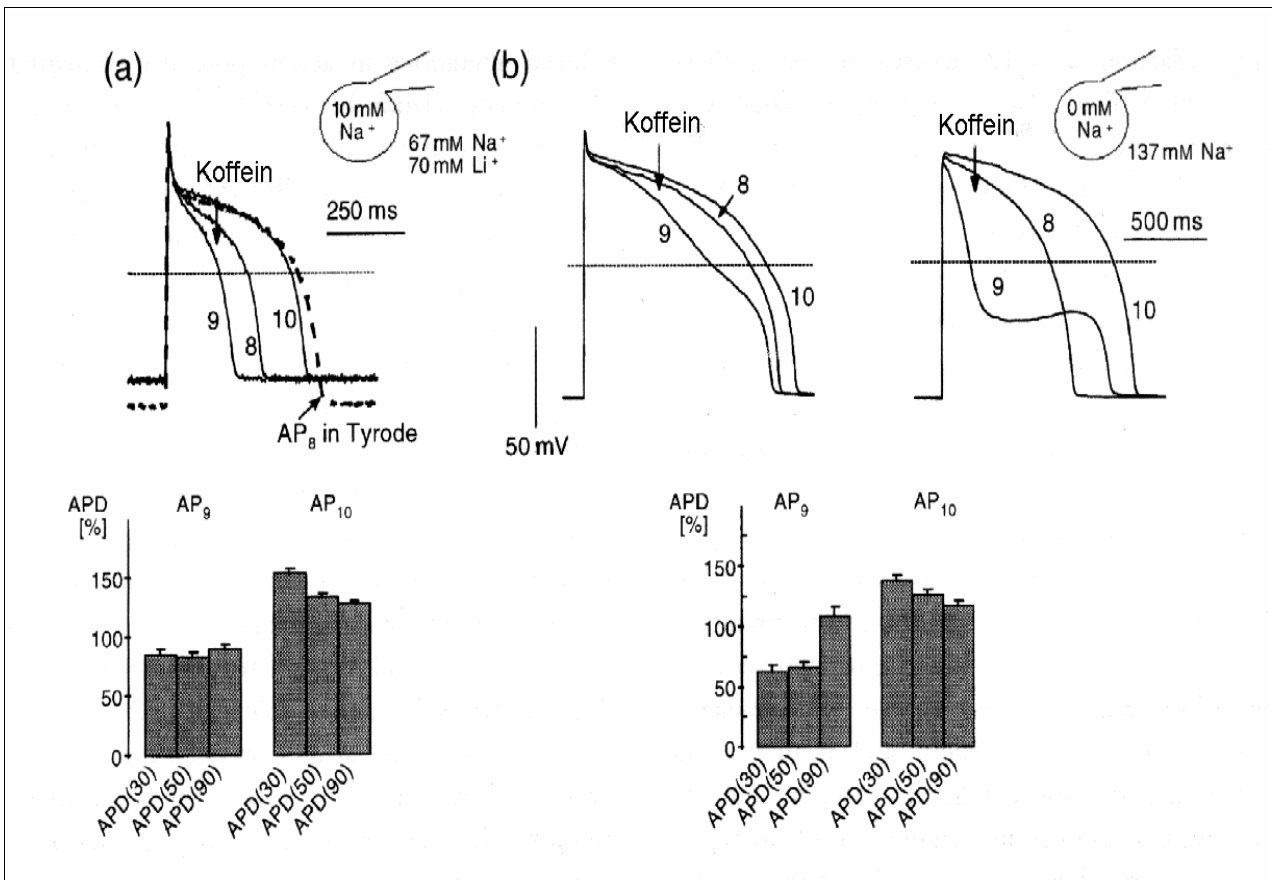
5.4.4. Az Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus szerepe az akciós potenciál konfiguráció változásban

A továbbiakban a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus koffein által létrehozott AP konfiguráció-változásokban betöltött lehetséges szerepét vizsgáltuk (14. ábra). A külső oldat Na^+ tartalmának részleges Li^+ szubsztitúciója a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus egyensúlyi potenciálját negatívabbá



13. ábra

Koffeinnel kiváltott ingerületi folyamatok az L-típusú Ca^{2+} -áram gátlása után. **A:** Kontroll körülmények között a membránpotenciált -60 mV-ról indulva +10 mV-os lépcsőkkel pozitívabb irányba változtattuk (feszültség-clamp), minek hatására az L-típusú Ca^{2+} -áramra jellegzetes kezdeti áramfokozódás és pozitívabb membránpotenciálokon áramcsökkénés volt megfigyelhető (balra felül és alul üres körökkel jelölve). 500 mM Cd^{2+} alkalmazását követően az L-típusú Ca^{2+} -áram nem alakult ki (jobbra felül és sötét szimbólumokkal alul). **B:** 500 mM Cd^{2+} jelenlétében -45 mV-ról +10 mV-ra történő ismételt depolarizációk (feszültség-clamp) során a 9. feszültségpulzus alatt (koffein hatás) egy izolált áramkomponens jelent meg (+10 mV-on outward, -45 mV-on inward). A 10. pulzus alatt mért áram lefutása megegyezett a kontrollal (8. pulzus). **C:** A Ca^{2+} -áram gátlását követően a kontroll akciós potenciál repolarizációs folyamata felgyorsult. A koffeinnel kiváltott fokozott Ca^{2+} -felszabadulás a repolarizációs folyamatot jelentősen gyorsította (AP₉). A 10. akciós potenciál lefutása megegyezett a 8. akciós potenciáléval. (A szimbólumok és az oszlopdiagrammok jelölése a 11. ábrán bemutatottnak megfelelő, N= 8).



14.ábra

A különböző Na⁺ gradiensek hatása a koffeinnel létrehozott akciós potenciál változásokra. **A:** Az akciós potenciálokat normál Tyrode oldatban (pontozott vonallal jelölve), illetve Na-Li Tyrode oldatban regisztráltuk 10 mM belső Na⁺ koncentráció mellett ugyanazon a sejten. A külső oldat Na tartalmának csökkentése a nyugalmi membránpotenciál értékét -80 mV-ról -64 mV-ra depolarizálta, míg az APD(90) értékét 509 ms-ról 290 ms-ra csökkentette. Azonban a koffein AP₉-t rövidítő, illetve AP₁₀-t nyújtó hatása ilyen körülmények között is kimutatható volt. **B:** A teljes belső Na⁺ elvonás akciós potenciálokra kifejtett hatását mutatja. A koffein hatása az akciós potenciál lefutása némileg variábilissá vált. Az ábra felső részén két gyakori helyzetet mutatunk be. Egyes esetekben, bár kimutatható volt a koffein AP₉ és AP₁₀-re kifejtett hatása, azonban ez igen minimálisnak adódott (bal oldal). Más esetekben a koffein adagolást közvetlenül követve egy szék konfigurációjú AP₉ alakult ki (jobb oldal). Ilyenkor az APD(30) és APD(50) értékek nagymértékben csökkentek, míg az APD(90) jelentősen növekedett. A koffein AP₁₀-re kifejtett APD nyújtó hatásai azonban nem változtak számottevően. Az oszlopdiaagrammok 21 sejt átlagát mutatják a 11. ábrán bemutatotthoz hasonlóan.

változtatta, ami megnövelte a fordított cseremechanizmus (outward áram) lehetőségét (Luo és Rudy, 1994, Hobai és társai 1997). A külső oldat Na^+ tartalmának csökkentése a nyugalmi membránpotenciál értékét -82 ± 1 mV-ról -74 ± 2 (N=11) mV-ra depolarizálta, valamint csökkentette a steady-state APD(90) értékét 442 ± 40 ms-ról 247 ± 22 ms-ra. A koffein AP₉-t rövidítő, illetve AP₁₀-t nyújtó hatásai ilyen körülmények között is kimutathatóak voltak.

Egy másik sorozatban azt vizsgáltuk, hogy a sejt teljes belső Na^+ elvonásának van-e az AP-okra kifejtett hatása, miközben a külső oldat normál Tyrode-oldat volt. Ilyen körülmények között a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus reverz módját gátoltuk, míg az inward áram generálást fokoztuk. Ennek következtében a steady-state AP-ok APD(90) értéke 1013 ± 129 ms-ra nőtt (N=19), míg a nyugalmi membránpotenciál szignifikánsan nem változott (-79 ± 2 mV). A koffein hatására az AP-ok lefutása a AP₉ alatt némileg variabilissá vált, de a koffein AP₉-t rövidítő hatása ilyenkor is kimutatható volt. Továbbá a koffein AP₁₀-re kifejtett APD nyújtó hatásai nem változtak számottevően a normál Tyrode-oldatban kapott eredményekhez képest.

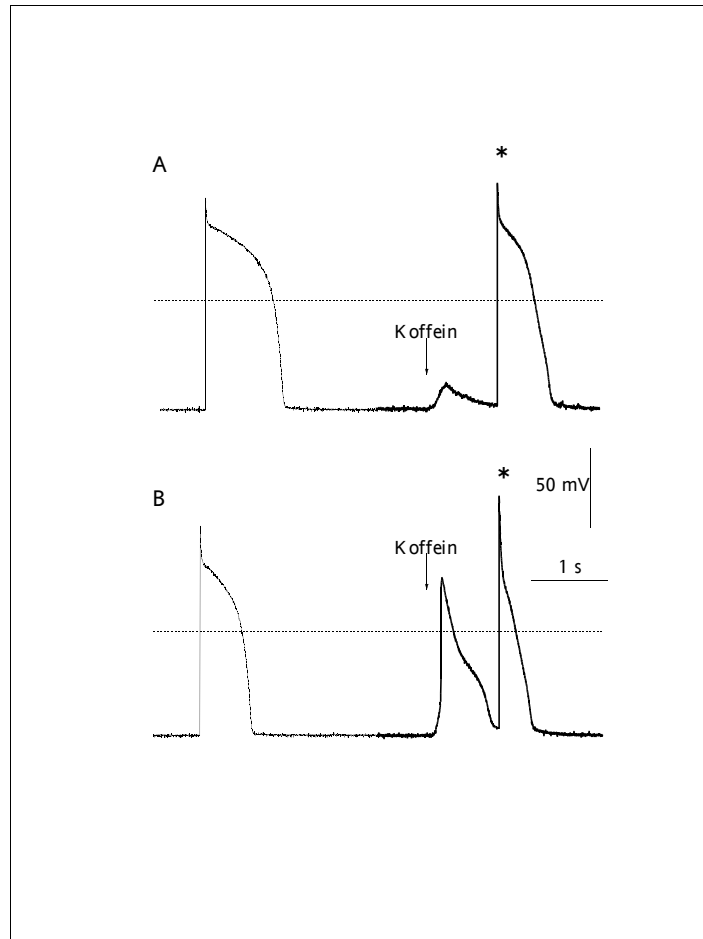
5.5. Koffein-által aktivált áram(ok) lehetséges szerepe az aritmogenezisben

A $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok aritmogenezisben betöltött lehetséges szerepét nyúlászívkből izolált pitvari és kamrai izomsejteken vizsgáltuk. A pipettákat a sejt intracelluláris teréhez hasonló folyadékkal (standard pipetta oldat), míg a mérőkádat normál Tyrode-oldattal töltöttük fel. Az $[Ca^{2+}]_i$ fokozott emelkedését 10 mM koffein egyszeri pulzusszerű alkalmazásával idéztük elő. A 15. ábra A részén két elektromos impulzussal (*) kiváltott akciós potenciált és egy koffeinnel (nyíl) előidézett tranziens depolarizációt tüntettünk fel.

Amennyiben a koffein alkalmazását követő Ca^{2+} -tranziens a membránpotenciált az akciós potenciál kiváltásához szükséges küszöbpotenciálra depolarizálta, úgy akciós potenciál („extrasystole”) jött létre (15. ábra B része). Öt másik sejt vizsgálata során hasonló megfigyeléseket tettünk. A Ca^{2+} -koncentráció emelkedésével párhuzamosan kialakuló tranziens depolarizációk és „extrasystolék” megjelenése azt igazolta, hogy az általunk alkalmazott kísérletes körülmények között a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése a diastolés periódusban tranziens inward áramokat (I_{TI}) hozott létre.

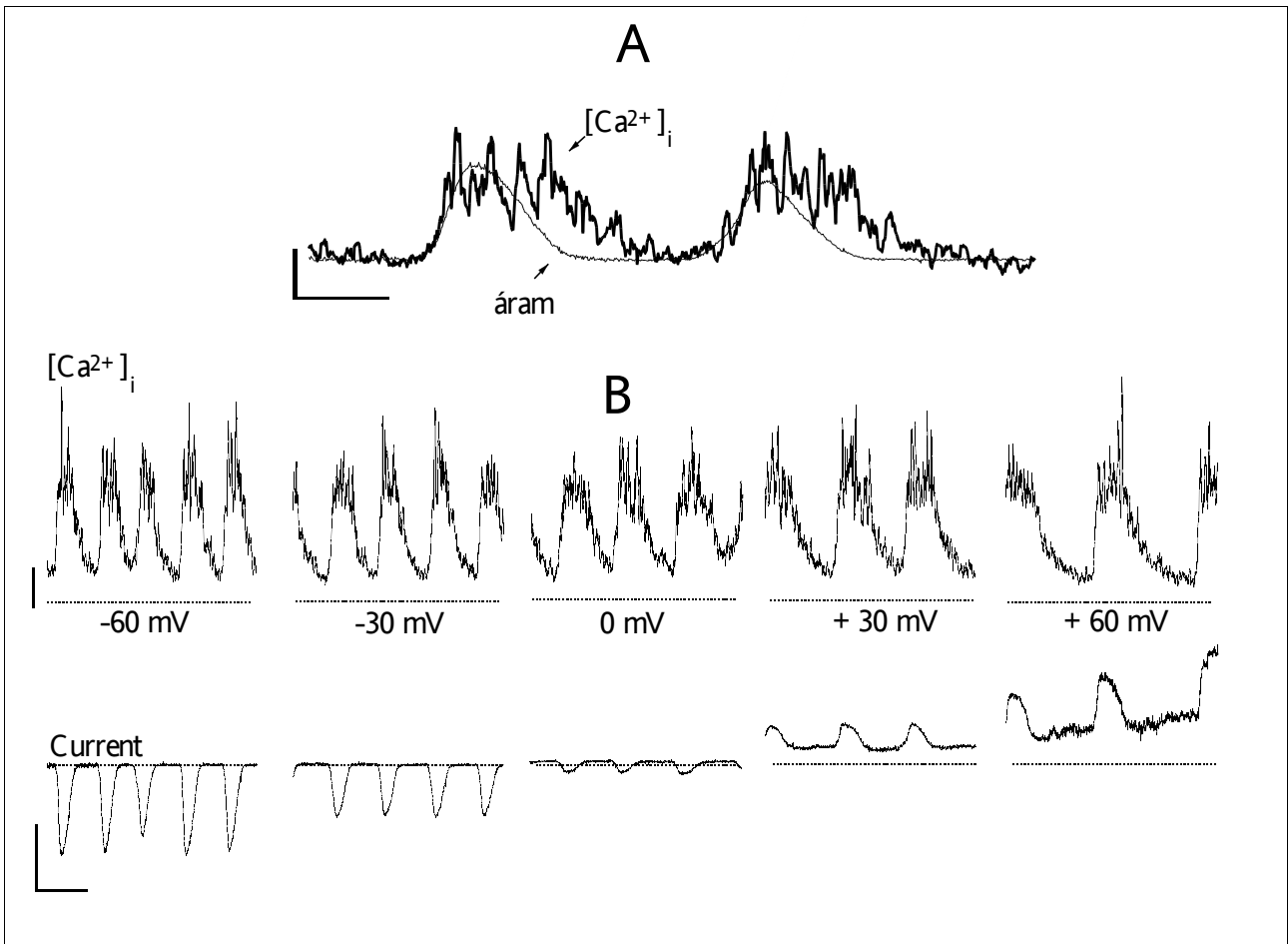
Abban az esetben, amikor a szívizomsejtek $[Ca^{2+}]_i$ -homeosztázisa felborul, egy úgynevezett Ca^{2+} -túltöltött állapot alakulhat ki. Ilyenkor az SR-ből a Ca^{2+} oszcillatórikus felszabadulása figyelhető meg. Az 16. ábra B. része demonstrálja, hogy különböző membránpotenciálok esetén hogyan változik a $[Ca^{2+}]_i$ szint, valamint a megjelenő I_{TI} nagysága és iránya. Az ábra felső részen a

$[Ca^{2+}]_i$ szint, valamint az áram egymásra helyezett képen észrevehetjük, hogy a $[Ca^{2+}]_i$ növekedés minden esetben egyszerre történt az áram kialakulásával és attól időben tovább tartott. A spontán áram-oszcillációk alatt végzett Cl^- szubsztitúciós kísérleteink is a Cl^- lehetséges szerepét bizonyították az aritmogén I_{T1} kialakításában.



15.ábra

A Ca^{2+} sejten belüli raktárakból történő felszabadulása extrasystolét eredményezhet. Az elektromos impulzusokkal (*) kiváltott akciós potenciálok között a sejten belüli Ca^{2+} -raktárakból koffein (nyíl) segítségével előidézett Ca^{2+} -felszabadulás tranzienst depolarizációt (A), vagy akciós potenciált („extrasystole”) eredményezett (B). A 0 mV feszültség szintet szaggatott vonallal ábrázoltuk.



16.ábra

Spontán $[Ca^{2+}]_i$ és áramoscillációk nyúl Ca^{2+} túltöltött pitvari sejtein. **A:** -60 mV-on regisztrált Ca^{2+} tranziens és a szinkron kialakult membránáram NMDG-Cl⁻ külső és CsCl belső oldatok esetén. A könnyebb összehasonlíthatóság miatt az áram polaritását megfordítottuk és a csúcsértéket az $[Ca^{2+}]_i$ csúcsértékére normalizáltuk. **B:** Ugyanazon sejten különböző membránpotenciálok esetén kimutatható Ca^{2+} tranziensek és a szinkron kialakult membránáramok -60, -30, 0, +30 és +60 mV-os membránpotenciálokon. A Ca^{2+} tranzienseknél található függőleges vonal 300 nM $[Ca^{2+}]_i$ koncentrációváltozást mutat.

6. Megbeszélés

A szívizom kontrakcióját az AP által kiváltott tranziens $[Ca^{2+}]_i$ -növekedés hozza létre. Kóros körülmények között a $[Ca^{2+}]_i$ szabályozatlanná válhat, mely sejt felszíni csatornafehérjékre hatva aritmiákat eredményezhet. Az ingerületi folyamatok változásait nem csak a $[Ca^{2+}]_i$ növekedése, hanem annak csökkenése is okozhatja, mert a sarcolemma bizonyos ioncsatornái fiziológiás Ca^{2+} koncentrációknál is jelentős $[Ca^{2+}]_i$ -függéssel rendelkeznek. Munkánkban nyúl és humán szív azon ionáramait igyekeztünk elkülöníteni, melyek fontos szerepet játszanak az ingerületi folyamatok $[Ca^{2+}]_i$ -függő szabályozásában.

Nyulak pitvari, kamrai és Purkinje-sejtjeit -60 mV-os membránpotenciálon tartva rövid koffeinpulzusokkal létrehozott $[Ca^{2+}]_i$ növekedés egy tranziens inward áramot aktivált. Ez az áram mindhárom sejt típusban hasonlóan kimutatható és közel azonos működést mutatott. Kísérleti rendszerünkben az oldatösszetételt és a mérési protokollt úgy választottuk meg, hogy a feszültségfüggő áramaktivációt, valamint a K^+ áramokat elimináltuk. Az áram feszültségfüggésének meghatározásához rövid ideig tartó, gyors feszültségrámpákat használtunk, ezzel biztosítottuk, hogy a vizsgálat alatti $[Ca^{2+}]_i$ -függő áramaktiváció közel állandó legyen. Mivel ligand-függő áramot vizsgáltunk, így az időfüggő árammodulációval kevésbé kellett számolnunk.

Nyulak szívizomsejtjeiben a koffein-által kiváltott áramkomponens feszültségfüggése, megfordulási potenciálja nagymértékben függött a külső és a belső oldatok Cl^- megoszlásától. Mivel rendszerünkben csupán a Cl^- és a Cs^+ lehet töltéshordozó, de a Cs^+ csak és kizárólag outward áramot hozhatott létre, ezért itt egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- csatorna működését láttuk. A Cl^- csatornákról azonban ismert, hogy más anionokra is permeábilisak (Franciolini and Nonner, 1987; Overholt és mtsai, 1993),, ezáltal az ionszubsztitúciós kísérletekben a mért $E_{rev(ITI)}$ és a Cl^- megoszlásból számított $E_{rev(Cl)}$ értéke nem pontosan fedték egymást.

Az I_{TI} Na^+ -függésének korábbi vizsgálata bizonyította a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus jelentőségét az I_{TI} kialakításában csirkén (Clusin, 1983; Clusin és mtsai, 1983), tengeri malacon (Mechmann és Pott, 1986; Kimura és mtsai, 1986; Callewaert és mtsai, 1989), valamint patkányon (Callewaert és mtsai, 1989), ahol a kimutatott Na^+ - Ca^{2+} csereáramok lineáris függést mutattak az $[Ca^{2+}]_i$ -tól. Az áramamplitúdók igen variábilisak voltak, azonban negatív membránpotenciálon rendszerint nem voltak nagyobbak, mint 300 pA (Bers, 1991). A Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus jelentős a myoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció szabályozásában tengeri malac és nyúl

szívizomsejtjeiben is (Crespo és mtsai, 1990, Bers, 1991). Nyulakban azonban nem teljesen tisztázott a cseremechanizmus szerepe az arritmogén I_{TI} kialakításában. Giles és Shimoni (1989) vetette fel először az I_{TI} és a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus lehetséges kapcsolatát nyúl kamrai szívizomsejtben. Ezeken a sejteken Laflamme és Becker (1996) demonstrálta a spontán $[Ca^{2+}]_i$ oszcillációkkal szinkron jelentkező 120 pA-nél kisebb amplitúdójú inward áramokat Cl^- hiányában. Azonban ők Ag-AgCl mérő- és kádelektrodákat használtak, ami felveti a Cl^- szennyezettségének lehetőségét. Mivel saját kísérleteink során a vizsgált áramokban nem találtunk számottevő különbséget Na^+ hiányában és jelenlétében, ezért a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmust a $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- áramhoz viszonyítva kevésbé tartjuk jelentősnek az I_{TI} kialakításában.

A Ca^{2+} túltöltött kamrai szívizomsejteknél Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus mellett (January és Fozzard, 1991) gyakran hivatkoznak egy nemspecifikus kationcsatornára, mint elsődleges aritmogén áramra (Kass és mtsai, 1978). Ezt a csatornát nem sikerült kimutatnunk a nyúl szívizomsejtben, azonban megtaláltuk a humán pitvari izomsejteken. A nyúl szíveken korábban végzett kísérleteinket humán pitvari sejteken megismételve egy nemspecifikus kationkonduktanciát sikerült kimutatnunk, míg a kamrai izomsejteken Na^+ és K^+ hiányában nem tudtunk koffein függő csatornaműködést demonstrálni. Ez utóbbi felveti annak a valószínűségét, hogy a kamrai izomsejtben csak a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus vesz részt az I_{TI} kialakításában (Hilgemann, 1990; Noble, 1991). A humán pitvari sejtek esetén felmerült, hogy valóban valódi nemspecifikus csatornműködésről van szó, vagy pedig a $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ csatorna K^+ mentes környezetben kialakuló módosult vezetőképességét látjuk (Romey és Lazdunski, 1984). Ezt a felvetést azonban a $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ csatorna specifikus gátlószereivel végzett kísérleteink alapján kizártuk.

Izolált kamrai szívizomsejteket használva olyan kísérletes protokollt választottunk, mely lehetőséget adott az akciós potenciál időtartam és a $[Ca^{2+}]_i$ közötti kapcsolat tanulmányozására. Az alacsony frekvencián ingerelt szívizomsejt néhány összehúzódás után steady-state állapotba került (Szigligeti és mtsai, 1998). Erre az állapotra az egymást követő AP-ok és Ca^{2+} -tranziensek nagyfokú stabilitása volt jellemző. Pillanatszerű koffein-alkalmazással az egyensúlyt megbontottuk. A plató fázis alatt a koffein az SR raktárakból fokozott Ca^{2+} -felszabadulást eredményezett, és ez a repolarizációt felgyorsította (közvetlen koffein-hatás). A közvetlen koffein-hatást követő Ca^{2+} -tranziensek a kontrollhoz (steady-state) viszonyítva csökkent amplitúdóval rendelkeztek, és az AP-ok meghosszabbodtak (késői koffein-hatás). A késői koffein-hatás során

tapasztalt $[Ca^{2+}]_i$ -csökkenés valószínűleg annak volt köszönhető, hogy a koffein által szabadabbá tett Ca^{2+} csak részben pumpálódott vissza az SR-be, jelentős részben az extracelluláris térbe távozott. Így a koffein pulzus után következő kontrakciók alatt kezdetben csak kevés intracelluláris Ca^{2+} állt rendelkezésre. Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy az akciós potenciálok lefutásában tapasztalt változások nem magyarázhatók egyetlen töltéshordozó mechanizmussal. Az AP-ok $[Ca^{2+}]_i$ -függő modulációja összetett jelenség.

Jelen munkánkban összegzett eredményeink felvetik, hogy az AP időtartamának szabályozásában az L-típusú Ca^{2+} -áram $[Ca^{2+}]_i$ -függő viselkedése és az aritmogén tranziens inward áram $[Ca^{2+}]_i$ -függő aktivációja egyaránt szerepet kap (Kass és mtsai, 1976; Levy, 1989). Az L-típusú Ca^{2+} -áram elkülönített vizsgálata során az AP-ok vizsgálatához hasonló kísérletes megközelítést alkalmaztunk. Az áramok megjelenítéséhez 0,2 Hz-es sorozatingerlés és egyszeri koffein alkalmazás mellett -45 mV-os potenciálról +10 mV-ra történő depolarizáló négyszögpulzusokat alkalmaztunk. Ez a feszültséglépcső jól értékelhető L-típusú Ca^{2+} -áramot eredményezett. Demonstráltuk, hogy a depolarizációval kiváltott inward áramcsúcs, amely elsősorban az L-típusú Ca^{2+} -áramnak felelt meg, igen érzékenyen reagált az $[Ca^{2+}]_i$ változásaira (Hoth és Penner, 1992; Sipido és mtsai, 1995). A koffein által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés a csúcsáram amplitúdóját csökkentette, míg a koffein alkalmazását követő $[Ca^{2+}]_i$ csökkenés a csúcsáram amplitúdóját emelte. Ezek a változások jól korreláltak az AP-ok időtartamának azonos irányú eltéréseivel, sőt a Ca^{2+} -áram növekedés az alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett tapasztalt akciós potenciál-megnyúlás egyedüli tényezőjének volt tekinthető. Ezt a megállapítást arra a kísérletes megfigyelésre alapoztuk, melyet az L-típusú Ca^{2+} -áram gátlásakor tapasztaltunk. Ilyen körülmények között, a Ca^{2+} -raktárak koffeinnel történő kiürítése ugyanis képtelen volt AP hosszabbodást eredményezni. A koffein közvetlen hatásaként az AP rövidülését viszont ilyenkor is tapasztaltuk. Világos ezért, hogy emelt $[Ca^{2+}]_i$ mellett nem csak a Ca^{2+} -áram csökkenésével, hanem egy másik repolarizáló (outward) áram aktiválódásával is számolnunk kell.

Az L-típusú Ca^{2+} -áram $[Ca^{2+}]_i$ -függő viselkedése több szempontból érdekes. Úgy tűnik, hogy ez a plató kialakításában kitüntetett jelentőségű ionáram az SR fiziológiás Ca^{2+} -telítettsége mellett is jelentős $[Ca^{2+}]_i$ -függő inaktivációt mutat (Sipido és mtsai, 1995). Ez a sajátosság a $[Ca^{2+}]_i$ szisztolé alatti negatív feed-back jellegű szabályozását, és ezért annak (bizonyos fokú) stabilitását is eredményezheti. Amennyiben a raktár Ca^{2+} -mal telített úgy a gyorsan emelkedő Ca^{2+} -tranziens

hamar inaktiválhatja a Ca^{2+} -áramot, ami megszünteti a további Ca^{2+} -belépést és Ca^{2+} -felszabadítást (Hoth és Penner, 1992). Csökkent SR Ca^{2+} -tartalom mellett viszont a Ca^{2+} -áram lassabban inaktiválódik (Sipido és mtsai, 1995), mely lehetőséget ad a hosszabb ideig tartó Ca^{2+} -belépésnek és Ca^{2+} -felszabadításnak. A Ca^{2+} -áram inaktivációjának finom-szabályozása nem csak a szív kontrakciója szempontjából fontos (Bers, 2000, 2001). Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy ez az AP-ok hosszára is igen erősen hat.

Az emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ a Ca^{2+} -áram fokozott inaktiválásán kívül, működésbe hozott egy másik áramkomponenst is. Nyugalmi membránpotenciálon ez depolarizáló (inward) jellegű volt, és ezért megfeleltethető az aritmogén természetű tranziens inward áramnak. Az AP plató potenciáljánál azonban (a Ca^{2+} -áram kikapcsolása után) repolarizáló jellegű áramot észleltünk. Valószínűsíthető, hogy a különböző potenciálokon mért ellentétes irányultság ugyanazon töltéshordozó feszültségfüggő irányfordulásának volt a következménye. Az áram pontos reverzálpotenciálját nem határoztuk meg, de feszültség-clamp méréseink tanúsága szerint az mindenképp -45 mV-nál pozitívabb értéknél alakult ki. Kísérletes rendszerünkben a Cl^- Nernst-egyenlet alapján számított egyensúlyi potenciálja -39 mV volt. Ez az adat is felveti, hogy az I_{T1} háttérében $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- -áramok húzódnak meg. Mások azonban azt hangsúlyozzák, hogy az I_{T1} létrehozásában a Na^+ - Ca^{2+} -csere szerepe is fontos lehet (Hilgemann, 1990; Noble és mtsai, 1991).

Eredményeink egyértelműen jelzik, hogy az L-típusú Ca^{2+} -áram $[Ca^{2+}]_i$ -függő inaktivációjának mértéke fontos az akciós potenciál lefutásának szabályozásában. Nyúl izolált szívműködésben nagy amplitúdójú Ca^{2+} -tranziensek egy további $[Ca^{2+}]_i$ -függő mechanizmust is képesek azonban aktiválni. Az ilyenkor megnyíló csatornák diasztolé alatt depolarizációt, szisztolé alatt kóros repolarizációt eredményeznek. Mindezen hatások feltehetőleg fontosak az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis zavaraihoz kapcsolódó ritmuszavarok létrejöttében.

7. Összefoglalás

Nyúl pitvari, kamrai és Purkinje-sejtjein, valamint humán pitvari és kamrai sejteken vizsgáltuk a koffein kezelés, tehát az $[Ca^{2+}]_i$ -növekedés hatására kialakuló ionáramokat és akciós potenciálok módosulásait. Megállapításaink:

1. Na^+ és K^+ mentes környezetben, koffein pulzusszerű alkalmazásakor nyúl szívműködésében, valamint humán pitvari sejteken egy tranzienst, sejtbe irányuló áram alakul ki -60 mV-os membránpotenciál esetén.
2. Nyulak pitvari, kamrai sejtjein Na^+ és K^+ mentes környezetben egy, a Purkinje sejteken már kimutatott, $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- áram jelenlétét igazoltuk. Ennek feszültség-áramerősség karakterisztikáit, antracén-9-karboxilát érzékenységeit hasonlónak találtuk a különböző sejteken.
3. Humán pitvari szívműködésében is kimutatható, egy a koffeinkezelés hatására kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ -függő membránáram. A megnyíló csatornák vezetőképességét nagymértékben befolyásolta a membrán két oldala közötti monovalens kationeloszlás, de nem befolyásolta a Cl^- megoszlás. Ennek alapján ezeken a sejteken egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő nonspecifikus kationcsatorna működését tételezzük fel.
4. Humán kamrai miocitákon nem sikerült $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- , és nonspecifikus kationcsatorna jelenlétét kimutatni.
5. A szívműködésben $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramai az akciós potenciálok lefutásában és a ritmuszavarok kialakulásában meghatározó szerepet játszanak. Nyúl elektromosan ingerelt kamrai szívműködésében rövid ideig tartó koffein-alkalmazással a $[Ca^{2+}]_i$ átmeneti emelkedését észleltük. A hirtelen emelkedő $[Ca^{2+}]_i$ diasztolé alatt tranzienst depolarizációt váltott ki, míg szisztolé alatt az akciós potenciál időtartamának csökkenését hozta létre.
6. Feszültség-clamp vizsgálatok alapján a gyorsult repolarizáció, részben az L-típusú Ca^{2+} -áram csökkenésének, részben annak a tranzienst áramnak volt a következménye, amely a nyugalmi membránpotenciálon depolarizációt okozott.
7. Alacsony $[Ca^{2+}]_i$ akciós potenciál megnyúlást eredményezett, melyet az L-típusú Ca^{2+} -csatornák fokozott megnyílásával magyaráztunk.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Kovács László és Dr. Papp Zoltán áldozatos munkáját, akik témavezetôként minden támogatást megadtak munkám elvégzéséhez és hozzáértôen segítettek a Ph.D. tézisek alapjául szolgáló dolgozatok megszületését. A mellettük és velük együtt végzett munka során tanultam legtöbbet a tudományos véleményalkotás és problémafelvetés tekintetében. Nagy szeretettel gondolok dolgozataim társszerzôire: Debreceni Egyetem OEC Élettani Intézetébôl Dr. Rusznák Zoltánra, a Kölni Egyetem III. Belklinikájáról Dr. Dirk J. Beuckelmannra és Dr. Olaf Kösterre, valamint a Touri Egyetem Élettani Intézetébôl Dr. Jorge Argibayra és Dr. Nicola Peineaurára, akikkel színvonalas együttmûködésre volt lehetôségem.

Eddigi munkám során az Élettani Intézet minden egyes tagjával voltak már kollaborációs kapcsolataim. Ezek során mindenkitôl sikerült tanulnom és elsajátítanom olyan dolgokat, amelyeket a késôbbiekben sikerrel használtam fel. Külön szeretném megköszönni Őri Rózának segítségét, ami elsôsorban az általam nem igazán szívlelt oldatkészítésben nyilvánult meg.

Végezetül hálás köszönettel tartozom feleségemnek azért a türelemért és megértésért, mellyel körülvett és támogatott az elmúlt években.

9. Irodalomjegyzék

Bers, D.M. 2000. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* **87**, 275-281.

Bers, D.M. 2001. Excitation and contraction coupling and cardiac contractile force. 2nd edition. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press

Beuckelmann, D.J. and Erdmann, E. 1992. Ca^{2+} -currents and intracellular $[Ca^{2+}]_i$ -transients in single ventricular myocytes isolated from terminally failing human myocardium. *Basic Res Cardiol* **87 Suppl 1**, 235-243.

Beuckelmann, D.J. and Wier, W.G. 1988. Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J Physiol* **405**, 233-255.

Beuckelmann, D.J., Nabauer, M., and Erdman, E. 1992. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* **86**, 1044-1045.

Blatz, A.L. and Magleby, K.L. 1986. Single apamin-blocked Ca-activated K^+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* **323**, 718-720.

Bustamante, J.O., Watanabe, T., Murphy, D.A. and McDonald, T.F. 1982. Isolation of single atrial and ventricular cells from the human heart. *Can Med Assoc J* **126**, 791-793.

Callewaert, G. 1992. Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac muscle. *Cardiovasc Res* **26**, 923-932.

Callewaert, G., Cleemann, L. and Morad, M. 1989. Caffeine-induced Ca^{2+} release activates Ca^{2+} extrusion via Na^+-Ca^{2+} exchanger in cardiac myocytes. *Am J Physiol* **257**, C147-C152.

Callewaert, G., Vereecke, J. & Carmeliet, E. 1986. Existence of a calcium-dependent potassium channel in the membrane of cow cardiac Purkinje cells. *Pflügers Arch* **406**, 424-426.

Cannell, M.B. and Lederer, W.J. 1986. The arrhythmogenic current I_{Ti} in the absence of electrogenic sodium-calcium exchange in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* **374**, 201-219.

De Clerck, N.M. 1991. Increased force levels after shortening and restretching skinned cardiac muscle. *J Muscl Res Cell Motil* **12**, 192-200.

Ehara, T., Noma, A. and Ono, K. 1988. Calcium-activated non-selective cation channel in ventricular cells isolated from adult guinea-pig hearts. *J Physiol* **404**, 117-133.

Fabiato, A. 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **245**, C1-C14.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260** 3440-3450

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakman, B. and Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Plügers Arch* **391**, 85-100.

Hilgemann, D.W. 1990. 'Best estimates' of physiological sodium-calcium exchange function: Calcium conservation and the cardiac electrical cycle. In: D.P. Zippes and J. Jalife (eds) *Cardiac Electrophysiology: from Cell to Beside*, pp. 51-61, Saunders Co., Philadelphia

Hobai, I.A., Bates, J.A., Howarth, F.C. and Levi, A.J. 1997. Inhibition of external Cd^{2+} of Na/Ca exchange and l-type Ca channel in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* **272**, H2164-H2172.

Hoth, M. and Penner, R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**, 353-355.

Jorgensen, A.O., Broderick, R., Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. 1988. Two structural distinct calcium storage sites in rat cardiac sarcoplasmic reticulum: an electron microprobe analysis study. *Circ Res* **63**, 1060-1069.

- Kass, R.S., Lederer, W.J., Tsien, R.W. and Weingart, R. 1978a. Role of calcium ions in transient inward currents and after contractions induced by strophantidin in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* **67**, 187-208.
- Kass, R.S. and Tsien, R.W. 1976. Control of action potential duration by calcium ions in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* **67**, 599-617.
- Kass, R.S., Tsien, R.W. Weingart, R. 1978b. Ionic basis of transient inward current induced by strophantidin in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* **281**, 209-226.
- Kawano, S., Hirayama, Y. and Hiraoka, M. 1995. Activation mechanism of Ca^{2+} -sensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* **486**, 593-604.
- Kim, Y-K., Kim, S-J, Kramer, CM., Yatani, A., Takagi, G., Mankad, S., Deepak, S., **Szigeti, G.P.**, Bishop, S.P., Vatner, D.E. and Vatner, S.F. 2001. Altered of excitation-contraction coupling in myocytes after chronic myocardial infarction; potential mechanism for hibernating myocardium. *Circulation Res* submitted.
- Kimura, J., Noma, A. and Irisawa, H. 1986. Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature* **319**, 596-597.
- Laflamme, M.A. and Becker, P.L. 1996. Ca^{2+} -induced current oscillations in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* **78**, 707-716.
- Lederer, W.J., Niggli, E. and Hardley, R.W. 1990. Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science* **248**, 283.
- Levesque, P.C., Leblanc, N. and Hume, J.R. 1994. Release of calcium from guinea pig cardiac sarcoplasmic reticulum induced by sodium-calcium exchange. *Cardiovasc Res* **28**, 370-378.
- Levy, M.N. 1989. Role of calcium in arrhythmogenesis. *Circulation* **80**, IV23-IV30.

- Lipp, P. and Niggli, E. 1994. Modulation of Ca^{2+} release in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res* **74**, 979-990.
- Lipp, P., Pott, L., Callewaert, G. and Carmeliet, E. 1992. Simultaneous recordings of Indo-1 fluorescence and Na^+/Ca^{2+} exchange current reveals two components of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of cardiac atrial myocytes. *FEBS Letters* **275**, 181-184.
- Luo, C.H. and Rudy, Y. 1994. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res* **74**, 1071-1096.
- Mechmann, S. and Pott, L. 1986. Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature* **319**, 597-599.
- Neher, E. 1992. Correction for liquid junction potentials in patch-clamp experiments. In: B. Rudy and L.E. Iverson (eds) *Methods in Enzymology*, Vol.207, *Ion Channels*, pp. 123-131. Academic press, London.
- Noble, D., Noble, S.J., Bett, G.C.L., Earm, Y.E., Ho, W.K. and So, I.K. 1991. The role of sodium-calcium exchange during the cardiac action potential. *Ann NY Acad Sci* **639**, 334-353.
- Papp, Z., Sipido, K.R., Callewaert, G. and Carmeliet, E. 1995. Two components of $[Ca^{2+}]_i$ -activated Cl^- current during large $[Ca^{2+}]_i$ transients in single rabbit heart Purkinje cells. *J Physiol* **483**, 319-330.
- Pogwizd, S.M., Qi, M., Yuan, W., Samarel, A.M. and Bers, D.M. 1999. Upregulation of Na^+/Ca^{2+} exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res* **85**, 1009-1019.
- Pogwizd, S.M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. and Bers, D.M. 2001. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure. Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual B-adrenergic responsiveness. *Circ Res* **88**, 1159-1167.

Romey, G. and Lazdunski, M. 1984. The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca^{2+} -dependent K^+ channels with different pharmacological properties and different physiological functions. *Biochem Biophys Res Commun* **118**, 669-674.

Sheu, S.S., Blaustein, M.P. 1992. Sodium/Calcium exchange and control of cell calcium and contractility in cardiac and vascular smooth muscles. In H.A. Fozzard *et al.* *The Heart and Cardiovascular System*, 2nd edn, pp. 903-943. Raven Press, New York

Sipido, K.R., Callewaert, G. and Carmeliet, E. 1993. $[Ca^{2+}]_i$ transients and $[Ca^{2+}]_i$ -dependent chloride current in single Purkinje cells from rabbit heart. *J Physiol* **468**, 641-667

Sipido, K.R., Callewaert, G. and Carmeliet, E. 1995. Inhibition and rapid recovery of Ca^{2+} current during Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* **76**, 102-109.

Sipido, K.R. and Wier, W.G. 1991. Flux of Ca^{2+} across the sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells during excitation-contraction coupling. *J Physiol* **435**, 605-630.

Sommer, J.R. and Jennings, R.B. 1992. Ultrastructure of cardiac muscle. In *The Heart and Cardiovascular System*, eds. Fozzard, H.A. *et al.* pp. 3-50. Raven Press, New York.

Szigligeti, P., Bányász, T., Magyar, J., Szigeti, G.P., Papp, Z., Varró, A. and Nánási, PP. 1998. Intracellular calcium and electrical restitution in mammalian cardiac cells. *Acta Physiol Scand* **163**, 139-147.

Zahradnik, I. and Palade, P. 1993. Multiple effects of caffeine on calcium current in rat ventricular myocytes. *Pflüger Arch* **424**, 129-136.

Zygmunt, A.C. 1994. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *Am J Physiol* **267**, H1984-H1995.

Dr. Szigeti Gyula Péter: $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok szerepe az arritmiák kialakításában (Ph.D. Tézisek, 2001)

Zygmunt, A.C. and Gibbons, W.R. 1991. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* **68**, 424-437.

Zygmunt, A.C. And Gibbons, W.R. 1992. Properties of the calcium-activated chloride current in heart. *J Gen Physiol* **99**, 391-414.

10. Publikációk

A tézisek alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

Szigeti, G.P., Rusznák, Z., Kovács, L. and Papp, Z. 1998. Chloride ions are the dominant charge carriers of the transient inward current (I_{TI}) in rabbit myocytes. *Exp Physiol* **83**, 137-153. **IF: 1.170**

Köster, O.F., Szigeti, G.P. and Beuckelmann, D.J. 1999. Characterization of a $[Ca^{2+}]_i$ -dependent current in human atrial and ventricular cardiomyocytes in the absence of Na^+ and K^+ . *Cardiovasc Res* **41**, 175-187. **IF: 3.092**

Papp, Z., Peineau, N., Szigeti, G.P., Argibay, J. and Kovács, L. 1999. Caffeine-dependent modulation of the plateau phase of action potentials in isolated ventricular cells of rabbit. *Acta Physiol Scand* **167**, 119-129. **IF: 1.411**

A tézisek alapjául szolgáló citálható absztraktok:

Papp, Z., Szigeti, G.P., Rusznák, Z. and Kovács, L. 1996. Chloride ions are the dominant charge carriers of the transient inward current (I_{TI}) in rabbit myocytes. *JMCC* **28**, A165.

Szigeti, G.P., Papp, Z., Beuckelmann, DJ. and Kovács, L. 1996. Caffeine-induced ionic currents in isolated atrial cells of human and rabbit heart. *New Series Physiology/Fiziologia* **6**, CV72.

Peineau, N., Papp, Z., Kovács, L., Argibay, J. and Szigeti, G.P. 1997. Caffeine-induced alteration in action potential configuration of isolated rabbit ventricular myocytes. *JMCC* **29**, A112.

A tézisek alapjául nem szolgáló *in extenso* közlemények:

Szigligeti, P., Bányász, T., Magyar, J., **Szigeti, G.P.**, Papp, Z., Varró, A. and Nánási, PP. 1998. Intracellular calcium and electrical restitution in mammalian cardiac cells. *Acta Physiol Scand* **163**, 139-147. **IF: 1.411**

Kristóf, E., **Szigeti G.P.**, Papp, Z., Bódi, A., Facskó, A., Papp, J.G., Kranias, E., Édes, I. and Kovács, L. 1998. Cardiac responses to calcium sensitizers: effects on left ventricular function, Cyclic AMP levels, protein phosphorylation and myoplasmic calcium concentration. *Ann NY Acad Sci* **853**, 316-9. **IF: 0.964**

Kristóf, E., **Szigeti, G.P.**, Papp, Z., Bódi, A., Ball, A.N., Édes, I. and Walsh, R.A. 1999. The effect of levosimendan on the left ventricular function and protein phosphorylation in postischaemic guinea pig hearts. *Basic Res Cardiol* **94**, 223-230. **IF: 1.148**

Nánási, P.P., Sárközi, S., **Szigeti, G.P.**, Jóna, I., Szegedi, Cs., Szabó, A., Bányász, T., Magyar, J., Szigligeti, P., Körtvély, A., Csernoch, L., Kovács, L. and Jednákovits, A. 2000. Biphasic effect of bimoelomol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. *Br J Pharmacol* **129**, 1405-12. **IF: 3.722**

Szigeti, G.P., Bányász, T., Magyar, J., Körtvély, A., Szigligeti, P., Kovács, L., Jednákovits, A. and Nánási, P.P. 2000. Effects of Bimoelomol, the novel heat shock protein coinducer, in dog ventricular myocardium. *Life Sci* **67**, 73-79. **IF: 1.774**

Körtvély, A., **Szigeti, G.P.**, Gesztelyi, R., Bányász, T., Magyar, J., Szigligeti, P., Kovács, L., Jednákovits A., Szentmiklósi J.A. and Nánási P.P. 2000. Cardiovascular effects of BRX-005: Comparision to Bimoelomol. *Life Sci* **67**, 1783-1789. **IF: 1.774**

Clemens, B., **Szigeti, G.P.**, Barta, Z. 2000. Frequency profile of EEG background activity in idiopathic generalised epilepsy. *Epilepsy Res* **42**, 105-115. **IF: 2.193**

Nánási, P.P., Sárközi, S., **Szigeti, G.P.**, Jóna, I., Szegedi, Cs., Papp, Z., Bányász, T., Magyar, J., Szigligeti, P., Körtvély, A., Csernoch, L., and Kovács, L. 2001. Different effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in canine ventricular cells. *N-S Arch Pharmacol* **363**, 383-390.

IF: 2.414

A tézisek alapjául nem szolgáló citálható absztraktok:

Papp, Z., Ball, N.A., **Szigeti, G.P.**, Bódi, A., Kristóf, É., Kovács, L., Walsh, R.A. and Édes, I. 1997. Effects of Levosimendan on stunned myocardium. *Cardiol Hung* **26 Suppl 2**, 48.

Yatani, A., **Szigeti, G.P.**, Ligett, S. and Dorn, G.W. 1999. Cardiac-specific overexpression of beta2-adrenergic receptors is associated with decreased Ca^{2+} -current density and increased myocyte size. *Biophysical J* **76**, A369.

Szell, E.A., Somogyi, G.T., de Groat, W.C. and **Szigeti, G.P.** 2000. Developmental changes in smooth muscle spontaneous activity in the neonatal rat urinary bladder. *Biophysical J*

Szigeti, G.P., Asai, K., Kim, S-J., Vatner, S.F., Rasmusson, R.L. and Yatani, A. 2000. Transgenic mice over-expressing cardiac $G_{s\alpha}$ -develop QT prolongation and decreased transient outward K^+ currents with slowed inactivation. *Biophysical J*

Nanasi, P.P., Jóna, I., **Szigeti, G.P.** and Jednakovits, A. 2000. Biphasic effect of bimoelomol, a new heat shock protein coinducer, on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. *European Heart Journal* **21**, P2309.

Könyvfejezetek:

Szigeti Gy.: A szívizomsejteken kiváltott akciós potenciálok számítógépes szimulációja. Számítógépes szimuláció. Útmutató az élettani gyakorlatokhoz, 19-23. Szerk.: Cseri Julianna. Debreceni Orvostudományi Egyetem, Élettani Intézet (1992)

Dr. Szigeti Gyula Péter: *[Ca²⁺]-függő ionáramok szerepe az arritmiák kialakításában* (Ph.D. Tézisek, 2001)

Szigeti Gy.: A pH szabályozás. Számítógépes program. Útmutató az élettani gyakorlatokhoz, 29-33. Szerk.: Cseri Julianna. Debreceni Orvostudományi Egyetem, Élettani Intézet (1992)

Szigeti Gy.: A voltage clamp technika. Az ionáramok matematikai analízise. Sejtélettani jegyzet biológus hallgatóknak, 43-55. Szerk.: Cseri Julianna. Debreceni Orvostudományi Egyetem, Élettani Intézet (1997)

11. Dr. Szigeti Gyula Péter tudományos önéletrajza

1969. március 7-én születtem Debrecenben. Egyetemi tanulmányaimat Debrecenben, az Orvostudományi Egyetemen végeztem, 1987-től 1993-ig. Általános orvosi diplomámat 1993-ban szereztem meg. Végzésem óta dolgozom a Debreceni Orvostudományi Egyetem Élettani Intézetében, kezdetben PhD ösztöndíjas hallgatóként majd 1995. július 1-től egyetemi gyakornoki beosztásban. A tudományos munka mellett a gyógyítómunkából is kivettem a részemet. 1994 és 1997 között Hajdúszoboszlón, illetve Pocsajban voltam ügyeletes orvos.

Már medikus korom óta folyamatosan tartok szemináriumokat és gyakorlatokat orvostanhallgatóknak magyar, illetve angol nyelven. Részt vállalok a tudományos diákkörös hallgatók képzésében. Irányítással 7 elfogadott pálya- és diplomamunka készült, hallgatóim több helyi és országos TDK kongresszuson értek el jó eredményeket előadásaikkal.

Kutatási tevékenységemet mind tudományos diákkörös hallgatóként, mind oktatóként az elektrofiziológiai munkacsoport tagjaként végeztem. Kezdetől fogva a szívizom elektrofiziológiai sajátágaival és az intracelluláris kalcium háztartásával, valamint ezeknek a szívritmuszavarok kialakításában betöltött szerepével foglalkozom. 1995-ben három hónapos tanulmányutat tettem a Kölni Egyetemen III. Belgyógyászati Klinikájának kísérletes laboratóriumában, ahol ugyancsak szívelektrofiziológiai kísérleteket végeztem humán szívizomsejteken Dr. Dirk J. Beuckelmann irányításával. 1997-től kezdődően Dr. Clemens Bélával a Debreceni Kenézy Kórház Epilepszia Centrumának vezetőjével kollaborálva az epilepsziás betegek rohamelőjelzését szolgáló matematikai módszerek adaptálásában vettem részt. 1998. augusztus 1-től két éves tanulmányutat tettem az Egyesült Államokban. Tanulmányutam során további korszerű módszereket elsajátítva folytattam a szívizomzat működésének megismerését célzó kutatómunkámat. Az amerikai tanulmányutam első három hónapját a Cincinnati Egyetem Gyógyszertani és Sejtbiológiai Intézetében töltöttem. Dr. Atsuko Yatani irányításával a humán hypertrophias szívbetegségeket modellező egértörzsek ioncsatornáinak tanulmányozásával. A továbbiakban Dr. Stephen Vatner csoportjába kerülve az Allegheny General Hospital Kardiovaszkuláris kutatórészlegében, majd a Pennsylvania Állami Egyetemen Dr. Atsuko Yatani és Dr. Randall Rasmusson vezetésével, különböző nagytestű állatok szívizomsejtjein található ioncsatornák működésének modulációját vizsgáltam sebészeti úton előállított szívbetegség-modellek esetén. Mindezeket túl a kísérletes eredményekre épülő az egészséges és beteg szívizomsejtek elektromos tevékenységét leíró matematikai modell kidolgozásában vettem részt. A tanulmányutam idején kollaborációs

Dr. Szigeti Gyula Péter: *[Ca²⁺]-függő ionáramok szerepe az aritmiák kialakításában* (Ph.D. Tézisek, 2001)

kapcsolatot alakítottam ki Dr. William de Groat munkacsoportjával a Pittsburgh-i Egyetem Gyógyszertani Intézetéből, akikkel az újszülött patkányok húgyhólyagjának működését vizsgáltam nemlineáris matematikai módszerek felhasználásával.

1995-től tagja vagyok a Cardiovascular Research bírálóinak, míg 1999-től a Biophysical Society-nek. 1997-től a nemlineáris módszerek orvosi alkalmazását elősegítő NMTD alapító tagja vagyok. Eddigi pályafutásom alatt 11 dolgozatom jelent meg, és további 6 van közlésre beküldve. A megjelent, illetve elfogadott kéziratok kumulatív impakt faktora: 21.073. Az eddigi tudományos tevékenységem alatt 38 tudományos előadást tartottam és 8 citálható absztraktom jelent meg.

Gyula P. Szigeti, M.D.: *Role of [Ca²⁺]_i-dependent currents in cardiac arrhythmogenesis*

Tutors: Prof. László Kovács, M.D. and Zoltán Papp, M.D.

Single atrial, ventricular and Purkinje cells, isolated enzymatically from either rabbit or human heart, have been studied under whole-cell voltage-clamp and were internally perfused with the fluorescent Ca²⁺ indicator, fura-2. Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum was induced by external application of caffeine. Membrane currents of cardiomyocytes from rabbit heart accompanying Ca²⁺ transients showed linear current-voltage characteristics. When Cl⁻ concentrations were kept symmetrical in the absence of the Na⁺-Ca²⁺ exchange mechanism, transient currents had a reversal potential close to 0 mV. Reduction of external Cl⁻ concentration shifted this reversal potential towards the new Cl⁻ equilibrium potential. This current was blocked by the application of the Cl⁻ channel blocker, anthracene-9-carboxylic acid (0.5 mM). It is concluded, that [Ca²⁺]_i-activated transient membrane currents in atrial, ventricular and Purkinje cells of rabbit heart are mainly due to the activation of a [Ca²⁺]_i-dependent Cl⁻ current. In human atrial myocytes, caffeine also induced a transient membrane current in the absence of Na⁺ and K⁺. Cl⁻ did not contribute to this current. Experiments with different cations suggested non-selectivity for Cs⁺ and Li⁺. Voltage ramps indicated a linear current-voltage relation. In human ventricular cardiomyocytes, caffeine failed to induce transient currents. In human atrial cardiomyocytes, a [Ca²⁺]_i-dependent nonspecific cation channel is expressed and may contribute to triggered arrhythmias in situations of [Ca²⁺]_i-overload. In ventricular cells, neither a [Ca²⁺]_i-dependent nonspecific cation channel nor a [Ca²⁺]_i-dependent chloride channel seems to be expressed.

Effects of single, brief application of caffeine (10 mM) on action potential train were demonstrated on rabbit ventricular cells. Caffeine (during AP9) first enhanced and thereafter attenuated the [Ca²⁺]_i transients accompanying AP9 and AP10-AP12, respectively. This approach provided direct comparison between time courses of action potentials: during the initial steady state (e.g. AP8) and when Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum was increased by caffeine (AP9) or decreased by depletion (AP10). The increase in [Ca²⁺]_i facilitated repolarization and decreased action potential duration. However, action potentials at reduced Ca²⁺ release (AP10) had longer duration than during steady state. The caffeine-induced changes in L-type Ca²⁺ current (I_{Ca,L}), during voltage-clamp conditions partially explained the effects of caffeine on action potentials. When I_{Ca,L} was blocked by 500 μM Cd²⁺, enhanced [Ca²⁺]_i transients revealed an extra current component which was outward at +10 mV and inward at the resting membrane potential (most probably the transient inward current). In the presence of Cd²⁺, however, AP8 and AP10 had identical time courses, suggesting that I_{Ca,L} alone was responsible for the lengthening of AP10. Alterations in the transmembrane Na⁺ gradient resulted in changes of the steady state action potential durations (AP8) consistently with the expected modulation of the Na⁺-Ca²⁺ exchange current. However, the contribution of this current to the [Ca²⁺]_i-dependent behaviour of action potential plateau could not be demonstrated.