

Részletes szakmai beszámoló

A jelen kutatás célja a repolarizáló kálium áramok, elsősorban a tranziens kifelé haladó kálium áram (I_{to}) kamrai repolarizációban betöltött szerepének tanulmányozása volt. Legfrissebb információk szerint a specifikus I_{Ks} gátlónak tartott chromanol 293B a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensén (I_{Ks}) kívül blokkolja az I_{to} -t is. Ez lehetőséget adna annak tanulmányozására, hogy az I_{to} gátlása miképpen befolyásolja a kamrai repolarizációt. Specifikus I_{Ks} gátló (HMR-1556 vagy L-735,821) jelenlétében az akciós potenciálban chromanol 293B hatására bekövetkező változások ugyanis az I_{to} blokk hatását tükröznék. A kutatási terv keretében meg kívántuk vizsgálni, hogy befolyásol-e az I_{to} és a I_{Ks} áramokon kívül más kálium áramot a chromanol 293B? Tanulmányozni kívántuk, hogy az I_{to} ionáram gátlása (100 μ M chromanol 293B) hogyan befolyásolja a kamrai szívizom repolarizációját kutya endokardiális és epikardiális preparátumokon. Meg kívántuk vizsgálni az I_{to} áram kinetikai tulajdonságait és amplitúdóviszonyait is, amelyek választ adhatnak arra, hogy van-e jelentős szerepe az I_{to} lassan inaktiválódó fázisának az akciós potenciál repolarizációjában.

MÓDSZEREK

Intracelluláris mikroelektród technika

Az állatokat 30 mg/kg intravénás nátrium pentobarbitállal altattuk, szívüket laterális thoracotomián keresztül gyorsan kimetszettük, majd azonnal oxigenizált Tyrode tápoldatba helyeztük. A szívek jobb kamráiból epikardiális preparátumokat illetve papilláris izmokat preparáltunk ki, s ezeket egy körülbelül 50 ml-es szervfürdőbe helyeztük. A készítményeket ingerlővel, 1000 ms ciklushosszú, 2 ms széles, a földtől izolált impulzusokkal ingereltük bipoláris platina elektródok segítségével. A kísérletek kezdetét legalább egy óras "beállási" (inkubációs) periódus előzte meg 37°C-on. Akciós potenciálokat standard intracelluláris mikroelektród technikával vezettük el a preparátumokból. Az üvegapilláris mikroelektródokat 3 M-os KCl oldattal töltöttük meg, amelyek ellenállása így 5-20 M Ω . A jeleket nagy bemeneti ellenállású, megfelelően földelt, mikroelektróda erősítőbe vezettük. A transzmembrán akciós potenciál felszálló szárának első deriváltját (V_{max}) analóg deriválóval nyertük. Az ily módon felerősített jeleket oszcilloszkópon jelenítettük meg. A nyugalmi potenciál (RP) az akciós potenciál amplitúdó (APA) valamint az akciós potenciál repolarizációjának 50, és 90 %-os értékét (APD_{50-90}) - Intézetünkben kifejlesztett program segítségével - IBM 386-os számítógéppel mértük.

Patch-clamp technika

A kamrai miocitákat kollagenáz enzimessal emésztéssel izoláltuk. A sejtszuszpenzióból egy cseppet az inverziós mikroszkópra szerelt, átlátszó aljzatú szervfűrdőbe cseppentettünk és 10 percig hagytuk a sejteket leülepedni, mielőtt a szuperfúziót megindítottuk. A mérés során alkalmazott 1-2 μm csúcsi átmérőjű patch-pipetta elektródokat boroszilikát üvegapillárisokból húztuk. Az elektródokat standard intracelluláris pipettaoldattal töltöttük fel. Miután gyenge szívás segítségével létrehoztuk a nagy ellenállású (1-10 GOhm) kapcsolatot (az ún. "gigaseal") a pipetta és a sejtmembrán között, erős szívással vagy 1.5 V-os elektromos impulzusokkal a sejtmembránt, a pipetta hegyével érintkező részen, felszakítottuk. Így a sejt és a pipetta belseje közös teret alkot.

Az ionáramokat patch-clamp erősítővel (Axopatch-1D vagy Axopatch 200B, AXON INSTRUMENTS, Foster City CA, USA) a patch-clamp technika egész-sejtes (whole-cell) konfigurációjában regisztráltuk. Az erősítő kimenetét egy 333 kHz-es analóg-digitális konverterhez (DIGIDATA 1200, AXON INSTRUMENTS, Foster City CA, USA) és számítógéphez csatlakoztattuk. A számítógépben, PCLAMP (AXON INSTRUMENTS, Foster City CA, USA) szoftver segítségével, a kísérleti adatokat regisztráltuk és tároltuk. Az eredményeket "off line", szintén a PCLAMP programmal analizáltuk. A méréseket 36 – 37 °C-on végeztük.

EREDMÉNYEK

Az I_{to} áramnak a kamrai repolarizációs folyamatban betöltött szerepét specifikus I_{to} gátló hiánya miatt nehéz vizsgálni. Nemrégén leírták, hogy két póktoxin – a phrixotoxin és a heteropodatoxin – specifikusan gátolja a Kv4 csatornákat. A kutya és humán I_{to} áram pedig nagyjából ezekből az alegységekből épül fel. Amennyiben ezek a toxinok specifikusan gátolják a natív I_{to} áramot is, úgy a phrixotoxin és/vagy a heteropodatoxin alkalmas eszköz a célkitűzésünkben megfogalmazott kérdések megválaszolására. Sajnos a phrixotoxin nem befolyásolta az I_{to} áramot kutya bal kamrai miocitákban, a heteropodatoxinnal pedig ellentmondásos eredményeket kaptunk. Mivel ezek az anyagok nagyon drágák, ezeket a méréseket leállítottuk. Így, a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének (I_{Ks}) egyik gátlószerét - a chromanol 293B-t – kívántuk használni kísérleteinkben, ami nem csak az I_{Ks} áramot, hanem nagy koncentrációban (100 μM) az I_{to} áramot is nagymértékben gátolja. Így a teljes I_{Ks} blokk jelenlétében az akciós potenciál repolarizációjában és az ionáramokban

chromanol 293B hatására létrejött változások a szer I_{to} áramra gyakorolt hatásának tulajdoníthatók.

Megvizsgáltuk 100 μM chromanol 293B hatását néhány fontos repolarizáló kálium áramra, nevezetesen a tranziens kifelé haladó kálium áramra, a befelé egyenirányító kálium áramra (I_{K1}) és a gyors késői egyenirányító kálium áramra (I_{Kr}) kutya bal kamrai miocitákon. A méréseket 0.5 μM HMR-1556 és 1 μM nisoldipin jelenlétében végeztük, hogy gátoljuk az I_{Ks} és az L-típusú kalcium áramokat (I_{Ca}). 100 μM chromanol 293B jelentősen csökkentette az I_{to} áram amplitúdóját. 20 mV-nál negatívabb membránpotenciálokon a blokk majdnem teljes volt, míg ennél pozitívabb teszt potenciálok esetén csak részleges. A szer nem gátolta szignifikáns módon az I_{Kr} áramot. Hasonlóképpen, 100 μM chromanol 293B nem befolyásolta a steady-state áram-feszültség (I-V) karakterisztikát sem, amelyet úgy határoztunk meg, hogy megmértük a steady-state áramot a -80 mV-tól 30 mV-ig terjedő potenciáltartományokon. Ennek a feszültségtartománynak a negatív részében az I_{K1} áram aktív, míg az I-V görbe pozitív tartományában különféle neminaktiválódó ionáramok, amelyeket gyakran neveznek plató áramnak (I_p), dominálnak. Méréseink alapján a chromanol 293B 100 μM koncentrációban amellet, hogy gátolja az I_{Ks} áramot, az I_{to} amplitúdóját is jelentősen csökkenti anélkül, hogy befolyásolná az I_{Kr} , I_{K1} és I_p áramokat. Figyelembe véve, hogy irodalmi adatok alapján a szer nem befolyásolja a nátrium (I_{Na}) és kalcium áramokat, a chromanol 293B alkalmasnak eszköznek látszott a célkitűzésben leírt vizsgálatok elvégzésére.

Korábbi vizsgálatok szerint az I_{to} áram olyan gyorsan aktiválódik és inaktiválódik, hogy csak a repolarizáció nagyon korai szakaszában játszhat szerepet. Kutya bal kamrai miocitákon végzett vizsgálataink szerint azonban az áram inaktivációs fázisa két exponenciális függvény összegével illeszthető (1. ábra). A gyors komponens időállandója kisebb volt mint 5 ms és kevésbé potenciálfüggő. Az áram első gyors csökkenését egy második sokkal lassabb fázis követte. Ennek a lassú fázisnak az időállandója 14 és 23 ms közötti értékeket mutatott és az amplitúdója elérte a teljes áram-amplitúdó 10 – 20%-át. Így, az I_{to} áramnak ez a lassú komponense jelentős repolarizáló erőt jelenthet az akciós potenciál plató fázisának első 50 – 100 ms időtartamában, azaz amikor más repolarizáló ionáramok relatíve gyengék.

A steady-state aktivációs görbét úgy kaptuk meg, hogy teszt impulzusok sorozatát alkalmaztunk 10 mV-os lépésekben 80 mV-ig. A normalizált konduktanciát pedig ábrázoltuk a teszt potenciál függvényében. A steady-state inaktivációs összefüggést úgy mértük meg, hogy a teszt impulzusok előtt pre-pulzusok sorozatát, -90 – 20 mV feszültségtartományban, alkalmaztunk. A teszt impulzusok során mért normalizált áramamplitúdót pedig ábrázoltuk a pre-pulzusok alatt alkalmazott potenciál függvényében. Mindkét esetben az adatokat kétállapotú Boltzmann függvényel illesztettük (1. ábra). A steady-state inaktivációs és

aktivációs görbék kismértékű átfedést mutattak a 0 és -40 mV közötti potenciáltartományban. Ez pedig felveti annak lehetőségét, hogy az I_{to} áramot szállító ioncsatornák egy kis hányada ebben a potenciáltartományban reaktiválódhat (I_{to} "window" áram). Ez a jelenség hasonló ahhoz, amit korábban a I_{Na} és I_{Ca} áramokkal kapcsolatban leírtak. Ez az áram szintén hozzájárulhat a repolarizációhoz a plató fázis késői szakaszában kutya bal kamrai szívműködéseken.

Az I_{to} áram lefutását az akciós potenciál plató és repolarizációs fázisa alatt akciós potenciál voltage clamp mérésével lehet a legjobban meghatározni. ehhez a kísérlethez azonban szükség van egy szelektív gátlószerre. Az irodalmi adatok és saját méréseink alapján $100 \mu\text{M}$ chromanol 293B szelektíven gátolja az I_{to} áramot feltéve, hogy a kísérleteket egy I_{Ks} gátló szer ($0.5 \mu\text{M}$ HMR-1556) jelenlétében végezzük. A mérés során egy akciós potenciál hullámformát alkalmaztunk parancsjelként. Az I_{to} áramot úgy kaptuk meg, hogy a $100 \mu\text{M}$ chromanol 293B jelenlétében kutya bal kamrai miocitákból regisztrált áramgörbét kivontuk a kontroll körülmények közötti regisztrátumból. Az így kapott chromanol 293B szenzitív áram, vagyis I_{to} áram görbe közelíti meg azt az áram profilt, amely az akciós potenciál alatt létrejön, a plató fázis elején látható áram megfelel az I_{to} lassan inaktíváló komponensének, míg a késői plató fázis alatti áram pedig a I_{to} "window" áramnak.

Tanulmányoztuk az I_{to} gátlás hatását az akciós potenciál repolarizációjára kutya jobb kamrai epikardiális szívműködés preparátumokon. Az áramot $100 \mu\text{M}$ chromanol 293B alkalmazásával gátoltuk, kísérleteinket $0.5 \mu\text{M}$ HMR-1556 jelenlétében végeztük, ami teljes I_{Ks} blokkot biztosít. Amint a 2A. ábra mutatja, az I_{Ks} blokk csak kismértékben nyújtotta meg az akciós potenciál időtartamát. Chromanol 293B alkalmazása teljes I_{Ks} blokk jelenlétében szignifikánsan nyújtotta az akciós potenciál repolarizációját és ezzel párhuzamosan a plató potenciál pozitív irányba tolódott. Az I_{to} gátlás fordított frekvenciafüggő módon nyújtotta meg az akciós potenciál időtartamát, vagyis a hatás nagyobb volt lassabb, mint gyorsabb ingerlési frekvenciánál (2B. ábra).

Az utóbbi időben nyilvánvalóvá vált, hogy a szívműködés repolarizációja egy túlbiztosított élettani folyamat, ami azt jelenti, hogy az egyes transzmembrán ionáramoknak nincsen kizárólagos szerepük a repolarizáció kialakításában. Így egy-egy ioncsatorna sérülése (mutáció, „downreguláció”), specifikus farmakológiai gátlása, vagy egyáltalán nem, vagy csak mérsékelt fokú repolarizáció megnyúlást eredményez. Ilyenkor ugyanis a többi nem érintett ioncsatorna működése kompenzálja a funkciójában sérült ioncsatorna működésének zavarát, és így a repolarizációs folyamat látszólag nem változik meg. Ezt jelenséget repolarizációs tartaléknak nevezzük. Ha azonban egy másik, újabb ioncsatorna funkció sérül, vagy gyógyszeresen gátoljuk, váratlanul nagy mértékben megnyúlhat a repolarizáció és veszélyes aritmiák keletkezhetnek. Ezért tanulmányoztuk az I_{to} gátlás hatását olyan jobb kamrai epikardiális preparátumokon is, amelyekben a repolarizációs tartalékokat $0.1 \mu\text{M}$

dofetiliddel beszűkítettük. A dofetilid jelentősen – fordított frekvenciafüggő módon - megnyújtotta az akciós potenciál időtartamát. A dofetilid jelenlétében 100 μM chromanol 293B alkalmazása után az akciós potenciál repolarizációja, különösen lassú ingerlési frekvencia esetén, nagyon nagymértékben megnyúlt. Ráadásul, 5 kísérletben (a 7-ből) korai utódepolarizációt (EAD) észleltünk (3. ábra).

Munkánk legfontosabb következtetése az, hogy a tranziens kifelé haladó kálium áram nemcsak közvetett módon, a plató fázis potenciáljának modulálásával, hanem közvetlenül is befolyásolja a repolarizációt kutya kamrai szívizomban, valamint jelentősen hozzájárul a repolarizációs tartalékhoz. Ezeket az eredményeinket egy közleményben összefoglaltuk, és a kéziratot közlésre elküldtük a *British Journal of Pharmacology* angol nyelvű folyóirathoz.

Ismeretes, hogy az I_{to} áram denzitása nagyobb az epikardiális és midmiokardiális régiókban, mint az endokardiumban. Emiatt nehéz megmagyarázni azt az eredményünket, hogy az I_{to} gátlás endokardiális preparátumokon is megnyújtotta az akciós potenciált, mivel az áram denzitása itt jóval kisebb, mind az epikardiális régióban. Ráadásul saját korábbi ionáram méréseink midmiokardiális szívizomsejtekből származnak és az így nyert áramdenzitás, valamint kinetikai adatok nem tükrözik az I_{to} áram tulajdonságait azokban az – epikardiális és endokardiális – régiókban, amelyekből az akciós potenciál mérések származtak. Ezért elkerülhetetlen volt egy olyan kísérletsorozat végrehajtása, amelyben az I_{to} áram denzitásbeli és kinetikai tulajdonságait – különös tekintettel az áram lassan inaktíváló komponensére – hasonlítjuk össze epikardiális ill. endokardiális régiókból izolált kutya kamrai szívizomsejteken. Ezek a mérések jelenleg is folyamatban vannak és ennek a kérdésnek a tisztázásához még további kísérletekre van szükség.

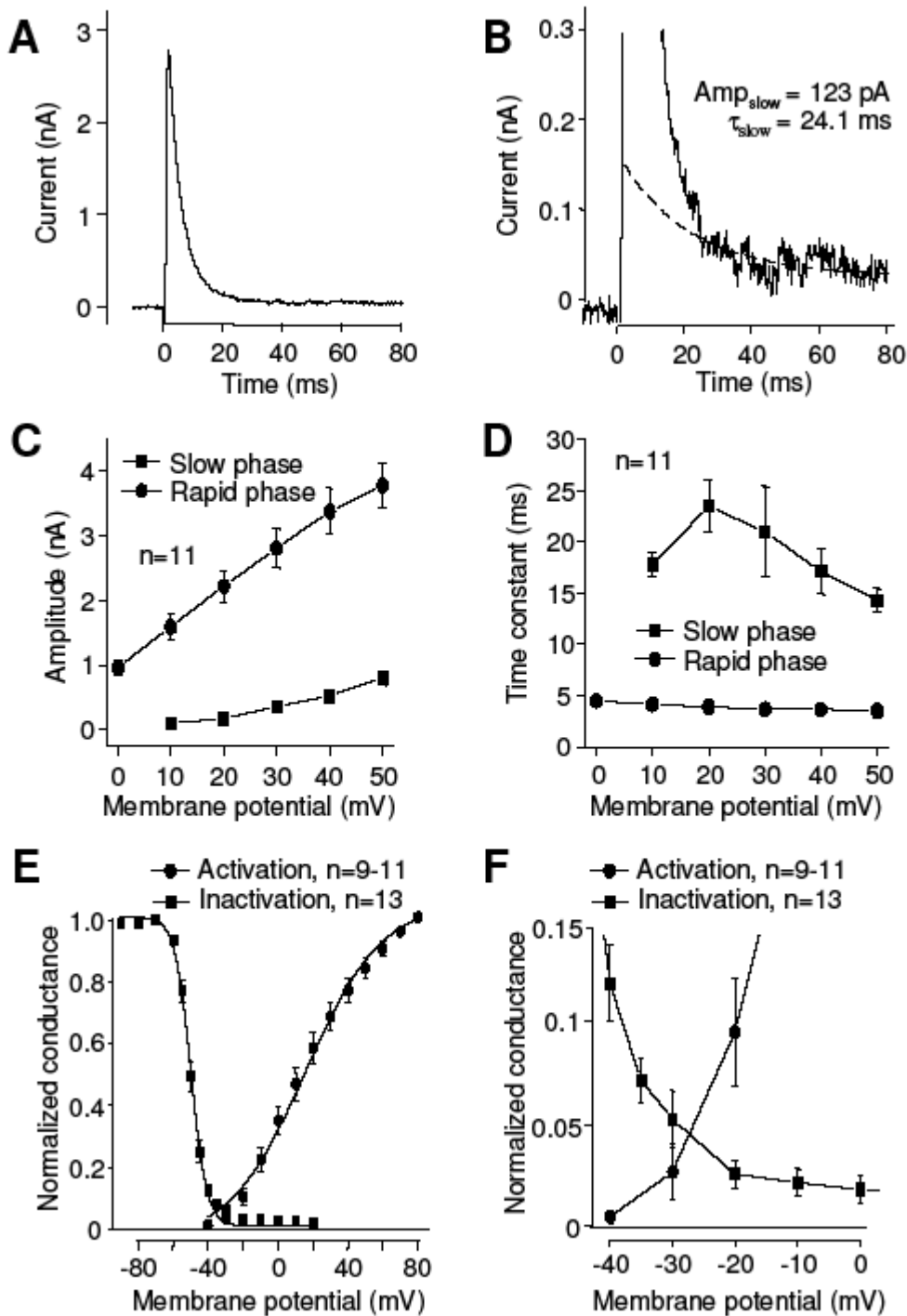
Megvizsgáltuk az elektrofiziológiai paraméterekben és néhány fontos transzmembrán ionáramban az 1. típusú kísérletes diabetes hatására bekövetkezett változásokat nyúl szívizmon. Úgy találtuk, hogy a diabetes mérsékelten megnyújtotta a kamrai repolarizációt és a lassú típusú késői egyenirányító kálium áram (I_{Ks}) denzitásának csökkentésével gyengítette a repolarizációs tartalékot, ami növelheti a hirtelen szívhalál kockázatát. Az I_{Kr} , I_{to} , I_{CaL} és I_{K1} áramokban azonban nem találtunk változást. Számos vizsgálatban leírták, hogy 1. típusú diabetes mellitus csökkentette az I_{to} áram amplitúdóját patkány szíven. Ez megegyezik saját korábbi méréseinkkel kutyán, ahol szintén I_{to} denzitás csökkenést tapasztaltunk. Annak az eredménynek a magyarázata, hogy diabetes hatására nem változott az I_{to} áram denzitása nyúlra az lehet, hogy míg patkány és kutya esetében a domináns pórus formáló alegység a Kv4.2 ill. Kv4.3, úgy nyúl esetében a Kv1.4 protein. Ezeket az eredményeket egy angol nyelvű közleményben foglaltuk össze [Acta Physiol (Oxf) 2008, 192, 359–368].

Korábbi kísérleteinkben megvizsgáltuk az I_{Kr} és az I_{K1} áramoknak a fordított frekvenciafüggésben betöltött szerepét kutya és humán kamrai preparátumokon. A jelenség

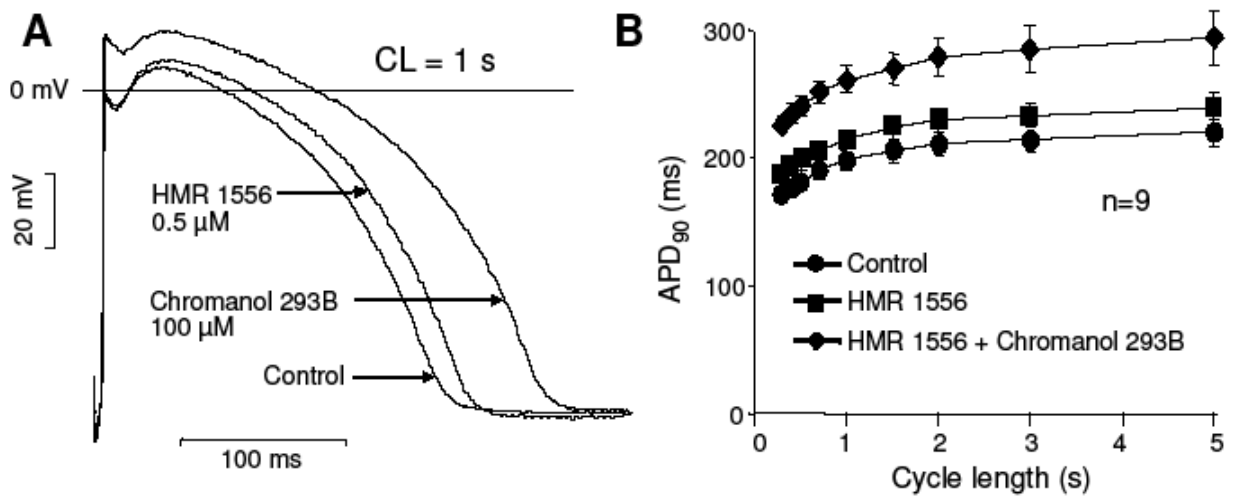
vizsgálatához E-4031 érzékeny (I_{Kr}) és Ba^{2+} érzékeny (I_{K1}) ionáramokat regisztráltunk különböző repolarizáció sebességgel rendelkező "akciós potenciál-szerű" feszültségimpulzusok és különböző időtartamú akciós potenciál jelformák segítségével. A vizsgálatok azt mutatták, hogy egy hosszabb akciós potenciál esetén, a repolarizáció egy adott időpontjában az I_{Kr} és I_{K1} ionáramok repolarizáló ereje kisebb. Ezért egyéb faktorok (befelé irányuló áramok növelése vagy kifelé irányuló áramok csökkentése) repolarizációt nyújtó hatása relatíve erősebbé válik lassú frekvencia esetén, ami az akciós potenciál fordított frekvenciafüggő megnyúlását eredményezi. Ezeket a korábbi eredményeinket akciós potenciál kísérletekkel egészítettük ki: négy különböző hatásmódú anyaggal – dofetilid, $BaCl_2$, Bay K-8644 és veratrin –kutya papilláris izmon fordított frekvenciafüggő repolarizáció megnyúlást tapasztaltunk, ami azt mutatja, hogy ez a jelenség nem egy specifikus mechanizmus – pl. az I_{Kr} áram gátlásának – következménye. Eredményeinket egy angol nyelvű közleményben foglaltuk össze [Br J Pharmacol. 2009, 156, 1076-1084].

A kutatási programunk során elért eredmények jelentősen hozzájárulhatnak ahhoz, hogy az akciós potenciál repolarizáció mechanizmusát jobban megértsük illetve ebben az egyes ionáramok, elsősorban a tranziens kifelé haladó kálium áram szerepét mélyebben megismerjük.

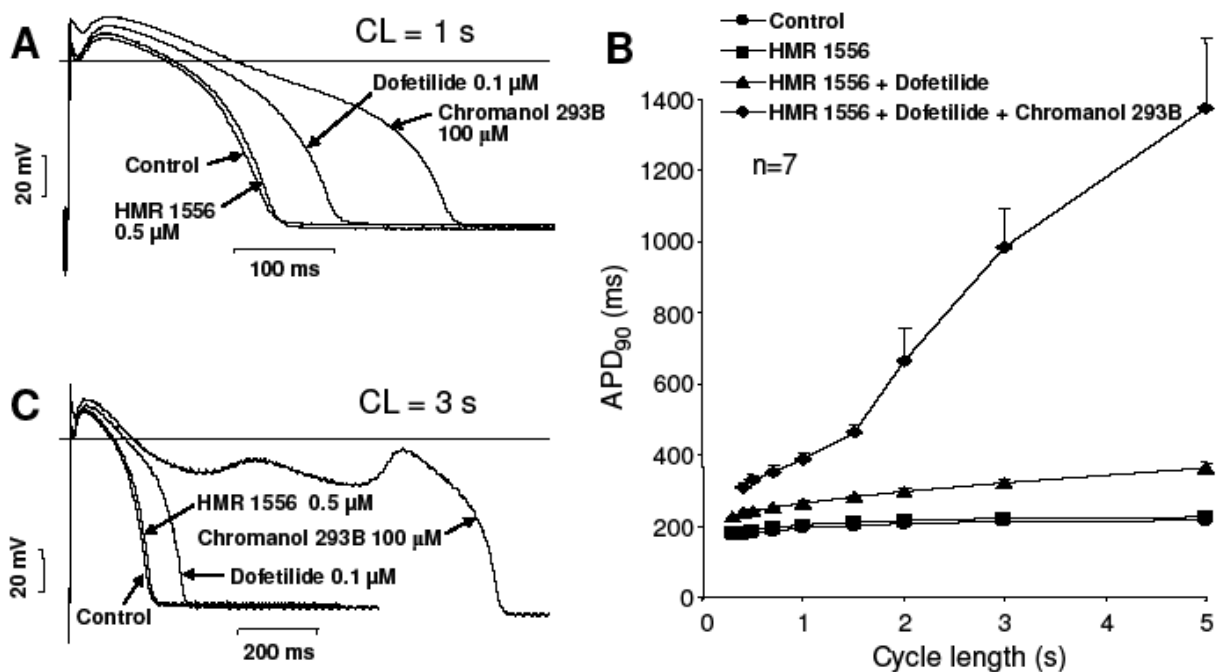
MELLÉKLET



1. ábra. **A:** Kutya bal kamrai miocitából 20 mV-os teszt potenciálon regisztrált I_{to} áram görbe. Az ordinátát tízszeresére kinagyítottuk a **B** panelen, ahol a szaggatott vonal mutatja az áram lassan inaktíváló komponensét, amelyet a kísérletekben mért időállandó és amplitúdóértékek segítségével egy exponenciális függvénnyel szimuláltunk. **C, D:** Az I_{to} áram inaktívációs fázisát két exponenciális függvény összegével illesztettük. Az így kapott amplitúdóértékeket (**C**) és időállandókat (**D**) a teszt potenciál függvényében ábrázoltuk. **E, F:** Az I_{to} steady-state aktivációs és inaktívációs összefüggései kutya bal kamrai miocitákon.



2. ábra. **A:** 100 μ M chromanol 293B hatása az akciós potenciálra kutya jobb kamrai epikardiális preparátumon 500 nM HMR-1556 jelenlétében. **B:** 100 μ M chromanol 293B ciklushosszfüggő hatása az akciós potenciál időtartamára kutya jobb kamrai epikardiális preparátumokon 500 nM HMR-1556 jelenlétében.



3. ábra. **A, C:** 100 μ M chromanol 293B hatása az akciós potenciálra kutya jobb kamrai epikardiális preparátumon 500 nM HMR-1556 és 100 nM dofetilid jelenlétében 1000 ms ill. 3000 ms-os ciklushosszak esetén. **B:** 100 μ M chromanol 293B ciklushosszfüggő hatása az akciós potenciál időtartamára kutya jobb kamrai epikardiális preparátumokon 500 nM HMR-1556 és 100 nM dofetilid jelenlétében.