

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

[Ca²⁺]_i-függô ionáramok szerepe az aritmiák kialakításában

Dr. Szigeti Gyula Péter

Programvezetô: Dr. Kovács László

Témavezetôk: Dr. Kovács László és Dr. Papp Zoltán

Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Élettani Intézet
Debrecen, 2001

Bevezetés, nemzetközi előzmények

A ritmikus szív működést 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. Az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése elsősorban a kalcium raktárakból (szarkoplazmatikus retikulum, SR) történő felszabadulás eredménye, 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. 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. Az energiaigényes ciklus akkor zárul le, amikor a Ca^{2+} szint az összehúzódás előtti nyugalmi értékre tér vissza. Az $[Ca^{2+}]_i$ csökkentésében kiemelkedő szereppel bír az SR-be történő aktív visszavétel, 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.

A Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmuson kívül az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése más membránáramok megjelenését is eredményezheti. Különböző szívizom preparátumokon ismertté vált egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő nemspecifikus kation áram, egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő kálium áram, és egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő klorid áram is. Élettani körülményeink között ezek az ionszatórnák elvileg hozzájárulhatnak az AP kialakulásához. Ugyanezen áramok a sejtek Ca^{2+} -túltöltöttsége esetén ritmuszavarokat is létrehozhatnak. Ez akkor következik be, amikor a szívizomsejtek oxidatív anyagcseréje elégtelenné válik és az energiaigényes folyamatok zavart szenvednek (pl. ischaemiás szívbetegségek, ischaemiás-reperfúziós

anyagcserezavarok, szívelégtelenség). Ilyenkor a raktárból a Ca^{2+} spontán felszabadul és a sejten belüli nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megemelkedik. Ez a Ca^{2+} -felszabadulás a nyugalmi membránpotenciállal rendelkező sejtben depolarizáló áramokat (inward áramokat) hoz létre, melyek sinus-inger hiányában is kiválthatják a károsodott szívizomsejt és környezete ingerületét. Ilyen tranziens inward áramok (I_{TI}) jól ismertek a spontán kialakuló, sejten belüli $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inhomogén felszabadulása kapcsán, igazolva a Ca^{2+} -anyagcsere sérülésének jelentőségét a ritmuszavarok keletkezésében. Kevés ismeret áll ugyanakkor rendelkezésre ezen I_{TI} relatív összetételére és azok sejtszintű szabályozására vonatkozólag. A szívizomsejtek intracelluláris és az intersticiális tér ionösszetételét figyelembe véve a nyugalmi membránpotenciálon a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő klorid áram, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő nonspecifikus kation áram és a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus eredményezhet depolarizáló áramokat, míg a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő kálium áram inward áramot nem generál. Jelen munkánkban az inward áramot létrehozó csatornaműködések vizsgálatának kiemelt figyelmet szenteltünk.

A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő klorid áramot nyúl pitvari és kamrai sejtjeiben, mint tranziens hyperpolarizáló (outward) áramot ismerték fel, depolarizáló feszültséglépcsők alkalmazása kapcsán. Ezen klorid (Cl^-) áram és a sejten belüli Ca^{2+} -tranziens kapcsolatát nyúlból izolált Purkinje-sejteken írták le először. 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő Cl^- -áram azonosítását eredményezte. 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 pulzusok alatt, addig a lassú komponens eredete ismeretlen. Lehetséges, hogy ez a lassú áram egy Ca^{2+} -ra eltérő

affinitással rendelkező csatorna megnyílásának az eredménye. Azonban az is elképzelhető, hogy csak egyféle Cl^- -csatorna található a Purkinje-sejtek membránjában és a kétfázisú áramkinetika a sejtmembrán alatti lokális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t tükrözi. Ez utóbbi nézetet támogatja az a tény, hogy a Purkinje-sejtek sajátos morfológiája jelentős $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő Cl^- -áramot nyúl pitvari, kamrai sejtjein még nem mutattak ki. Ugyanezen sejteken mindeddig csak depolarizációval váltottak ki Ca^{2+} -tranzienseket, amelyek Purkinje sejteken is elégtelenek a lassú áramkomponens aktiválására. Az utóbbi időben egyre több nagytestű állat ventrikuláris sejtjein demonstrálták a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő klorid áram jelenlétét (kutya, birka, disznó, vadászgörey), azonban eddig még senki nem próbálta meg ezen áramtípust humán szívizomsejtekben kimutatni.

A nyúl Purkinje-sejteken megismert $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő Cl^- -áramokhoz hasonlóan tengeri malac pitvari sejtjein a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus által létrehozott membránáram is két komponenst mutatott. A Na^+ - Ca^{2+} csere jelenlétét nyulak izolált szívizomsejtjein szintén demonstrálták, azonban $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő analízisre mindeddig nem került sor. Az sem ismert, hogy a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus milyen mértékben járul hozzá azon membránáramokhoz, amelyek a sejten belüli Ca^{2+} -overload kapcsán alakulnak ki.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő ionáramok kialakulása nem csak a nyugalmi membránpotenciál, hanem az AP lefutás modulációja révén is kelthet ritmuszavarokat. A sejten belüli térben kórosan megemelkedő $[\text{Ca}^{2+}]_i$, valamint a spontán kialakuló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 sejtszintű megismeréséhez.

Izolált szívizomsejtek elektrofiziológiai vizsgálata segítséget nyújthat az ingerületi folyamatokat kialakító ionáramok Ca^{2+} -függésének tanulmányozásához. A sejtmembrán potenciálváltozásai és ionáramai elektromos úton mérhetők, a $[Ca^{2+}]_i$ változásai optikai úton követhetők. Az elektromosan ingerelt szívizomsejtek az ingerlések alatt AP-t generálnak, a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedik: a sejtek összehúzódnak. A diastolés periódus alatt a $[Ca^{2+}]_i$ alacsony, a sejtek relaxált állapotban vannak. Kóros körülmények között a $[Ca^{2+}]_i$ szabályozatlanná válik, elsősorban emelkedik. Az ischaemiás viszonyok közötti emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ modellezésére rövid ideig tartó koffein alkalmazásokkal (koffein-pulzus) nyílik lehetőség, amely az SR-ből az elektromos ingerléstől függetlenül bármikor Ca^{2+} -felszabadulást idéz elő. Mivel a koffein igen erősen 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 következményes ingerületi folyamat-változások a $[Ca^{2+}]_i$ -függő folyamatok tanulmányozására megfelelő lehetőséget biztosítanak.

Célkitűzések

1. Azonos működésűek-e a koffeinnel kiváltott, $[Ca^{2+}]_i$ -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 befolyásolhatóságát nyúl pitvari és kamrai szívizomsejteken is.

2. 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 ilyen ionáram kimutatása, karakterizálása, valamint a nyúl szívizomsejteken megismert áramokkal történő összevetése volt

3. 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?

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

Eszközök, módszerek

Nyúl szívizomsejtek izolálása

Izolált pitvari, kamrai és Purkinje sejteket 1,3-1,8 kg testtömegű új-zélandi fehér nyulakból enzimatis módszer alkalmazásával nyertünk. 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 ($3^\circ C$) 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 ($37^\circ C$). Ezután a szív működést leállítottuk Ca^{2+} mentes Tyrode-oldattal, majd

kollagenázt és proteázt tartalmazó Ca^{2+} mentes Tyrode-oldattal 10-15 percig perfundáltunk. Ezt követően a szíveket a Langendorff-rendszerről eltávolítottuk, és a kamrákat felnyitottuk. Az így kiterített szívből kipreparáltuk a Purkinje-sejtek által létrehozott hálózatot, a bal kamra papilláris izomzatát, valamint a pitvarokat. A szövetdarabok emésztését az enzim tartalmú Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatban szobahőmérsékleten mindaddig folytattuk amíg izolált sejteket nem kaptunk. 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.

Humán pitvari szívizomsejtek izolálása

A jobb pitvari szövetminták 46 olyan betegből származtak, akik nyitott szívű műtéten estek keresztül. Ezeknél a műtételnél a jobb pitvar egy kicsiny darabja rutinszerűen eltávolításra került.

A kimetszett izomdarabkák a hozzávetőleg 4 °C-os kardioplégias oldatban tárolva jutottak át a műtöből a kísérleti laboratóriumba. A myocardium darabkákat ollóval apró darabokra vágtuk, majd azokat 37 °C-s 10 ml-nyi Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatba helyeztük. Ezután a szövetdarabokat folyamatos mechanikus agitációnak tettük ki, és a folyadékokat tiszta O_2 -nel állandóan buborékolattuk. A mintákat először vértől mentesítettük, majd enzim tartalmazó (Worthington-kollagenáz és proteáz) Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatot alkalmaztunk. 30 perc elteltével a részlegesen emésztett izmot 1 percen keresztül 500 g-vel centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk, ezután a centrifugálást Ca mentes Tyrode oldat újbóli hozzáadása után megismételtük. A felülúszó újbóli eltávolítása után az izmot tartalmazó részt Worthington-kollagenázt tartalmazó Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatba helyeztük. A szövetdarab emésztődésétől függően 10-20 perc elteltével a sejtszuspenziót az előzőekben ismertetett kétlépéses centrifugálásnak tettük ki. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 20-22 °C-on nominálisan Ca^{2+} mentes Tyrode-oldatban tároltuk a kísérletek megkezdéséig, amikor a mérőedénybe áthelyezett sejtek körül 2 mM Ca^{2+} tartalmazó Tyrode-oldatot alkalmaztunk. A méréseket azokon a sejteken végeztük, amelyek 2 mM Ca^{2+} jelenlétében spontán kontrakciókat, kontraktúrát nem mutattak,

tipikus alakúak voltak, valamint a sejtfelszíni membránjuk mentes volt mindenféle kidomborodástól.

Humán kamrai szívműködési sejtek izolálása

A humán bal kamrai myocardiumból származó sejteket 22 páciens szívéből izoláltuk. A páciensek közül 17-en a szívelégtelenség végső stádiumában kerültek szívtranszplantációra és a műtét alatt eltávolított beteg szíveket használtuk fel kísérleteinkben. További 5 szív olyan egészséges donor szív volt, amelyek különböző technikai okok miatt nem kerülhettek szívtranszplantációra.

Az eltávolított szíveket 4 °C-os kardioplégias oldatba helyeztük és a laboratóriumba szállítottuk. A sejtizolációhoz szegmentperfúziós eljárást alkalmaztunk. 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 buborékolgatott Ca²⁺ mentes módosított Tyrode-oldatot perfundáltunk a vér és a Ca²⁺ eltávolítása végett. A kimosást követően a szíveket 40 percen keresztül Worthington-kollagenázt és proteázt tartalmazó nominálisan Ca²⁺ mentes Tyrode oldattal emesztettük. Ezt követően a szövetmintákat 15 percen át mostuk az enzimeket és 200 μM Ca²⁺ tartalmazó módosított Tyrode-oldattal. A kimosás után a sejteket a midmyocardiális régióból metsztük ki és nylon szűrőn történő filtrálás után a sejteket 200 μM Ca²⁺ tartalmazó Tyrode-oldatban tároltuk. Ezt követően a tároló oldat Ca²⁺ koncentrációját 15 percenként 0,5 mM-al emeltük a 2 mM-os Ca²⁺ koncentráció eléréséig. A sejtek szobahőmérsékleten tartva átlagosan 5 órán keresztül voltak használhatók elektrofiziológiai mérésekhez.

Ionáramok és akciós potenciálok mérése

Az izolált szívműködési sejtek ingerületi folyamatait teljes-sejt patch-clamp technikával szobahőmérsékleten tanulmányoztuk. A nyúl szívműködési sejteken történt kísérletekhez Axopatch-1D erősítőt használtunk. A mérésekhez használt mikropipetták elektromos ellenállása 1,2-3,4 MΩ 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 révén valósítottuk meg. Az

elektromos jelek mintavételezése 400 Hz-es gyakorisággal történt. A mért áramjeleket 2 kHz-es Bessel szűrővel filtereztük és nem korrigáltuk lineáris leak áramra. Az adatokat PC kompatibilis számítógépen tároltuk. A humán izomsejteken történt mérések hasonló technikával, de egy EPC 7 bázisú rendszeren voltak kivitelezve.

[Ca²⁺]_i-mérés

A kísérleti apparátus egy Nikon-Diaphot invertáló mikroszkóp köré épült. A mikroszkóp tárgyasztalára helyezett sejtek elektromos kontrollját és a sejten belüli Ca²⁺ koncentráció változások követését egyidejűleg valósítottuk meg. A Ca²⁺ koncentráció megítélését a mikroszkóp köré épített optikai rendszer segítette. Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció változásainak mérését fluoreszcens indikátorral (100 μM K₅Fura-2) oldottuk meg. Az izolált sejtbe a mikropipettán keresztül bejuttatott Fura-2 fluoreszcenciájának Ca²⁺-függő viselkedését 340 nm és 380 nm gerjesztési hullámhosszokon vizsgáltuk. Az excitációs hullámhosszokat egy Deltascan-1 készülék kettős monokromátor rendszere különítette el. 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 segítségével valósítottuk meg. Az optikai mintavétel frekvenciája 200-400 Hz volt. A humán izomsejteken történt mérések hasonló technikával, de egy Zeiss-Axiovert 35 bázisú rendszeren történtek.

Kísérleti protokollok

A kiválasztott sejtet a közvetlen környezetében elhelyezett (a sejttől mért távolság <100 mm) házilag készült perfúziós rendszerrel folyamatosan mostuk, amely a vegyszerek igen gyors cseréjét (kb. 500 ms alatt) is biztosította. A [Ca²⁺]_i-függő ionkonduktancia-változásokat 10 mM koffein gyors, pulzusszerű (időtartam 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. A sejtek membránpotenciálját

rendszerint -60 mV-os kiindulási értéken tartottuk. A $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok áram-feszültség karakterisztikáját és az áramok megfordulási potenciálját (E_{rev}) egyrészt 30 mV-os feszültséglépcsők segítségével, másrészt 200 ms hosszú ($0,7 \text{ Vs}^{-1}$) -60 mV-tól +80 mV-ig tartó folyamatosan emelkedő feszültséggel (feszültségrámpák) segítségével határoztuk meg.

A pipetták szájadékánál kialakuló junkciós potenciál értékét 7-10 mV-nak találtuk, amelynek az aktuális értéke attól függően változott, hogy az adott pillanatban milyen oldatkombinációt alkalmaztunk.

AP méréseinket az áram-rögzítés technika alkalmazásával hoztuk létre. Ilyenkor rövid ideig tartó (3 ms), 0,2 Hz-es áramimpulzusokkal 15 egymást követő akciós potenciált (AP_{1-15}) váltottunk ki. Az AP alakbeli stabilizálódását, és steady-state SR Ca^{2+} telítettség kialakulását (azonos Ca^{2+} -tranziensek) 3-5 ingerlést követően tapasztaltuk. Annak érdekében, hogy a diasztolés periódus alatti membránpotenciál, és a steady-state AP plató fázisának $[Ca^{2+}]_i$ -függő viselkedését tanulmányozhassuk a perfúziós rendszer segítségével koffein-pulzusokat alkalmaztunk. Amennyiben a plató $[Ca^{2+}]_i$ -függő viselkedésére voltunk kíváncsiak, úgy a koffein alkalmazására a kilencedik akciós potenciál (AP_9) felszálló szárát követően került sor. Ennek megfelelően AP_9 alatt szemmel láthatóan is erősebb kontrakció alakult ki, mint az azt megelőző (AP_8), és az azt követő ingerületi folyamat alatt (AP_{10}). Sőt, AP_{10} alatt a kontrakciók rendszerint teljesen hiányoztak. Ez arra utalt, hogy a koffein kezelést közvetlenül követő AP alatt az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak átmenetileg kiürültek. A nyolcadik akciós potenciált (AP_8) és az ahhoz tartozó Ca^{2+} -tranzienst kontrollnak tekintettük. A kilencedik akciós potenciál a magas amplitúdóval rendelkező Ca^{2+} -tranzienst tükrözte (AP_9), míg AP_{10} az intracelluláris Ca^{2+} -depléciónak hatásairól árulkodott. Azért, hogy az AP $[Ca^{2+}]_i$ -függő sajátságait jobban szemléltessük, az AP időtartamokat különböző repolarizációs feszültség (30, 50 és 90 %-os) szinteknél is meghatároztuk.

Az adatok kiértékelése

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

Eredmények

I_{TI} tanulmányozása nyúl pitvari, kamrai és Purkinje-sejteken; koffein alkalmazása az I_{TI} vizsgálatára

Kísérleteinkben először arra kerestünk választ, hogy nyulak pitvari és kamrai sejtjein is megtalálható-e a Purkinje-sejteken már korábbiakban demonstrált koffein aktivált áram. -60 mV-os kiindulási membránpotenciált alkalmazva, mind a pitvari, mind a kamrai miocitákon ki tudtuk mutatni a koffein pulzusszerű alkalmazását követően kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ -függő, a sejtek belsejébe irányuló (inward) ionáramot. Ezen kísérleteinkben a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus és a K^+ áramok zavaró hatásának kiküszöbölése végett a sejtek külső és belső terében Na^+ és K^+ mentes oldatokat használtunk. A koffein hatására kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramok és Ca^{2+} tranziensek jelentős variabilitást mutattak. A sejtek kapacitására vonatkoztatott 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+} tranziensek minden esetben megelőzték az áramaktivációt és rendszerint tovább is tartottak.

A koffeinnel kiváltott áram feszültségfüggése és a töltéshordozó megállapítása ionszubsztitúcióval nyúl szívműsejtjeiben

Továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy milyen töltéshordozó állhat a koffeinnel aktivált I_{TI} háttérében. Elvileg az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} (1) $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- -áramot, (2) $[Ca^{2+}]_i$ -aktivált nem specifikus kation áramot és (3) Na^+ - Ca^{2+} csereáramot generálhatott. Az általunk használt Na^+ és K^+ mentes oldatkombináció esetén azonban a lehetséges töltéshordozók száma kettőre csökkent. Mivel a Na^+ szubsztituenseként használt NMDG⁺ membrán-impermeábilis, így a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus I_{TI}-ban betöltött szerepét Na^+ mentes környezetben kizárhattuk. A K^+ szubsztituens Cs^+ lehetséges töltéshordozóként merült fel. Ezt az iont viszont kizárólag a pipetta oldat tartalmazta, így bármilyen membránpotenciált is alkalmaztunk, annak egy kifele irányuló áramot kellett volna létrehozni. A Cl^- töltéshordozó szerepének bizonyítására Cl^- szubsztitúciós kísérleteket

végeztünk először Na^+ mentes, majd Na^+ tartalmazó oldatokban. Na^+ mentes külső oldat esetén a külső és belső oldat Cl^- koncentrációjából számított megfordulási potenciál ($E_{\text{rev}(\text{Cl})}$) értéke kezdetben -1 mV volt. A feszültségrámpákkal meghatározott I_{TI} megfordulási potenciál értékek ($E_{\text{rev}(\text{IT})}$) 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, amik jó egyezést mutattak a számított $E_{\text{rev}(\text{Cl})}$ értékkel. Amikor a Na^+ mentes külső oldat Cl^- koncentrációját lecsökkentettük, akkor a számított $E_{\text{rev}(\text{Cl})}$ értéke $+42$ mV-ra változott. A kísérleteinkből meghatározott $E_{\text{rev}(\text{IT})}$ értékek 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 felveti a Cl^- lehetséges szerepét az I_{TI} kialakításában.

A továbbiakban a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus I_{TI} -ban betöltött lehetséges szerepét vizsgáltuk. Ennek érdekében Cl^- szubsztitúciós kísérleteinket normál Tyrode és alacsony Cl^- koncentrációjú Tyrode-oldatokban is megismételtük. A szimmetrikus Cl^- megoszlást biztosító normál Tyrode-oldatban a számított $E_{\text{rev}(\text{Cl})}$ -3 mV, míg alacsony Cl^- Tyrode-oldatban $+43$ mV volt. A feszültségrámpákkal meghatározott $E_{\text{rev}(\text{IT})}$ megfordulási potenciál értékek 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, akkor a kísérleteinkből meghatározott $E_{\text{rev}(\text{IT})}$ értékek 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 értékekben, sem szimmetrikus, sem pedig aszimmetrikus Cl^- megoszlások esetén nem tudtunk szignifikáns különbségeket 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+} ($5 \mu\text{M}$) jelenlétében is megismételtük. A kísérleteket három pitvari sejten elvégezve, nem találtunk statisztikailag kimutatható különbségeket sem az áramok lefutásában, sem azok megfordulási potenciáljában. A szubsztitúciós és a Ni^{2+} felhasználásával kapott eredmények ismeretében megállapítható, hogy a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus I_{TI} -ben betöltött szerepe a Cl^- áramokhoz képest csekély. Cl^-

szubsztitúciós kísérleteink arra utalnak, hogy nyúlban a koffeinnel kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ -függő I_{TI} fő 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-i különbség adódott az $E_{rev(Cl)}$ és a $E_{rev(ITI)}$ értékei 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-ra és Cl^- -ra 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.

A nyúl szívműködésében található I_{TI} áram töltéshordozójának megállapítása a csatorna farmakológiai gátlása alapján

Az ionszubsztitúciós kísérletek mellett különböző Cl^- csatorna gátlók hatását is vizsgáltuk a koffeinnel kiváltott I_{TI} -on. Elsőként a külsőleg alkalmazott 0,5 mM anthracén-9-karboxilát (9-AC) koffeinnel kiváltott membránáramra kifejtett hatását vizsgáltuk. A 9-AC jelentős mértékben gátolta a I_{TI} kifelé irányuló komponensét a pitvari sejteken. Ez a gátlás +80 mV-on a 90 %-ot is elérte, miközben sem a megfordulási potenciál értéke, sem pedig a befele irányuló áramkomponens nem változott. Hasonló hatásokat tudtunk kimutatni 4 kamrai és 1 Purkinje sejten is. Hat pitvari és 11 kamrai sejt esetén megvizsgáltuk a 9-AC hatását az intracelluláris oldal felől adagolva. Ilyenkor mind a kifelé, mind a befele irányuló áramkomponens nagymértékben csökkent, sőt összesen 10 sejt esetén egyáltalán nem tudtunk $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramot kimutatni. Az $I_{Cl(Ca)}$ működésének gátlására stilbén-származékokat is próbáltunk alkalmazni, hiszen ezekről is ismert, hogy gátolni képesek a $I_{Cl(Ca)}$ működését. Kísérleteinkben 2 mM SITS és 0,1 mM DIDS hatását vizsgáltuk, azonban számottevő gátlást nem sikerült kimutatnunk.

I_{TI} tanulmányozása humán pitvari sejteken

A humán sejteken végzett méréseink, a pitvari és kamrai izomsejtek könnyebb elérhetősége miatt, Dr. Dirk J. Beuckelmannal kollaborációban a Kölni Egyetem

Szívelektrofiziológiai Laboratóriumban készültek. A németországi mérôrendszer különbségei miatt a mérési protokoll módosítására volt szükség. Mivel az emésztést követôen a szívizomsejtekben lévô SR Ca^{2+} telítettsége igen variabilis volt, ezért 5 db -60 mV-ról +10 mV-ra történô depolarizáló pulzussorozattal (1 Hz) egy konstansnak tekinthetô SR Ca^{2+} telítettséget hoztunk létre. Az 5. depolarizáló lépcsô után tesztpulzusok segítségével meghatároztuk különbözô membránpotenciáloknál kialakuló membránáramokat koffein alkalmazása nélkül, illetve 10 mM koffein pulzusszerű alkalmazásakor. A különbségi áramokat koffein által aktivált áramként értelmeztük és ezeket ábráztuk a feszültség-áramerôsség diagrammokon.

A koffeinnel kiváltott áram feszültség-függése és a töltéshordozó megállapítása ionszubsztitúcióval humán pitvari sejteken

Kísérleteinket elôszôr közel szimmetrikus Cl^- megoszlást létrehozó oldatösszetételnél ($E_{\text{rev}(\text{Cl}^-)} = -1$ mV) végeztük el. Minden vizsgált membránpotenciálnál kifelé irányuló áramot tudtunk kimutatni. A Cl^- megfordulási potenciáljának megváltoztatása a külsô illetve a belsô oldat Cl^- koncentrációjának megváltoztatásával nem befolyásolta a koffein által kiváltott áram irányultságát ($E_{\text{rev}(\text{Cl}^-)} = +41$ mV, illetve $E_{\text{rev}(\text{Cl}^-)} = -46$ mV). Az így kiváltott áram megfordulási potenciálját nem sikerül meghatározni még -120 mV-os tesztpotenciál használatával sem. Az általunk alkalmazott oldatok esetén a csatorna lehetséges töltéshordozóinak száma ezáltal egyre csökkent. Ezekben a sejtekben csak a Cs^+ lehetett a töltéshordozó. Mivel ezt az iont kizárólag a pipetta oldat tartalmazta, így bármilyen membránpotenciált alkalmazunk, annak egy kifelé irányuló áramot kellett létrehoznia és ezáltal egy nonspecifikus áramaktivációról lehetett szó a koffein adagolását követôen. Továbbiakban ezt a hipotézisünket teszteltük. A nonspecifikus kation csatorna fiziológiás körülmények között Na^+ -ra és K^+ -ra mutat vezetôképességet, azonban ha ezek az ionok hiányoznak, akkor egyéb monovalens kationok (Li^+ és Cs^+) is képesek áthaladni az aktivált csatornán. Oldatainkban továbbra is mellôzve a Na^+ -t és K^+ -t, szimmetrikus Cs^+ megoszlást (N=7), illetve szimmetrikus Li^+ megoszlást (N=6) hoztunk létre. 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 aktiválódott. A csatorna (I_{CAN}) különbözô vezetôképességet mutatott

Li⁺-ra és Cs⁺-ra, mivel a -60 mV-os membránpotenciálokon a kapacitásra vonatkoztatott áramsűrűségek jelentősen különböztek egymástól (-1,13±0,26 pA/pF Li⁺ esetén, illetve -0,66±0,15 pA/pF Cs⁺ használatakor).

A nemspecifikus kation csatorna [Ca²⁺]_i-függése humán pitvari sejteken

A csatorna töltéshordozójának meghatározása után két további kérdésre kerestünk választ: Tényleg [Ca²⁺]_i-függő a koffein-által létrehozott áram? A lépcsős árammérési protokollok miatt alkalmazott többszörös koffeinkezelés minden esetben azonos Ca²⁺ tranzienseket hoz létre? Az első kérdés megválaszolásához a pipetta oldatba Ca²⁺ megkötő EGTA-t (10 mM) juttattunk, így az [Ca²⁺]_i emelkedés gátlásán keresztül, minden esetben (N=7) megakadályoztuk a koffeinnel aktiválható áram kialakulását. A továbbiakban a repetitív koffein adagolás hatására, különböző membránpotenciáloknál kialakuló Ca²⁺ tranzienseket vizsgáltuk. Bár kisebb eltérések találhatók az egyes tranziensek között, de lényegi különbségek nem voltak kimutathatók a 340, illetve a 380 nm-es hullámhosszúságnál mért Fura-2 jelekben. Az ismételten alkalmazott koffein azonos membránpotenciálok esetén sem befolyásolta számottevően a kialakult Ca²⁺ tranziens- és áramsajátságokat.

A humán pitvari sejteken kimutatható I_{CAN} farmakológiája

Az eddigiek során bemutatott kísérletes eredményeink bizonyítják, hogy humán pitvari sejteken egy [Ca²⁺]_i-függő nemspecifikus kation csatorna (I_{CAN}) működése mutatható ki. Ezt a csatornát, úgy tekintik, mint a legtöbb emlős sejten kimutatható [Ca²⁺]_i-függő K⁺-csatorna evolúciós módosulását. A [Ca²⁺]_i-függő K⁺-csatornának single-channel mérésekből meghatározott konduktancia-értékek alapján 2 altípusa ismert, amelyek farmakológiailag is különbözőek. 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 [Ca²⁺]_i-függő K⁺ csatorna működését látnánk a koffeinpulszusok alkalmával. Megnéztük, hogy az apamin gátolja-e a humán pitvari sejteken található I_{CAN} működését. 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés következtében aktiválódni és ez nem azonos a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő K^+ -árammal.

I_{TI} tanulmányozása humán kamrai sejteken Na^+ és K^+ mentes környezetben

Kísérleteinket humán kamrai sejteken is megismételtük 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konzekvensen megemelkedett.

Koffein-által aktivált áramok hatása az akciós potenciál lefutására nyúl kamrai izomsejteken; Az akciós potenciálok alakjának Ca^{2+} -indukált változásai

Az AP-okat rövid (3 ms), állandó frekvenciájú (0,2 Hz) küszöb feletti (1500 pA) depolarizáló áram impulzusokkal váltottuk ki. A kezdeti pulzusok hatására az SR-ben steady-state Ca^{2+} töltöttség alakult ki, amit közel hasonló lefutású AP formák követtek. A 9. AP 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. AP-ok alatt alacsonyabb amplitúdójú Ca^{2+} tranziensek voltak mérhetőek. A steady-state állapotnak megfelelő Ca^{2+} tranziens (és AP lefutás) csak később, a 14.-15. ingerlések alatt tért vissza. Az AP-ok lefutása az egyszeri koffein alkalmazás mellett jellegzetesen megváltozott. A steady-state AP lefutás a koffein alkalmazását megelőzően (AP₄-AP₈), és a koffein pulzust követő, sorrendben 14. és 15. AP-ok esetében érvényesült. Koffein közvetlen hatására (AP₉) a koffein által megemelt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gyorsította a repolarizációt, valamint deprimálta a platót (AP₉), azonban ezt követően meglepő módon nyújtotta az AP₁₀-t. Az AP időtartamok, mind a 9., mind a 10. akciós potenciálok eseteiben szignifikánsan különböztek a kontrolltól (N=20). A nagyobb amplitúdójú Ca^{2+} tranziens hatására bekövetkező gyorsult repolarizáció egyaránt lehet fokozott outward áramok, és csökkent inward áramok következménye, míg a csökkent Ca^{2+} felszabadulás alatt a plató megnyúlása az inward áramok dominanciájára utalt.

Az L-típusú Ca^{2+} -áram Ca^{2+} -függő modulációja

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy vajon a koffein adását követően megfigyelt közvetlen (AP_9) és kései változások (AP_{10}) korrelálnak-e az L-típusú Ca^{2+} -áram ($I_{Ca,L}$) valószínűsített eltéréseivel. Az $I_{Ca,L}$ -okat feszültség-rögzített körülmények között tanulmányoztuk. Az AP-ok vizsgálatához hasonlóan 15 egymást követő depolarizáló feszültségpulzust alkalmaztunk, melyek időtartama 800 ms, frekvenciája 0,2 Hz volt. Ezek a pulzusok tehát követték az áram-rögzített körülmények között mért AP-ok 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 különbségeként értelmeztünk az L-típusú Ca^{2+} -áram jellemzésére használtuk. A koffein alkalmazása és időzítése megegyezett az AP-nál leírtakkal.

Koffein hatására a 9. Ca^{2+} -áram a kontrollhoz képest nagymértékben csökkent, a 10. Ca^{2+} -áram viszont jelentősen fokozódott. A Ca^{2+} -tranziensek viselkedése kvalitatív szempontból megegyezett az AP tekintetében lelt sajátosságokkal. A következőkben arra kerestünk választ, hogy a $I_{Ca,L}$ áramon kívül más ionáramok szerepet kapnak-e még a plató fázis Ca^{2+} -függő modulálásában.

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

Korábbiakban demonstráltuk, hogy kísérleti körülményeink között az I_{T1} aktiválható. Mivel ez az áram nem csak diasztolé, hanem szisztolé alatt is kialakulhat ezért célunk az volt, hogy annak feltételezett hatásait az $I_{Ca,L}$ -étől izoláljuk. A különválasztás érdekében, olyan kísérleteket végeztünk, melyekben az $I_{Ca,L}$ -ot $0,5$ mM Cd^{2+} alkalmazásával blokkoltuk. A Ca^{2+} -áram gátlását feszültség-clamp körülmények között ellenőriztük. Ezt követően a koffein hatását feszültség- és áram-rögzített körülmények között egyaránt tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy a Ca^{2+} -áram gátlását követően a feszültség-lépcsőkkel előidézett áramok koffeinérzékenysége a korábbiakhoz

képeket 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 $I_{Ca,L}$ gátlását követően áram-clamp körülmények között továbbra is lehetőség volt AP-ok kiváltására. Az ilyenkor kialakuló AP-ok az L-típusú Ca^{2+} -áram hiányában jelentősen rövidebbek voltak és a plató negatívabb potenciálokon alakult ki. Koffein alkalmazására az AP_9 időtartama csökkent az AP_{10} lefutása azonban megegyezett az AP_8 -al. Ezek a mérések arra utaltak, hogy az AP 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 az valószínűleg megfelelt a Ca^{2+} -aktivált tranziens inward áramnak.

A Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus szerepe az akciós potenciál lefutásának szabályozásában

A továbbiakban a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus koffein által létrehozott AP konfiguráció-változásokban betöltött lehetséges szerepét vizsgáltuk. A külső oldat Na^+ tartalmának részleges Li^+ szubsztitúciója a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus egyensúlyi potenciálját negatívabbá változtatta, ami megnövelte a fordított cseremechanizmus (outward áram) lehetőségét. 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 AP_9 -t rövidítő, illetve AP_{10} -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 nôtt (N=19), míg a nyugalmi membránpotenciál szignifikánsan nem változott (-79 ± 2 mV). A koffein hatására az AP-ok lefutása a AP_9 alatt némileg variabilissá vált, de a koffein AP_9 -t rövidítő hatása ilyenkor is kimutatható volt. Továbbá a koffein AP_{10} -re kifejtett APD nyújtó hatásai nem változtak számottevően a normál Tyrode oldatban kapott eredményekhez képest.

Megbeszélés

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

Nyulak pitvari, kamrai és Purkinje-sejtjeit -60 mV-os membránpotenciálon tartva rövid koffeinpulzusokkal létrehozott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés egy tranziens inward áramot aktivált. Ez az áram mindhárom sejttypusban 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 gyors feszültségrámpákat használtunk, ezzel biztosítottuk, hogy a vizsgálat alatti $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő áramaktiváció közel állandó legyen. Mivel ligand-függő áramot vizsgáltunk, így az időfüggő árammodulációval kevésbé kellett számolnunk.

Nyulak szívizomsejtjeiben a koffein-által aktivált áram feszültségfüggése, megfordulási potenciálja nagymértékben függöt 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 hozhat létre, ezért itt egy $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő Cl^- csatorna működéséről van szó. A Cl^- csatornákról azonban ismert, hogy más anionokra is permeábilisak, ezáltal az ionsubsztitúciós kísérletekben a megmért $E_{\text{rev}(\text{ITl})}$ és a Cl^- megoszlásból számított $E_{\text{rev}(\text{Cl})}$ értéke nem pontosan fedi egymást.

Az I_{TI} Na^+ -függésének korábbi vizsgálata bizonyította a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus jelentőségét az I_{TI} kialakításában csirkén, tengeri malacon, valamint patkányon, ahol a kimutatott Na^+ - Ca^{2+} csereáramok lineáris függést mutattak az $[Ca^{2+}]_i$ -től. Az áramamplitúdók igen variábilisak voltak, azonban negatív membránpotenciálon nem voltak nagyobbak, mint 300 pA. A Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus igen jelentős a myoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció szabályozásában tengeri malac és nyúl szivizomsejtjeiben. 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 szivizomsejtekben. Ezekon 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 salát 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 szivizomsejteknél Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus mellett gyakran hivatkoznak egy nonspecifikus kationcsatornára, mint elsődleges aritmogén áramra. Ezt a csatornát nem sikerült kimutatnunk a nyúl szivizomsejtben, azonban megtaláltuk a humán pitvari izomsejteken. A nyúl szíveken végzett kísérleteinket humán pitvari sejteken megismételve egy nonspecifikus kationkonduktanciát sikerült kimutatni, 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. A humán pitvari sejtek esetén felmerült, hogy valóban valódi nonspecifikus csatornaműködésről van szó, vagy pedig a $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ csatorna K^+ mentes környezetben kialakuló módosult vezetőképességét látjuk. Ezt a felvetést azonban a $[Ca^{2+}]_i$ -függő K^+ csatorna specifikus gátlószerével 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. 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 szabaddá 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. 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 holding 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. 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 depletálása ugyanis képtelen volt AP hosszabbodást eredményezni. A koffein közvetlen hatásaként az AP rövidülését viszont ilyenkor is tapasztaltuk. Világos ezért, hogy emelt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett nem csak a Ca^{2+} -áram csökkenésével, hanem egy másik repolarizáló (outward) áram aktiválódásával is számolnunk kell.

Az L-típusú Ca^{2+} -áram $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő viselkedése több szempontból érdekes. Úgy tűnik, hogy ez a plató kialakításában kitüntetett jelentőségű ionáram az SR fiziológias Ca^{2+} -telítettsége mellett is jelentős $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő inaktivációt mutat. Ez a sajátosság a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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. Csökkent SR Ca^{2+} -tartalom mellett viszont a Ca^{2+} -áram lassabban inaktiválódik, mely lehetőséget ad a hosszabb ideig tartó Ca^{2+} -belépésnek és Ca^{2+} -felszabadításnak. A Ca^{2+} -áram inaktivációjának finomszabályozása nem csak a szív kontrakciója szempontjából fontos. Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy ez az AP-ok hosszára is igen erélyesen hat.

Az emelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 felveti, hogy az I_{Tl} háttérében $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő Cl^- -áramok húzódnak meg. Mások azonban azt hangsúlyozzák, hogy az I_{Tl} létrehozásában a Na^+ - Ca^{2+} -csere szerepe legalább ennyire fontos.

Eredményeink egyértelműen jelzik, hogy az L-típusú Ca^{2+} -áram $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -függő inaktivációjának mértéke fontos az akciós potenciál lefutásának szabályozásában. Nyúlizolált szívizom-sejtjeiben nagy amplitúdójú Ca^{2+} -tranziensek egy további $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -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 zavaraiiban.

Összefoglalás

A szívizomsejtek $[Ca^{2+}]_i$ -függő ionáramai az akciós potenciálok lefutása és a ritmuszavarok kialakulása szempontjaiból egyaránt érdekesek. Nyúl elektromosan ingerelt kamrai szívizomsejtjeit használva olyan kísérletes rendszert alakítottunk ki, amelyben a magas és alacsony $[Ca^{2+}]_i$ ingerületi folyamatokra kifejtett hatásait tanulmányozhattuk. Rövid ideig tartó koffein-alkalmazással a $[Ca^{2+}]_i$ először emelkedett, majd csökkent. A hirtelen emelkedő $[Ca^{2+}]_i$ diasztolé alatt tranziens depolarizációt váltott ki, míg szisztolé alatt az akciós potenciál időtartamának csökkenését indukálta. Feszültség-clamp vizsgálatok alapján a gyorsult repolarizáció, részben az L-típusú Ca^{2+} -áram csökkenésének, részben annak a tranziens áramnak volt a következménye, amely a nyugalmi membránpotenciálon depolarizációt okozott. Alacsony $[Ca^{2+}]_i$ az akciós potenciál megnyúlást eredményezte, mely az L-típusú Ca^{2+} -áram fokozódásához volt kapcsolható.

A tranziens inward áram hátterében többféle csatorna működése állhat. Nyulak pitvari, kamrai sejtjein Na^+ és K^+ mentes környezetben egy, a Purkinje sejteken már kimutatott, $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- áram jelenlétét sikerült megmutatnunk. Ellentétben a korábbiakban Purkinje-sejteken bemutatott árammal, a pitvari és kamrai sejteken minden esetben egycsúcsú áramaktivációt láttunk. Az ionszubsztitúciós kísérletek eredményeiben, a feszültség-áramerősség karakterisztikákban, az antracén-9-karboxilát érzékenységben azonban teljesen azonosan viselkedtek a különböző sejtípusokban kimutatott $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- áramok.

Humán pitvari szívizomsejteken is kimutatható egy koffeinkezelés hatására kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ -függő membránáram, ami azonban független a Cl^- -ok extra- és intracelluláris megoszlásától. A csatorna vezetőképességét azonban nagymértékben befolyásolja a membrán két oldala közötti monovalens kationeloszlás. Mivel ez a csatorna Cs^+ -ra és Li^+ -ra is permeábilis ezért ezeken a sejteken egy $[Ca^{2+}]_i$ -függő

nemspecifikus kationcsatorna működését kell feltételeznünk. Humán kamrai miocitákon nem sikerült sem a $[Ca^{2+}]_i$ -függő Cl^- , sem a $[Ca^{2+}]_i$ -függő nemspecifikus kationcsatorna jelenlétét kimutatni.

A sejten belüli térben kórosan megemelkedő Ca^{2+} koncentráció, valamint a spontán kialakuló Ca^{2+} szint ingadozások és a $[Ca^{2+}]_i$ -függő ioncsatornák közötti kapcsolat számos vonatkozása ma még továbbra ismeretlen. Ezen folyamatok tanulmányozása tovább vezet a szívbetegségeket kísérő ritmuszavarok sejtszintű megismerésének rögzös útján.

A tézisek alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

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

Köster OF., **Szigeti Gy.** and Beuckelmann DJ.: 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, 1999) **IF: 3.092**

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

A tézisek alapjául szolgáló citálható absztraktok:

Papp Z., **Szigeti Gy.**, Rusznák Z. and Kovács L.: Chloride ions are the dominant charge carriers of the transient inward current (I_{Ti}) in rabbit myocytes (JMCC, 28(6), 1996)

Szigeti Gy., Papp Z., Beuckelmann DJ. and Kovács L.: Caffeine-induced ionic currents in isolated atrial cells of human and rabbit heart (New Series Physiology/Fiziologia, 6(2), 1996)

Peineau N., Papp Z., Kovács L., Argibay J. and **Szigeti Gy.**: Caffeine-induced alteration in action potential configuration of isolated rabbit ventricular myocytes (JMCC, 29(5), 1997)

A tézisek alapjául nem szolgáló *in extenso* közlemények:

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

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

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

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

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

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

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

Nánási PP., Sárközi S., **Szigeti Gy.**, Jóna I., Szegedi Cs., Papp Z., Bányász T., Magyar J., Szigligeti P., Körtvély A., Csernoch L., and Kovács L.: Different effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in canine ventricular cells. (*N-S Arch. Pharmacol.*, **363**, 383-390, 2001) **IF: 2.414**

A tézisek alapjául nem szolgáló citálható absztraktok:

Papp Z., Ball NA., **Szigeti Gy.**, Bódi A., Kristóf É., Kovács L., Walsh RA. and Édes I.: Effects of Levosimendan on stunned myocardium (*Acta Cardiol. Hung.*, 1996)

Yatani A., **Szigeti GP.**, Ligett S. and Dorn GW.: Cardiac-specific overexpression of beta2-adrenergic receptors is associated with decreased Ca^{2+} -current density and increased myocyte size (*Biophysical J.*, 1999)

Széli EA., Somogyi GT., de Groat WC. and **Szigeti Gy.**: Developmental changes in smooth muscle spontaneous activity in the neonatal rat urinary bladder. (*Biophysical J.*, 2000)

Szigeti Gy., Asai K., Kim S-J., Vatner SF., Rasmusson RL. and Yatani A: Transgenic mice over-expressing cardiac G_{sa} -develop QT prolongation and decreased transient outward K^+ currents with slowed inactivation (*Biophysical J.*, 2000)

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