

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Szabó Gergely

**Területi és nemi inhomogenitás az emlős kamrai
szívizomszövetben**



Témavezető:

Dr. Bányász Tamás

Programvezető:

Dr. Csernoch László

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2009.**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
I. BEVEZETÉS.....	3
I/1. A szívizom elektrofiziológiája, az akciós potenciál keletkezése.....	3
I/2. A szívizom rétegei közötti inhomogenitás	6
I/3. Vertikális különbségek a szívben belül	9
I/4. Nemi hormonok hatása a szívizom elektromos sajátságaira	11
II. CÉLKITŰZÉS.....	14
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	14
III/1. Szívizom preparátumok	14
III/2. Elektrofiziológiai vizsgálatok	15
III/2. 1. Sejtizolálás	15
III/2. 2. Az akciós potenciálok mérése.....	15
III/2. 3. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával	17
III/3. EKG mérések	18
III/4. Western (immuno)blot.....	20
III/5. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis.....	21
IV. EREDMÉNYEK.....	22
IV/1. Akciós potenciál karakterisztika és membránkapacitás	22
IV/2. Befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})	23
IV/3. L-típusú kalciumáram (I_{Ca}).....	24
IV/4. Tranziens, kifelé irányuló káliumáram (I_{to}).....	25
IV/5. A késői típusú káliumáram gyors komponense (I_{Kr})	27
IV/6. A késői típusú káliumáram lassú komponense (I_{Ks}).....	29
IV/7. Ioncsatorna proteinek eloszlása a szívizom különböző területein.....	31
IV/8. Nemi hormonok hatása az EKG paraméterekre	35
IV/8. 1. Plazmahormon-szintek	35
IV/8. 2. Szívfrekvencia és az atrioventrikuláris vezetés	36
IV/8. 3. Kamrai depolarizáció és repolarizáció	37
IV/8. 4. Dofetilide indukált repolarizáció nyújtás	39
IV/9. Nemi hormonok hatása az ioncsatorna proteinek expressziós mintázatára.....	39
V. DISZKUSSZIÓ.....	42
V/1. A szívizom regionális különbségei	42
V/1. 1. EPI/MID asszimetria.....	42
V/1. 2. APEX/BASE inhomogenitás	45
V/1. 3. Jelentőség és a vizsgálatok korlátai	46
V/2. Nemi hormonok és kardiális ioncsatornák.....	48
V/2. 1. Jelentőség és az EKG vizsgálatok korlátai	50
V/3. Konklúzió.....	51
ÖSSZEFOGLALÁS	52
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	56
IRODALOMJEGYZÉK	57
FÜGGELÉK	72

I. BEVEZETÉS

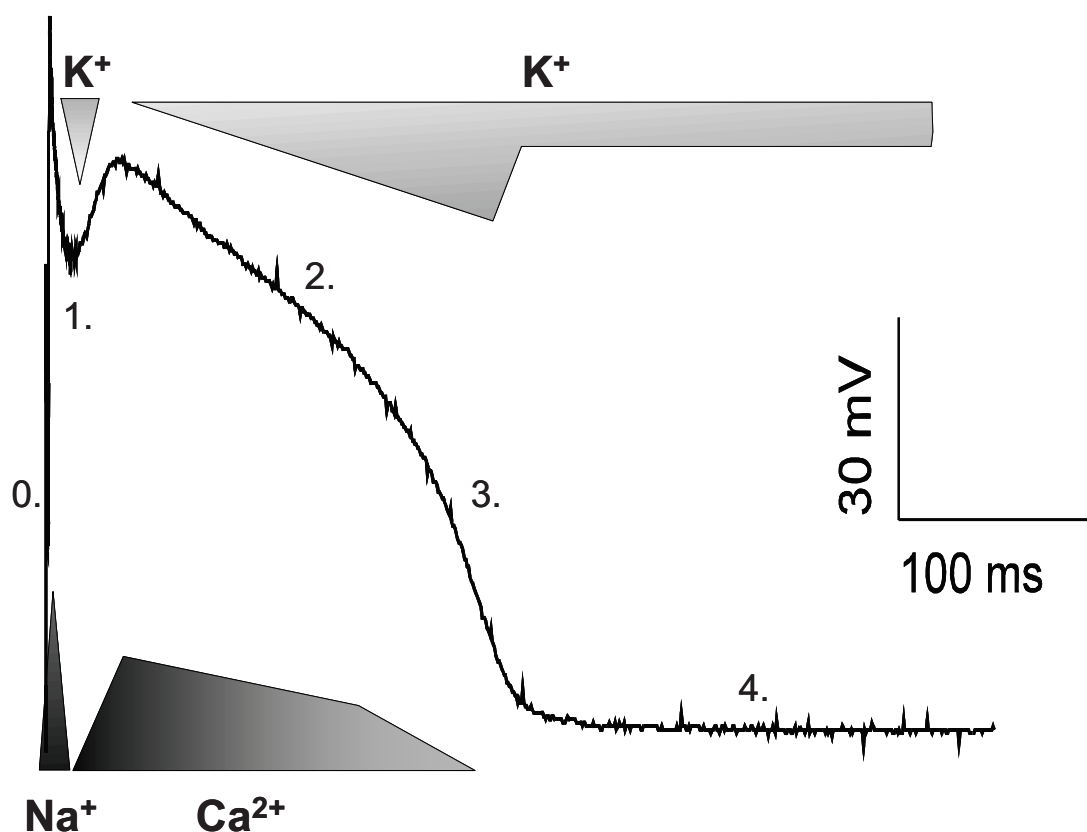
A szív izomzata a hagyományos elképzelések szerint homogén morfológiájú és funkciójú sejtek által felépített úgynevezett „functionalis syncytium”. Ez a hosszú időn át, szinte dogmaként kezelt felfogás gyorsan semmivé foszlott, mikor az első megfigyelések napvilágot láttak a jobb és a bal kamra falát alkotó sejtek funkcionális különbözőségéről [57, 101, 113, 133]. Ahogy ez lenni szokott, a kezdeti megfigyeléseket lavinaszerűen követték az újabbak, és a szívmot alkotó sejtek funkcionális inhomogenitása ma már tankönyvi adat. A szívmot elektrofiziológiai inhomogenitására számos példa van. Az akciós potenciál morfológiája jelentős különbséget mutat a pitvar és a kamra, vagy a jobb kamra bal kamra, epikardiális és endokardiális régió összehasonlításakor. Az akciós potenciáloknak a szívmot belüli különbözőségéért a sejtmembrán ionáramainak ugyancsak megfigyelt regionális inhomogenitása a felelős. Ebben a munkában azt kívántuk megvizsgálni, hogy a szívmotsejtek elektrofiziológiai inhomogenitása magyarázható-e az ioncsatornák expressziós mintázatának különbségeivel.

I/1. A szívmot elektrofiziológiája, az akciós potenciál keletkezése

A szívmotsejtek akciós potenciálját (AP) a plazmamembrán idő- és feszültségfüggő konduktanciaváltozásai hozzák létre. Hagyományosan az AP-t öt fázisra osztjuk, melyet 0-tól 4-ig sorszámozunk (1. ábra).

Az akciós potenciál nulladik fázisában az idő és feszültségfüggő gyors Na^+ -csatornák aktivációja következik be, megnövelve az addig alacsony Na^+ -konduktanciát. Ez – összhangban a jelentős elektrokémiai hajtóerővel – jelentős áramot produkál és a membránpotenciál aktuális értéke a Na^+ egyensúlyi potenciálja felé mozdul, a membrán depolarizálódik. A gyors Na^+ -csatornák hamar inaktiválódnak és aktiválható állapotba csak a repolarizáció után kerülnek ismét.

Az AP 0. fázisa során a gyors Na^+ -csatornák által okozott depolarizáció következtében egyes áramok aktiválódnak, míg mások inaktiválódnak. Bár a nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős nagy K^+ -konduktancia (I_{K1})



1. ábra. Az kamrai szívműködés akciós potenciáljának fázisai, és az ezeknek megfelelő ionkonduktancia-változások. Az egyes áramokat jelképező idomok nagysága csak tájékoztató jellegű.

lecsökken a befelé történő egyenirányítás miatt, ez megakadályozza repolarizáló hatású K^+ -áram generálódását. Ugyanakkor már az AP első fázisa során a 0. fázis depolarizációja hatására olyan korai kifelé irányuló áram (tranzienst outward: I_{to}) aktiválódik, amelynek 4-aminopiridin érzékeny K^+ -áram (I_{to1}) mellett Ca^{2+} -függő Cl^- -áram (I_{to2}) és némi Na^+ -áram komponense is van [35, 72, 122]. Humán szívműködésben az I_{to2} hiányzik [62]. A korai kifelé irányuló áram felelős az AP első fázisban tapasztalt átmeneti gyors repolarizációért.

Az akciós potenciál második (plató) fázisáért a főként Ca^{2+} -ionokat szállító lassú inward áram (slow inward: I_{si}) felelős, amely az I_{to} gyors inaktiválódása után reaktiválódik, és ismét depolarizálja a membránt [11, 35]. Az emlős kamrai szívműködésben az L-típusú Ca^{2+} -áram hozza létre a plató fázist, más típusú Ca^{2+} -áramnak (T-típusú) a plató során nincs jelentősége.

A plató fázis alatt nem történik jelentősebb mértékű repolarizáció az I_{to} inaktiválódása és a K^+ -áramok befelé történő jelentős egyenirányítása miatt. Az AP

harmadik fázisában kezdődik meg a repolarizációs folyamat, mely az AP negyedik fázisának végére állítja vissza a membránpotenciál kiindulási értékét. A repolarizációért elsősorban a késői típusú K^+ -áramok (delayed K^+ -áram, I_K) és a nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) felelősek. Emlős fajokban az I_K három komponensét tudjuk elkülöníteni, az ultragyors (I_{Kur}), a gyors (I_{Kr}) és a lassú (I_{Ks}) komponenset [12, 51, 123, 138]. Az áramkomponensek nevüket aktivációs kinetikai sajátosságuk alapján kapták: az I_{Ks} (lassú komponens) lassan aktiválódik, de gyorsan inaktiválódik, az I_{Kr} (gyors komponens) gyors aktiváció után lassan inaktiválódik, az ultragyors komponens (I_{Kur}) pedig az I_{Kr} -nél gyorsabb aktivációs kinetikával rendelkezik. Az I_{Kur} kutya kamrai szívműködésében nem található meg.

Az AP során bejutott ionegyensúly visszaállítását, azaz a Na^+ és a Ca^{2+} sejtbe való kijuttatását és a K^+ sejtbe való bejuttatását különböző cseremechanizmusok végzik. Ilyen többek között a Na^+/Ca^{2+} ioncserélő. A transzporter három Na^+ /egy Ca^{2+} sztöchiometriával működik, és az ionmozgás áramot generál. Az ioncserélő működésének iránya a membrán két oldalán található ionok koncentrációjától és a membránpotenciáltól függ. Az áram lehet inward és outward irányú, attól függően, hogy mekkora az aktuális potenciál különbség a membrán két oldala között, illetve hogy milyen az intra- és extracelluláris Na^+ - és Ca^{2+} -koncentrációk viszonya. A Ca^{2+} eltávolításáért felelős még a szarkoplazmás retikulum Ca^{2+} -ATP-áz és a szarkolemma Ca^{2+} pumpa is. Ezek mellett a Na^+/K^+ -ATP-áz segíti a sejt eredeti ionmegoszlásának visszaállítását. Ez a pumpa ATP felhasználásával távolítja el a sejtbe az AP során megnövekedett koncentrációjú Na^+ -ot és szállítja a sejtbe az extracelluláris térből az AP során kilépett K^+ -ot. A pumpa három Na^+ /két K^+ sztöchiometriával működik. Ezen transzporterek segítségével helyreáll az eredeti ionmegoszlás a sejt két oldala között [16].

A munkaizomsejtek nyugalmi membránpotenciáljának nagyságát elsősorban a befelé egyenirányító K^+ -áram (inward rectifier: I_{K1}) határozza meg. Az áram aktivációja feszültségfüggő, az aktiváció - és deaktiváció időben igen gyorsan zajlik le.

I/2. A szívizom rétegei közötti inhomogenitás

Az emlős kamrai szívizomról korábban azt gondolták, hogy homogén, egyfoma sejtek alkotják. Először a Purkinje rostok sejtjeiről derült ki, hogy különböznek a többi kamrai szívizomsejttől abban, hogy hosszabb akciós potenciállal rendelkeznek és 4. fázisú depolarizációt mutatnak (ami hasonlít a sinus csomó lassú diasztolés depolarizációjához, de csak kis ingerlési frekvenciánál mutatkozik). Ezt követően a kamrafal különböző rétegeiben is találtak különbségeket a sejtek akciós potenciáljai között. Először a könnyen elkülöníthető epikardiumhoz valamint endokardiumhoz közel eső (továbbiakban röviden epikardiális és endokardiális) sejtek akciós potenciáljai között találtak karakterisztikus különbségeket. Később, ahogy a kísérleti technikák fejlődtek, már a kutya kamrafal középső rétegében (midmiokardium) is találtak egy, az eddigiektől különböző sajátosságokkal rendelkező sejtípust, az M-sejtet. Kérdés volt, hogy az emlős kamrafalat alkotó sejtek összessége két vagy három sejtípusra osztható-e. Eleinte az M-sejtek klasszifikációját megkérdőjelezték, de a későbbiekben tengerimalac és sertés szívizomban is bebizonyították az osztályozás helyességét. Humán szívizomban az M-sejtek eloszlása és in vivo funkciója máig kérdéses.

Az akciós potenciál kamrafalon belüli különböző konfigurációit több fajban is részletesen leírták, köztük kutyában [4, 5, 6, 10, 35, 63, 71, 72, 75, 107, 109, 113, 139], sertésben [97, 114], tengerimalacban [21, 23, 112, 131], nyúlban [29, 42, 80, 93, 124, 132], patkányban [8, 25, 28, 57, 105, 106, 129, 133] és emberben [39, 40, 69, 82, 88] is. Az akciós potenciál korábban tárgyalt 5 fázisát csak a nagyobb emlős fajokban tudjuk megfigyelni (pl. kutya, sertés, nyúl, ember), tengerimalac akciós potenciálok nem tartalmazzák az első fázist (a korai repolarizációt), míg a kis rágcsálók (egér, patkány) AP-ja nem mutatja a plató (második) fázist.

Az akciós potenciál 0. fázisában a kamrafalban található összes sejtípus gyorsan depolarizálódik, de a depolarizáció maximális sebessége ($V_{\max}$) nagyobb az M-sejtekben, mint a kamra felszínéhez közelebb fekvő sejtekben. Ezt a jelenséget leírták kutyában [4, 5, 10, 107, 109, 111, 113], emberben [39, 40, 88] és nyúl szívizomban is [80]. Az endokardiális sejtek $V_{\max}$ értékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint az epikardiális sejteké [7, 10, 97, 107, 134].

Az akciós potenciál felszálló szárát létrehozó Na^+ -áram (I_{Na}) szívizom rétegeken belüli különbségeit kutya [31, 143], patkány [8, 50] és tengerimalac [78, 100] szívizomsejteken is megfigyelték. Fiziológiai körülmények között nagyon nehéz közvetlenül megmérni a I_{Na} -t, ezért a közlemények az AP nulladik fázisának jellemzésére a jó közelítést adó V_{max} -ot, vagy az ioncsatorna fehérjék denzitását szokták használni. A nátriumáram (I_{Na}) denzitása szignifikánsan kisebb az izolált patkány kamrafal epikardiális régiójában, mint az endokardiális részeken, de az áram kinetikája nem különbözik a rétegeken belül [8]. Ezzel szemben Honen és mtsai. 16%-al nagyobb I_{Na} -t mértek patkány epikardiális, mint az endokardiális izolált szívizomsejtekben [50]. Kutya izolált endokardiális és epikardiális szívizomsejteken Cordeiro és mtsai. nem találtak különbséget sem a Na^+ -áram denzitásában, sem az egyensúlyi aktivációs- vagy az áram inaktivációból való visszatérési kinetikájában [31].

Amikor az akciós potenciálok amplitúdóját hasonlítjuk össze a szívizom rétegeiben, eltérő fajok között, ellentmondásokkal találkozunk. Az endokardiális sejtekkel összehasonlítva az epikardiális sejteknek kisebb AP amplitúdója volt kutya sejtekben [35, 72, 81, 107], tengerimalacban [21, 30, 134], nyúlban [42, 80] és patkány szívizomsejtekben [25, 28, 57], ugyanakkor Shipsey és mtsai. szintén patkány szívizomsejtekben kisebb endokardiális AP amplitúdót találtak az epikardiális sejtekhez viszonyítva [106]. Cook és mtsai. az előző közleményekkel ellentétben nyúl szívizomsejtekben hasonló AP amplitúdót mértek mindhárom rétegben [29], ezt találták mások sertésben [97, 114] és emberben [39, 40, 69, 82] is.

Az epikardiális akciós potenciáloknak szintén kisebb amplitúdója volt az M-sejtekhez képest tengerimalac preparátumokban [21, 30, 134] és kutya szívizomsejtekben [4, 10, 111, 137]. Az M-sejteknek volt a legnagyobb AP amplitúdója a három sejttípus közül humán mintákban [88], patkányban [106] és nyúlban [80], habár ez utóbbi esetben a különbség nem volt szignifikáns. További vizsgálatok szerint kutya szívizomsejtekben az M-sejtek amplitúdója az epi- és endokardiális sejtek amplitúdói között helyezkedett el [107, 108, 111, 137], ugyanakkor Baláti és mtsai. valamint Moro és mtsai. az M-sejtek AP amplitúdóját az endokardiális sejtekéhez közelebbinek találták [10, 81]. Mindezen eredményeket összevetve a következő megállapítást tehetjük: általánosságban az epikardiális sejtek kisebb akciós potenciál amplitúdóval rendelkeznek az endokardiális réteghez viszonyítva.

Az akciós potenciál felszálló, 0. fázisa után a korai, gyors repolarizáció alkotja az AP 1. fázisát és az azt követő ismételt depolarizációval együtt alakítja ki a tipikus “spike-and-dome” AP konfigurációt. Ez a jellegzetes AP alak csak az epikardiális és az M-sejtekben alakul ki, az endokardiális sejtekben hiányzik. Legmarkánsabban kutya szívizomsejtekben jelenik meg [4, 5, 10, 30, 45, 63, 71, 107, 110, 139, 143] kevésbé mutatható ki ember [39, 69, 82], sertés [97, 114] és nyúl [42, 124] szívizomsejtekben, és teljesen hiányzik tengerimalac szívizomban [21, 30, 78, 112, 133]. Kis rágcsálókban (egér és patkány) a “spike-and-dome” AP alak egyáltalán nem figyelhető meg, mert náluk hiányzik az AP második, plató szakasza [8, 25, 28, 58, 105, 130, 133, 136], jellegzetes háromszög alakú akciós potenciált eredményezve. Kutya szívizomszövetben a korai repolarizáció nagysága kisebb az endokardiális sejtekben, mint a két másik sejtípusban [63, 72], ugyanakkor az epikardiális sejtekben nagyobb, mint az M-sejtekben [107]. Ionáramok szintjén vizsgálva, nagyobb I_{to} csatorna denzitást találtak az epikardiális és midmiokardiális sejtekben az endokardiális réteghez viszonyítva egér [20, 64], nyúl [42], patkány [25, 28, 105, 129], kutya [34, 71, 75, 137, 142] és humán [69, 82, 135] szívizomsejtekben. Az epikardiális és az M-sejtek közül az epikardiális sejteknek volt szignifikánsan nagyobb I_{to} amplitúdója [34, 98, 130, 140]. Egyedül Bryant és mtsai. írtak le nagyobb M-sejt I_{to} amplitúdót az epikardiális réteghez képest, de ez a különbség nem volt szignifikáns [22]. Abban megegyeztek a közlemények, hogy az I_{to} áram inaktivációból való visszatérése mindig gyorsabb volt az epikardiális, mint az endokardiális sejtekben.

Az I_{to} áram egyensúlyi félinaktivációs feszültségértéke pozitívabb volt az endokardiális, mint az epikardiális rétegben mind kutya szívizomsejtekben [137], mind egy humán mintákat vizsgáló tanulmányban [135]. Ennek az ellentétét írták le Li és mtsai., akik szintén emberi mintákon végezték kísérleteiket [69]. Li és mtsai. jobb kamrai mintákat használtak, míg a másik munkacsoport bal kamrából izolált sejteken kísérleteztek, így a két tanulmány ellentétes adatai talán megmagyarázhatók az interventrikuláris különbségekkel.

Az akciós potenciál plató fázisa után következik be az I_K és az I_{Kr} áramok által létrehozott AP repolarizáció. A végső repolarizáció és így az akciós potenciál hossza nagymértékben függ a plató magasságától: ha nagyobb a 2. fázis amplitúdója akkor gyorsabban aktiválódik a késői típusú káliumáram gyors komponense (I_{Kr}), így hamarabb létrejön a végső repolarizáció és rövidebb lesz az AP. Ez történik az

epikardiális sejtekben, ahol a legnagyobb a plató fázis magassága és a legrövidebb az AP kutya [24, 31, 41, 45, 63, 73], sertés [114], tengerimalac [21, 30, 131] és nyúl [42, 124, 138] szívizomsejtekben. Emberi minták esetében ellentmondóak a publikációk, Naubauer és mtsai. [82] rövidebb epikardiális akciós potenciálokat találtak az endokardiális sejtekhez képest, míg mások az endokardiális AP-okat találták rövidebbnek, bár egyik esetben sem volt a különbség szignifikáns [39, 40, 69]. Az M-sejtek akciós potenciáljai minden közlemény szerint hosszabbak az epi- és endokardiális sejtek AP-hoz képest, és ezen sejtek AP hosszának volt a legmeredekebb frekvencia függése, tehát az ingerlési ciklushossz növelésekor ezen sejtek akciós potenciálja nyúlt meg a legnagyobb mértékben [2, 4, 5, 10, 71, 75, 80, 81, 97, 107, 111-114, 139].

Ha megvizsgáljuk a terminális repolarizációt létrehozó ionáramokról szóló közleményeket, akkor láthatjuk, hogy nyúl bal kamrai midmiokardiális szívizomsejtekben kisebb I_{Ks} amplitúdót írtak le az epi- és endokardiális sejtekhez képest, míg az I_{Kr} amplitúdója hasonló volt minden sejttípusban [132]. Az epi- és endokardiális sejtek összehasonlításakor nagyobb I_{Ks} -denzitást találtak az epikardiális rétegben, ami összhangban volt az itt megfigyelt rövidebb akciós potenciálokkal [138]. Az I_{Ks} transzmurális gradiensét kutya szívizomsejtekben is tanulmányozták, minden esetben újfent a midmiokardiumban volt az áram amplitúdója a legkisebb [46, 71, 73, 137]. Az epi- és endokardiumot összehasonlítva azonban nem találtak jelentős különbséget sem az I_{Ks} és I_{Kr} áram amplitúdójában sem kinetikai sajátágaiban. A befelé egyenirányító kálium áram (I_{K1}) sajátágaiban nem találtak különbséget a szívizom rétegein belül egyik vizsgált emlősfajban sem [59, 69, 71, 75, 78].

Az epikardiális/endokardiális különbségek miatt létrejövő transzmurális gradiens élettani jelentősége az EKG repolarizáló, a T és (feltételezések szerint) az U hullámok pozitív kitéréseinek létrehozása.

1/3. Vertikális különbségek a szívben belül

Az előző fejezetben tárgyalt transzmurális különbségekhez képest a szívizom vertikális inhomogenitásáról sokkal kevesebb publikáció jelent meg. Az apiko-bazális különbségeket vizsgálták többek között kutya [13, 54, 101, 110], nyúl [26, 52, 74, 92,

136], patkány [25, 28], vadászgörény [18, 19], sertés [32], tengerimalac [27, 131, 134] és ember szívekben [43, 94].

Patkány preparátumokon vizsgálva a szívcsúcson mért akciós potenciálokat rövidebbnek találták, mint a bazális területeken regisztráltakat, ugyanakkor a közleményben az apikális epikardium és a bazális endokardiumot hasonlították össze, így a bemutatott vertikális különbséget nagymértékben befolyásolhatta a transzmurális grádiens [25, 28]. Wan és mtsai. izolált tengerimalac sejteken nem találtak apiko-bazális különbségeket [131], ugyanakkor tengerimalac multicelluláris preparátumot használva az AP paramétereiben nem találtak vertikális grádiens, egyedül az akciós potenciál hossza változott a szívizom különböző területein: rövidebb apikális akciós potenciálokat mértek a jobb kamra endokardiális és a bal kamrai szeptum bazális részéhez képest [134]. Ehhez hasonló eredményt írtak le Choi és mtsa. Langendorff-féle teljes szívpreparátumon is [27]

Nyúlból származó mintákon nem egyértelműek a közlemények adatai, némelyek nem találtak apiko-bazális különbségeket az AP hosszában [92, 136], mások rövidebb AP-t találtak az apikális területen [74], de az ellenkezőjét is (tehát hosszabb apikális AP a bazális területhez képest) leírták már [26, 52]. Emberi szíveket vizsgálva is találunk az irodalomban apikálisan hosszabb [43] és rövidebb [94] akciós potenciálokat is. Kutya teljes szív preparátumokon [13, 54] és izolált kamrai mintákon [101, 110] az apikális akciós potenciálok hosszabbak voltak, mint a bazálisok. Ugyanakkor ezek az adatok nem elektrofiziológiai mérésekből származnak, hanem optikai technikával mérték a területi inhomogenitást, és effektív refrakter periódusból vagy repolarizációs időből számították ki az akciós potenciál időtartamát.

A vertikális inhomogenitást ioncsatorna-fehérje és mRNS szinten Brahmajothi és mtsai. vadászgörény szívizommintákon vizsgálták [19]. Az apikális HERG (I_{Kr}) mRNS és protein szintek magasabbak voltak, mint a bazálisok. Ugyanezen szerzők két évvel későbbi, szintén vadászgörényen végzett vizsgálataikban a bazális epikardiumban magasabb Kv4.2 (egyres fajokban az I_{to} -csatorna egyik pórusformáló, α -alegysége) mRNS és fehérje szinteket találtak az apikális területhez képest, miközben nem volt vertikális különbség a Kv4.3 (I_{to} -csatorna α alegység) mRNS- és proteinszintekben. A Kv1.4 (szintén I_{to} -csatorna α alegység) fehérjedenzitása magasabb volt az apikális régióban, mint a bázison, ugyanakkor az mRNS eloszlás nem mutatott szignifikáns különbséget a szív különböző területein [18].

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy jelentős mennyiségű, de gyakran egymásnak ellentmondó adatot találunk az irodalomban a szívizom regionális inhomogenitását illetően mind az akciós potenciál tulajdonságaiban mind az azt kialakító ionáramok karakterisztikájában. Ezzel egyidőben az adatokban nagymértékű a fajok közötti különbség, így a emberi mintákon végzett vizsgálatoknak különösen nagy jelentőségük van.

Munkánkban ezért célul tűztük ki az emlős kamrai szívizom transzmurális és vertikális inhomogenitásának szisztematikus feltérképezését elektrofiziológiai módszerekkel. Kíváncsiak voltunk, hogy a talált funkcionális eltérések milyen mértékben tükröződnek az ioncsatorna-fehérjék expressziós mintázatában. Ez azt jelenti, hogy megmérjük az akciós potenciált létrehozó ionáramok amplitúdóit és kinetikai sajátosságait a szívizom apikális és bazális területein, epikardiális és midmiokardiális rétegeiben, majd megvizsgáljuk az adott területekről származó mintákban az ioncsatornákat felépítő fehérjék expressziós szintjeit. Konkrétan arra voltunk kíváncsiak, hogy ha pl. egy adott területen vagy rétegben nagyobb amplitúdójú ionáramot tudunk mérni, mint máshol, akkor ezen a területen az áramért felelős ioncsatorna-proteineknek magasabb-e az expressziója.

I/4. Nemi hormonok hatása a szívizom elektromos sajátosságaira

Az emlős kamrai szívizmon belüli nagymértékű elektrofiziológiai inhomogenitást az előző szakaszban tárgyaltuk. Az ionáramok és a csatornafehérjék regionális eltérései tanulmányozására azonban további lehetőségek is adódnak. Nagymértékű inhomogenitást mutat pl. egymáshoz képest a bal és jobb kamra is (kutya szív interventrikuláris összehasonlítás: [98, 107, 110, 127], tengerimalac: [131], patkány: [25, 133]) Azonban nemcsak egy egyed szívében belül végezhető összehasonlítások, hanem ugyanazon faj különböző egyedeinek szívei között is találunk különbségeket. Patológias állapotokban (szívelégtelenségben /szívhipertrofiában) pl. megváltozik az akciós potenciál alakja, a Ca^{2+} -áram és az I_{K1} denzitása lecsökken [119, 120, 53]. Szintén kézenfekvő egy fajon belüli egyedek közötti nemi különbségek vizsgálata, mivel jól ismert különbségek vannak akár csak a kamrai repolarizációban is férfiak és nők között.

Mivel az AP paramétereiben és az ionáramokban bekövetkezett változások jól nyomon követhetők a testfelszíni EKG regisztrátumon, ezért első megközelítésben EKG mérésekkel összehasonlíthatjuk különböző egyedek szívének elektrofiziológiai sajátságait. Amennyiben látunk különbségeket az EKG paraméterekben, feltételezhetjük, hogy a szívizom elektrofiziológiája és az ioncsatorna-fehérjék expressziós szintjei is eltéréseket mutathatnak.

Nőkben, miközben magasabb a nyugalmi szívfrekvencia, hosszabb (kb. 2-6 %-al) a QT és a korrigált QT (QTc) idő is [9, 14, 17, 67, 95, 115], ezek mellett magasabb incidenciával fordul elő nők között a torsade de pointes arritmia és a Brugada szindróma, ezen kívül a női akciós potenciál káliumcsatorna-blokkoló szerekre erőteljesebb AP nyúlással reagál [15, 66, 79].

A nemi különbségeket – amiket normál és kasztrált férfiak és nők összehasonlító EKG tanulmányaiból tudunk – úgy tűnik, hogy elsősorban a hím nemi hormon, a tesztoszteron jelenlétének vagy hiányának tudhatjuk be, kisebb szerepe van a női szexuáliszteroidoknak [17, 86, 95]. A tesztoszteron és az ösztrogén szívre gyakorolt hatása máig alig ismert, tehát egy állatmodell nagymértékben segíthet tisztázni a nemi hormonoknak a szívizom ioncsatornáira és ionáramjaira gyakorolt molekuláris hatását.

Abi-Gerges és mtsai. kutya Purkinje rostokon vizsgálták az interszexuális különbségeket, eredményeik jól egybevágtak a humán EKG tanulmányokkal. A nőtények Purkinje rostjainak AP-ja hosszabb volt, mint a hímeknek, ráadásul a nőtény Purkinje rostok akciós potenciáljai jobban meggyúltak, amikor az ingerlési frekvenciát lecsökkentették [1]. A nőtény kutyák hormonális állapotáról azonban nem voltak információk, ami nagy mértékben befolyásolhatja az eredmények interpretálását, mivel ismert a nőtény kutya anösztusza és ezzel párhuzamosan az ösztrogénszint csökkenése [125]. Egy másik tanulmányban artériásan perfundált szöveti preparátumon vizsgálták a kutyaszív területi és nemi differenciáit [36]. A jobb kamrai epikardiális AP korai repolarizációja nagyobb amplitúdóval rendelkezett hím állatokban, mint nőtényekben, és az I_{to} denzitása is magasabb volt ezekben a mintákban. Ugyanakkor ezeket a különbségeket nem tudták megfigyelni bal kamrai preparátumokon, ami inkább az interventrikuláris, mintsem a nemi különbségekre utal.

A kamrai repolarizáció nemtől függő változásait és a nemi hormonok hatásait vizsgálták rágcsló modellekben, többek között egérben [55, 121], patkányban [65],

tengerimalacban [83, 118] és nyúlban is [76, 91], de az eredmények nagy fajfüggést mutattak [90]. A tengerimalac jó modellállatnak tűnik, mert a többi említett fajjal szemben a tengerimalac poliösztrozus egész évben, 16 napos ovarialis ciklusokkal és teljes luteális fázissal, ami nagy egyezést mutat a női nemi ciklussal [89, 103]. Ugyanakkor a tengerimalac szívelektrofiziológiája és akciós potenciálja nagymértékű különbségeket is mutat az emberi szív AP-lal szemben, gondoljunk csak a korai repolarizáció és az I_{to} hiányára.

A kardiális ioncsatornák típusai, eloszlásai és kinetikai paraméterei, ezzel együtt az általuk létrehozott akciós potenciál morfológiája nagymértékben különbözik emberben és a rágcsáló fajokban. Irodalmi adatok alapján a kutya szívizomsejt hasonlít a legjobban elektrofiziológiai sajátosságai alapján a humán kamrai kardiomiocitára [70, 82].

Mivel a nemi hormonok szubsztitúciója jelenleg is alkalmazott gyakorlat a klinikumban, munkánk nemi különbségeket vizsgáló részét úgy terveztük meg, hogy kutya EKG paraméterein vizsgáljuk meg az ösztrogén és tesztoszteron hatásait, amely eredményeket össze tudunk hasonlítani az irodalomban található emberi EKG eredményekkel. A tesztoszteron és ösztrogén kezelést kasztrált hím és nőstény kutyákban alkalmaztuk, hogy elkerüljük az endogén hormonok hatását, majd ebből következtethessünk a szex szteroidok potenciális szívre gyakorolt hatásaira olyan esetekben, amikor férfiakat kezelnek női nemi hormonokkal, vagy nőket tesztoszteron származékokkal.

Munkánk ezen szakaszában tehát EKG mérésekkel vizsgáltuk a kutya szívizom interszexuális inhomogenitását, majd a kapott adatokat összehasonlítottuk az ioncsatorna expressziós mintázatokkal.

Kutya állatmodellünket (bár korlátokkal) megfelelőnek találtuk a nemi különbségek vizsgálatára, és arra is, hogy emberre vonatkozó releváns konklúziókat vonjunk le.

II. CÉLKITŰZÉS

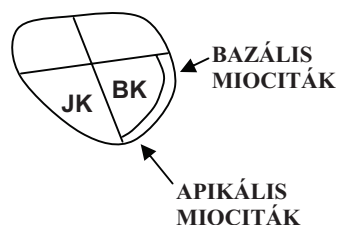
Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy az emlős szívizmon belüli, illetve ugyanazon faj egyedei közötti elektrofiziológiai inhomogenitás magyarázható-e az ioncsatornák expressziójában megfigyelhető különbségekkel.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III/1. Szívizom preparátumok

Vizsgálatainkhoz kutatási célra tenyésztett vegyes nemű ivarérett kutyák szívét használtunk. A 10–15 kg súlyú állatokat 10 mg kg⁻¹ ketamin (Calypsol) és 1 mg kg⁻¹ xylazin-hidroklorid (2% CP-xylazine) intramuszkuláris injekálásával altattuk el. A mellkas megnyitása után a szívet gyorsan kiemeltük, majd hideg Tyrode oldattal mostuk át (összetétel mM-ban megadva: 153 NaCl, 5,4 KCl, 2,7 CaCl₂, 1,05 MgCl₂, 5,4 HEPES, 11 glükóz, pH=7,4), és leválasztottuk a pitvarokat.

A humán kamrai szöveteket 7 db, kardioplégiás oldatban tartott, egészséges donor szívből nyertük. A szíveket olyan szervdonorokból kaptuk, akiknek a szemilunáris billentyűjét transzplantációra használták fel. A kutya és a humán szívek esetében is először 5x5 mm-es darabokat vágunk ki a szívek bal kamrai szabad falának apikális és bazális régióiból (2.ábra), majd dermatómmal (C. R. Bard. Covington, Ga., USA) lenyúztunk egy 0,5 mm vastag szubepikardiális csíkot a bal kamra felületéről az apikális-bazális tengely felénél. Hasonló módon vettünk mintát a midmiokardium középső rétegéből is 3 mm-el az epikardium alatt. A csatornaféhrje-denzitás vizsgálatokhoz ezeket a mintákat felhasználásig folyékony nitrogénben tároltuk.



2. ábra Az apikális és bazális sejtek eredete

III/2. Elektrofiziológiai vizsgálatok

III/2. 1. Sejtizolálás

A kutya kamrai szívizom sejteket anterográd irányú szegmentperfúziós technika alkalmazásával nyertük [77]. A bal elülső leszálló artéria koronária ágba kanült vezetünk és az artéria vérellátási területének megfelelően perfundáltuk a bal kamrai szívizomzatot. A perfúzió első 5 percében Ca^{2+} -mentes, taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l) és NaH_2PO_4 -tal (200 mg/l) kiegészített, karbogénnel 6,8-as pH-ra ekvibrált szobahőmérsékletű JMM oldatot (Joklik-féle módosított Minimum Essential Medium, Sigma) alkalmaztunk a szövet Ca^{2+} - és vértartalmának eltávolítása céljából. Az emésztést 25-30 percig végeztük ugyanezen alapoldattal 37 °C-on, amelyhez még kollagenáz enzimet (0,66 mg/ml, Worthington CLS-II), borjú szérum albumint (2 g/l) és CaCl_2 -ot (50 μM) adtunk. A szövet elfolyósodása után a szívizom különböző területeiről (apikális, bazális, epikardiális, midmiokardiális) mintákat vettünk, kis darabokra vágtuk őket, majd finom rázással kiszabadítottuk a sejteket a szövetdarabokból. A továbbiakban a mintákat fokozatosan emelkedő Ca^{2+} -koncentrációjú JMM oldatban mostuk. Az így nyert sejteket MEM oldatban (Minimal Essential Medium, Sigma) tároltuk 15°C-on. Az izolálás során kapott szuszpenzióban a szabályos téglalap alakú, ép harántcsíkolatú, éles szélű és tiszta citoplazmával rendelkező ép sejtek aránya 10% és 60% között változott. A sejteket az izolálást követő 36 órán belül felhasználtuk.

III/2. 2. Az akciós potenciálok mérése

A membránpotenciál mérésére a Volders és mtsai. [126] által egysejtes rendszerre kidolgozott, nagyellenállású üveg-mikroelektrodás eljárást alkalmaztunk. Kísérleteink során az előző pontban leírtak szerint készített sejtszuszenzióból 2-3 cseppet egy invertáló mikroszkóp (Olympus CK-2, Japán) tárgyasztalára rögzített, 1 ml térfogatú mérőkádba cseppentettünk. A kád és a perfundáló oldatok hőmérsékletét a kísérletek során termosztát és perfúziós rendszer segítségével végig 37 °C-on tartottuk. A szívizomsejtek kiüledése után (2-3 perc) elindított, 2-4 ml/perces sebességgel áramló normál Tyrode oldat perfúziója eltávolította az

elhalt sejteket, így csak a kád fenekére kitapadt szabályos alakú, éles szélű, ép harántcsíkolattal rendelkező sejteken dolgoztunk. A sejtek membránpotenciáljának követésére 3 M-os KCl-dal töltött, 25-30 M Ω ellenállású mikroelektrodát használtunk. Az elektrodákat közvetlenül a kísérlet megkezdése előtt boroszilikát kapillárisból (Harvard Apparatus LTD., Kent, UK) készítettük programozható mikroelektroda-húzó (Sutter Instruments Co., USA) segítségével. A mérőrendszert a környezetből származó elektromágneses hullámoktól és mechanikai rezgésektől Faraday-kalitka és antivibrációs asztal (Newport, USA) védte. Az elektrodát mechanikus makro- és három irányba mozgatható hidraulikus mikromanipulátorral (Narishige, Japán) pozícionáltuk. A mérés során nyert jeleket AXOCLAMP 2B erősítő (AXON INSTRUMENTS Inc., Foster City, USA) segítségével erősítettük. A sejtek ingerlése a kísérletek teljes időtartama alatt a mérőelektrodon keresztül 1 s ciklushosszal folyamatosan zajlott. Az ingerlő impulzusok időtartama 1 ms volt, amplitúdója, a sejtek érzékenységtől függően 4-8 nA között változott. Az erősítő által felerősített jeleket analóg-digitális átalakítás (Digidata 1200 A/D kártya, AXON INSTRUMENTS Inc., Foster City, USA) után a későbbi elemzéshez számítógépen tároltuk. A mérés során a mintavételezés az AP első 10 ms-a alatt 20 μ s gyakorisággal történt, majd ezt követően 200 μ s-onként rögzítettük az adatokat. Ezáltal az AP felszálló szára és a repolarizáció folyamata egyaránt jól megítélhető volt. A mért AP-ok kísérlet közbeni követésére oszcilloszkópot (Hitachi VC-6025, Hitachi Ltd., Tokió, Japán) használtunk. A mérések során pontosan rögzítettünk minden kísérleti körülményt illetve ezek változtatásának idejét és mértékét. Minden mérés során 10 egymást követő AP-t rögzítettünk, kiértékelésük egy intézetünkben fejlesztett szoftver segítségével történt (off-line). A 10 AP paramétereit átlagoltuk. A program által kiszámított paraméterek közé tartozik a nyugalmi membránpotenciál értéke, a depolarizáció maximális sebessége (V_{max}), az AP amplitúdója, valamint az AP 20, 50 illetve 90%-os repolarizációjához tartozó időtartama (a későbbiekben APD_{20} , APD_{50} és APD_{90}). Az AP-ok kiértékeléséből kapott adatokból az ábrákat az ORIGIN (Microcal, Northampton, USA), valamint a POWERPOINT (Microsoft, Santa Rosa, USA) grafikus szoftverek segítségével készítettük.

III/2. 3. Ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

Az ionáramok mérésére a korábban leírt módon izolált szívizomsejteket használtunk. A mérésekhez használt patch pipettákat a III/2. 1. pontban leírtakhoz hasonlóan készítettük, azzal a különbséggel, hogy ezek ellenállását 2-3 M Ω -nak választottuk. Az ionáramokat a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában, feszültség-clamp körülmények között mértük [47]. A méréseket 37 °C-on, normál Tyrode oldatban végeztük. A pipetták feltöltésére használt ún. belső oldat összetételét a mérni kívánt ionáramtól függően választottuk meg.

Az L-típusú kalciumáram (I_{Ca-L}) mérésekor a következő belső oldatot használtuk (mM-ban megadva): 110 KCl, 40 KOH, 10 EGTA, 10 HEPES, 20 TEACl, 3 K₂-ATP, 0,25 GTP, pH=7,4. A káliumáramokat a belső oldatban jelenlevő tetraetilammónium-klorid (TEACl) alkalmazása mellett, a perfundáló oldathoz adott 3 mM 4-aminopiridin (4-AP) hozzáadásával gátoltuk. A tartó feszültség -40 mV volt, amely membránpotenciál értéken a gyors, feszültségfüggő Na⁺-csatornák teljes mértékben, a tranziens, kifelé irányuló káliumáram kialakításáért felelős csatornák pedig jelentős mértékben inaktiválódtak, így nem zavarták az I_{Ca-L} mérést. A kalciumáram vizsgálatára használt impulzusprotokollokat tehát -40 mV-os tartópotenciálról indítottuk, és a protokollok végén ugyanerre a potenciálra állítottuk be a sejtek membránpotenciálját. Azokban az esetekben, amikor a kalciumáram amplitúdóját vizsgáltuk, az áramokat 400 ms hosszú, +5 mV-ra történő depolarizációval váltottuk ki.

A káliumáramok mérésekor a belső oldat összetétele a következő volt (mM-ban megadva): 110 K-aszpartát, 45 KCl, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 3 K-ATP, 0,25 GTP, 5 HEPES, pH=7,4. A mérések során a kalciumáramot 5 μ M Nifedipin Tyrode oldathoz történő adagolásával gátoltuk. A sejtek membránpotenciálját a tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to}) és a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) mérésekor -80 mV-on, míg a késői egyenirányító káliumáram gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponensének mérésekor -40 mV-on tartottuk. Az utóbbi két komponens elkülönítésére eltérő impulzusprotokollokat használtunk.

Az áramméréseknél a következő módon jártunk el: először a mikropipettával óvatosan megérintettünk egy, a kád aljához kitapadt sejtet, majd a pipettában szájjal történő szívással csökkentettük a nyomást, aminek hatására a sejtek membránjának

egy kis darabja betüremkedett a pipettába. Ennek következtében jött létre a “gigaseal”-nek nevezett, nagy ellenállású (minimum 1 G Ω) kapcsolat a pipetta és a mérni kívánt sejt felszíni membránja között. Ezt követően a sejtet óvatosan jobbra-balra és előre-hátra mozgatva fokozatosan felemeltük a mérőkád fenekéről, majd kompenzáltuk a pipetta kapacitását. A teljes-sejtes konfiguráció eléréséhez a szívóerőt tovább növeltük és ezzel egyidejűleg rövid áramimpulzus alkalmazásával átszakítottuk a pipetta és a sejt közötti membránszakaszt, így hozva létre a kapcsolatot a pipetta belső oldata és az intracelluláris tér között. Minden mérés kezdetén meghatároztuk a sejtek kapacitását, amely 80-200 pF közötti értéknek adódott. A méréseink során a soros ellenállás 3-6 M Ω volt, melyet 75 %-ban kompenzáltunk. Azokat a méréseket, ahol a soros ellenállás nagyobb volt, vagy a mérés során megnövekedett, kihagytuk az értékelésből. A kapott áramjeleket Axopatch-200B erősítő (AXON INSTRUMENTS Inc., Foster City, USA) segítségével erősítettük, Digidata 1200 A/D kártyával végzett analóg-digitális átalakítás után pCLAMP 6.04 szoftverrel számítógépen rögzítettük, majd elemeztük. Az árammérések során a mintavételezési frekvencia a mérni kívánt ionáramtól függően 0,5-20 kHz között változott. A nyolcpólusú Bessel szűrő könyökfrequenciáját a mintavételezési frekvencia negyedrészeként megfelelően állítottuk be.

III/3. EKG mérések

Az EKG mérések altatott állapotban történtek. 10-10 db, felnőtt korú (2-4 éves), kutatási célra tenyésztett hím és nőstény kutyát propofollal (Fresenius Kabi AG., Bad Homburg, Németország) elaltattunk. A szert a következő dózisban alkalmaztuk: indukcióhoz 15 mg kg⁻¹ bólus injekció, az anesztézia fenntartásához 25 mg h⁻¹ kg⁻¹ infúzió. A légzést az anesztézia során intratracheális tubuson keresztül asszisztáltuk, nyomásvezérelt respirátorral. A légzést 250 ml min⁻¹ kg⁻¹ értéken tartottuk 15-20/perc frekvenciával. A kontroll EKG értékeket (szívfrekvencia, PQ-intervallum, QRS-időtartam és QT-intervallum) folyamatosan monitoroztuk egy 12 csatornás PC-vezérelt elektrokardiográfon, ELITE 6.21-es szoftvert (Meditech Kft., Budapest, Magyarország) használva. Ugyanezt a szoftvert használtuk az EKG felvételek analizéséhez is off-line, manuális módban. Minden paramétert, a diszperziót kivéve, a V₁-es elvezetésben mért, 15 egymást követő szív ciklus átlagából kaptunk. A QT-

diszperziót a 12 elvezetésben mért leghosszabb és legrövidebb QT-intervallum különbségeként határoztuk meg. A korrigált QT-intervallum (QT_c) kiszámításához a Friderica-formulát [44] használtuk, amely Koyama és mtsai. alapján kutyák esetén a legpontosabb korrekciót adja:

$$QT_c = QT / \sqrt{RR}$$

ahol RR a ciklushossz másodpercekben kifejezve [61]. Az első EKG felvételt az EKG paraméterek stabilizálódása után (általában 5-8 percen belül) készítettük, majd ezt 5 percenként ismételtük. A kontroll EKG felvétel elvezetése után az állatokat Dofetiliddel (HERG-csatorna gátló) kezeltük (100 µg kg⁻¹ 2 perc alatt intravénásan beadva). A Dofetilide hatását 10 perccel később értékeltük.

A kontroll EKG mérések elvégzése után mind a hím, mind a nőstény állatokat ivartalanítottuk. 1 hónapos időtartam után, miután a kutyák endokrin státusza stabilizálódott, az EKG méréseket a Dofetilide adásával együtt megismételtük. Ezek után az állatok inverz hormon szubsztitúciót kaptak 4 héten keresztül, a kasztrált hím kutyák 17β-ösztadiol-benzoátot kaptak (intramuszkulárisan 0,1 mg kg⁻¹, minden 48 órában), a nőstényeket pedig 5α-dihidroxytesztoszteron - propionáttal kezeltük (intramuszkulárisan 1 mg kg⁻¹, 48 óránként). Az alkalmazott dózisok a klinikai gyakorlatban használtaknak megfelelőek. Végül az EKG méréseket ismét elvégeztük a Dofetilide kezeléssel együtt.

A kísérletek minden egyes fázisában, a Dofetilide alkalmazása előtt 3 ml vért vettünk a kutyáktól. Ezeket a mintákat alvás után 5 percig centrifugáltuk 1000 g-n, a felülúszót leszívtuk és -20 °C-on tároltuk. A 17β-ösztadiol- és a tesztoszteron-szinteket elektro-kemilumineszcens immunoesszé technikát (ECLIA) alkalmazva határoztunk meg Roche Elecsys 2010 típusú immunoesszé analizátorral (Hoffmann-La Roche, Basel, Svájc). Az ECLIA egy kompetitív teszten alapul, specifikusan irányított és biotinnal jelölt antitesteket alkalmazva, elhanyagolható keresztreakciókkal más biológiaiilag aktív szteroidokkal szemben. Az ECLIA-ösztrogénteszt analitikai specifitása ösztrolra és ösztironra vonatkoztatva sorrendben 0,077% és 0,515% [68], az ECLIA-tesztoszteronteszt kereszt-reaktivitása 5α-tesztoszteronra vonatkoztatva 1.89% [117].

A fent leírt protokoll után az állatok szívét kiemeltük és a szívizmukból a III/1. fejezetben leírtaknak megfelelően (a regionális különbségeket figyelmen kívül hagyva) mintákat vettünk az ioncsatorna-fehérjék denzitásának meghatározása céljából.

III/4. Western (immuno)blot

A szívizom különböző területeiről származó minták membrán proteinjeinek kinyerését Han és mtsai. módosított módszerét használva végeztük [48]. A szövetdarabokat folyékony nitrogénben tároltuk, hideg CMF PBS-ben mostuk, lízispufferben (5 mM EGTA, 20 mM Tris-Cl, 20 μ M leupeptin, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, pH 7,4; Sigma) dörzsözősárban homogenizáltuk. A szuszpenziót ultrahangos szonikálás után 90 percig 4 °C-on, 100,000 g-n centrifugáltuk. A felülúszót újra szuszpendáltuk 2%-os Triton X-100-el (Sigma) kiegészített lízispufferben, majd újracentrifugáltuk 4 °C-on, 100,000 g-n 45 percig. Az így elkészített minták proteintartalmának meghatározása BCA protein assayvel (Pierce, Rockford, IL, USA) történt. Ezután a minták proteintartalmát 2 mg/ml-re állítottuk be, az azonos proteintartalmú mintákat SDS mintapufferben (10% glicerín, 2% SDS, 0,062 M Tris, 20 mM ditiotritol, 0,002% brómfenolkék és 5% β -merkaptotanol; Sigma) 10 percig főztük. Az így elkészített mintákat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) 100 V-os feszültségen választottuk el. A gélelektroforézishez 7,5%-os gélt készítettünk, amelyekre 20 μ g/vályú proteint vittünk fel. Ezután a gélről a fehérjéket 100 V-os feszültségen nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Bécs, Ausztria) transzferáltuk. Ezt követően a membrán szabad kötőhelyeit 5% tejet tartalmazó PBS-sel 20 percig blokkoltuk, majd a következő elsődleges antitestekkel inkubáltuk: nyúl anti-Kv1.4, anti-Kv4.3, anti-Kir 2.1, anti-Nav1.5, anti- α_{1C} , anti-minK, anti-HERG és anti-MiRP1 (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael), kecske anti-KchIP2 és anti-LQT1 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, California, USA). Az elsődleges antitestek hígítása 5% tejet tartalmazó PBS-ben történt, a membránokat egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően a membránokat 30 percig PBST-ben (0,1% Tween-20 PBS-ben, Sigma) mostuk, és megfelelő torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (1:1000 hígítás 5% tejet tartalmazó PBS-ben) inkubáltuk vagy ABC kitet alkalmaztunk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1:1000 hígításban. Az immunjelek rögzítése minden esetben kemiluminescens (ECL) kit (Pierce, Rockford, IL, USA), a detektálás pedig fényérzékeny film (AGFA, Brüsszel, Belgium) vagy Fujifilm LAS 3000-es darkbox (Fujifilm, Tokió, Japán) segítségével történt. Az expresszió kvantitatív meghatározását denzitométer, valamint megfelelő szoftver (Image-Pro

Plus, Media Cybernetics, Inc. Georgia, USA) segítségével hajtottuk végre. Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyformán történt-e, a nitrocellulóz membránokat 65 °C-on 1 órán át inkubáltuk 200 ml 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.5) (2% SDS és 1% β -mercaptoethanol). A membránokat ezután egérben termeltetett citokróm-C (Cyt-c) ellenes antitesttel (1:100 PBS tejben) (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, California, USA) festettük meg, majd az előzőekhez hasonlóan elemeztük a jelet.

III/5. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A mérések során kapott adatokat átlagoltuk és kiszámítottuk a standard hibát (SE). Az átlagértékek különbségeinek megítélésakor egyváltozós ANOVA-t, F próbát és Student-féle kétmintás t-próbát használtunk. A változásokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p értéke kisebb volt, mint 0,05. Valamennyi statisztikai analízist személyi számítógépen, Microsoft Excel szoftver segítségével végeztünk. Az ábrákon a mért értékek átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibát (SE) tüntettük fel. Az ábrákon a szignifikáns különbségeket csillaggal jelöltük.

Minden elvégzett vizsgálat 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 humán minták kezelését és a kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (No. 51-57/1997 OEJ).

IV. EREDMÉNYEK

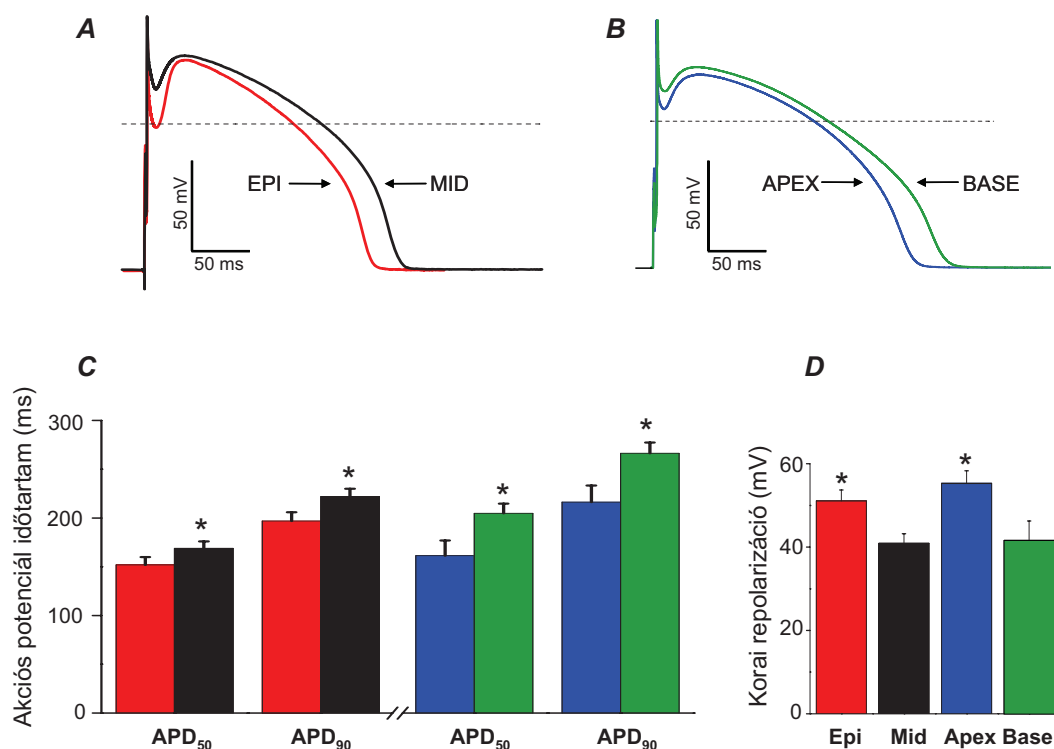
IV/1. Akciós potenciál karakterisztika és membránkapacitás

Az akciós potenciálokat kutya kamrai szívizom különböző területeiről származó munkaizomsejteken mértük áram-clamp üzemmódban. A munka során az apikális (APEX) és bazális (BASE) területről származó, valamint az epikardiális (EPI) és midmiokardiális (MID) rétegből származó sejtek akciós potenciáljait és azok jellegzetes paramétereit hasonlítottuk össze (3. ábra). Az APEX-BASE összehasonlításnál használt sejtek a szívizom középső (MID) rétegéből származtak. Amint az a 3. ábrán látható, az EPI sejtek akciós potenciáljai rövidebbek voltak a MID sejtekénél, az APEX sejtek akciós potenciáljai pedig a BASE sejtekénél. Ezt a különbséget meg tudtuk figyelni az akciós potenciál repolarizációjának 50 és 90%-nál (APD_{50} és APD_{90}) egyaránt. Az EPI és APEX sejtek akciós potenciáljai prominens első fázis repolarizációval rendelkeztek, míg a MID és BASE sejtek esetében ez kisebb volt (D panel). Ugyanakkor a MID sejtek maximális depolarizációs sebessége (V_{max}) szignifikánsan meghaladta az EPI sejteken mért értéket (MID: 292 ± 14 és EPI: $233,4 \pm 4$ V/s, $p < 0,05$), és az AP amplitúdója is szignifikánsan nagyobb volt (MID: 138 ± 1 és EPI: $133,8 \pm 1,4$ mV, $p < 0,05$). Az apikális és bazális sejtek V_{max} értéke között nem találtunk szignifikáns különbséget (300 ± 22 és 275 ± 23 V/s), mint ahogy nem volt szignifikáns különbség az AP amplitúdójában sem a két területről származó sejtek között ($140,9 \pm 2$ mV az apikális és $138,2 \pm 1,4$ mV a bazális sejtek esetén). A vizsgált sejtszoptok nyugalmi membránpotenciál-értékei között nem találtunk szignifikáns különbséget.

A sejtek kapacitását feszültség-clamp üzemmódban határoztuk meg, az egyes értékek az 1. táblázatban találhatóak. Amint a szám adatok mutatják, a kapacitásértékek átlagai minden vizsgált sejtszoptban hasonló értéket

1. táblázat. A vizsgált régiókból származó sejtek átlagos kapacitásértékei.

Régió	Kapacitás (pF)
Apikális	141 ± 5
Bazális	139 ± 7
Epikardiális	144 ± 6
Midmiokardiális	149 ± 8



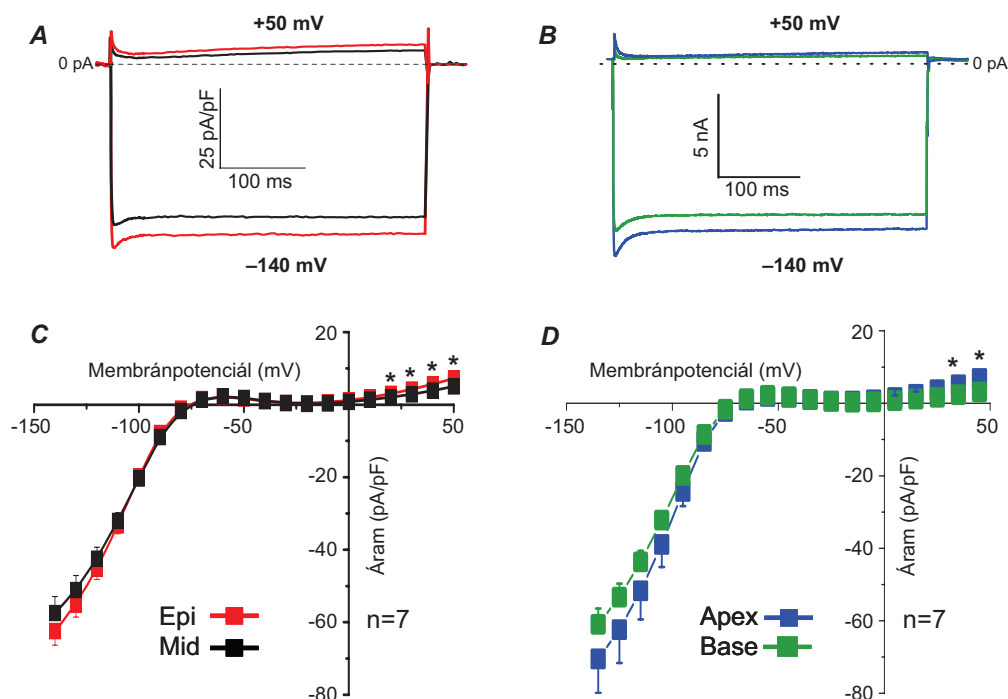
3. ábra. Reprezentatív akciós potenciálok a szívizom különböző területeiről (A és B panel), és az akciós potenciálok hosszának (C), valamint a korai repolarizáció nagyságának (D) összevetése. Az APD₅₀ és APD₉₀ értékek az AP időtartamát jelentik a repolarizáció 50 és 90%-nál. A korai repolarizáció nagyságát az akciós potenciál inflexiós pontjától a csúsig határoztuk meg.

Epikardiális (EPI): piros szín; Midmiokardiális (MID): fekete szín; Apikális (APEX): kék szín; Bazális (BASE): zöld szín.

mutattak, szignifikáns különbséget sehol nem találtunk. Ez arra utal, hogy a sejtek mérete valamennyi vizsgált régióban egyforma volt.

IV/2. Befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})

A membrán egyensúlyi áram-feszültség (I/V) összefüggését 400 ms hosszú, -130 és +50 mV közötti, 5 millivoltos lépcsőkben alkalmazott teszt impulzusokkal határoztuk meg 5 μ M Nifedipin jelenlétében (4. ábra). Az így kapott I/V összefüggés inward szakaszát (ábránkon negatív tartomány) egyértelműen az I_{K1} határozza meg, míg az outward szakasz (pozitív áramértékek) esetében már egyéb áramok is jelen lehetnek. Az egyes régiókból származó sejtek átlagait összehasonlítva a -130 és +40 mV közötti tartományban szignifikáns különbségeket sehol nem találtunk. Ezzel



4. ábra. Reprezentatív I_{K1} áramjelek (A és B panel) és a membrán áram-feszültség összefüggéseinek összehasonlítása (D, E) az EPI/MID és az APEX/BASE régiókban.

Epikardiális (EPI): piros szín; Midmiokardiális (MID): fekete szín; Apikális (APEX): kék szín; Bazális (BASE): zöld szín.

szemben szignifikáns különbségeket tapasztaltunk az EPI/MID és APEX/BASE összehasonlításaikor az I/V görbe pozitív feszültségértékekhez tartozó szakaszán, ahol már egyéb áramok (pl. a késői típusú káliumáram gyors és lassú komponense) is jelen vannak.

IV/3. L-típusú kalciumáram (I_{Ca})

Az L-típusú kalciumáram méréseknél Tyrode oldatot 3 mM koncentrációjú 4-aminopiridinnel, 1 μ M E-4031-gyel és 30 μ M chromanol 293B-vel egészítettük ki, hogy blokkoljuk a káliumáramokat. A pipettatöltő oldat összetételét a módszerek (III/2. 3.) fejezet tartalmazza. Az áram kiváltásához a membránt -40 mV-os tartó feszültség után 400 ms hosszan +5 mV-ra depolarizáltuk. Vizsgáltuk az áram amplitúdójának, inaktivációjának feszültségfüggését, és a +5 mV értéken mért inaktiváció időállandóját (2. táblázat). Az egyes régiókban mért paraméterek között

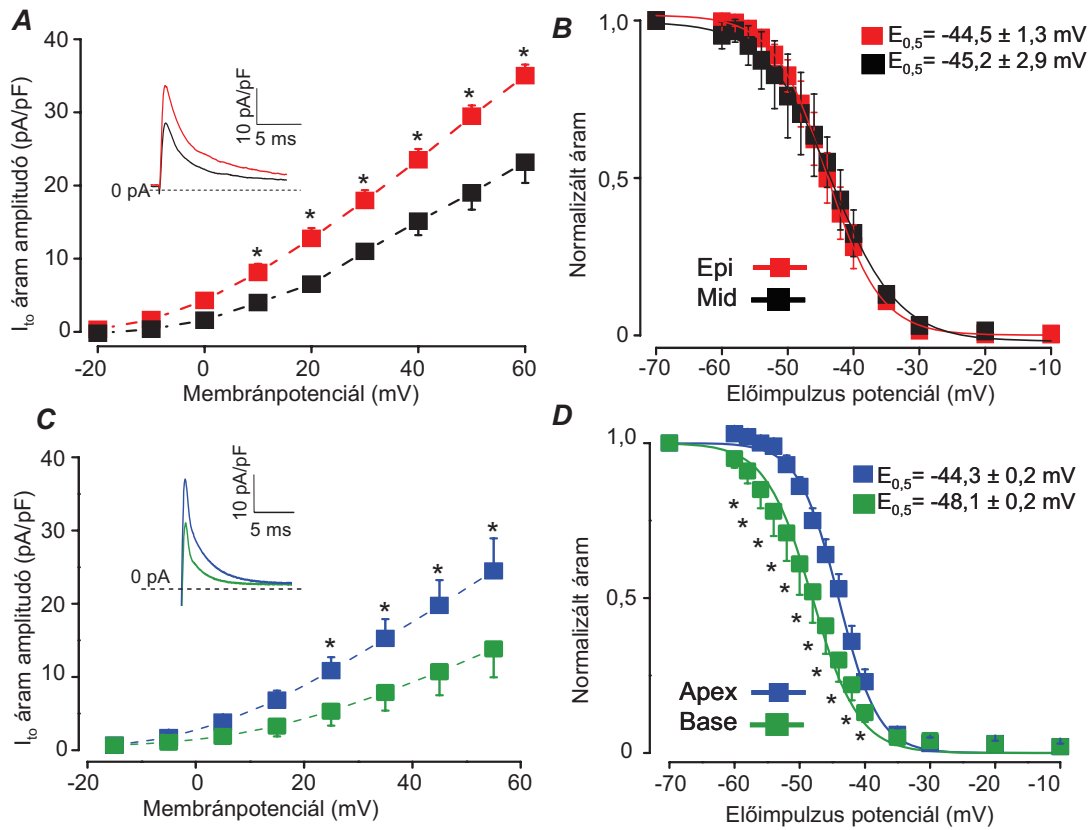
szignifikáns különbséget sehol nem figyeltünk meg. Tehát megállapíthatjuk, hogy a kalciumáramok paraméterei az általunk vizsgált régiókban megegyeznek.

2. táblázat. Az L-típusú kalcium áram (I_{Ca}) paraméterei a vizsgált régiókban.

I_{Ca}	<i>EPI</i>	<i>MID</i>	<i>APEX</i>	<i>BASE</i>
Amplitúdó (pA/pF)	-4,9±1,2	-4,6±0,8	-5,85±0,76	-7,17±0,63
Egyensúlyi inaktiváció félaktivációs feszültsége (mV)	-16,1±1,1	-15,1±0,4	-19,7±1,3	-20,9±1,2
Egyensúlyi inaktiváció meredeksége (mV)	-3,38±0,25	-3,41±0,24	4,1±0,26	4,4±0,25
Inaktiváció időállandói (ms)	20,5±2,8	20,4±0,8		
gyors komponens (ms)			10,6±0,9	10±1
lassú komponens (ms)			46,4±10,5	37,2±3,4

IV/4. Tranziens, kifelé irányuló káliumáram (I_{to})

Az I_{to} -t -80 mV-os tartó feszültségről aktiváltuk 400 ms hosszú, -20 és +60 mV közötti tesztimpulzusokkal, 10 mV-os lépésközökkel. Minden egyes tesztimpulzus előtt egy rövid (5 ms időtartamú) -30 mV-os depolarizáló lépcsőt alkalmaztunk, hogy inaktiváljuk a gyors, feszültség függő Na^+ -áramot, a külső oldat pedig az $I_{Ca,L}$ gátlása céljából 5 μ M Nifedipint tartalmazott. Amint az az 5. ábra A és C paneljén is látható, az EPI és az APEX sejteknek a +10 illetve +20 mV feletti feszültségértékeknél szignifikánsan nagyobb I_{to} csúcsáram amplitúdója volt, mint a velük összehasonlításra kerülő MID és BASE sejteknek. Az áram inaktivációjának feszültségfüggését -80 mV-os tartó feszültségről -70 és -10 mV közötti, 5 mV-os lépcsőkben alkalmazott előimpulzust követő +50 mV-ra történő depolarizációval vizsgáltuk. Az előimpulzusok alkalmazása után +50 mV-on kiváltott csúcs áramokat az előimpulzus nélkül, ugyancsak +50 mV-on kiváltott áram csúcserkére normalizáltuk, és a hányadost az előimpulzus feszültségértékének függvényében ábrázoltuk, majd Boltzmann függvénnyel illesztettük. Az EPI és MID sejtek esetében nem volt szignifikáns különbség az I_{to} egyensúlyi inaktivációjában. A Boltzmann függvénnyel történt illesztést követően kapott félaktivációs feszültség az EPI sejtek esetében -44,5±1,3 mV lett -3,2±0,12 mV-os meredekséggel, míg a MID sejteknél a félaktivációs feszültség -45,2±2,9 mV -3,4±0,47 mV-os meredekséggel (5. ábra B).



5. ábra. A tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to}) tulajdonságainak összehasonlítása a kamrai szívmusculus különböző területein ($n=7$). Az I_{to} amplitúdójának áram-feszültség összefüggése az EPI/MID (A) és az APEX/BASE (C) területeken. Az ábrabetétekben reprezentatív áramjelek láthatók +60 mV-os depolarizáló feszültségnél mérve. Az I_{to} egyensúlyi inaktivációjának feszültség függése az EPI/MID (B) és az APEX/BASE (D) területeken. A folytonos vonalakat Boltzmann illesztéssel kaptuk.

Az APEX sejtekben az inaktivációs görbe 4 mV-al jobbra helyezkedett el a BASE sejtek görbéjéhez képest. Az APEX sejtek félaktivációs feszültsége $-44,3 \pm 0,2$ mV volt, szemben a BASE sejtek $-48,1 \pm 0,2$ mV-os értékéhez képest ($p < 0,05$). Ugyanakkor az APEX sejtek inaktivációjának feszültségfüggési görbéje kis mértékben, de szignifikánsan meredekebb is, mint a BASE sejteké, a meredekség az előbbi esetben $3,4 \pm 0,15$ mV, az utóbbi esetben pedig $4,5 \pm 0,15$ mV-nak adódott (5. ábra D panel, $n=7$, $p < 0,05$).

Az I_{to} inaktivációjának időfüggését a +50 mV-on kialakult áram leszálló szárának exponenciális illesztésével kaptuk. Az inaktiváció sebességében nem találtunk szignifikáns különbséget egyik vizsgált csoport között sem. Az epikardiális sejtek inaktivációjának időállandója $6,8 \pm 0,2$ ms volt a midmiokardiális sejtek $6,6 \pm 0,4$

ms-os értékéhez képest (n=7), ugyanezek az értékek az apikális és bazális sejtek esetében $7,2 \pm 0,4$ (APEX) és $6,5 \pm 0,6$ (BASE) ms voltak (n=7, $p > 0,05$).

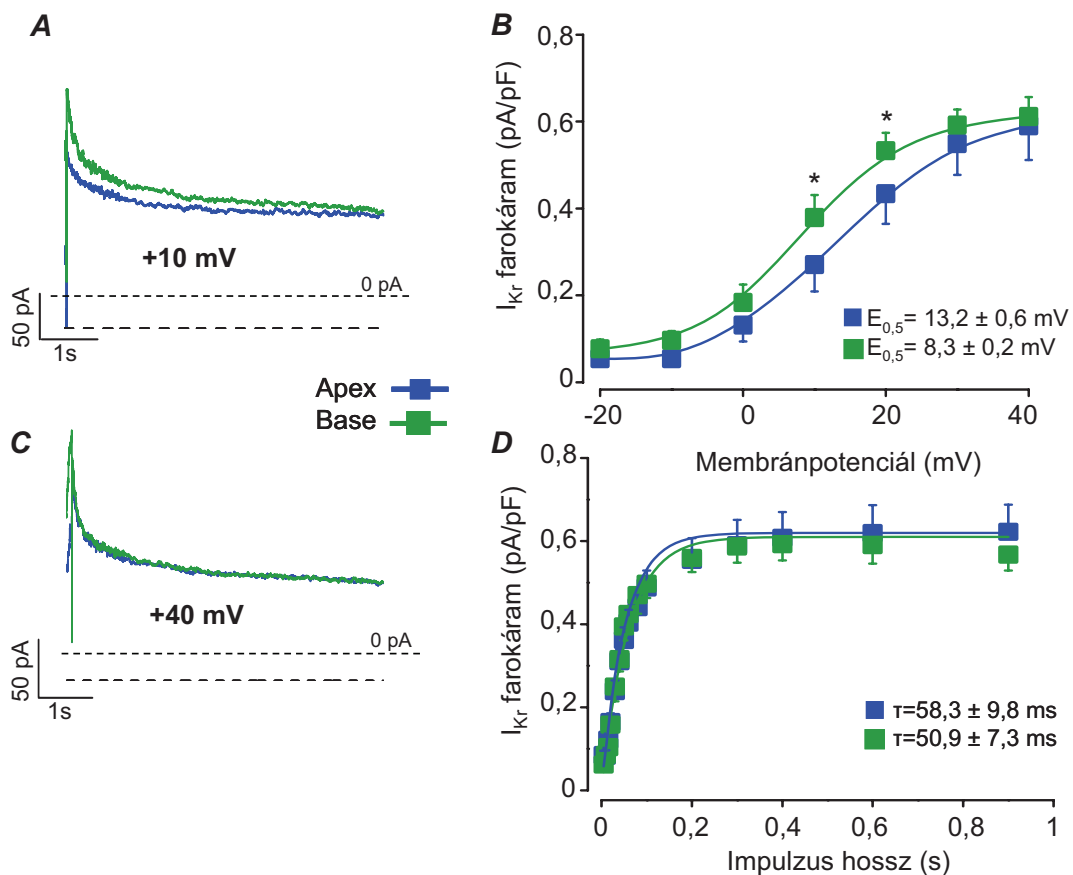
IV/5. A késői típusú káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Az I_{Kr} aktiválását 200 ms hosszú -20 és +40 mV közötti, 10 mV-os lépcsőkben alkalmazott depolarizáló pulzusokkal végeztük. Az I_{Kr} -t farokáramként mértük a -40 mV-os tartófeszültségre történő repolarizáció során. A mérések során az $I_{Ca,L}$ és az I_{Ks} áramot $5 \mu\text{M}$ Nifedipinnel és $30 \mu\text{M}$ Chromanol 293B-vel gátoltuk. Amint az a 6. ábra C paneljén is látható, a +40 mV-os aktivációkor nem volt különbség az APEX és BASE sejtek farokáramai között. Ugyanakkor az aktiváló feszültség egy kis tartományában (+10 mV körül) az apikális áramamplitúdók szignifikánsan kisebbek voltak, mint a bazális sejtek áramai (6. ábra A). Ez jól látható a 6. ábra B részén, ahol az I_{Kr} áram aktivációjának feszültség-függését mutatjuk be. A görbéket két-állapotú Boltzmann függvényrel illesztve a félaktivációs-feszültségek $13,2 \pm 0,6$ -nak és $8,3 \pm 0,2$ mV-nak adódtak az apikális és bazális sejtek esetében ($p < 0,05$), $8 \pm 0,6$ mV és $6,4 \pm 0,2$ mV-os meredekséggel ($p < 0,05$, n=7). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az I_{Kr} kevésbé pozitív feszültségértékeken aktiválódik a BASE területeken, mint az APEX sejteiben.

Az áram aktivációjának időállandóit envelope-tesztel határoztuk meg (6. ábra D). Ezen protokoll során +30 mV-os depolarizáló pulzusokat alkalmazunk 5-900 ms időtartamban. Az aktivációs időállandók nem különböztek szignifikánsan a szívizom különböző, összehasonlításra került területein (APEX: $58,3 \pm 9,8$ ms; BASE: $50,9 \pm 7,3$ ms; $p > 0,05$, n=7).

A deaktivációs időállandókat két exponens illesztésével kaptuk a farokáram leszálló szakaszán. Nem volt szignifikáns különbség sem a gyors (161 ± 23 ms és 143 ± 15 ms), sem a lassú ($3,04 \pm 0,45$ s és $2,6 \pm 0,38$ s) időállandókban az APEX és BASE sejtek I_{Kr} áramai között (n=7).

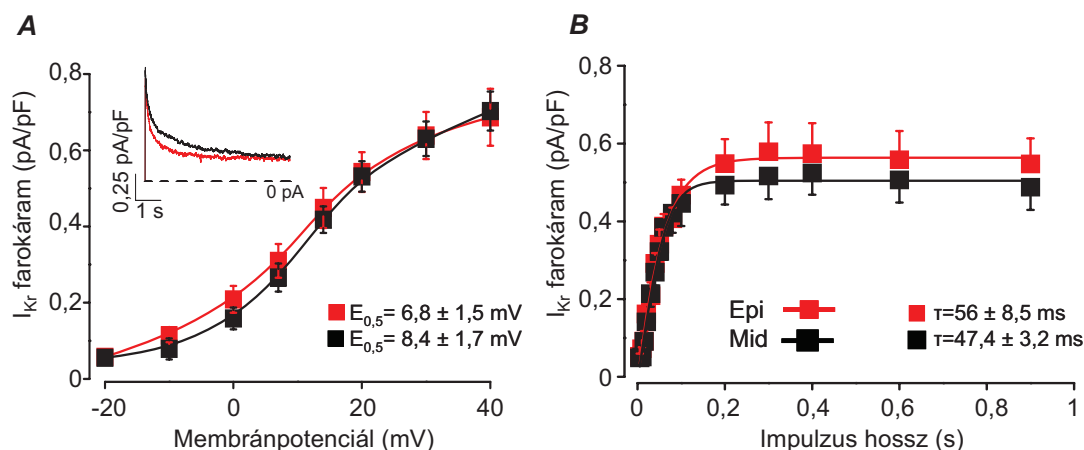
A 7. ábrán az I_{Kr} EPI/MID összehasonlításának eredményeit mutatom be. Az A panelen az I_{Kr} aktivációjának feszültségfüggése látható. A mérési pontok Boltzmann-függvényrel történő illesztése után a fél-aktivációs feszültség az EPI sejtek esetében $6,8 \pm 1,5$ mV, a meredekség $7,3 \pm 1,1$ mV, a MID sejteknél a félaktivációs-feszültség $8,4 \pm 1,7$ mV, $5,7 \pm 0,6$ mV-os meredekséggel (n=6).



6. ábra. A késői típusú káliumáram gyors komponensének (I_{K_r}) tulajdonságai az APEX és BASE területeken ($n=7$). Reprezentatív I_{K_r} farokáram regisztrátumok -40 mV-on mérve 200 ms hosszú +10 (A panel) és +40 mV-os (C panel) aktivációt követően. B panel: az I_{K_r} áram-feszültség összefüggése. Az áramot az abszcisszán feltüntetett depolarizáló membránpotenciál értékekkel aktiváltuk, a folytonos vonalakat kétállapotú Boltzmann-illesztéssel kaptuk. D panel: Az I_{K_r} aktivációs kinetikája az envelope-tesztel meghatározva +30 mV-on.

Az I_{K_r} aktivációjának időfüggését az envelope-teszt mutatja meg (7. ábra B). Az aktivációs időállandók között nem találtunk szignifikáns különbséget az EPI és a MID sejtekben (EPI: $56 \pm 8,5$ ms és MID: $47 \pm 3,2$ ms, $p > 0,05$, $n=6$).

Az áram deaktivációja gyorsabb volt az EPI sejtekben, mint a MID régióban: mind a gyors (92 ± 12 vs 173 ± 22 ms), mind a lassú ($1,75 \pm 0,25$ vs $2,33 \pm 0,16$ ms) deaktivációs időállandók szignifikánsan kisebbek az EPI sejtekben ($n=5$, $p < 0,05$).

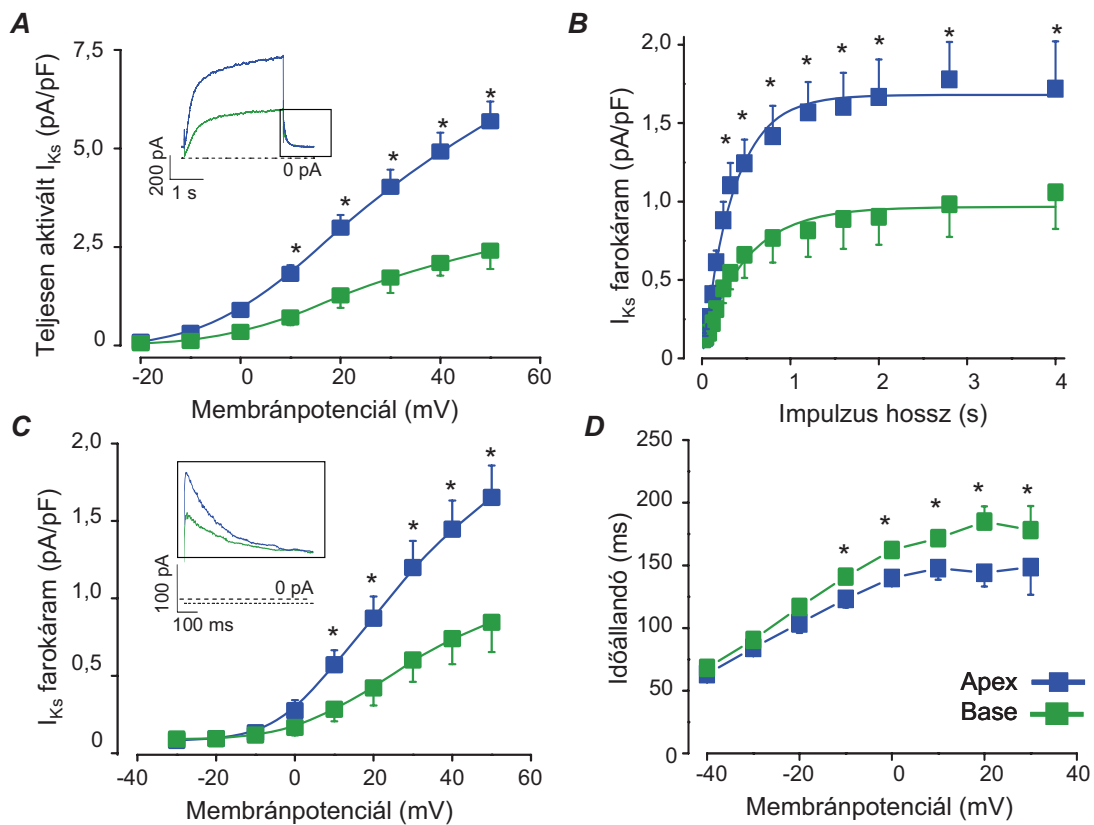


7. ábra. A késői típusú káliumáram gyors komponensének (I_{Kr}) paraméterei EPI és MID sejtekben ($n=6$). A panel: Az I_{Kr} farokáram aktivációjának feszültségfüggése. Az ábrabetétben reprezentatív I_{Kr} farokáramok láthatók -40 mV-on mérve. B panel: Az I_{Kr} aktivációs kinetikája envelope-tesztel meghatározva, +30 mV-on.

IV/6. A késői típusú káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

A késői típusú káliumáram lassú komponensét (I_{Ks}) teljesen aktivált és farokáramként egyaránt meghatároztuk. Tartó feszültségként -40 mV-ot, aktiváló feszültségként 3 s hosszú, -30 és +50 mV közötti feszültségértékeket alkalmaztunk 10 mV-os lépésközzel. Az I_{Ca} -t 5 μ M Nifedipine, az I_{Kr} -t 1 μ M E-4031 segítségével blokkoltuk. Mind a teljesen aktivált, mind a farokáram szignifikánsan nagyobb volt az APEX, mint a BASE sejteken (8. ábra A és C panel): az APEX sejteken a teljesen aktivált áram amplitúdója +50 mV-on mérve $5,61 \pm 0,43$ pA/pF míg a BASE sejtek esetében csak $2,14 \pm 0,18$ pA/pF volt ($p < 0,01$), a hozzájuk tartozó farokáramok pedig $1,65 \pm 0,21$ pA/pF az APEX, és $0,85 \pm 0,19$ pA/pF a BASE területről származó sejteken ($p < 0,05$, $n=7$).

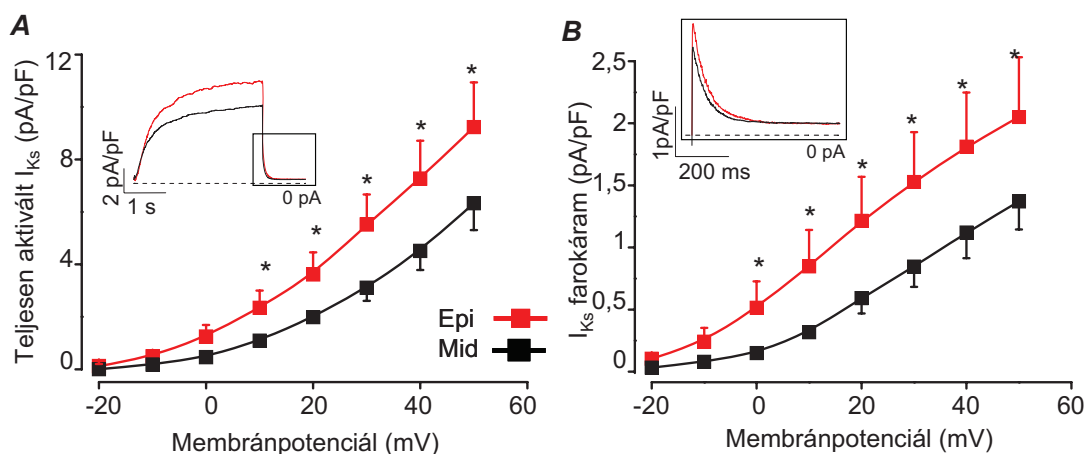
Az I_{Kr} eredményekkel ellentétben az I_{Ks} aktivációs és deaktivációs időállandója is szignifikánsan kisebb volt az APEX sejtek esetében. Az aktiváció sebességét envelope-tesztel határoztuk meg, ahol +50 mV-os depolarizáló pulzusokat alkalmaztunk 16-tól 4000 ms-os időtartamokig (8. ábra B). A kapott áramamplitúdókat a pulzusok hosszának függvényében ábráztuk, majd monoexponenciális egyenlettel illesztettük. Az így kapott időállandók az apikális sejtek esetében 358 ± 53 ms, a bazális sejtek esetében pedig 516 ± 34 ms-nak adódtak ($p < 0,05$, $n=7$). Az I_{Ks} deaktivációját -40 és +30 mV közötti feszültségértékeken



8. ábra. A késői típusú káliumáram lassú komponensének (I_{Ks}) tulajdonságai APEX és BASE szívizomsejteken ($n=7$). A panel: a I_{Ks} maximális aktivációjának feszültségfüggése, az ábrabetétben reprezentatív áramgörbékkel (+50 mV-on mérve). B panel: Az I_{Ks} aktivációs kinetikája envelope-tesztel meghatározva. C panel: az I_{Ks} farokáram amplitúdójának feszültségfüggése, az ábrabetétben reprezentatív farokáramokkal (maximális aktivációt követő -40 mV-os repolarizáció során mérve). D panel: Az I_{Ks} deaktivációját jellemző időállandók feszültségfüggése.

vizsgáltuk, egy 3 s hosszú +50 mV-os depolarizáló impulzust követően. A kapott áramgörbék leszálló szárait exponenciális egyenlettel illesztettük, és a kapott időállandókat a deaktiváló feszültség függvényében ábrázoltuk (8. ábra D). Eredményeink azt mutatják, hogy a -10 és +20 mV közötti feszültség tartományban a deaktiváció szignifikánsan gyorsabb az APEX sejtek esetében, mint a BASE területeken.

A következő, 9. ábrán a késői típusú káliumáram lassú komponensének EPI/MID területek közötti összehasonlítása látható. Az EPI rétegben az I_{Ks} áram amplitúdóját szignifikánsan nagyobbak találtuk, mint a MID rétegben. Az EPI sejteknél, +50 mV-on mérve a maximálisan aktivált áram amplitúdója $9,2 \pm 1,4$ pA/pF, a farokáram amplitúdója $2,05 \pm 0,48$ pA/pf, míg ugyanezek az értékek a MID sejteknél

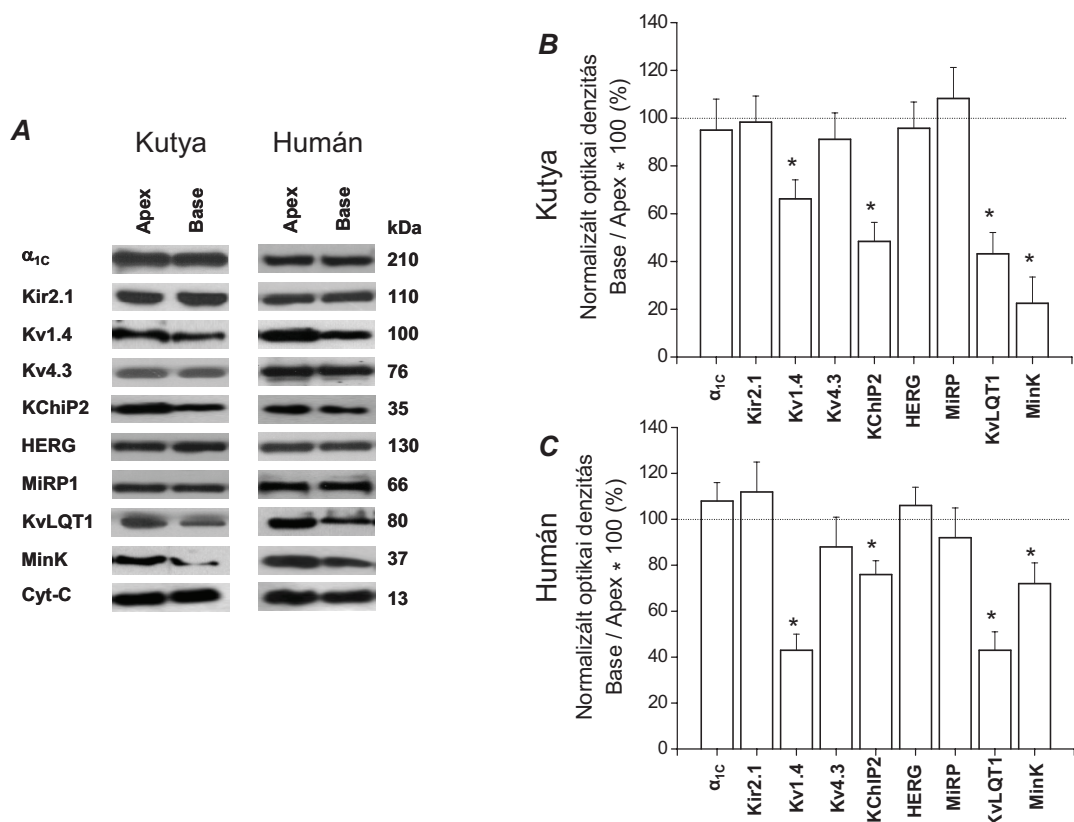


9. ábra. A teljesen aktivált (A) és az I_{Ks} farokáramok (B) I/V összefüggései EPI és MID szívműsejtekben ($n=7$). Az ábrabetétekben +50 mV-on teljesen aktivált I_{Ks} áram látható (A) és a -40 mV-os repolarizációt követő farokáramok kinagyítva (B).

6,3±1 pA/pF a teljesen aktivált áramnál és 1,37±0,22 pA/pF a farokáramnál (mindkét esetben $p<0.05$, $n=7$). Az aktiváció feszültségfüggése nem különbözött egymástól a két rétegben, csakúgy mint az aktiváció időállandói sem (EPI: 392±65 ms; MID: 337±40 ms, $n=6$). Az I_{Ks} deaktivációját biexponenciális függvénnyel tudtuk megilleszteni, de nem találtunk különbséget az EPI és MID rétegek között sem a gyors (53±3 ms vs. 59±6 ms EPI/MID), sem a lassú (196±17 ms versus 232±44 ms EPI/MID, $n=6$) időállandók esetében sem.

IV/7. Ioncsatorna proteinek eloszlása a szívmű különböző területein

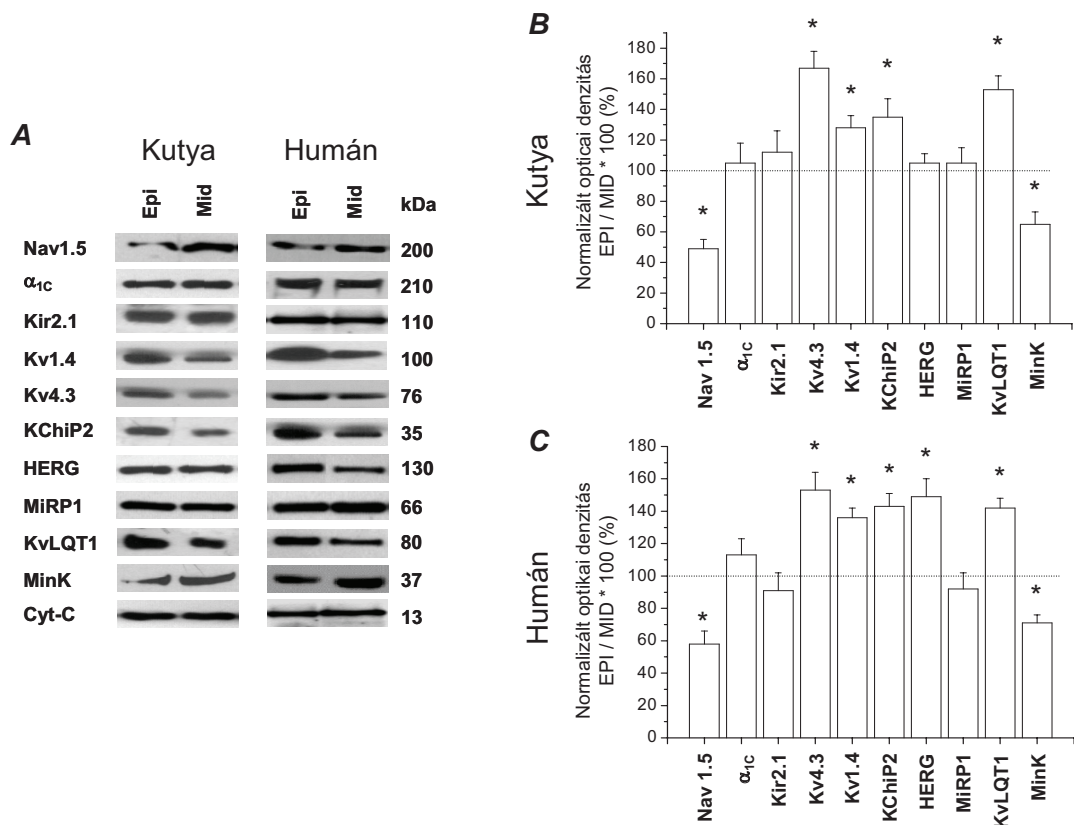
A további kísérletek célja annak eldöntése volt, hogy a vizsgált ionáramok paramétereiben észlelt különbségek (akár APEX/BASE, akár EPI/MID viszonylatban tapasztalt eltérések legyenek) eredhetnek-e az ioncsatornák expressziójának különbségeiből. Ezért meghatároztuk a fő ioncsatornaproteinek (α -alegységek), és azok ismert másodlagos szabályozó proteinjeinek expressziós mintázatát APEX/BASE és EPI/MID mintákban. Mivel a kísérleti technika csak minta-párok összehasonlító vizsgálatát engedi meg, a Western-blot eredmények kiértékelése során a BASE területéről származó fehérjék optikai denzitását normalizáltuk az APEX területéről származó proteindenzitásra, és ugyanezt tettük a szívmű EPI-MID rétegeiből származó minták esetén is. A Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és



10. ábra. APEX/BASE ioncsatorna-fehérje eloszlás (α -alegységek és a szabályozó proteinek) kutya és humán szívizomban Western blottal meghatározva. Reprezentatív Western blot fotók láthatóak az A panelen. Hogy minden esetben egyforma töltést érjünk el, a nitrocellulóz membránt leemésztettük, és újrifestettük egér Citokróm-C ellenes antitesttel (Cyt-C). A relatív optikai densitások (bazális értékek az apikális értékekre normalizálva) láthatók az ordinátákon. Az átlag értékeket 8 kutya és 7 humán szív mintáiból kaptuk (B, C).

Farmakoterápiai Intézetével történő együttműködésünk keretein belül lehetőségünk nyílt egészséges, humán szívizomminták vizsgálatára is. A humán mintákon nyert adatokat a kutya szívizomzatból nyert eredményeinkkel együtt mutatom be.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az L-típusú Ca^{2+} -csatorna α_{1C} (pórus formáló) alegységének, a befelé egyenirányító K^{+} -csatorna Kir2.1 (pórus formáló) alegységének, valamint az I_{Kr} -csatorna HERG (pórus formáló) és MiRP1 (regulatórikus) alegységének expressziója nem különbözött szignifikánsan az APEX és BASE mintákban (10. ábra B). Ezzel szemben a KvLQT1 és MinK (az I_{Ks} -csatorna pórus formáló és regulatórikus) alegységek expressziója szignifikánsan kisebb volt a BASE területekről származó mintákban. Hasonló asszimetriát találtunk az I_{to} áramot létrehozó csatornaféhrjék expressziós mintázatában is: a Kv1.4- és a KChIP2-



11. ábra. Ioncsatorna-fehérjék (α -alegységek és a szabályozó proteinek) eloszlása kutya és humán szívizom EPI és a MID rétegében. Reprezentatív Western blot jelek láthatók az A panelen. A relatív optikai densitások (EPI értékek a MID értékekre normalizálva) láthatók az ordinátákon. Az átlag értékeket 6 kutya és 5 humán szív mintáiból kaptuk (B, C). A csillagok a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatják.

fehérjék (pórus formáló és másodlagos I_{to} alegységek) szignifikánsan kisebb mértékben voltak jelen a BASE területeken, mint az APEX részen. A Kv4.3 expressziója (az I_{to} másik pórus formáló alegysége) ugyan kisebb volt a BASE mintákban, de a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak. A 10. ábra C részén egészséges humán szívek ($n=7$) APEX és BASE területeiről származó minták ioncsatorna expressziós mintázatának összehasonlítása látható. Bár összevetve a B panelen látható kutya miokardiumból származó eredményekkel mennyiségi különbségek vannak a KChIP2, a MinK és a Kv1.4 expressziós szintjeinek relatív értékeiben, az APEX/BASE asszimetria emberi anyagban hasonló volt a kutyából származó mintákon megfigyeltekéhez.

A 11. ábrán az EPI/MID ioncsatorna expressziós különbségeket mutatom be ugyancsak kutyából és emberi anyagból származó mintákon. Az α_{1c} , a Kir2.1, a

HERG és a MiRP1 proteinek (sorrendben az I_{Ca} , az I_{K1} és az I_{Kr} áramokért felelős csatornák) expresszióiban nem volt szignifikáns különbség a kutyaszív epikardiális és a midmiokardiális rétegeből származó minták között. Ezzel szemben szignifikánsan nagyobb volt az epikardiális mintákban az I_{to} áramot létrehozó ioncsatorna fehérjéknek, a Kv4.3, a Kv1.4 és a KChIP2 proteineknek (két pórus formáló és egy regulatórikus alegység) az expressziója. A KvLQT1 és a MinK fehérjék (I_{Ks}) denzitása aszimmetrikus volt: a KvLQT1 expressziója magasabb volt az EPI területeken, míg a MinK denzitása a MID régióban volt magasabb. Ezen kívül itt megvizsgáltuk még a Nav1.5 (a gyors, feszültség függő Na^+ -csatorna pórus formáló alegysége) expressziós szintjét is, ami MID régióban mintegy kétszerese volt az EPI területen találtnak. Az EPI/MID ioncsatorna expressziós különbségeket 5 humán szíven is alkalmunk nyílt megvizsgálni (11. ábra C): alapvetően hasonló ioncsatorna expressziós mintázatot kaptunk itt is, mint amit kutya mintákban észleltünk, kisebb mennyiségi különbségeket leszámítva. Egyedül a HERG-fehérje expressziójának EPI/MID hányadosa volt nagyobb a humán mintákban a kutya miokardiumban megfigyelt értékhez képest.

IV/8. Nemi hormonok hatása az EKG paraméterekre

IV/8. 1. Plazmahormon-szintek

A korábbi kísérleteinkben az ioncsatornák expressziójának és funkciójának szíven belüli inhomogenitását tanulmányoztuk. A következő kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy hogyan változik meg a szív ioncsatornáinak expressziója és funkciója különböző hormonstátuszú állatmodellekben. Vizsgálatainknak ebben a részében a nemi hormonok hatását tanulmányoztuk. Vizsgáltuk kasztráció, illetve különböző hormon szubsztitúció hatásait.

Mind a plazmatesztoszteron-, mind a plazmaösztrogén-szinteket folyamatosan meghatároztuk a kísérletek során. A tesztoszteron szinteket az 3. táblázat mutatja be. A hím kutyák kasztrációja a plazmatesztoszteron-szint közel egy nagyságrendű csökkenéséhez vezetett, olyan szintre csökkent a plazma tesztoszteronkoncentrációja, mint a kontroll, vagy ivartalanított nőstény állatokban. A kasztrált nőstény állatok tesztoszteron kezelése magasabb plazmatesztoszteron-szintet eredményezett, mint amit a kontroll hím állatokban tapasztaltunk.

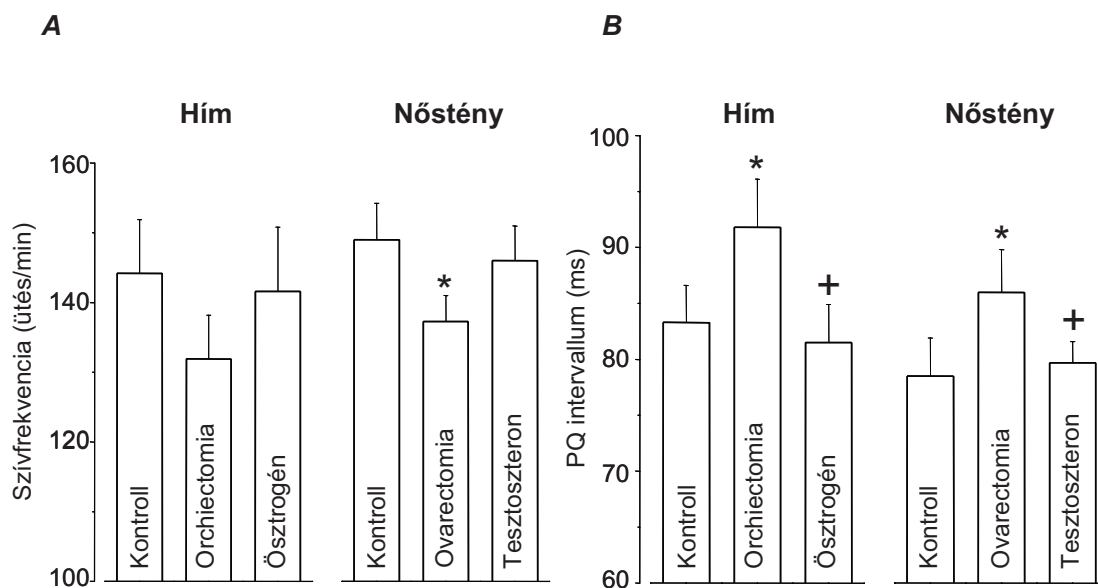
Az ösztrogénkoncentrációk a kontroll hímekben és ovariectomizált nőstényekben nem haladták meg a detekciós határt ($18,4 \text{ pmol L}^{-1}$), a kontroll nőstényekben pedig (valószínűleg a kitek nagy mérési bizonytalansága miatt) igen nagy szórást mutattak. Ezért átlagértékek számítására nem került sor. Egyedüli kivételt az ösztrogén kezelt hímek jelentettek, ahol a csoport átlaga $162 \pm 43 \text{ pmol L}^{-1}$ 17β -ösztradiol volt. Ezek az adatok azonban kielégítően igazolják, hogy az inverz hormon szubsztitúció itt is hatásos volt.

3. táblázat. Szérumtesztoszteron-szintek kutyákban elektro-kemilumineszcens immunoesszé technikával mérve

	Kontroll	Kasztráció	Inverz szubsztitúció
Hím	$3,6 \pm 1,4$	$0,23 \pm 0,06$ *	$0,33 \pm 0,05$ *
Nőstény	$0,19 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,05$	$10,2 \pm 3,6$

Tesztoszteron átlagértékek $\pm$ SE (nmol L^{-1}) 10 állatban

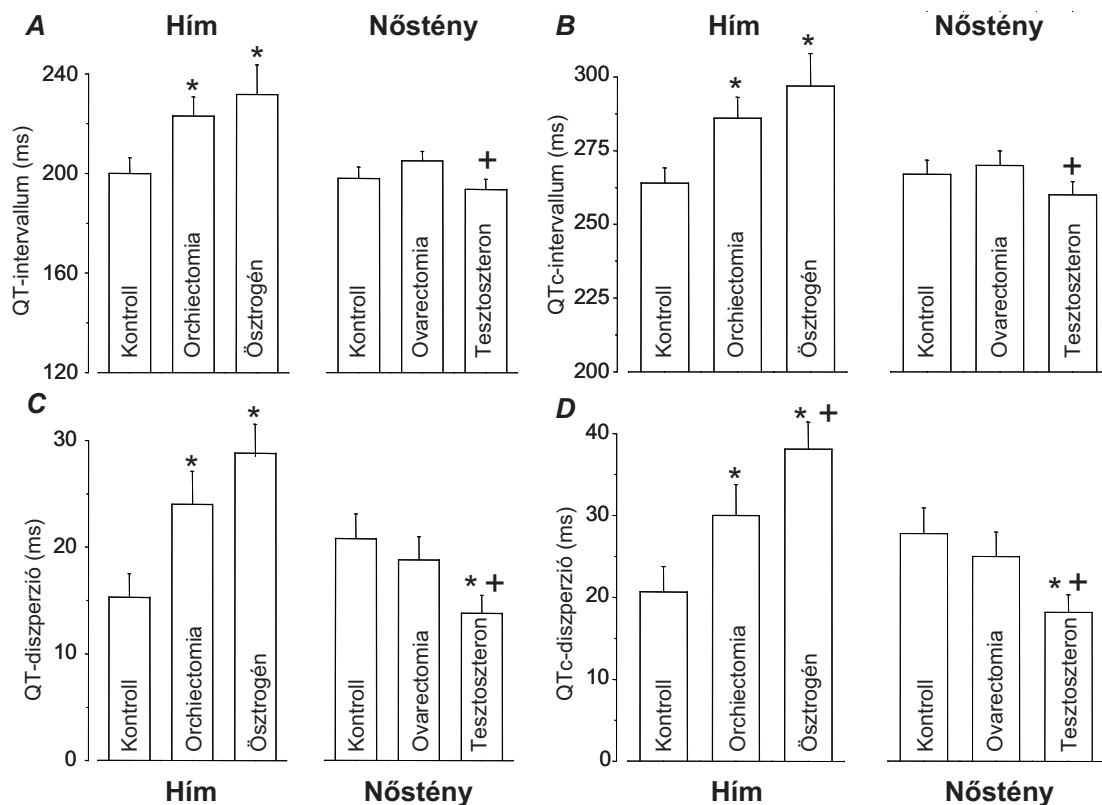
* kontrolltól való szignifikáns eltérés



12. ábra. Kasztráció és inverz hormonszubsztitúció hatása kutyákban a szívfrekvenciára és a PQ intervallumra (minden csoportban $n=10$). Az állatok kardiális státuszát 1 hónappal az orchiectomia és ovariectomia után értékeltük. Az inverz hormonszubsztitúció (ösztrogén adagolása a kasztrált hímeknek és tesztoszteron a nőstényeknek) szintén 1 hónapig tartott. Az oszlopok az átlagot és a standard hibát ábrázolják. (*) Szignifikáns különbség a kontroll csoporttól, (+) Szignifikáns eltérés a kasztrált és hormonszubsztituált állatok között ($p<0,05$).

IV/8. 2. Szívfrekvencia és az atrioventrikuláris vezetés

Ha egy szívben, illetve azon belül a szinusz csomóban vagy pitvar-kamrai csomóban megváltozik az ioncsatornák funkciója, akkor a változás tükröződik a szívfrekvenciában és az atrioventrikuláris vezetés sebességében (PQ intervallum). Amint az a 12. ábra A részén is látható, a kasztráció kis mértékben lecsökkentette mind a hím, mind a nőstény kutyák szívfrekvenciáját. Ezek a változások a nőstények esetében statisztikailag szignifikánsak voltak ($p<0,05$), míg a hím állatoknál nem érte el a változás a szignifikáns szintet. Inverz nemi hormon szubsztitúcióját követően (ösztrogén adagolása a kasztrált hímeknek és tesztoszteron a nőstényeknek) a szívfrekvencia nem különbözött a kontroll csoporttól sem hímek, sem nőstények esetében. Ehhez hasonló változásokat tapasztaltunk a PQ-intervallum viselkedésében is kasztráció, és kasztrációt követő inverz hormon szubsztitúció hatására (12. ábra B). A kasztráció meghosszabbította, majd a hormonok fordított adása helyreállította a PQ-intervallumot. Összefoglalva tehát, a hormonok szintjének lecsökkentése lassította a



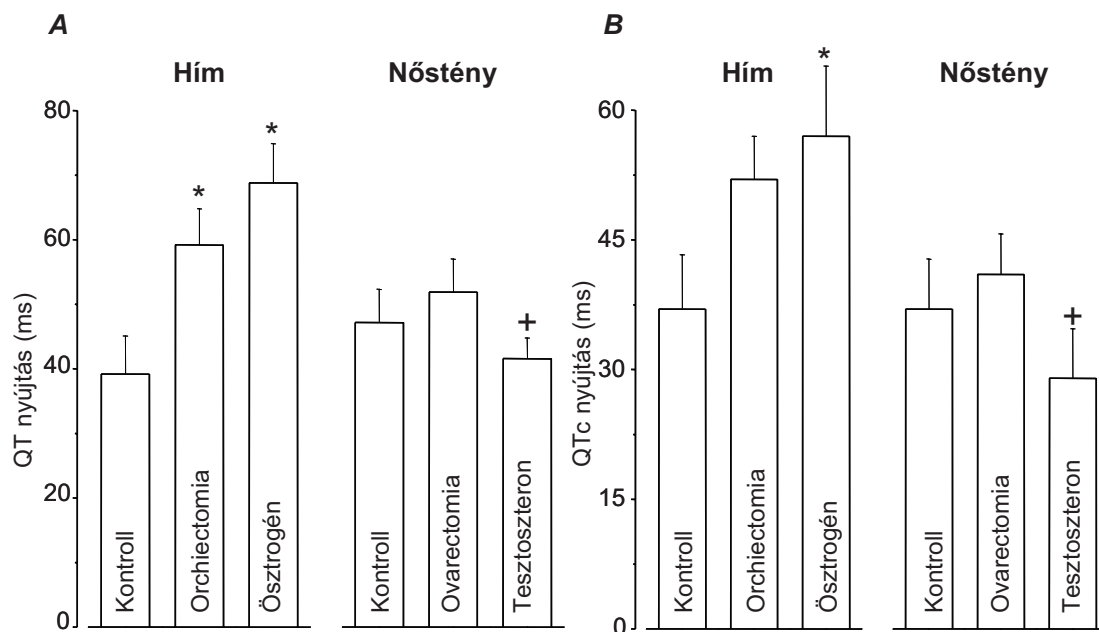
13. ábra. Kasztráció és inverz hormonszubsztitúció hatása a QT- és QTc-intervallumra (A, B), valamint a QT- és QTc-diszperzióra (C, D). A (*) a kontroll csoporttól való, a (+) a kasztrált és hormonszubsztituált állatok közötti statisztikailag szignifikáns különbséget mutatja.

szívfrekvenciát és megnyújtotta a PQ intervallumot, majd a nemihormonok adagolása (függetlenül a szex sztroid típusától vagy az állat aktuális nemétől) visszaállította ezen paraméterek eredeti értékét.

IV/8. 3. Kamrai depolarizáció és repolarizáció

Az intraventrális vezetésről a QRS-komplexum hossza nyújt információt a felszíni EKG-regisztrátumon. Kontroll körülmények között a hím állatok QRS időtartama $56,7 \pm 1,5$ ms, míg a nőstény kutyáké $54,4 \pm 2,2$ ms-nak adódott. Sem a kasztráció, sem az inverz hormonszubsztitúció nem befolyásolta szignifikánsan a QRS-komplexum hosszát, ami arra utal, hogy az intraventrális vezetésre nem hatnak a szexuálissteroidok szintjében bekövetkező változások.

A depolarizációval ellentétben, a kamrai repolarizáció időtartama nagy mértékben függött a tesztoszteron szintjétől. Orchiectomia szignifikánsan megemelte a QT és a korrigált QT intervallum (QTc) hosszát hím kutyákban (13. ábra A és B). A



14. ábra. Kasztráció és inverz hormonszubsztitúció hatása a dofetilide-indukált QT (A) és QTc (B) nyúlásra. A Dofetilide ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.v. injekció) hatását 10 perccel a beadást követően vizsgáltuk. Az oszlopok az átlag és standard hiba értékeket mutatják. (*) Szignifikáns különbség a kontroll csoporttól, (+) Szignifikáns eltérés a kasztrált és hormonszubsztituált állatok között ($p < 0,05$).

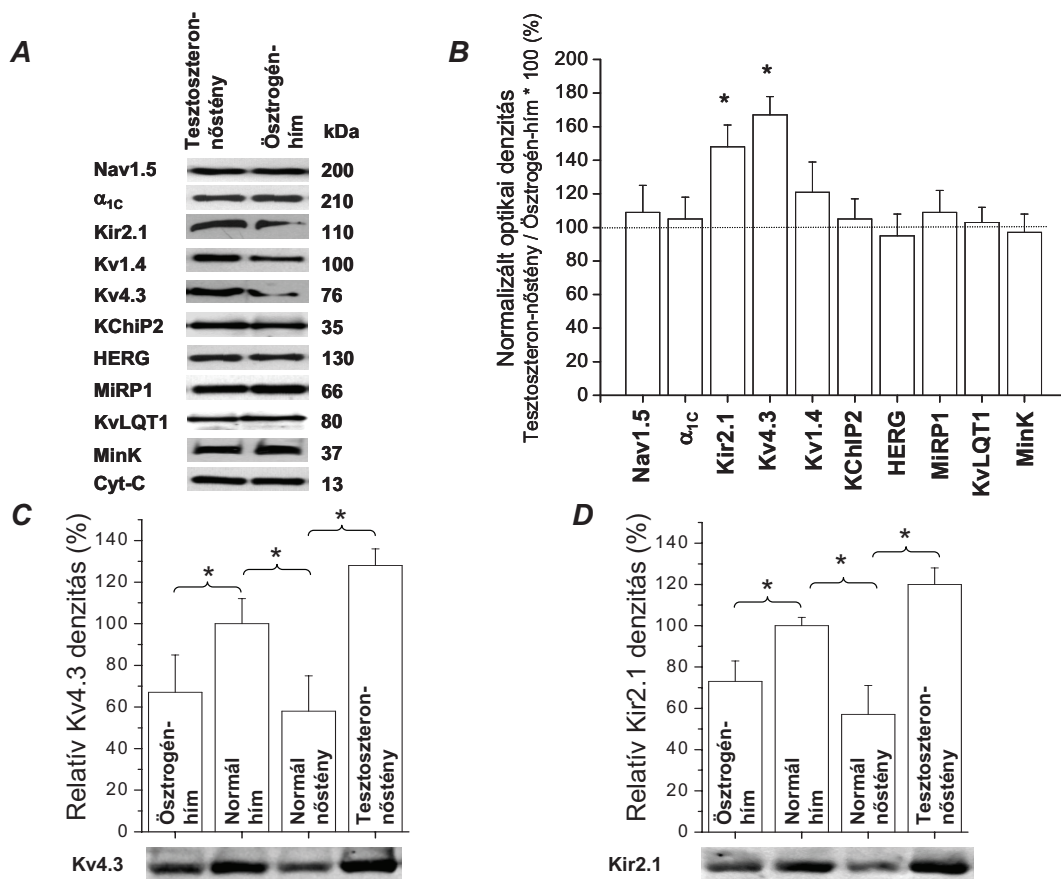
kasztrált hím kutyák 1 hónapig tartó ösztrogén kezelése tovább növelte a QT- és QTc-intervallum hosszát, de ez a növekedés a kasztrált állatok értékeihez képest már nem bizonyult szignifikánsnak. Nőstény kutyákban az ovariectomia nem okozott szignifikáns változást a QT- és QTc-intervallumban. A tesztoszteron egy hónapon át történő adagolása szignifikánsan lerövidítette a repolarizáció időtartamát, amint azt a QT- és QTc-intervallumok időtartamának csökkenése jelzi. Orchiectomia szignifikánsan megnövelte a QT- és QTc-diszperziót is, amit az ösztrogén adása tovább növelt (13. ábra C és D panel). A QT- és QTc-intervallumokhoz hasonlóan, nőstény kutyákban ovariectomiával nem sikerült a diszperzió mértékét megváltoztatni, de a tesztoszteron kezelés lecsökkentette a QT- és QTc-diszperziót a kasztrált nőstény állatokban. A QT- és QTc-diszperziók alap értékei kontroll körülmények között szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabbak voltak a kezeletlen nőstényekben ($20,8 \pm 2,3$ és $27,8 \pm 3,1$ ms), mint a kezeletlen hímekben ($15,3 \pm 2,2$ és $20,7 \pm 3,1$ ms).

IV/8. 4. Dofetilide indukált repolarizáció nyújtás

Dofetilide adása ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ 2 perc alatt i. v.) mindkét nemből, - függetlenül az aktuális hormonszintektől - percenként 20-30 ütéssel csökkentette le a szívfrekvenciát. Ez a bradikardia mindig együtt járt a QT-és QTc-intervallumok nagymértékű megnyúlásával (14. ábra). A hím állatok kasztrálása szignifikánsan felerősítette ezt a nyújtó hatást, ugyanakkor tesztoszteron adása a kasztrált nőstény kutyáknak szignifikánsan lecsökkentette a Dofetilide indukált QT- és QTc-időtartam megnyúlását. Az ösztrogénszint megváltozása sem a nőstény állatok kasztrálása, sem a kasztrált hím kutyák ösztrogénkezelése esetében nem befolyásolta a Dofetilide repolarizáció-nyújtó, bradikardizáló hatását.

IV/9. Nemi hormonok hatása az ioncsatorna proteinek expressziós mintázatára

Ioncsatornát alkotó proteinek (α -alegységek) és a másodlagos, szabályozó alegységek expressziós szintjeit először a tesztoszteron-kezelt ovariectomizált nőstény állatokban és az ösztrogén-kezelt orchietomizált hímekben határoztuk meg, és hasonlítottunk össze. Amint az a 15. ábra B részén látható a vizsgált ioncsatorna-fehérjék nagy többségének expressziója nem különbözött szignifikánsan a két vizsgált csoportban: a Nav1.5 (gyors Na^+ -áram), az α_{1C} ($\text{I}_{\text{Ca,L}}$), HERG, MiRP1 (I_{Kr}), KvLQT1 és MinK (I_{Ks}) denzitása közel azonos volt mindkét csoportban. Ezzel szemben szignifikáns különbségeket találtunk az I_{K1} és az I_{to} áram létrehozásáért felelős Kir2.1 (I_{K1} csatorna pórusformáló alegysége) és a Kv4.3 (az I_{to} csatorna egyik pórusformáló alegysége) fehérjék expressziójában, mindkét fehérje szignifikánsan nagyobb denzitást mutatott a tesztoszteron-kezelt kasztrált nőstényekben, mint az ösztrogén-kezelt kasztrált hímekben. A Kv1.4 (az I_{to} másik részért felelős csatorna pórusformáló alegysége) expressziós szintje szintén magasabb volt a tesztoszteronnal kezelt, kasztrált nőstény csoportban, ez az emelkedés azonban elmaradt a szignifikáns mértéktől. Érdekes módon a KChIP2 szintje, ami a legfontosabb regulatórikus alegysége a tranziens kifelé egyenirányító K^+ -csatornának (I_{to}), nem mutatott különbséget a két vizsgált csoportban.



15. ábra. Ioncsatornák fehérje-alegységeinek expressziós mintázata kasztrált állatokban inverz hormonszubsztitúciót követően. (A) Reprezentatív Western blot eredmények. Hogy minden esetben egyforma töltést érjünk el, a nitrocellulóz membránt leemésztettük, és újrafestettük egér Citokró-m-C ellenes antitesttel (Cyt-C). (B) A tesztoszteron-kezelt ovariectomizált nőstényekben és ösztrogén-kezelt orchiectomizált hímekben Western blottal meghatároztuk a csatornafehérje-denztásokat (α -alegységek és járulékos proteinek), majd a tesztoszteron-kezelt nőstények értékeit normalizáltuk az ösztrogén-kezelt hímek értékeire, és százalékban fejeztük ki. Az oszlopok az átlagokat és a standard hibát jelölik. A (*) szignifikáns különbséget jelenti a 100%-tól, amit a szaggatott vonal jelöl. (C, D) Kv4.3 és Kir2.1 protein relatív denztások összehasonlítva a normál (nem kezelt) hím és nőstény, és a tesztoszteron-kezelt ovariectomizált nőstény és ösztrogén-kezelt orchiectomizált hím kutyákkal. Itt, a normál hím csoport átlagos optikai denzitása önkényesen lett 100%-nak megállapítva. A (*) a csoportok közötti szignifikáns különbségeket mutatja.

A vizsgálatok további részében a Kv4.3 és a Kir2.1 relatív optikai denztásait megvizsgáltuk négy különböző csoportban: kontroll (nem kezelt) hím és nőstény kutyák, tesztoszteron-kezelt ovariectomizált nőstények és ösztrogén-kezelt orchiectomizált hím kutyák (15. ábra C és D). Mind a Kir2.1, mind a Kv4.3 proteinek expressziós szintjei szignifikánsan magasabbak voltak a tesztoszteron-kezelt kasztrált

nőstényekben és normál hímekben, mint a tesztoszteronnal nem rendelkező csoportokban. Más szóval egyedül a tesztoszteron hatása volt a döntő, függetlenül az állat aktuális nemétől vagy az ösztrogén jelenlététől illetve hiányától.

V. DISZKUSSZIÓ

Annak ellenére, hogy számos tanulmány foglalkozik az emlős szívizom regionális és transzmurális heterogenitásával, mai tudásunk ezen a területen (különösen a humán szívizomra vonatkozóan) korántsem nevezhető teljesnek. Adódik ez részben a szisztematikus, átfogó elemzések hiányából (a legtöbb közlemény egy adott, markánsan megfigyelhető különbség vizsgálatára szorítkozik), másrészt pedig az egészséges humán szívizomminták hozzáférhetőségének nehézségeiből. Ezen utóbbi hiányában nagyon fontos, hogy megfelelő modellt találjunk a vizsgálatokhoz, hiszen az orvosbiológiai kutatások végső célja mégiscsak az ember. Ez a tanulmány az első szisztematikus összehasonlító elemzés az egészséges humán szívizom ioncsatorna-fehérjéinek regionális eloszlásáról, összehasonlítva az azonos körülmények között vizsgált kutya szívizomminták eredményeivel. Ezeknek az expressziós mintázatoknak a kutya miokardium elektrofiziológiai sajátágaival történő összevetése választ adhat arra a kérdésre, hogy mennyiben járul hozzá egy-egy csatornaegység expressziójának inhomogenitása az ionáramok és az akciós potenciál szívizmon belüli, illetve egyedek közötti variabilitáshoz.

V/1. A szívizom regionális különbségei

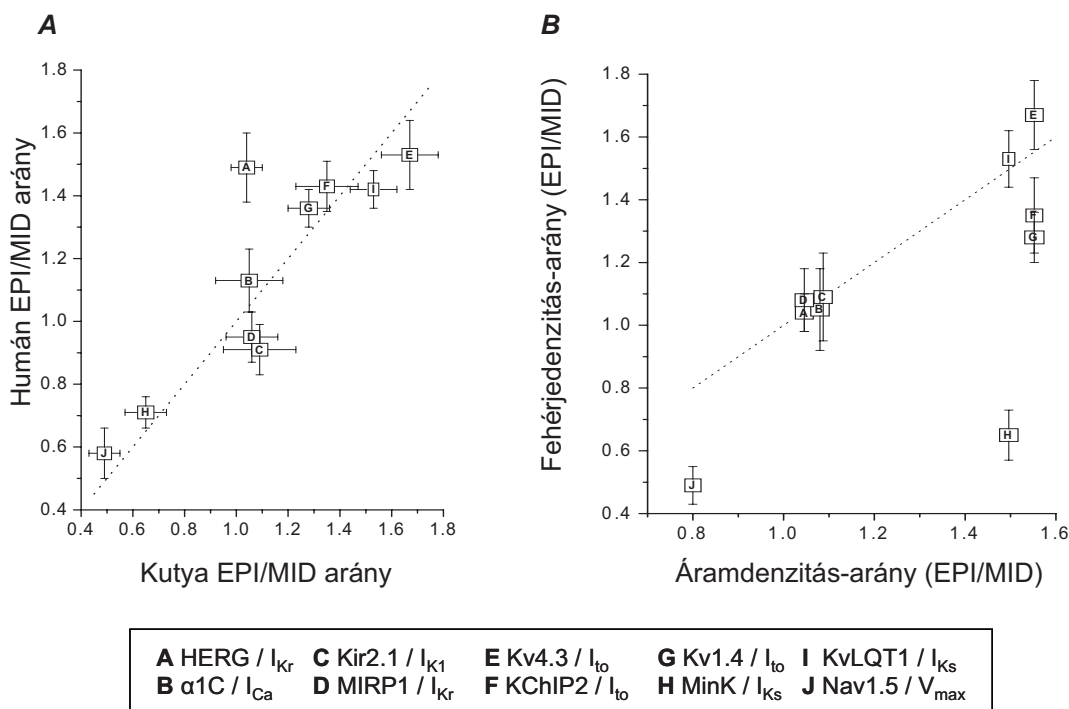
V/1. 1. EPI/MID asszimetria

Szerzőtársaimmal elsőként írtuk le a markáns epikardiális-midmiokardiális inhomogenitás jelenlétét az ionáramban és ioncsatorna-expresszióban kutya és humán miokardium esetében. Az I_{to} és az I_{Ks} áram denzitása nagyobb volt az EPI rétegekben, mint a midmiokardiumban (kb. 55 és 50%-al), miközben nem találtunk különbséget az I_{Kr} és az I_{K1} áram eloszlásában. A mi eredményeinkkel ellentétben Liu és mtsai. nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a kutya szívizom egyes rétegeinek I_{to} amplitúdója között (1,15 EPI/MID arány) [75]. Az eltérő adatok oka az is lehet, hogy az epikardiális réteget a szívizom felületén kb. 3 mm vastagnak tartják, a mi kísérleti technikánk pedig lehetővé tette, hogy 0,5 mm-es szubepikardiális szeletekből sejteket izoláljunk. Liu és mtsai. közleményében nincs adat arra vonatkozóan, hogy milyen

vastagságú szeletekből dolgoztak, mi azonban nem több mint, 30-40 sejtsorból tudtunk sejteket izolálni, így sikerült kimutatni az EPI/MID I_{to} gradienst. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy valószínűleg sokkal élesebb az I_{to} transzmurális gradiens, mint azt korábban feltételezték volna. Ami az I_{Ks} -t illeti, eredményeink hasonlóak a más laboratóriumok által publikált adatokhoz, tehát magasabb az epikardium I_{Ks} denzitása [46, 73]. Az I_{to} és az I_{Ks} magasabb EPI/MID arányai rövidebb, és kifejezettebb „spike-and-dome” konfigurációjú akciós potenciálokat eredményezhetnek az epikardium sejtjein (3.ábra), ugyanakkor kérdés, hogy az akciós potenciál időtartamában tapasztalt változások a szívizom rétegein belül megmagyarázhatók-e kizárólag az I_{to} és az I_{Ks} asszimmetrikus eloszlásával. Valószínűleg nem. A nátriumcsatorna-fehérje (Nav1.5) denzitása csak 49% volt az epikardiális sejteken, a midmiokardiumban mérthez képest. Mivel az I_{to} gyors inaktivációs kinetikája és az I_{Ks} nagyon lassú aktivációs időállandói [123, 128] csökkenthetik ezen áramok szerepét a repolarizációban, valószínűnek tűnik, hogy a kifejezettebb Na^+ -áram (amit a nagyobb Nav1.5 denzitás, a nagyobb V_{max} és AP amplitúdó jelez) azon komponense, amely a plató fázis alatt is aktív (nem inaktiválódó, úgynevezett háttér Na^+ -áram), lehet felelős a midmiokardiumban az ott tapasztalható hosszabb akciós potenciálokért.

Más tanulmányokhoz hasonlóan [46, 73] mi sem tapasztaltunk EPI/MID különbségeket az I_{Kr} áram amplitúdójában, amikor a megszokott, alacsony stimuláló ciklushosszt (20 s) használtuk. Ugyanakkor az áram deaktivációs kinetikája lassabb volt a midmiokardiumban, ami arra utal, hogy fiziológiás szívfrekvencián az I_{Kr} erősebb lehet ebben a rétegben. Ha az I_{Kr} áram nem tud teljes mértékben deaktiválódni akkor a csatornapopuláció egy része még nyitott állapotban van, amikor a következő ingerület megérkezik. Így az áramnak egy része akkumulálódik és erősebb repolarizációt hoz létre. Ez hozzájárulhat a 3. osztályú antiarritmiás szerek midmiokardiális rétegben tapasztalt jelentősebb AP nyújtó hatásához [104, 111].

A 16. ábra A részén a Western blottal meghatározott EPI/MID csatornafehérje denzitások és a hozzájuk tartozó feszültség-clamppel mért ionáramok közötti összefüggés látható a kutya szívizomban. Az összes I_{to} -ért felelős csatorna protein (Kv4.3, Kv1.4 és KchIP2) expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt az epikardiális rétegben, mint a midmiokardiálisban – ez jól egyezik az elektrofiziológiai mérések eredményeivel. Ezek közül az I_{to} fehérjék közül a Kv4.3 denzitása volt a legjobban arányban az I_{to} csúcserősségeivel. Első pillantásra ez nem meglepő, hiszen a



16. ábra. (A) Összefüggés a Western blottal meghatározott EPI/MID csatornafehérje denzitások és a hozzájuk tartozó feszültség clamp mért ionáramok amplitúdói között. [A Nav 1.5 az akciós potenciál maximális deolarizációs meredekségének (V_{max}) a függvényében lett ábrázolva]. (B) A humán és a kutya miokardium EPI/MID fehérje rációk közötti összefüggés. A szaggatott vonal meredeksége 1.

Kv4.3 a fő pórusalkotó proteinje az I_{to} csatornának, mind kutyaiban, mind a humán miokardiumban [3, 37]. Ugyanakkor érdemes megemlíteni, hogy Rosati és mtsai. csak kis mértékű Kv4.3 mRNS expressziós különbséget láttak az epikardium és a midmiokardium között kutya kardiális izomszövetében, és a nagy transzmurális I_{to} gradiens jobban korrelált a KChIP2 mRNS szintjével [99]. Ennek az ellentmondásnak az lehet az oka, hogy az mRNS-szintek és a fehérjeexpresszió nem mindig identikusak egymással.

Az elektrofiziológiai mérések során megállapított I_{Ks} EPI/MID asszimmetria nagyon jó korrelációt mutatott a pórusformáló alegység KvLQT1 EPI/MID eloszlásával, mivel a KvLQT1 protein denzitása és az I_{Ks} farokáram amplitúdója egyformán 50%-al nagyobb volt az epikardiumban, mint a midmiokardiális rétegben. Ezzel szemben, fordított EPI/MID eloszlást találtunk a regulatórikus alegység MinK esetén (a MinK denzitása az epikardiális rétegben csak 65% és 71%-a volt a midmiokardiális rétegben észleltekénél, kutya és humán miokardiumban). Más szóval az egyenlőtlen I_{Ks} eloszlás az EPI/MID rétegek között egyedül az asszimmetrikus

KvLQT1 fehérjének tulajdonítható, és független a regulatórikus, MinK alegységtől. Ez egyezik a transzmurális MinK mRNS expresszió asszimetria hiányával, amit Péreón és mtsai. humán kardiomiopátiás szövetmintákban találtak [88]. A MinK azonban nem csak a KvLQT1-el hanem más α -alegységekkel is előszeretettel társul, tehát ez a téma további vizsgálatokat igényel.

A Na^+ -áram a kutya szívizomzat midmiokardiális rétegében a legkifejezettebb, és így meredekebb felszálló szárral rendelkező akciós potenciálokat hoz létre, mint akár az epikardiális vagy az endokardiális rétegben [10, 39, 109, 143]. A mi vizsgálatunkban 49%-os EPI/MID arányt találtunk a Nav1.5 fehérje denzitásban, ami közel van a kutya szívmájában Zygmunt és mtsai. által feszültség-clamp körülmények között mért 59%-os Na^+ -áram arányhoz [143]. Amint az a 16. ábra A paneljén látható a Nav1.5 fehérjére vonatkoztatott 49%-os EPI/MID arány elég messze van a $V_{\max}$ 79%-os arányától. Annak ellenére, hogy a $V_{\max}$ -ot gyakran használják a publikációkban a Na^+ -konduktancia vagy a I_{Na} karakterizálására, a $V_{\max}$ és a Na^+ -áram nem lineárisan aránylik egymáshoz [85, 102]. Ennek a nonlinearitásnak a mértéke vita tárgyát képezi, de pl. 50%-os Na^+ -konduktancia csökkenés csak közel 20%-os $V_{\max}$ csökkenést fog okozni [85], ami egybevág a mi eredményeinkkel.

V/1. 2. APEX/BASE inhomogenitás

Kísérleteinkben leírtuk a markáns ionáram és ioncsatorna-expresszió inhomogenitást a kutya és a humán szívizom apikális és bazális részein. A emlős akciós potenciál repolarizációjáért legnagyobb mértékben felelős I_{to} és I_{Ks} áram denzitásait közel kétszer nagyobbak találtuk a szív csúcsi részén, mint a bázison, ami magyarázatot ad a rövidebb apikális akciós potenciálokra.

Az I_{to} áram létrehozásáért felelős csatornafehérjék közül a Kv1.4 és a KChIP2 protein expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a bazális területeken, mint a csúcson. Ez az eredmény egybevág az I_{to} apikális dominanciájával; ugyanakkor ne felejtsük el, hogy a Kv4.3 a fő pórusformáló I_{to} csatorna alegység mind kutya mind a humán kamrai szívizomban [3, 37]. Tehát a Kv4.3 expressziójában tapasztalt kis mértékű apiko-bazális inhomogenitás nem magyarázza az áramdenzitás jelentős különbségeit a szívizom különböző területei között. Mivel a szabályozó KChIP2 alegységről ismert, hogy mind a kutya, mind a humán szívizomban társul a Kv4.3

alegységgel, és a két alegység közös expressziója megnöveli az I_{to} amplitúdóját [33, 34], feltételezhetjük, hogy a KChIP2 fehérje magasabb apikális expressziója felelős az erősebb csúcsi I_{to} -ért. Erre a következtetésre jutottak Rosati és mtsai. is, amikor a már fentebb említett epi-endokardiális transzmurális differenciákat vizsgálták [99]. Tehát inkább a KChIP2 expressziója okozza az I_{to} amplitúdóbeli különbségeket és nem a Kv4.3. Egy másik közvetett bizonyítékot szolgáltat erre Yu és munkacsoportja amikor leírják, hogy az angiotenzin II és losartan megváltoztatta az I_{to} amplitúdóját és kinetikai paramétereit anélkül hogy a Kv4.3 vagy a Kv1.4 alegységek relatív expresszióját érdemben megváltoztatná [141]. Habár az I_{to} inaktivációból való visszatérését nem vizsgáltuk, a Kv1.4 alegység (mivel az alegység ismert módon megváltoztatja a csatorna aktivációs kinetikáját) csökkent bazális expressziója felgyorsult áram-reaktivációt feltételez.

Az elektrofiziológiai módszerekkel meghatározott apiko-bazális I_{Ks} asszimetriát alátámasztják a humán és kutya mintákon végzett Western blot eredmények, ugyanis mind a KvLQT1, mind a MinK (az I_{Ks} -t létrehozó csatorna fehérjék) szintje szignifikánsan magasabb volt az apikális területeken, mint a bazálisokon. Az áram lassú aktivációs kinetikája miatt az I_{Ks} repolarizációban való szerepét az utóbbi időben többen megkérdőjelezték [123, 128], mások megerősítették [84]. Az I_{Ks} aktivációja 44%-al gyorsabb volt a csúcsi területeken, mint a bázison, ami arra utal, hogy ezen áram aktivációja felgyorsíthatja a repolarizációt, vagy legalábbis jobban erősítheti a repolarizációs rezervet az apikális szívműködősejtekben.

Annak ellenére, hogy sem az I_{Kr} áramdenzitásokban, sem a HERG és a MiRP1 proteinek expressziójában nem találtunk szignifikáns apiko-bazális különbséget, az I_{Kr} aktivációja lassabb volt a csúcsi területeken, mint a bázison. Ezt a relatív nyújtó hatást az apikális sejtekben azonban úgy tűnik kompenzálja az I_{Ks} és az I_{to} erőteljesebb AP rövidítő hatása.

V/1. 3. Jelentőség és a vizsgálatok korlátai

Egészséges humán szívműködőre vonatkozó releváns elektrofiziológiai adatok hiányában egyedül a Western blot eredményeket tudjuk összehasonlítani a kutya kapott eredményekkel. A kutya és humán mintákban kapott epikardiális/midmiokardiális fehérje arányok közötti összefüggés látható a 16. ábra B

részen. Általánosságban elmondható, hogy az EPI/MID inhomogenitás nagyon hasonló volt a két fajban, kivételt csak a HERG protein eloszlása képez. Kutyaiban nem találtunk eltérést a két miokardiális rétegben a HERG csatorna eloszlását illetően, míg a humán mintákban az EPI/MID arány 1,49 volt. A különbség okára magyarázatot adni nem tudunk, humán mintákon végzett elektrofiziológiai mérésekre lenne szükség, hogy felfedjük ennek az okát. Az apiko-bazális asszimetriát illetően is nagyon hasonló a kutya és a humán miokardium, habár kvantitatív különbségeket fedezhetünk fel a KChIP2, a MinK és a Kv1.4 fehérjék expressziós szintjeiben.

Vizsgálatainknak két különböző típusú lehetséges korlátját említeném meg. Először is, amikor adott ioncsatornán folyó áramokat mérünk kutya szívműködéseken, az alkalmazott gátlók (pl. 5 μ M Nifedipine vagy 3 mM 4-aminopiridin) nem biztos, hogy teljes mértékben gátolják a többi, nem a vizsgált csatornán folyó (pl. a I_{Cl} , $I_{K,ATP}$) áramot. Mivel azonban az így fennmaradó „szennyező” áramok az összes vizsgált szívműködési csoportban jelen vannak és ha feltételezzük hogy regionális különbségeket nem mutatnak, a vizsgált apiko/bazális és EPI/MID különbségeket nem feltétlenül torzíthatja el az inkomplett ionáram gátlás. Másodszorban a kamrai repolarizációban részt vevő ioncsatorna több alegységből áll, mint amit jelen munkában meg tudunk vizsgálni, mert a piacon nem érhető el az összes alegység elleni antitest. Ráadásul némely K^+ -csatorna szabályozó alegységről (mint pl. a MIRP1 vagy a MinK) az utóbbi időben írták le, hogy különböző α -alegységekkel is kombinálódhatnak. Ezek eltorzíthatják eredményeinket, így azokat megfelelő óvatossággal kell kezelni.

Eredményeink alapján a kutya szívműködése megfelelő modell lehet a humán szív elektromos inhomogenitásának tanulmányozására, de csak korlátozottan. Ugyanakkor az irodalomban található nagy fajok közötti különbségeket figyelembe véve, amelyek az apiko/bazális és az epikardiális/midmiokardiális grádiensekre vonatkoznak a kutya kamrai miokardium, a fennálló kvantitatív különbségek ellenére még mindig a humánhoz leginkább hasonlító modellnek számít. A tanulmányban bemutatott repolarizációs inhomogenitás a patológiás esetben megnövekedett elektromos diszperzió miatt a szívritmuszavarok fokozott előfordulásához vezethet, vagy az antiaritmiás szerek hatásának módosulását okozhatja [13, 26]. Jelen eredmények nagyban hozzájárulhatnak alapvető ismereteink bővítéséhez a szívritmuszavarok kialakulásának mechanizmusáról, és segíthetnek hatékonyabb és ésszerűbb antiaritmiás terápiák kifejlesztésében.

V/2. Nemi hormonok és kardiális ioncsatornák

Vizsgálataink során megvizsgáltuk a legfontosabb emlős nemi hormonok, a tesztoszteron és az ösztrogén hatásait az emlős kamrai szívízom elektrofiziológiai paramétereire és ioncsatorna eloszlására. A két hormonnak azonos hatása volt a szívfrekvenciára és a pitvar-kamrai vezetési időre. Mind a szívfrekvencia, mind az atrioventrikuláris csomó vezetési sebessége emelkedett az ösztrogén és tesztoszteron kezelés hatására, míg a szexuálszteroidok hiányának (kasztráció) ellentétes hatása volt. Izgalmas eredmény lenne, ha kiderülne, hogy mindkét hormonnak azonos, közvetlen hatása van mind a szinusz-, mind az AV-csomóra, ugyanakkor az autonóm idegrendszer nemihormon-függő változásait sem lehet kizárni, így ezek a hormonok közvetett módon is befolyásolhatják az ingerképző szövetek elektromos aktivitását.

Vizsgálataink legérdekesebb eredménye annak kimutatása, hogy a kutya kamrai izomszövet – az ingerképző szövettel ellentétben – máshogy reagál a tesztoszteronra, mint az ösztrogénre: a tesztoszteron felgyorsította a kamrai repolarizációt, lecsökkentette a Dofetilide-indukált repolarizáció nyúlást, és mindkét nemben lecsökkentette a szívízom elektromos diszperzióját, miközben az ösztrogénnek nem volt hatása ezekre a paraméterekre. Eredményeink jó összhangban vannak a humán EKG tanulmányokkal [17, 95], ami újfent arra utal, hogy a kutya modell alkalmas a nemi hormonok szívre gyakorolt hatásának vizsgálatára, továbbá humán szívízomra is releváns következtetéseket vonhatunk le az eredményekből.

Mivel sem a nőstény kutyák kasztrálása, sem a kasztrált hím kutyák ösztrogén kezelése nem okozott szignifikáns változást a kamrai repolarizáció sebességében, feltételezhető, hogy az inverz hormonszubsztituált kutyák ioncsatorna-expressziójában tapasztalt különbségeket kizárólag a tesztoszteron jelenléte vagy hiánya okozta. Ezt a következtetésünket az a kísérlet is alátámasztja, amelynek eredményeit a 15. ábra C és D részén mutattam be, amikor a Kv4.3 és a Kir2.1 csatornaféhrjék expresszióját nemcsak a kasztrált és inverz hormonkezelt állatok csoportjai között, hanem kezeletlen kutyák csoportjaiban is összehasonlítottuk. A kezeletlen kutyák összehasonlítása megmutatta ezen csatorna alegységek magasabb expressziós szintjét a kontroll hím állatokban a normál nőstényekhez képest. Ez az eredmény nehezen egyeztethető össze a kontroll körülmények között regisztrált QT- és QTc-intervallumokkal, amelyek gyakorlatilag megegyeztek a kontroll állapotban.

Ugyanakkor az feltételezhető, hogy a nemek közötti különbségek más, olyan általunk nem vizsgált csatorna alegységeket is érinthetnek, amelyek kompenzálhatják a hím állatokban talált magasabb K^+ -csatorna sűrűséget. Ennek eldöntésére további tanulmányok szükségesek.

Amint azt fentebb is említettük, a tesztoszteron kezelés fokozta két K^+ -csatornafehérje ($K_{ir2.1}$ és $K_{v4.3}$) kifejeződését, amelyek az I_{K1} és az I_{to} áram kialakításáért felelősek. Az I_{K1} felelős az AP terminális repolarizációjáért, így az AP hosszának szabályozásában kiemelt szerepe van, tehát amplitúdójának megnövekedése szerepet játszhat a tesztoszteron által létrehozott QT- és QTc-intervallumok lerövidülésében. Habár az I_{to} kutya kamrai szívműködés repolarizációjában betöltött szerepét megkérdőjelezzük [116], mindkét áram hozzájárul a repolarizációs rezerv kialakításához [96]. Így tehát meglepő módon az I_{K1} és az I_{to} megnövekedett expressziója szerepet játszik a tesztoszteronnal kezelt szívműködés csökkent Dofetilide-érzékenységében – annak ellenére, hogy az I_{K1} áramot létrehozó HERG csatornafehérjék (amelyet a Dofetilide gátol) sűrűsége nem változik. Mindezek ellenére a többi, általunk nem vizsgált K^+ -csatorna alegység (pl. a $K_{v3.4}$ vagy a $K_{v1.7}$) szerepét sem lehet kizárni. A két kasztrált, majd inverz hormonkezelt csoportban nem találtunk denzitásbeli különbséget a $Nav1.5$ csatorna (mely a gyors feszültségfüggő Na^+ -áram létrehozásáért felelős) expressziós szintjében, ami egybevághat azzal az eredményünkkel, hogy az intraventrikuláris vezetési sebesség nem függ a gonádális hormonszintektől.

Érdemes megemlíteni, hogy a tesztoszteron kezelés által indukált $K_{v4.3}$ csatorna fokozott expresszióját nem követte a $KChIP2$ fehérje expressziójának az emelkedése, amely pedig az I_{to} legfontosabb szabályozó alegysége. Ha a tesztoszteron szelektíven tudja fokozni a $K_{v4.3}$ szintjét, akkor az is feltételezhető, hogy a tesztoszteron hiánya a csatornafehérje downregulációjához vezet. Mivel a $K_{v4.3}$ szelektív downregulációját [56, 142] és alacsony tesztoszteronszinteket [60, 87] egyaránt megfigyelték kutya és humán szívelégtelenségben, egyenesen következtethetünk arra, hogy a szívelégtelen betegekben a $K_{v4.3}$ csatorna downregulációját a csökkent tesztoszteron koncentráció okozhatja.

A szexuáliszteroidok kamrai repolarizációra és az azt létrehozó ioncsatornák expressziójára gyakorolt hatása nagymértékű fajfüggőséget mutat. Például patkányban a nemi hormonoknak nincs hatása sem az akciós potenciál alakjára, sem az ionáramokra (I_{K1} , I_{to} és I_{Ca}) [65], ugyanakkor hím egér kasztrációja (tesztoszteronszint

csökkenése) az akciós potenciál megnyúlását és a repolarizációs rezerv lecsökkenését okozta. Liu és mtsai. hasonló kísérletet hajtottak végre nyúlra, mint mi: két hétig tesztoszteronnal kezelték a kasztrált állatokat, ezek után a tesztoszteron hatására akciós potenciál rövidülést tapasztaltak, és a kinidin-indukált akciós potenciál nyúlás lecsökkent [76]. Ugyanakkor a tesztoszteron hatásmechanizmusa különbözik a két fajban, a nyúl szívműködésében az I_{Kr} és az I_{K1} felerősödése volt tapasztalható, miközben kutyában mi az I_{to} és az I_{K1} megnövekedését találtuk. Ellentmondásos adatokat találunk az irodalomban a nemi hormonok egyéb hatásairól is a nyúl szívműködésében. Az ösztrogén és a tesztoszteron is képes volt különböző K^+ -csatornafélek $mRNS$ -szintjét lecsökkenteni ovariectomizált nőstény nyulakban [38], ami arra utal, hogy mindkét hormon erősen befolyásolja a nyúl kamrai szívműködésének elektromos aktivitását [49]. A nemi hormonok hatásán kívül a genotípusos nem is befolyásolta a kamrai repolarizációt ebben a fajban [91]. Ezekből az adatokból arra a következtetésre juthatunk, hogy több emlős faj (köztük a kutya, a nyúl és az egér) szívműködésében a tesztoszteron megnövelhet bizonyos K^+ -áramokat, ami a repolarizációs rezerv növekedését vonja maga után, amit Dofetiliddel végzett kísérleteinkben ki is mutattunk. A repolarizációs rezerv megnövekedése jelentős védelmet biztosíthat bizonyos torsade de pointes aritmiára hajlamosító K^+ -csatorna blokkoló gyógyszerek hatásaival szemben.

V/2. 1. Jelentőség és az EKG vizsgálatok korlátai

Mivel nincs releváns információ arra vonatkozóan, hogyan hat az ösztrogén és a tesztoszteron az egészséges humán szívműködés ioncsatornáin, a mi Western blot eredményeinket nem tudjuk közvetlenül összehasonlítani humán adatokkal. A kutya és a humán szívműködés celluláris elektrofiziológiai hasonlóságai, és a humán EKG adatokkal való jó egyezés alapján azonban nagy biztonsággal kijelenthetjük, hogy a kutya jó modell a nemi hormonok hatásának tanulmányozására. Ugyanakkor ennek a modellnek is vannak korlátai. A legszembetűnőbb különbség a kutya és az ember nemi működése között az az emberben tapasztalható 28 napos menstruációs ciklus a kutya anösztruszához képest [125], amikor a nőstény állatokban gyakran az ECLIA kit detekciós határánál ($18,4 \text{ pmol l}^{-1}$) alacsonyabb ösztrogén szinteket találunk. Tehát a kezeletlen kutyák nem reprezentálják tökéletesen az emberben nemtől függően

kialakuló különbségeket, mégis – főleg kasztráció után – a kutya modell adja a legjobb megközelítést a szexuálszteroidok hatásmechanizmusának vizsgálatához.

V/3. Konklúzió

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy az emlős szívizmon belüli, illetve ugyanazon faj egyedei közötti elektrofiziológiai inhomogenitás magyarázható-e az ioncsatornák expressziójában megfigyelhető különbségekkel. A szívizmon belüli inhomogenitás vizsgálatakor a tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to}) és a késői típusú káliumáram lassú komponense (I_{Ks}) jó korrelációt mutatott az áramokat létrehozó ioncsatorna-proteinek expressziójával. Elektrofiziológiai módszerekkel nem találtunk különbséget a szívizom különböző területei között az L-típusú kalciumáram (I_{Ca}), a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) és a késői típusú káliumáram gyors komponensének (I_{Kr}) paramétereiben, amely adatok jól korrelálnak az ioncsatorna expressziós szintekkel, ahol szintén nem találtunk különbséget a szívizom egyes területei között. A nemek közötti inhomogenitás vizsgálatakor a talált repolarizációs különbségek jól korreláltak az I_{to} és I_{K1} ioncsatorna-fehérjék változásaival, és visszavezethetők a tesztoszteron hatásaira.

Az emlős szívizomszövet nem homogén, mint azt korábban feltételezték. Valójában sok eltérést tudunk felfedezni az akciós potenciál morfológiájában, az ionáramok amplitúdóiban, kinetikai sajátságaiban és az ioncsatorna-fehérjék eloszlásában mind a szívizom rétegein belül, mind a szívizom különböző területei között és különböző nemű egyedek között is. A különbségek élettani jelentősége egyrészt az EKG-regisztrátum repolarizációs hullámainak létrehozása, aminek nagy diagnosztikai jelentősége van. Az inhomogenitás lehetséges patológiás következménye a farmakológiai behatásokra adott változatos válasz, amelyek pl. az antiarritmiás szerek esetében proarritmiás hatást eredményezhetnek. Érthető tehát, hogy minél többet tudunk a szívizom inhomogenitásáról, annál hatékonyabb és biztonságosabb gyógyszeres beavatkozásokat tudunk tervezni és alkalmazni a szívbetegségben szenvedő betegeknél.

ÖSSZEFOGLALÁS

Célunk az egyes ionáramok, és az azokért felelős csatornafehérjék eloszlásának vizsgálata volt kutya és humán kamrai szívizom epikardiális (EPI) és midmiokardiális (MID) rétegeiben, illetve az apikális (APEX) és bazális (BASE) régiókban. Összehasonlítottuk a kutya és humán sejteken elektrofiziológiai és immunhisztokémiai módszerekkel kapott eredményeket. Ezen kívül a tesztoszteron és ösztrogén hatását vizsgáltuk az EKG paraméterekre és a szívizom ioncsatorna expressziójára hím és nőstény kutyákban.

Vizsgálatainkhoz konvencionális mikroelektrodatechnikát, egészejt patch-clamp és Western blot módszert használtunk. Az EKG vizsgálatokat altatott hím és nőstény kutyákon végeztük kasztráció előtt, után és inverz hormonszubsztitúciót követően.

Eredményeink alapján az akciós potenciál időtartama rövidebb, a korai repolarizáció amplitúdója pedig nagyobb volt az APEX és az EPI eredetű kutya kamrai sejteken, mint a BASE és a MID sejteken. Az akciós potenciál egyéb paramétereiben ill. a sejtek kapacitásában nem volt szignifikáns különbség.

Feszültség-clamp körülmények között vizsgálva a tranziens kifelé irányuló K^+ -áram (I_{to}) és a késői egyenirányító K^+ -áram lassú komponensének (I_{Ks}) amplitúdója APEX és EPI sejteken közel kétszer nagyobbak adódott, mint a BASE és MID sejteken. Nem találtunk viszont szignifikáns különbségeket a többi vizsgált ionáram (I_{Kr} , I_{K1} , I_{Ca}) amplitúdójában és kinetikai paramétereiben. Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei – az ionárammérések adataival teljes összhangban – csak az I_{to} és I_{Ks} áramokért felelős csatornafehérjék esetében mutattak intenzívebb apikális expressziót: a Kv1.4, KChIP2, KvLQT1 és MinK alegységek denzitása apikálisan nagyobbak bizonyult, mint bazálisan. Az EPI minták esetében a Kv4.3, a Kv1.4, a KChIP2 és a KvLQT1 proteineknek az expressziója volt magasabb a MID sejtekhez képest. Hasonló ioncsatorna expressziós mintázatot kaptunk a humán szívizom minták esetében is, mint amit kutya mintákban észleltünk, kisebb mennyiségi különbségeket leszámítva.

A nemi különbségek vizsgálatakor a szívfrekvencia csökkent, a pitvar-kamrai átvezetési idők pedig emelkedtek kasztráció hatására mindkét nemben, miközben az inverz hormonszubsztitúció visszaállította az eredeti értékeket. Orchiectomia

szignifikánsan emelte a QT- és QTc-időt és a QTc-diszperziót, miközben a kasztrált nőstények tesztoszteron kezelése ellentétes hatású volt. Az I_{K1} és I_{to} áramokért felelős ioncsatorna-fehérjék (Kir2.1 és Kv4.3) expressziója magasabb volt a normális hím és a tesztoszteron-kezelt kasztrált nőstény egyedekben. A tesztoszteron szignifikánsan befolyásolta, ösztrogén viszont nem hatott a kutya kamrai szívizom repolarizációjára, nemtől függetlenül. Ez a hatás valószínűleg a K^+ -csatornafehérjék expressziójának fokozásán keresztül valósul meg.

A kutya és humán kamrai szívizomban talált regionális és nemi eltérések mind a diszperzió, mind pedig a gyógyszerhatások szempontjából figyelmet érdemelnek. Vizsgálataink alapján a humán szívizom regionális elektromos inhomogenitásának vizsgálatára a kutyaszívből izolált szívizomsejtek a legmegfelelőbbek.

Kulcsszavak:

szívelektrofiziológia, ioncsatorna, ionáram, akciós potenciál, regionális inhomogenitás, elektrokardiogramm, szexuáliszteroid

SUMMARY

The aim of our study was to examine the distribution of ionic currents and the concordant channel proteins in the apical (APEX) and basal (BASE) region and the epicardial (EPI) and midmyocardial (MID) layers of the human and canine ventricular myocardium. We compared the data obtained using human and canine cardiac tissue and opposed the electrophysiological and the immunohistological measurements as well. We also examined the effects of testosterone and estrogen on the ECG parameters and on the expression of cardiac ion channels in male and female dogs.

Conventional microelectrode whole-cell voltage clamp and Western blot technique were used on isolated cardiomyocytes. ECG records were taken from male and female anaesthetized dogs before and after castration, and following inverted hormone substitution.

We found that the duration of the action potential was shorter, the amplitude of the early repolarisation was larger on cells isolated from the APEX and EPI region of the ventricle compared to those of the BASE and MID region. There was no difference on the other parameters of the action potential or on the capacity of the cells.

During voltage-clamp measurements the amplitude of the transient outward potassium current (I_{to}) and the slow component of the delayed rectifier potassium current (I_{Ks}) were approximately twice as large on APEX and EPI cells than on BASE and MID ones. The amplitude and kinetic properties of the other examined ionic currents (I_{Kr} , I_{K1} , I_{Ca}) were similar in cells from all examined origins. The results of the immunohistochemical experiments - consistent with the data of the current measurements - showed more intense apical expression only in the channel proteins of the I_{to} and I_{Ks} : the density of the Kv1.4, KChIP2, KvLQT1 and MinK were higher in apical than in basal samples of canine hearts. During the transmural comparison, only the Kv4.3, Kv1.4, KChIP2 and KvLQT1 proteins had higher expression level in the EPI region than in the MID one. We found similar ion channel protein expression pattern in the human samples than in the canine ones.

During the sexual difference investigation we found that heart rate was decreased and PQ interval increased by castration in both genders, while inverted hormonal substitution restored control values. Orchiectomy significantly increased the

duration of QT and QTc intervals, QTc-dispersion, while testosterone treatment of castrated females had opposite effects. Expression of ion channel proteins responsible for mediation of I_{K1} and I_{to} currents (Kir2.1 and Kv4.3, respectively), was higher in normal males and in the testosterone-treated castrated females. Repolarization of canine ventricular myocardium is significantly modified by testosterone. This effect is likely due to augmentation of expression of K^+ -channel proteins.

The regional and sexual differences found in the canine and human ventricular myocardium are remarkable regarding both dispersion and drug effects. Isolated canine ventricular myocytes are appropriate for the study of the electrical inhomogeneity of the human myocardium.

Keywords:

cardiac electrophysiology, ionchannel, ionic current, action potential, regional inhomogeneity, electrocardiogram, sexual steroid

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki dr. Csernoch László Professzor Úrnak, az Élettani Intézet igazgatójának, aki lehetővé tette számomra a munka elvégzését.

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Bányász Tamásnak áldozatkész segítségét, bátorítását, messzemenő elméleti és gyakorlati tanácsait.

Köszönettel tartozom dr. Nánási Péternek, dr. Magyar Jánosnak, dr. Szentandrassy Norbertnek, dr. Horváth Balázsnak, dr. Harmati Gábornak és dr. Birinyi Péternek a támogatásért és a jó hangulatért, valamint köszönöm dr. Víghné Horváth Katalinnak a technikai segítséget.

Köszönettel tartozom továbbá mindazoknak, akik hozzájárultak az értekezésben bemutatott anyagok elkészítéséhez, névszerint dr. Bíró Tamásnak, Tóth István Balázsnak, dr. Czifra Gabriellának, dr. Fülöp Lászlónak, dr. Lőrincz Istvánnak, dr. Balogh Ádámnak, dr. Pető Katalinnak, dr. Mikó Irénnek, dr. Lázár Józsefnek, dr. Varró Andrásnak és dr. Kovács Lászlónak.

Mindezekén kívül megköszönöm menyasszonyomnak, dr. Ruisanchez Évának a szeretetét, bátorítását, segítségét és a dolgozatom figyelmes átolvasását, nélküle e munka nem készülhetett volna el.

IRODALOMJEGYZÉK

1. **Abi-Gerges N, Small BG, Lawrence CL, Hammond TG, Valentin J-P, Pollard CE.** Evidence for gender differences in electrophysiological properties of canine Purkinje fibres. *Br. J. Pharmacol.* 142, 1255–1264. 2004b.
2. **Aiba T, Shimizu W, Inagaki M, Hidaka I, Tatewaki T, Sunagawa K.** Transmural heterogeneity of the action potential configuration in the feline left ventricle. *Circ. J.*, 67, 449-54, 2003.
3. **Akar FG, Wu RC, Deschenes I, Armondas AA, Piacentino V III, Houser SR, Tomaselli GF.** Phenotypic differences in transient outward K^+ current of human and canine ventricular myocytes insights into molecular composition of ventricular I_{to} . *Am. J. Physiol.* 286, 602-609, 2004.
4. **Anyukhovskiy EP, Sosunov EA, Rosen MR.** Regional differences in electrophysiological properties of epicardium, midmyocardium, and endocardium. In vitro and in vivo correlations. *Circulation.* 94, 1981-8, 1996.
5. **Anyukhovskiy EP, Sosunov EA, Gainullin RZ, Rosen MR.** The controversial M cell. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10, 244-60, 1999.
6. **Antzelevitch C.** Cellular basis and mechanism underlying normal and abnormal myocardial repolarization and arrhythmogenesis. *Ann. Med.* 36, 5-14, 2004.
7. **Antzelevitch C, Shimizu, Yan GX, Sicouri S, Weissenburger J, Nesterenko VV, Burashnikov A, Di Diego J, Saffitz J, Thomas GP.** The M cell: its contribution to the ECG and to normal and abnormal electrical function of the heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10, 1124-52, 1999
8. **Ashamalla SM, Navarro D, Ward CA.** Gradient of sodium current across the left ventricular wall of adult rat hearts. *J. Physiol.* 536, 439-43, 2001,
9. **Ashman R.** The normal duration of the QT interval. *Am. Heart J.* 23, 522–534, 1942.
10. **Baláti B, Varró A, Papp JGy.** Comparison of the cellular electrophysiological characteristics of canine left ventricular epicardium, M cells, endocardium and Purkinje fibers. *Acta Physiol Scand* 164, 181-190, 1998.

11. **Bányász T, Fülöp L, Magyar J, Szentandrassy N, Varró A, Nánási PP.** Endocardial versus epicardial differences in L-type calcium current in canine ventricular myocytes studied by action potential voltage clamp. *Cardiovasc. Res.* 58, 66-75, 2003.
12. **Bányász T, Magyar J, Szentandrassy N, Horváth B, Birinyi P, Szentmiklósi J, Nánási PP.** Action potential clamp fingerprints of K⁺ currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiol.(Oxf.)* 190, 189-98, 2007.
13. **Bauer A, Becker R, Karle C, Schreiner KD, Senges JC, Voss F, Kraft P, Kuebler W, Schoels W.** Effects of the I_{Kr}-blocking agent Dofetilide and of the I_{Ks}-blocking agent chromanol 293b on regional disparity of left ventricular repolarization in the intact canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:460-7, 2002.
14. **Bazett H.** An analysis of time-relations of electrocardiograms. *Heart* 7, 353–370, 1920.
15. **Benton RE, Sale M, Flockhart DA, Woosley RL.** Greater quinidine-induced QTc interval prolongation in women. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 413–418, 2000.
16. **Bers DM.** Cardiac excitation-contraction coupling *Nature*. 10; 415 (6868): 198-205. 2002
17. **Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E, Bertran G, Arini P, Biagetti MO, Quinteiro RA.** Sex differences in the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am. Heart J.* 140, 678–683, 2000.
18. **Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL, Morales MJ, Trimmer JS, Nerbonne JM, Strauss HC.** Distinct transient outward potassium current (I_{to}) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 113, 581, 1999.
19. **Brahmajothi MV, Morales MJ, Reimer KA, Strauss HC.** Regional localization of ERG, the channel protein responsible for the rapid component of the delayed rectifier, K⁺ current in the ferret heart. *Circ. Res.* 81, 128, 1997.
20. **Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM.** Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *J. Physiol.* 559, 103-20, 2004,

21. **Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G.** Regional differences in electrical and mechanical properties of myocytes from guinea-pig hearts with mild left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 35, 315-23, 1997.
22. **Bryant SM, Shipsey SJ, Hart G.** Normal regional distribution of membrane current density in rat left ventricle is altered in catecholamine-induced hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 42, 391-401, 1999.
23. **Bryant SM, Wan XS, Shipsey J, Hart G.** Regional differences in the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc. Res.* 40, 322-31, 1998.
24. **Burashnikov A, Antzelevitch C.** Prominent I_{Ks} in epicardium and endocardium contributes to development of transmural dispersion of repolarization but protects against development of early afterdepolarizations. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 13, 172-7, 2002.
25. **Casis O, Iriarte M, Gallego M, Sanchez-Chapula JA.** Differences in regional distribution of K^+ current densities in rat ventricle. *Life Sci.* 63, 391-400, 1998.
26. **Cheng J, Kamiya K, Liu W, Tsuji Y, Toyama J, Kodama I.** Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K^+ current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilide class III agents. *Cardiovasc Res* 43, 135-47, 1999.
27. **Choi B, Salama G.** Simultaneous maps of optical action potentials and calcium transients in guinea-pig hearts: mechanisms underlying concordant alternans. *J. Physiol.* 529, 171-88, 2000.
28. **Clark RB, Bouchard RA, Salinas-Stefanon E, Sanchez-Chapula J, Giles WR.** Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovasc. Res.* 27, 1795-9, 1993.
29. **Cook SJ, Chamunorwa JP, Lancaster MK, O'Neill SC.** Regional differences in the regulation of intracellular sodium and in action potential configuration in rabbit left ventricle. *Pflugers Arch.* 433, 515-22, 1997.
30. **Cordeiro JM, Greene L, Heilmann C, Antzelevitch D, Antzelevitch C.** Transmural heterogeneity of calcium activity and mechanical function in the canine left ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, 1471-9, 2004.

31. **Cordeiro JM, Mazza M, Goodrow R, Ulahannan N, Antzelevitch C, Di Diego JM.** Functionally distinct sodium channels in ventricular epicardial and endocardial cells contribute to a greater sensitivity of the epicardium to electrical depression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, 154-62, 2008.
32. **Dean JW, Lab MJ.** Regional changes in ventricular excitability during load manipulation of the in situ pig heart. *J. Physiol.* 429, 387-400, 1990.
33. **Decher N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yuksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B.** hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 52, 255-64, 2001.
34. **Deschenes I, DiSilvestre D, Juang GJ, Wu RC, An WF, Tomaselli GF.** Regulation of Kv4.3 current by KChIP2 splice variants: a component of native cardiac I_{to} ? *Circulation* 106, 423-9, 2002.
35. **Di Diego JM, Antzelevitch C.** Pinacidil-induced electrical heterogeneity and extrasystolic activity in canine ventricular tissues. Does activation of ATP-regulated potassium current promote phase 2 reentry? *Circulation* 88, 1177-89, 1993.
36. **Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Perez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C.** Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* 106, 2004-11, 2002.
37. **Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D.** Role of the Kv4.3 K^+ channel in ventricular muscle. A Molecular correlate for the transient outward current. *Circ. Res.* 79, 659-668, 1996.
38. **Drici MP, Burklow TR, Haridasse V, Glazer RI, Woosley RL.** Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation* 94, 1471-1474, 1996.
39. **Drouin E, Charpentier F, Gauthier C, Laurent K, Le Marec H.** Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for the presence of M cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* 26, 185-192, 1995.
40. **Drouin E, Lande G, Charpentier F.** Amiodarone reduces transmural heterogeneity of repolarization in the human heart. *JACC.* 32, 1063-7, 1998.

41. **Emori T, Antzelevitch C.** Cellular basis for complex T waves and arrhythmic activity following combined I_{Kr} and I_{Ks} block. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 12, 1369-78, 2001.
42. **Fedida D, Giles WR.** Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. *J. Physiol.* 442, 191-209, 1991.
43. **Franz MR, Bargheer K, Rafflenbeul W, Haverich A, Lichtlen PR.** Monophasic action potential mapping in human subjects with normal electrocardiograms: direct evidence for the genesis of the T wave. *Circulation.* 75, 379-86, 1987.
44. **Fridericia LS.** Die Systolendauer im Elektrokardiogramm bei normalen Menschen und bei Herzkranken. *Acta Med Scand* 53, 469-486, 1920.
45. **Gao J, Wang W, Cohen IS, Mathias RT.** Transmural gradients in Na^+/K^+ pump activity and I_{Na} in canine ventricle. *Biophys. J.* 89, 1700-9, 2005.
46. **Gintant GA.** Regional differences in I_K density in canine left ventricle: role of I_{Ks} in electrical inhomogeneity. *Am. J. Physiol.* 268, 604-613, 1995.
47. **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. *Pflügers Arch.* 391, 85-100, 1981.
48. **Han W, Bao W, Wang Z, Nattel S.** Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ. Res.* 91, 790-797, 2002.
49. **Hara M, Danilo P, Rosen MR.** Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 1068-1072, 1998.
50. **Honen BN, Saint DA.** Heterogeneity of the properties of I_{Na} in epicardial and endocardial cells of rat ventricle. *Clin. Exp. Pharmacol. Phys.* 29, 161-6, 2002.
51. **Horváth B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nánási PP, Bányász T.** Contribution of I_{Ks} to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflügers Arch.* 452, 698-706, 2006.
52. **Iwata H, Kodama I, Suzuki R, Kamiya K, Toyama J.** Effects of long-term oral administration of amiodarone on the ventricular repolarization of rabbit hearts. *Jpn. Circ. J.* 60, 662-72, 1996.

53. **Janse MJ.** Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovasc. Res.* 61, 208-17, 2004.
54. **Janse MJ, Sosunov EA, Coronel R, Opthof T, Anyukhovskiy EP, de Bakker JMT, Plotnikov AN, Shlapakova IN, Danilo P, Tijssen JGP, Rosen MR.** Repolarization gradients in the canine left ventricle before and after induction of short-term cardiac memory. *Circulation.* 112, 1711-8, 2005.
55. **Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM.** Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J. Gen. Physiol.* 110, 135–140, 1997.
56. **Kääh S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF.** Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 98, 1383–1393, 1998.
57. **Keung EC, Aronson RS.** Non-uniform electrophysiological properties and electrotonic interaction in hypertrophied rat myocardium. *Circ. Res.* 49, 150-8, 1981.
58. **Knollmann BC, Katchman AN, Franz MR.** Monophasic action potential recordings from intact mouse heart: validation, regional heterogeneity, and relation to refractoriness. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 12, 1286-94, 2001
59. **Konarzewska H, Peeters GA, Sanguinetti MC.** Repolarizing K⁺ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes. *Circulation.* 92, 1179-87, 1995.
60. **Kontoleon PE, Anastasiou-Nana MI, Papapetrou PD, Alexopoulos G, Ktenas V, Rapti AC, Tsagalou EP, Nanas JN.** Hormonal profile in patients with congestive heart failure. *Int. J. Cardiol.* 87, 179–183, 2003.
61. **Koyama H, Yoshii H, Yabu H, Kumada H, Fukuda K, Mitani S, Rousselot JF, Hirose H, Uchino T.** Evaluation of QT interval prolongation in dogs with heart failure. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1107-11, 2004.
62. **Köster OF, Szigeti GP, Beuckelmann DJ.** Characterization of a Ca²⁺_i-dependent current in human atrial and ventricular cardiomyocytes in the absence of Na⁺ and K⁺. *Cardiovasc. Res.* 41, 175-87, 1999.

63. **Krishnan SC, Antzelevitch C.** Sodium channel block produces opposite electrophysiological effects in canine ventricular epicardium and endocardium. *Circ. Res.* 69, 277-91, 1991.
64. **Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyễn-Trần VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR.** A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107, 801-13, 2001.
65. **Leblanc N, Chartier D, Gosselin H, Rouleau JL.** Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *J. Physiol.* 511, 533–548, 1998.
66. **Lehmann MH, Hardy S, Archibald D, Quart B, MacNeil DJ.** Sex difference in risk of Torsade de Pointes with d,l-Sotalol. *Circulation* 94, 2535–2541, 1996.
67. **Lepeschkin E.** Components of Q-T and Q-U intervals of the electrocardiogram in normals. *J. Appl. Physiol.* 9, 443–446, 1956.
68. **Lévesque A, Letellier M, Dillon PW, Grant A.** Analytical performance of Bayer Immuno 1 estradiol and progesterone assays. *Clin. Chem.* 43, 1601-9, 1997.
69. **Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M.** Transmural heterogeneity of action potentials and I_{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 275, 369-77, 1998.
70. **Li GR, Feng J, Yue L, Carrier ., Nattel S.** Evidence for two components of delayed rectifier K^+ current in human ventricular myocytes. *Circ. Res.* 78, 689–696, 1996.
71. **Li GR, Lau CP, Ducharme A, Tardif JC, Nattel S.** Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, 1031-41, 2002.
72. **Litovsky SH, Antzelevitch C.** Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ. Res.* 62, 116-26, 1988.
73. **Liu DW, Antzelevitch C.** Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ. Res.* 76, 351-365, 1995.

74. **Liu T, Choi BR, Drici MD, Salama G.** Sex modulates the arrhythmogenic substrate in prepubertal rabbit hearts with Long QT2. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 16, 516-24, 2005.
75. **Liu DW, Gintant GA, Antzelevitch C.** Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ. Res.* 72, 671-687, 1993.
76. **Liu XK, Katchman A, Whitfield BH, Wan G, Janowski EM, Woosley RL, Ebert SN.** In vivo androgen treatment shortens the QT interval and increases the densities of inward and delayed rectifier potassium currents in orchietomized male rabbits. *Cardiovasc. Res.* 57, 28–36, 2003.
77. **Magyar J, Bányász T, Szigligeti P, Körtvély Á, Jenákovits A, Nánási PP.** Electrophysiological effects of bimoclomol in canine ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361, 303-310, 2000.
78. **Main MC, Bryant SM, Hart G.** Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes. *Exp. Physiol.* 83, 747-61, 1998.
79. **Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH.** Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *J. Am. Med. Assoc.* 270, 2590–2597, 1993.
80. **McIntosh MA, Cobbe SM, Smith GL.** Heterogeneous changes in action potential and intracellular Ca^{2+} in left ventricular myocyte sub-types from rabbits with heart failure. *Cardiovasc. Res.* 45, 397-409, 2000.
81. **Moro S, Ferreira M, Celestino D, Medei E, Elizari MV, Sicouri S.** In vitro effects of acute amiodarone and dronedarone on epicardial, endocardial, and M cells of the canine ventricle. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Therap.* 12, 314-21, 2007.
82. **Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr 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.* 93,168-77, 1996.
83. **Nakajima T, Iwasawa K, Oonuma H, Morita T, Goto A, Wang Y, Hazama H,** Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17 β -estradiol in cardiac myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 127, 429–440, 1999.

84. **Nakashima H, Gerlach U, Schmidt D, Nattel S.** In vivo electrophysiological effects of a selective slow delayed rectifier potassium channel blocker in anesthetized dogs: potential insights into class III actions. *Cardiovasc. Res.* 61, 705-714, 2004.
85. **Nánási PP, Dankó M, Varró A, Lathrop DA.** Nonlinear relationship between $V_{\max}$ and h-infinity in frog skeletal muscle. *Gen. Physiol. Biophys.* 11, 159-167, 1992.
86. **Nowinski K, Pripp U, Carlstrom K, Landgren BM, Schenck-Gustafsson K, Bergfeldt L.** Repolarization measures and their relations to sex hormones in postmenopausal women with cardiovascular disease receiving hormone replacement therapy. *Am J Cardiol* 90, 1050–1055, 2002.
87. **Opalinska-Ciszek E, Niemczyk S, Matuszkiewicz-Rowinska J.** Prolactin (PRL), thyrotropin (TSH), free thyroid hormones (fT4), (fT3) and testosterone (TTE) level in men with chronic heart failure. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 113, 320–325, 2005.
88. **Péréon Y, Demolombe S, Baró I, Drouin E, Charpentier F, Escande D.** Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am. J. Physiol.* 278, 1908-1915, 2000.
89. **Petanceska SS, Nagy V, Frail D, Gandy S.** Ovariectomy and 17b-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid b peptides in brain. *Neurology* 54, 2212–2217, 2000.
90. **Pham TV, Rosen MR.** Sex, hormones, and repolarization. *Cardiovasc. Res.* 53, 740–751, 2002.
91. **Pham TV, Sosunov EA, Gainullin RZ, Danilo P, Rosen MR.** Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by I_K -blocking drugs. *Circulation* 103, 2207– 2212, 2001.
92. **Pitruzzello AM, Krassowska W, Idriss SF.** Spatial heterogeneity of the restitution portrait in rabbit epicardium. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 292, 1568-78, 2007.
93. **Qi XY, Shi WB, Wang HH, Zhang ZX, Xu YQ.** A study on the electrophysiological heterogeneity of rabbit ventricular myocytes the effect of ischemia on action potentials and potassium currents. *Acta Physiol. Sin.* 52, 360-4, 2000.

94. **Ramanathan C, Jia P, Ghanem R, Ryu K, Rudy J.** Activation and repolarization of the normal human heart under complete physiological conditions. *PNAS*. 103, 6309-14, 2006.
95. **Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, Davignon A.** Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can. J. Cardiol.* 8, 690–695, 1992.
96. **Roden DM.** Taking the “idio” out of “idiosyncratic”: Predicting torsades de pointes. *Pacing. Clin. Electrophysiol.* 21, 1029–1034, 1998.
97. **Rodriguez-Sinovas A, Cinca J, Tapias A, Armadans L, Tresanchez M, Soler-Soler J.** Lack of evidence of M-cells in porcine left ventricular myocardium. *Cardiovasc. Res.* 33, 307-13, 1997.
98. **Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H, Nerbonne JM, McKinnon D** Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J. Physiol.* 548, 815-22, 2003.
99. **Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D.** Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J. Physiol.* 533, 119-125, 2001.
100. **Sakmann BFAS, Spindler AJ, Bryant SM, Linz KW, Noble D.** Distribution of a persistent sodium current across the ventricular wall in guinea pigs. *Circ. Res.* 87, 910-4, 2000.
101. **Sekiya S, Ichikawa S, Tsutsumi T, Harumi K.** Distribution of action potential durations in the canine left ventricle. *Jpn. Heart. J.* 25, 181-94, 1984.
102. **Sheets MF, Hank DA, Fozzard HA.** Nonlinear relation between $V_{\max}$ and I_{Na} in canine cardiac Purkinje cells. *Circ. Res.* 63, 386-398, 1988.
103. **Shi F, Ozawa M, Komura H, Yang P, Trewin AL, Hutz RJ, Watanabe G, Taya K.** Secretion of ovarian inhibin and its physiologic roles in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion during the estrous cycle of the female Guinea pig. *Biol. Reprod.* 60, 78–84, 1999.
104. **Shimizu W, Antzelevitch C.** Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade des pointes in LQT2 and LQT3 models of long-QT syndrome. *Circulation* 96, 2038-2047, 1997.

105. **Shimoni Y, Severson D, Giles W.** Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium currents in rat ventricle. *J. Physiol.* 488, 673-88, 1995.
106. **Shipsey SJ, Bryant SM, Hart G.** Effects of hypertrophy on regional action potential characteristics in the rat left ventricle: a cellular basis for T-wave inversion? *Circulation.* 96, 2061-8, 1997.
107. **Sicouri S, Antzelevitch C.** A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ. Res.* 68, 1729-41, 1991.
108. **Sicouri S, Antzelevitch C.** Drug-induced afterdepolarizations and triggered activity occur in a discrete subpopulation of ventricular muscle cells (M cells) in canine heart: quinidine and digitalis. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 4, 48-58, 1993.
109. **Sicouri S, Antzelevitch C.** Electrophysiologic characteristics of M cells in the canine left ventricular wall. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 6, 591-603, 1995.
110. **Sicouri S, Fish J, Antzelevitch C.** Distribution of M cells in the canine ventricle. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 5, 824-37, 1994.
111. **Sicouri S, Moro S, Litovsky S, Elizari MV, Antzelevitch C.** Chronic amiodarone reduces transmural dispersion of repolarization in the canine heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 8, 1269-79, 1997.
112. **Sicouri S, Quist M, Antzelevitch C.** Evidence for the presence of M cells in the guinea pig ventricle. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 7, 503-11, 1996.
113. **Solberg LE, Singer DH, Ten Eick RE, Duffin EG.** Glass microelectrode studies on intramural papillary muscle cells. Description of preparation and studies on normal dog papillary muscle. *Circ. Res.* 34, 783-97, 1974.
114. **Stankovicova T, Szilard M, De Scheerder I, Sipido KR.** M cells and transmural heterogeneity of action potential configuration in myocytes from the left ventricular wall of the pig heart. *Cardiovasc. Res.* 45, 952-60, 2000.
115. **Stramba-Badiale M, Locati EH, Martinelli A, Courville J, Schwartz PJ.** Gender and the relationship between ventricular repolarization and cardiac cycle length during 24-h Holter recordings. *Eur. Heart J.* 18, 1000–1006, 1997.

116. **Sun X, Wang HS.** Role of the transient outward current (I_{to}) in shaping canine ventricular action potential – a dynamic clamp study. *J. Physiol.* 564, 411–419, 2005.
117. **Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, Lacroix I, Somma-Delpero C, Boudou P.** Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin. Chem.* 49, 1381-95, 2003.
118. **Tanabe S, Hata T, Hiraoka M.** Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 277, 826–833, 1999.
119. **Tomaselli GF, Marbán E.** Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 42, 270-83, 1999.
120. **Tomaselli GF, Zipes DP.** What causes sudden death in heart failure? *Circ. Res.* 95, 754-63, 2004.
121. **Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset, C.** Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ. Res.* 89, 437–444, 2001.
122. **Tseng GN, Hoffman BF.** Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ. Res.* 64, 633-47, 1989.
123. **Varró A, Baláti B, Iost N, Takács J, Virág L, Lathrop DA, Csaba L, Tálosi L, Papp JG.** The role of the delayed rectifier component I_{Ks} in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J. Physiol.* 523, 67-81, 2000.
124. **Verkerk AO, Tan HL, Ravesloot JH.** Ca^{2+} -activated Cl^- current reduces transmural electrical heterogeneity within the rabbit left ventricle. *Acta Physiol. Scand.* 180, 239-47, 2004.
125. **Vermeirsch H, Simoens P, Lauwers H, Coryn M.** Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. *Theriogenology* 51, 729–743, 1999.
126. **Volders PG, Kulcsár A, Vos MA, Sipido KR, Wellens HJ, Lazzara R, Szabo B.** Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 34(2), 348-59, 1997.

127. **Volders PGA, Sipido KR, Carmeliet E, Spätjens RL, Wellens HJJ, Vos MA.** Repolarizing K^+ currents I_{to1} and I_{Ks} are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation* 99, 206-10, 1999.
128. **Volders PGA, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Spätjens RLHMG, Beekman JDM, Sipido KR, Vos MA.** Probing the contribution of I_{Ks} to canine ventricular repolarization: Key role for β -adrenergic receptor stimulation. *Circulation* 107, 2753-2760, 2003.
129. **Volk T, Nguyen THD, Schultz JH, Ehmke H.** Relationship between transient outward K^+ current and Ca^{2+} influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin. *J. Physiol.* 519, 841-50, 1999.
130. **Volk T, Nguyen THD, Schultz JH, Faulhaber J, Ehmke H.** Regional alterations of repolarizing K^+ currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *J. Physiol.* 530, 443-55, 2001.
131. **Wan X, Bryant SM, Hart G.** A topographical study of mechanical and electrical properties of single myocytes isolated from normal guinea-pig ventricular muscle. *J. Anat.* 202, 525-36, 2003.
132. **Wang JK, Cui CC, Chen XY, Yao XW, Yao QH, Lian JF.** Heterogeneity of Na^+/Ca^{2+} exchanger current across the left ventricular wall of rabbit *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 35, 496-9, 2004.
133. **Watanabe T, Delbridge LM, Bustamante JO, McDonald TF.** Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ. Res.* 52, 280-90, 1983.
134. **Watanabe T, Rautaharju PM, McDonald TF.** Ventricular action potentials, ventricular extracellular potentials, and the ECG of guinea pig. *Circ. Res.* 57, 362-73, 1985.
135. **Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U.** Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ. Res.* 75, 473-82, 1994.
136. **Wolk R, Kane KA, Cobbe SM, Hicks MN.** Apex-to-base dispersion of refractoriness underlies the proarrhythmic effect of hypokalaemia/hypomagnesaemia in the rabbit heart. *J. Electrocardiol.* 35, 245-52, 2002.

137. **Xiao L, Zhang L, Han W, Wang Z, Nattel S.** Sex-based transmural differences in cardiac repolarization and ionic-current properties in canine left ventricles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, 570-80, 2006.
138. **Xu X, Rials SJ, Wu Y, Salata JJ, Liu T, Bharucha DB, Marinchak RA, Kowey PR.** Left ventricular hypertrophy decreases slowly but not rapidly activating delayed rectifier potassium currents of epicardial and endocardial myocytes in rabbits. *Circulation.* 103, 1585-90, 2001.
139. **Yan GX, Shimizu W, Antzelevitch C.** Characteristics and distribution of M cells in arterially perfused canine left ventricular wedge preparations. *Circulation* 98, 1921-7, 1998.
140. **Yang X, Zhou P, Li C.** Electrical heterogeneity of canine right ventricular transient outward potassium currents. *Chinese Med. J.* 117, 528-31, 2004.
141. **Yu H, Gao J, Wang H, Wymore R, Steinberg S, McKinnon D, Rosen MR, Cohen IS.** Effects of the renin-angiotensin system on the current I_{to} in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart. *Circ. Res.* 86, 1062-8, 2000.
142. **Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S.** Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J. Physiol.* 561, 735–748, 2004
143. **Zygmunt AC, Eddlestone GT, Thomas GP, Nesterenko VV, Antzelevitch C.** Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am. J. Physiol.* 281, 689-697, 2001.

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények:

1. **Szabó G**, Szentandrassy N, Bíró T, Tóth IB, Czifra G, Magyar J, Bányász T, Varró A, Kovács L, Nánási PP: Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflügers Arch* 2005;450:307-316 [IF=3,564]

2. Szentandrassy N, Bányász T, Bíró T, **Szabó G**, Tóth B, Magyar J, Lázár J, Varró A, Kovács L, Nánási PP: Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 2005;65:851-860 [IF=5,283]

3. Fülöp L, Bányász T, **Szabó G**, Tóth IB, Bíró T, Lőrincz I, Balogh Á, Pető K, Mikó I, Nánási PP: Effects of sex hormones on ECG parameters and expression of cardiac ion channels in dogs. *Acta Physiol (Scand)* 2006;188:163-171 [IF=2.23]

Az értekezésben fel nem használt in extenso közlemények:

4. Szabó A, Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, **Szabó G**, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J: Effects of articaine on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. *Br J Anaesthesia* 2007;99:726-733 [IF=2.948]

5. Szabó A, Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, **Szabó G**, Bányász T, Márton I, Magyar J, Nánási PP: Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. *Anesthesiology* 2008 Apr;108(4):693-702; [IF=4.596]

FÜGGELÉK

Az értekezést megalapozó közlemények gyűjteménye