

OTKA nyilvántartási szám:

**RÉSZJELENTÉS**

Ismert, hogy az emlős szívizomból izolált miocitákon mérhető áramminázat, és így az általuk létrehozott akciós potenciál konformáció attól függően változik, hogy a szívizomsejtek a miokardium endo- vagy epikardiális régiójából származnak. Epikardiális sejtek esetében a korai repolarizáló áramok jelenléte miatt jellegzetes, úgynevezett “spike and dome” konfiguráció alakul ki, míg endokardiális sejteken ezek kisebb intenzitása miatt prominens plato fázis jön létre. Kísérleteinkben az L-típusú kalciumáram profiljának és kinetikai paramétereinek endo- és epikardiális viszonylatban megfigyelhető különbségeit vizsgáltuk kutya- és egészséges emberi szívizomból izolált kamrai szívizomsejteken konvencionális voltage clamp és akciós potenciál voltage clamp (APVC) technika segítségével. Ez utóbbi esetben a sejt saját akciós potenciálját alkalmaztuk parancsjelként, az L-típusú kalciumáramot nisoldipin-érzékeny áramként azonosítottuk. Megállapítottuk, hogy az APVC körülmények között vizsgált endokardiális eredetű kamrai sejtek esetében a kalciumáram gyors aktivációját gyors és teljes inaktiváció követte. Késői komponens vagy esetleges reaktiváció nem volt megfigyelhető. Ezzel szemben epikardiális sejtek esetében az áram aktivációját részleges inaktiváció követte, de még az áram teljes lecsengése előtt újabb kalciumáram aktiváció volt megfigyelhető. Ez a másodszori aktiválódás a hagyományos voltage clamp eljárással nem volt megjósolható. Annak eldöntésére, hogy az áram profiljában megfigyelt epi-endokardiális különbségek a kalciumcsatornák inherens tulajdonságából fakad-e, vagy az eltérő alakú epikardiális ill. endokardiális akciós potenciálok következménye, az endokardiális sejteken parancsjelként hasonló időtartamú, de epikardiális morfológiájú, tehát mély incizúrával rendelkező akciós potenciált alkalmaztunk. Az így nyert áramgörbék mindegyikén megfigyelhető volt a kalciumáram második aktivációja, ami arra utal, hogy a kalciumáram epikardiálisan megfigyelt bifázisos jellege a “spike and dome” akciós potenciál konfiguráció következménye. Ezt a következtetést alátámasztja a konvencionális voltage clamp körülmények között végzett árammérések eredménye, mely szerint nem találtunk szignifikáns különbséget sem a kalcium csúcsáram nagyságában, sem az inaktivációs ill. reaktivációs kinetika paramétereiben az epikardiális és az endokardiális sejtek között. Mivel az epi- és endokardiális sejtek akciós potenciálján megfigyelhető legmarkánsabb különbség az incizúra jelenléte ill. hiánya, kísérleteink során az incizúra alakja (elsősorban annak mélysége és időtartama) valamint a második kalcium áramcsúcs paramétereinek között kerestünk összefüggéseket. Megállapítottuk, hogy az akciós potenciál korai repolarizációjának kifejezettebbé válásával a második kalcium áramcsúcs is prominensebbé válik. Ennek alapján összefüggés tételezhető fel a második kalcium áramcsúcs időbeli megjelenése és a korai repolarizáció lefutása illetve ezt követően a dóm kialakulása között, ezért megvizsgáltuk az összefüggést a kalciumáram és akciós potenciál paraméterek időbeli lefutásában. Azt találtuk, hogy az epikardiális sejtek második kalcium áramcsúcsának megjelenési ideje és a dóm maximumáig eltelt idő igen szoros korrelációt mutat. Hasonlóan szoros összefüggést találtunk az incizúra minimum értékek időpontja valamint az akciós potenciál feszültségfüggvényének első deriváltja és a második kalcium áramcsúcs között. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az epikardiális sejteken a dóm felszálló szárának lefutását a második kalcium áramcsúcs időbeli lefutása határozza meg. Ez

lényegében azt is jelenti, hogy az epikardiális sejteken kialakuló "spike and dome" konfiguráció nemcsak a korai repolarizáló áramok aktiválódásának és inaktiválódásának, hanem döntő mértékben az L-típusú kalciumáram bifázisos aktivációjának is köszönhető. Az akciós potenciál alatt folyó kalciumáram áram-feszültség karakterisztikáját fázissík módszerrel ábrázolva megállapítottuk, hogy endokardiális sejteken a fázissík egyetlen hurokkal, míg epikardiális sejteken kettős hurokkal jellemezhető. Amennyiben endokardiális eredetű sejten epikardiális akciós potenciált alkalmaztunk parancsjelként, az így nyert fázissík diagram ugyanúgy kettős hurokkal volt leírható, mint amit epikardiális sejtek esetén APVC körülmények között találtunk.

A kutya kamrai sejteken megfigyelt kétsúcsú kalciumáramot találtunk az egészséges emberi szív szubepikardiális rétegeből izolált humán kamrai sejteken is. Ezek a megfigyelések további bizonyítékot jelentenek arra nézve, hogy a kalciumáram epi- és endokardiális viszonylatban megfigyelt eltérő profilja nem a csatornák inherens tulajdonságából fakad, hanem azt az akciós potenciálok eltérő feszültségmintázata hozza létre.

A kutya kamrai szívizom transzmurális inhomogenitását elektrofiziológiai és immunbiológiai módszerek segítségével párhuzamosan vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a szubepikardiális (EPI) sejtekről elvezethető akciós potenciál időtartama a repolarizáció 50 és 90%-os szintjén egyaránt szignifikánsan rövidebb, a depolarizáció maximális sebessége és az akciós potenciál amplitúdója szignifikánsan kisebb, míg a korai repolarizáció (phase-1) nagysága szignifikánsan nagyobb volt, mint a midmiokardiális (MID) sejteken. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns különbséget sem a nyugalmi potenciál nagyságában sem a sejtek membránjának kapacitásában a két sejtípus között. Hagyományos voltage clamp körülmények között nem volt szignifikáns különbség az L-típusú kalcium áram amplitúdójában, az áram steady-state inaktivációjának feszültség-függésében, sem az inaktivációból való visszatérés időállandójában. A membrán steady-state áram-feszültség karakterisztikája tekintetében a két sejtípus azonosan viselkedett a  $-135 - +65$  mV feszültségtartományban vizsgálva. A nyugalmi kálium áram ( $I_{K1}$ ) denzitása EPI és MID sejteken egyforma volt. A tranziens outward kálium áram ( $I_{10}$ ) nagysága EPI sejteken 0 és +65 mV között minden membránpotenciálon szignifikánsan nagyobb volt, mint a MID sejteken mért átlagérték. Ezen túlmenően nem találtunk különbséget sem az aktiváció, sem a steady-state inaktiváció feszültség-függése tekintetében. A késői kálium áram gyors komponensének ( $I_{Kr}$ ) amplitúdója minden membránpotenciálon egyforma volt a két sejtípuson. Az  $I_{Kr}$  aktivációjának feszültség-függésében és időállandójában nem találtunk szignifikáns különbséget, de az áram deaktivációja EPI sejtekben szignifikánsan gyorsabb volt, mint MID sejteken. A késői kálium áram lassú komponensének ( $I_{Ks}$ ) amplitúdója EPI sejteken 0 és +55 mV között minden membránpotenciálon szignifikánsan nagyobb volt, mint a MID sejteken. Ez egyaránt igaz volt a farokáramok, valamint a hosszú depolarizáló impulzussal teljes mértékben aktivált áramok esetében. Az aktivációs valamint deaktivációs időállandók nagyságában az  $I_{Ks}$  esetében nem találtunk különbséget a két sejtípus között.

Western-blot technikával vizsgálva a kutya kamrai szívizomzat transzmurális inhomogenitását azt találtuk, hogy EPI sejteken a Nav1.5 és a MinK csatornafehérjék szignifikánsan kisebb mértékben, míg a Kv4.3, Kv1.4, KchIP2 és LvLQT1 fehérjék szignifikánsan nagyobb mértékben kerülnek expresszióra az EPI, mint a MID sejteken. Fenti vizsgálatokat egészséges emberi szívizomból kimetszett szívizommintákon is elvégeztük és a kutyán tapasztalt aszimmetriát találtuk. Az elektrofiziológia és Western-blot módszerekkel feltárt EPI-MID eltéréseket összevetve megállapíthatjuk, hogy azok - a MinK csatornafehérje változásaitól eltekintve - jó korrelációt mutatnak egymással – másként fogalmazva az ioncsatornák valamint ionáramok szintjén talált különbségek jól magyarázzák az akciós potenciál konfigurációk között látott EPI-MID eltéréseket. Ugyancsak kiváló kvantitatív egyezést találtunk az EPI-MID különbségek viszonylatában a kutya és az ember kamrai szívizma között, ami arra utal, hogy a kutyaszív valóban alkalmas model a transzmurális különbségek vizsgálatára.

Az EPI és MID sejteken talált fenti különbségek azért fontosak, mert kialakítják ill. fenntartják a transzmurális diszperziót, amely jelentős proarrhythmias kockázatot hordoz. Mivel méréseink során a legmarkánsabb transzmurális különbségeket az  $I_{Ks}$  áram amplitúdójában találtuk, az áram farmakológiai blokkolásának következtében bekövetkező transzmurális különbségeket számítógép segítségével szimuláltuk. Megállapítottuk, hogy az  $I_{Ks}$  áram – azonos csatornaszámot feltételezve is – nagyobb mértékben aktiválódik endokardiális, mint epikardiális sejteken. Ennek oka az endokardiális sejtek akciós potenciáljának pozitívabb plato-potenciáljában keresendő, következménye pedig az, hogy az áram farmakológiai gátlása tovább növeli a diszperziót ezért proarrhythmias hatású.

A kamrafal transzmurális inhomogenitásának meghatározását követően arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a kutyaszívben és az egészséges emberi szívben milyen az egyes ionáramok, valamint az azokat létrehozó csatornafehérjék megoszlása a szív apiko-bazális tengelye mentén. Elektrofiziológiai kísérleteinket patch clamp technikával, a csatornafehérjék denzitásának vizsgálatát Western-blot technikával végeztük. Megállapítottuk, hogy a kutyaszív apikális régiójából izolált szívizomsejtekről elvezetett akciós potenciálok időtartama szignifikánsan rövidebb, a korai (1-fázis) repolarizáció amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt, mint a bazális régiókból izolált sejtek esetében. Sem az akciós potenciál egyéb paramétereiben, sem a sejtek kapacitásában nem találtunk szignifikáns különbséget. Apikális sejteken a tranziens kálium áram ( $I_{to}$ ) amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt, mint bazális sejteken. Apikális sejteken a késői kálium áram lassú komponensének ( $I_{Ks}$ ) amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt, mint bazális sejteken. Nem találtunk szignifikáns apiko-bazális különbséget a nyugalmi kálium áram ( $I_{K1}$ ), a késői kálium áram gyors komponense ( $I_{Kr}$ ) és az L-típusú kalcium áram ( $I_{Ca-L}$ ) esetén. Western-blot kísérleteink során kimutattuk, hogy kutyaszívben és emberi szívben egyaránt apikálisan szignifikánsan nagyobb azoknak a csatornafehérjéknek az expressziója, amelyek az  $I_{to}$  és  $I_{Ks}$  áramok kialakításában részt vesznek (apikálisan nagyobb Kv1.4, KChIP2, KvLQT1 és MinK denzitásokat regisztráltunk). Eredményeink alapján arra

OTKA nyilvántartási szám:

## **RÉSZJELENTÉS**

következtetünk, hogy markáns apiko-bazális különbségek vannak a kutya és a humán kamrai szívizom elektrofiziológiai sajátágaiban, amelyet a megfigyelt transzmurális különbségekhez hasonlóan szintén fontos potenciálisan diszperziót növelő tényezőknek tartunk.

### **Következtetések**

Az elektrofiziológiai és biokémiai módszerekkel nyert eredmények egymással jól korrelálnak és arra utalnak, hogy markáns apiko-bazális valamint transzmurális különbségek vannak a kutya és a humán kamrai szívizom elektrofiziológiai sajátágaiban, amelyet potenciálisan diszperziót növelő tényezőknek tartunk. Ez a diszperzió farmakológiai beavatkozások hatására (pl. nyugtatók, antidepresszánsok, terpenoid vegyületek alkalmazásakor) tovább növekedhet, amely jelentős proarrhythmias kockázatot hordoz.