

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Dr. Horváth Balázs

Káliumáramok szerepe kutya bal kamrai szívizomsejtek repolarizációjában



Témavezető:

Dr. Bányász Tamás

Programvezető:

Dr. Csernoch László

DEBRECENI EGYETEM, ORVOS-, ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2009.

Betétlap

Káliumáramok szerepe kutya bal kamrai szívizomsejtek repolarizációjában

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében

Írta: Dr. Horváth Balázs

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
Élettan és neurobiológia doktori programja keretében
Témavezető: Dr. Bányász Tamás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Virág László, Ph.D.
Dr. Krasznai Zoltán, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2009. szeptember 29.

Az értekezés bírálói:

Dr. Jost Norbert László, Ph.D.
Dr. Panyi György, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Virág László, Ph.D.
Dr. Krasznai Zoltán, Ph.D.
Dr. Jost Norbert László, Ph.D.
Dr. Panyi György, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2009. szeptember 29.

Bevezetés

I. Általános megfontolások

Az emberi szervezetben található sejtek plazmamembránja az egymástól eltérő ionösszetételű intra-, és extracelluláris teret választja el. Az ingerelhető sejtek (így a szívkamrai sejtek) akciós potenciálja nem más, mint a sejtmembránon átfolyó, térben és időben változó ionáramok következtében létrejövő feszültségváltozás.

A sejtek mindenkori membránpotenciálja az adott időpillanatban a sejtmembrán két oldala közötti elektrokémiai iongradiensektől, valamint a plazmamembrán egyes ioncsatornáinak eltérő permeabilitásától függ. Ezt a jelenséget a Goldman–Hodgkin–Katz-egyenlet írja le.

Az elektrokémiai gradienseket különböző aktív pumpák generálják, és ezek az AP lezajlása után is szükségesek az eredeti ionösszetétel visszaállításához. Ezek a pumpák közvetlenül vagy közvetve ATP által tárolt energiát használnak fel. A Na^+/K^+ ATP-áz a Na^+ ionokat a sejtől az extracelluláris térbe juttatja, miközben az extracelluláris térből K^+ ionokat visz a sejtbe. A pumpa $3 \text{ Na}^+ / 2 \text{ K}^+$ sztöchiometriával működik, emiatt kicsiny, a sejtől kifelé irányuló ("outward") áramot generál. A másik jelentős pumpa a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter, amely 3 Na^+ és 1 Ca^{2+} ion egyidejű cseréjét végzi, így az előző transzporterhez hasonlóan szintén elektrogén. Működése eredményezhet mind befelé ("inward"), mind kifelé ("outward") irányuló áramot (I_{NaCa}), a pillanatnyi membránpotenciáltól és ionösszetételtől függően. Működése a sejtek Ca^{2+} háztartását illetően nélkülözhetetlen, segítik az AP során a sejtplazmába jutott Ca^{2+} eltávolítását.

Az egyes ionokra a membrán nem egyformán permeábilis. A mindenkori membránpotenciál azon ion — Nernst-egyenletből adódó — egyensúlyi potenciáljához áll legközelebb, amelyre nézve a membrán leginkább áteresztő. A gerincesek kamrai szívmusclesejtjeiben, nyugalmi állapotban K^+ ionokra vonatkozóan nagy, míg Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- ionokra nézve kicsi a membrán permeabilitása, tehát a nyugalmi membránpotenciál a K^+ ionok

egyensúlyi potenciáljához esik közel. Fiziológiai körülmények között az ionösszetételből, az egyes ioncsatorna-típusok permeabilitásából, illetve az elektrogén pumpák működéséből a kamrai sejtek nyugalmi membránpotenciálja körülbelül -80 mV-nak adódik, azaz a kamrai sejtek nyugalomban negatívabbak az extracelluláris térhez képest.

Magát az akciós potenciált az emlősök szívizomsejtjeiben a plazmamembrán idő-, és feszültségfüggő ioncsatornáinak konduktancia-változásai hozzák létre (a konduktancia — vagy más néven vezetőképesség — definíció szerint az adott ioncsatorna pillanatnyi ellenállásának reciproka; az ioncsatorna permeabilitásával arányos mennyiség). Hagyományosan az AP-t öt fázisra osztjuk.

II. A kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja

II.1. Az akciós potenciál nulladik és első fázisa

Az akciós potenciál nulladik fázisában idő-, és feszültségfüggő gyors Na^+ csatornák aktiválódnak, sokszorosára növelve az addig alacsony Na^+ konduktanciát. A Na^+ ionokra jelentős elektrokémiai hajtóerő hat, ezáltal a csatorna nyitása jelentős áramot eredményez (I_{Na}), így a membránpotenciál aktuális értéke a Na^+ Nernst-egyenletben meghatározott egyensúlyi potenciálja felé mozdul, tehát a membrán depolarizálódik. Ezt a fázist nevezik az AP felszálló szárának is a hirtelen nagymértékű membránpotenciál-változás idő-feszültség grafikonon ábrázolódó jellegzetes alakja miatt. A gyors Na^+ csatornák hamar inaktiválódnak és ingerelhető állapotba majd csak a teljes repolarizáció után kerülnek.

A gyors Na^+ csatornák által okozott depolarizáció következtében egyes áramokért felelős ioncsatornák aktiválódnak, míg mások inaktiválódnak. A nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős nagy K^+ áram (befelé egyenirányító K^+ áram, I_{K1}) lecsökken a befelé történő egyenirányítás miatt, ez megakadályozza repolarizáló hatású K^+ áram létrejöttét a nulladik fázis alatt. A depolarizáció hatására ugyanakkor olyan tranziens kifelé irányuló áram ("transient outward current", I_{to}) aktiválódik, amelynek humán szívizomsejteken

főként K^+ és Cl^- , valamint némi Na^+ komponense is van. Az I_{to} felelős az akciós potenciál első fázisában tapasztalt gyors, átmeneti repolarizációért.

Említést érdemel, hogy a szívizomzat egyes rétegeiben eltérő az akciós potenciálok megjelenése. A subepicardiális sejteken az AP első fázisában igen kifejezett az átmeneti repolarizáció, míg ugyanez a subendocardiális sejtekben csak jelzett. A midmyocardiális a kezdeti repolarizáció kevésbé mély, mint a subepicardiális sejtekben, de a subendocardiális sejtekénél kifejezettebb. A fent vázolt különbségek az I_{to} áram egyes myocardium-rétegekben észlelhető eltérő denzitásából adódnak.

II.2. Az akciós potenciál második fázisa

Az akciós potenciál második fázisának létrejöttében jelentős szerepe van annak, hogy a befelé egyenirányító káliumcsatornák ekkorra bezárultak, tehát a membrán ellenállása nagyon nagy. A plateau fázis során folyó befelé és kifelé irányuló áramok hasonló nagyságúak, tehát a plateau során a membránpotenciál értéke csak viszonylag lassan változik.

A plateau során folyó befelé irányuló áramot főként Ca^{2+} ionok szolgáltatják: a Na^+ csatornáknál lassabban aktiválódó, de tovább fennálló L-típusú Ca^{2+} áram felelős a plató fázis fenntartásáért. A késői káliumáram fokozatos növekedése ellensúlyozza az $I_{Ca,L}$ depolarizáló hatását.

II.3. Az akciós potenciál harmadik fázisa és az I_K gátlása

Az AP harmadik fázisának elején kezdődik meg a repolarizációs folyamat, mely az AP negyedik fázisára visszaállítja a membránpotenciál kiindulási értékét. A repolarizációt számos áram együtt hozza létre. A kezdeti szakaszt az $I_{Ca,L}$ áram inaktivációja határozza meg leginkább, később egyre nagyobb szerep jut a késői K^+ áramnak (delayed rectifier; I_K), majd a repolarizációt a körülbelül -55 mV alatti membránpotenciálok ismét jelentős szerephez jutó I_{K1} áram teszi teljessé.

Az I_K áram egyre több összetevőjét sikerül felfedezni különböző fajokon, melyek közül a három leglényegesebb (jelenlegi ismereteink szerinti legtöbb

gerinces fajban előforduló) a lassan aktiválódó (slow component of I_K ; I_{Ks}), a gyorsan aktiválódó (rapid component of I_K ; I_{Kr}) és a nagyon gyorsan aktiválódó (ultra rapid component of I_K , I_{Kur}) komponens. Az egyes komponensek aktivációs és inaktivációs kinetikájukban, farmakológiai tulajdonságaikban különböznek. Az I_{Kr} és I_{Ks} megtalálható mind a pitvari, mind a kamrai munkaizomsejteken, míg az I_{Kur} jelenlétét csak pitvari sejteken bizonyították.

Az I_{Kr} szelektív gátlószerei, mint az E-4031, a dofetilide vagy a D-sotalol metánszulfanilid szerkezetű vegyületek és jelentősen meghosszabbítják a kamrai akciós potenciál hosszát. Ezt a hatást használják ki a III. osztályú antiarrhythmias gyógyszerek esetében is. K^+ áramok, különösen az I_{Kr} áram gátlását azonban nem csak antiarrhythmias szerek esetében figyelhetjük meg, így például egyes antihisztamin szerek (pl. terfenadin, astemizol), mikrobaellenes szerek (pl. erythromycin, ketokonazol), gyomor-bélrendszerre ható gyógyszerek (pl. cisaprid), illetve antipszichotikumok (pl. haloperidol) is hasonló hatást gyakorolnak az I_{Kr} -re. Közös vonása a fent felsorolt szereknek, hogy legalább egy aromás gyűrűt tartalmaznak, valamint, hogy I_{Kr} blokkoló hatásuk az ioncsatornába belépve és azokat mintegy "eldugítva" érvényesül. Bármely szer, mely gátolja a kamrai szívizomsejtek repolarizációját (pl. az I_K áramot), megnyújtja az AP hosszát, és emiatt ún. szerzett hosszú QT szindrómához vezethet. A hosszú QT szindróma bármely öröklött vagy szerzett formája a syncope, egyes arrhythmia (például torsade de pointes típusú kamrai tachycardia), és a hirtelen szívhalál fokozott kockázatával társul.

Az I_K áram jelentős szerepet játszik a sinus-csomó és a pitvar-kamrai csomó repolarizációjában, így a maximális diastolés potenciál meghatározásában, valamint a pacemaker szövetek ritmusgenerálásában is. A pacemaker szövetekben azonban az áram komponensei eltérő aktivációs és deaktivációs kinetikát mutatnak, így feltételezhető, hogy az ioncsatornáknak több eltérő izoformája létezik.

II.4. Az elektromos diastole fázisa

Az AP negyedik fázisa (elektromos diastole) során az extranodalis (automáciával nem rendelkező) myocyták, így a kamrai sejtek membránpotenciálja is a nyugalmi értéken marad egészen az újabb AP kezdetéig. A fázist meghatározó nagy K^+ konduktancia (amely az I_{K1} áramot eredményezi) felelős azért, hogy a kamrai myocyták nyugalmi membránpotenciálja a K^+ ionok egyensúlyi potenciáljához közeli érték. Hogy ez a két érték mégsem egyezik meg pontosan, az a korábban már szintén említett elektrogén pumpák (Na^+/K^+ pumpa és Na^+/Ca^{2+} cserélő) hatásának, valamint az egyéb ionokra vonatkozó kicsiny, de nem zérus vezetőképesség következménye. Az elektromos diastole ideje alatt a Na^+/K^+ pumpa kicsiny kifelé, míg a Na^+/Ca^{2+} cserélő kicsiny befelé irányuló áramot eredményeznek, míg ebben a fázisban a plazmamembrán I_{K1} -től különböző ionáramai együtt "háttér" befelé irányuló áramot tartanak fenn. Az ioncserélő transzporterek az AP lezajlása után az eredeti ionösszetétel visszaállításához is nélkülözhetetlenek. Ezen tényezők összessége a K^+ egyensúlyi potenciáljánál kb. 5-10 mV-tal pozitívabb nyugalmi membránpotenciált eredményez.

Célkitűzés

Kísérleteink célja a kutya bal kamrai szívműködésében megtalálható káliumáramok repolarizációban játszott pontos szerepének tisztázása volt. Ezt elsősorban az élettani viszonyokat leginkább tükröző akciós potenciál clamp körülmények között kívántuk elvégezni. Továbbá vizsgálni kívántuk az egyes ionáramok frekvenciafüggő sajátosságait is, hogy a repolarizációban betöltött szerepüket még pontosabban meghatározhassuk.

A kutya szívműködésén végzett vizsgálatoknak azért van különös jelentősége, mert elektrofiziológiai szempontból a humán kamrai myocardium legjobb modellje a kutya szívműködés. Emiatt a kutya modellen végzett kísérleteket minimális fenntartással extrapolálhatjuk humán viszonyokra.

Anyagok és módszerek

I. Kutya bal kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából enzimatikusan izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket ivarérett, kísérleti célra tenyésztett kutyák szívéből nyertük, az anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával.

Az izolálást követően a szuszpenzióban levő sejtek mintegy 30–60 %-a pálcika alakú volt és tiszta harántcsíkolatot mutatott 2,5 mM kalciumot tartalmazó oldatban. A sejtizolálás befejezése után két-három órával kezdtük meg a kísérletek végzését. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on tároltuk, Minimum Essential Medium Eagle oldatban (pH=7,4).

II. Elektrofiziológiai mérések

Valamennyi kísérletünk kezdetekor a szívizomsejteket 37 °C hőmérsékleten tartott, 1 ml térfogatú plexiüveg mérőkádba helyeztük. A kádban levő sejteket folyamatosan Tyrode oldattal (144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 10 mM glükóz; pH=7,4) perfundáltuk 10 ml/perc sebességgel. Az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez Axoclamp 2B, illetve Axoclamp 200B (Axon Instruments) erősítőket használtunk. A számítógépes vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 6.0 szoftvert alkalmaztunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot Digidata 1200 A/D-D/A (Axon Instruments) jelátalakító teremtette meg.

II.1. Akciós potenciálok elvezetése izolált szívizomsejtekről

A transzmembrán potenciálokat 3 M KCl oldattal töltött boroszilikát mikroelektrodákkal regisztráltuk, melyek ellenállása 20–40 M Ω volt. A sejteket folyamatosan 1 ms szélességű négyszögimpulzusok alkalmazásával ingereltük, melyek amplitúdóját az ingerküszöb 110–120%-ára állítottuk, így az ingerlő jel és az AP felszálló szára között 1–2 ms szünet lehetett. Az AP-okat

100 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, és tároltuk a későbbi értékelésig.

II.2. Az ionáramok mérése feszültség-clamp technikával

A mérésekhez 1,5-2,5 M Ω ellenállású boroszilikát mikroelektródákat használtunk a patch-clamp technika teljes sejtes elrendezésében. A pipetta belső oldata az alábbi anyagokat tartalmazta: 100 mM K-aszpartát, 45 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 3 mM K-ATP, 5 mM HEPES; pH=7,2. A sejtek membránfelületének kapacitását minden kísérlet előtt 10 ms hosszú, –10 mV-ról –20 mV-ra történő hiperpolarizáció segítségével megmértük, és az ionáramokat az így kapott sejtkapacitásra vonatkoztattuk. A mérési elrendezés teljes soros ellenállása általában 4–8 M Ω -nak adódott, melyet 50–80 %-ban kompenzáltunk.

II.2.1. Akciós potenciál clamp

Az akciós potenciálokat áram-clamp üzemmódban rögzítettük a patch pipetta segítségével normál Tyrode oldatban. A sejteket folyamatosan 1 Hz-es (illetve a megfelelő kísérleteknél 0,2 Hz, 0,5 Hz, vagy 1,66 Hz) frekvenciájú 1 ms széles küszöb feletti négyszögjellel ingereltük. A sejtekről így elvezetett akciós potenciált használtuk ugyanazon a sejten és ugyanolyan ingerlési frekvenciával feszültségparancsként, immár feszültség-clamp módban. Az így kapott áramjel — a kezdeti kapacitív tranziens kivételével — a nulla szintben futó vízszintes vonal volt. Az I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} és I_{K1} áramokat rendre 1 mM 4-aminopyridin, 1 μ M E-4031, 10 μ M chromanol-293B, illetve 50 μ M BaCl₂ alkalmazásával különítettük el, mindegyik szert legalább 3 percig alkalmaztuk. Az egyes ionáramok profilját úgy kaptuk meg, hogy a szerek alkalmazása előtti áramgörbéből kivontuk a szerhatás utáni áramgörbét.

II.2.2. Az I_{Ks} mérése négyszögimpulzusokkal

A kísérletek során tartópotenciálként –40 mV-ot alkalmaztunk. Az I_{Ks} -t 10 másodpercenként, 5 s hosszú +30 mV-ra történő depolarizáció segítségével aktiváltuk. Az áram steady-state aktivációjának feszültségfüggését vizsgáló

kísérleteink során -20 mV és $+50$ mV közötti potenciálra depolarizáltuk a sejtmembránt 10 mV-os lépcsőkben.

III. Matematikai modellezés

Számítógépes szimulációk segítségével elemeztük a plateau fázis magasságának, illetve az akciós potenciál hosszának az I_{Ks} kinetikájára gyakorolt hatását. Numerikus modellként az I_{Ks} feszültség-, és időfüggését is leíró Viswanathan és munkatársai által publikált modellt alkalmaztuk, melyet saját mérési eredményeinkhez adaptáltunk. A plateau magasság, illetve az akciós potenciál hossz I_{Ks} -re gyakorolt hatásának elemzéséhez egy korábban regisztrált akciós potenciálból az általunk kívánt (tehát vagy kizárólag a plateau magasságában, vagy kizárólag az akciós potenciál hosszában különböző) akciós potenciál sorozatokat készítettünk.

A modellt Mathcad 2000i (Mathsoft Engineering & Education, Surrey, Egyesült Királyság) program segítségével futtattuk. Az akciós potenciál kezdete elé 10 ms hosszú nyugalmi membránpotenciált illesztettünk, hogy a modellezés során az áram steady-state értékre álljon az aktiválás előtt. Az integrációs lépések időtartama 1 ms volt. Mivel a modell figyelembe veszi a citoszól kalciumkoncentrációjának változását is, ezért egy mesterséges kalcium tranzienst illesztettünk a modellbe. A diastole során 200 nM-os, míg a systole során 2 μ M-os intracelluláris kalcium koncentrációt állítottunk be.

IV. Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei $\pm$ a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos varianciánálízist, Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollós t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdéseknek megfelelően. Az adatok közötti korrelációk meghatározásához lineáris regressziót használtuk. Az eltéréseket $P < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

I. Káliumáramok vizsgálata akciós potenciál clamp módszerrel

I.1. Tranziens kifelé irányuló káliumáram (I_{to})

Az I_{to} -t 1 mM 4-aminopyridin alkalmazásával különítettük el, amely ebben a koncentrációban az I_{to} 70 %-át gátolja anélkül, hogy egyéb kamraizomsejteken megtalálható káliumáramokra jelentős hatása lenne. Az akciós potenciál felszálló szárát követően az I_{to} gyorsan növekedett, és $4,4 \pm 0,7$ ms-mal az akciós potenciál csúcsa után érte el a maximumát, majd $7,4 \pm 0,6$ ms-os időállandóval csökkent zérusra. Az akciós potenciál felszálló szárának kezdetétől 50 ms elteltével $0,05 \pm 0,1$ pA/pF áramsűrűséget mértünk ($n=10$). Az I_{to} amplitúdója $3,0 \pm 0,23$ pA/pF-nak adódott, míg az áram által szállított töltésmennyiség $29,7 \pm 2,5$ fC/pF volt. Az I_{to} csúcsa minden esetben megelőzte a kezdeti repolarizáció során elért legalacsonyabb membránpotenciált. Az akciós potenciál clamp során nyert áram-feszültség összefüggés alapján megállapítottuk, hogy az I_{to} -15 mV és $+40$ mV között volt aktív, maximumát $+8,8 \pm 1,9$ mV-nál érte el. Az akciós potenciál korai repolarizációja során mért legnegatívabb feszültségérték és az I_{to} maximális értéke fordítottan aránylott egymáshoz. A 90 %-os repolarizációnál mért akciós potenciál hossz (APD_{90}) és az I_{to} amplitúdója között nem találtunk összefüggést.

I.2. A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Az I_{Kr} vizsgálatát kilenc szívizomsejten végeztük el 1 Hz-es ingerlési frekvencián. Az áram szelektív gátlására 1 μ M E-4031-et alkalmaztunk. Az I_{Kr} fokozatosan emelkedett a plateau fázis során, csúcsértéke $0,62 \pm 0,08$ pA/pF-nak adódott, az áram által szállított töltésmennyiség $57,6 \pm 6,7$ fC/pF volt. Az áram maximumát $-54,2 \pm 1,7$ mV-nál érte el. Az áram tulajdonságait vizsgálva megállapítottuk, hogy összefüggés van az I_{Kr} áram csúcsának időpontja és a repolarizáció legnagyobb meredekségének (V_{max}^-) időpontja között: az akciós potenciál során az I_{Kr} mintegy 7 ms-mal a V_{max}^- előtt érte el maximumát.

Az I_{Kr} és a membránon keresztülfolyó nettó áram (a nettó áramot a sejtmembrán kapacitása és a membránpotenciálváltozás idő szerinti első deriváltjának szorzataként számolhatjuk: $I_{net} = -C_m \cdot dU/dt$) összevetésekor azt láttuk, hogy a nettó membránáram a plateau fázis minden időpillanatában meghaladta az I_{Kr} értékét. A V_{max}^- időpontjában az I_{Kr} értéke a nettó membránáramnak mindössze egynegyede volt, így tehát az I_{Kr} nem lehet a repolarizáció végső fázisának domináló árama. Ennek megfelelően nem találtunk összefüggést sem az I_{Kr} amplitúdója és a V_{max}^- értéke sem pedig az I_{Kr} amplitúdója és az APD_{90} között.

I.3. A késői egyenirányító káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

Az I_{Ks} akciós potenciál alatti áramprofilját $10 \mu M$ chromanol-293B alkalmazásával kíséreltük meg megjeleníteni 1 Hz-es ingerlési frekvencián, öt szívizomsejten. A chromanol-érzékeny áram amplitúdója nem haladta meg a kísérleti elrendezés zajszintjének háromszorosát, emiatt — a többi káliumárammal ellentétben — az I_{Ks} -t nem jellemeztük akciós potenciál clamp körülmények között végzett kísérletsorozatunkban.

I.4. A befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})

Az I_{K1} áram tulajdonságait hét kamrai szívizomsejt esetében vizsgáltuk 1 Hz-es ingerlőfrekvencián. Gátlószerként $50 \mu M$ $BaCl_2$ -ot használtunk. Az I_{K1} áramot a diastole során is megfigyeltük: $0,26 \pm 0,03$ pA/pF áramsűrűséget mértünk a repolarizáció teljes lezajlása után, illetve a felszálló szár megkezdődése előtt. Az áram a felszálló szár alatt átmenetileg csökkent, majd a plateau fázis során lassan növekedett. Az áram-feszültség görbe alapján az I_{K1} növekedésének hirtelen gyorsulása a repolarizáció során nagyjából -22 mV-os membránpotenciálnál következett be. Az I_{K1} amplitúdója $1,8 \pm 0,1$ pA/pF volt, ezt $-58,3 \pm 0,6$ mV-os membránpotenciálnál érte el. Az I_{K1} maximális értéke és a V_{max}^- időpontja között szoros összefüggést fedeztünk fel: az I_{K1} a V_{max}^- után 1 ms-mal érte el maximumát. Az I_{K1} idő szerinti határozott integrálja az akciós potenciál alatt $61,6 \pm 6,2$ fC/pF volt, melyet az

áram akciós potenciál alatti kinetikája alapján két részre oszthatunk. Mintegy 20 fC/pF mennyiségű töltés az akciós potenciál plateau fázisa alatt, míg a maradék nagyjából 41 fC/pF a végső repolarizáció során hagyta el a sejtet. A $V_{\max}^-$ bekövetkeztének pillanatában az I_{K1} jelentette a nettó membránáram hozzávetőleg 75 %-át. Ennek megfelelően a mértéke és az I_{K1} amplitúdója között szoros összefüggést találtunk. Azonban — hasonlóan az I_{Kr} esetén tapasztaltakhoz — nem figyelhettünk meg összefüggést az I_{K1} csúcstérteke és az APD_{90} között.

I.5. Az I_{Kr} és I_{K1} frekvenciafüggő sajátságai

Az akciós potenciál morfológiájának frekvenciafüggő változásaiért valamely, az akciós potenciál során aktiválódó ionáram(ok) frekvenciafüggő sajátossága(i) kell, hogy feleljen(ek). Emiatt megvizsgáltuk az I_{Kr} és I_{K1} ionáramok frekvenciafüggését 0,2 Hz-es, és 1,66 Hz-es ingerlési frekvencia esetén is. Megfigyeltük, hogy az I_{Kr} áramnak sem a maximális értéke, sem a plateau fázis közepén mért értéke nem változott szignifikánsan a különböző ingerlési frekvenciák esetén. Ehhez hasonlóan, sem az I_{K1} amplitúdója sem a az akciós potenciál repolarizációjának maximális sebessége nem különbözött szignifikánsan a vizsgált frekvenciák esetén.

Az I_{Kr} általunk tapasztalt frekvenciafüggetlen viselkedése miatt négyszögimpulzusok segítségével megvizsgáltuk, hogy változik-e az I_{Kr} farokáramok amplitúdója az előző depolarizációtól való időbeli távolság függvényében. A sejtmembránt -80 mV-os tartófeszültségről egyenként 250 ms hosszú, $+10$ mV-ra depolarizáló négyszögimpulzus párokkal ingereltük, majd a farokáramokat a második impulzus után -40 mV-ra történő repolarizáció során regisztráltuk. A kísérleteket $5 \mu\text{M}$ nifedipin és $30 \mu\text{M}$ chromanol-293B jelenlétében végeztük, így eliminálva az L-típusú kalciumáramot, illetve a késői egyenirányító káliumáram lassú komponensét. Az ingerlőjelek paramétereit azért így választottuk meg, hogy hasonlítsanak két egymást követő akciós potenciálra. Eredményeink szerint az impulzuspárok egymáshoz való időbeli viszonya 25 ms–10 s tartományban

nem befolyásolta a farokáramok amplitúdóit, tehát az I_{Kr} nem akkumulálódik az egymást követő akciós potenciálok során.

Megvizsgáltuk továbbá, hogyan viszonyul egymáshoz a plateau fázis közepén folyó nettó membránáram (I_{net} mid-plateau) és az akciós potenciál hossza (APD_{90}). A nettó membránáramot a plateau közepén mért feszültségváltozási sebesség és a membránkapacitás alapján ki tudjuk számítani. A kísérletek során áram-clamp módszerrel akciós potenciálokat rögzítettünk 0,2 Hz és 2,5 Hz közötti ingerlési frekvenciákat alkalmazva. Az APD_{90} és a I_{net} mid-plateau között fordított arányosságot találtunk.

II. Az I_{Ks} vizsgálata chromanol-293B alkalmazásával

II.1. A chromanol hatása az akciós potenciál alakjára

A chromanol frekvenciafüggő módon nyújtotta az akciós potenciálokat, azonban más paramétereket nem változtatott meg. Az APD_{50} és APD_{90} értéke 10 μ M chromanol hatására rendre $152.0 \pm 7,4$ ms-ról $158 \pm 10,9$ ms-ra, illetve $200,5 \pm 8,2$ ms-ról $209,7 \pm 10,8$ ms-ra nőtt 1 Hz-es frekvencián. A nyújtó hatás tehát mérsékelt (az APD_{50} és APD_{90} esetén $6,0 \pm 1,6$ ms-os, illetve $9,2 \pm 3,5$ ms-os), ám statisztikailag szignifikáns volt. A chromanol akciós potenciál hosszát növelő hatása kifejezettebb volt nagyobb ciklushosszakon. A chromanol kezelés nem okozott szignifikáns különbségeket az akciós potenciál egyéb paramétereit illetően.

II.2. A chromanol hatása isoproterenol és E-4031 jelenlétében

Az alábbi kísérletekben 10 μ M chromanol hatását vizsgáltuk 2 nM isoproterenol előkezelés után, valamint 1 μ M E-4031 jelenlétében. Az isoproterenol ebben a koncentrációban megemelte a plateau amplitúdóját, ám nem volt hatása az APD_{95} -re. Az E-4031 mind a plateau amplitúdóját, mind az APD_{95} -t növelte. A két szer hatásai a ciklushossz növelésével egyre kifejezettebbé váltak. A chromanol által okozott akciós potenciál nyúlás jelentősen felerősödött mind isoproterenol mind E-4031 jelenlétében. Ez a hatás szintén fordított frekvenciafüggést mutatott.

A jelen munkánk egyik fontos célja volt, hogy megkeressük azokat az akciós potenciál paramétereket, amelyek felelősek lehetnek az I_{Ks} aktiválásáért. Ezekre a paraméterekre a chromanol által létrehozott APD hosszabbító hatásból próbáltunk következtetni. Ezért a chromanol-indukált akciós potenciál nyújtó hatás és az APD_{95} , valamint a plateau amplitúdója között kerestünk korrelációt, isoproterenol illetve E-4031 jelenlétében. A chromanol akciós potenciált nyújtó hatása jól korrelált a plateau amplitúdójával, azonban nem találtunk összefüggést a chromanol-indukált akciós potenciál nyújtó hatás és az APD_{95} között sem isoproterenol, sem E-4031 esetében. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a plateau fázis amplitúdója az I_{Ks} aktivációjának fontos tényezője az akciós potenciál alatt, függetlenül attól, hogy mi idézi elő a plateau megemelkedését.

II.3. A chromanol hatása befelé irányuló árammal kezelt myocytákon

Mivel az isoproterenolról kutyából származó preparátumokon kimutatták, hogy megváltoztatja az I_{Ks} kinetikáját, ezért keresnünk kellett egy olyan vizsgálati módszert, mely úgy okozza a plateau fázis megemelkedését, hogy közben nem változtatja meg az I_{Ks} áramot létrehozó $K_v7.1$ csatornák foszforilációs állapotát. Módszerünk a következő volt: a mikroelektrodán keresztül áram-clamp módban négyszögjelnek megfelelő befelé irányuló árammal tonizáltuk a sejteket az akciós potenciál csúcsától kezdődően. A négyszögjelek 170 ms hosszúak voltak, amplitúdójukat 100-500 pA-ig változtattuk 100 pA-es lépcsőkben. A tonizáló lépéseket mind kontroll körülmények között, mind chromanol előkezelés után megismételtük ugyanazon a sejten. Módszerünk segítségével a chromanol által létrehozott akciós potenciál időtartam növelést több különböző APD_{95} és plateau amplitúdó esetén is megvizsgálhattuk ugyanazon a preparátumon. A befelé irányuló áram alkalmazása — a vártak megfelelően — mind a plateau fázis amplitúdóját, mind az APD_{95} -t megnövelte. Ezek a hatások kifejezettebbek voltak 10 μ M chromanol jelenlétében, mint kontroll körülmények között. Az isoproterenollal és az E-4031-gyel végzett kísérleteinkhez hasonlóan a

chromanol által indukált akciós potenciál nyújtó hatás arányos volt a plató amplitúdójával, azonban nem függött az akciós potenciálok hosszától.

II.4. Az I_{Ks} áramprofil meghatározása matematikai modellezéssel

Matematikai szimulációinkhoz a módosított Viswanathan modellt használtuk. Modellkísérleteink során szintén a plateau magasságának és az akciós potenciál hosszának hatását vizsgáltuk az I_{Ks} áramsűrűségére. Vizsgálatainkhoz egyetlen korábban rögzített akciós potenciált használtunk, melyből akciós potenciál sorozatot készítettünk. A sorozat egyes elemei csak a plateau fázisuk magasságában, vagy a hosszukban különböztek egymástól. A szimuláció során a számítógépes program a betáplált akciós potenciálok, és az alkalmazott modell alapján kiszámította az I_{Ks} áram profilját az adott akciós potenciál alatt. A plateau fázis amplitúdókat és az APD_{95} értékeket úgy választottuk meg, hogy átfedjenek az isoproterenol, E-4031 és a tonizáló kísérletekben kapott eredményekkel. A szimulált I_{Ks} áramgörbék amplitúdója jelentősen függött a plateau magasságától: a plató amplitúdójának 72 mV-ról 102 mV-ra történő növelése mintegy négyszeres I_{Ks} amplitúdó növekedést okozott. Az I_{Ks} amplitúdó változott az APD_{95} függvényében is, ám az APD_{95} közel megkétszerezése (180 ms-ról 350 ms-ra növelése) az I_{Ks} maximumát csak mintegy 50 %-kal növelte.

A fenti eredmények szintén arra engednek következtetni, hogy az I_{Ks} aktiválódását elsősorban a plateau magassága határozza meg.

III. Az L-364,373 hatása az I_{Ks} -re kutya bal kamrai szívműködésén

Mivel az I_{Ks} áramot — főként kis amplitúdója miatt — nem tudtuk megbízhatóan jellemezni akciós potenciál clamp körülmények között, ezért felvetődött az I_{Ks} farmakológiai felerősítés utáni vizsgálatának lehetősége. A vizsgálatok elvégzéséhez ideális jelöltnek látszott az L-364,373 anyag. Erről korábban kimutatták, hogy mikromólos koncentrációkban alkalmazva többszörösére növelte az I_{Ks} amplitúdóját tengerimalac és nyúl preparátumokon is. Ahhoz azonban, hogy akciós potenciál clamp körülmények

között alkalmazhassuk a szert, meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy az L-364,373 az általunk vizsgálni kívánt kutya bal kamrai szívizomsejteken szintén megnöveli az I_{Ks} amplitúdóját. Ezen kísérletek elvégzéséhez hagyományos feszültség-clamp eljárást használtunk. Ahhoz, hogy az L-364,373 anyag hatását megítélhessük, referenciamolekulaként (pozitív kontrollként) a mefénaminsavat alkalmaztuk.

100 μ M mefénaminsav szignifikánsan növelte mind a +30 mV-on mért teljesen aktivált I_{Ks} áramot ($2,68 \pm 0,47$ pA/pF vs. $4,46 \pm 0,98$ pA/pF), mind az I_{Ks} farokáramok amplitúdóját ($1,04 \pm 0,14$ pA/pF vs. $1,77 \pm 0,39$ pA/pF), melyet a tartópotenciálra visszatérve –40 mV-on mértünk. A mefénaminsav hatása feszültségfüggést mutatott: az I_{Ks} farokáramok amplitúdóját kifejezettebben növelte kevésbé pozitív prepotenciálok esetén. A mefénaminsav I_{Ks} aktiváló hatása az áram feszültségfüggésének negatívabb feszültségértékek irányába történő eltolása révén valósult meg. Az I_{Ks} amplitúdójának növelésén kívül a mefénaminsav 100 μ M-os koncentrációban szignifikánsan növelte az áram deaktivációs időállandóját is (74 ± 15 ms vs. 186 ± 37 ms).

Az L-364,373 anyag hatását 0,1 μ M, 1 μ M és 3 μ M-os koncentrációkban vizsgáltuk. A mefénaminsavval ellentétben az L-364,373 nem növelte az I_{Ks} áramok amplitúdóját az általunk vizsgált membránpotenciál-tartományban. A teljesen aktivált áramok amplitúdói $3,94 \pm 0,36$ pA/pF; valamint $3,62 \pm 0,53$ pA/pF; $3,59 \pm 0,53$ pA/pF; $3,08 \pm 0,46$ pA/pF voltak, rendre normál Tyrode oldatban, illetve 0,1 μ M; 1 μ M és 3 μ M L-364,373 jelenlétében. A farokáramok amplitúdói a következőképpen alakultak: $1,23 \pm 0,1$ pA/pF, illetve $1,21 \pm 0,13$ pA/pF; $1,15 \pm 0,12$ pA/pF; $1,14 \pm 0,04$ pA/pF rendre normál Tyrode oldatban, illetve 0,1 μ M; 1 μ M és 3 μ M L-364,373 alkalmazása során. Az L-364,373 anyag I_{Ks} áramamplitúdókat csökkentő hatása a 3 μ M-os koncentráció esetén szignifikáns volt. Mindezek mellett az L-364,373 anyag a mefénaminsavhoz hasonlóan, szintén lassította az áram deaktivációját. A deaktivációs időállandókat rendre 66 ± 3 ms-nak, illetve 73 ± 8 ms-nak; 78 ± 8 ms-nak és 87 ± 10 ms-nak mértük normál Tyrode oldatban, illetve 0,1 μ M; 1 μ M és 3 μ M L-364,373 anyag jelenlétében.

Megbeszélés

Az egyes káliumáramok szerepe a kutya bal kamrai munkaizomsejtek repolarizációjában mindmáig nem tisztázott pontosan. Munkánk során négy, a kutya kamrai szívizomsejteken megtalálható káliumáram (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) akciós potenciál repolarizációjában játszott szerepét jellemeztük. Ezek közül három (I_{to} , I_{Kr} , I_{K1}) áram profilját maradéktalanul meg tudtuk jeleníteni akciós potenciál clamp technikával. Ez a technika a legalkalmasabb az áramok tényleges akciós potenciál alatti lefutásának megítélésére a fiziológiához leginkább közelítő körülmények miatt. Továbbá megvizsgáltuk az egyes ionáramok frekvenciafüggő sajátosságait is, hogy a repolarizációban betöltött szerepüket még pontosabban meghatározhassuk.

I. Káliumáramok lefutása a kamrai akciós potenciál során

A jelen munka jelentőségét az adja, hogy először mi írtuk le pontosan az I_{to} , I_{Kr} és I_{K1} akciós potenciál alatti megjelenését kutya bal kamrai szívizomsejteken, valamint parametrikusan is jellemeztük ezeket az áramokat. A három áram közül kettő (nevezetesen az I_{Kr} és I_{K1}) erősen befelé egyenirányító karakterű. Emiatt a hagyományos, négyszögimpulzusokkal végzett feszültség-clamp mérésekből csak nagyon bizonytalanul, matematikai modellezéssel lehet egy tényleges akciós potenciál alatt kialakuló tulajdonságaikra következtetni.

Az I_{Ks} áramot akciós potenciál clamp technika alkalmazásával nem tudtuk kielégítően megítélni, így ennél az áramnál az I_{Ks} szelektív gátlószerének segítségével próbáltunk következtetni az áram repolarizációban betöltött szerepére.

Az I_{Kr} általunk 1 Hz-es ingerlőfrekvencián akciós potenciál clamp módszerrel mért átlagosan 0,62 pA/pF nagyságú amplitúdója hasonló nagyságú a korábban már Hua és munkatársai által szintén kutya myocyták esetén kapott 0,55 pA/pF-os értékhez, ám kisebb, mint a tengerimalacokon eddig leírt 0,86 pA/pF nagyságú áramcsúcs. Jelen kísérletek során az I_{K1} maximuma (1,8 pA/pF) is kisebb volt, mint amiket a tengerimalac modelleket

használók leírtak. Az I_{Kr} és I_{K1} áramban tapasztalható különbségeken túl tengerimalacokban nagyobb a plateau fázis során folyó $I_{Ca,L}$, mint kutyákban. Ezek alapján megállapítható, hogy a kutya szívműködése a plateau fázis során kisebb transzmembrán áramokkal dolgozik, mint a tengerimalacok cardiomyocytái. Így a plateau fázis alatti finom elektromos egyensúly kevesebb energia befektetésével valósulhat meg kutyákban.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy mind az I_{Kr} , mind az I_{K1} fokozatosan növekedett, ahogy a membrán a plateau fázis után egyre inkább repolarizálódott. Az I_{Kr} 7 ms-mal a V_{max}^- időpontja előtt, $-54,2 \pm 1,7$ mV-os membránpotenciál-értéken, míg az I_{K1} 1 ms-mal a V_{max}^- után, $-58,3 \pm 0,6$ mV-on érte el maximumát. Megfigyeléseink alapján tehát valószínű, hogy az I_{Kr} felgyorsítja a repolarizáció végső szakaszát, és ezzel mintegy „triggereli” az I_{K1} áramot. Az a szűk membránpotenciál-tartomány, ahol az I_{Kr} és I_{K1} elérte maximumát szintén azt sugallja, hogy a két áram aktiválódását inkább a membránpotenciál irányítja, mint valamely időfüggő tényező. A repolarizáció végső fázisának ezzel a pozitív visszacsatolási mechanizmusával összhangban a repolarizáció legnagyobb sebességének időpillanatában a nettó membránáram mintegy egynegyedét az I_{Kr} , a fennmaradó háromnegyedét pedig az I_{K1} szolgáltatta. Az I_{K1} áram maximális értéke és a V_{max}^- közötti korreláció alapján kijelenthetjük, hogy a repolarizáció legnagyobb sebességét elsősorban az I_{K1} határozza meg kutya kamrai szívműködéseken.

Érdekes módon azonban nem találtunk összefüggést egyetlen általunk vizsgált ionáramok nagysága és az akciós potenciál hosszúsága között, ami többféle módon magyarázható. Egyrészt valószínű, hogy a repolarizáció kezdetét nem egyetlen ionáram, hanem a plateau fázis során folyó ionáramok elektromos egyensúlya együttesen határozza meg. Másrészt a plateau fázis során és a repolarizáció kezdetekor folyhatnak olyan áramok, melyek csatornafehérjéit molekuláris biológiai módszerekkel már kimutattak a szívműködéseken membránjában, azonban ezeket elektrofiziológiai szempontból még mind a mai napig nem sikerült kellően jellemezni (például transzmembrán klorid áramok).

Bár a három általunk vizsgált ionáram által szállított töltésmennyiség hasonló nagyságrendű volt (I_{to} : $29,7 \pm 2,5$ fC/pF; I_{Kr} : $57,6 \pm 6,7$ fC/pF; I_{K1} : $61,6 \pm 6,2$ fC/pF), az akciós potenciál során játszott szerepük jelentősen különbözőnek tűnik.

Megfigyeléseink szerint a vizsgált áramok az akciós potenciál során egymást követően aktiválódnak, és az akciós potenciál eltérő részein biztosítják a kifelé irányuló, repolarizáló áramot. Eredményeink alapján az I_{to} a korai repolarizáció során, az I_{Kr} a plató fázis közepétől kezdődően a végső repolarizáció triggereléséig, az I_{K1} pedig a repolarizáció teljessé tételében játszik szerepet.

Az I_{to} az akciós potenciál felszálló szára után gyorsan aktiválódik és a plateau fázis legelején aktív, és meghatározza a korai repolarizáció kialakulását. Mivel azonban gyorsan, 7,4 ms-os időállandóval lecseng, szinte kizárható, hogy a végső repolarizációban az I_{to} bármilyen szerepet is játszana. Hasonló megfontolás alapján nem valószínű, hogy az I_{to} befolyásolhatná az akciós potenciál hosszát. Sun és munkatársai is erre világítottak rá elegáns dinamikus clamp kísérletsorozatukban. Vizsgálataik során kutya bal kamrájából származó subendocardialis sejtekbe „illesztették” az I_{to} áramot, amely következtében a sejteken megjelent a subepicardialis myocytákra jellemző „tüske és dóm” akciós potenciál morfológia, ám az akciós potenciálok hosszúsága nem változott. A fenti megfontolások miatt az I_{to} késői repolarizációban betöltött szerepét nem elemeztük tovább.

A késői egyenirányító káliumáram lassú komponensének (I_{Ks}) akciós potenciál clamp technikával történő megítélésére vonatkozó kísérleteink technikai nehézségek miatt nem hoztak megfelelően értelmezhető eredményt. Az áram kicsiny amplitúdója, amely a kísérleti elrendezés zajszintjének mindössze 3-szorosa volt, nem tette lehetővé az áram akciós potenciál alatti lefutásának precíz megítélését, emiatt — a többi káliumárammal ellentétben — az I_{Ks} -t nem jellemeztük akciós potenciál clamp körülmények között végzett kísérletsorozatunkban.

Az I_{Kr} és I_{K1} áramokra vonatkozóan azt láttuk, hogy a plateau fázis közepén folyó nettó transzmembrán áram ($I_{net}=C_m \cdot dU/dt$) közel azonos az ugyanekkor mérhető I_{Kr} és I_{K1} áramok összegével. Ez valószínűleg nem azt jelenti, hogy ekkor nem folyik más ionáram, hanem azt, hogy a többi ekkor jelen levő kifelé és befelé irányuló áram nagyjából kiegyenlíti egymást.

Az akciós potenciál clamp kísérletek során jól megjeleníthetők az egyes ionáramok akciós potenciál alatt folyó tényleges profiljai, amennyiben egy megfelelően szelektív gátlószer áll rendelkezésünkre, amellyel teljes gátlás elérhető. Mindkét követelménynek azonban kizárólag az I_{Kr} gátlására használt E-4031 felelt meg az általunk alkalmazott szerek közül. Sajnos sem a 4-aminopyridin, sem a $BaCl_2$ nem teljesen specifikus abban a koncentrációban, amely már teljes I_{to} illetve I_{K1} gátlást okoz.

Ilyen esetben a legjobb stratégia, ha alacsonyabb, még éppen szelektívnek ítélt koncentrációk alkalmazásával elkerüljük az egyéb áramokkal történő kontaminációt, mint ahogy azt a jelen kísérletek során is láthattuk. 50 μM $BaCl_2$ az I_{K1} 88 %-át gátolja -58 mV-os membránpotenciálon, ott, ahol mi az áram csúcsértékét észleltük a repolarizáció során. Az I_{to} gátló 4-aminopyridint 1 mM-os koncentrációban használtuk, mely nagyjából 70 %-os gátlást okoz. Emiatt ha a tényleges áramértékeket szeretnénk tudni, az I_{to} esetén nagyjából 1,14-szoros, míg az I_{K1} esetén mintegy 1,43-szoros szorzófaktort kell alkalmaznunk. Méréseink alapján a 4-aminopyridin 1 mM-os koncentrációban elég szelektív, mivel a 4-aminopyridin-érzékeny áram diagramján a plateau fázis kezdete után végig nulla áram folyt, tehát 1 mM 4-aminopyridin nem befolyásolta az akciós potenciál végső repolarizációja során maximumot mutató I_{Kr} , illetve I_{K1} áramot.

Az akciós potenciál hosszúságának frekvenciafüggő tulajdonsága régóta foglalkoztatja az elektrofiziológiával foglalkozó kutatókat. A frekvenciafüggő sajátságokat legtöbbször az akciós potenciált kialakító ionáramok frekvenciafüggésével próbálják magyarázni. Eredményeink szerint sem az I_{Kr} sem az I_{K1} nem volt frekvenciafüggő az általunk vizsgált 0,2 Hz–1,66 Hz-es tartományban. Ez nem meglepő az I_{K1} vonatkozásában, ám az I_{Kr} lassú

deaktivációs kinetikája alapján joggal feltételezték, hogy ez az ionáram hozzájárul az akciós potenciál gyorsabb ingerlés során tapasztalt rövidüléséhez. Saját kísérleteink alapján azonban azt a következtetést kell levonnunk, hogy — lassú deaktivációja ellenére — az I_{Kr} nem akkumulálódik. Ezt azért jelenthetjük ki, mert az I_{Kr} farokáramok amplitúdója nem függött a farokáram aktiválásához közvetlenül felhasznált impulzus és az azt megelőző depolarizáló jel közötti időintervallumtól. Feltehetően az okozza az I_{Kr} akkumulációjának hiányát, hogy az akciós potenciál teljes repolarizációja után nyitvamaradó $K_v11.1$ csatornák bezárulnak a következő akciós potenciál felszálló szára alatt.

Korábbi $K_v11.1$ csatornákat expresszálo HEK sejteken végzett megfigyelések alapján az I_{Kr} tág ingerlési frekvencia tartományban sem mutatott frekvenciafüggést. Kutyaszív bal kamrájából származó subendocardialis cardiomyocytaon Hua és munkatársai sem tudtak kimutatni szignifikáns frekvenciafüggő változásokat az I_{Kr} vonatkozásában 2 Hz-nél lassabb ingerlés esetén, ám 3,3 Hz-nél gyorsabb ingerlés során az I_{Kr} maximális értéke csökkent, míg a diastole során folyó I_{Kr} esetén növekedést tapasztaltak.

Az I_{K1} farokáramok kapcsán is kimutatták, hogy nagyobb ingerlési frekvencián módosulnak, ám ezek a változások 0,3 s-on belül visszaálltak az eredeti értékre. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy az akciós potenciálok hosszúságának frekvenciafüggő változásáért nem az I_{Kr} vagy az I_{K1} , hanem más ionáram(ok) tulajdonságaiban bekövetkező változások tehetők felelőssé.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a jelen kísérleteink szerint sem az I_{Kr} , sem az I_{K1} nem mutatott frekvenciafüggő változást 0,2–1,66 Hz-es ingerlés során. Ez azt jelenti, hogy ennek a két ionáramnak — az I_{to} -val és az I_{Ks} -sel együtt — csekély lehetősége lehet a kamrai munkaizomsejtek akciós potenciál hosszúságának befolyásolásában normál vagy alacsony szívfrekvenciák esetén.

II. Az I_{Ks} hozzájárulása a repolarizációhoz

A szakirodalomban mindmáig vitatott kérdés, hogy az I_{Ks} hozzájárul-e, és ha igen, akkor mennyiben a kutya kamrai myocyták repolarizációjához. Több tanulmány eredménye szerint az I_{Ks} normál körülmények között nem vesz részt a kutya kamrai szívimsejtek repolarizációjában, melyet az áram túlságosan lassú aktivációjával és viszonylag gyors deaktivációjával magyaráznak. Saját eredményeink alapján azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy az I_{Ks} fiziológias körülmények között is hozzájárul a kutya bal kamrai szívimsejtek repolarizációjához. Ezt az alapján jelenthetjük ki, hogy a chromanol — bár kismértékű, de — statisztikailag szignifikáns akciós potenciált nyújtó hatással bírt kísérleteink során 0,5 Hz-nél nagyobb ingerlési frekvenciákat alkalmazva.

Kimutattuk továbbá, hogy az I_{Ks} repolarizációban való részvételét elsősorban a plateau fázis magassága (membránpotenciálértéke) határozza meg. Alátámasztottuk a chromanol akciós potenciál hosszúságot növelő hatásának felerősödését isoproterenol illetve E-4031 jelenlétében, mely megerősíti néhány korábbi vizsgálat eredményeit.

Az I_{Ks} normál kamrai repolarizációhoz történő hozzájárulását vitató tanulmányok mindegyikében szintén megfigyelték az I_{Ks} gátlására alkalmazott szerek (chromanol-293B, HMR-1556, és L-735,821) akciós potenciál nyújtó hatását, azonban ezt a hatást a szerzők nem találták szignifikánsnak. Az általunk elvégzett mérések alapján ez az akciós potenciált nyújtó hatás szignifikánsnak bizonyult, bár kétségtelen, hogy mindössze $9,2 \pm 3,5$ ms volt az APD_{90} esetén. Másrészt viszont bármely, a plateau fázis magasságát növelő beavatkozás (isoproterenollal, illetve E-4031-gyel történő előkezelés, valamint befelé irányuló áramimpulzusok alkalmazása) drámaian megnövelte a chromanol által okozott akciós potenciál hosszabbodást. Ezeket az eredményeket alátámasztottuk matematikai szimulációkkal is, melyek alapján a plateau amplitúdóját 72 mV-ról 107 mV-ra növelve (ami -80 mV-os nyugalmi membránpotenciált feltételezve abszolút értékben -8 mV-ról $+27$ mV-ra

növelné a plateau magasságát) megközelítőleg négyszeres növekedést tapasztaltunk az I_{Ks} áram maximumértékében. A plateau magasságának változása tehát az I_{Ks} feszültségfüggő aktiválódását befolyásolja, és ez megmagyarázhatja a témakörben fellelhető vizsgálatok oly eltérő következtetéseit. Így például egy tengerimalac kamrai szívműködésében a plateau abszolút potenciálja akár +30 mV-nál is nagyobb lehet, míg kutya Purkinje sejtekben ugyanez az érték akár a negatív feszültségtartományba is eshet. Ennek megfelelően az előbb említett két preparátum esetén jelentős különbségeket tapasztaltak I_{Ks} gátlószerek alkalmazása során. Míg Bosch és munkatársai az I_{Ks} gátlás kifejezett akciós potenciál hosszúságot növelő hatását írták le tengerimalac kamrai sejteken, addig Varró és munkatársai kutya Purkinje sejteken gyakorlatilag nem tapasztaltak akciós potenciál hosszúság változást. Saját, kutya kamrai munkaműködésén végzett kísérleteink során a plateau potenciál +10 mV környékén volt, ami jól magyarázza a chromanol által kifejtett szignifikáns, ám mérsékelt akciós potenciált nyújtó hatást. Nakashima és munkatársai szintén hasonló következtetésre jutottak, ugyanis β -adrenerg receptor gátlás alkalmazása és az I_{Ks} egyidejű gátlásának hatására elhúzódó kamrai repolarizációt figyeltek meg.

A chromanol által indukált APD nyújtás és a plateau fázis magassága közötti jó korrelációval szemben szinte semmi összefüggés nem mutatkozott a chromanol akciós potenciált meghosszabbító hatása és az APD_{95} között. Ez látszólag ellentétes a matematikai modell segítségével kapott lineáris összefüggéssel.

Az ellentmondást azzal tudjuk feloldani, ha meggondoljuk, hogy az *in vitro* kísérletek során kismértékben bár, de kétségtelenül ingadozott mind az akciós potenciálok hossza, mind az akciós potenciálok plateau fázisainak amplitúdója. Ezzel szemben az *in silico* modellezés során kizárólag az akciós potenciál egyik paraméterét változtattuk. Így ha elfogadjuk az *in silico* kísérletek alapján kapott összefüggéseket, az bizonyos, hogy az APD_{95} és az I_{Ks} amplitúdója közötti korrelációt sokkal nehezebb lesz *in vitro* kimutatni az

összefüggés kisebb meredeksége miatt. Ez tehát azt jelenti, hogy az APD_{95} és az I_{Ks} amplitúdója között lehet összefüggés, de elképzelhető, hogy a szívizomsejtek plateau fázis magasságának véletlenszerű ingadozása miatt az általunk elvégzett *in vitro* kísérletek ezt az összefüggést nem tudták megjeleníteni.

Varró és munkatársai a chromanol által okozott akciós potenciál nyúlás felerősödését figyelték meg, amennyiben az akciós potenciált előzőleg veratrin vagy E-4031 előkezeléssel hosszabbították meg, így sejtetve az akciós potenciál eredeti hosszának szerepét a chromanol-indukált nyújtó hatásban. Mivel azonban a veratrinról és az E-4031-ről is ismert, hogy növelik a plateau fázis amplitúdóját, nem zárhatjuk ki ennek szerepét sem a szerzők által megfigyelt chromanol-indukált nyújtó hatásban. Az is említésre méltó továbbá, hogy saját kísérleteink során a legkifejezettebb chromanol-indukált akciós potenciál nyúlást éppen E-4031 jelenlétében láttuk, annak ellenére, hogy az E-4031 jóval kevésbé emelte a plateau magasságát, mint például az isoproterenol. Ez a megfigyelés alátámaszthatja az akciós potenciál hosszának szerepét az I_{Ks} aktiválásában.

Figyelembe véve azonban az APD_{95} és a chromanol-indukált APD növelés közötti gyenge korrelációt, valószínűbbnek tűnik, hogy az I_{Kr} gátlása megnövelte az I_{Ks} relatív hozzájárulását a repolarizációhoz, és emiatt hozhatott létre a chromanol olyan kifejezett akciós potenciál nyúlást E-4031 jelenlétében. Ennek értelmében az I_{Ks} — ha nem is járul hozzá olyan jelentősen a normál körülmények közötti repolarizációban — mintegy „repolarizációs tartalékot” képez, ahogy azt már több közlemény is felvetette. Tehát ha a repolarizáció túlzottan elhúzódna, az I_{Ks} már elegendő mértékben aktiválódhat ahhoz, hogy megrövidítse az akciós potenciált. Emiatt valószínűsíthetjük, hogy a chromanol által indukált akciós potenciál nyúlás jelentékenyebb lesz bármely olyan állapotban, amikor a repolarizációs tartalék csökkent.

Hasonló logikával látható be a chromanol által indukált akciós potenciál nyúlás fordított frekvenciafüggése is. Rocchetti és munkatársai tengerimalac

kamraizomsejteken az I_{Kr} frekvenciafüggő akkumulációját tapasztalták, és ezért felvetették az I_{Kr} repolarizációban játszott jelentősebb szerepét gyorsabb szív működés esetén. Saját, kutya kamrai myocytákon nyert adataink azonban ennek ellentmondanak, ugyanis az I_{Kr} nem volt frekvenciafüggő az általunk vizsgált 0,2 Hz–1,66 Hz-es tartományban. Mivel az I_{Ks} 500 ms-nál nagyobb ciklushosszok esetén nem akkumulálódik kutya kamrai myocytákban, így az I_{Ks} -nek szintén megkérdőjelezhető a szerepe a nagyobb szívfrekvenciákon tapasztalt rövidebb akciós potenciálok kialakításában.

Mivel a szívizomsejtek akciós potenciáljának kialakításában sok befelé és kifelé irányuló áram együttesen vesz részt, ezért bármely, a plateau fázis magasságának növelését okozó manipuláció bizonyosan több, a repolarizációban szerepet játszó ionáram tulajdonságait is megváltoztatja. A késői egyenirányító káliumáram komponenseinek (I_{Kr} , I_{Ks}) növelésén kívül például egyidejűleg az L-típusú kalciumcsatornákon keresztül lejátszódó kalciumbelépés hajtóereje is csökken a plateau fázis potenciáljának növekedésével. Így az $I_{Ca,L}$ csökkenése miatt kisebb befelé irányuló áram folyik, ami szükségszerűen a nettó ionáramot eltolja a kifelé irányuló áramok irányába. A kifelé irányuló áramok kifejezettebbé válása pedig megnöveli a repolarizációs rezervet. Ennek épp az ellenkezője várható isoproterenol jelenlétében, ugyanis β -adrenerg hatás során a kalciumáram jelentősen növekszik. Ezeken kívül még több más ionáram tulajdonságai is függhetnek a plateau fázis magasságától, amiket figyelembe véve tovább módosulhat a korábbi, kizárólag az I_{Ks} szerepére koncentrált értékelés.

II.1. Klinikai vonatkozások

Az I_{Ks} áramot szelektíven gátló anyagok (például az általunk is alkalmazott chromanol-293B) fejlesztéséhez nagy reményeket fűztek, mert úgy gondolták, hogy kevésbé kifejezett az arrhythmogén hatásuk, mint az I_{Kr} gátlószereinek. Ezt az elképzelést arra alapozták, hogy az I_{Ks} gátlószereinek hatásában talán kevésbé nyilvánul meg a klinikai szempontból igen kedvezőtlen fordított frekvenciafüggő tulajdonság, ami a tisztán I_{Kr} -t blokkoló anyagokat egytől-

egyig jellemzi. Azonban az általunk végzett kísérletekből — sok más, hasonló eredményt felmutató vizsgálattal együtt — az derül ki, hogy a helyzet nem egészen felel meg a fenti optimista várakozásoknak.

A jelen tanulmányban a chromanol hatását két, főként kóros esetekben fennálló állapotban is teszteltük. Az isoproterenolt alacsony koncentrációban (2 nM) alkalmazva a fokozott szimpatikus tónushoz hasonló környezetet igyekeztünk teremteni. A szimpatikus tónus növekedése megfigyelhető több kardiológiai kórállapotban is, így például a magasvérnyomás-betegség, az angina pectoris, vagy éppen a szívinfarktus. Eredményeink azt mutatták, hogy a chromanol akciós potenciált nyújtó hatása (ami tulajdonképpen az elvart III. osztályú antiarrhythmias működés) jelentősen kifejezettebb volt isoproterenol jelenlétében. Ez a tény — az I_{Ks} normál repolarizáció során játszott alárendelt szerepe ellenére — annak a lehetőségét vetíti előre, hogy *in vivo* jelentősen nagyobb mértékű akciós potenciál nyújtó hatása lehet a chromanolnak, különösképp fokozott szimpatikus tónussal járó esetekben. Ehhez hasonló következtetésre jutottak Volders és munkatársai, valamint Jost és munkatársai kutya, illetve humán kamraizomzatot tanulmányozva. Ezzel a megállapítással vitába lehet szállni, mondván, hogy az I_{Ks} gátlása mégis hasznos lehet klinikailag, mert a nagyobb szimpatikus izgalom önmagában is rövidíti az akciós potenciált, amit az I_{Ks} gátlás csak ellensúlyoz, és így meghosszabbítja a refrakter periódust. Bár az I_{Ks} gátlók valóban csökkentették a repolarizáció diszperzióját szívelégtelenségben szenvedő kutya modellekben, ám az I_{Ks} gátlószereit β -adrenerg stimulációt követően alkalmazva az akciós potenciálok hosszúságának heterogenitását és következményes arrhythmia kialakulását írták le.

Az I_{Kr} gátló E-4031 alkalmazásával a csökkent repolarizációs tartalékú kamraizomzat modellezése volt a célunk. A repolarizációs rezerv csökkenését több öröklött (például a bizonyos ioncsatornák mutációjával járó veleszületett hosszú QT szindrómák), és szerzett kórkép (elektrolitzavarok, gyógyszerek mellékhatása) is okozhatja. A helyzetet bonyolítja, hogy a csökkent repolarizációs tartalék sokszor rejtett marad, és — például egy további

repolarizáló ionáramot (terápiás céllal, vagy mellékhatásként) gátló gyógyszer adása során — csak egy manifeszt ritmuszavar következtében derül rá fény. Az egyébként is csökkent repolarizációs rezervet tovább ronthatják az I_{Ks} gátlószerei, így drámaian megnövelve a torsade de pointes típusú arrhythmia kialakulásának lehetőségét. Amennyiben az I_{Ks} blokád alacsony szívfrekvencia esetén, vagy a szimpatikus aktivitás növekedésekor (esetleg részlegesen már egyébként is gátolt I_{Kr} mellett) következik be, az arrhythmia létrejötte, és így a végzetes kimenetel is mind valószínűbbé válik. Ezek alapján mi úgy véljük, hogy az I_{Ks} gátlása jelentős proarrhythmias veszélyt rejthet magában. Összegzésül tehát elmondhatjuk, hogy az I_{Ks} gátlás, mint kezelési lehetőség inkább tűnik károsnak, mint hasznosnak, jóllehet a döntő klinikai vizsgálatok még tisztázhatják az I_{Ks} gátlásának terápiás hasznát.

III. Az L-364,373 nem növeli az I_{Ks} -t kutya kamrai szívizomsejteken

Korábban láttuk, hogy az I_{Ks} áramot — főként kis amplitúdója miatt — nem tudtuk megbízhatóan jellemezni akciós potenciál clamp körülmények között. Ezért megvizsgáltuk, hogy egy I_{Ks} aktivátor molekulával (L-364,373) fel tudjuk-e úgy erősíteni a vizsgálni kívánt áramot, hogy az lehetővé tegye az akciós potenciál clamp technika segítségével történő mérést.

A kísérletsorozat legfőbb következtetése az volt, hogy az L-364,373 anyag még 3 μ M-os koncentrációban sem növelte az I_{Ks} áramot kutya kamrai myocytákon. Ez éles ellentétben áll a korábbi, nyúl, illetve tengerimalac preparátumokon tapasztaltakkal, ahol az L-364,373 már 0,1–1 μ M-os koncentrációban is jelentősen növelte az I_{Ks} áramot azáltal, hogy az áram aktivációjának feszültségfüggését negatívabb membránpotenciálok felé tolta. Így az L-364,373 molekulát a továbbiakban nem tudtuk felhasználni az I_{Ks} felerősítésére a tervezett akciós potenciál clamp mérésekhez.

Az számunkra sem tisztázódott még, hogy mi lehet annak a molekuláris háttere, hogy az L-364,373 nem aktiválja az I_{Ks} áramot. A mefenaminsavról kimutatták, hogy kizárólag akkor növelte az I_{Ks} -t, ha az áramot létrehozó csatorna pórusformáló α alegységét ($K_v7.1$, $KCNQ1$) a szabályozásért felelős

β alegységgel (MinK, KCNE1) együtt expresszáltatták. Ezekkel a megfigyelésekkel ellentétben az L-364,373 anyag a heteromultimer csatorna összeszerelődését lehetővé tevő, KCNQ1 és KCNE1 gént is tartalmazó expressziós rendszerben nem mutatkozott hatásos I_{Ks} aktivátornak. Bár mind a mefénaminsav, mind az L-364,373 a pórusformáló $K_v7.1$ alegységhez kötődik, a két különböző kötőhelyet másképp befolyásolja a MinK-val történő kapcsolódás. Emiatt a fajok közötti eltérő $K_v7.1$ /MinK arány talán magyarázhatja az általunk kapott eredményeket. Ugyanerre mutatnak a korábban már említett nyúlból, illetve tengerimalcból származó L-364,373 anyagra vonatkozó megfigyelések is. Salata és munkatársai $0,1 \mu M$ L-364,373 jelenlétében az I_{Ks} amplitúdójának négyszeres növekedését észlelték tengerimalacban, a maximális aktiváló hatás ($1 \mu M$ esetén) pedig mintegy tizenötszörösnek (!) adódott. Ezzel ellentétben nyúl preparátumokon a $1 \mu M$ L-364,373 sokkal gyengébb hatását tapasztalták, így ennél kisebb koncentrációkat nem is alkalmaztak. Az a lehetőség, hogy az L-364,373 nem kötődne a $K_v7.1$ fehérjéhez kutya szívműködéseken eredményeink alapján kizárható, hiszen mind az L-364,373, mind a mefénaminsav megnövelte az I_{Ks} deaktivációs időállandóját a jelen kísérleti elrendezésben.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az L-364,373 humán gyógyászatban történő felhasználása az eddig rendelkezésre álló adatok alapján igencsak megkérdőjelezhető. Az biztos azonban, hogy a rágcsáló modellek nem alkalmasak a szer potenciális terápiás hasznának megítélésére. Elképzelhető, hogy — az emlős fajok közötti jelentős elektrofiziológiai különbségek megléte miatt — az I_{Ks} aktivátorok humán preparátumokon történő vizsgálata is szükségessé válhat a későbbiekben.

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények:

Bányász T, Magyar J, Szentandrassy N, Horváth B, Birinyi P, Szentmiklósi J, Nánási PP (2007) Action potential clamp fingerprints of K^+ currents in canine cardiomyocytes: their role in ventricular repolarization. *Acta Physiol*; 190: 189–198

[IF=2,085]

Horváth B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nánási PP, Bányász T (2006) Contribution of I_{Ks} to ventricular repolarization in canine myocytes. *Pflügers Arch* 452(6): 698–706

[IF=4,807]

Magyar J, Horváth B, Bányász T, Szentandrassy N, Birinyi P, Varró A, Szakonyi Z, Fülöp F, Nánási PP (2006) L-364,373 fails to activate the slow delayed rectifier K^+ current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373(1): 85–90

[IF=2,779]

Az értekezésben fel nem használt in extenso közlemények:

Virág L, Jost N, Acsai K, Horváth B, Bányász T, Bitay M, Bogáts G, Papp JGy, Varró A, Nánási PP (2009) Contribution of I_{Kr} and I_{K1} to ventricular repolarization in canine and human myocytes: is there any influence of action potential duration?. *Basic Res Cardiol* 104: 33–41

[IF=4,333; JCR 2007 alapján]

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

[IF=4,596; JCR 2007 alapján]

Szabó A, Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J (2007) Effects of articaine on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. *Brit J Anaesth* 99: 726–733

[IF=2,948]

Birinyi P, Acsai K, Bányász T, Tóth A, Horváth B, Virág L, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Fülöp F, Nánási PP (2005) Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na^+/Ca^{2+} exchange current and L-type Ca^{2+} current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 372(1): 63–70

[IF=2,098]