

Beszámoló

Utódepolarizációk ionmechanizmusának vizsgálata akciós potenciál clamp módszerrel
OTKA nyilvántartási szám: T 037332

A beszámoló készítésekor elsősorban a project megvalósítása során már publikált adatainkból és eredményeinkből levonható következtetéseinket kívánom részletezni, mintegy szintetizálva az egyes publikációk eredményeit. A konkrét adatok megtalálhatóak a közleményekben.

A munka célja az volt, hogy ismereteket szerezzünk az utódepolarizációs típusú aritmiák hátterében található ionmechanizmusokról. Tervünk az volt hogy a transzmembrán ionáramok ($I_{Ca,L}$, $I_{Na/Ca}$, I_{to} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{Cl}) akciós potenciál (AP) alatti kinetikai jellemzése révén megértsük azok szerepét a fiziológiás és patológiás repolarizáció folyamatában. A vizsgálatok során hagyományos- és akciós potenciál voltage clamp technikát kívántunk alkalmazni matematikai modellezéssel kiegészítve. A project során a következő eredményeket értük el:

- 1) Az irodalomban elsőként jellemeztük a vizsgálatba bevont ionáramok akciós potenciál alatti viselkedését (az I_{to} -val és I_{K1} -el végzett kísérleteink eredményei jelenleg állnak publikálás alatt). Meghatároztuk lefutásukat, jellemeztük az akciós potenciál morfológiájának kialakításában játszott szerepüket.
 - a) L-típusú kalcium áram: Ellentétben az irodalomban szinte dogmaként elfogadott, az akciós potenciál platója alatt várt árammal, az L-típusú kalcium áram kutya szívmájában igen gyorsan lecsengő, tranzienst jelenség. Az AP nulladik fázisával párhuzamosan kiépül és az első ötven milliszekundum során lecseng anélkül, hogy látható plató fázisa lenne. Jelentős regionális eltérést mutat epicardiális-endocardiális irányban. Míg az endocardiális sejteken csupán egy rövid, túszerű csúcsként jelenik meg, az epicardiális sejteken az incisurát követően újra aktiválódik, két csúcsa van, de ezután igen gyorsan inaktiválódik. A jelenség oka az epicardiális sejtek akciós potenciáljának morfológiájában található meg. Az incisura alatti gyors repolarizáció deaktiválja a kalcium csatornákat, illetve fokozza az inaktivációból való visszatérésüket. Az epicardiális sejtekre jellemző dóm fázis alatt pedig nagy számú csatorna nyílik újra, létrehozva a második csúcsot. Ezen jelenséget humán miokardiumban is igazolni tudtuk. Érdekes, hogy az L-típusú kalcium csatorna ezen viselkedését a hagyományos (Luo-Rudy) modellekkel le lehet írni, de ezidáig erre még nem került sor. Eredményeink azt igazolják, hogy a korai utódepolarizáció mechanizmusában ezidáig csupán hipotézisként felvetett kalcium csatorna újranyílás a valóságban is megtörténhet, sőt minden bizonnyal meg is történik.
 - b) Az $I_{Na/Ca}$ -val kapcsolatos eredményeink: Az $I_{Na/Ca}$ aritmogenezisben játszott szerepének pontos tisztázásához és elektrofiziológiai vizsgálatához szükség van az $I_{Na/Ca}$ megfelelő szelektivitású gátlószereire. A projecttervezet készítésekor tervezett gátlószerekről időközben kiderült, hogy nem alkalmasak pontos mérések elvégzésére. Ezért megvizsgáltuk két újonnan fejlesztett $I_{Na/Ca}$ gátló anyag (SEA0400 és KB-R7943) szelektivitását és az L-típusú kalcium csatornára gyakorolt esetleges

- hatását. Ezek a molekulák csak a legutóbbi időben váltak elérhetővé. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a SEA0400 az $I_{Na/Ca}$ -t sokkal alacsonyabb (0,2 $\mu\text{mol/l}$) koncentrációban gátolja mint a KB-R7943 (8 $\mu\text{mol/l}$). A SEA0400 az $I_{Na/Ca}$ minkét irányú (inward, outward) működését azonos erősséggel gátolja, míg a KB-R7943 esetében az inward mód gátlása gyengébb az outward módénál. Mindkét szer gátolja az L-típusú kalcium áramot 3 $\mu\text{mol/l}$ félhatásos koncentrációval. Mindezek alapján a SEA0400 $I_{Na/Ca}$ gátló hatását szelektívebbnek kell tekintenünk a másikkal. Ezért a további kísérletekben $I_{Na/Ca}$ gátlásra csak a SEA0400-at alkalmaztuk. A kísérletek ezen részében dofetilide, illetve strofantin aritmia modellben vizsgáltuk a SEA0400 hatását. A vizsgálatokra egy olyan koncentrációt választottunk (1 $\mu\text{M/l}$), ahol a kalcium csatorna gátló hatás még gyenge, de az $I_{Na/Ca}$ gátló hatás már teljes mértékben kifejlődik. Megállapítottuk, hogy SEA0400-zal történő $I_{Na/Ca}$ gátlás egyaránt csökkenti az utódepolarizációs modellekben kiváltott korai és késő utódepolarizációk amplitúdóját. Több esetben tapasztaltuk, hogy a SEA0400 megszüntette a már kialakult késői típusú utódepolarizációk jelentkezését.
- c) Az I_{to} vizsgálatával nyert eredményeink: Akciós potenciál clamp módszerrel tanulmányoztuk az áram AP alatti lefutását. Az áram igen gyorsan, néhány ms-os aktivációs kinetikával épül fel és mielőtt az AP incisurája elérné a mélypontját, már inaktiválódni kezd. A várakozásnak megfelelően jelentős epicardiális-endocardiális inhomogenitást figyeltünk meg. Az áram igen jelentős (3-4 pA/pF) az epicardialis régióban, míg gyakorlatilag nincs jelen az endocardiumban. A midmyocardiális régió sejtjeiben a kettő közötti átmeneti állapotok figyelhetőek meg. Ezen kísérleti programban az irodalomban először mértük meg és jellemeztük az I_{to} AP alatti lefutását, viselkedését és igazoltuk mérésekkel az EPI-ENDO irányú inhomogenitást. Az I_{to} a plato morfológiájának módosítása révén szabályozza a sejtbe bejutó kalcium mennyiségét és ezzel szerepet játszhat az utódepolarizációs aritmiák kialakulásában.
- d) Az I_{Ks} vizsgálata során nyert eredményeink egyértelműen igazolták, hogy az I_{Ks} az AP terminális repolarizációjában jelentős szerepet játszik. Az áram az AP alatt lassan épül ki, csúcsát a plato alatt éri el, majd lassan csökkenni kezd. Az áram amplitúdójának a nagyságát elsősorban az AP platómagassága határozza meg, az AP hosszának szerepe (ellentétben több munkacsoport javaslatával) a fiziológias AP hossz tartományon belül jelentéktelen. Amikor az AP morfológiáját farmakológiailag módosítottuk (plato emelés illetve AP nyújtás) az I_{Ks} gátlása chromanol-293B-vel azokban az esetekben okozott jelentős AP nyúlást amikor a plato magas volt. Alacsony platóju AP-ken az eredeti hosszától független volt az I_{Ks} gátlással kiváltott AP nyúlás mértéke. Ez az áram vélhetőleg fontos szerepet játszik az AP hosszának beállításában is, ilymódon a sejt kalcium homeosztázisát is befolyásolja. Modellkísérleteink arra utalnak, hogy az I_{Ks} gátlása (pl antiaritmias beavatkozás céljából) a sejt kalcium homeosztázisa szempontjából előnytelen viszonyokat teremt, a megnyúlt akciós potenciál kifejezetten aritmogén hatású. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy megállapításunk szerint az I_{Ks} jelentős plato-magasság érzékenysége miatt egy esetlegesen terápiás célból beadott I_{Ks} -gátló szer AP nyújtó hatásosságának erőssége jelentős egyedi eltéréseket mutatna, esetleg a szívizmon belül regionálisan is ingadozna az I_{Ks} jelentős apico-basalis és epicardialis-midmiocardialis irányú inhomogenitást miatt. Az I_{Ks} nagyságának regionális eltérése legalábbis részben magyarázatul szolgálhat a szívizomzat egyes régióiban

- megfigyelhető akciós potenciálok hosszkülönbségére, másrészt arra hívja fel a figyelmet, hogy egy esetleges terápiás céllal történő I_{Ks} gátlásra a szívizom egyes területei eltérő módon reagálnának.
- e) Az I_{K1} árammal kapcsolt megfigyeléseink: Akciós potenciál clamp módszerrel, 50 $\mu\text{Mol/l}$ bárium ion alkalmazásával vizsgáltuk az I_{K1} AP alatti lefutását. Megállapítottuk, hogy az elektromos diastole alatt jelentős, konstans bárium érzékeny áram folyik a membránon keresztül, mely az AP harmadik fázisában jelentősen megerősödik, ugyanakkor alig van jelen a plato alatt. Az áram által szállított töltésmennyiség modellszámításaink szerint a terminális repolarizációért felelős nettó outward áram mintegy 60-70%-at szolgáltatja. Ezek a megfigyeléseink jó összhangban vannak azzal a kísérletes ténnyel, hogy az bárium érzékeny áramot gyengítő farmakológiai beavatkozások utódepolarizációs aritmiákat okoznak.
- f) Klorid áram: Megfigyeléseink szerint a klorid áram az AP korai fázisában kifelé irányul, majd a plato alatt fokozatosan csökken, illetve átmegy befelé irányuló áramba. A klorid áram gátlása nyújtja az AP-t ami arra utal, hogy a plato kialakításában játszott szerepe sokkal lényegesebb mint a terminális repolarizációhoz való hozzájárulása. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a klorid áram outward komponense alatt kifelé szállított töltésmennyiség mintegy kétszerese az inward komponens által szállított töltésmennyiségnek. A klorid áram gátlását gátlást követően csökken az incisura mélysége és emelkedik a plato. A klorid áram gátlása sietteteti az utódepolarizációk kialakulását többféle aritmia modellben (isoproterenol, ouabain és cézium). Mindezekből levonható az a következtetés, hogy a klorid áram (legalábbis az általunk vizsgált Antracén-9-karbonsav érzékeny komponense) része a membrán fiziológias repolarizációjáért felelős mechanizmusainak, gyengülése esetén fokozódik a ritmuszavarok kockázata. A plato emelkedés/AP nyúlás aritmogenitásaért minden bizonnyal a sejt megváltozott kalcium homeosztázia a felelős.
- 2) Az utódepolarizációs aritmiák kalcium-teóriájának vizsgálata céljából fluorescens festékek alkalmazásával tanulmányoztuk a citoszolikus kalciumion koncentráció változását aritmia modellekben.
- a) A SEA0400-zal végzett mérések során megállapítottuk, hogy a SEA0400 abban a koncentrációban, ahol már sikeresen gátolja az utódepolarizációs aritmiák kialakulását nem módosítja a kalcium tranziensek amplitúdóját vagy más paramétereit. Ez arra enged következtetni, hogy az utódepolarizációt létrehozó inward áram az $I_{Na/Ca}$ kell, hogy legyen. Emlékeztetni szeretnék itt arra, hogy a SEA0400 az $I_{Na/Ca}$ inward és outward (forward és revers) módú működését hasonló mértékben gátolja. Vagyis, a szívizomsejt nettó kalcium forgalmának megváltoztatása nélkül csökkenti le a $I_{Na/Ca}$ -t. Mivel nem tartozott a project célkitűzéseikhez új támadáspontú antiaritmiás szerek kifejlesztése, ezt a megfigyelés a tervezett eredményeken túli profitnak kell tekintenünk.
- b) A kalcium teória mellett szólnak különböző extracelluláris pufferek (bikarbonát, HEPES) alkalmazásával kapott eredményeink. Megfigyeltük, hogy a céziummal kiváltott utódepolarizációk elmaradnak, ha a sejtek extracelluláris környezetében HEPES helyett bikarbonát puffert használunk. A fluoreszcens kalcium érzékeny festékekkel végzett mérések megmutatták, hogy abban az esetben, ha az extracelluláris oldat bikarbonat iont tartalmaz, a kalcium tranziensek amplitúdója

csökken. Érdekes módon, a mechanikai aktivitás mérésekor a kontrakciós amplitúdó ellentétes irányú változásokat mutatott (alacsony kalcium tranzienshez nagyobb kontrakciós amplitúdó tartozott). Ugyanakkor, bikarbonát pufferben az akciós potenciálok rövidebbek, platojuk magasabb. Mindezen megfigyelések alátámasztják azt a véleményt, hogy az utódepolarizációs aritmiákért a citoszolikus kalcium koncentráció emelkedése a felelős a depolarizáló töltést szállító mechanizmus pedig az $I_{Na/Ca}$.

- 3) A csatornafehérjék expressziójának vizsgálata során nyert eredmények: Az egyes ionáramok szívizmon belüli inhomogenitása felvetette a kérdést, hogy eltérő tulajdonságú, vagy eltérő számú de azonos sajátságú ioncsatornák okozzák-e az ionáramok eltérő nagyságát a szívizom egyes régióiban. A kérdés megválaszolására összehasonlítottuk a jelenleg ismert csatornafehérjék expressziójának szíven belüli inhomogenitását az ionáramok inhomogenitásával. Azt találtuk, hogy a csatornafehérjék denzitása mindig korrelált az ionáramok nagyságával (pl nagyobb I_{Ks} nagyobb KvLQT1 expresszióval jár együtt).