

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A kalcium-függő klorid áram szerepe szívizomsejteken**

**Dr. Váci Krisztina**

**Témavezető: Prof. Dr. Magyar János**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2016.**

# Tartalomjegyzék

1.	Alkalmazott rövidítések jegyzéke .....	5
2.	Bevezetés .....	7
3.	Irodalmi áttekintés .....	8
3.1	A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és annak fázisai.....	8
3.2	Klorid csatornák.....	10
3.3	A kalcium-függő klorid áram.....	12
3.4	A kalcium-függő klorid csatorna .....	13
3.5	A kalcium-függő klorid áram gátlószerei .....	15
3.6	A szívizomsejtek klorid áramai .....	16
3.6.1	A szívizomsejtek kalcium-függő klorid árama.....	18
3.7	A szívizomsejtek kalcium homeostasisa.....	19
3.7.1	A szimpatikus stimuláció hatása a szívizomsejtek intracelluláris $Ca^{2+}$ koncentrációjára.....	22
4.	Célkitűzés .....	23
5.	Anyagok és módszerek.....	24
5.1	Kutya szívizomsejtek izolálása .....	24
5.2	Humán bal kamrai szívizomminták feldolgozása.....	25
5.3	Elektrofiziológiai mérések.....	26
5.3.1	Akciós potenciálok mérése.....	27
5.3.2	Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával .....	28
5.3.3	Akciós potenciál voltage-clamp technika.....	29
5.4	Intracelluláris kalcium mérés .....	30
5.5	Sejtrövidülés mérése .....	31
5.6	Immunfestés.....	31
5.7	Méréseinkhez használt oldatok összetétele.....	32
5.8	Statisztikai elemzés.....	33
6.	Eredmények .....	34

6.1	A kalcium-függő kloridáram jellemzése négyszögimpulzusok alkalmazásával .....	34
6.2	A 9-AC és a DIDS hatása a kamrafal midmyocardiális sejtjeinek akciós potenciáljára .....	35
6.3	A 9-AC dózisfüggő hatása az akciós potenciál paramétereire.....	38
6.4	A 9-AC hatása az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramokra .....	39
6.5	A $Ca^{2+}$ -függő $Cl^-$ áram $Ca^{2+}$ -függésének tanulmányozása.....	41
6.6	A $Ca^{2+}$ -függő $Cl^-$ áram profilja az akciós potenciálja alatt. Az intracelluláris $Ca^{2+}$ puffereelésének hatása.....	43
6.7	Az intracelluláris $Cl^-$ koncentráció megváltoztatásának hatása a $Ca^{2+}$ -függő $Cl^-$ áramra .....	46
6.8	A $Ca^{2+}$ -függő $Cl^-$ áram két különböző ingerlési frekvencián .....	48
6.9	Az L-típusú $Ca^{2+}$ áram emelésével a $Ca^{2+}$ -függő $Cl^-$ áram is nő.....	50
6.9.1	Az Isoproterenol $I_{Cl(Ca)}$ aktivációjára kifejtett hatásának vizsgálata.....	50
6.9.2	Bay K8644 $I_{Cl(Ca)}$ aktivációjára kifejtett hatásának vizsgálata .....	52
6.10	A sarcoplasmaticus reticulumból történő $Ca^{2+}$ felszabadulás gátlása csökkenti ugyan a $Ca^{2+}$ -függő $Cl^-$ áramot, de nem szünteti meg .....	53
6.11	A Bestrophin-3, TMEM16A és az L-típusú $Ca^{2+}$ csatornafehérjék ko-lokalizációja kutya szívéből izolált sejteken.....	55
7.	Megbeszélés.....	61
7.1	A 9-AC és DIDS összehasonlítása.....	61
7.2	A $I_{Cl(Ca)}$ tulajdonságai.....	65
7.3	A $I_{Cl(Ca)}$ fiziológias aktivációjához elégséges az L-típusú $Ca^{2+}$ csatornákon beáramló $Ca^{2+}$ .....	67
7.4	A TMEM16A és a Bestrophin-3, valamint az L-típusú $Ca^{2+}$ csatornák egymás közelében helyezkednek el .....	69
7.5	Klinikai relevanciák .....	71
7.6	Összegzés.....	72
8.	Összefoglalás .....	73
9.	Summary.....	74

10.	Irodalomjegyzék .....	75
11.	Saját közlemények listája .....	84
12.	Tárgyszavak.....	88
13.	Keywords.....	88
14.	Köszönetnyilvánítás .....	89
15.	Függelék .....	90

# 1. ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4-AP	4-aminopiridin
9-AC	antracén-9-karboxilsav
APD	akciós potenciál időtartam (action potential duration)
APD <sub>20</sub>	20 %-os repolarizációhoz tartozó APD
APD <sub>50</sub>	50 %-os repolarizációhoz tartozó APD
APD <sub>90</sub>	90 %-os repolarizációhoz tartozó APD
BSA	borjú szérum albumin
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CFTR	cystás fibrosis transzmembrán konduktancia regulátor
CICR	Ca <sup>2+</sup> indukált Ca <sup>2+</sup> felszabadulás (Ca <sup>2+</sup> induced Ca <sup>2+</sup> release)
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> -calmodulin protein kináz
DAD	késői utódepolarizáció (delayed afterdepolarization)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIDS	4,4'-diisotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav
DPC	difenilamin-2-karboxilát
E <sub>Cl</sub>	Cl <sup>-</sup> egyensúlyi, másnéven equilibrium potenciál
FFA	flufenaminsav
I <sub>9-AC</sub>	9-AC szenzitív áram
I <sub>Ca,L</sub>	L-típusú Ca <sup>2+</sup> áram
I <sub>Cl(Ca)</sub>	Ca <sup>2+</sup> -függő Cl <sup>-</sup> áram
I <sub>DIDS</sub>	DIDS szenzitív áram
I <sub>K1</sub>	befelé egyenirányító K <sup>+</sup> -áram (inward rectifier K <sup>+</sup> -áram)
I <sub>Kr</sub>	késői egyenirányító K <sup>+</sup> -áram gyors komponense (rapid)
I <sub>Ks</sub>	késői egyenirányító K <sup>+</sup> -áram lassú komponense (slow)
I <sub>Kur</sub>	késői egyenirányító K <sup>+</sup> -áram ultragyors komponense (ultra rapid)

$I_{Na}$	$Na^+$ áram
$I_{NCX}$	$Na^+/Ca^{2+}$ ioncserélő ( $Na^+/Ca^{2+}$ exchanger) áram
$I_{to1}$	tranziens kifelé irányuló 4-AP-szenzitív $K^+$ áram (tranzient outward)
$I_{to2}$	tranziens kifelé irányuló, 4-AP-inszenzitív $Cl^-$ áram
$NCX$	$Na^+/Ca^{2+}$ ioncserélő ( $Na^+/Ca^{2+}$ exchanger)
$NFA$	nifluminsav
$NPBB$	5-nitro-2-(3-fenilpropil-amino) benzoésav
$PBS$	foszfát pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
$plateau_{50}$	plateaupotenciál, az $APD_{90}$ felénél mérhető membránpotenciál
$PKA$	protein kináz-A
$SITS$	4-acetamido-4'-isotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav
$TEACl$	tetraetilammónium-klorid
$V_{max}$	depolarizáció maximális sebessége

## 2. BEVEZETÉS

Nemzetközi statisztikák szerint 1000 emberből 53 ember szenved valamilyen szívritmuszavarban. Ezen betegségcsoport Magyarországon körülbelül 500000 embert érint. [1]. A ritmuszavarok jelentős haláloki tényezők nemcsak hazánkban, hanem más európai országban is. A hirtelen szívhalál 50-100 esetben fordul elő 100000 főre számítva a különféle statisztikák alapján [2]. A szívritmuszavarok kialakulásának hátterében a myocyták elektromos aktivitásának kóros működése áll, melynek során megváltozik az akciós potenciál morfológiája vagy egyes ioncsatornák aktivitása tér el a normálistól [3], [4]. A kóros működés az ingerületképzés, az ingerületvezetés, vagy mindkét funkció károsodását idézi elő [5].

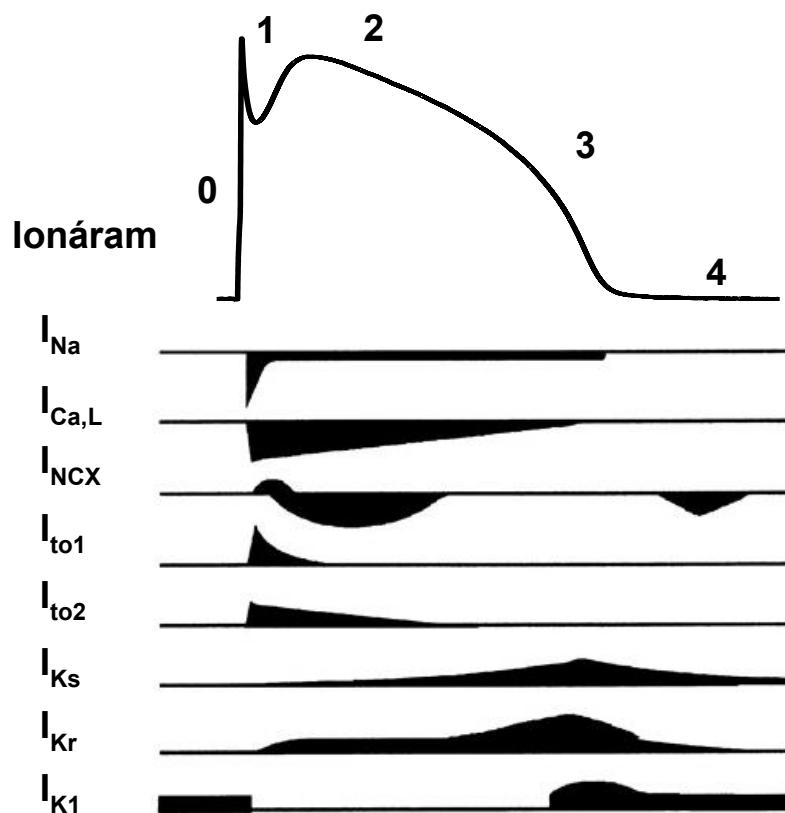
Az arrhythmiaák kezelésére különböző támadáspontú gyógyszermolekulák állnak rendelkezésre. Ezek többsége a transzmembrán ioncsatornákon átfolyó ionáramok befolyásolásával fejt ki hatását, és ezáltal megváltoztatja a sejtek repolarizációjának folyamatát, a refrakter periódust vagy az ingerületvezetés sebességét. Az arrhythmiaák kezelésére használt gyógyszerek azonban maguk is arrhythmogén (proarrhythmias) hatással rendelkeznek.

Annak ellenére, hogy a kation csatornákat moduláló szereket régóta alkalmazzák a szívritmuszavarok kezelésében, a betegek túlélése szempontjából ezek a szerek csak mérsékelten hatékonyak. Számos esetben számoltak be proarrhythmias hatásukról, ezért alkalmazásuk nagy odafigyelést igényel. Ezen nem kívánt hatásuk miatt igény van új terápiás lehetőségek keresésére az arrhythmiaák kezelésében. A szívizomsejtek  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornáinak szerepe, jelentősége az akciós potenciál kialakításában nem vagy csak alig ismert. Néhány korábbi tanulmányban már vizsgálták a  $Cl^-$  áram szerepét a késői utódepolarizáció kialakításában és felvetették az ionáram lehetséges szerepét a ritmuszavarok kiváltásában. Ezért a  $Cl^-$  áram akciós potenciál kialakításában betöltött szerepének tisztázása lehetőséget teremthet új antiarrhythmias gyógyszermolekulák fejlesztésére [6].

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1 A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja és annak fázisai

A szívizomsejtek akciós potenciálja a plazmamembrán feszültségfüggő ioncsatornáinak egymás utáni megnyílásának következménye [6]. A szívizomsejtek kétféle akciós potenciálját különböztetjük meg, a pacemaker sejtek nodális, lassú akciós potenciálját, és a munkaizomzat gyors akciós potenciálját. A munkaizomsejtek akciós potenciálja különbözik az egyéb ingerlékeny sejtek akciós potenciáljától, hiszen kifejezett plateau fázissal rendelkezik, mely az inward és outward áramok finom egyensúlyának a következménye. A kamrai myocyták akciós potenciálját öt fázisra osztjuk, melyet 0-tól 4-ig sorszámozunk.



**1. ábra A kamrai szívizomsejt akciós potenciálja és a kialakításában szereplő fontosabb ionáramok**

Az ábra felső részén a számok az akciós potenciál fázisait jelzik. Alatta az akciós potenciált létrehozó ionáramok látszanak. A lefelé irányuló kitérések az inward áramot, a felfelé irányuló kitérések az outward áramok.  $I_{Na}$ : gyors nátriumáram;  $I_{Ca,L}$ : L-típusú kalciumáram;  $I_{NCX}$ : nátrium-kalcium csereáram;  $I_{to}$ : tranziens kifelé irányuló áram;  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ : késői egyenirányító káliumáram gyors és lassú komponense;  $I_{K1}$ : befelé egyenirányító káliumáram

Dirk J. Snyders: Structure and function of cardiac potassium channels. Cardiovascular Research 42 (1999) 377–390. Módosítva



Az akciós potenciál **nulladik fázisában** a feszültségfüggő gyors  $\text{Na}^+$  csatornák aktiválódnak. Aktivációjuk a membránpotenciál aktuális értékét a  $\text{Na}^+$  egyensúlyi potenciálja felé mozdítja, ezáltal a membrán depolarizálódik, és létrehozza az akciós potenciál felszálló szárát. A gyors  $\text{Na}^+$ -áram ( $I_{\text{Na}}$ ) hamar inaktiválódik, és ismételtén aktiválható állapotba csak a repolarizáció után kerül.

Az akciós potenciál nulladik fázisának depolarizációja további feszültségfüggő ionáramok aktiválódását okozza. Az akciós potenciál csúcsát egy korai repolarizációs (**első fázis**) követi, mely egyrészt a  $I_{\text{Na}}$  inaktiválódása miatt, másrészt kifelé irányuló áram ( $I_{\text{O}}$ ) aktiválódása következtében jön létre.

Az 1980-as évekig elfogadott volt, hogy a tranziens kifelé irányuló áram 4-aminopiridinre (4-AP) érzékeny  $\text{K}^+$ -áram. Ekkor felvetődött, hogy ezen  $\text{K}^+$  áramkomponens mellett, Purkinje rostokban jelen van egy 4-AP inszenzitív,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált áramkomponens is [7]. Hoffman és Tseng 1989-ben írták le a 4-AP rezisztens  $\text{Ca}^{2+}$ -függő áramot kutya munkaizomsejteken, melyet  $I_{\text{O}2}$ -nek nevezték el [8]. Zygmunt és munkatársa nyúl kamrai izomsejteken is azonosították az áramot, és bizonyították, hogy ez a komponens  $\text{Cl}^-$  áram [9].

Az akciós potenciál **második (plateau) fázisáért** az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  áram ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) és a szintén depolarizáló áramként jelenlévő  $I_{\text{Na}}$  késői komponense, valamint az őket ellensúlyozó késői egyenirányító  $\text{K}^+$  áramok felelősek.

Az akciós potenciál **harmadik fázisában** kezdődik meg a repolarizáció folyamata, mely az akciós potenciál **negyedik fázisára** állítja vissza a membránpotenciált nyugalmi értékre. A repolarizációért elsősorban a késői egyenirányító  $\text{K}^+$ -áramok ( $I_{\text{K}}$ ) és a nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős befelé egyenirányító káliumáram ( $I_{\text{K1}}$ ) felelősek. Emlős fajokban az  $I_{\text{K}}$  három komponensét különíthetjük el, a lassú ( $I_{\text{Ks}}$ ), a gyors ( $I_{\text{Kr}}$ ) és az ultragyors ( $I_{\text{Kur}}$ ) komponenset [10], [11], [12]. Az áramkomponensek nevüket aktivációs kinetikai sajátosságuk alapján kapták: az  $I_{\text{Ks}}$  (lassú komponens) lassan aktiválódik, de gyorsan deaktiválódik. Fiziológias akciós potenciál időtartamoknál (200-300 ms) szerepe elhanyagolható, viszont olyan esetekben, amikor az akciós potenciál megnyúlik vagy a szimpatikus tónus fokozódik, az áram aktivációja megnő. Az  $I_{\text{Kr}}$  (gyors komponens) viszonylag gyors aktiváció után nagyon gyorsan inaktiválódik, viszont az inaktivációból való visszatérése gyorsabb, mint a csatorna záródása, ezért az áram reaktiválódik. Fiziológias akciós potenciál időtartamnál a fő repolarizáló áramnak tekinthető. Az ultragyors komponens ( $I_{\text{Kur}}$ ) pedig az  $I_{\text{Kr}}$ -

nél is gyorsabb aktivációs kinetikával rendelkezik. Az  $I_{Kur}$  kutya kamrai szívizomszövetben nem található meg, a pitvari akciós potenciál kialakításához járul hozzá.

Az akciós potenciál során, a felszíni membrán alatti térrész megváltozott ionegyensúlyának visszaállítását, azaz a  $Na^+$  és a  $Ca^{2+}$  sejtből való kijuttatását és a  $K^+$  sejtbe való juttatását különböző cseremechanizmusok és aktív pumpák végzik. Ezek közül kiemelkedő jelentőségű az elektrogén  $Na^+/Ca^{2+}$  ioncserélő mechanizmus (NCX), mely három  $Na^+$ /egy  $Ca^{2+}$  ellentétes irányú transzportálását végzi. Az ioncserélő működésének iránya a membrán két oldalán található ionok koncentrációjától, a  $Na^+$  és  $Ca^{2+}$  egyensúlyi potenciáljától és a membránpotenciál aktuális értékétől függ. Ennek megfelelően az NCX áram lehet inward és outward irányú. Az NCX mellett a  $Na^+/K^+$ -ATP-áz és  $Ca^{2+}$ -ATP-áz is segíti a sejt eredeti ionmegoszlásának visszaállítását. Mindkét pumpa ATP felhasználásával működik. Az előbbi  $Na^+$ -t távolít el a sejtől és a kilépett  $K^+$ -t szállítja vissza a sejtbe, három  $Na^+$  kettő  $K^+$  arányában [13]. A sarcolemmáris  $Ca^{2+}$ -ATP-áz a  $Ca^{2+}$  visszaszállítását végzi az extracellulláris térbe [13].

A munkaizomsejtek nyugalmi membránpotenciálját elsősorban a  $I_{K1}$  határozza meg. Az áramért felelős csatornák  $-70$  mV és  $-80$  mV közötti membránpotenciál értéken nyitott állapotban vannak biztosítva a sejtek nagy nyugalmi  $K^+$  permeabilitását. A  $-20$  mV-nál pozitívabb membránpotenciál értékeknél a csatornák már nem vezetnek ionáramot, mert az intracelluláris  $Mg^{2+}$ , illetve poliaminok feszültségfüggő módon gátolják a csatornát. Az áram aktivációja és deaktivációja rövid idő alatt zajlik le.

### 3.2 Klorid csatornák

A  $Cl^-$ -ok mozgása a sejtmembránon keresztül szigorúan szabályozott és elsősorban a sejtmembrán  $Cl^-$  csatornái és transzporterei által valósul meg. A  $Cl^-$  csatornák olyan anion szelektív ioncsatornák, melyek funkcionálisan és strukturálisan is heterogén csoportot alkotnak. A többi ioncsatornához hasonlóan a  $Cl^-$  csatornák nemcsak a felszíni membránban, hanem az intracelluláris organellek membránjában is megtalálhatóak.

A  $Cl^-$  csatornák tanulmányozása az 1990-es évekig háttérbe szorult, mostoha gyermekként tekintettek a  $Cl^-$  csatornákra. Ennek hátterében olyan korai kísérletek álltak, melyek alapján a  $Cl^-$ -oknak csekély fiziológiás jelentőséget tulajdonítottak: béka vázizomrostokon és vörösvértesteken végzett mérések alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a  $Cl^-$ -ok passzívan oszlanak meg az intra- és az extracelluláris folyadékok között, és gyors membrántranszporttal rendelkeznek [14]. Ezen megfigyeléseket a  $Cl^-$  csatornák magas

nyugalmi passzív elektromos permeabilitásával magyarázták. A fenti megfigyeléseket általánosították, és teoretikusan az összes sejtről azt gondolták, hogy ezek a csatornák magas  $\text{Cl}^-$  permeabilitással rendelkeznek és  $\text{Cl}^-$ -ok termodinamikailag passzívan oszlanak meg a sejtmembrán két oldala között. Ennek hatására a  $\text{Cl}^-$  csatornák vizsgálata nagymértékben mellőzve lett.

Az elmúlt két évtizedben drámai fordulat következett be a  $\text{Cl}^-$  csatornák megítélésében. Leírták, hogy bizonyos humán megbetegedések hátterében a  $\text{Cl}^-$  csatornák mutációja állhat. A congenitális myotónia esetében például a defektus a vázizom  $\text{ClC-1}$  csatornáját érinti, ami stabilizálja az izomrostok nyugalmi membránpotenciálját. Ebben az esetben a mutáció a  $\text{ClC-1}$  csatorna génjében van jelen, amely vagy a  $\text{ClC-1}$  feszültség szenzorát vagy az anion permeabilitását változtatja meg [15]. Cystás fibrózis esetében a mutáció a cystás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) gént érinti, és ezáltal maga a  $\text{Cl}^-$  csatorna vagy a csatorna regulatórikus funkciója károsodik [16]. Kimutatták továbbá, hogy  $\text{Cl}^-$  csatornák meghibásodása állhat az epilepszia, lizoszomális tárolási betegség, sükettség, vesekövesség, osteoporosis bizonyos formáinak a hátterében is [17].

Ma már elfogadott, hogy a  $\text{Cl}^-$ -t a legtöbb sejt membránja aktívan transzportáltja [18]. Valójában a  $\text{Cl}^-$ -ok számos sejtfunkcióban szerepet játszanak, mint például a sejtvolumen, az intracelluláris pH regulációban, a szignál transzdukcióban és annak inhibíciójában, a sejt migrációban, a differenciálódásban, az apoptózisban és a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában [19].

Az évtizedek alatt végzett ionáram mérések megmutatták, hogy a különféle sejteken zavarba ejtően sokféle  $\text{Cl}^-$  csatorna van jelen. Ezen csatornák lokalizációja, konduktanciája, aktiválási és szabályozási mechanizmusa is különböznek egymástól. Ezen sokféleség a  $\text{Cl}^-$  csatornák molekuláris diverzitásával párosul. Közös jellemzőjük a  $\text{Cl}^-$  csatornáknak, hogy alacsony a szelektivitásuk a szerves anionok között ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ), emiatt helyesebben anion csatornáknak is nevezhetnénk őket. A  $\text{Cl}^-$  csatorna elnevezés mégis azért terjedt el, mert a biológiai rendszerekben a  $\text{Cl}^-$  tekinthető a domináns anionnak.

Jelenlegi tudásunk szerint a  $\text{Cl}^-$  csatornák öt családját különítjük el:

- ❖ ligand - kapuzott  $\text{Cl}^-$  csatornák,
- ❖ CFTR (cystás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor)
- ❖  $\text{ClC}$ ,
- ❖ Bestrophin,
- ❖ TMEM (más néven Anoctamin).

A legnagyobb családot a ligand-kapuzott  $\text{Cl}^-$  csatornák alkotják, melyek a GABA és glicin  $\text{Cl}^-$  csatornákat foglalják magukba. 4 transzmembrán doménnal rendelkeznek és homo- vagy heteropentamer csatornákat formálnak [20].

A CFTR család az ABC transzporter szupercsaládkhoz tartozik, egyedüli képviselő a szupercsaládon belül, amely ioncsatornaként funkcionál. 12 transzmembrán doménnal rendelkezik, aktivációja ATP függő, a cAMP és cGMP-függő kinázok befolyásolják az aktivitását [20].

A CIC  $\text{Cl}^-$  proteinek az állatvilágban széles körben expresszálódnak. A CIC  $\text{Cl}^-$  csatornák dimer szerkezetűek, mindkét monomer 1-1 pórust tartalmaz (két pórusú csatorna) [20]. A kilenc emlős CIC  $\text{Cl}^-$  fehérje közül azonban ténylegesen csak négy alkot feszültségfüggő ioncsatornát, a többi  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  ioncserélő. Amellett, hogy a CIC csatornák feszültségfüggőek, aktivációjukat az intracelluláris és extracelluláris  $\text{Cl}^-$ -ok koncentrációja, valamint a pH is befolyásolja [18].

A TMEM16A és a Bestrophin fehérjék családjába tartozó  $\text{Cl}^-$  csatornák a  $\text{Ca}^{2+}$  függő  $\text{Cl}^-$  csatornákat hozzák létre.

### 3.3 A kalcium-függő klorid áram

A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  áramot ( $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ ) először 1981-ben *Rana pipiens* petesejtjeiben figyelték meg  $\text{Ca}^{2+}$ -ot injektálva vagy  $\text{Ca}^{2+}$  ionofórt alkalmazva [21]. Ezt követően írták le és karakterizálták az áramot *Xenopus laevis* oocytáiban [22], [23], valamint szalamandra fotoreceptorában az 1980-as évek elején [24]. A *Xenopus* petesejtben ezen csatornák felelősek a polispermia megakadályozásáért. Megtermékenyítéskor az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció megemelkedik, ez aktiválja a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot, amely depolarizálja a membránt és megakadályozza további spermiumok belépését. Mára már az is ismertté vált, hogy a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  többek között szerepet játszik az epitheliális szekrécióban, a neuronok ingerlékenységében, az olphactorius szignál transzdukcióban, az erek tónusának szabályozásában, valamint a fotoreceptorok regulációjában is [25].

Annak ellenére, hogy a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot már több, mint 30 éve tanulmányozzák, a csatornáért felelős fehérjéket nem azonosították még. Ennek hátterében számos tényező áll. Az egyik az, hogy ioncsatornákat leggyakrabban *Xenopus* oocytákban expresszálva tanulmányozzák. Ezen sejtek azonban nem igazán alkalmasak a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  tanulmányozására, mert viszonylag nagy endogén  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -mal rendelkeznek, ezért az endogén áramot nehéz elkülöníteni az expresszált csatornák ionáramától. Az is hátrány, hogy hiányoznak a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ok speciális gátlószerei, mely elkülönítené azt a többi  $\text{Cl}^-$  áramtól. A homológián alapuló klónozás sem segíti a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornák

megismerését, mert az eddig ismert és klónozott  $\text{Cl}^-$  csatornákkal (CFTR, GABA, glicin) nem mutat strukturális hasonlóságot.

A  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  nagyságát és a  $\text{Cl}^-$  mozgásának irányát három faktor határozza meg: az aktuális membránpotenciál, a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálja ( $E_{\text{Cl}}$ ) és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció.

Egy tetszőleges ionáram amplitúdóját a következő egyenlet definiálja:

$$I_x = g_x \times (E - E_x)$$

ahol  $g_x$  a konduktanciának,  $E$  az aktuális membránpotenciálnak,  $E_x$  a tetszőleges ion egyensúlyi potenciáljának felel meg.

Ahogy kationok esetében is, a  $\text{Cl}^-$ -ra is igaz, hogy amikor a hajtóerő ( $E - E_{\text{Cl}}$ ) pozitív, kifelé irányuló (outward) áram indukálódik. Hagyományosan, az outward membrán áram pozitív előjelű és a nulla vonalhoz képest pozitív irányú kitérésként jelenik meg. Az áram irányának a pozitív töltések mozgási irányát tekintjük, ezért a  $\text{Cl}^-$  áram esetén az outward áram valójában  $\text{Cl}^-$  befelé történő mozgását jelöli. A membrán depolarizációkor  $\text{Cl}^-$ -ok sejtbe történő belépése ( $\text{Cl}^-$  influx) fog megvalósulni, mely a membrán hyperpolarizációjához vezet. A  $\text{Cl}^-$ -ok megoszlására jellemző, hogy a  $\text{Cl}^-$  koncentráció nagyobb a sejten kívül, mint az intracelluláris térben. A  $\text{Cl}^-$  csatornák jellemző sajátása, hogy gyakran kifelé egyenirányítottak, vagyis ugyanakkora hajtóerő esetén az outward áram nagyobb amplitúdójú, mint az inward áram.

A legtöbb sejtben a nyugalmi membránpotenciál negatívabb, mint a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálja, ezért a  $\text{Cl}^-$  csatorna megnyílása ( $\text{Cl}^-$  efflux) depolarizálja a membránt. Ha az aktuális membránpotenciál pozitívabb, mint a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálja, akkor a  $\text{Cl}^-$  ellentétes irányba mozogva hyperpolarizálja a membránt [26].

### 3.4 A kalcium-függő klorid csatorna

Egy korai  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatorna jelölt a CLCA protein volt. Nevét a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  konduktanciáról kapta. Marha trachea epithel és más secretoros sejtekből tisztították, és mutatták ki [27]. Az elnevezése ellenére ma már tudjuk, hogy a CLCA nem  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornaként funkcionál. Marha CLCA fehérjét fejeztettek ki *Xenopus* petesejtekben és COS-7 sejtekben. Ugyan az áram elektrofiziológiai sajátásai hasonlítottak az endogén  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ra, például az anion szelektivitásuk azonos sorrendű volt, de számos eltérés is mutatkozott a két áram paramétereik között: 1) a petesejteken mért CLCA áram aktivációjához az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció megemelkedése nem volt szükséges, a depolarizáció önmagában is elégséges

volt. 2) A CLCA áramokra a nifluminsav (NFA) nem volt hatással, ugyanakkor ez a gátlószer az endogén  $I_{Cl(Ca)}$ -t hatékonyan csökkentette. 3) A COS-7 sejteken mért CLCA áram feszültségfüggése lineárisnak adódott, míg az endogén áram outward rektifikációt mutatott. 4) A CLCA érzékenynek bizonyult ditiotreitolra, míg az endogén  $I_{Cl(Ca)}$ -ra nem volt ezen szernek hatása [27], [28]. További expressziós, biokémiai és biofizikai mérések megerősítették, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$ -ért nem a CLCA fehérje felelős [28], pontos funkciójának felderítéséhez még vizsgálatok szükségesek.

A Bestrophin-t először a Best-féle vitelliform macula dystrophiáért felelős génként azonosították 1998-ban [29]. Később HEK293 sejtekben expresszálva a Bestrophin-t bizonyították, hogy  $Cl^-$  áramot hoz létre [30]. További mutagenézis vizsgálatok megerősítették, hogy a Bestrophin-ok valódi anion csatornák, melyek fiziológias intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció esetén aktiválódnak, ezért feltételezik, hogy felelősek lehetnek a  $I_{Cl(Ca)}$ -ért. Ionáram mérések során azonban az áram biofizikai paraméterei nem teljesen egyeztek a *Xenopus* petesejtek endogén  $I_{Cl(Ca)}$ -val. Humán vad típusú Bestrophin-1-et expresszálva az áram nem mutatott outward rektifikációt, mint a klasszikus  $I_{Cl(Ca)}$  [31]. Ezen felül, a Best-féle vitelliform macula dystrophiát okozó Best-1 génben W93C mutációt hordozó knock-in egerek retinális pigment epithel sejtjei normál  $Cl^-$  konduktanciával rendelkeztek, noha a humán megbetegedésekhez hasonló retinális elváltozások jelentkeztek a Best1<sup>W93C</sup> mutáció hatására [32]. Összességében elmondható, hogy a Bestrophin-ok anion csatornaként funkcionálnak, de szerepük a  $I_{Cl(Ca)}$  létrehozásában kérdéses.

2008-ban három munkacsoport egymástól függetlenül számolt be egy új  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatorna jelöltről, a TMEM16A-ról [33], [34], [35]. Schroeder és munkatársai megfigyelték, hogy *Xenopus*-tól eltérően más kétélűekre, mint például a szalamandrára (*Ambystoma mexicanum*) jellemző a polyspermia, mivel petesejtjei nem rendelkeznek  $I_{Cl(Ca)}$ -mal. Ezért a szalamandra petesejtjei alkalmasok voltak az expresszált  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornák vizsgálatára. Így sikerült azonosítaniuk a TMEM16A-t, mint a  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatorna alegységét [34], [28]. Yang és munkatársai az olyan membránproteineket szűrték bioinformatikai módszerekkel, melyek legalább két transzmembrán doménnel rendelkeznek, így találtak rá a TMEM16A-ra [35]. Caputo és munkatársai leírták, hogy interleukin-4-gyel kezelt humán bronchiális epithel sejtekben up-regulálódtak a  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornák és ezeken a sejteken a TMEM16A-t microarray technikával azonosították [33]. A TMEM16A-t mindhárom laboratórium heterológ expressziós rendszerekben vizsgálta, és a klasszikus  $I_{Cl(Ca)}$ -hoz nagy hasonlóságot mutató ionáramokat regisztráltak.

A TMEM16 fehérjék neve onnan származik, hogy olyan transzmembrán fehérjék, melyek pontos funkciója ismeretlen (Transmembrane proteins with unknown function). A TMEM16A mellett még 8 másik fehérje tartozik a családba (TMEM16B-I). A TMEM16 családba tartozó fehérjék anion csatornák, és vélhetően 8 transzmembrán domént tartalmaznak. Innen származik a fehérjecsalád másik elnevezése az Anoctamin1 vagy röviden Anol (anion csatornák 8 transzmembrán szegmenssel) [28].

### 3.5 A kalcium-függő klorid áram gátlószerei

A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornák tanulmányozására számos eltérő szerkezetű inhibitor alkalmaznak. Tradicionális anion csatorna gátlószerek a stilbén származék 4,4'-diisotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav (DIDS) és a 4-acetamido-4'-isotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav (SITS). Emellett anthacén-9-karboxilsavat (9-AC), difenilamin-2-karboxilátot (DPC), 5-nitro-2-(3-fenilpropil-amino) benzoetsavat (NPPB), nifluminsavat (NFA) és flufenaminsavat (FFA) használnak  $\text{Cl}^-$  csatornák vizsgálatára.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornák gátlására leggyakrabban alkalmazott szer a NFA és FFA. Már  $\mu\text{mol/l}$ -es koncentráció tartományban mindkettő potens módon gátolja *Xenopus* petesejtek  $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -át [36]. Az NFA-t 30-200  $\mu\text{mol/l}$  koncentrációban gyakorta használták a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornák specifikus gátlószereként az anion áram azonosításakor [37] [38], azonban, mint specifikus gátlószer nem vált be. Leírták ugyanis, hogy patkány szívizomsejteken a NFA 100  $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban mintegy 50 %-os  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  gátlást okozott, valamint csökkentette a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdóját és a sejtrövidülést is gátolta [39]. Patkány uterinális simaizom sejteken 10  $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban alkalmazva a NFA-t gátolta  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ot és csökkentette a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek amplitúdóját [40]. Továbbá leírták, hogy a NFA dóziszfüggő módon gátolta a  $\text{Na}^+$  áramot ( $\text{I}_{\text{Na}}$ ), negatívabb membránpotenciálok felé mozdította el a  $\text{I}_{\text{Na}}$  steady-state inaktivációjának feszültségfüggését és csökkentette az akciós potenciál felszálló szárának meredekségét [41]. Mivel a  $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  aktivációja az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációtól függ, ezért az áram tanulmányozására nem célszerű egy olyan gátlószert választani, mely a  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis-át megváltoztatja, ezáltal az áram aktivációját befolyásolja. Zhou és munkacsoportja bizonyította, hogy a NFA patkány szívizomsejtekben növelte a tyrozin-kináz szignalizációs útvonal aktiválását és ezen keresztül a sejtek steady-state  $\text{K}^+$  áramát [42]. Wang és munkatársai arról számoltak be, hogy 100  $\mu\text{mol/l}$  NFA nagy mértékben csökkentette a  $\text{K}_v4.3$ -t és  $\text{K}_v4.2$ -t expresszáló sejteken a csatornákon átfolyó áramot és negatívabb membránpotenciálok felé tolt az áram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését [43].

A  $I_{Cl(Ca)}$   $I_{to1}$ -től való elkülönítéséhez is elengedhetetlen, hogy a gátlószer csak az  $I_{to2}$ -re legyen hatással. Emiatt a  $I_{Cl(Ca)}$  akciós potenciál alatti lefutásának vizsgálatához nem javasolt az NFA használata, hiszen humán és kutya szívmemsejteken a  $K_v4.3$  fehérjét is tartalmazó csatorna ionárama tehető felelőssé az 4-AP szenzitív  $I_{to1}$ -ért. Subendocardiális sejtekben a  $I_{to1}$ -ért valószínűleg a  $K_v1.4$  csatornák felelősek [44], míg patkány szívmemsejteken a  $K_v4.2$  és  $K_v4.3$  fehérje együttesen működik közre a  $I_{to1}$  áram kialakításában [45].

Az NPPB alkalmazásakor is, az NFA-hoz hasonló, nem kívánatos hatásokat figyeltek meg. 50  $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban gátolta a  $I_{Ca,L}$ -ot [39], emellett  $I_{Na}$  gátlást is leírtak, mely együtt járt az akciós potenciál felszálló szár meredekségének dózisfüggő csökkenésével [41]. Portális véna simaizomsejteken azt figyelték meg, hogy 10  $\mu\text{mol/l}$  NPPB gátolta a koffein indukálta  $I_{Cl(Ca)}$ -t és a nagy konduktanciájú  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$  áramot ( $I_{BK(Ca)}$ ) [46].

A DPC-ről szintén kiderült, hogy nem szelektív gátlószer a  $I_{Cl(Ca)}$ -nak, ugyanis 0,5-1 mmol/l DPC 45 %-kal csökkentette a  $I_{Ca,L}$  amplitúdóját, valamint forskolin jelenlétében a  $I_{Ca,L}$  amplitúdójának 75 %-os csökkenését figyelték meg tengerimalac kamrai és egér pitvari szívmemsejteken [47].

### 3.6 A szívmemsejtek klorid áramai

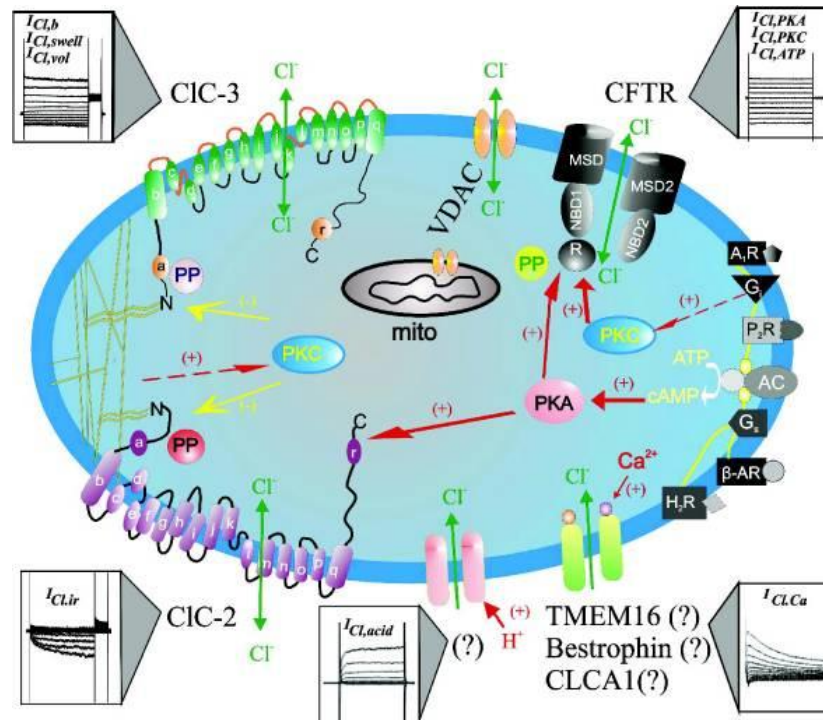
Számos különböző  $\text{Cl}^-$  áramot azonosítottak már emlős szívmemzen, beleértve a foszforiláció-aktivált vagy más néven cAMP dependens  $\text{Cl}^-$  áramot [48], a sejtduzzadás-aktivált vagy más néven sejt volumen-aktivált áramot [49], és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$  áramot [9].

A legutóbbi adatok alapján a protein kináz A és protein kináz C szinergista módon hatnak a foszforiláció-aktivált  $\text{Cl}^-$  áramra [50]. Az áramért felelős csatorna az epitheliális CFTR alternatív splice variánsa [51]. Tengerimalac szívmemsejteken megfigyelték, hogy bizonyos körülmények között az isoproterenol olyan mértékű depolarizációt okozott, amely ritmuszavarok kialakulásához vezetett [52]. Kiderült, hogy a jelenség hátterében a  $\text{Cl}^-$  mozgása áll [53], [54]. A protein foszforiláció-aktivált  $\text{Cl}^-$  csatorna defoszforilált állapotban inaktív, a  $\beta$ -adrenerg stimuláció hatására megemelkedik a cAMP szint, mely önmagában vagy a protein kináz A és/vagy protein kináz C jelátviteli utakon aktiválja az ionáramot. Az áram outward rektifikációt mutat és hozzájárulhat az akciós potenciál rövidítéséhez [55].

A sejtduzzadás aktivált  $\text{Cl}^-$  áramot először kutya kamrai szívmemsejteken írták le [49]. Patch-clamp technika egészsejtes elrendezését alkalmazva hypozmotikus külső oldatokat és hipertóniás belső oldatokat használtak a sejtduzzadás aktivált  $\text{Cl}^-$  áram indukálására [49].



A sejtduzzadás által aktivált  $\text{Cl}^-$  csatornákról azt tartják, hogy a CIC családhoz tartoznak [56], ugyanis klónozott sejtvonalon expresszálva a csatornán átfolyó áram a sejtduzzadás-aktivált  $\text{Cl}^-$  árammal mutatott nagy hasonlóságot [57]. A sejtduzzadás-aktivált  $\text{Cl}^-$  áram fiziológias szerepe még bizonytalan, aktivációja feltételezhetően a membrán feszítésére következik be [6].



## 2. ábra A szívizomsejt $\text{Cl}^-$ csatornái, feltételezett csatornafehérjei és a lehetséges szabályozási útvonalak

A  $I_{\text{Cl,Ca}}$ -ért felelős csatornafehérje jelöltek a bestrophin-3 és a TMEM16. A CIC-2, a feszültségfüggő  $\text{Cl}^-$  csatorna család tagja, mely felelős a volumen regulált és hyperpolarizáció-aktivált befelé egyenirányító  $\text{Cl}^-$  áramért ( $I_{\text{Cl,ir}}$ ). A  $I_{\text{Cl,acid}}$  olyan  $\text{Cl}^-$  áram, melyet az extracelluláris pH szabályoz. A CIC-3 csatornákon átfolyó  $\text{Cl}^-$  áramot a sejtvolumen regulálja ( $I_{\text{Cl,vol}}$ ) vagy a sejtduzzadás aktiválja ( $I_{\text{Cl,swell}}$ ). A  $I_{\text{Cl,b}}$  egy bazálisan aktivált CIC-3  $\text{Cl}^-$  áram. A CFTR, cystás fibrosis transzmembrán konductancia regulátor, olyan  $\text{Cl}^-$  csatornákat kódol, melyeken átfolyó áramot a cAMP–protein kináz A (PKA útvonala) ( $I_{\text{Cl,PKA}}$ ), protein kináz C (PKC) ( $I_{\text{Cl,PKC}}$ ), vagy az extracelluláris ATP ( $I_{\text{Cl,ATP}}$ ) aktivál. PP, szerin–treonin protein foszfatáz;  $G_i$ , inhibitorikus G fehérje;  $A_1R$ , 1-es típusú adozin receptor; AC, adenilát cikláz;  $H_2R$ , 2-es típusú hisztamin receptor;  $G_s$ , stimulatorikus G fehérje;  $\beta\text{-AR}$ ,  $\beta$ -adrenerg receptor;  $P_2R$ , 2-es típusú purinerg receptor; VDAC, feszültségfüggő anion csatorna; mito, mitokondrium.

Dayue Duan: Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. J Physiol. 2009 May 15; 587(Pt 10): 2163–2177. Módosítva

Az egyes emlősfajok között a szívizomsejtek  $\text{Cl}^-$  áramainak megoszlása nem egységes, nagymértékű fajfüggést mutatnak, továbbá a kamrafal rétegeiben is eltér a különböző  $\text{Cl}^-$  csatornák expressziója. A cAMP függő  $\text{Cl}^-$  áram hiányzik például kutya szívizomsejtekben

[50], viszont nyúl és tengerimalac szívműködéseken jelen van, de nem egységes a megoszlása az epicardiális és endocardiális rétegek között, valamint a pitvarok és kamrák között is különbség figyelhető meg. Subepicardiális sejtekben és a kamrákban nagyobb cAMP függő  $\text{Cl}^-$  áram denzitást mértek, mint pitvarokban [58], [59]. Ezzel szemben például a sejtduzzadás-aktivált  $\text{Cl}^-$  áram jelen van a legtöbb emlős fajban, a pitvarokban és a kamrákban egyaránt, de az áram denzitása különböző az egyes szívrégiókban [60], [6]. A sejtduzzadás-aktivált  $\text{Cl}^-$  áram a pitvarok területén nagyobb denzitással van jelen, mint a kamrákban, ezért a pacemaker aktivitás szabályozásában is szerepet játszhat. A protein foszforiláció- vagy sejtduzzadás-aktivált  $\text{Cl}^-$  áram aktiválódása kedvez a re-entry típusú szívritmuszavarok kialakulásának, hiszen csökkentik az APD-t és a refrakter periódust. Emellett, mivel nem egységes a megoszlásuk a szív különböző régióiban, növelhetik a repolarizáció heterogenitását, mely szintén re-entri aritmiák kialakulásának alapja lehet [59], [58].

### 3.6.1 A szívműködés kalcium-függő klorid árama

A legtöbb emlős faj szívműködés sejtjein a  $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  szerepet játszik az akciós potenciál repolarizációjában. A  $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot leírták már nyúl [9], [61], birka [62], sertés [63] és kutya [64] szívműködés sejtjein. A szívműködés sejtjeiben a tranziens kifelé irányuló áram, azaz  $\text{I}_{\text{to1}}$  és  $\text{I}_{\text{to2}}$  felelős az első fázis repolarizációjáért. A  $\text{I}_{\text{to1}}$   $\text{Ca}^{2+}$ -inszenzitív  $\text{K}^+$  áram, mely 4-AP-nel gátolható. A  $\text{I}_{\text{to2}}$  olyan  $\text{Cl}^-$  áram, melyet az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció megemelkedése aktivál, és nem gátolható 4-AP-nel. A  $\text{I}_{\text{to2}}$  a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornák aktivációjának eredményeként jön létre, és az áram az aktuális membránpotenciáltól és a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciáljától függően depolarizálja vagy repolarizálja a membránt. Ionszelektív mikroelektrodával végzett mérések alapján szívműködés sejtjeiben az intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentrációja 10-20 mmol/l-nek adódott [65], ami azt jelenti, hogy a szívműködés sejtjeiben a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálja megközelítőleg 30-50 mV-tal pozitívabb, mint a nyugalmi membránpotenciál [6] [66]. Pozitív membránpotenciál értékeknél, az akciós potenciál plateau fázisa alatt a  $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  a membránpotenciált negatív irányba mozdítja, repolarizáló áramként van jelen, csökkenti az akciós potenciál időtartamát (APD). A  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciáljától negatívabb membránpotenciálokban (nyugalomban) viszont a  $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  depolarizáló hatású és ezáltal korai és késői utódepolarizációk kialakulásához járulhat hozzá [26].

A késői utódepolarizációk (DAD-k) olyan membránpotenciál oszcillációknak tekinthetők, melyek az akciós potenciál repolarizációja után jelentkeznek [67]. A DAD-k hátterében feltehetően a  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődéskor diastole alatt jelentkező, a sarcoplasmaticus reticulumból spontán felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  állhat, mely tranziens inward áramot aktivál. Három mechanizmust

feltételeznek a DAD-k és az inward áram kialakításának hátterében: 1) az egyik mechanizmus a  $I_{Cl(Ca)}$ , melynek szerepét már több munkacsoport is felvetette. A diastole alatt a sarcoplazmaticus reticulumból a cytosolba csorgó  $Ca^{2+}$  aktiválhatja az  $I_{Cl(Ca)}$ -ot, mely depolarizálja a membránt [62] [68], [69]. 2) A spontán  $Ca^{2+}$  felszabadulás során megemelkedő intracelluláris  $Ca^{2+}$ -ot eltávolító forward módú NCX [70], mely egy  $Ca^{2+}$  szállítását három  $Na^+$  szállítására ellenében végzi, ezért működése szintén a membrán depolarizálódásához vezet. 3) A DAD-t egy nem szelektív kation áram is okozhatja [71]. A DAD-k hátterét vizsgáló kísérletek eredményei azonban ellentmondásosak. Verkerk és munkatársai demonstrálták, hogy az NCX áram és a  $I_{Cl(Ca)}$  egyaránt hozzájárulnak a tranziens inward áramhoz birka Purkinje és kamrai, és nyúl kamrai szívműködéseken [62]. Purkinje és kamrai szívműködéseken kimutatták, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  gátlása csökkentette a DAD-k kialakulásának gyakoriságát, és a triggerelt aktivitás megjelenését [72]. Ezzel szemben Sipido és munkatársai azt találták, hogy tengerimalac kamrai szívműködéseken nem mutatható ki a  $I_{Cl(Ca)}$  [73]. Ezen irodalmi adatok arra utalnak hogy a DAD kialakulásának mechanizmusa nem egységes, erős fajfüggést mutat.

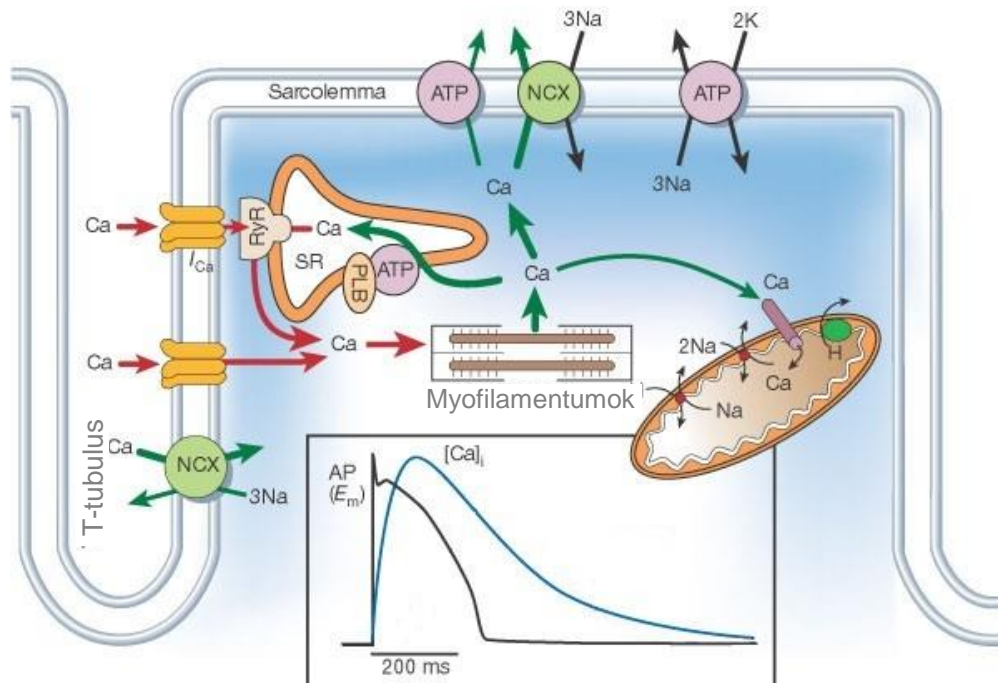
$I_{Cl(Ca)}$ -ot elektrofiziológiai tanulmányozás során a  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornát négyszögimpulzussal aktiválták, és mint 4-AP rezisztens tranziens outward áramot írták le. A depolarizáció hatására 4-AP jelenlétében egy bifázisos áramot regisztráltak, melyet  $I_{Ca,L}$  és a  $I_{Cl(Ca)}$  átfedésének vélték.  $K^+$  mentes oldatokat használva, a  $Cl^-$  egyensúlyi potenciálját megváltoztatva bizonyították, hogy a tranziens outward áram esetén a töltéshordozó a  $Cl^-$  [9].

$I_{Cl(Ca)}$  áram-feszültség összefüggést vizsgálva leírták, hogy az áram feszültségfüggése harang alakú, maximális áramamplitúdót +40 - +60 mV-nál mértek. Az áram outward rektifikációt mutatott. Az áram aktivációjához a sarcoplazmaticus reticulumból történő  $Ca^{2+}$ -felszabadulást mindenképpen szükségesnek tartották, 2-10  $\mu\text{mol/l}$  ryanodin előkezelés hatására a sejteken nem volt detektálható a  $I_{Cl(Ca)}$  [61].

### 3.7 A szívműködés kalcium homeostasisa

Ahhoz, hogy egy  $Ca^{2+}$ -függő ionáramot tanulmányozni tudjuk fiziológiai körülmények között szívműködésben, mindenképp ismernünk kell a szívciklus során bekövetkező intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció változásokat.

A szívműködés excitációs-kontrakciós kapcsolata alatt az elektromos jel mechanikai válaszá (kontrakció) való alakítását értjük. A  $Ca^{2+}$  elengedhetetlen a sejtek elektromos aktivitásához és a myofilamentumok direkt aktivátora is.



### 3. ábra A kamrai szívizomsejtek Ca<sup>2+</sup> homeosztázisa

Az ábrabetéten nyúl kamrai szívizomsejt akciós potenciálja és Ca<sup>2+</sup> tranziense látható.

NCX: nátrium/kalcium cserélő, RyR: ryanodin receptor, PLB: foszfolambán, SR: sarcoplasmaticus reticulum

Donald M. Bers: Cardiac excitation–contraction coupling. Nature. 2002 Jan 10;415(6868):198-205. Módosítva

A szívizomsejtek akciós potenciálja alatt a Ca<sup>2+</sup>-ok belépnek a sejtbe a depolarizáció hatására aktiválódó L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornákon és a reverz módú NCX-en keresztül. Általánosan elfogadott, hogy az L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornákon át belépő Ca<sup>2+</sup>-ot tekintjük a Ca<sup>2+</sup>-ok fő forrásának, a NCX által szállított Ca<sup>2+</sup> mennyisége csekély [74]. Az L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornákon keresztül beáramló Ca<sup>2+</sup>-ok inward áramot (I<sub>Ca,L</sub>) hoznak létre az akciós potenciál plateau fázisa alatt. A T-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornák expressziója alacsony a kamrai szívizomsejtekben, ezért az excitációs - kontrakciós kapcsolat során a T-típusú Ca<sup>2+</sup> áram szerepe elhanyagolható. A sejtbe jutó Ca<sup>2+</sup>-ok előidézik a sarcoplasmaticus reticulumból történő Ca<sup>2+</sup> felszabadulást. Ezt a folyamatot Ca<sup>2+</sup> indukált Ca<sup>2+</sup> felszabadulásnak (CICR) nevezik. Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció átmenetileg megnő, amit mint Ca<sup>2+</sup> tranziens tudunk mérni.

Az L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornák (más néven dihydropiridin receptorok) a sarcolemma invaginációjával létrejövő transversalis (T) tubulusokban helyezkednek el elsődlegesen [75]. A T tubulusok szoros fizikai közelségbe kerülnek a sarcoplasmaticus reticulum terminális ciszternáival, és létrehozzák a szívizomsejtekre jellemző ún. diád struktúrát. Az L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornák sarcolemma - sarcoplasmaticus reticulum jukcióknál lokalizálódnak, ahol a

sarcoplasmaticus reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadító csatornái, a ryanodin receptorok is helyet foglalnak a sarcoplasmaticus reticulum membránjában szemben az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornával [75]. Minden egyes junkcióban (T tubulus és sarcoplasmaticus reticulum membrán) 10-25 L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna foglal helyet, vele szemben 100-200 ryanodin receptor helyezkedik el és alkotnak egy lokális  $\text{Ca}^{2+}$  szignál komplexet. Az elemi sarcoplasmaticus  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást (6-20 ryanodin receptor megnyílását) sparknak nevezzük, melyet először Cheng és munkatársai írtak le [76]. Nyugalmi állapotban a  $\text{Ca}^{2+}$  sparkok véletlenszerűen, nagyon alacsony frekvenciával fordulnak elő. A szívizomösszehúzódás alkalmával felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  tranzienst) több száz elemi spark térbeli és időbeli szummációjának képzelhető el, melyet az akciós potenciál során aktiválódó  $I_{\text{Ca,L}}$  szinkronizál [77].

A  $I_{\text{Ca,L}}$  depolarizációra aktiválódik, majd idő- és  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon inaktiválódik. Ezek közül az utóbbi a domináns folyamat [13]. A cytoplasmaticus oldal felőli  $\text{Ca}^{2+}$  függő inaktiváció határt szab az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornán át beáramló  $\text{Ca}^{2+}$ -nak. Ez egy  $\text{Ca}^{2+}$ -nal való túltöltődés elleni védő mechanizmusnak is tekinthető [78].

Az ionszatornán át a sejtbe jutó  $\text{Ca}^{2+}$ -ok mellett a sarcoplasmaticus reticulumból történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás szintén hozzájárul a  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna  $\text{Ca}^{2+}$ -függő inaktivációjához [79]. Valójában a sarcoplasmaticus reticulumból történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás felelős az  $I_{\text{Ca,L}}$  inaktivációjának 50 %-áért [80]. Ezért a sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  és az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornán át beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  egy lokális negatív visszacsatolási kört hoz létre a beáramló  $\text{Ca}^{2+}$ -ra. Ha nagy mértékű a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás vagy a felszabadulás, akkor az a további  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást csökkenti, megakadályozva ezzel a  $\text{Ca}^{2+}$  túltöltődést, mely arrhythmia kiindulási alapja lehet vagy sejthalálhoz vezethet [13]. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésünkre arról, hogy az ún. junkcionális résben (junctional cleft- a sarcolemma és sarcoplasmaticus reticulum membránja közötti tér) a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja jóval magasabb értékeket érhet el, és a változás kinetikailag is sokkal gyorsabb, mint amit a cytoplazmában mérhetünk [79], [81], [82]. Amikor a  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna megnyílik a junkcionális rés  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja kevesebb, mint 1 ms alatt megemelkedhet 10-20  $\mu\text{mol/l}$ -re, mely aktiválja a ryanodin receptort, ahonnan további  $\text{Ca}^{2+}$  szabadul fel. A junkcionális résből a  $\text{Ca}^{2+}$  diffúzió útján jut a myofilamentumokhoz [13].

A szívizomsejtek relaxációjához a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot el kell távolítani a cytoplasmából. Egyensúly esetén a kontrakció alatt felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségének azonosnak kell lennie a relaxáció alatt eltávolított  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségével egy szív ciklus során, különben a sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -nal túltöltődne vagy kiürülne.

A  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítása többféle úton történhet, ezen mechanizmusok egymáshoz viszonyított aránya erős fajfüggést mutat [83]. Nyúl szívizomsejtekben a sarcoplasmaticus reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -

ATP-áz felelős a  $\text{Ca}^{2+}$  70 %-ának eltávolításáért, a NCX 28 %-ban távolítja el a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot, míg a maradék 2 %-on osztozik a a sarcolemmális  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz és a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter. A nyúlhoz képest a patkány szívműködésében a sarcoplasmaticus reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz szerepe jelentősebb, hiszen 92 %-ban vesz részt a  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolításban, a NCX pedig kisebb arányban távolítja el a  $\text{Ca}^{2+}$ -t (7 %). Az egér  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolító mechanizmusai is a patkányéhoz hasonlíthatnak. A tengerimalac, a kutya, a macska és a humán szívműködés  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítása viszont sokkal inkább a nyúlhoz áll közelebb [13].

**3.7.1 A szimpatikus stimuláció hatása a szívműködés intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjára**  
Szimpatikus izgalom során a szíven pozitív tróphatások érvényesülnek, köztük a szív fokozott kontrakciója (pozitív inotrópia) valamint gyorsabb relaxációja (pozitív lusitropia). A szimpatikus aktiváció a szív  $\beta$ -adrenerg receptorain keresztül valósul meg, melyek aktiválják a stimulatorikus heterotrimer G proteint. A  $G_{\alpha s}$  alegység disszociál a  $G_{\beta\gamma}$  alegységtől és aktiválja az adenilát cikláz (AC) enzimet, mely ATP-ből ciklikus AMP-t (cAMP) képez és a cAMP szint növekedését okozza, amely másodlagos hírvivőként funkcionál. A cAMP szint növekedése a protein kináz-A (PKA) aktiválásához vezet [13]. A kináz számos, az elektromechanikai kapcsolatban részt vevő fehérje foszforilációját okozza.

A PKA inotróp hatásának kialakításában az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák és a ryanodin receptorok foszforilálásának van szerepe. A PKA az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák foszforilálása által növeli a  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitúdóját és az aktivációját negatívabb membránpotenciálok felé mozdítja el, a ryanodin receptorok foszforilálása növeli azok nyitvatartási valószínűségét [84]. Ezen hatások eredőjeként megnő a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdója  $\beta$ -adrenerg stimuláció esetén.

A PKA lusitrop hatás a foszfolambán és a troponinI foszforilálásán keresztül valósul meg. A foszfolambán a sarcoplasmaticus reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázát tónusosan gátolja. Foszforilált állapotban kevésbé képes kifejteni gátló hatását, ezáltal felgyorsul a  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmaticus reticulumba történő visszavétele. A gyorsabb  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz a sarcoplasmaticus reticulum magasabb  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmának kialakításához is hozzájárul [85].

## 4. CÉLKITŰZÉS

A szívizomsejtek működése szempontjából a  $Cl^-$  csatornák szerepe kevésbé tisztázott. Nem teljesen ismert a  $I_{Cl(Ca)}$  kinetikája az akciós potenciál alatt, noha leírták, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  hozzájárul a szív akciós potenciál kialakításához, mint  $I_{to}$  2-es komponense. Célunk ezért a  $I_{Cl(Ca)}$  vizsgálata volt:

1. igazoljuk  $I_{Cl(Ca)}$  jelenlétét kutya szívének bal kamrájából izolált szívizomsejteken
2.  $I_{Cl(Ca)}$  gátlószereinek, a DIDS és a 9-AC hatásainak összehasonlítása, és annak eldöntése, hogy melyik alkalmasabb a  $I_{Cl(Ca)}$  sajátosságainak tanulmányozására
3. jellemezzük a  $I_{Cl(Ca)}$  membránpotenciál- és  $Ca^{2+}$ -függését
4. a  $I_{Cl(Ca)}$  szerepének tisztázása az akciós potenciál során
5. a  $I_{Cl(Ca)}$  potenciális csatornafehérjéi, a TMEM16A és Bestrophin-3 expressziójának a kimutatása humán és kutya szívizomsejteken
6. a TMEM16A és Bestrophin-3 és az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatorna fehérjék lokalizációjának megismerése

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1 Kutya szívizomsejtek izolálása

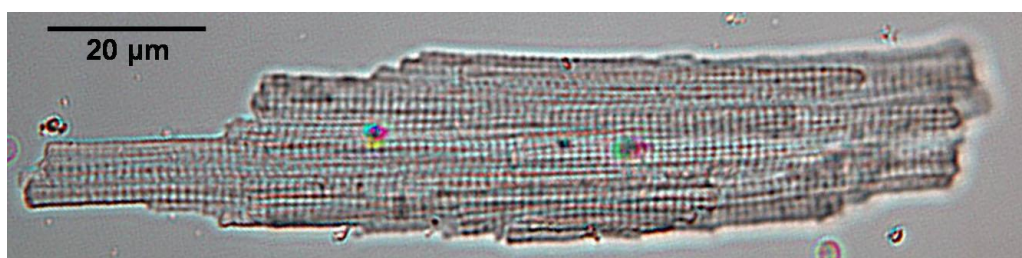
Elektrofiziológiai és immuncitokémiai vizsgálatainkat kutyák szívének bal kamrájából enzimatikusan izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket kutatási célra tenyésztett vegyes nemű, ivarérett beagle kutyák szívéből nyertük az ún. anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával [86]. Minden elvégzett kísérlet összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publication No 85-23. revised 1996) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (2/2011/DE MÁB). A laboratóriumi állatokat felhasználó összes kísérlet jelentésre került, összhangban az ARRIVE irányelvekkel [87]. A kutatás összhangban volt a „Good Publishing Practice in Physiology” elveivel is.

A 12–20 kg súlyú állatokat 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, Magyarország) és 1 mg/kg xylazin-hidroklorid (Sedaxylane, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Hollandia) intramuszkuláris injektálásával altattuk el. A mellkas megnyitása után a szívet gyorsan kimetszettük, majd hideg Tyrode oldattal mostuk át (összetételét lásd a kísérletekhez használt oldatok összetétele c. fejezetnél). A bal elülső leszálló artéria koronária ágat kanüláltuk és ezen artéria vérellátási területének megfelelően Langendorff-apparátus segítségével perfundáltuk a myocardiumot. A pitvarokat leválasztottuk. A perfúzió első 5 percében  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes, taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -tal (200 mg/l) és  $\text{NaHCO}_3$ -mal (1,4 g/l) kiegészített, szobahőmérsékletű JMM oldatot (Joklik-féle módosított Minimum Essential Medium Eagle, Sigma, termékszám: M0518; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) alkalmaztunk a szövet  $\text{Ca}^{2+}$ - és vértartalmának eltávolítása érdekében. Az oldatot folyamatosan 5 V/V %  $\text{O}_2$ -t és 95 V/V %  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazó gázkeverékkel (karbogén) ekvilibráltuk.

Az emésztést ezt követően ugyanezen JMM alapoldattal végeztük, a szívet 35-45 percig perfundáltuk az oldattal, amelyhez még kollagenázt (0,66 g/l, Type II., 245 U/mg; Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA), borjú albumint (2 g/l, Fraction V.; Sigma-Aldrich Co.) és  $\text{CaCl}_2$ -ot (50  $\mu\text{mol/l}$ ) adtunk. A sejtizolálás során a perfúziós oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. Az emésztés hatására a bal elülső, leszálló artéria ellátási területéhez tartozó szívizom elfolyósodott, sejtjeire esett szét. Az emésztés végén a bal kamra falának midmyocardiális rétegében vezetett, a szív csúcsa felé eső U alakú metszéssel tettük szabaddá a sejteket. A sejteket 50  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -ot tartalmazó módosított JMM oldatban szuszpendáltuk. A sejtszuszpenziót négy alkalommal ülepítettük, szűrtük és mostuk egyre növekvő  $\text{Ca}^{2+}$



koncentrációjú módosított JMM oldattal. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on tároltuk 2,5 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú Minimum Essential Medium Eagle (MEM, termékszám: M0643, Sigma-Aldrich Co.) oldatban, melyet taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -tal (200 mg/l) és  $\text{NaHCO}_3$ -mal (2,2 g/l) egészítettük ki. Az oldatot felhasználásig folyamatosan karbogen gázzal ekvibráltuk a kívánt 7,3-as pH eléréséhez. Az izolálás során kapott szuszpenzióban a szabályos téglalap alakú, ép harántcsíkolatú, éles szélű és tiszta citoplazmával rendelkező sejtek aránya 30 % és 60 % között változott. A sejteket az izolálást követő 36 órán belül felhasználtuk.



**4. ábra** Az elektrofiziológiai mérésekhez használt kutya bal kamrájából izolált szívizomsejt képe

## **5.2 Humán bal kamrai szívizomminták feldolgoása**

A humán szívizommintákat és izolált szívizomsejteket a Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A mintákat olyan egészséges donor szívekből nyerték, amelyekből a pulmonáris és aorta billentyűk kerültek transzplantációra. A kísérletek összhangban voltak a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérletek végrehajtását a Magyar Egészségügyi Minisztérium Tudományos és Kutatásügyi Bizottsága valamint a Szegedi Egyetem Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásügyi Bizottsága is jóváhagyta (ETT-TUKEB; No. 51-57/1997 OEJ és 4991-0/2010-1018EKU [339/PI/010]). A szívbillentyűk eltávolítását követően a szívet hideg (4 °C) cardioplégias oldatba helyezték és szállították át a Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetébe. Itt a szívizomminták egy részét folyékony nitrogénben fagyasztották és -80 °C-on tárolták felhasználásig. A többi esetben a bal kamrafal egy artériáját kanulálták és az általa ellátott szívizomterületet perfundálták Langendorff apparátus segítségével. Az emésztési folyamat nagy hasonlóságot mutatott a kutya szívizomsejtek emésztéséhez. Különbség volt viszont az emésztő oldat összetételében, mert az emésztő oldat kollagenáz (0,66 g/l, Type I, Sigma Chemicals, St. Louis MO, USA) és borjú albumin (2 g/l,

Fraction V, Sigma-Aldrich Co.) mellett elasztázt is tartalmazott (0,045 g/l Type III, Sigma Chemicals) és az emésztési folyamat ideje is hosszabb volt (45-90 perc) [88].

### 5.3 Elektrofiziológiai mérések

Kísérleteink során a sejtszuspenzióból 2-3 cseppet invertált mikroszkóp (Eclipse TE2000-U, Nikon Corporation, Tokió, Japán) tárgyasztalára rögzített, 1 ml térfogatú plexi mérőkádba cseppentettünk. A folyamatos perfúziót gravitáció-vezérelt perfúziós rendszerrel értük el. A kád és a perfundáló oldatok hőmérsékletét a kísérletek során végig 37 °C-on tartottuk. A szívizomsejteket leülepedésük után 1-2 ml/perces sebességgel áramló normál Tyrode oldattal perfundáltuk. Az elektródákat közvetlenül a kísérlet megkezdése előtt GC100F-15 boroszilikát üvegapillárisból (Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) készítettük P-2000 típusú programozható mikroelektróda-húzó (Sutter Instruments Co., Novato, CA USA) segítségével. A mérőrendszert a környezetből származó elektromágneses hullámoktól és mechanikai rezgésektől Faraday-kalitka és antivibrációs asztal (Newport Corporation, Irvine, CA, USA) védte. Az elektródát mechanikus makro- és három irányba mozgatható mikromanipulátorral (Narishige, Japán) pozicionáltuk. A mérés során kapott analóg jeleket MultiClamp 700B-vel (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) erősítettük, Digidata 1440A készülékkel (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) történő digitalizálás után (100 kHz-es mintavételezési gyakorisággal) rögzítettük, majd számítógépen tároltuk.

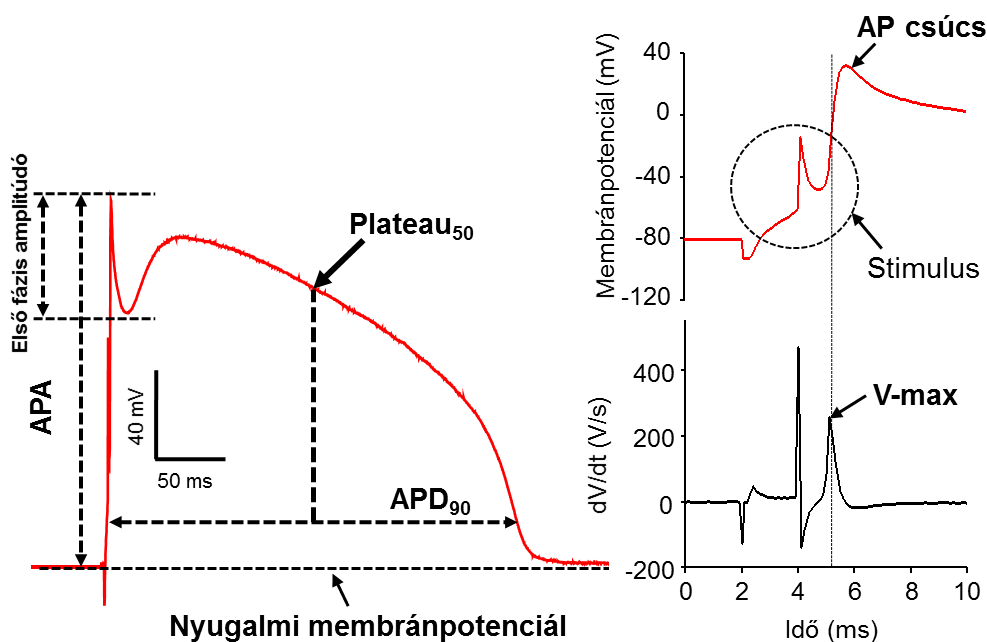


5. ábra Az elektrofiziológiai mérőrendszer felépítése

Az ábrán az elektrofiziológiai mérésekhez használt mérőrendszer vázlatos felépítése látható.

### 5.3.1 Akciós potenciálok mérése

A membránpotenciál mérésére a Volders és mtsai. által egysejtes rendszerre kidolgozott, nagyellenállású üvegmikroelektrodás eljárást alkalmaztuk [89]. Az akciós potenciálok elvezetésére 3 mol/l-es KCl-dal töltött, 25-50 M $\Omega$  ellenállású mikroelektrodát használtunk. A sejtek ingerlése a kísérletek alatt a mérőelektrodon keresztül 5 és 0,3 s közötti ciklushosszakkal folyamatosan zajlott. Az ingerlési frekvenciák változtatásakor minden esetben megvártuk amíg a steady-state állapot kialakul, ez általában 50 akciós potenciált jelentett. Az ingerlő impulzusok időtartama 1-2 ms, amplitúdójuk az ingerküszöb 120-130 %-a volt. Az akciós potenciálok kísérlet közbeni folyamatos követésére oszcilloszkópot (Hitachi VC-6025, Hitachi Ltd., Tokió, Japán) használtunk. Minden mérés során 50 egymást követő akciós potenciált rögzítettünk, kiértékelésük egy az intézetünkben fejlesztett szoftver segítségével történt. A program által kiszámított paraméterek közé tartozik a nyugalmi membránpotenciál értéke, a depolarizáció maximális sebessége ( $V_{max}$ ), az akciós potenciál amplitúdója, valamint az akciós potenciál 20, 50 illetve 90 %-os repolarizációjához tartozó időtartama (a későbbiekben  $APD_{20}$ ,  $APD_{50}$  és  $APD_{90}$ ), az első fázis repolarizáció nagysága (feszültségkülönbség az akciós potenciál csúcsa és a dómot megelőző notch között) és a  $APD_{90}$  felénél mérhető membránpotenciál ( $plateau_{50}$ ) értéke. Az akciós potenciálok kiértékeléséből kapott adatokból az ábrákat az Origin (Microcal, Northampton, USA), valamint a PowerPoint (Microsoft, Santa Rosa, USA) grafikus szoftverek segítségével készítettük.



### 6. ábra A kiértékelés során számított akciós potenciál paraméterek

Az ábra egy reprezentatív akciós potenciál segítségével mutatja be a kiértékelésnél számításra kerülő akciós potenciál paramétereket. APA: akciós potenciál amplitúdó,  $APD_{90}$ : 90%-os

repolarizációhoz tartozó akciós potenciál időtartam,  $\text{Plateau}_{50}$ :  $\text{APD}_{90}$  felénél mérhető membránpotenciál érték,  $V_{\text{max}}$ : felszálló szár meredekség

### 5.3.2 Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

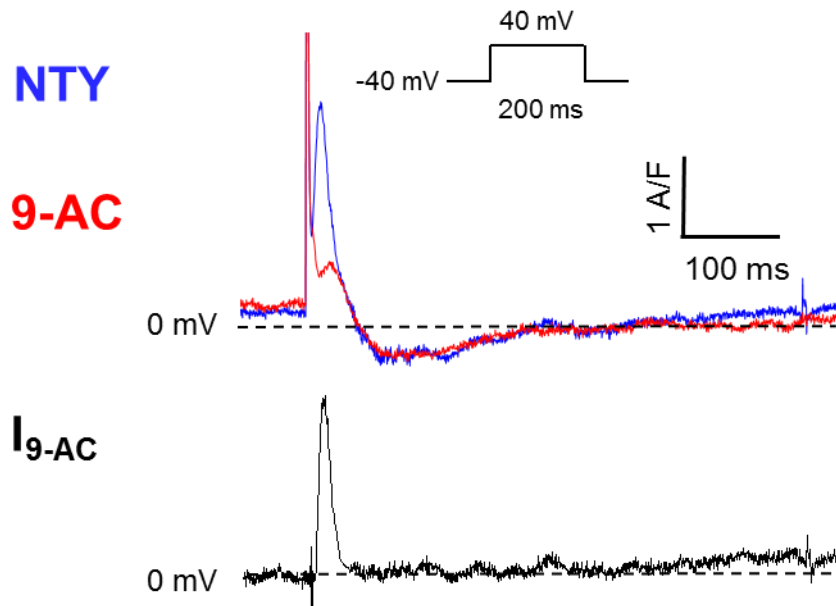
Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában [90], feszültség-clamp körülmények között rögzítettük. A mérésekhez 2-3  $\text{M}\Omega$  ellenállású mikroelektródákat (patch pipetta) használtunk. Miután a sejtek felszínét a mikropipettával megérintettük, enyhe szívást alkalmaztunk, amely segítségével egy nagy ellenállású kapcsolat ( $>1 \text{ G}\Omega$ ) jött létre. Ezt követően további szívás vagy néhány 1 ms hosszúságú 1,5 V-os elektromos impulzus alkalmazásával beszakítottuk az elektróda csúcsi része alá eső sejtmembránt. A mérések során a soros ellenállás rendszerint 3-8  $\text{M}\Omega$  volt. Amennyiben a soros ellenállás ennél nagyobb volt vagy a mérés során jelentősen emelkedett (20 %-ot meghaladóan), akkor azt a mérést elvetettük.

A patch-clamp technika egészsejtes konfigurációjában a patch pipetta oldatok közlekednek a sejtek intracelluláris terével. A belső oldat összetételének megváltoztatásával befolyásolni tudtuk például a sejt szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációját vagy  $\text{Cl}^-$  koncentrációját.

Az előzőekben ismertetett elektrofiziológiai mérőrendszer vázlata az 5. ábrán látható. Az ionáramokat minden esetben a sejt kapacitására normalizáltunk, amelyet egy 15 ms hosszú 0 mV-ról  $-10 \text{ mV}$ -ra történő hyperpolarizáló pulzus segítségével határoztunk meg. Méréseink során a sejtkapacitás 80-200 pF közötti értéknek adódott.

A  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  mérésekor az áramot gátlószer érzékeny áramként definiáltuk, azonosításhoz a kontroll körülmények között rögzített áramjelekből kivontuk a gátlószer jelenlétében mért áramjeleket. A  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  mérésekor a sejteket  $-40 \text{ mV}$  feszültségen tartottuk, majd az áramot 200 ms hosszú,  $-100 \text{ mV}$  és  $+100 \text{ mV}$  közötti, 20 mV-onként növekvő feszültséglépcsőkkel aktiváltuk 5 másodpercenként.

A 7. ábra a kontroll áramgörbéből a 9-AC jelenlétében mért áramgörbe kivonásával kapott gátlószer érzékeny áramot mutatja be a  $+40 \text{ mV}$ -os feszültséglépcső példája segítségével.



### 7. ábra A kivonás eredményeként kapott gátlószer szenzitív áram

Az ábra a +40 mV-os feszültséglépcső segítségével mutatja be a kivonás műveletét. NTY: normál Tyrode oldat,  $I_{9-AC}$ : 9-AC szenzitív áram

Az  $I_{Ca,L}$  mérésekor a  $K^+$  áramokat a belső oldatban jelenlevő 20 mmol/l tetraetilammónium-klorid (TEACl) alkalmazása mellett, a perfundáló oldathoz adott 3 mmol/l 4-aminopiridin (4-AP az  $I_{to1}$  gátlásához), 1  $\mu$ mol/l E-4031 (szelektív  $I_{Kr}$  blokkoló) és 1  $\mu$ mol/l HMR-1556 (szelektív  $I_{Ks}$  blokkoló) hozzáadásával gátoltuk.

A  $K^+$  áramok mérésekor a  $I_{Ca,L}$ -ot 5  $\mu$ mol/l nifedipinnel gátoltuk, míg a  $I_{Na}$ -ot a tartópotenciál -40 mV-ra történő beállításával inaktívtuk.

Az áram amplitúdókat a nulla vonalhoz vagy a nem inaktíváló komponenshez viszonyítva olvastuk le.

### 5.3.3 Akciós potenciál voltage-clamp technika

Méréseink során a Tyrode oldattal perfundált szívizomsejtek akciós potenciálját a patch-clamp technika teljes sejtes elrendezésében áram-clamp üzemmódban rögzítettük. A sejteket a mérő elektródán keresztül folyamatosan ingereltük 1-2 ms szélességű négyszögimpulzusok alkalmazásával, melyek amplitúdóját az ingerküszöb 110–120 %-ára állítottuk. Ezáltal az ingerlő jel és az akciós potenciál felszálló szára elkülöníthetőek voltak egymástól. Minden sejten 10 egymást követő akciós potenciált rögzítettünk és azokat átlagoltuk. Ezt követően az

erősítőt feszültség-clamp módba kapcsolva azt az egy akciós potenciált alkalmaztuk azonos ingerlési frekvencián feszültségparancsként, amelynek a fő paraméterei legközelebb voltak a tíz rögzített akciós potenciál átlagához. A saját akciós potenciált alkalmazva parancsjelként egy nulla áramjelet kaptunk (egy nagyon rövid szakasz kivételével, amely az ingerlési artefaktum és az akciós potenciál felszálló szára alatt mérhető), hiszen ebben az esetben a sejt nem igényel külső áramot saját akciós potenciálja fenntartásához. A  $I_{Cl(Ca)}$ -ot specifikus gátlószere, 9-AC segítségével tettük láthatóvá. Az akciós potenciál clamp technika alkalmazásával lehetőségünk van egynél több ionáram akciós potenciál alatti lefutásának tanulmányozására az ún. hagyma hámzás technika segítségével. Ennek lényege, hogy az egyes ionáramokat specifikus gátlószereik vagy aktivátoraik hozzáadásával tudjuk láthatóvá tenni. A mérések során az egyes ionáramok a hagyma leveleihez hasonlóan lehámozhatóak az adott ionáram specifikus gátlószereinek vagy aktivátorának perfundáló oldathoz való adásával annak egyensúlyi hatásának beállta után. Az ionáramokat ez esetben az adott szerre szenzitív áramként definiáljuk. Az ionáram profilját a szermentes görbéből a szer jelenlétében rögzített görbe kivonásával tehetjük láthatóvá. A következő vizsgálni kívánt ionáramot a specifikus gátlószereinek vagy aktivátorának segítségével, az előzőekhez hasonlóan vizualizáljuk. Az egyes ionáramokat a következő farmakonok segítségével metszettük ki: 0,5 mmol/l 9-AC-at a  $I_{Cl(Ca)}$ , 1  $\mu$ mol/l nisoldipine-t az  $I_{Ca,L}$ , 10 nmol/l isoproterenolt az  $I_{ISO}$  és 20 nmol/l Bay K8644-et a  $I_{Bay K8644}$  vizsgálatára. Az ionáramokat a sejtkapacitásra normalizálva ábrázoltuk.

#### 5.4 Intracelluláris kalcium mérés

Az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  szint változás követésére epifluoreszcens technikát alkalmaztunk. A sejteket a rációmetrikus Fura-2 membrán permeábilis formájával (Fura-2-AM), Pluronic F-127 jelenlétében, töltöttük 10-30 percig szobahőmérsékleten Tyrode oldatban. A sejtszuspenziót a korábban leírt mérőrendszer plexikádjába cseppentettük. A sejteket vagy téringerléssel stimuláltuk egy pár platina elektródával, vagy négyszögimpulzussal hegyes mikroelektródán keresztül, mely utóbbi esetben a sejtek akciós potenciálját is szimultán rögzíteni tudtuk.

A sejteket xenon lámpa (Ushio Deutschland GmbH, Steinhöring, Németország) 340 és 380 nm hullámhosszú fényével gerjesztettük. Az excitációs hullámhossz változtatását kettős hullámhossz excitációs monokromátor és a hozzá csatlakoztatott Photon Technology International (PTI) Delta Scan<sup>TM</sup> (New Brunswick, NJ, USA) berendezés biztosítja. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en fotoelektron-sokszorozó (PMT R1527P,

Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH., Herrsching am Ammersee, Németország) segítségével detektáljuk 500 Hz-es mintavételezési frekvenciával.

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint változására a nem specifikus háttér intenzitás levonását követően a két hullámhosszon történő gerjesztés során mért (FeliX32 Software és Brytebox Interface) fluoreszcencia-értékek hányadosából ( $R = F_{340}/F_{380}$ ) következtettünk. Minden mérés estén tíz egymást követő  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienszt átlagoltunk, meghatároztuk a diastoles  $\text{Ca}^{2+}$  szintet, valamint a tranziens amplitúdóját.

## 5.5 Sejtrövidülés mérése

A sejtrövidülés mérése során a sejteket egy pár platina elektróda segítségével 1 Hz frekvenciával alkalmazott supramaximális ingerrel stimuláltuk 37 °C-on (Advent Research Materials Ltd., Oxford, Anglia). Az optikai jeleket (video edge detector system, VED-105, Crescent Electronics, Sandy, Utah, USA) Digidata 1440A (Molecular Devices) A/D átalakító segítségével, 240 Hz mintavételi frekvenciával digitalizáltuk. Az adatok kiértékelése során 10 egymást követő sejtrövidülést átlagoltunk és meghatároztuk a paramétereit (alapvonal, csúcserték, amplitúdó). A sejtrövidülés mértékét a diastoles sejthossz százalékában fejeztük ki.

## 5.6 Immunfestés

A kutya kamrai szívmintákat üveg fedőlemezre ülepítettük 2-3 órán át 37 °C-on. Az izolált sejteket paraformaldehiddel (4 %, 15 perc, 22 °C) fixáltuk. Az egészséges humán szívmintákból izolált kamrai szívmintákat tárgylemezre ülepítettük, majd etanolos fixálást követően a mintákat teljesen kiszárítva, -20°C-on tartottuk további feldolgozásig. Immunjelölést megelőzően a humán mintákat rehidráltuk 5% BSA oldatban 2-3 órán át. Ezt követően három alkalommal mostuk a mintákat (10 perc, 100mM glicint tartalmazó Phosphate Buffered Saline (PBS) vagy PBS-Tween20 oldatokkal). A sejteket Triton-X-100 (10 perc, 22 °C) alkalmazásával permeabilizáltuk, majd a nem specifikus kötőhelyek blokkolását 1, illetve 4 % borjú szérum albuminnal (BSA) történő inkubálással valósítottuk meg (30 perc illetve 60 perc, 22 °C). A mintákat ezt követően a következő elsődleges antitestekkel jelöltük: nyúlban termeltetett TMEM16A elleni antitest (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:200), kecskében termeltetett Bestrophin-3 elleni antitest (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), nyúlban termeltetett  $\text{Ca}_v1.2$  elleni antitest (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), egérben termeltetett ryanodin receptor elleni antitest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA; 1:200), vagy

egérben termeltetett cytochrome c elleni antitest (Santa Cruz Biotechnology 1:200). Az elsődleges antitesteket 1 % BSA oldatban hígítva, egész éjen át alkalmaztuk 4 °C-on. Másnap háromszor 10 perces PBS-sel történő mosást követően alkalmaztuk a megfelelő másodlagos antitesteket: biotinilált nyúl ellen, egér ellen vagy kecske ellen termeltetett antitest (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, 1:300, 45 perc, 22 °C). Az immunfestés utolsó specifikus lépése a Streptavidine Alexa488-al (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; 1:100, 30 perc, 22 °C) történő inkubáció, illetve Cy3-jelölt, egér vagy nyúl elleni jelölés volt (Vector Labs; 1:500, 60 perc, 22 °C). A mintákat a sejtmagokat is jelölő 4',6-diamidino-2-fenilindol-t (DAPI, Vector Labs.) tartalmazó Vectashield mounting medium-mal fedtük. A fluoreszcens jelöléseket Zeiss lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal detektáltuk (Zeiss LSM 510 Meta; 488, 543 és 405 nm excitációs hullámhosszakat használva, 40x olaj immerziós objektívvel). Annak érdekében, hogy számszerűsítsük a fluorofórok ko-lokalizációjának mértékét, Pearson korrelációs koefficiens határoztunk meg Zeiss LSM510 Software segítségével. A Pearson-féle korrelációs együttható a mérések közötti lineáris kapcsolat szorosságát méri. A Pearson-féle korrelációs együtthatót az alábbi képlettel számítottuk:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})(y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2}}$$

ahol

r a korrelációs együttható értéke

$x_i$  és  $y_i$  a két változóra vett minták

A korrelációs együttható értéke mindig  $-1$  és  $+1$  között van. Ha az r értéke közel van  $+1$ -hez vagy  $-1$ -hez, akkor a két változó között szoros korreláció van.

## 5.7 Méréseinkhez használt oldatok összetétele

Tyrode oldat: 144 mmol/l NaCl; 5,6 mmol/l KCl; 2,5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>; 1,2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 5 mmol/l HEPES és 10 mmol/l glükóz (pH=7,4).

Az akciós potenciál feszültség-clamp mérésekor használt pipettaoldat összetétele (puffer nélkül): 110 mmol/l K-aszpartát; 45 mmol/l KCl; 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 5 mmol/l HEPES; és 3 mmol/l K<sub>2</sub>-ATP (pH=7,2).



Az akciós potenciál feszültség-clamp mérésekor használt pipettaoldat összetétele (EGTA): 100 mmol/l K-aszpartát; 45 mmol/l KCl; 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 5 mmol/l HEPES; 10 mmol/l EGTA és 3 mmol/l K<sub>2</sub>-ATP (pH=7,2).

Az akciós potenciál feszültség-clamp mérésekor használt pipettaoldat összetétele (BAPTA): 100 mmol/l K-aszpartát; 45 mmol/l KCl; 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 5 mmol/l HEPES; 10 mmol/l BAPTA és 3 mmol/l K<sub>2</sub>-ATP (pH=7,2).

A I<sub>Ca,L</sub> mérésekor a pipetták feltöltésére az alábbi összetételű oldatot használtuk: 110 mmol/l KCl; 40 mmol/l KOH; 10 mmol/l HEPES; 10 mmol/l EGTA; 20 mmol/l TEACl és 3 mmol/l K<sub>2</sub>-ATP (pH=7,2).

A K<sup>+</sup> áramok mérésekor a belső oldat összetétele a következő volt: 110 mmol/l K-aszpartát, 45 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l EGTA, 3 mmol/l K<sub>2</sub>-ATP, 0,25 mmol/l GTP, 5 mmol/l HEPES (pH=7,4).

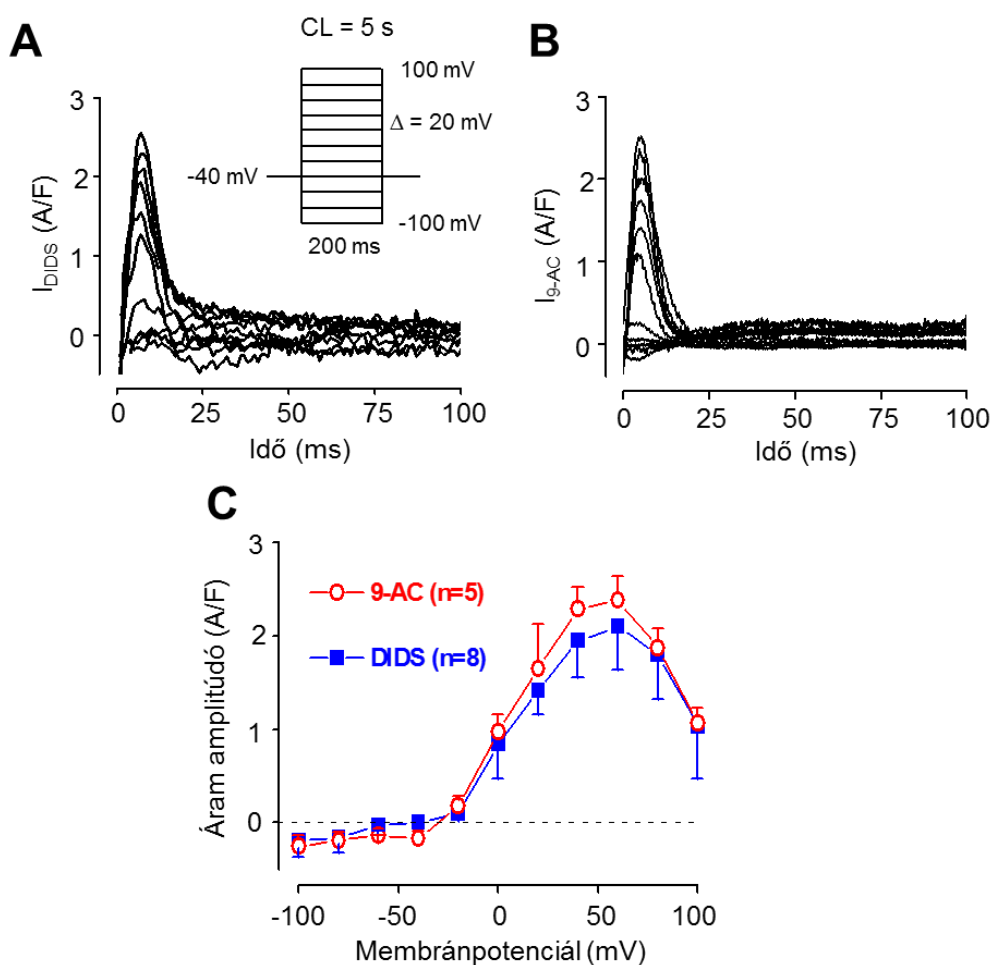
## 5.8 Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei  $\pm$  a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos variancianalízist, Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollos t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdéseknek megfelelően. Az adatok között az eltéréseket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1 A kalcium-függő kloridáram jellemzése négyszögimpulzusok alkalmazásával

A  $I_{Cl(Ca)}$ -ot 9-AC- vagy DIDS-érzékeny áramként azonosítottuk. A sejteket  $-100$  mV és  $+100$  mV közötti membránpotenciál tartományban,  $20$  mV-onként növekvő,  $200$  ms hosszú négyszögimpulzusokkal stimuláltuk öt másodpercenként. A méréseket  $Ca^{2+}$  puffert nem tartalmazó belső oldattal végeztük. Kontrollnak tekintettük a gátlószer nélkül mért áramgörbéket. A kontroll áramgörbék felvételét követően a sejteket a két gyakorta használt klorid áram blokkolóval,  $0,5$  mmol/l 9-AC-val vagy  $0,2$  mmol/l DIDS-sel perfundáltuk, majd a gátlás kialakulása után ismét rögzítettük az áramgörbéket. A 9-AC-, illetve DIDS-szenzitív áramgörbéket úgy kaptuk meg, hogy kivontuk a kontroll körülmények között rögzített áramokból a gátlószer jelenlétében mért áramgörbéket (8. ábra A és B).



#### 8. ábra A $I_{Cl(Ca)}$ feszültségfüggése kutya kamrai szívizomsejteken

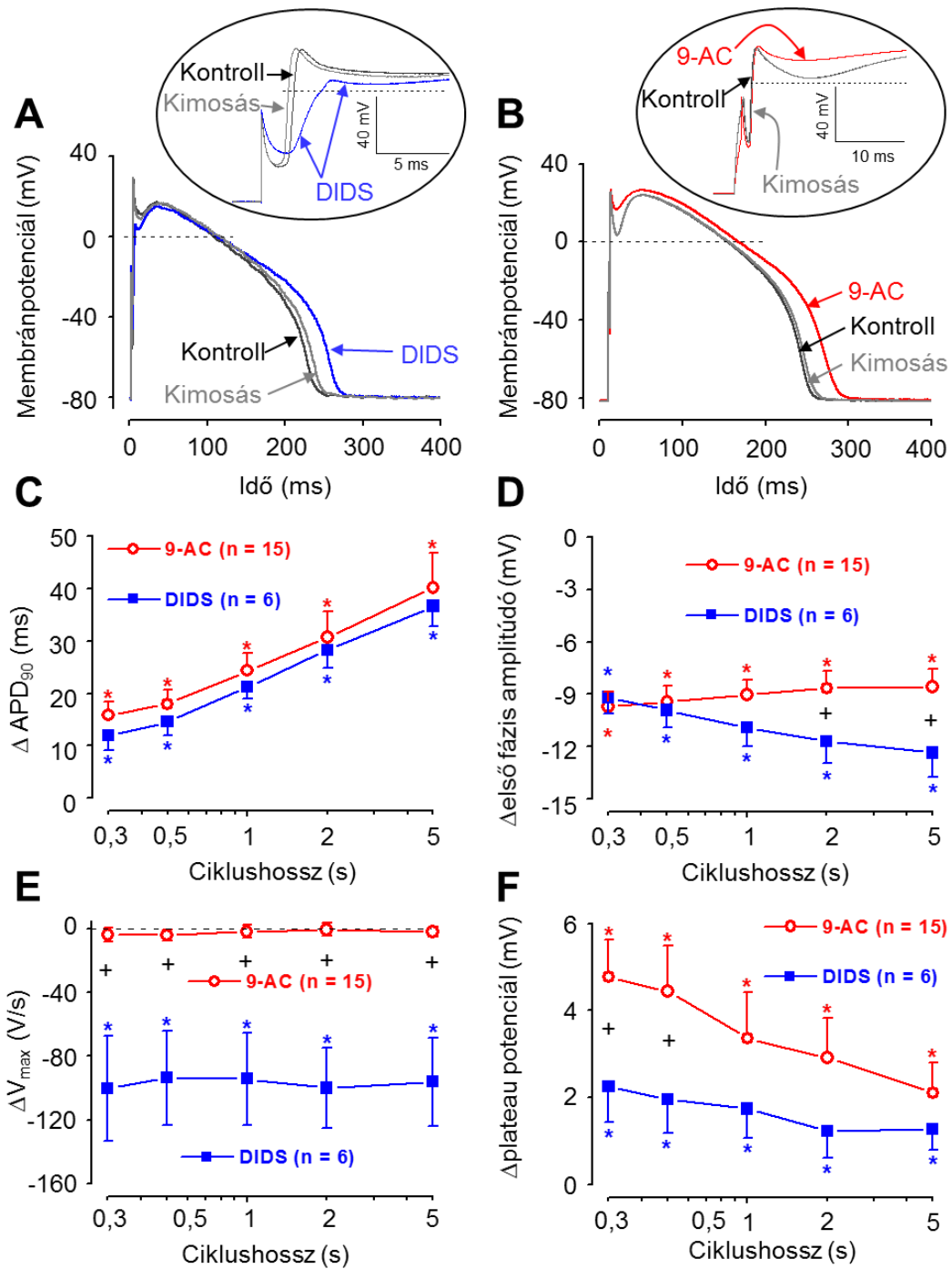
Az ionáramokat  $-100$  és  $+100$  mV közötti depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. Az ábrabetéten az alkalmazott feszültségparancsok láthatók. (A) Reprezentatív DIDS szenzitív, és

(B) 9-AC szenzitív áramgörbék. (C) A 9-AC és DIDS szenzitív áramok feszültségfüggése. Az  $n$  a mérések számát jelöli.

Eredményeink azt mutatják, hogy a 9-AC és a DIDS-szenzitív áram 15 ms-on belül aktiválódott, és az áram amplitúdója 30 ms-on belül gyakorlatilag nullára csökkent.  $-40$  mV vagy annál negatívabb membránpotenciálok esetén negatív irányú kitéréseket, azaz inward áramokat kaptunk,  $-40$  mV-tól pozitívabb membránpotenciál tartományban pedig pozitív, azaz outward áramokat mértünk. A gátlószer-szenzitív áram amplitúdóját a maximális áram és az impulzus végén mérhető áram különbségeként határoztuk meg. A sejtkapacitásra normalizált áram amplitúdókat az ingerlő impulzusok függvényében ábrázoltuk (8. ábra C). Megállapítottuk, hogy a 9-AC- és DIDS-érzékeny áram amplitúdók nem különböznek szignifikánsan egymástól. Az áram-feszültség görbe mindkét gátlószer jelenlétében hasonló lefutású, harang alakú görbe. Legnagyobb áram amplitúdókat  $+60$  mV membránpotenciál esetén mértünk.

## **6.2 A 9-AC és a DIDS hatása a kamrafal midmyocardiális sejtjeinek akciós potenciáljára**

A két gátlószer akciós potenciál morfológiára kifejtett hatását a kamrafal középső rétegéből származó, midmyocardiális sejteken vizsgáltuk. Az akciós potenciálokat supramaximális négyszögimpulzusokkal váltottuk ki, az ingerlési ciklushosszakat  $0,3$  s és  $5$  s között változtattuk ( $0,3$  s;  $0,5$  s;  $1$  s;  $2$  s; és  $5$  s hosszú ingerlési ciklusokat alkalmaztunk). Kontrollnak a normál Tyrode oldattal perfundált sejtek akciós potenciálját tekintettük. A kontroll akciós potenciálok felvételét követően (leghosszabb ciklushossz felől haladva a legrövidebb felé), a sejteket  $0,2$  mmol/l DIDS vagy  $0,5$  mmol/l 9-AC tartalmú normál Tyrode oldattal perfundáltuk. A gátlószer hatása minden esetben  $7-8$  perc alatt kialakult, és stabil maradt. Ekkor ismételtén rögzítettük az akciós potenciálokat az  $5$  különböző ingerlési ciklushosszon. A mérés sorozat végén a sejteket ismét gátlószermentes, normál Tyrode oldattal perfundáltuk.



**9. ábra A 9-AC és DIDS akciós potenciál morfológiára kifejtett hatásának összehasonlítása**

Reprezentatív hegyes mikroelektrodával mért akciós potenciálok 0,2 mmol/l DIDS (A) és 0,5 mmol/l 9-AC jelenlétében. A bekarikázott ábrabetéten az akciós potenciálok első 15-20 ms-ának nagyítása látható. A 90%-os repolarizációnál mért akciós potenciál időtartam változás (C), első fázis repolarizáció amplitúdó változás (D), a felszálló szár maximális sebesség változás (E) és a plateau potenciál változás (F) az ingerlési frekvencia függvényében ábrázolva. A szimbólumok a mérések átlagait illetve a középérték közepes hibáját (SEM) demonstrálják.

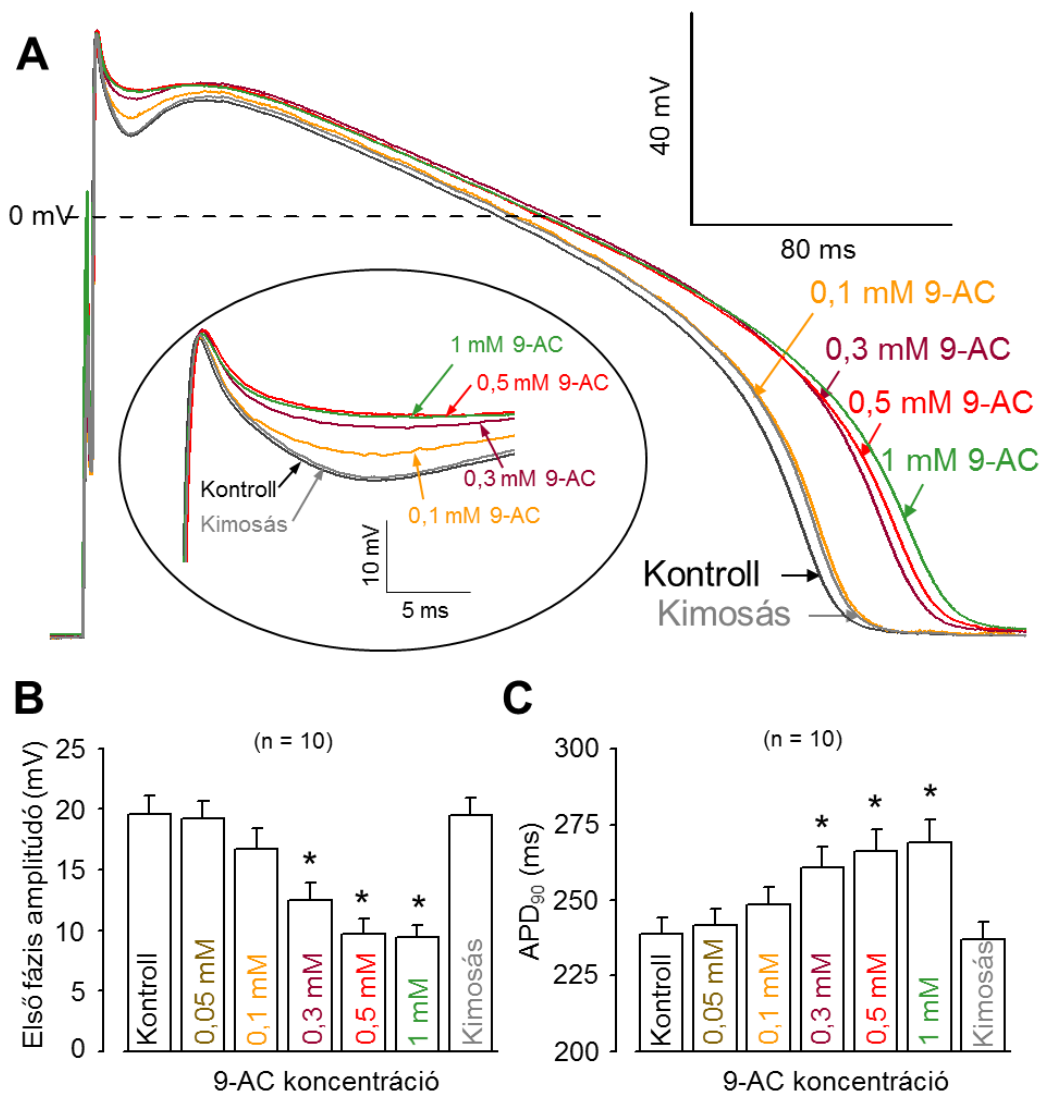
Megállapítottuk, hogy 0,2 mmol/l DIDS hatására az akciós potenciál időtartama megnőtt és az első fázis repolarizáció amplitúdója lecsökkent. Emellett azt is megfigyeltük, hogy DIDS alkalmazása esetén lecsökkent az akciós potenciál felszálló szárának a meredeksége is. Ezen hatások reverzibilisnek bizonyultak, hiszen a DIDS kimosásakor a kontrollhoz hasonló akciós potenciálokat mértünk. A 9-AC perfúziójakor is hasonló eltéréseket tapasztaltunk, nevezetesen a 9-AC is nyújtotta az akciós potenciált és csökkentette az első fázis repolarizáció mértékét, de az akciós potenciál felszálló szárának meredekségét nem változtatta meg. A DIDS-sel, illetve a 9-AC-val végzett mérések eredményeit átlagolva megállapítottuk, hogy a vizsgált ingerlési frekvencia tartományban mindkét gátlószer szignifikánsan megnövelte az APD<sub>90</sub> értékét a kontrollhoz képest (n=6, illetve n=15). 1 s-os ingerlési ciklushosszon DIDS hatására az APD<sub>90</sub> értéke 21,21±2,19 ms-mal nőtt meg, míg a 9-AC 24,3±3,3 ms-mal növelte ezen paramétert (p<0,05). Az APD<sub>90</sub> változás mindkét gátlószer esetén fordított frekvenciafüggőnek bizonyult. Ez azt jelenti, hogy a gátlószer okozta APD<sub>90</sub> változás nagyobb volt hosszabb ingerlési ciklushosszak, azaz alacsonyabb ingerlési frekvenciák esetén. Mindkét gátlószer szignifikáns mértékben csökkentette az első fázis repolarizáció nagyságát, de a ciklushossztól való függésük különbözött. A 9-AC az összes ciklushosszon azonos mértékben csökkentette az első fázis repolarizáció nagyságát. A DIDS rövidebb ciklushosszaknál a 9-AC-hoz hasonló gátlást okozott, viszont magasabb ciklushosszak esetén (2 és 5 s) a csökkenés mértéke szignifikánsan nagyobb volt. 2 s-os ciklushossz esetén a 9-AC és a DIDS rendre 8,7±1,0 mV-tal és 11,7±1,3 mV-tal csökkentette az első fázis repolarizáció amplitúdóját, 5 s-os ciklushossznál a változás 8,6±1,0 mV és 12,3±1,4 mV volt 9-AC, illetve DIDS esetén (p<0,05).

A DIDS szignifikánsan csökkentette az APA és a V<sub>max</sub> értékét is, 1 s-os ciklushosszon a V<sub>max</sub> értékének csökkenése -94,2±28,9 V/s volt (p<0,05). A V<sub>max</sub> változása arányos a feszültségfüggő Na<sup>+</sup> csatornák aktivitásával [91]. A 9-AC nem befolyásolta ezen paramétert, 250,0±16,8 V/s-nak és 248,2±17,4 V/s-nak adódott kontroll körülmények között, illetve 9-AC jelenlétében. A plateau<sub>50</sub> értékét mindkét gátlószer növelte, 1 s-os ciklushossz esetén a 9-AC 3,4±1,1 mV-tal a DIDS pedig 1,7±0,7 mV-tal. Azonban míg a DIDS hatása független volt a ciklushosszaktól, addig a 9-AC plateau<sub>50</sub> emelő hatása nagyobb mértékű volt alacsonyabb ciklushosszak esetén. A nyugalmi membránpotenciál értékét egyik gátlószer sem befolyásolta szignifikáns mértékben.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a 9-AC ugyanolyan hatásos I<sub>Cl(Ca)</sub> gátlószer kutya szívműködésén, mint a korábban gyakorta alkalmazott DIDS, viszont nem befolyásolja a feszültségfüggő Na<sup>+</sup> csatornák működését, ezért további méréseinkben egyedül a 9-AC-t alkalmaztuk a I<sub>Cl(Ca)</sub> vizsgálatára.

### 6.3 A 9-AC dózisfüggő hatása az akciós potenciál paramétereire

A megfelelő 9-AC koncentrációnak a kiválasztásához vizsgáltuk a 9-AC koncentráció-függő hatásait az akciós potenciál paramétereire. A 9-AC-t 0,05 mmol/l és 1 mmol/l koncentráció tartományban kumulatív módon alkalmaztuk. Újabb dózis alkalmazása előtt minden esetben legalább 8 percet vártunk a hatás beállításához. A sejteket 1 s-os ingerlési ciklushosszak mellett folyamatosan ingereltük.



**10. ábra** A 9-AC különböző koncentrációinak hatása az akciós potenciál paramétereire

(A) Reprezentatív hegyes mikroelektrodával mért akciós potenciálok kontroll körülmények között illetve különböző 9-AC dózisok jelenlétében. A bekarikázott ábrabetét az akciós potenciál első 20 ms-ának nagyítása. Az APD<sub>90</sub> (B) és az első fázis repolarizáció amplitúdó értékeinek (C) változása kontroll illetve növekvő 9-AC koncentrációk jelenlétében valamint a gátlószer kimosását követően. A \* jelöli, ha a változás a kontrollhoz képest szignifikánsnak adódott (p < 0,05). Az n a mérések számát jelöli.

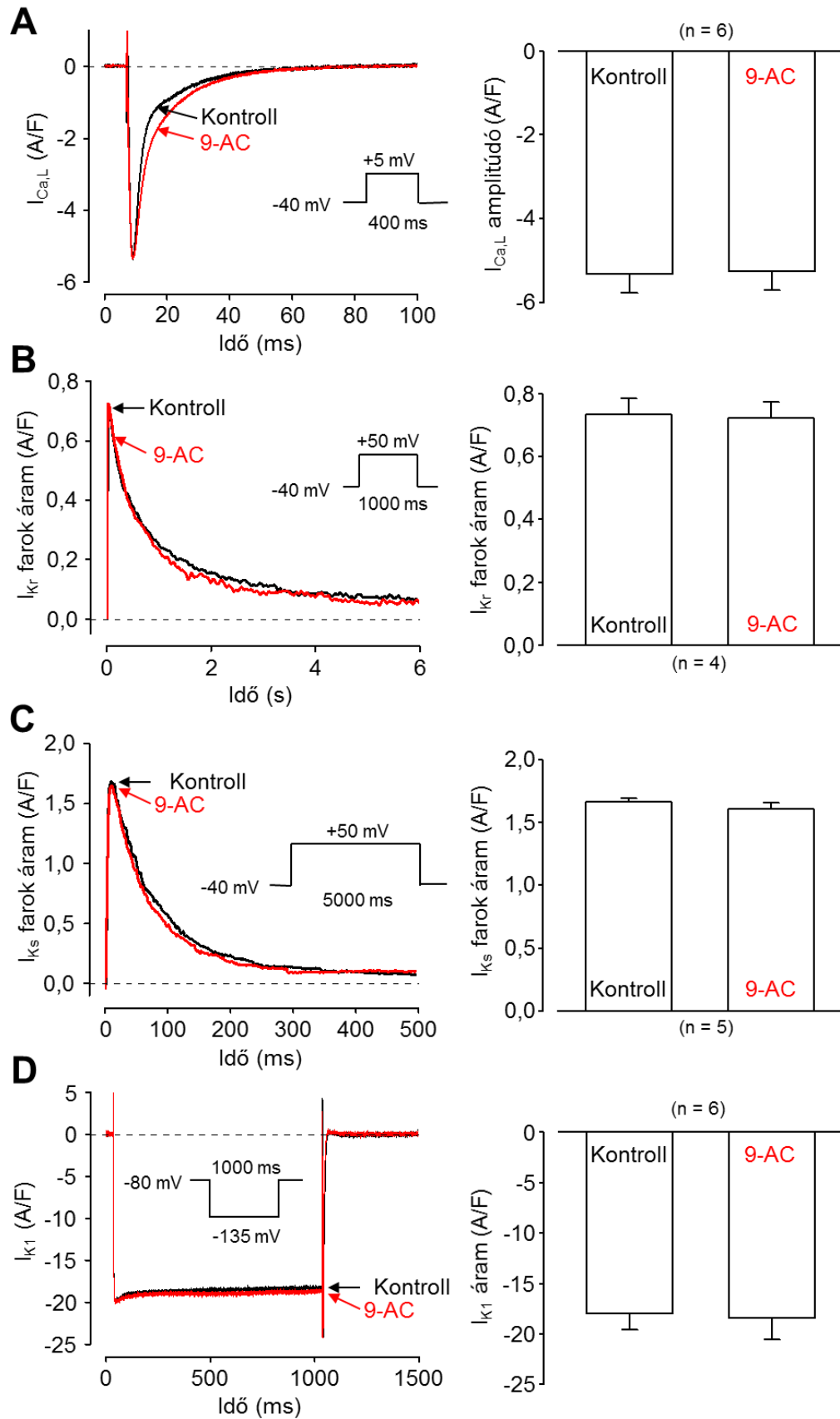
Eredményeink azt mutatták, hogy a 9-AC akciós potenciál nyújtó és első fázis repolarizációt csökkentő hatásai dózisfüggő módon alakultak ki. 0,3 mmol/l az a legkisebb 9-AC dózis, mely

szignifikáns APD és első fázis repolarizáció változásokat okozott. A 0,5 mmol/l 9-AC tovább csökkentette az első fázis repolarizációt, és nyújtotta az APD-t. Az 1 mmol/l koncentrációjú 9-AC már nem okozott további változást az akciós potenciál paramétereiben, és még ebben a koncentrációban sem tapasztaltunk csökkenést az akciós potenciál felszálló szárának meredekségében.

#### **6.4 A 9-AC hatása az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramokra**

Ahhoz, hogy a 9-AC-at megbízhatóan alkalmazzuk akciós potenciál clamp mérésekben, fontos volt megvizsgálnunk, hogy mennyire tekinthető specifikus gátlószernek, azaz 0,5 mmol/l koncentrációban milyen mértékben befolyásolja az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramokat. Ezeket a méréseket négyszögimpulzusok alkalmazásával feszültség-clamp körülmények között végeztük. A sejteket ebben az esetben is legalább nyolc percig perfundáltuk 9-AC-vel.

A  $I_{Cl(Ca)}$   $Ca^{2+}$ -függő természete miatt az áram vizsgálata során elengedhetetlen, hogy olyan gátlószert alkalmazzunk, melynek nincs hatása az L-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornára. Ezért elsőként a 9-AC  $I_{Ca,L}$ -ra gyakorolt hatását vizsgáltuk.



**11. ábra 9-AC hatása az ionáramokra**

A kontroll, illetve 0,5 mmol/l 9-AC jelenlétében mért  $I_{Ca,L}$  (A),  $I_{Kr}$  (C),  $I_{Ks}$  (E) és  $I_{K1}$  (G). Az oszlopok a mérések átlagait illetve a középérték közepes hibáját (SEM) demonstrálják. Az  $n$  a mérések számát jelöli.



Az  $I_{Ca,L}$ -ot 400 ms hosszú  $-40$  mV tartófeszültségről  $+5$  mV-ra történő depolarizáló négyszögimpulzussal aktiváltuk 5 másodpercenként ismételve (0,2 Hz). Megállapítottuk, hogy 0,5 mmol/l 9-AC nem befolyásolta szignifikánsan az  $I_{Ca,L}$  amplitúdóját, mely  $-5,34 \pm 0,44$  A/F-nak adódott kontroll körülmények között, illetve  $-5,27 \pm 0,44$  A/F volt 9-AC jelenlétében (n.s., n=6).

A kutya akciós potenciál repolarizációjában jelentős szereppel bír a  $I_{Kr}$  és a  $I_{Ks}$ . Az áramok gátlása akciós potenciál időtartam növekedést okoz. Ezért a 9-AC APD-ot növelő hatásának elemzésekor fontos volt, hogy elkülönítsük a 9-AC-nak a repolarizáló áramra kifejtett esetleges gátló hatását.

A 9-AC  $I_{Kr}$ -re gyakorolt hatásának tanulmányozására a sejteket  $-40$  mV tartófeszültségről  $+50$  mV-ra depolarizáltuk 1 s-ig, majd a membránpotenciált ismét  $-40$  mV-ra állítottuk. Az impulzusprotokollt 20 s-onként ismételtük (0,05 Hz). A  $I_{Kr}$ -ét a depolarizáló impulzus kikapcsolásakor fennmaradó farokáram amplitúdójának mérésével jellemeztük. Megállapítottuk, hogy a 9-AC alkalmazása nem volt hatással a  $I_{Kr}$  farokáram amplitúdójára, az áramdenzitások  $0,73 \pm 0,05$  A/F-nak és  $0,72 \pm 0,05$  A/F-nak adódtak kontroll, illetve 9-AC jelenlétében (n.s.; n=4).

A  $I_{Ks}$ -ét 5 s hosszú  $+50$  mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk. A tartófeszültség  $-40$  mV, az ingerlési frekvencia 0,1 Hz volt. Az impulzust követően a membránpotenciált ismét  $-40$  mV feszültségre állítottuk. A  $I_{Ks}$ -t szintén a farokáram amplitúdójának mérésével jellemeztük. Öt sejten mért adatok alapján elmondható, hogy a  $I_{Ks}$  amplitúdója nem változott 9-AC hatására, a sejtkapacitásra normalizált áram amplitúdó  $1,66 \pm 0,03$  A/F és  $1,61 \pm 0,05$  A/F volt kontroll körülmények között, illetve 9-AC perfúziója során.

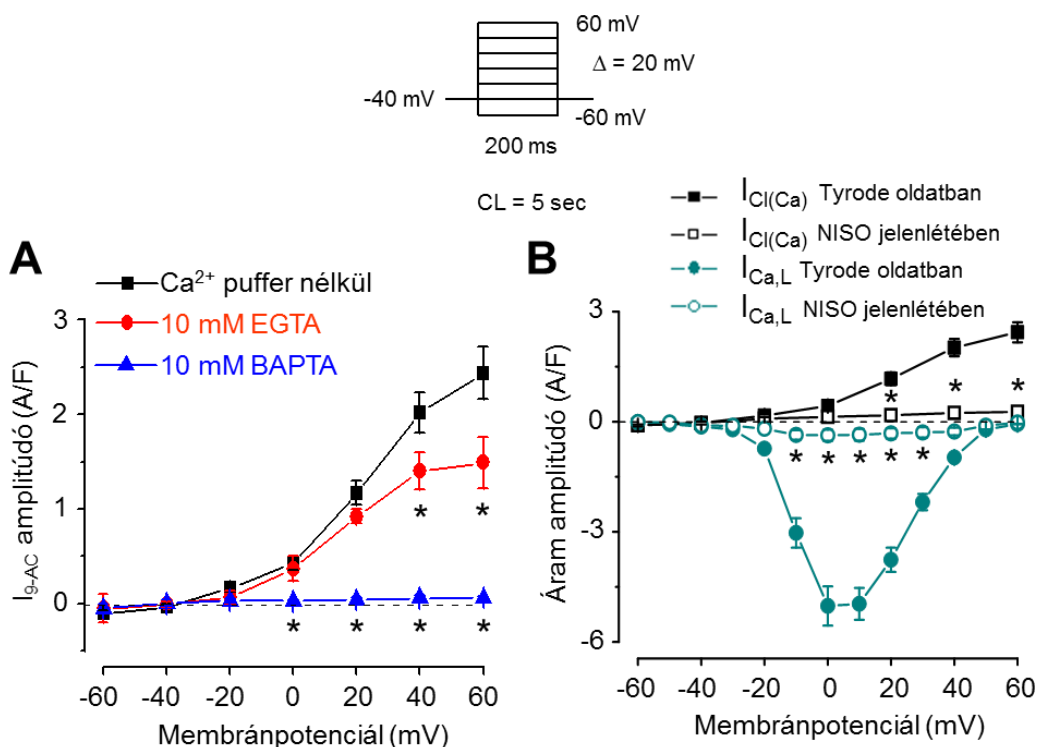
Az akciós potenciál késői repolarizációjában a  $I_{K1}$  is szerepet játszik. A  $I_{K1}$  vizsgálatához a sejteket  $-80$  mV-ról  $-135$  mV-ra történő hiperpolarizáló impulzusokkal aktiváltuk. A 0,2 Hz frekvenciájú impulzusok hossza 1 s volt. A  $I_{K1}$  amplitúdóját az impulzusok végén határoztuk meg.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a 9-AC nem változtatta meg az áram amplitúdóját, mely hat sejten átlagolva  $-18,00 \pm 1,54$  és  $-18,36 \pm 2,16$  A/F-nak adódott kontroll körülmények között, illetve 9-AC jelenlétében.

## 6.5 A $Ca^{2+}$ -függő $Cl^-$ áram $Ca^{2+}$ -függésének tanulmányozása

A  $I_{Cl(Ca)}$   $Ca^{2+}$ -függésének tanulmányozásához két eltérő  $Ca^{2+}$  kötési kinetikával rendelkező kelátort, az EGTA-t és a BAPTA-t alkalmaztuk intracellulárisan. A BAPTA  $Ca^{2+}$  kötési

kinetikája mintegy két nagyságrenddel gyorsabb, mint az EGTA-é. A méréseket konvencionális feszültség-clamp körülmények között végeztük. A  $I_{Cl(Ca)}$ -t ez esetben is 9-AC-szenzitív áramként definiáltuk, és  $-60$  és  $+60$  mV közötti depolarizáló impulzusokkal aktiváltuk.



### 12. ábra A $I_{Cl(Ca)}$ $Ca^{2+}$ függése kutya kamrai szívműsejteken

(A) A  $I_{Cl(Ca)}$  membránpotenciál függése  $Ca^{2+}$  puffer nélkül, 10 mmol/l EGTA és 10 mmol/l BAPTA jelenlétében. (B) A  $I_{Cl(Ca)}$  és  $I_{Ca,L}$  áram-feszültség összefüggése Tyrode oldat és 1  $\mu$ mol/l nisoldipin (NISO) jelenlétében. A \* jelöli a szignifikáns eltérést a Tyrode oldatban mért adatokhoz képest ( $p < 0,05$ ). Az  $n$  a mérések számát jelöli.

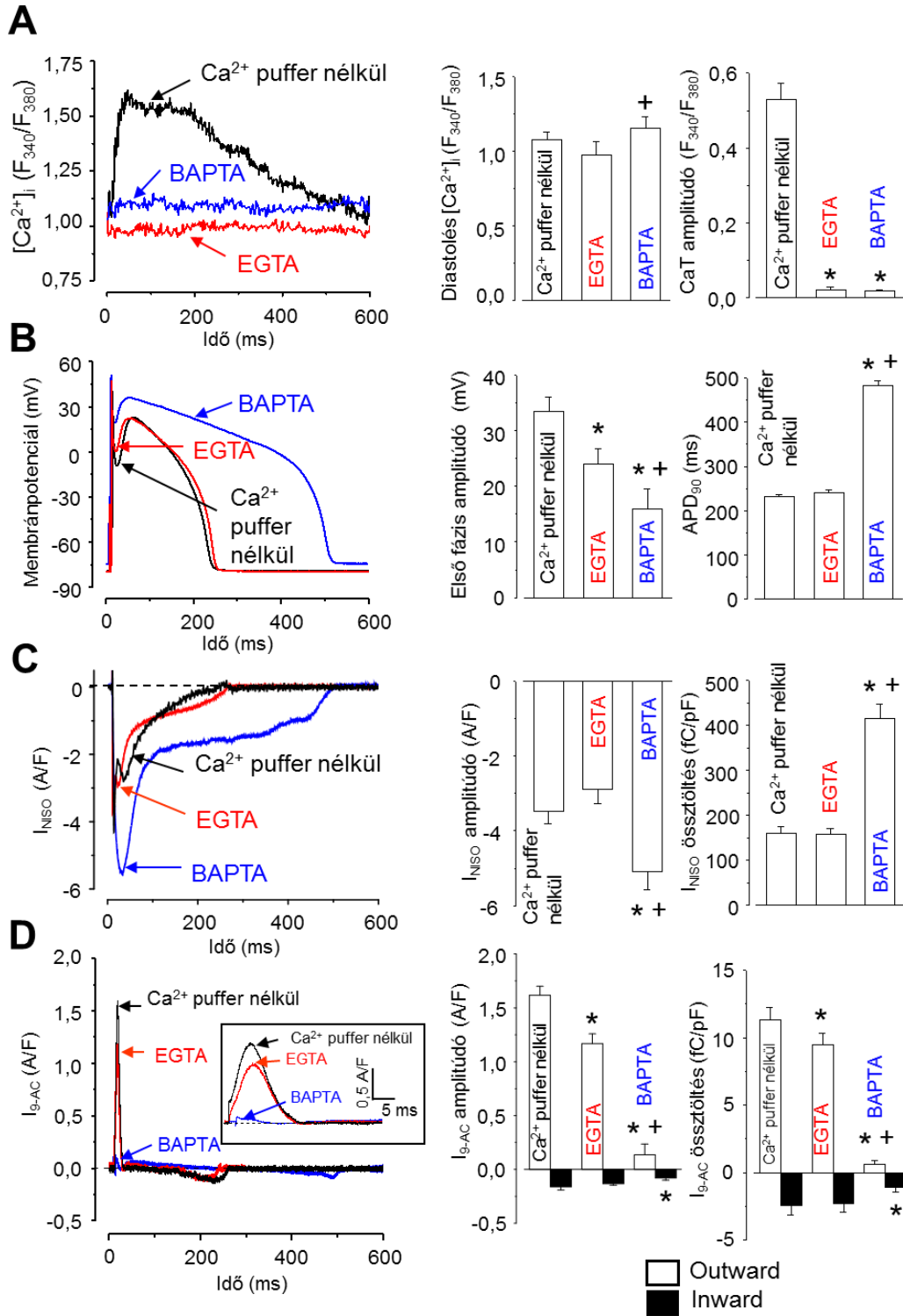
10 mmol/l BAPTA hatására a  $I_{9-AC}$  amplitúdók nullára csökkentek, a  $+60$  mV-nál mérhető áramdenzitás  $2,44 \pm 0,28$  A/F-ról  $0,07 \pm 0,01$  A/F-ra csökkent. Ezzel szemben 10 mmol/l EGTA ugyan csökkentette a  $I_{9-AC}$  amplitúdóit, de nem szüntette meg az áramot és nem változtatta meg az áram membránpotenciál-függését. A  $+60$  mV-nál mérhető áram amplitúdója  $1,49 \pm 0,27$  A/F-nak adódott EGTA jelenlétében.

A  $I_{Cl(Ca)}$   $Ca^{2+}$ -függésének további vizsgálata során az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációt 1,1  $\mu$ mol/l értékre állítottuk be, mely érték a systole alatt mérhető globális  $Ca^{2+}$  koncentrációnak felel meg. Ezt a pipetta oldathoz megfelelő mennyiségű  $Ca^{2+}$  és 4,5 mmol/l BAPTA hozzáadásával érték el (Anyagok és Módszerek fejezet). A  $+60$  mV-ra történő depolarizációval mérhető áram denzitás ebben az esetben  $0,31 \pm 0,06$  A/F volt, mely ugyan nagyobb, mint a 10 mmol/l BAPTA jelenlétében mért érték, de jóval kisebb, mint amit a kontroll körülmények között, puffer mentes belső oldattal mértünk.

Az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szerepének a tisztázására, a méréseinket elvégeztük az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna szelektív gátlószerének tekinthető nisoldipin jelenlétében is.  $1 \mu\text{mol/l}$  nisoldipint alkalmazva mind az  $I_{\text{Ca,L}}$ , mind  $I_{9\text{-AC}}$  amplitúdói közel nulla értékre csökkentek. Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  fiziológias aktivációjában nagy szerepe van az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon keresztül beáramló  $\text{Ca}^{2+}$ -nak.

## **6.6 A $\text{Ca}^{2+}$ -függő $\text{Cl}^-$ áram profilja az akciós potenciálja alatt. Az intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ pufferelesének hatása**

Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  akciós potenciál kialakításához való hozzájárulását az akciós potenciál voltage-clamp technikát alkalmaztunk. A négyszögimpulzusokkal kiváltott árammal szemben akciós potenciál voltage-clamp technika használatával az áram akciós potenciál alatti lefutását követhetjük nyomon. Azért, hogy a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  aktivációját fiziológias körülmények között detektáljuk, nem befolyásoltuk a sejt  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasisát, azaz nem puffereztük az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -ot. A további kísérletek során akciós potenciál voltage-clamp technika és egyidejű epifluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  méréssel megvizsgáltuk a BAPTA és az EGTA hatását a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$ -ra és a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensre. A  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  mellett a  $I_{\text{Ca,L}}$ -t is láthatóvá tettük az ún. hagyma hámozás technika segítségével, melynek során egy sejten egyszerre több ionáram akciós potenciál alatti lefutását is vizsgálhatjuk specifikus gátlószerreik (jelen esetben 9-AC és nisoldipin) segítségével. Részletesebb leírásért lásd 5.3.3. fejezetet.



**13. ábra A I<sub>Cl(Ca)</sub> akciós potenciál alatti lefutásának vizsgálata akciós potenciál-clamp technikával**

(A) Reprezentatív Ca<sup>2+</sup> tranzienseket kontroll körülmények között (Ca<sup>2+</sup> puffer nélküli) és Ca<sup>2+</sup> puffert tartalmazó pipetta oldatokkal (BAPTA és EGTA) mértünk. (B) Reprezentatív akciós potenciálok, illetve paraméterei Ca<sup>2+</sup> puffer nélküli, 10 mmol/l EGTA és 10 mmol/l BAPTA jelenlétében. (C) Akciós potenciál clamp körülmények között mért nisoldipin szenzitív áramgörbék (I<sub>NISO</sub>), illetve paraméterei Ca<sup>2+</sup> puffer nélküli, EGTA és BAPTA jelenlétében. (D) Reprezentatív 9-AC szenzitív áramgörbék (I<sub>9-AC</sub>) Ca<sup>2+</sup> puffer nélküli, EGTA és BAPTA

jelenlétében. Az áramgörbe első 35 ms-ának nagyítása látható az ábrabetétben. A \* jelöli, ha a változás a  $\text{Ca}^{2+}$  puffer nélkülihez (n=15) képest szignifikánsnak adódott és + jelöli, ha a változás az EGTA és BAPTA között szignifikánsnak adódott ( $p < 0,05$ , n=5 és 6).

A  $\text{Ca}^{2+}$  kelátor mentes pipetta oldattal dializált sejteken a 13. ábrán bemutatott  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseket és akciós potenciálokat rögzítettünk. Abban az esetben mikor 10 mmol/l EGTA-t vagy BAPTA-t adtunk a pipettaoldathoz a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek eltűntek és a sejtek kontrakciója is megszűnt. BAPTA jelenlétében jelentősen megnyúlt az akciós potenciál, megemelkedett az akciós potenciál plateau potenciálja és csökkent az első fázis repolarizáció mértéke. Az EGTA hatására csupán az első fázis repolarizáció amplitúdója csökkent, de ez a változás kisebbnek adódott, mint BAPTA esetén. A nisoldipin szenzitív áram ( $I_{\text{NISO}}$ ) lefutására is eltérő hatással volt az EGTA és a BAPTA. Amíg BAPTA jelenlétében szignifikánsan megnőtt a  $I_{\text{NISO}}$  amplitúdója és az áram által szállított össztöltés mennyisége, addig az EGTA-nak nem volt hatása ezen paraméterekre. A  $I_{\text{NISO}}$  elsősorban a  $I_{\text{Ca,L}}$ -nak felel meg, de mellette az összes nisoldipinnel gátolható,  $\text{Ca}^{2+}$ -függő elektrogén folyamat is hozzájárul. Subepicardiális sejteken  $\text{Ca}^{2+}$  puffer mentes pipetta belső oldattal ún. „kétsúcú”  $I_{\text{Ca,L}}$ -ot mértünk az akciós potenciál alatt [92]. Ennek hátterében az áll, hogy subepicardiális sejtekben tapasztalt nagy amplitúdójú első fázis repolarizáció miatt az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák újra aktiválódnak. BAPTA jelenlétében az  $I_{\text{Ca,L}}$  második csúcsa is eltűnik.

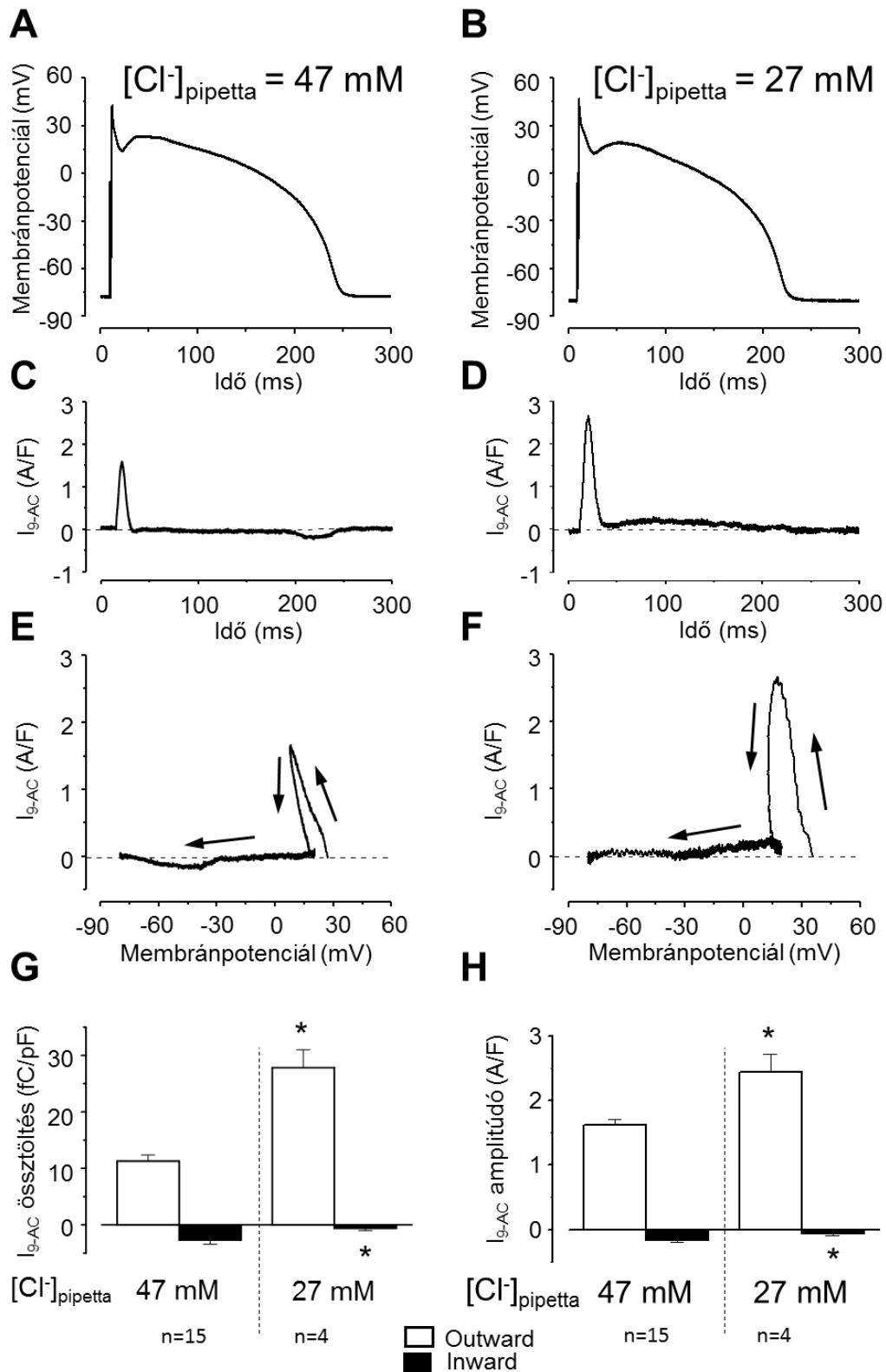
A 9-AC egy korai outward és egy késői inward áramot metszett ki akciós potenciál voltage-clamp technikával. Az outward komponens az első fázis repolarizációnak megfelelően jelentkezett,  $5,5 \pm 0,6$  ms-mal az akciós potenciál csúcsát követően és  $5,1 \pm 0,6$  ms-mal az első fázis repolarizáció legmélyebb pontját (notch) megelőzve. Az amplitúdója  $1,62 \pm 0,06$  A/F-nak, adódott (n=15). Az inward komponens amplitúdója  $-0,16 \pm 0,02$  A/F volt (n=15), mely időben az akciós potenciál terminális repolarizációjának megfelelően jelentkezett. Az  $I_{\text{Ca,L}}$ -mal összehasonlítva a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  outward csúcsa időben  $6,4 \pm 0,5$  ms-mal később jelentkezett, mint a  $I_{\text{Ca,L}}$  inward csúcsa ( $p < 0,05$ ; n=6). BAPTA hatására mindkét komponens amplitúdója közel nullára csökkent, az outward és inward komponens amplitúdója rendre  $0,13 \pm 0,10$  A/F  $-0,08 \pm 0,02$  A/F volt. (n=6) Az EGTA csak az outward komponens amplitúdóját csökkentette szignifikáns mértékben  $1,62 \pm 0,06$  A/F-ról  $1,17 \pm 0,09$  A/F-ra ( $p < 0,05$ ; n=9), de a csökkenés mértéke kisebb volt, mint amit BAPTA jelenlétében tapasztaltunk. Az áramok által szállított össztöltés mennyiségek összehasonlításával is hasonló eredményeket kaptunk: az outward komponens  $11,32 \pm 0,91$  fC/pF-ról  $9,48 \pm 0,84$  fC/pF-ra csökkent EGTA, és  $0,61 \pm 0,30$  fC/pF-ra BAPTA jelenlétében. Az inward komponens alatti töltésmennyiség  $-2,47 \pm 0,66$  fC/pF-ról  $-2,30 \pm 0,62$  fC/pF-ra csökkent EGTA és  $-1,06 \pm 0,38$  fC/pF-ra BAPTA jelenlétében. A BAPTA

és az EGTA hatásaiban tapasztalt eltérésekért valószínűleg a BAPTA, EGTA-hoz viszonyított gyorsabb és ezáltal effektívebb  $\text{Ca}^{2+}$  kötése a felelős.

## **6.7 Az intracelluláris $\text{Cl}^-$ koncentráció megváltoztatásának hatása a $\text{Ca}^{2+}$ -függő $\text{Cl}^-$ áramra**

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk, hogy az általunk vizsgált ionáram esetén a  $\text{Cl}^-$ -ok a töltéshordozók, megváltoztattuk az intracelluláris  $\text{Cl}^-$ -ok koncentrációját. Az eddig bemutatott kísérletekben a pipetta oldat és így a sejten belüli tér  $\text{Cl}^-$  koncentrációja 47 mmol/l volt, amit 27 mmol/l-re (equimoláris aspartáttal helyettesítve) csökkentettük. Ezzel változott a  $\text{Cl}^-$ -ok egyensúlyi potenciáljának értéke, és vele együtt a hajtóerő is. A 47 mmol/l intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentráció esetén a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálja  $-32$  mV, a csökkentett  $\text{Cl}^-$  tartalmú intracelluláris oldatot használva a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálja  $-47$  mV lett.

Megállapítottuk, hogy a  $\text{Cl}^-$  hajtóerejének megváltoztatásának hatására a  $I_{9-AC}$  outward komponensének amplitúdója és a görbe alatti területe megnövekedett, emellett az inward komponens gyakorlatilag eltűnt (14. ábra G és H). A  $I_{9-AC}$ -ot az aktuális membránpotenciál függvényében ábrázolva az ún. fázis-sík diagramot kapjuk meg. Ezen diagramokról leolvasható, hogy függetlenül az intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentrációtól a  $I_{9-AC}$  egy szűk membránpotenciál tartományban, az első fázis repolarizációnak megfelelően aktív (14. ábra E és F).



**14. ábra Az intracelluláris  $Cl^-$  koncentráció megváltoztatásának hatása a  $I_{Cl(Ca)}$ -ra**

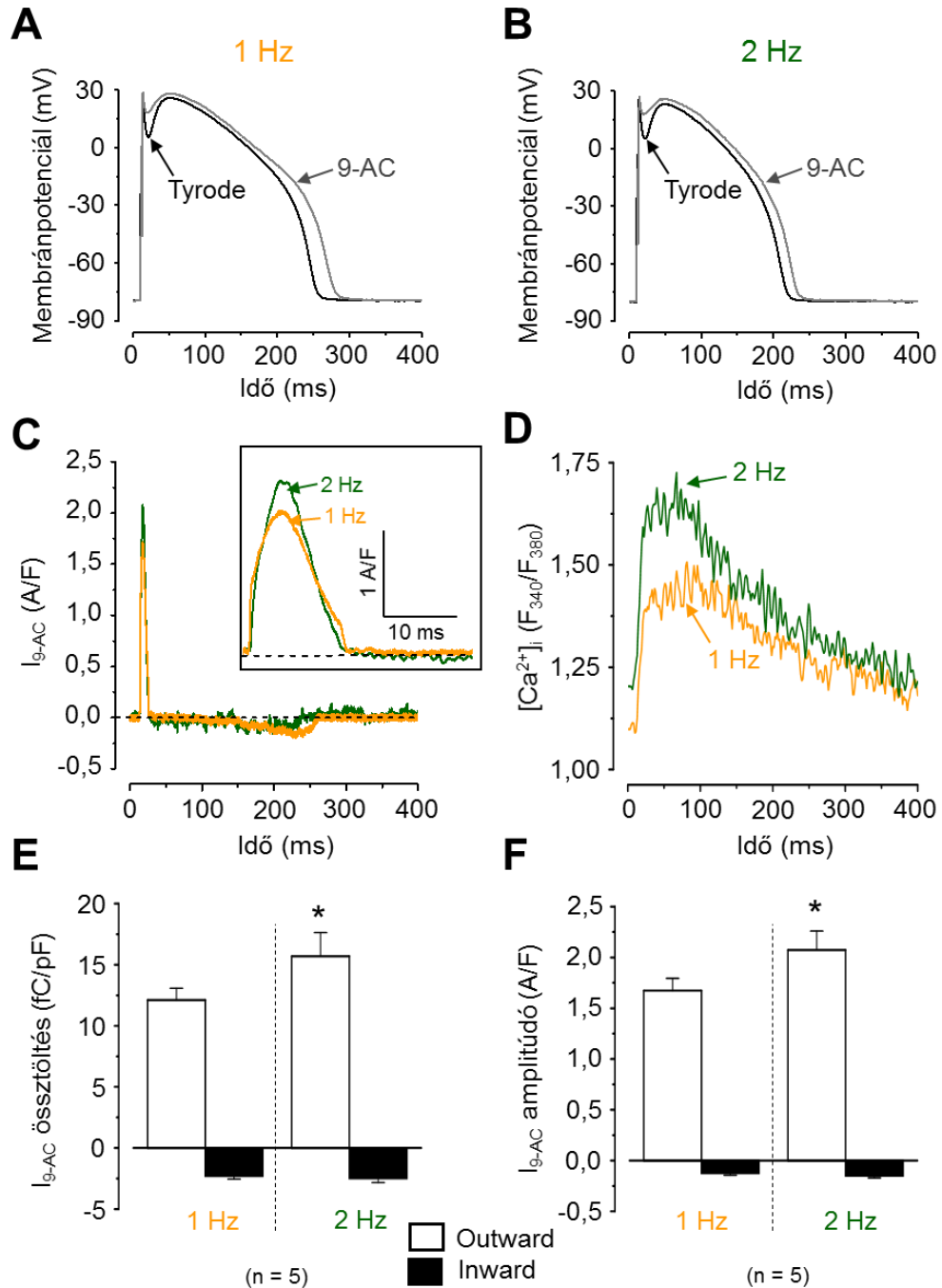
A pipetta oldata vagy 47 mmol/l (A, C, E) vagy csökkentett, 27 mmol/l (B, D, F)  $Cl^-$ -t tartalmazott. A sejt saját akciós potenciálját (A és B) használtuk parancsjelként és mértük a 9-AC szenzitív áramot (C és D). Az E és F panelon az ún. fázis-sík görbék láthatók, melyeket a  $I_{9\text{-AC}}$  amplitúdókat a membránpotenciál függvényében ábrázolva szerkesztettünk. A nyilak a görbék időbeli lefutását jelzik. A G és H panelon a  $I_{9\text{-AC}}$  outward és inward áramcsúcsait, illetve az áramgörbe alatti területek átlagait mutatják. A \* jelöli, ha a változás a 47 mmol/l  $Cl^-$ -t

tartalmazó pipetta oldathoz (kontroll) képest szignifikánsnak adódott ( $p < 0,05$ ). Az  $n$  a mérések számát jelöli.

## 6.8 A $\text{Ca}^{2+}$ -függő $\text{Cl}^-$ áram két különböző ingerlési frekvencián

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt az ingerlési frekvencia változtatásával is befolyásolni lehet. Korábbi kísérleteinkben már megállapítottuk, hogy a 9-AC hatása fordított frekvenciafüggő, vagyis magasabb ingerlési frekvenciákon kisebb mértékű akciós potenciál nyújtó hatással rendelkezik, mint alacsonyabb ingerlési frekvenciákon (15. ábra A és B). A pozitív lépcsőjelenség értelmében magasabb ingerlési frekvenciákon a sejtben mind a systoles, mind a diastoles  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció megemelkedik (15. ábra D), mert ilyenkor a  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítására kevesebb idő áll rendelkezésre. Ebben a kísérletsorozatban a sejteket előbb 1 Hz, majd 2 Hz frekvenciájú impulzussal stimuláltuk, és vizsgáltuk a  $I_{9-AC}$  amplitúdójának változását. Az előzetes várakozásainknak megfelelően, a  $I_{9-AC}$  amplitúdója és az általa szállított teljes töltés mennyisége is szignifikáns mértékben megemelkedett amikor az ingerlési frekvenciát 1-ről 2 Hz-re növeltük.





**15. ábra Az ingerlési frekvencia változtatás hatása a  $I_{Cl(Ca)}$ -ra akciós potenciál clamp körülmények között**

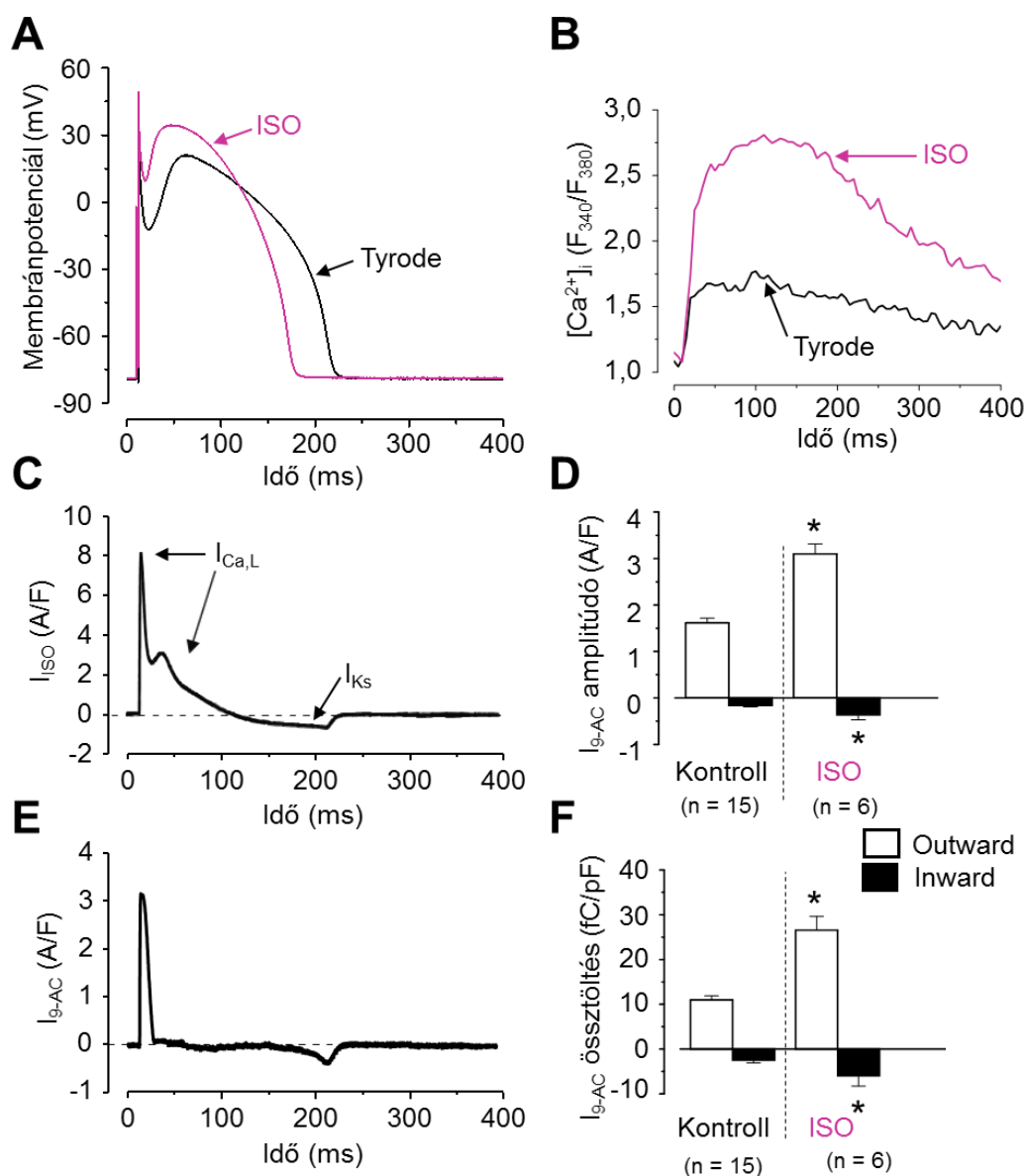
A sejt saját, 1 Hz (A) és 2 Hz (B) ingerlési frekvencián mért akciós potenciálját használtuk parancsjelként. Reprezentatív 9-AC szenzitív áramgörbék (C) és  $Ca^{2+}$  tranziensek (D), melyeket szintén 1 Hz-es és 2 Hz-es frekvencián rögzítettünk. A C panel ábrabetétén a  $I_{9-AC}$  görbe első 30 másodpercének nagyítása látható. Az E és F panelokon a  $I_{9-AC}$  outward és inward áramcsúcsait, illetve az áramgörbe alatti területek átlagait mutatják. A \* jelöli, ha a változás az 1 Hz ingerlési frekvencián mért értékhez képest szignifikánsnak adódott ( $p < 0,05$ ). Az  $n$  a mérések számát jelöli.

## 6.9 Az L-típusú $\text{Ca}^{2+}$ áram emelésével a $\text{Ca}^{2+}$ -függő $\text{Cl}^-$ áram is nő

A nisoldipin jelenlétében végzett kísérletek rávilágítottak arra, hogy a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  aktivációjában kritikus szerepe van az  $I_{\text{Ca,L}}$ -nak. Ennek további bizonyítása érdekében  $I_{\text{Ca,L}}$ -ot két egymástól eltérő módon aktiváltuk, és vizsgáltuk a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ra gyakorolt hatását. Az  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitúdóját indirekt módon, a  $\beta$  adrenerg jelátviteli útvonal aktiválásával, valamint direkt módon egy ioncsatorna aktivátor alkalmazásával növeltük.

### 6.9.1 Az Isoproterenol $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktivációjára kifejtett hatásának vizsgálata

A  $\beta$ -adrenerg receptorokat egy nem specifikus agonista alkalmazásával, isoproterenollal aktiváltuk. Ennek hatására protein-kináz A függő foszforiláció révén az  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitúdója megnőtt. Megállapítottuk, hogy 10 nmol/l isoproterenol duplájára növelte a sztoles  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt és szignifikáns mértékben emelte az akciós potenciál plateau potenciál értékét és rövidült az akciós potenciál hossza is ( $p < 0,05$ ) (16. ábra A és B). Ezen hatásokért a kalcium csatorna és a  $\text{Ks}$  csatorna foszforilációja tehető felelőssé [93]. Akciós potenciál voltage-clamp körülmények között az isoproterenol hatására megjelenő áramnak két komponense volt, melyek az  $I_{\text{Ca,L}}$ , illetve a  $I_{\text{Ks}}$  és  $I_{\text{Kr}}$  aktivációjának tulajdoníthatóak (16. ábra C). Isoproterenol jelenlétében szignifikánsan nagyobb 9-AC-érzékeny áram ( $I_{9\text{-AC}}$ ) outward és inward komponenszt mértünk a kontrollhoz képest (16. ábra D). Az outward komponens  $3,10 \pm 0,21$  A/F-nak, míg az inward komponens  $-0,36 \pm 0,10$  A/F-nak adódott isoproterenol kezelés estén ( $p < 0,05$ ;  $n=6$ ).

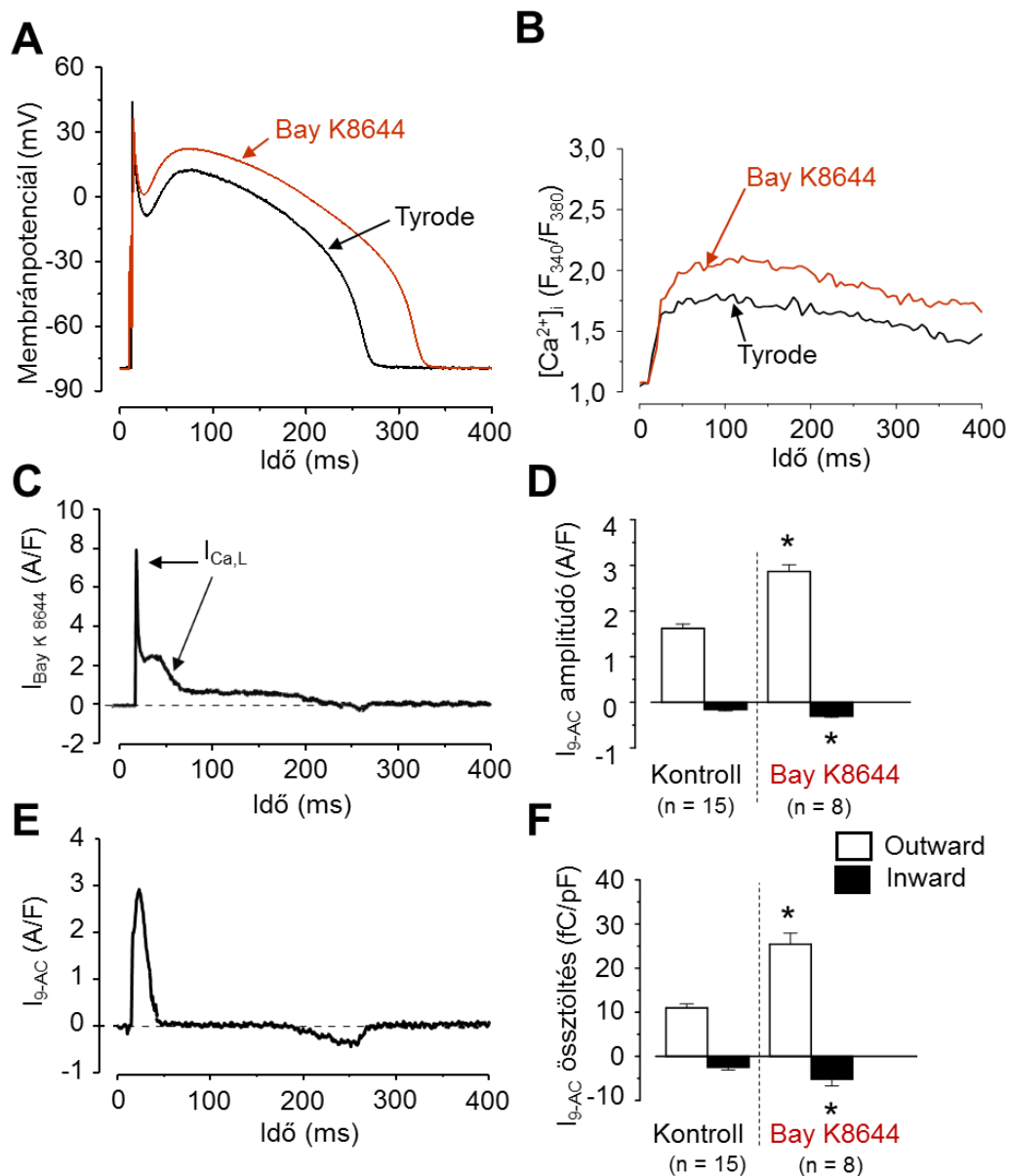


### 16. ábra A $I_{Cl(Ca)}$ aktiválása isoproterenollal

Az **A** és **B** panelokon bemutatott akciós potenciálokat, illetve  $Ca^{2+}$  tranzienseket kontroll körülmények (Tyrode oldat), illetve 10 nmol/l isoproterenol (ISO) jelenlétében mértük. A kontroll körülmények között rögzített akciós potenciálok szolgálták feszültségparancsként az akciós potenciál voltage-clamp mérések során. A **C** panel az isoproterenol érzékeny áramot, az **E** panel a 9-AC érzékeny áramot ábrázolja, melyet isoproterenol jelenlétében rögzítettünk. A **D** és **F** panelokon a  $I_{9-AC}$  outward és inward áramcsúcsait, illetve az áramgörbe alatti területek átlagait mutatják. A \* jelöli, ha a változás a kontrollhoz (isoproterenollal nem kezelt) képest szignifikánsnak adódott ( $p < 0,05$ ). Az  $n$  a mérések számát jelöli.

### 6.9.2 Bay K8644 $I_{Cl(Ca)}$ aktivációjára kifejtett hatásának vizsgálata

A dihydropiridinek közé tartozó Bay K8644 direkt módon növeli a  $I_{Ca,L}$  amplitúdóját. Az isoproterenol hatásához hasonlóan, 20 nmol/l Bay K8644 is szignifikáns mértékben növelte a  $Ca^{2+}$  tranziens amplitúdóját. A Bay K8644 hatására csökkent az első fázis repolarizáció mértéke, emelkedett az akciós potenciál plateau fázisa és megnövekedett az akciós potenciál időtartama. Akciós potenciál voltage-clamp körülmények között a Bay K8644 hatására megjelenő áramnak csak egy komponense volt, ami az  $I_{Ca,L}$ -nak tulajdonítható (17. ábra C). Az  $I_{9-AC}$  outward és inward komponensei kétszeresére nőttek Bay K8644 hatására ( $p < 0,05$ ;  $n = 8$ ).



**17. ábra A  $I_{Cl(Ca)}$  aktiválása Bay K8644-gyel**

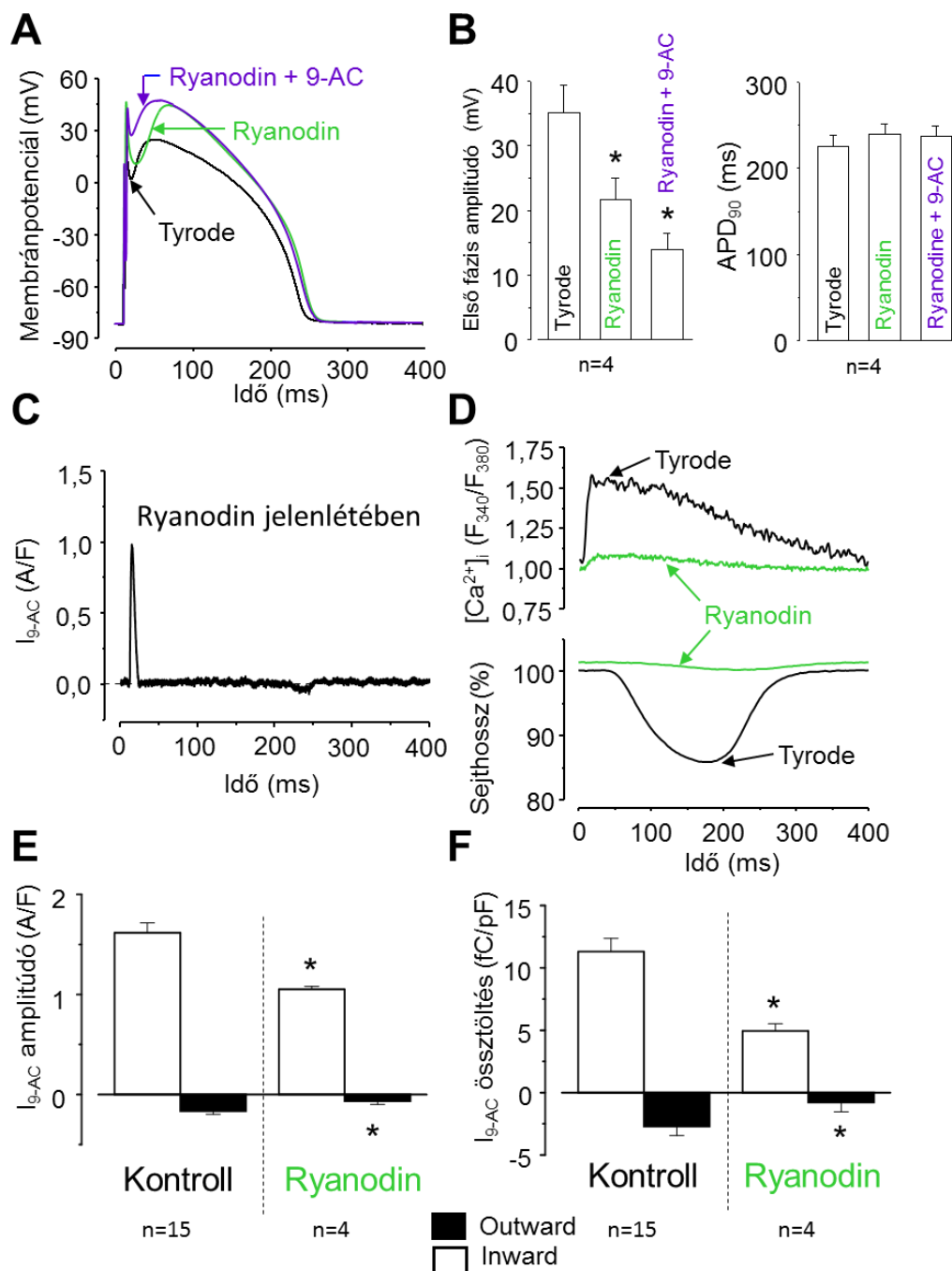
Az **A** és **B** panelokon reprezentatív akciós potenciálok illetve  $Ca^{2+}$  tranziensek láthatók kontroll körülmények (Tyrode oldat) illetve 20 nmol/L Bay K8644 jelenlétében. A kontroll körülmények között rögzített akciós potenciálok szolgálták feszültségparanesként az akciós potenciál voltage-clamp mérések során. A **C** panel az Bay K8644 érzékeny áramot, az **E** panel

a 9-AC érzékeny áramot ábrázolja, melyet Bay K8644 jelenlétében rögzítettünk.. A **D** és **F** panelokon a  $I_{9-AC}$  outward és inward áramcsúcsait, illetve az áramgörbe alatti területek átlagait mutatják. A \* jelöli, ha a változás a kontrollhoz (Bay K8644-gyel nem kezelt) képest szignifikánsnak adódott ( $p < 0,05$ ). Az  $n$  a mérések számát jelöli.

A 16. és 17. ábrán demonstrált kísérletek alapján megállapítottuk, hogy az  $I_{Ca,L}$  növelés esetén nő a  $I_{9-AC}$  amplitúdója. Ez a növekedés független a  $I_{Ca,L}$  növelés módjától. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  aktivációjában fontos szerepe van a  $I_{Ca,L}$ -nak.

### **6.10 A sarcoplasmaticus reticulumból történő $Ca^{2+}$ felszabadulás gátlása csökkenti ugyan a $Ca^{2+}$ -függő $Cl^-$ áramot, de nem szünteti meg**

A további kísérletekben a sarcoplasmaticus reticulumból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulás hatását vizsgáltuk a  $I_{Cl(Ca)}$  aktivációjában. A sarcoplasmaticus reticulumból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulást  $10 \mu\text{mol/l}$  ryanodin 15 perces perfúziójával gátoltuk. A ryanodin kezelés megszüntette a szívizomsejtek  $Ca^{2+}$  tranziensét és a kontrakcióját. A ryanodin emelte az akciós potenciál plateau fázisát és csökkentette az első fázis repolarizáció mértékét. 9-AC és ryanodin együttes perfúziója során azonban az első fázis repolarizáció amplitúdója tovább csökkent. Az akciós potenciál voltage-clamp kísérletek során a 9-AC-val kimetszett áram amplitúdója és az általa szállított teljes töltés mennyisége szignifikánsan csökkent a ryanodin előkezelést követően, de az előzetes várakozásainkkal ellentétben a sarcoplasmaticus retikulumból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulás gátlása nem csökkentette nullára az áramot. Az outward és inward komponens amplitúdói a kontroll körülmények között mért  $1,62 \pm 0,10$  A/F-ról és  $-0,16 \pm 0,03$  A/F-ról  $1,05 \pm 0,03$  A/F-ra és  $-0,07 \pm 0,03$  A/F-ra csökkentek ryanodin előkezelés hatására. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  a sarcoplasmaticus reticulumból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulás blokkolása mellett is aktiválható, a ryanodin receptorok megnyílása tehát nem elengedhetetlen az áram aktivációjához.



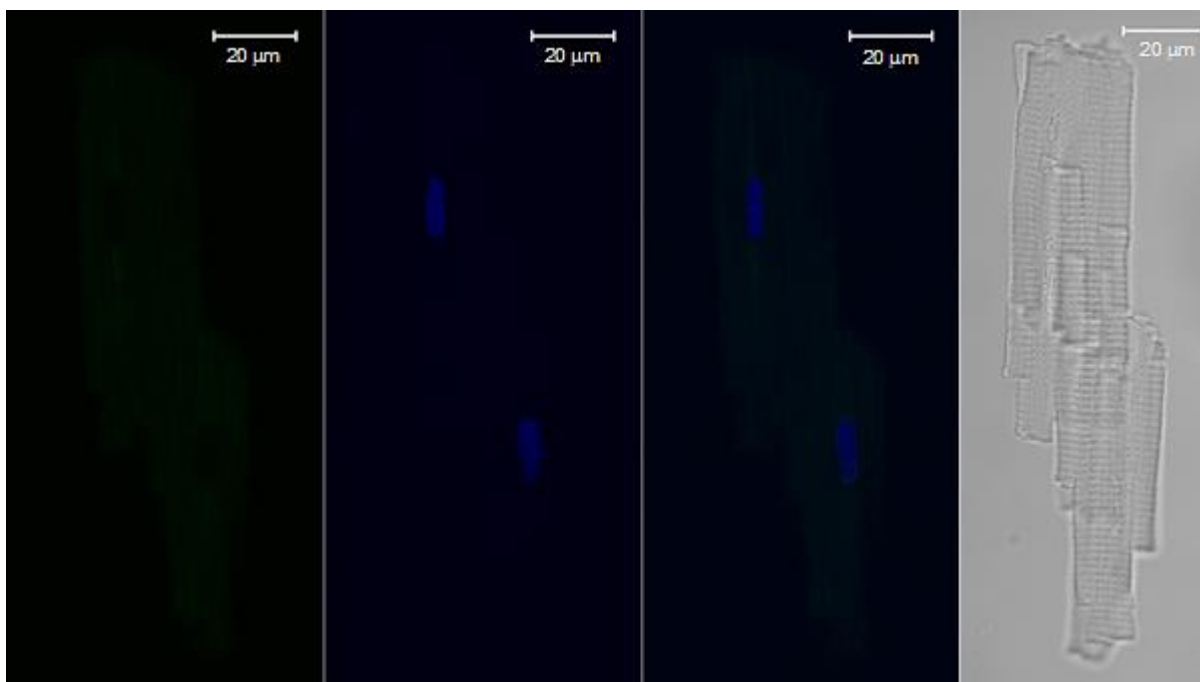
**18. ábra A sarcoplasmaticus reticulumból történő Ca<sup>2+</sup> felszabadulás szerepe a I<sub>Cl(Ca)</sub> aktivációjában**

(A) A parancsjelként használt akciós potenciálokot kontroll körülmények (Tyrode oldat), 10 μmol/l ryanodine valamint 10 μmol/l ryanodine és 0,5 mmol/l 9-AC együttes jelenlétében mértük. A B panelon a kontroll körülmények között, ryanodine valamint ryanodine és 9-AC jelenlétében mért akciós potenciálok első fázis repolarizáció amplitúdó értékeinek és APD<sub>90</sub> értékeinek átlagai láthatók. (C) Reprezentatív 10 μmol/l ryanodine jelenlétében akciós potenciál voltage-clamp technikával mért 9-AC szenzitív áramgörbe. A D panelon a ryanodine Ca<sup>2+</sup> tranzienstre (felső) és sejtrövidülésre (alsó) kifejtett hatásait ábrázoltuk téringertelt sejten. Az E és F panelokon panelokon a I<sub>9-AC</sub> outward és inward áramcsúcsait, illetve az áramgörbe alatti területek átlagait mutatják. A \* jelöli, ha a változás a kontrollhoz képest szignifikánsnak adódott (p<0,05). Az n a mérések számát jelöli.

## 6.11 A Bestrophin-3, TMEM16A és az L-típusú $\text{Ca}^{2+}$ csatornafehérjék ko-lokalizációja kutya szívéből izolált sejteken

A  $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ért felelős potenciális csatornafehérjék expresszióját és szívizomsejteken való elhelyezkedését immuncitokémiai módszerrel és konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Elektrofiziológiai méréseink alapján feltételeztük az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák és a  $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ért felelős ionszűrő ko-lokalizációját. A  $\text{Ca}^{2+}$  függő  $\text{Cl}^-$  csatornát a TMEM16A és Bestrophin-3 ellen, az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat pedig a pórusformáló alegysége ( $\text{Ca}_v1.2$ ) ellen termeltetett ellenanyaggal jelöltük. Emellett vizsgáltuk a cytochrome c és a ryanodin receptor lokalizációját is.

Első lépésként teszteltük a másodlagos jelölésre szánt antitestek specificitását. Izolált szívizomsejteken alkalmaztuk a másodlagos jelölést úgy, hogy kihagytuk az elsődleges antitesteket.



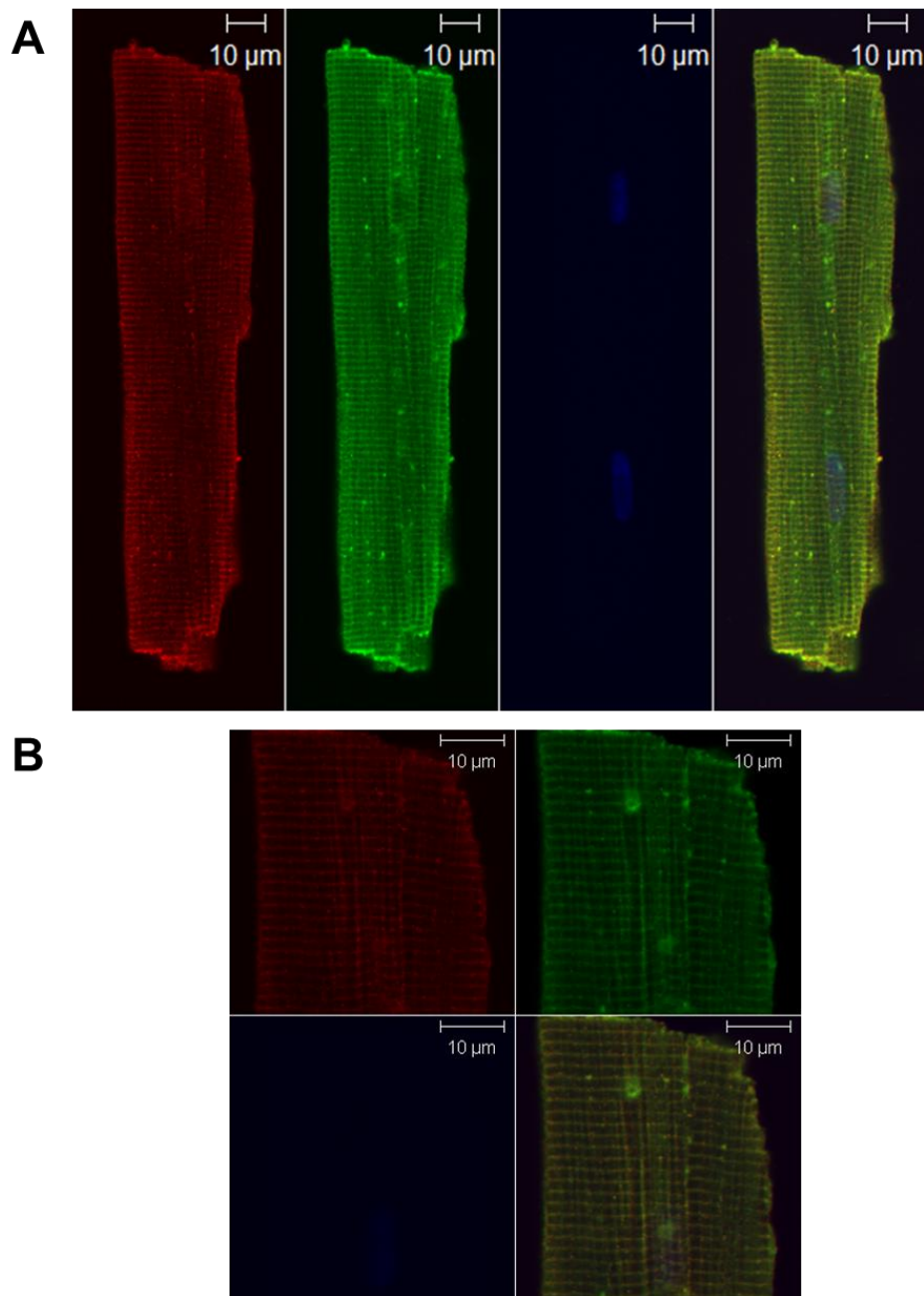
### 19. ábra Az immuncitokémiai festés negatív kontrollja kutya kamrai szívizomsejten

Az egyes felvételeken balról jobbra a vörös (Cy3 másodlagos antitest) és zöld (biotinilált másodlagos antitest + Streptavidine Alexa488) festődés hiányát, valamint a kék (DAPI) jelenlétét lehet megfigyelni. A jobb oldali legszélső kép ugyanazon szívizomsejtről készült kép áteső fényben.

A felvételeken a sejtmagok DAPI-val való jelölését leszámítva egyéb festődést nem tapasztaltunk.

A 20. ábrán piros szín az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákat, zöld a Bestrophin-3-at, kék a sejtmagot jelöli. Ismert, hogy az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák a T tubulusokban helyezkednek el [94].

Eredményeink is megerősítették ezt, hiszen a piros festődés a T tubulusok mentén volt a legerősebb. A zölddel jelölt Bestrophin-3 festődése is a harántcsíkolatnak megfelelően volt a legkifejezettebb. A két felvételt egymásra vetítve sárga színt kaptunk, ami arra utal, hogy a Bestrophin-3 és az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna egymás közelében helyezkednek el. A ko-lokalizáció számszerűsítésére a Pearson-féle korrelációs koefficiens-t határoztuk meg. Értéke  $0,74 \pm 0,03$ -nak adódott a  $\text{Ca}_v1.2$  és Bestrophin-3 között ( $n=8$ ).



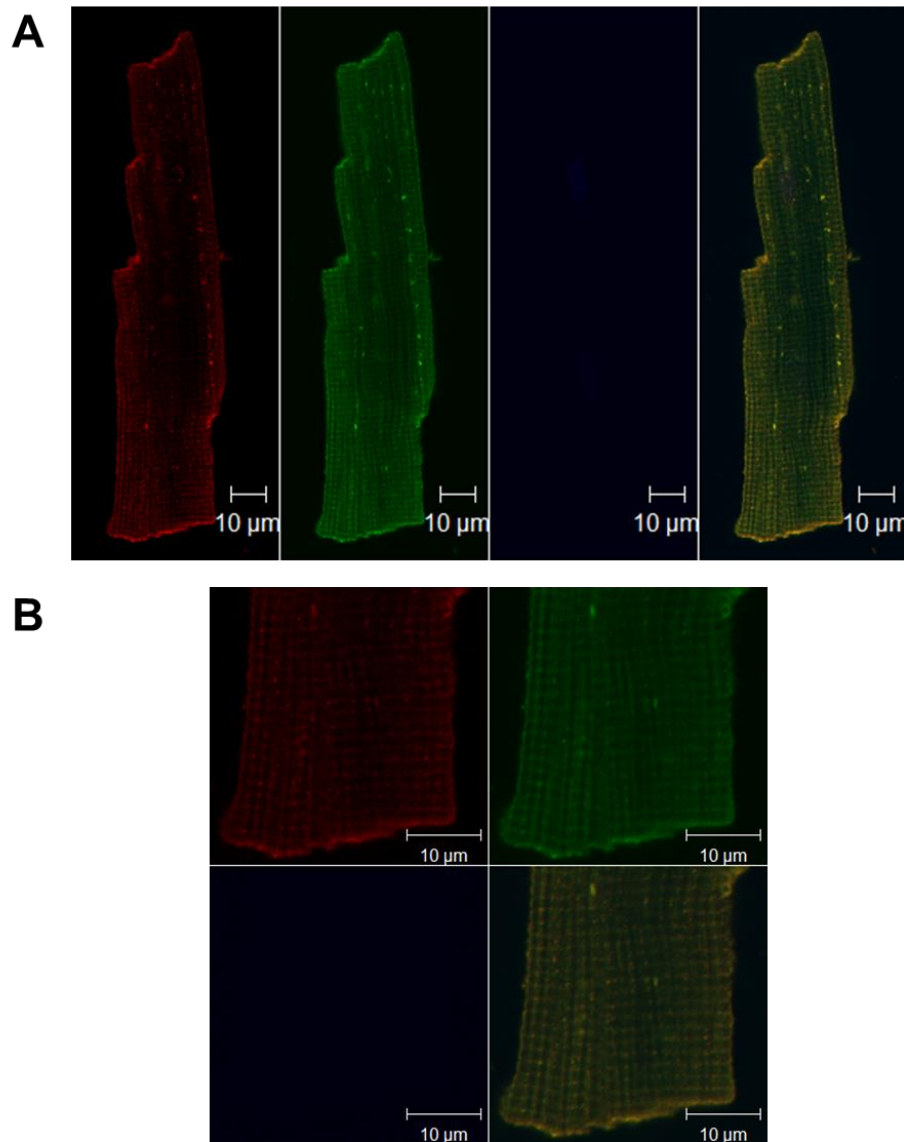
**20. ábra** Konfokális mikroszkópos felvételek, melyek a  $\text{Ca}_v1.2$  és Bestrophin-3 expressziós mintázatát mutatják

(A) Reprezentatív felvételek kutya bal kamrai szívizomsejtről, melyen a  $\text{Ca}_v1.2$ -t pirossal, a Bestrophin-3-at zölddel, a sejtmagokat pedig kézzel jelöltük. A jobb oldali legszélső kép az



előbbiek egymásra vetítésével készült. **(B)** A fent bemutatott sejt felső ¼ részének nagyított képe.

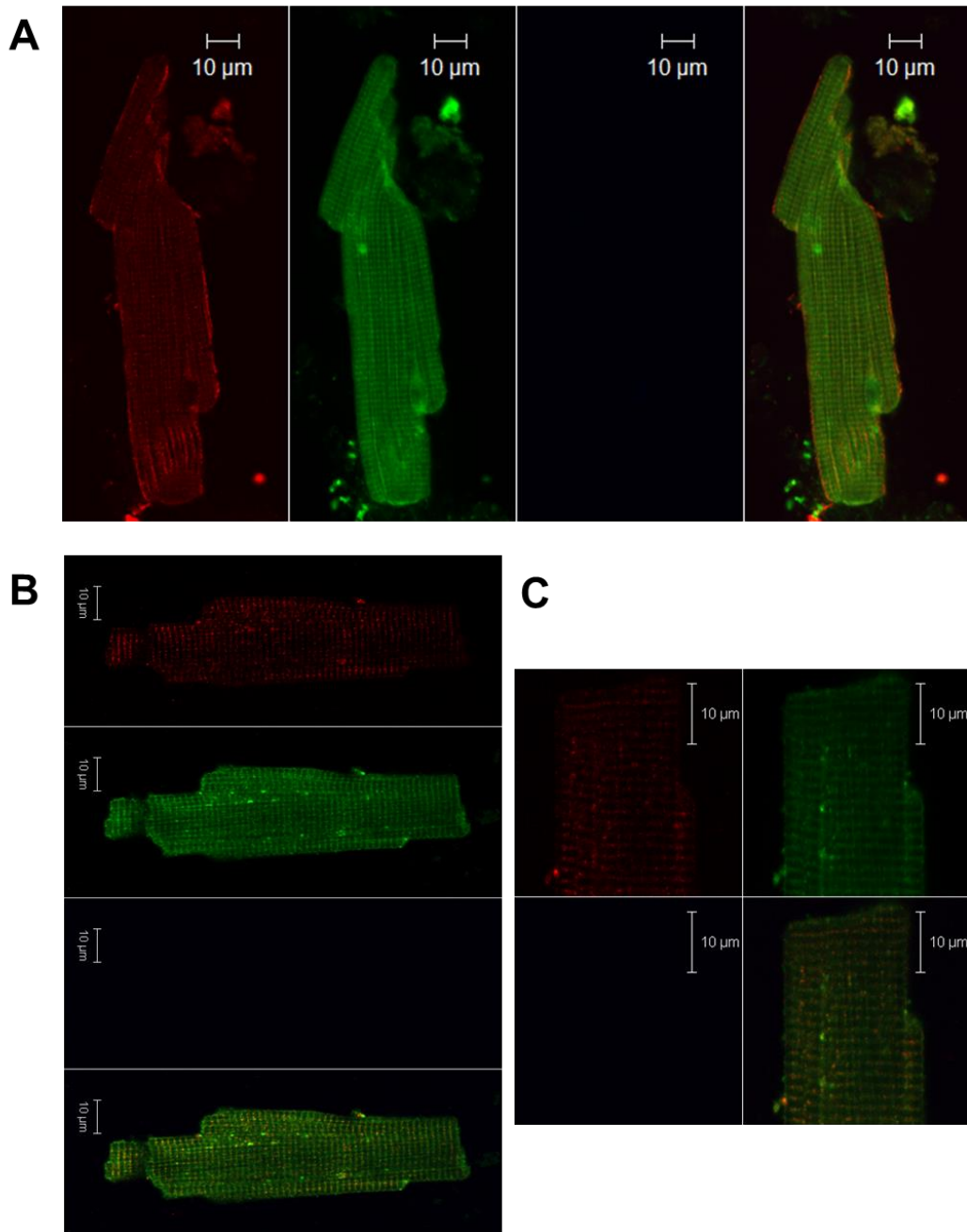
A 21. ábrán bemutatott méréseink során pirossal a TMEM16A-t jelöltük, a zöld szín továbbra is a Bestrophin-3-at jelöli. A két felvételt egymásra vetítve ebben az esetben is sárga színt kapunk, mely a két fehérje ko-lokalizációjára utal. A Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke ebben az esetben is magas,  $0,74 \pm 0,06$ -nak adódott ( $n=8$ ).



**21. ábra** Konfokális mikroszkópos felvételek, melyek a TMEM16A és Bestrophin-3 expressziós mintázatát mutatják

(A) Reprezentatív felvételek kutya bal kamrai szívizomsejtről, melyen a TMEM16A-t pirossal, a Bestrophin-3-at zölddel, a sejtmagokat pedig kékkel jelöltük. A jobb oldali legszélső kép az előbbiek egymásra vetítésével készült. **(B)** A fenti sejt alsó ¼ részének nagyított képe.

Annak érdekében, hogy kizárjuk a fehérjék festődésének véletlenszerű ko-lokalizációját, további fehérjék elhelyezkedését tanulmányoztuk. A cytochrome c és a ryanodin receptorok festődése esetén a ko-lokalizáció valószínűségét jelző Pearson-féle korrelációs együttható alacsony volt,  $0,25 \pm 0,03$  a TMEM16A és cytochrome c esetén ( $n=7$ ), és  $0,36 \pm 0,05$  a Bestrophin-3 és a ryanodin receptor között ( $n=3$ ), amely arra utal, hogy a fehérjék nem egymás közelében helyezkednek el.

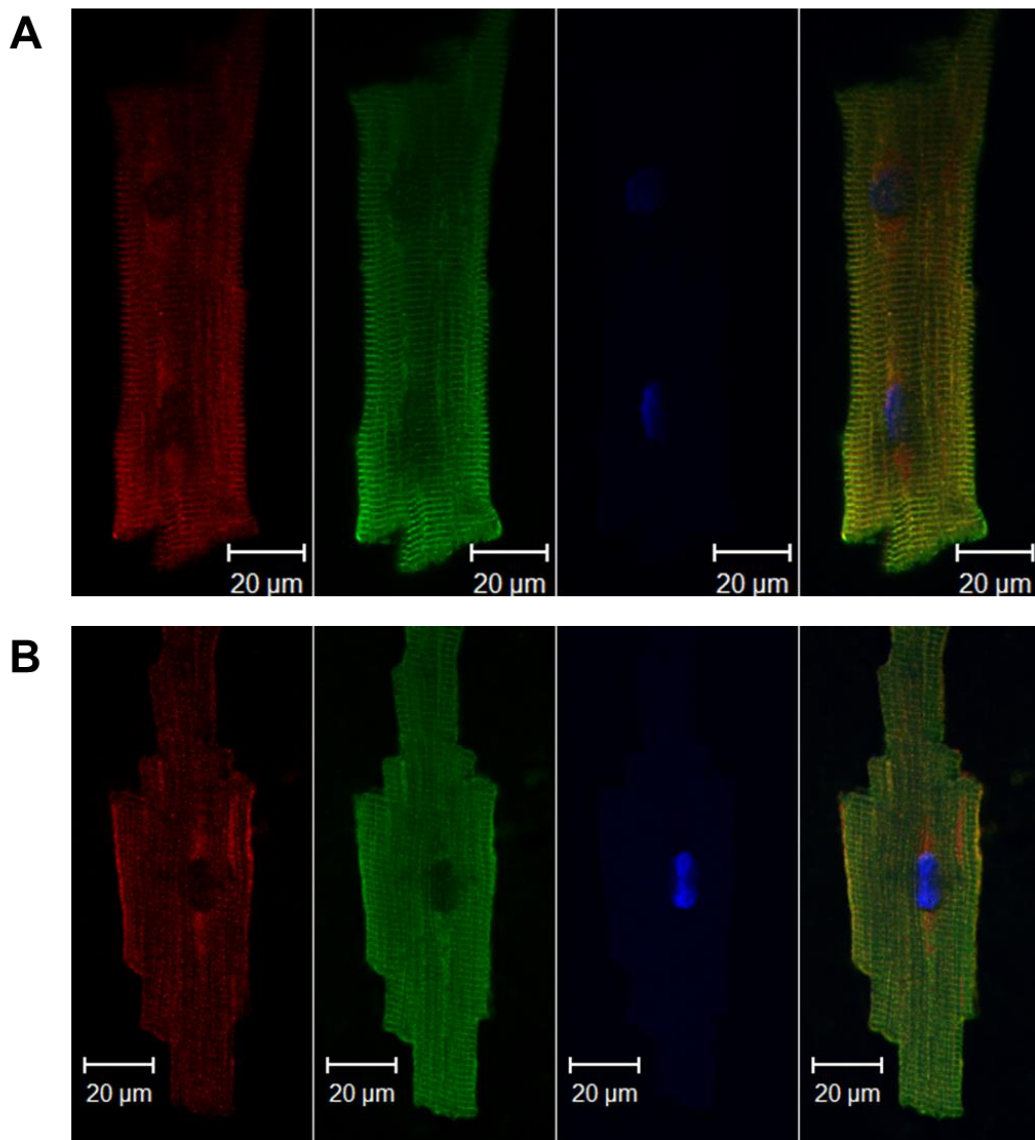


**22. ábra** Konfokális mikroszkópos felvételek, melyek a cytochrome c és TMEM16A illetve a ryanodin receptor és Bestrophin-3 expressziós mintázatát mutatják

(A) Reprezentatív felvételek kutya bal kamrai szívizomsejtről, melyen a cytochrome c-t pirossal, a TMEM16A-t zölddel, a sejtmagokat pedig kézzel jelöltük. A jobb oldali legszélő

kép az előbbiekre egymásra vetítésével készült. **(B)** Reprezentatív felvételek kutya bal kamrai szívizomsejtről, melyen a ryanodin receptor-t pirossal, a Bestrophin-3-at zölddel, a sejtmagokat pedig kékkel jelöltük. A legalsó kép az előbbiekre egymásra vetítésével készült. **(C)** A bal oldali sejt jobb oldali végének nagyított képe.

Egészséges humán izolált szívizomsejteken is elvégeztük az immunfestést. A képek elemzésével elsőként mutattuk ki, hogy mind a Bestrophin-3, mind a TMEM16A fehérjék expresszálódnak humán kamrai szívizomon. Hasonlóan a kutya szívizomsejtekhez a két fehérje erős ko-lokalizációt mutat. A Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke a  $Ca_v1.2$  és Bestrophin-3 esetén  $0,84 \pm 0,02$ -nek adódott ( $n=18$ ). A TMEM16A és Bestrophin-3 esetében ez az érték  $0,85 \pm 0,02$ -nek adódott ( $n=5$ ).



**23. ábra** Egészséges humán izolált szívizomsejtekről készült konfokális mikroszkópos felvételek, melyek a  $Ca_v1.2$  és Bestrophin-3 illetve a TMEM16A és a Bestrophin-3 expressziós mintázatát mutatják

(A) Reprezentatív felvételek, melyen Cav1.2-t pirossal, a Bestrophin-3-at zölddel, a sejtmagokat pedig kézzel jelöltük. A jobb oldali legszélső kép az előbbiek egymásra vetítésével készült. (B) Reprezentatív felvétel, melyen a TMEM16A piros, a Bestrophin-3 zöld, a magfestődés pedig kék színnel láthatjuk. A jobb oldali legszélső kép az előbbiek egymásra vetítésével készült.

## 7. MEGBESZÉLÉS

Munkám során kutya izolált szívizomsejteken vizsgáltam a  $I_{Cl(Ca)}$ -ot két, széleskörűen alkalmazott  $Cl^-$  csatorna gátlószer, a 9-AC és a DIDS segítségével. Megbizonyosodtunk, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  jelen van kutya szívizmon. Megállapítottuk továbbá, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  fiziológiás szerepének tanulmányozására a 9-AC előnyösebb, mint a DIDS, hiszen a 9-AC az általunk vizsgált koncentrációban nem gátolta az akciós potenciált kialakító főbb ionáramok ( $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ ) egyikét sem. Megállapítottuk, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  időben az akciós potenciál első fázis repolarizáció és terminális repolarizáció alatt aktiválódik. Bizonyítottuk, hogy a 9-AC-érzékeny áram  $Ca^{2+}$ -függő és a  $Cl^-$  a töltéshordozó. Eredményeink arra is utalnak, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  aktiválásához a csatorna közelében elhelyezkedő L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákon át történő  $Ca^{2+}$  belépés szükséges, a sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló  $Ca^{2+}$  felerősíti a  $I_{Cl(Ca)}$  aktivációját. Megállapítottuk, hogy a TMEM16A és Bestrophin-3 egyaránt kimutatható kutya bal kamrájából izolált szívizomsejteken és egészséges humán szívizommintákon. Irodalmi adatok alapján a TMEM16A és Bestrophin-3 egyaránt lehet klorid csatorna alkotófehérje. A TMEM16A és Bestrophin-3 expressziója a T tubulusok mentén a legkifejezettebb, hasonlóan az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák elhelyezkedéséhez.

### 7.1 A 9-AC és DIDS összehasonlítása

Elekfiziológiai méréseink során a  $I_{Cl(Ca)}$  szelektív gátlószerét alkalmaztuk, és a mért ionáramot gátlószer-szenzitív áramként azonosítottuk. Egy  $Ca^{2+}$  függő áram tanulmányozásánál létfontosságú, hogy a gátlószer ne befolyásolja a  $I_{Ca,L}$ -ot, hiszen az nagy mértékben hozzájárul az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció megemelkedéséhez, mely az áramot aktiválja. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy 0,5 mmol/l 9-AC 8-10 perces alkalmazás során nem befolyásolta a  $I_{Ca,L}$  amplitúdóját. Ezzel szemben Walsh és Wang arról számoltak be, hogy tengerimalac kamrai szívizomsejteken 0,5 mmol/l 9-AC 57±7 %-kal csökkentette a forskolinnal stimulált  $I_{Ca,L}$ -ot. [47]. Egy további összefoglaló tanulmány is beszámol a 9-AC feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák gátló hatásáról, azonban a szerző nem említ konkrét irodalmi vagy kísérletes hivatkozást ezzel kapcsolatban [95]. Ezzel szemben számos olyan közlemény olvasható, mely a mi eredményeinket erősíti abban a tekintetben, hogy a 9-AC nem gátolja a feszültségfüggő L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákat [96], [97].

Korábbi közlemények alapján mind a DIDS, mind a 9-AC gátolta a volumen-regulált  $Cl^-$  áramot szívizomsejteken. Tengerimalac szívizomsejteken 0,1 mmol/l DIDS 60 %-os gátlást hozott létre a volumen-regulált  $Cl^-$  áramban [60], míg kutya pitvari sejteken 100 %-os gátlást

tapasztaltak [98]. Vandenberg és munkatársai szerint egyik gátlószer sem befolyásolja az isoproterenol aktivált (cAMP függő)  $\text{Cl}^-$  áramot [60], ugyanakkor más munkacsoportok arról számoltak be, hogy tengerimalac kamrai szívizomsejteken a 9-AC gátolta a cAMP dependens  $\text{Cl}^-$  áramot [99], [55], és tengerimalac papilláris izmon is szignifikáns gátlást hozott létre [100]. Ezzel szemben 1 mmol/l DIDS nem csökkentette a protein kináz A dependens  $\text{Cl}^-$  áramot tengerimalac papilláris izmon [100], sőt tengerimalac kamrai szívizomsejteken az áram aktiválásáról számoltak be, melyet a szerzők azonban nem direkt csatornahatásnak, hanem a  $\beta$ -adrenerg receptorok stimulálásának tekintettek [101].

Jelen tanulmányban a pipettaoldatok és a perfúziós oldatok ozmolaritását gondosan egyeztettük egymással, ezért a volumen regulált  $\text{Cl}^-$  áram kis valószínűséggel zavarhatta a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  méréseinket. A protein kináz A függő  $\text{Cl}^-$  áram pedig nincs jelen kutya [102] és humán szívizomsejteken [103], ezért a mi méréseink során a 9-AC és a DIDS szenzitív áram a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  áramnak tekinthető.

A  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  feszültségfüggését tanulmányozva megállapítottuk, hogy a két gátlószerrel hasonló áram amplitúdókat mértünk a vizsgált membránpotenciál tartományban. Ez arra utal, hogy a 0,5 mmol/l 9-AC és a 0,2 mmol/l DIDS hasonló  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  gátló potenciállal rendelkezik. Korábbi közleményekben Kawano és munkacsoportja arról számolt be, hogy 0,2 mmol/l DIDS teljes  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  gátlást hozott létre nyúl kamrai szívizomsejteken [104], míg Sipido és munkatársai eredményei azt mutatták, hogy 0,1 mmol/l DIDS csak 70 %-ban gátolta  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot nyúl Purkinje rostokon [61]. Az utóbbi közleménynél viszont figyelembe kell vennünk azt a tényt, hogy Sipido és munkatársai az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció változás követésére UV fényt használtak, mely a fényérzékeny DIDS bomlását is elősegíti [64]. Nyúl és egér kamrai szívizomsejteken 0,1 mmol/l DIDS is teljes  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  gátlást okozott [9],[37]. Sertés kamrai szívizomsejteken ehhez 0,15 mmol/l DIDS-re volt szükség [105]. A DIDS-sel ellentétben, a 9-AC  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  gátló hatásával kapcsolatban jóval kevesebb publikáció létezik. Nyúl szívizomsejteken 0,5 mmol/l 9-AC mintegy 90 %-ban gátolta a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot [106], patkány simaizom sejteken már 0,1 mmol/l 9-AC is nagy mértékben csökkentette a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot [40], míg sertés pitvari szívizomsejteken 0,2 mmol/l 9-AC gyakorlatilag nullára csökkentette a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot [63].

A  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  további tanulmányozása során megállapítottuk, hogy kutya kamrai szívizomsejteken a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -nak a feszültségfüggése harang alakú görbe. Hasonló eredményre jutottak korábbi kísérletek során nyúl kamrai szívizomsejteken DIDS használatával [107], [108]. Méréseink során azt találtuk, hogy  $-40$  mV-nál pozitívabb membránpotenciál értékeken pozitív  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot detektáltunk, és növekvő depolarizáló pulzusokkal a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  amplitúdója folyamatosan nőtt,

maximális értékét +60 mV-nál érte el. Az ennél pozitívabb membránpotenciálok az áram amplitúdója csökkent. Ennek háttérében az  $I_{Ca,L}$  hajtóerejének csökkenését feltételezzük. Az áram időbeli aktivációja és inaktivációja egyaránt gyors volt. Hasonlóan két korábbi tanulmányhoz, kísérleteink során az áram nullára csökkent a depolarizáló impulzust követő 30 ms-on belül [107], [62]. Ezzel szemben expresszált TMEM16A csatornák áramának egy fenntartott komponensét lehet megfigyelni [109]. Ezen különbség háttérében a sejtvonalak és a natív sejtek közötti különbségek is állhatnak. A natív szívizomsejtekkel szemben a sejtvonalakban az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció változása eltérő kinetikát mutat és a  $Ca^{2+}$ -ok intracelluláris kompartmentalizációja is sokkal kevésbé kifejezett [110], [111].

Eredményeink rámutattak arra, hogy a DIDS kevésbé használható  $I_{Cl(Ca)}$  gátlószerként akciós potenciál és akciós potenciál voltage-clamp mérések során, hiszen 0,2 mmol/l DIDS szignifikáns mértékben csökkentette az akciós potenciál felszálló szárának meredekségét. Az akciós potenciál felszálló szár meredeksége arányos a gyors, feszültségfüggő  $Na^+$  csatornák aktivitásával, ezért a  $V_{max}$  csökkenése indirekt módon a  $I_{Na}$  gátlására utal [91]. A  $Cl^-$  csatornák további gátlószerei, a NFA és NPPB esetében is leírták, hogy csökkentették a  $I_{Na}$ -ot és az áram inaktivációjának feszültségfüggését a negatívabb membránpotenciálok felé módosították [41]. Szemben az általunk leírtakkal, számos közleményben nem említik a DIDS  $V_{max}$  csökkentő hatását például nyúl szívizmon [112], [62] vagy kutya szívizmon [113]. Liu és munkatársai mérései viszont a DIDS direkt  $I_{Na}$  gátló hatásáról számoltak be. Méréseik alapján a DIDS  $I_{Na}$  gátlás  $EC_{50}$ -ja 0,15 mmol/l-nek adódott [114], vagyis a DIDS abban a koncentrációban gátolhatja a  $I_{Na}$ -ot, amiben a  $I_{Cl(Ca)}$ -ot is. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy voltage-clamp mérésekben a DIDS ugyanolyan hatékonyan alkalmazható szer a  $I_{Cl(Ca)}$  gátlására, mint a 9-AC, mert a -40 mV-os tartófeszültségen a feszültségfüggő  $Na^+$  csatornák inaktivált állapotban vannak. Ezt demonstrálják voltage-clamp méréseink is, ahol nem találtunk különbséget a DIDS- és 9-AC-szenzitív áramok között.

Az általunk vizsgált frekvencia tartományban (3-0,2 Hz) a  $I_{Cl(Ca)}$  gátlása (9-AC vagy DIDS által) az első fázis repolarizáció amplitúdójának csökkenését és az akciós potenciál időtartamának növekedését okozta midmyocardiális sejteken. Hasonló eredményről számoltak be Verkerk és munkacsoportja, akik azt találták, hogy nyúl subendocardiális szívizomsejtekben a  $I_{Cl(Ca)}$  DIDS-sel való gátlása az összes alkalmazott ingerlési frekvencián (3,33 Hz - 0,2 Hz) szignifikáns mértékben növelte az akciós potenciál időtartamát és csökkentette az első fázis repolarizáció mértékét. Subepicardiális sejtekben viszont a  $I_{Cl(Ca)}$  blokkolása az APD-t csak 3,33 Hz-es ingerlési frekvencián növelte, az ettől alacsonyabb frekvenciákon nem befolyásolta azt. 1 Hz ingerlési frekvencián csak az  $I_{to1}$  gátlása után alkalmazott DIDS nyújtotta szignifikáns

mértékben az akciós potenciált [62]. Munkacsoportunk a szívizom midmyocardiális rétegeből származó sejteket használt a kísérletek során. Ezen sejtek kisebb amplitúdójú  $I_{to1}$ -mal rendelkeznek, mint a subepicardiális rétegeből származó sejtek [115]. Feltételezzük, hogy a DIDS eltérő hatásáért a sejtek eltérő akciós potenciál morfológiája tehető felelőssé. Zygmunt és munkatársai subepicardiális sejteken megállapították, hogy a DIDS-nek nincs hatása sem az akciós potenciál időtartamára, sem az első fázis repolarizációra, és a  $V_{max}$  értékének csökkenését sem figyelték meg [113]. Nyúl kamrai szívizomsejteken a DIDS nyújtotta az akciós potenciált, viszont az első fázis repolarizációra nem volt hatással [112]. Az eltérő eredményeket az magyarázhatja, hogy velünk szemben Zygmunt és munkatársai tompa hegyű, ún. patch pipettákat használtak az akciós potenciálok méréséhez, míg mi hegyes mikroelektrodákat használtunk az akciós potenciálok elvezetésére. A hegyes végű elektróda használata során a sejtek nem dializálódnak, szemben a patch pipettákkal. A másik lehetséges magyarázat az, hogy velünk ellentétben Zygmunt és munkacsoportja 20 mmol/l EGTA  $Ca^{2+}$  kelátort is alkalmazott intracellulárisan. Perforált patch clamp mérésekben 0,2 mmol/l DIDS emelte az akciós potenciál plateau potenciálját, viszont csökkentette az APD-t [113]. Hasonló eredményekre jutottunk mi is, nevezetesen a 9-AC subepicardiális sejteken alacsonyabb ingerlési frekvenciákon nem változtatta meg az akciós potenciál hosszát (ezen eredmények nem kerültek bemutatásra az értekezésben). A magyarázat a jelenségre az lehet, hogy míg midmyocardiális sejteknél a  $I_{Cl(Ca)}$  gátlásával egy repolarizáló áramot csökkentünk, és ezáltal akciós potenciál nyúlást érünk el, addig subepicardiális sejtekben emellett figyelembe kell vennünk azt is, hogy az első fázis repolarizáció csökkenésével az  $I_{Ca,L}$  újraaktiválódását is csökkentjük.

A 9-AC és a DIDS akciós potenciálra kifejtett hatásának összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a DIDS szignifikáns módon csökkentette az akciós potenciál felszálló szárának meredekségét ( $V_{max}$ ) és az akciós potenciál amplitúdóját. Az első fázis repolarizáció nagyságát több ionáram ( $I_{Na}$ ,  $I_{to1}$ ,  $I_{Cl(Ca)}$  és  $I_{Ca,L}$ ) is befolyásolja. A DIDS ezek közül a  $I_{Na}$ -ot, a  $I_{Cl(Ca)}$ -ot is gátolja, míg a 9-AC a  $I_{Cl(Ca)}$ -on kívül nem befolyásolja ezen áramokat. Az első fázis repolarizáció amplitúdójára jellemző a fordított frekvenciafüggés, mely azt jelenti, hogy hosszabb ciklushosszak mellett (alacsonyabb ingerlési frekvenciákon) nagyobb amplitúdóval rendelkezik. Ezen jelenség annak a következménye, hogy az  $I_{to1}$  visszatérése az inaktivációjából lassú, ami magasabb frekvenciákon csökkent  $I_{to1}$  amplitúdót eredményez [116]. A másik tényező, amely hozzájárul az első fázis repolarizáció amplitúdójának fordított frekvenciafüggéséhez a  $I_{Ca,L}$ , melynek amplitúdója a magasabb ingerlési frekvenciákon (rövidebb ciklushosszak esetén) nő, a  $Ca^{2+}$ -calmodulin protein kináz (CaMKII) függő



szabályozó útvonal aktiválásával [117]. A  $I_{Ca,L}$  amplitúdójának növekedése hatására az akciós potenciál plateau potenciálja időben korábban emelkedik, ami csökkenti az első fázis repolarizáció amplitúdóját. Ez alapján nem meglepő, hogy a 9-AC gátló hatása is frekvenciafüggő, hiszen magasabb ingerlési frekvenciákon nagyobb amplitúdójú  $Ca^{2+}$  tranziens és általa nagyobb amplitúdójú  $I_{Cl(Ca)}$ -ot mértünk. Ezzel szemben a DIDS első fázis repolarizációt csökkentő hatása fordított frekvenciafüggőnek bizonyult. A 9-AC és a DIDS ezen eltérő hatását a DIDS minden frekvencián mutatkozó állandó  $Na^+$  csatorna gátlása magyarázhatja.

## 7.2 A $I_{Cl(Ca)}$ tulajdonságai

Noha a  $I_{Cl(Ca)}$ -ot számtalan faj szívizomsejtjeiben kimutatták már [9], [61], [72], a  $I_{Cl(Ca)}$  akciós potenciál alatti profilját akciós potenciál voltage-clamp technika segítségével fiziológias körülmények között ezidáig nem vizsgálták. Az egyetlen tanulmány, melyben a perforált patch-clamp technikát kombinálták az akciós potenciál voltage-clamp technikával Zygmunt és munkacsoportjától származik. A szerzők – velünk ellentétben – nem a sejt saját, hanem minden kísérletben ugyanazt a tipikusnak mondott akciós potenciált alkalmaztak feszültségparancsként, hogy tanulmányozzák a  $I_{Cl(Ca)}$ -ot. További eltérés, hogy nem specifikus DIDS-sel végezték méréseiket [113].

Munkánk második felében ezért azt vizsgáltuk, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  milyen mértékben járul hozzá a kamrai szívizomsejtek akciós potenciál kialakításához. A méréseket akciós potenciál voltage-clamp technikával végeztük. Ez a technika lehetőséget biztosított arra, hogy az ionáramok fiziológias aktivációját és akciós potenciál alatti profilját tanulmányozzuk. A mérések során nem alkalmaztunk intracelluláris  $Ca^{2+}$  puffert (kivételet képeznek azon méréseink, ahol vizsgáltuk a  $I_{Cl(Ca)}$   $Ca^{2+}$  függését) ezáltal az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció valós kinetikával változott a sejt ingerlése során.

Megállapítottuk, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  akciós potenciál alatti profilja két komponensből tevődött össze: egy korai tranziens outward és egy késői inward áramcsúcsot lehetett elkülöníteni. Az outward komponens gyors aktivációt mutatott, majd az áram amplitúdója gyorsan nullára is csökkent annak ellenére, hogy az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció magas maradt és a  $Cl^-$ -ok hajtóereje sem csökkent. A  $I_{Cl(Ca)}$ -ot létrehozó csatornák időfüggő inaktivációja magyarázhatja a jelenséget, ennek azonban ellentmond az a megfigyelés, hogy állandó intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció mellett, hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmazva az áram nem mutatott időfüggő inaktivációt [64]. Felvetődött egy alacsony  $Ca^{2+}$  affinitású kötőhelyen megvalósuló  $Ca^{2+}$ -függő inaktiváció lehetősége is [64]. A  $Ca^{2+}$ -függő inaktiváció mechanizmusát

TMEM16A-t expresszáló HEK sejtekben vizsgálták, és feltételezték, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin függő protein kináz II foszforilációja is állhat a jelenség hátterében [118]. Ez a lehetőség viszont valószínűtlennek tűnik az akciós potenciál 200-300 msec-os időtartama miatt. Egy másik lehetséges magyarázat az áram gyors csökkenésére, hogy a jukcionális résben a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció gyorsabban és nagyobb mértékben csökken, a globális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció változásához viszonyítva [82], [119]. Ezt a felvetést támogatják eredményeink is, nevezetesen a  $\text{Cl}^-$  csatornák és az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák ko-lokalizációja, mert ezáltal lehetőség van arra, hogy a  $I_{\text{Ca,L}}$  kontrollálja a közelében elhelyezkedő  $\text{Cl}^-$  csatornák kapuzását. A  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  késői, inward komponensét a membránpotenciál és a megfelelő jukcionális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció együttese hozza létre. A terminális repolarizáció alatt a membránpotenciál negatívabb mint a  $E_{\text{Cl}}$  (kísérleteink során a  $E_{\text{Cl}} - 32 \text{ mV}$  volt, kivéve, azon kísérleteket amikor a  $\text{Cl}^-$  koncentrációját megváltoztattuk), emiatt inward áram folyik a nyitott  $\text{Cl}^-$  csatornákon keresztül. A  $\text{Cl}^-$  csatornák újrainyílásának, a késői, inward komponens kialakításának több mechanizmusa is elképzelhető. Az áram aktiválódhat a megemelkedő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció, vagy éppen ellenkezőleg, a csökkenő jukcionális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció hatására is. A diastole alatt spontán  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás történhet a ryanodin receptoron keresztül a  $\text{Ca}^{2+}$ -mal túltöltődött sarcoplasmaticus retikulumból [120], [121]. Így a jukcionális rés  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja megemelkedhet, ami arrhythmogén, mert késői utódepolarizációk kialakulásához vezethet a forward módú NCX és a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  aktivációja által [69]. A  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  aktivációját igazolták késői utódepolarizációk kialakításában kutya kamrai szívműködéseken [64], birka Purkinje sejteken és kamrai szívműködéseken [72], mely eredmények felhívják a figyelmet a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  kórélettani szerepére. Azokon a sejteken, amelyeken nem tapasztaltak  $\text{Ca}^{2+}$ -túltöltődést sokkal nehezebb magyarázatot találni a jukcionális rés  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának megemelkedésére az akciós potenciál terminális repolarizációjának során. A lehetséges magyarázatok között szerepelhet a L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák reaktivációja. Tengerimalac szívműködéseken például a  $I_{\text{Ca,L}}$  amplitúdó ismételt emelkedését figyelték meg a terminális repolarizáció alatt [122]. Egy másik lehetséges magyarázat lehet, hogy az akciós potenciál terminális repolarizációja alatt a  $\text{Ca}^{2+}$ -ok disszociálódnak a myofilamentumokról, mely a lokális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció megemelkedéséhez, és ezáltal a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  és az NCX aktivációjához vezethet [123]. Saját megfigyelésünk szerint - a  $I_{\text{Cl(Ca)}}$  és a  $I_{\text{NCX}}$  ugyanazon sejten történő mérésekor - az akciós potenciál terminális repolarizációja során inward  $I_{\text{Cl(Ca)}}$ -ot és inward  $I_{\text{NCX}}$ -ot rögzítettünk.

A csökkenő jukcionális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció is lehet felelős a  $\text{Cl}^-$  csatornák újrainyílásáért. Az akciós potenciál plateau fázisa alatt a magas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció a TMEM16A inaktíválódását okozhatja a calmodulinon keresztül. Csökkenő jukcionális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció mellett a  $\text{Ca}^{2+}$

disszociál a calmodulin alacsony affinitású kötőhelyéről, és ezáltal a TMEM16A felszabadulhat a calmodulin függő inaktiváció alól [124].

### **7.3 A $I_{Cl(Ca)}$ fiziológias aktivációjához elégséges az L-típusú $Ca^{2+}$ csatornákon beáramló $Ca^{2+}$**

Nyúl pitvari szívműködéseken és Purkinje rostokon végzett korábbi kísérletek szerint a  $I_{Cl(Ca)}$  aktiválásához elengedhetetlen a sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló  $Ca^{2+}$  [107], [61]. Ennek bizonyítására Sipido és munkatársai (30-60 percig) ryanodinnal kezelték a sejteket, mely megszüntette a  $I_{Cl(Ca)}$ -ot és lecsökkentette a  $Ca^{2+}$  tranziens és a kontrakció amplitúdóját is. Ezzel szemben, kísérleteink során a 15 perces ryanodin előkezelés minden esetben csökkentette ugyan a  $I_{Cl(Ca)}$  amplitúdóját, de azt nem szüntette meg teljesen. Emellett azt is megfigyeltük, hogy a ryanodin kezelést követően a 9-AC tovább csökkentette az első repolarizáció mértékét. Felvetődhet annak a lehetősége, hogy a 15 perces ryanodin kezelés nem elég a ryanodin receptorok blokkolásához. Ennek kicsi a valószínűsége, hiszen 8-10 perces ryanodin perfúzió is megszüntette mind a sejtek  $Ca^{2+}$  tranziensét, mind a sejtrövidülést. A különbség további lehetséges magyarázata az is lehet, hogy munkacsoportunk kutya kamrai szívműködéseit végezte méréseit, míg a más tanulmányokban nyúl pitvari szívműködéseket és Purkinje rostot használtak [107], [61]. Zygmunt és munkatársai viszont kutya szívműködéseken kimutatták, hogy a ryanodin a  $I_{Cl(Ca)}$  teljes gátlását okozta [64].

Ryanodinnal végzett méréseink során a  $I_{9-AC}$  amplitúdója valamennyi esetben szignifikáns mértékben kisebb volt, mint a ryanodin előkezelés nélküli kontroll, de nem csökkent nullára. Teljes  $I_{9-AC}$  gátlást akkor tapasztaltunk, amikor nisoldipin hozzáadásával gátoltuk az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákon keresztül megvalósuló  $Ca^{2+}$  belépést. Ezen eredményünk arra utal, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  fiziológias aktivációjában az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákon beáramló  $Ca^{2+}$  -nak nélkülözhetetlen szerepe van. Más munkacsoportok is hasonló következtetésre jutottak a  $Ca^{2+}$  csatorna gátlószerek, kadmium, nisoldipin, nicardipin alkalmazásával, ahol a gátlószerek jelenlétében a  $I_{Cl(Ca)}$  eltűnt [9], [125].

A Bay K8664-gyel és isoproterenollal végzett kísérleteink eredményei további bizonyítékot szolgáltatottak az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákon beáramló  $Ca^{2+}$ -nak a  $I_{Cl(Ca)}$  aktiválásában betöltött szerepéről. A BayK 8664 és az isoproterenol egyaránt növelik a  $I_{Ca,L}$ -t és szoros összefüggést tapasztaltunk a  $I_{Ca,L}$  és a  $I_{9-AC}$  amplitúdója között. Mivel a BayK 8664 az isoproterenollal ellentétben nem foszforilálja a csatornafehérjéket, ezért ebben az esetben a direkt interakció kizárható. Mindkét aktiválószer hasonló mértékben növelte a  $I_{9-AC}$  amplitúdóját, noha a  $Ca^{2+}$

tranziens amplitúdó növelő hatásuk eltérő volt (16 és 17. ábra). Az aktiválószerkezethez hasonlóan, az ingerlési frekvencia – 1 Hz-ről 2 Hz-re – növelése, szintén  $I_{9-AC}$  amplitúdó növelő hatású. Az ingerlési frekvencia növelésének ez a hatása valószínűleg a sejtmembránon át beáramló  $Ca^{2+}$  mennyiségének, és a  $Ca^{2+}$  tranziens amplitúdójának növelése révén következik be. Összességében elmondható tehát, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  fiziológias aktivációjához elégséges az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákon beáramló  $Ca^{2+}$ . A sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló  $Ca^{2+}$  növeli ugyan a  $I_{Cl(Ca)}$  amplitúdóját, de nem alapvető fontosságú az aktiváció bekövetkeztéhez.

Tankönyvi adat, hogy az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák és a ryanodin receptorok egymás közelében helyezkednek el a diádikus részben [75]. Az elektro-mechanikai kapcsolat során a junkcionális rés  $Ca^{2+}$  koncentrációja sokkal magasabb értéket érhet el, és gyorsabb kinetikával változhat, mint amit a globális  $Ca^{2+}$  koncentráció mérések alapján feltételeztünk [82], [119]. A junkcionális rés  $Ca^{2+}$  koncentrációjának direkt mérése jelenleg még nem teljesen megoldott [119], [126].

Egy ún. cleft-célt  $Ca^{2+}$  szenzorral végzett mérések eredményei azt mutatták, hogy a junkcionális cleftben mintegy kétszer nagyobb a  $Ca^{2+}$  koncentráció változásának amplitúdója, és a  $Ca^{2+}$  tranziens felszálló szára is sokkal gyorsabb, mint a cytoplasma  $Ca^{2+}$  koncentráció változás hasonló paraméterei. A maximális  $Ca^{2+}$  koncentráció eléréséhez szükséges idő  $46 \pm 5$  ms-nak adódott a junkcionális részben és  $90 \pm 7$  ms-nak a cytoplasmában. A  $Ca^{2+}$  koncentráció csökkenés is gyorsabb kinetikát mutatott, az időállandó  $254 \pm 19$  ms illetve  $421 \pm 42$  ms volt a junkcionális rés és a cytoplasma esetén [119]. Ezen eredmények feltehetően alulbecslik a változások sebességét, ugyanis a cleft-célt  $Ca^{2+}$  szenzor a  $10 \mu\text{mol/L}$   $Ca^{2+}$  kötési  $K_d$  értéke ellenére sem képes követni az extrém  $Ca^{2+}$  koncentráció változásokat [119].

Véleményünk szerint a  $I_{Cl(Ca)}$ -ot sokkal inkább a lokális  $Ca^{2+}$  koncentráció változások irányíthatják, mint a globális intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációban beálló változások. Ezen nézetünket támogatják azon kísérleteink, melyben az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációt  $1,1 \mu\text{mol/l}$  értékre állítottuk be. Ez az érték a systole alatt mérhető maximális intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációnak felel meg. Ilyen körülmények között mért  $I_{9-AC}$  amplitúdója sokkal kisebbnek adódott, mint a  $Ca^{2+}$ -ot és puffert sem tartalmazó pipetta oldatok esetén. Ezzel összhangban áll az a megfigyelés is, melyet egér légúti simaizomsejtekben tettek, ahol a  $I_{Cl(Ca)}$  teljes aktiváláshoz  $20\text{-}50 \mu\text{mol/l}$ -es intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció volt szükséges, annak ellenére hogy az áram  $Ca^{2+}$  érzékenysége  $EC_{50}$  értékét  $3,3 \mu\text{mol/l}$ -nek becsülték [127]. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a puffertmentes pipettaoldattal mért szignifikánsan nagyobb  $I_{Cl(Ca)}$  amplitúdó a magasabb junkcionális részben mérhető  $Ca^{2+}$  koncentrációnak a következménye.

A BAPTA és az EGTA  $I_{Cl(Ca)}$ -ra és  $I_{Ca,L}$ -ra gyakorolt hatása között tapasztalható különbség is megmagyarázható azzal, hogy eltérő  $Ca^{2+}$  kötési kinetikával rendelkeznek, emiatt a különböző subcelluláris kompartmentekben – juncionális rés, intracelluláris tér – eltérő módon képesek a  $Ca^{2+}$ -t pufferelni [128]. Ennek következtében a kelátorok a  $I_{Ca,L}$   $Ca^{2+}$  függő inaktivációjára és a  $I_{Cl(Ca)}$ -ra eltérő hatékonysággal hathatnak. Noha mindkét puffer megszüntette a  $Ca^{2+}$  tranzienszt (12. ábra A), csak a BAPTA volt képes hatékonyan csökkenteni az  $I_{Ca,L}$   $Ca^{2+}$ -függő inaktivációját, ezzel szignifikánsan nagyobb  $I_{NISO}$  amplitúdót és az áram által szállított ösztöltés mennyiségét eredményezni. A  $I_{Ca,L}$   $Ca^{2+}$ -függő inaktivációjára gyakorolt hatással magyarázható a BAPTA által okozott hosszabb akciós potenciál is. BAPTA jelenlétében a  $I_{9-AC}$  megszűnt, ezzel szemben az EGTA csupán csökkentette a  $I_{9-AC}$  amplitúdóját és az áram által szállított ösztöltést. A BAPTA és az EGTA eltérő hatékonysága azzal magyarázható, hogy a BAPTA mintegy százszor gyorsabb sebességgel képes a  $Ca^{2+}$ -ot megkötni, mint az EGTA [128]. A jelen munkához hasonlóan Berkefeld és munkacsoportja is vizsgálta a BAPTA és az EGTA a nagy konduktanciájú  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  csatornákra kifejtett hatásait [129]. A mi eredményeinkkel összhangban, ők is arra a megállapításra jutottak, hogy csak a gyors  $Ca^{2+}$  kötési kinetikával rendelkező BAPTA képes pufferelni a juncionális rés  $Ca^{2+}$  koncentráció változásait, ezáltal a nagy konduktanciájú  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  csatornák EGTA jelenlétében aktiválódtak, míg BAPTA esetében az áram megszűnt [129].

A sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló  $Ca^{2+}$ -nak a  $I_{Cl(Ca)}$  aktiválódásában betöltött szerepét ryanodinnal vizsgáltuk. A  $I_{Ca,L}$   $Ca^{2+}$ -függő inaktivációja a sarcoplasmaticus reticulumból történő  $Ca^{2+}$  felszabadulástól is függ. Ryanodin jelenlétében csökken a  $I_{9-AC}$  amplitúdója, de ezen eredmény alapján nehéz megítélni a felszíni membránon keresztül és a sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló  $Ca^{2+}$  hozzájárulását a  $I_{9-AC}$  aktiválódásához. Mivel ryanodin jelenlétében a  $I_{Ca,L}$   $Ca^{2+}$ -függő inaktivációja is gátolt, ezért a  $I_{Ca,L}$  tényleges hozzájárulása valószínűleg túlbecsült ezekben a kísérletekben. További nehézséget jelent a megítélésben, hogy számos egyéb  $Ca^{2+}$ -függő folyamat is részt vesz a szívizomsejtek elektro-mechanikai kapcsolásában. Például a NCX,  $Ca^{2+}$ -függő  $K^+$  csatorna, különféle  $Ca^{2+}$  pumpák, melyek szintén az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció változásaira aktiválódnak.

#### **7.4 A TMEM16A és a Bestophin-3, valamint az L-típusú $Ca^{2+}$ csatornák egymás közelében helyezkednek el**

Munkánk során tanulmányoztuk a két legígéretesebb  $I_{Cl(Ca)}$ -ért felelős csatornafehérje, a TMEM16A és Bestrophin-3 jelenlétét és lokalizációját szívizmon [30], [33], [35], [34],[130].

A Bestrophin-1 és Bestrophin-3 egér szívizmon való kifejeződését már korábban leírták. HEK sejtekben expresszált Bestrophin-1 vagy Bestrophin-3 a  $I_{Cl(Ca)}$ -hoz hasonló áramot eredményezett az áram  $Ca^{2+}$  függése, anion szelektivitása, DIDS, illetve NFA iránti szenzitivitása szintén hasonlított a  $I_{Cl(Ca)}$ -hoz [131], [130]. Humán szívizmon ezidáig csak mRNS szinten vizsgálták a Bestrophin-3 jelenlétét [130]. Egér szívizomsejtekben a Bestrophin-3 a sarcolemmában fejeződik ki a legerősebben [130]. Kutya szívizomsejteken és egészséges humán szívizommintákon azt találtuk, hogy a Bestrophin-3 a harántcsíkolt mintázatnak megfelelően jelölődött.

A TMEM16A kifejeződését egér kamrai szívizomsejteken már korábban leírták [132], viszont kutya, illetve humán szívizommintákon nem állt rendelkezésre információ. Munkacsoportunk elsőként írta le, hogy a TMEM16A kutya és humán szíven egyaránt expresszálódik. A Bestrophin-3 ko-lokalizálódik a  $Ca_v1.2$  proteinnel (L-típusú  $Ca^{2+}$  csatorna) és a TMEM16A fehérjével, ezért feltételezzük, hogy a TMEM16A és az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák is egymás közelében helyezkednek el. Ezen eredmények összhangban állnak a légutak simaizomsejtjein találtakkal, ahol a  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornák a ryanodin receptorok közelségében találhatóak és a lokális  $Ca^{2+}$  által vezéreltek [127]. Felvetődött annak is a lehetősége, hogy a Bestrophin-ok a TMEM16A fehérjékhez kapcsolódnak és együttesen hozzák létre a funkcionális csatornát simaizom sejtekben [133]. Ezt azonban meglehetősen nehéz tesztelni, mert a TMEM16A befolyásolja a Bestrophin expresszióját [134]. A TMEM16A downregulációja nemcsak a Bestrophin expresszióját csökkentette, de az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákét is [134]. Arról is beszámoltak már, hogy a Bestrophin [135], hasonlóan a TMEM16A fehérjéhez inkább homomer csatornákat alkot [136], mely megkérdőjelezi annak a lehetőségét, hogy a Bestrophin a TMEM16A-val közösen alkosson funkcionális csatornát.

A Bestrophin-3, TMEM16A, és  $Ca_v1.2$  fehérjék jelölődése a harántcsíkolatnak megfelelően nagy valószínűséggel annak tudható be, hogy a fehérjék leginkább a T tubulusok membránjában fejeződnek ki. Hasonló mintázatú felvételeket kaptak egér és humán kamrai szívizomsejteken a  $Ca_v1.2$  fehérjék jelölésével [137]. A fehérjék ko-lokalizációjának véletlenszerű bekövetkezésének valószínűsége alacsony, hiszen a cytochrome c és TMEM16A közötti alacsony korrelációs faktor érték gyenge kapcsolatra utal. Ehhez hasonlóan a Bestrophin-3 és ryanodin receptorok közötti kapcsolat is gyengének mutatkozott. A ryanodin receptorok jelölése emlékeztetett a patkány kamrai sejtekben talált mintázatra [138]. A  $Ca_v1.2$  fehérje és ryanodin receptor, illetve ryanodin receptor és  $Ca_v1.2$  fehérje között ko-lokalizáció mértéke 57 %, illetve 37 %-nak adódott patkány kamrai szívizomsejtekben [75].

## 7.5 Klinikai relevanciák

A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornák a szívizomsejtek akciós potenciál repolarizációjában vesznek részt, mint  $I_{\text{to}2}$  [8]. A csatornák megnyílása a  $E_{\text{Cl}^-}$ -től és a membránpotenciál aktuális értékétől függően hyperpolarizáló és depolarizáló áramot is létrehozhat. A nyugalmi membránpotenciál körül, negatív membránpotenciál értékeken a  $\text{Ca}^{2+}$  függő  $\text{Cl}^-$  csatornák aktivációja depolarizálja a membránt, és arrhythmogén tranziens inward áramot generál. Ez késői utódepolarizációkhoz vezet, ami alapja lehet arrhythmia kialakulásának a  $\text{Ca}^{2+}$ -nal túltöltődött szívizomsejteken [64]. Kimutatták, hogy egér szívizmon ischaemia hatására az *Ano1* (más néven *TMEM16A*) fehérje expressziója molekuláris és funkcionális szinten is szignifikánsan megnő, mely hozzájárulhat az ischaemia indukált arrhythmia kialakulásához. [139]. A szignifikánsan nagyobb  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  annak köszönhető, hogy ischaemia hatására nő az *Ano1* expressziója és a sejtek túltöltődnek  $\text{Ca}^{2+}$ -nal. Az ischaemia során kialakuló oxidatív stressz növeli a  $\text{H}_2\text{O}_2$  szintje, ami reverzibilis vagy irreverzibilis módon aktiválja a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornákat [140]. Éppen emiatt a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornák farmakológiai gátlása az arrhythmia kialakulását megakadályozhatná, és védhetne az ischaemia-reperfúzió okozta arrhythmia kialakulás ellen.

A pozitív membránpotenciálok aktiválódó  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  negatív visszacsatoló mechanizmus lehet, mely a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  belépést limitálja, csökkentve ezáltal a korai plateau fázis nagyságát [8]. Nyúl subendocardiális szívizomsejtekben leírták, hogy a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  gátlása az akciós potenciál nyúlásához vezet, ugyanakkor subepicardiális sejteken nem befolyásolta az akciós potenciál hosszát. A csatorna kapuzásában és az áram denzitásokban nem találtak különbséget subendocardiális és subepicardiális sejtek között. A  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  ezen eltérő akciós potenciál időtartamot befolyásoló hatása miatt megállapították, hogy a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  csökkenti a bal kamra transmuralis heterogenitását [62]. Az elektromos heterogenitás az egészséges szív működéshez szükséges, alapjául szolgál az EKG-n a QRS komplexum és T hullám létrejöttének [141]. A megnövekedett akciós potenciál időtartam és refrakter szakasz heterogenitás azonban reentry típusú szívritmuszavar kialakulásának mechanizmusa lehet [142].

Fontos továbbá megjegyezni, hogy a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  nagysága függ az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációtól, és a  $\text{Ca}^{2+}$  jelentős mértékben képes befolyásolni a csatorna feszültségfüggését is. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint az autonóm idegrendszer aktiválódásának a függvénye, ezért adrenerg stimuláció esetén, a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  repolarizáló hatása megnő. Ennek patológiai jelentősége is lehet, hiszen ilyen esetekben felerősödhet a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  szerepe. Olyan hatások, melyek csökkentik a az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt, egyben csökkentik a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  jelentőségét is az akciós potenciál kialakításában [143].

A  $I_{Cl(Ca)}$  fiziológias/patológias szerepe humán szívizmon jelenleg még nem egyértelmű. Leírtak humán pitvari myocytákon 4-AP inszenzitív  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  áramot, mások viszont ezt nem igazolták [144], [145], [146] [147]. A mi méréseink viszont egyértelműen igazolták a TMEM16A és Bestrofin-3 jelenlétét humán kamrai szívizomsejteken.

## 7.6 Összegzés

Összességében elmondható, hogy a  $I_{Cl(Ca)}$  aktivációjához az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornákon át beáramló  $Ca^{2+}$  szükséges és egyben elégséges. Eredményeink azt mutatják, hogy a korábbi közleményekkel ellentétben a sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló  $Ca^{2+}$  nem nélkülözhetetlen az áram aktivációjához. Jelen tanulmányban elsőként mutattuk ki, hogy a TMEM16A és Bestophin-3 is expresszálódik kutya és humán szívizmon egyaránt. Továbbá, eredményeink azt mutatják, hogy a két fehérje egymás, valamint az L-típusú  $Ca^{2+}$  csatornák közelében helyezkedik el. A fehérjék pontos funkciójának megállapításához valamint a  $I_{Cl(Ca)}$ -ért felelős csatorna létrehozásának tisztázásához azonban további kísérletek lennének szükségesek.



## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az ionáramoknak az akciós potenciál (AP) kialakításában betöltött szerepének megértése nagy jelentőséggel bírhat, hiszen ezen csatornák kóros működése arrhythmia kialakulásához vezethet, melynek hirtelen szívhalál lehet a következménye. Annak ellenére, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  áramról ( $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ ) ismert, hogy kóros működése arrhythmia okozhat, a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  pontos szerepe az AP kialakításában kevésbé ismert. Feltételezik, hogy a TMEM16A és/vagy Bestrophin-3 proteinek lehetnek felelősek a csatorna kialakításáért. Kísérleteink célja az volt, hogy összehasonlítsuk két ismert gátlószer, a 9-antracén karboxilsav (9-AC) és a 4,4'-diisotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav (DIDS) hatásait, és eldöntsük, hogy melyik alkalmasabb a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  detektálására. Továbbá, célunk volt a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  AP alatti ( $\text{Ca}^{2+}$  puffer nélkül, AP-voltage-clamp technika) és megváltozott intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) melletti aktivációjának tanulmányozása kutya kamrai szívizomsejteken. A TMEM16A és a Bestrophin-3 regionális megoszlásának és esetleges  $\text{Ca}_v1.2$  proteinnel való ko-lokalizációjának a vizsgálatát kutya kamrai szívizomsejteken és humán szívizommintákon is elvégeztük. Megállapítottuk, hogy a 9-AC (0,5 mmol/l) és a DIDS (0,2 mmol/l) is növelte az AP időtartamot. A voltage-clamp technikával mért DIDS- és 9-AC-érzékeny áramamplitúdók azonosak voltak. A DIDS, a 9-AC-val ellentétben szignifikánsan csökkentette a depolarizáció maximális sebességének értékét, ami a DIDS  $\text{Na}^+$  áram gátló hatására utal. AP clamp mérések során a 9-AC-érzékeny áramgörbe ( $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ ) egy korai outward és egy késői inward komponensből tevődött össze, melyek időben az első fázis és a terminális repolarizációnak megfelelően jelentkeztek. A ryanodin és az EGTA mindkét komponens amplitúdóját csökkentette, míg a BAPTA teljesen megszüntette az áramkomponenseket. Az 1,1  $\mu\text{mol/l}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (a systoles  $[\text{Ca}^{2+}]$  megfelelő érték) csökkentette a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  amplitúdóját, ezzel szemben a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növelése Bay K8644, isoproterenol, és a magasabb ingerlési frekvencia által növelte a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  elengedhetetlen a  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  fiziológias aktivációjához. A TMEM16A és Bestrophin-3 erős ko-lokalizációt mutatott egymással és a  $\text{Ca}_v1.2$  fehérjével kutya izolált szívizomsejteken és humán szívizommintákon egyaránt. Eredményeink arra utalnak, hogy a DIDS és a 9-AC egyformán jól használható voltage-clamp mérésekben, de a 9-AC kedvezőbb AP mérésekben, mert nem gátolja a  $\text{Na}^+$  csatornákat. A  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  aktivációjához az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon át beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  szükséges. A sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  nem nélkülözhetetlen az áram aktivációjához, az áram aktivációjának felerősödéséhez járul hozzá. A  $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$  aktivációjához magas  $[\text{Ca}^{2+}]$  szükséges a diadikus résben, melyet a BAPTA megfelelően tud pufferelni.

## 9. SUMMARY

Understanding the role of ionic currents in shaping the cardiac action potential (AP) has great importance as channel malfunctions can lead to sudden cardiac death by inducing arrhythmias. Despite the possible contribution of  $I_{Cl(Ca)}$  may mediated by TMEM16A and/or Bestrophin-3 to cardiac arrhythmias, the true profile of  $I_{Cl(Ca)}$  during an actual ventricular AP, is poorly understood.

In this study we aimed to explore which blocker, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) or 9-anthracene carboxylic acid (9-AC) is preferable to visualize the profile of  $I_{Cl(Ca)}$ . We aimed to study  $I_{Cl(Ca)}$  at normal  $Ca^{2+}$  cycling and by AP voltage-clamp as well as in conditions designed to change  $[Ca^{2+}]_i$  in canine ventricular myocytes. The expression of TMEM16A and/or Bestrophin-3 in canine left ventricular myocytes and human ventricular myocardium by immunolabelling was examined. The possible spatial distribution of these proteins and their co-localization with  $Ca_v1.2$  was also studied.

Both inhibitors, DIDS (0.2 mmol/l) and 9-AC (0.5 mmol/l) increased AP duration. DIDS- and 9-AC-sensitive currents were identical in voltage-clamp conditions. 9-AC did not influence either the AP amplitude or the maximal rate of depolarizations ( $V_{max}$ ), while DIDS caused marked reduction of  $V_{max}$ . The profile of  $I_{Cl(Ca)}$ , identified as a 9-AC-sensitive current under AP voltage-clamp conditions, contained an early fast outward and a late inward component, overlapping early and terminal repolarizations, respectively. Both components were moderately reduced by ryanodine, while fully abolished by BAPTA, but not EGTA. Setting  $[Ca^{2+}]_i$  to the systolic level measured in the bulk cytoplasm (1.1  $\mu$ mol/l) decreased  $I_{Cl(Ca)}$ . Increase in  $[Ca^{2+}]_i$  elicited by application of BayK 8644, isoproterenol, and faster stimulation rates increased the amplitude of  $I_{Cl(Ca)}$ . We concluded that  $Ca^{2+}$ -entry through L-type  $Ca^{2+}$  channels is essential for activation of  $I_{Cl(Ca)}$ . TMEM16A and Bestrophin-3 showed strong co-localization with one another and also with  $Ca_v1.2$  channels, when assessed using immunolabeling and confocal microscopy in both canine myocytes and human ventricular myocardium.

These results suggest that DIDS and 9-AC are equally useful to study  $I_{Cl(Ca)}$  during voltage-clamp but 9-AC is superior in AP due to its lack of sodium channel inhibition. Activation of  $I_{Cl(Ca)}$  in canine ventricular cells requires  $Ca^{2+}$ -entry through neighboring L-type  $Ca^{2+}$  channels and is only augmented by SR  $Ca^{2+}$ -release. Substantial activation of  $I_{Cl(Ca)}$  requires high  $Ca^{2+}$  in the dyadic clefts which can be effectively buffered by BAPTA, but not EGTA.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] National Health Interview Survey. [http://www.cureresearch.com/a/arrhythmias/stats-country\\_printer.htm](http://www.cureresearch.com/a/arrhythmias/stats-country_printer.htm).
- [2] Deo R, Albert CM. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. *Circulation*. 2012;125:620-37.
- [3] Hoffman BF, Rosen MR. Cellular mechanisms for cardiac arrhythmias. *Circulation research*. 1981;49:1-15.
- [4] Boyden PA. Cellular electrophysiologic basis of cardiac arrhythmias. *The American journal of cardiology*. 1996;78:4-11.
- [5] Waldo AL, Wit AL. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Lancet*. 1993;341:1189-93.
- [6] Mulvaney AW, Spencer CI, Culliford S, Borg JJ, Davies SG, Kozlowski RZ. Cardiac chloride channels: physiology, pharmacology and approaches for identifying novel modulators of activity. *Drug discovery today*. 2000;5:492-505.
- [7] Siegelbaum SA, Tsien RW. Calcium-activated transient outward current in calf cardiac Purkinje fibres. *The Journal of physiology*. 1980;299:485-506.
- [8] Tseng GN, Hoffman BF. Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circulation research*. 1989;64:633-47.
- [9] Zygmunt AC, Gibbons WR. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circulation research*. 1991;68:424-37.
- [10] Varro A, Balati B, Iost N, Takacs J, Virag L, Lathrop DA, et al. The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *The Journal of physiology*. 2000;523 Pt 1:67-81.
- [11] Horvath B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nanasi PP, Banyasz T. Contribution of I Ks to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2006;452:698-706.
- [12] Banyasz T, Magyar J, Szentandrassy N, Horvath B, Birinyi P, Szentmiklosi J, et al. Action potential clamp fingerprints of K<sup>+</sup> currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta physiologica*. 2007;190:189-98.
- [13] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.
- [14] Adrian RH. Internal chloride concentration and chloride efflux of frog muscle. *The Journal of physiology*. 1961;156:623-32.
- [15] Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, et al. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*. 1992;257:797-800.
- [16] Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiological reviews*. 1999;79:S3-S22.
- [17] Planells-Cases R, Jentsch TJ. Chloride channelopathies. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1792:173-89.
- [18] Duran C, Thompson CH, Xiao Q, Hartzell HC. Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable. *Annual review of physiology*. 2010;72:95-121.
- [19] Duan D. Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *The Journal of physiology*. 2009;587:2163-77.

- [20] Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological reviews*. 2002;82:503-68.
- [21] Cross NL. Initiation of the activation potential by an increase in intracellular calcium in eggs of the frog, *Rana pipiens*. *Developmental biology*. 1981;85:380-4.
- [22] Miledi R. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1982;215:491-7.
- [23] Barish ME. A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *The Journal of physiology*. 1983;342:309-25.
- [24] Bader CR, Bertrand D, Schwartz EA. Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *The Journal of physiology*. 1982;331:253-84.
- [25] Hartzell HC, Yu K, Xiao Q, Chien LT, Qu Z. Anoctamin/TMEM16 family members are Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *The Journal of physiology*. 2009;587:2127-39.
- [26] Hartzell C, Putzier I, Arreola J. Calcium-activated chloride channels. *Annual review of physiology*. 2005;67:719-58.
- [27] Cunningham SA, Awayda MS, Bubien JK, Ismailov, II, Arrate MP, Berdiev BK, et al. Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:31016-26.
- [28] Huang F, Wong X, Jan LY. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXV: calcium-activated chloride channels. *Pharmacological reviews*. 2012;64:1-15.
- [29] Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T, et al. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nature genetics*. 1998;19:241-7.
- [30] Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:4008-13.
- [31] Tsunenari T, Sun H, Williams J, Cahill H, Smallwood P, Yau KW, et al. Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:41114-25.
- [32] Zhang Y, Stanton JB, Wu J, Yu K, Hartzell HC, Peachey NS, et al. Suppression of Ca<sup>2+</sup> signaling in a mouse model of Best disease. *Human molecular genetics*. 2010;19:1108-18.
- [33] Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*. 2008;322:590-4.
- [34] Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*. 2008;134:1019-29.
- [35] Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*. 2008;455:1210-5.
- [36] White MM, Aylwin M. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels in *Xenopus* oocytes. *Molecular pharmacology*. 1990;37:720-4.
- [37] Xu Y, Dong PH, Zhang Z, Ahmmed GU, Chiamvimonvat N. Presence of a calcium-activated chloride current in mouse ventricular myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283:H302-14.
- [38] Forrest AS, Joyce TC, Huebner ML, Ayon RJ, Wiwchar M, Joyce J, et al. Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension. *American journal of physiology Cell physiology*. 2012;303:C1229-43.

- [39] Zhou SS, Gao Z, Dong L, Ding YF, Zhang XD, Wang YM, et al. Anion channels influence ECC by modulating L-type Ca(2+) channel in ventricular myocytes. *Journal of applied physiology*. 2002;93:1660-8.
- [40] Jones K, Shmygol A, Kupittayanant S, Wray S. Electrophysiological characterization and functional importance of calcium-activated chloride channel in rat uterine myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2004;448:36-43.
- [41] Zhou SS, Yang J, Li YQ, Zhao LY, Xu M, Ding YF. Effect of Cl- channel blockers on aconitine-induced arrhythmias in rat heart. *Experimental physiology*. 2005;90:865-72.
- [42] Zhou SS, Zhang LB, Sun WP, Xiao FC, Zhou YM, Li YJ, et al. Effects of monocarboxylic acid-derived Cl- channel blockers on depolarization-activated potassium currents in rat ventricular myocytes. *Experimental physiology*. 2007;92:549-59.
- [43] Wang HS, Dixon JE, McKinnon D. Unexpected and differential effects of Cl- channel blockers on the Kv4.3 and Kv4.2 K+ channels. Implications for the study of the I(to2) current. *Circulation research*. 1997;81:711-8.
- [44] Nabauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation*. 1996;93:168-77.
- [45] Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, et al. Role of the Kv4.3 K+ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circulation research*. 1996;79:659-68.
- [46] Kirkup AJ, Edwards G, Weston AH. Investigation of the effects of 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB) on membrane currents in rat portal vein. *British journal of pharmacology*. 1996;117:175-83.
- [47] Walsh KB, Wang C. Effect of chloride channel blockers on the cardiac CFTR chloride and L-type calcium currents. *Cardiovascular research*. 1996;32:391-9.
- [48] Walsh KB, Long KJ. Properties of a protein kinase C-activated chloride current in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation research*. 1994;74:121-9.
- [49] Tseng GN. Cell swelling increases membrane conductance of canine cardiac cells: evidence for a volume-sensitive Cl channel. *The American journal of physiology*. 1992;262:C1056-68.
- [50] Hume JR, Duan D, Collier ML, Yamazaki J, Horowitz B. Anion transport in heart. *Physiological reviews*. 2000;80:31-81.
- [51] Hart P, Warth JD, Levesque PC, Collier ML, Geary Y, Horowitz B, et al. Cystic fibrosis gene encodes a cAMP-dependent chloride channel in heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:6343-8.
- [52] Egan TM, Noble D, Noble SJ, Powell T, Twist VW, Yamaoka K. On the mechanism of isoprenaline- and forskolin-induced depolarization of single guinea-pig ventricular myocytes. *The Journal of physiology*. 1988;400:299-320.
- [53] Harvey RD, Hume JR. Autonomic regulation of a chloride current in heart. *Science*. 1989;244:983-5.
- [54] Bahinski A, Nairn AC, Greengard P, Gadsby DC. Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature*. 1989;340:718-21.
- [55] Levesque PC, Clark CD, Zakarov SI, Rosenshtraukh LV, Hume JR. Anion and cation modulation of the guinea-pig ventricular action potential during beta-adrenoceptor stimulation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1993;424:54-62.

- [56] Jentsch TJ, Gunther W, Pusch M, Schwappach B. Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *The Journal of physiology*. 1995;482:19S-25S.
- [57] Duan D, Winter C, Cowley S, Hume JR, Horowitz B. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature*. 1997;390:417-21.
- [58] Takano M, Noma A. Distribution of the isoprenaline-induced chloride current in rabbit heart. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 1992;420:223-6.
- [59] James AF, Tominaga T, Okada Y, Tominaga M. Distribution of cAMP-activated chloride current and CFTR mRNA in the guinea pig heart. *Circulation research*. 1996;79:201-7.
- [60] Vandenberg JJ, Yoshida A, Kirk K, Powell T. Swelling-activated and isoprenaline-activated chloride currents in guinea pig cardiac myocytes have distinct electrophysiology and pharmacology. *The Journal of general physiology*. 1994;104:997-1017.
- [61] Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E.  $[Ca^{2+}]_i$  transients and  $[Ca^{2+}]_i$ -dependent chloride current in single Purkinje cells from rabbit heart. *The Journal of physiology*. 1993;468:641-67.
- [62] Verkerk AO, Tan HL, Ravesloot JH.  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  current reduces transmural electrical heterogeneity within the rabbit left ventricle. *Acta physiologica Scandinavica*. 2004;180:239-47.
- [63] Li GR, Sun H, To J, Tse HF, Lau CP. Demonstration of calcium-activated transient outward chloride current and delayed rectifier potassium currents in Swine atrial myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;36:495-504.
- [64] Zygmunt AC. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *The American journal of physiology*. 1994;267:H1984-95.
- [65] Vaughan-Jones RD. Non-passive chloride distribution in mammalian heart muscle: micro-electrode measurement of the intracellular chloride activity. *The Journal of physiology*. 1979;295:83-109.
- [66] Caille JP, Ruiz-Ceretti E, Schanne OF. Intracellular chloride activity in rabbit papillary muscle: effect of ouabain. *The American journal of physiology*. 1981;240:C183-8.
- [67] Cranefield PF. Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circulation research*. 1977;41:415-23.
- [68] Han X, Ferrier GR. Ionic mechanisms of transient inward current in the absence of  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchange in rabbit cardiac Purkinje fibres. *The Journal of physiology*. 1992;456:19-38.
- [69] Zygmunt AC, Goodrow RJ, Weigel CM.  $INaCa$  and  $ICl(Ca)$  contribute to isoproterenol-induced delayed after depolarizations in midmyocardial cells. *The American journal of physiology*. 1998;275:H1979-92.
- [70] Lipp P, Pott L. Transient inward current in guinea-pig atrial myocytes reflects a change of sodium-calcium exchange current. *The Journal of physiology*. 1988;397:601-30.
- [71] Cannell MB, Lederer WJ. The arrhythmogenic current  $IT_1$  in the absence of electrogenic sodium-calcium exchange in sheep cardiac Purkinje fibres. *The Journal of physiology*. 1986;374:201-19.
- [72] Verkerk AO, Veldkamp MW, Bouman LN, van Ginneken AC. Calcium-activated  $Cl^{-}$  current contributes to delayed afterdepolarizations in single Purkinje and ventricular myocytes. *Circulation*. 2000;101:2639-44.
- [73] Sipido KR, Callewaert G, Porciatti F, Vereecke J, Carmeliet E.  $[Ca^{2+}]_i$ -dependent membrane currents in guinea-pig ventricular cells in the absence of  $Na/Ca$  exchange. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 1995;430:871-8.
- [74] Grantham CJ, Cannell MB.  $Ca^{2+}$  influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation research*. 1996;79:194-200.

- [75] Scriven DR, Dan P, Moore ED. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophysical journal*. 2000;79:2682-91.
- [76] Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 1993;262:740-4.
- [77] Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. Spatial non-uniformities in  $[Ca^{2+}]_i$  during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophysical journal*. 1994;67:1942-56.
- [78] Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT. Calmodulin is the  $Ca^{2+}$  sensor for  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*. 1999;22:549-58.
- [79] Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E. Inhibition and rapid recovery of  $Ca^{2+}$  current during  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation research*. 1995;76:102-9.
- [80] Puglisi JL, Yuan W, Bassani JW, Bers DM.  $Ca^{2+}$  influx through  $Ca^{2+}$  channels in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: influence of temperature. *Circulation research*. 1999;85:e7-e16.
- [81] Langer GA, Peskoff A. Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. *Biophysical journal*. 1996;70:1169-82.
- [82] Acsai K, Antoons G, Livshitz L, Rudy Y, Sipido KR. Microdomain  $[Ca^{2+}]_i$  near ryanodine receptors as reported by L-type  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchange currents. *The Journal of physiology*. 2011;589:2569-83.
- [83] Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *The Journal of physiology*. 1994;476:279-93.
- [84] Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by  $Mg^{2+}$  and phosphorylation. *Science*. 1995;267:1997-2000.
- [85] Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;278:H769-79.
- [86] Magyar J, Banyasz T, Sziligeti P, Kortvely A, Jednakovits A, Nanasi PP. Electrophysiological effects of bimocloamol in canine ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2000;361:303-10.
- [87] McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkenny C, Wainwright CL. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *British journal of pharmacology*. 2010;160:1573-6.
- [88] Jost N, Virag L, Comtois P, Ordog B, Szuts V, Seprenyi G, et al. Ionic mechanisms limiting cardiac repolarization reserve in humans compared to dogs. *The Journal of physiology*. 2013;591:4189-206.
- [89] Volders PG, Kulcsar A, Vos MA, Sipido KR, Wellens HJ, Lazzara R, et al. Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Cardiovascular research*. 1997;34:348-59.
- [90] Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1981;391:85-100.
- [91] Strichartz G, Cohen I.  $V_{max}$  as a measure of  $GNa$  in nerve and cardiac membranes. *Biophysical journal*. 1978;23:153-6.

- [92] Banyasz T, Fulop L, Magyar J, Szentandrassy N, Varro A, Nanasi PP. Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. *Cardiovascular research*. 2003;58:66-75.
- [93] Ruzsnavszky F, Hegyi B, Kistamas K, Vaczi K, Horvath B, Szentandrassy N, et al. Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2014;387:457-67.
- [94] Kawai M, Hussain M, Orchard CH. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *The American journal of physiology*. 1999;277:H603-9.
- [95] Kocic I. Modulators of ion channels activated by hypotonic swelling in cardiomyocytes: new perspectives for pharmacological treatment of life-threatening arrhythmias. *Current medicinal chemistry Cardiovascular and hematological agents*. 2005;3:333-9.
- [96] Baron A, Pacaud P, Loirand G, Mironneau C, Mironneau J. Pharmacological block of Ca(2+)-activated Cl<sup>-</sup> current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1991;419:553-8.
- [97] Cotton KD, Hollywood MA, McHale NG, Thornbury KD. Ca<sup>2+</sup> current and Ca(2+)-activated chloride current in isolated smooth muscle cells of the sheep urethra. *The Journal of physiology*. 1997;505 ( Pt 1):121-31.
- [98] Sorota S. Pharmacologic properties of the swelling-induced chloride current of dog atrial myocytes. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 1994;5:1006-16.
- [99] Harvey RD, Clark CD, Hume JR. Chloride current in mammalian cardiac myocytes. Novel mechanism for autonomic regulation of action potential duration and resting membrane potential. *The Journal of general physiology*. 1990;95:1077-102.
- [100] Shida S, Nakaya H, Kanno M. Effects of Cl<sup>-</sup> channel blockers on beta-adrenoceptor-mediated decreases in resting potential and intracellular Cl<sup>-</sup> activity in guinea-pig heart. *European journal of pharmacology*. 1992;212:267-70.
- [101] Harvey RD. Effects of stilbenedisulfonic acid derivatives on the cAMP-regulated chloride current in cardiac myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1993;422:436-42.
- [102] Sorota S, Siegal MS, Hoffman BF. The isoproterenol-induced chloride current and cardiac resting potential. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1991;23:1191-8.
- [103] Oz MC, Sorota S. Forskolin stimulates swelling-induced chloride current, not cardiac cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator current, in human cardiac myocytes. *Circulation research*. 1995;76:1063-70.
- [104] Kawano S, Hirayama Y, Hiraoka M. Activation mechanism of Ca(2+)-sensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *The Journal of physiology*. 1995;486 ( Pt 3):593-604.
- [105] Li GR, Du XL, Siow YL, O K, Tse HF, Lau CP. Calcium-activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential. *Cardiovascular research*. 2003;58:89-98.
- [106] Szigeti G, Rusznak Z, Kovacs L, Papp Z. Calcium-activated transient membrane currents are carried mainly by chloride ions in isolated atrial, ventricular and Purkinje cells of rabbit heart. *Experimental physiology*. 1998;83:137-53.
- [107] Zygmunt AC, Gibbons WR. Properties of the calcium-activated chloride current in heart. *The Journal of general physiology*. 1992;99:391-414.
- [108] Verkerk AO, Wilders R, Zegers JG, van Borren MM, Ravesloot JH, Verheijck EE. Ca(2+)-activated Cl(-) current in rabbit sinoatrial node cells. *The Journal of physiology*. 2002;540:105-17.



- [109] Bradley E, Fedigan S, Webb T, Hollywood MA, Thornbury KD, McHale NG, et al. Pharmacological characterization of TMEM16A currents. *Channels*. 2014;8:308-20.
- [110] Trafford AW, Diaz ME, Eisner DA. Ca-activated chloride current and Na-Ca exchange have different timecourses during sarcoplasmic reticulum Ca release in ferret ventricular myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1998;435:743-5.
- [111] Zhang S, Chen Y, An H, Liu H, Li J, Pang C, et al. A novel biophysical model on calcium and voltage dual dependent gating of calcium-activated chloride channel. *Journal of theoretical biology*. 2014;355:229-35.
- [112] Hirayama Y, Kuruma A, Hiraoka M, Kawano S. Calcium-activated Cl<sup>-</sup> current is enhanced by acidosis and contributes to the shortening of action potential duration in rabbit ventricular myocytes. *The Japanese journal of physiology*. 2002;52:293-300.
- [113] Zygmunt AC, Robitelle DC, Eddlestone GT. Ito1 dictates behavior of I<sub>Cl(Ca)</sub> during early repolarization of canine ventricle. *The American journal of physiology*. 1997;273:H1096-106.
- [114] Liu J, Lai ZF, Wang XD, Tokutomi N, Nishi K. Inhibition of sodium current by chloride channel blocker 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) in guinea pig cardiac ventricular cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998;31:558-67.
- [115] Szabo G, Szentandrassy N, Biro T, Toth BI, Czifra G, Magyar J, et al. Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2005;450:307-16.
- [116] Wang Z, Feng J, Shi H, Pond A, Nerbonne JM, Nattel S. Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K<sup>+</sup> current in rabbit and human atrial myocytes. *Circulation research*. 1999;84:551-61.
- [117] Bers DM, Morotti S. Ca<sup>2+</sup> current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:144.
- [118] Tian Y, Schreiber R, Kunzelmann K. Anoctamins are a family of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Journal of cell science*. 2012;125:4991-8.
- [119] Despa S, Shui B, Bossuyt J, Lang D, Kotlikoff MI, Bers DM. Junctional cleft [Ca<sup>2+</sup>(+)]<sub>i</sub> measurements using novel cleft-targeted Ca<sup>2+</sup>(+) sensors. *Circulation research*. 2014;115:339-47.
- [120] Fink M, Noble PJ, Noble D. Ca<sup>2+</sup>(+)-induced delayed afterdepolarizations are triggered by dyadic subspace Ca<sup>2+</sup>(+) affirming that increasing SERCA reduces aftercontractions. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301:H921-35.
- [121] Horvath B, Banyasz T, Jian Z, Hegyi B, Kistamas K, Nanasi PP, et al. Dynamics of the late Na<sup>+</sup> current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;64:59-68.
- [122] Banyasz T, Horvath B, Jian Z, Izu LT, Chen-Izu Y. Profile of L-type Ca<sup>2+</sup> current and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current during cardiac action potential in ventricular myocytes. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2012;9:134-42.
- [123] Boyden PA. Chasing calcium. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2012;9:143-4.
- [124] Yang T, Colecraft HM. Calmodulin regulation of TMEM16A and 16B Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels. *Channels*. 2016;10:38-44.
- [125] Saleh SN, Greenwood IA. Activation of chloride currents in murine portal vein smooth muscle cells by membrane depolarization involves intracellular calcium release. *American journal of physiology Cell physiology*. 2005;288:C122-31.

- [126] Shang W, Lu F, Sun T, Xu J, Li LL, Wang Y, et al. Imaging Ca<sup>2+</sup> nanosparks in heart with a new targeted biosensor. *Circulation research*. 2014;114:412-20.
- [127] Bao R, Lifshitz LM, Tuft RA, Bellve K, Fogarty KE, ZhuGe R. A close association of RyRs with highly dense clusters of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels underlies the activation of STICs by Ca<sup>2+</sup> sparks in mouse airway smooth muscle. *The Journal of general physiology*. 2008;132:145-60.
- [128] Pasek M, Simurda J, Orchard CH. Effect of Ca<sup>2+</sup> efflux pathway distribution and exogenous Ca<sup>2+</sup> buffers on intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics in the rat ventricular myocyte: a simulation study. *BioMed research international*. 2014;2014:920208.
- [129] Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart JO, Eble S, et al. BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> signaling. *Science*. 2006;314:615-20.
- [130] O'Driscoll KE, Hatton WJ, Burkin HR, Leblanc N, Britton FC. Expression, localization, and functional properties of Bestrophin 3 channel isolated from mouse heart. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;295:C1610-24.
- [131] O'Driscoll KE, Leblanc N, Hatton WJ, Britton FC. Functional properties of murine bestrophin 1 channel. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;384:476-81.
- [132] Ye Z, Wu MM, Wang CY, Li YC, Yu CJ, Gong YF, et al. Characterization of Cardiac Anoctamin1 Ca<sup>-</sup> activated Chloride Channels and Functional Role in Ischemia-Induced Arrhythmias. *Journal of cellular physiology*. 2014.
- [133] Dam VS, Boedtker DM, Aalkjaer C, Matchkov V. The bestrophin- and TMEM16A-associated Ca(2+)- activated Cl(-) channels in vascular smooth muscles. *Channels*. 2014;8:361-9.
- [134] Dam VS, Boedtker DM, Nyvad J, Aalkjaer C, Matchkov V. TMEM16A knockdown abrogates two different Ca(2+)-activated Cl (-) currents and contractility of smooth muscle in rat mesenteric small arteries. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2014;466:1391-409.
- [135] Bharill S, Fu Z, Palty R, Isacoff EY. Stoichiometry and specific assembly of Best ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111:6491-6.
- [136] Tien J, Lee HY, Minor DL, Jr., Jan YN, Jan LY. Identification of a dimerization domain in the TMEM16A calcium-activated chloride channel (CaCC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:6352-7.
- [137] Hong TT, Smyth JW, Gao D, Chu KY, Vogan JM, Fong TS, et al. BIN1 localizes the L-type calcium channel to cardiac T-tubules. *PLoS biology*. 2010;8:e1000312.
- [138] Chen-Izu Y, McCulle SL, Ward CW, Soeller C, Allen BM, Rabang C, et al. Three-dimensional distribution of ryanodine receptor clusters in cardiac myocytes. *Biophysical journal*. 2006;91:1-13.
- [139] Ye Z, Wu MM, Wang CY, Li YC, Yu CJ, Gong YF, et al. Characterization of Cardiac Anoctamin1 Ca(2+)-Activated Chloride Channels and Functional Role in Ischemia-Induced Arrhythmias. *Journal of cellular physiology*. 2015;230:337-46.
- [140] Jeulin C, Guadagnini R, Marano F. Oxidant stress stimulates Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels in the apical activated membrane of cultured nonciliated human nasal epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;289:L636-46.
- [141] Katz LN. The genesis of the electrocardiogram. *Physiological reviews*. 1947;27:398-435.
- [142] Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circulation research*. 1977;41:9-18.
- [143] Nakayama T, Fozzard HA. Adrenergic modulation of the transient outward current in isolated canine Purkinje cells. *Circulation research*. 1988;62:162-72.

- [144] Escande D, Coulombe A, Faivre JF, Deroubaix E, Coraboeuf E. Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *The American journal of physiology*. 1987;252:H142-8.
- [145] Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Comparative mechanisms of 4-aminopyridine-resistant I<sub>to</sub> in human and rabbit atrial myocytes. *The American journal of physiology*. 1995;269:H463-72.
- [146] Koster OF, Szigeti GP, Beuckelmann DJ. Characterization of a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-dependent current in human atrial and ventricular cardiomyocytes in the absence of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. *Cardiovascular research*. 1999;41:175-87.
- [147] Verkerk AO, Tan HL, Kirkels JH, Ravesloot JH. Role of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current during proarrhythmic early afterdepolarizations in sheep and human ventricular myocytes. *Acta physiologica Scandinavica*. 2003;179:143-8.

## 11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/279/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Váczai Krisztina  
Neptun kód: RDZWCZ  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

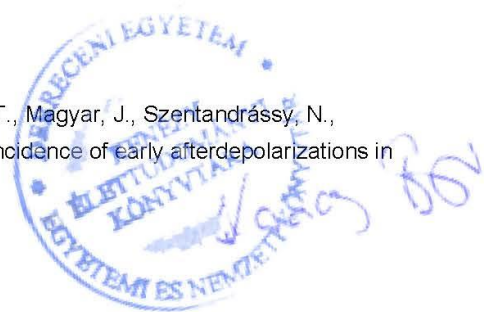
1. Horváth, B.\*, **Váczai, K.\***, Hegyi, B., Gönczi, M., Dienes, B., Kistamás, K., Bányász, T., Magyar, J., Baczkó, I., Varró, A., Seprényi, G., Csernoch, L., Nánási, P. P., Szentandrassy, N.: Sarcolemmal Ca<sup>2+</sup>-entry through L-type Ca<sup>2+</sup> channels controls the profile of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current in canine ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97, 125-139, 2016.  
\*The two first authors have equally contributed.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.05.006>  
IF: 4.874 (2015)
2. **Váczai, K.**, Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., Kistamás, K., Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrassy, N., Magyar, J.: 9-Anthracene carboxylic acid is more suitable than DIDS for characterization of calcium-activated chloride current during canine ventricular action potential. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 388 (1), 87-100, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-1050-9>  
IF: 2.376





### További közlemények

3. Szentandrásy, N., Horváth, B., **Váczi, K.**, Kistamás, K., Masuda, L., Magyar, J., Bányász, T., Papp, Z., Nánási, P. P.: Dose-dependent electrophysiological effects of the myosin activator omecamtiv mecarbil in canine ventricular cardiomyocytes.  
*J. Physiol. Pharmacol.* "Accepted by Publisher", 2016.  
IF: 2.804 (2015)
4. Nánási, P. P., **Váczi, K.**, Papp, Z.: The myosin activator omecamtiv mecarbil: a promising new inotropic agent.  
*Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94 (10), 1033-1039, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2015-0573>  
IF: 1.704 (2015)
5. Kistamás, K., Szentandrásy, N., Hegyi, B., **Váczi, K.**, Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P. P., Magyar, J.: Changes in intracellular calcium concentration influence beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes.  
*J. Physiol. Pharmacol.* 66 (1), 73-81, 2015.  
IF: 2.804
6. Magyar, J., Kistamás, K., **Váczi, K.**, Hegyi, B., Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrásy, N.: Concept of relative variability of cardiac action potential duration and its test under various experimental conditions.  
*Gen. Physiol. Biophys.* 35 (1), 55-62, 2015.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.4149/gpb\\_2015019](http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2015019)  
IF: 0.892
7. Szentandrásy, N., Kistamás, K., Hegyi, B., Horváth, B., Ruzsnavszky, F., **Váczi, K.**, Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P.: Contribution of ion currents to beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes.  
*Pflügers Arch.* 467 (7), 1431-1443, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-014-1581-4>  
IF: 3.654
8. Horváth, B., Hegyi, B., Kistamás, K., **Váczi, K.**, Bányász, T., Magyar, J., Szentandrásy, N., Nánási, P. P.: Cytosolic calcium changes affect the incidence of early afterdepolarizations in canine ventricular myocytes.  
*Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93 (7), 527-534, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2014-0511>  
IF: 1.704





9. Kistamás, K., Hegyi, B., **Váczi, K.**, Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Szentandrassy, N., Nánási, P. P.: Oxidative shift in tissue redox potential increases beat-to-beat variability of action potential duration.  
*Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93 (7), 563-568, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2014-0531>  
IF: 1.704
10. Ruzsnavszky, F., Hegyi, B., Kistamás, K., **Váczi, K.**, Horváth, B., Szentandrassy, N., Bányász, T., Nánási, P. P., Magyar, J.: Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes.  
*Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 387 (5), 457-467, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-0964-6>  
IF: 2.471
11. Kormos, A., Nagy, N., Acsai, K., **Váczi, K.**, Ágoston, S., Pollesello, P., Levijoki, J., Szentandrassy, N., Papp, G. J., Varró, A., Tóth, A.: Efficacy of selective NCX inhibition by ORM-10103 during simulated ischemia/reperfusion.  
*Eur. J. Pharmacol.* 740, 539-551, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.033>  
IF: 2.532
12. Kistamás, K., Szentandrassy, N., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., **Váczi, K.**, Bárándi, L., Horváth, B., Szebeni, A., Magyar, J., Bányász, T., Kecskeméti, V., Nánási, P. P.: Effects of pioglitazone on cardiac ion currents and action potential morphology in canine ventricular myocytes.  
*Eur. J. Pharmacol.* 710 (1-3), 10-19, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.047>  
IF: 2.684
13. Szabó, L., Szentandrassy, N., Kistamás, K., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., **Váczi, K.**, Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Pál, B., Nánási, P. P.: Effects of tacrolimus on action potential configuration and transmembrane ion currents in canine ventricular cells.  
*Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 386 (3), 239-246, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0823-2>  
IF: 2.36





14. Hegyi, B., Komáromi, I., Kistamás, K., Ruzsnavszky, F., **Vácz, K.**, Horváth, B., Magyar, J.,  
Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrassy, N.: Tetrodotoxin Blockade on Canine Cardiac L-  
Type Ca<sup>2+</sup> Channels Depends on pH and Redox Potential.  
*Mar Drugs*. 11 (6), 2140-2153, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md11062140>  
IF: 3.512

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,075**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,25**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.10.18.



## 12. TÁRGYSZAVAK

kalcium-függő klorid áram;  
TMEM16A;  
Bestrophin-3;  
emlős szívizomsejtek  
antracén-9-karboxilsav;  
DIDS;  
akciós potenciál;  
ionáramok;  
akciós potenciál voltage-clamp;

## 13. KEYWORDS

calcium-activated chloride current;  
TMEM16A;  
Bestrophin-3;  
9-Anthracene carboxylic acid;  
DIDS;  
mammalian cardiomyocytes;  
action potential;  
ion currents;  
action potential voltage-clamp;



## 14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Magyar Jánosnak az áldozatkész segítségét, bátorítását, elméleti és gyakorlati tanácsait, amelyek nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom Dr. Szentandrassy Norbertnek, akitől nagyon sokat tanulhattam nemcsak az elektrofiziológiai mérések, hanem elméleti ismeretek terén is.

Köszönettel tartozom a Szívelektrofiziológiai Laboratórium vezetőjének, Prof. Dr. Nánási Péternek a hatékony munkavégzés feltételeinek biztosításáért, a hasznos tanácsokért és a bátorításért, továbbá Dr. Bányász Tamásnak, akihez bármikor fordulhattam segítségkéréssel.

Köszönettel tartozok Dr. Bárándi László Viktornak, Dr. Horváth Baláznak, Dr. Szabó Gergelynek, Dr. Harmati Gábornak, akik bevezettek az elektrofiziológia rejtelmeibe.

Hálával tartozom hajdani PhD hallgatótársaimnak, Dr. Kistamás Kornélnak, Dr. Hegyi Bencének és Dr. Ruzsnavszky Ferencnek, akikkel megoszthattam a közösen végzett munka felejthetetlen pillanatait.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Szentandrassy Dr. Gönczi Mónikának, aki nélkülözhetetlen munkájával hozzájárult az értekezésben bemutatott eredmények elkészítéséhez.

A kísérletek előkészítése során segítséget nyújtott és derűs légkört teremtett Sági Éva.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, aki a Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola vezetőjeként és az Élettani Intézet igazgatójaként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Köszönöm az Élettani Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, hogy támogattak és segítettek munkámat.

Végül, de nem utolsósorban férjemnek, Medvés Péternek, családomnak és barátaimnak köszönöm a türelmet és a támogatást.

## **15. FÜGGELÉK**

Az értekezést megalapozó közlemények gyűjteménye