

dc_509_12

MTA DOKTORI PÁLYÁZAT
DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Ionáramok dinamikája és koordinációja
az emlős kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja alatt**



BÁNYÁSZ TAMÁS
DEBRECEN, 2013

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertációban összefoglalt kutatások célja az volt, hogy kísérletes módszerekkel tanulmányozzuk a szív ionáramainak az akciós potenciál kialakításában játszott szerepét, valamint a létrejött feszültségprofil ionáramokra gyakorolt moduláló hatását. Azt kívántuk megérteni, hogy a közös kommunikációs közegen, a membránpotenciálon keresztül az egyes ionáramok miként koordinálják egymás működését. Azt is vizsgáltuk, hogy milyen mechanizmus révén hangolják össze az ionáramok a működésüket az akciós potenciál alakjának meghatározásában. Tanulmányoztuk az ionáramok szív ciklus alatti aktivációját, inaktivációját és reaktivációját, valamint ezek lehetséges szerepét a normális, vagy kóros akciós potenciál kialakításában. Vizsgáltuk, hogy egy adott ionáram megváltozott lefutása miként módosítja az akciós potenciál alakját, ezen keresztül pedig a többi ionáram működését.

A fentiekén kívül elemeztük az akciós potenciál szíven belüli epicardialis-endocardialis, illetve csúcs-bázis irányú heterogenitása mögött álló ionmechanizmusokat. Tanulmányoztuk, hogy a szív akciós potenciáljának frekvenciafüggő funkcionális és morfológiai változásait milyen, az ionáramok működésében megfigyelhető változások hozzák létre. A vizsgálatok emlős kamrai szívműködéseken történtek és kiterjedtek a legfontosabb ismert ionáramokra ($I_{Ca,L}$, I_{Cl} , I_{NCX} , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}).

Mivel a szívműködés ionáramainak működésében a sejt kalcium háztartása központi szerepet tölt be, tanulmányoztuk a sarcoplasmaticus reticulum kalcium felszabadító mechanizmusának működésében megfigyelhető koordinációs jelenségeket. Megmértük a sparkok közötti kapcsolat erősségét és távolságfüggését.

A vizsgálatok elvégzéséhez az általánosan elterjedt elektrofiziológiai és fluorescens módszereket alkalmaztuk. Az új megközelítés miatt azonban szükség volt néhány már korábban is elérhető metodika továbbfejlesztésére. Kidolgoztuk a szekvenciális akciós potenciál clamp módszert, amely képes több ionáram akciós potenciál alatti mérésére egyazon sejtben. A sparkok vizsgálatához pedig egy automatikus spark detektáló és elemző programot írtunk, amely alkalmas a sparkok tömeges feldolgozására.

2. CÉLKITÚZÉSEK

Munkám során az emlős kamrai szívizomsejtek ionáramainak akciós potenciál (AP) alatti dinamikáját és koordinációját kívántam megismerni. Tanulmányozni kívántam az egyes ionáramoknak az AP alatti profilját és az AP kialakításában játszott szerepét. Vizsgálni kívántam, hogy az AP feszültségprofilja hogyan hat vissza az egyes ionáramok dinamikájára és a sejtmembrán feszültségváltozásán keresztül az egyes ionáramok hogyan modulálják egymás működését.

Ennek során az alábbi feladatok elvégzését tűztem ki célul:

1. A kísérleti modell, az izolált kamrai szívizomsejt megbízhatóságának, stabilitásának tesztelése. Az izolált szívizomsejtekben az izolálást követően a felhasználásig terjedő időben bekövetkező szerkezeti és funkcionális változások jellemzése.
2. Az Akciós Potenciál Clamp technika továbbfejlesztése. A módszer alkalmassá tétele több ionáram mérésére ugyanazon sejtből.
3. Az emlős AP alatti legjelentősebb ionáramok ($I_{Ca,L}$, I_{Cl} , I_{NCX} , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}) profiljának meghatározása. Az áramprofilok szíven belüli inhomogenitásának jellemzése.
4. A vizsgált ionáramok potenciális szerepének tanulmányozása utódepolarizációs aritmiák (EAD, DAD) esetén.
5. Az egyes ionáramok szerepének feltárása az AP kialakításban, alakjának meghatározásában.
6. A kamrai szívizom ionáramai közötti koordinációs jelenségek tanulmányozása.
7. Az $I_{Ca,L}$ AP alatti lehetséges reaktivációjának vizsgálata az áram patológiás szerepének megértése szempontjából.
8. Az I_{Ks} repolarizációban játszott szerepének vizsgálata.
9. Az I_{Ks} potenciális farmakológiai célpontként való vizsgálata, az áram modulálásának terápiás stratégiakénti elemzése ritmuszavarokban.

10. Az I_{Cl} szerepének tisztázása az utódepolarizációs aritmiák kialakulásában.
11. Az intracellularis pH pufferekében szerepet játszó bikarbonát ion mechanikai válaszban és ritmuszavarokban játszott szerepének tanulmányozása.
12. Az AP paramétereinek (hossz, plató magasság) frekvenciafüggéséért felelős ionáramok tanulmányozása.
13. A fordított frekvenciafüggés néven ismert jelenség mechanizmusának vizsgálata kutya és más emlősök kamrai szívműködésében.
14. Olyan automatikus spark felismerő algoritmus/program kifejlesztése, amely lehetővé teszi konfokális mikroszkóppal készült felvételeken nagyszámú spark automatikus detektálását és elemzését.
15. A kamrai szívműködésben megfigyelhető sparkok morfológiai sajátosságainak leírása, kiterjedésük szimmetria viszonyainak jellemzése.
16. A sparkok egy sejtre vonatkoztatott gyakoriságának, frekvenciájának meghatározása.
17. A kumulatív és intrinsic kialakulási valószínűségek alapján két spark közötti kapcsolat erősségének és térkonstansának meghatározása kontroll viszonyok között, valamint az SR túltöltését követően (Ca^{2+} overload).

3. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

3.1. Szerkezeti és funkcionális változások a szívizomsejtek tárolása során

A viabilitási tesztek célja annak eldöntése volt, hogy az izolálást követően a primaer kultúrában mennyire őrződnek meg a sejtek szerkezeti és funkcionális paraméterei. Mivel a módszereinkkel izolált sejtek az alkalmazott tárolási viszonyokkal általában 24-48 órán át stabil, az izolálás napján mérttől szignifikáns mértékben nem különböző AP-t adnak, ezekkel a mérésekkel kívántuk sejtjeink eltarthatóságát tesztelni. A vizsgálatokra patkány bal kamrai sejteket használtunk, amelyeknek meghatároztuk ugyanazon paramétereit az izolálást követően hat órán belül (ez volt a D0-al jelölt nulladik nap), majd öt egymást követő napon (D1-D5).

3.1.1. Sejtméretetek

A méretek vizsgálata során a sejtek hosszát, szélességét, alapterületét és a sarcomerhosszat határoztuk meg a kultúrában tartás során. Általánosan megfigyelhető tendencia volt a sejtek valamennyi vizsgált kiterjedésének csökkenése és a sarcomer hossz rövidülése. A méretek csökkenése mellett a sejtek egy kisebb hányadánál (<5%) polymorf alakzatok kialakulása volt megfigyelhető a tárolás előre haladtával. Egyes sejtek legömbölyödtek, esetleg súlyzó alakot vettek fel, míg mások nyúlványokat növesztettek.

Korábbi megfigyelések egybehangzóan kimutatták, hogy az izolált szívizomsejtek száma a tárolás során jelentős ütemben csökken. A különböző beszámolók a sejtszám csökkenést az első héten 50-70% között jelölik meg [1-4]. Ez a sejtszám csökkenés azonban, bármennyire is

jelentős, valójában nem csökkenti a primaer sejt-kultúra kísérleti felhasználhatóságát. Ennél sokkal jelentősebb következményekkel járhat az a morfológia változás, ami a tárolás során lezajló dedifferenciálódás eredményeként jön létre. Itt bemutatott adataink arra utalnak, hogy a szívizomsejtekben a morfológiai átalakulás igen gyorsan, már az első két nap során, illetve azt követően bekövetkezik.

3.1.2. A T-tubulusok kiterjedésének változása a tárolás során

A T-tubulus-jelölt sejtek egyszerű megtekintésével felismerhető volt, hogy a sejtek T-tubulus rendszere a tárolás során gyorsan defragmentálódik, a relatív terület pedig jelentősen csökken. Az ötödik tárolási napra a sejtek nagy része már csak nyomokban tartalmazott T-tubulust. Tapasztalataink szerint a T-tubulusok kiterjedésének mennyiségi becsléseként használt mutató, az RTTA érték (Relative T-tubule Area) igen jelentős sejt-sejt ingadozást mutat egyazon sejtpopuláción belül, akár közvetlenül a sejtizolálást követően is.

3.1.3. Elektrofiziológiai változások a tárolás során

Az izolálást követően (D0) meghatározott sejtkapacitás átlagértéke 156 ± 8 pF volt, amely a tárolás alatt egyenletesen csökkent, az ötödik napon (D5) elérve a 105 ± 11 pF értéket. Az izolálást követően (D0) a sejtek AP paraméterei (nyugalmi membránpotenciál, AP amplitúdó és szélesség) minden vizsgált ingerlési frekvencián az irodalmi értékeknek megfelelőek voltak. Az ingerlési frekvencia növelésére az AP szélessége megnyúlt (pozitív APD – frekvencia kapcsolat), de az egyes sejtek közötti egyedi APD ingadozások mértéke meghaladta a frekvencia változtatásakor megfigyelhető APD változások mértékét. Az első tenyésztési napon (D1) a sejtek nyugalmi membránpotenciálja jelentősen alacsonyabb volt mint az izolálás napján (D0: -77.3 ± 2.5 mV, D1: -59.6 ± 6.1 mV, $p < 0.001$) és AP-t kiváltani már nem lehetett. Amennyiben a nyugalmi membránpotenciált hyperpolarizáló árammal normalizáltuk, a sejteken szabályos AP-kat tudtunk kiváltani. A további tárolási napok során a sejtek depolarizációja folyamatosan növekedett, végül az ötödik tárolási napon (D5) az átlagérték -24.2 ± 5.9 mV-nak adódott.

Az I_{K1} vizsgálata azt mutatta, hogy a Ba^{2+} érzékeny áram -70 mV-nál mért nagysága a tárolás során egyenletesen csökkent és a csökkenés mértéke már az első napon (D1) statisztikailag

szignifikánsnak adódott. Az ötödik napra az áram nagysága már az izolálás napján mért érték egyharmadával csökkent. Ez az érték ugyanakkor még mindig szignifikánsan nagyobb volt, mint a frissen izolált és detubulált sejtekben mérhető áram nagysága. Érdekes módon a nyugalmi membránpotenciál és az I_{K1} nagysága között lineáris összefüggést találtunk, ami arra utal, hogy az I_{K1} csökkenése a tárolás során meghatározó szerepet tölthet be a kialakuló depolarizációban. Az L-típusú kalcium áram ($I_{Ca,L}$) nagysága folyamatosan csökkent a tárolás során, de eközben sem a feszültségfüggés, sem a kinetikai paraméterek nem változtak meg. Az ötödik tárolási napra (D5) az áram átlagos nagysága az izoláláskor (D0) mért értéknek már csak mintegy fele volt, de még mindig szignifikánsan meghaladta a frissen izolált, detubulált sejteken mért értékeket. Az $I_{Ca,L}$ csökkenés egyik lehetséges oka a korábban már tárgyalt T-tubulus sűrűség csökkenéssel függhet össze.

Összefoglalva a tárolás során végzett vizsgálatok eredményeit megállapíthatjuk, hogy a tárolás alatt a sejtekben már az első két napon jelentős szerkezeti és működési változások következnek be. Már az első tárolási napon (D1) sem tudtunk AP-t kiváltani, bár ekkor még a vizsgált ionáramok nagyságában bekövetkezett csökkenés mértéke nem volt több a kiindulási (D0) érték 20-25%-nál. Mindezekből arra következtethetünk, hogy a tárolás során a sejtek funkcionális állapotának az AP lehet a legérzékenyebb indikátora. Amíg tehát az AP paraméterei az élettani értékeken belül vannak, a sejt többi funkcionális paramétere valószínűleg jól tükrözi az élettani viszonyokat.

3.2. Az AP Clamp technika továbbfejlesztése: Szekvenciális AP Clamp módszer

A Szekvenciális AP Clamp technika (Sequential Dissection Method, vagy „*Onion Peeling*”) több ionáram mérését teszi lehetővé egyazon szívizomsejtből annak AP-je alatt. A technika kifejlesztése során elsődleges feladat annak megvizsgálása, hogy az ionáramok mérésének sorrendje befolyásolja-e az egyes ionáramok mérés során megfigyelt paramétereit. Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgálatba bevont szerek alkalmazási sorrendje nem befolyásolja a mért áramprofilok tulajdonságait. Ez a következtetés fontos feltétele a módszer

alkalmazhatóságának, hiszen lehetővé teszi, hogy a vizsgált tudományos céltól, problémától függően tetszőleges ionáramokat mérjünk meg egy adott sejtben.

3.3. Áramprofilok az AP alatt – faji és regionális eltérések

Ebben a szakaszban a munkába bevont ionáramok AP alatti profiljának meghatározása során kapott eredmények bemutatása történik áramtípusonként, fajok szerinti bontásban. Az esetlegesen megfigyelt szíven belüli regionális különbségek megbeszélése fajokon belül történik.

3.3.1. L-típusú kalcium áram ($I_{Ca,L}$)

A kutya kamrai szívizomzat endocardialis részéből származó (ENDO) sejtek áramgörbéi az AP felszálló szárával egyidőben meredeken növekedtek, majd éles csúcsot adva néhány ms-on belül gyorsan csökkentek. Az áram lecsengésének sebessége a hagyományos négyszög alakú parancsjeleket használó VC mérések során megfigyelhetőnél lényegesen gyorsabb volt, amelynek oka valószínűleg az AP első fázisában lezajló gyors repolarizáció lehetett. EPI sejtek esetében az áram csúcsának átlaga az ENDO sejtekében megfigyeltekénél szignifikánsan kisebb volt. A két sejtípus áramprofilja közötti legjelentősebb különbség azonban az volt, hogy EPI sejteken az AP csúcsa és a dóm között kialakult egy második csúcs. Ez a második csúcs az első csúcsnál alacsonyabb és szélesebb volt, lecsengése pedig az ENDO sejtekben látott áramcsökkenésnél jóval lassabb.

A megfigyelések további tesztelése céljából számítógépes szimulációt végeztünk. A szimulációhoz a Luo-Rudy modellt használtuk Kass-Sanguinetti féle inaktivációs kinetikával [5]. A modell megbízhatóan reprodukálta az általunk regisztrált ENDO és EPI típusú $I_{Ca,L}$ görbéket. Az AP alatti lefutáson túlmenően, a szimulált áramgörbék sikeresen reprodukálták az ENDO sejteken megfigyelhető szimpla, illetve az EPI sejteken megfigyelhető dupla áramhurkokat. A szimulációs kísérletek újabb, független módon igazolták tehát azt a kísérleti adatokból levont következtetésünket, hogy ugyanaz a kalcium csatorna az AP feszültségprofiljától függően az ENDO és EPI sejtekben eltérő lefutású $I_{Ca,L}$ -t hoz létre.

3.3.1.1. Az $I_{Ca,L}$ profilja human kamrai szívmemsejteken

Az előző pontban kapott megfigyelések relevanciáját, illetve emberi szívmemra történő alkalmazhatóságát humán balkamrai szívmemsejteken teszteltük APC módszerrel. Az eredmények jobb összevethetősége érdekében az emberi izolált szívmemsejteken az AP Clamp kísérletekhez a kutya kísérletekben rögzített AP-eket használtuk parancsjelként, ugyanis az emberi szívmemsejteken az AP második fázisát követő incizúra kevésbé kifejezett. A várható különbségek felerősítése érdekében a korábban rögzített AP-jeink közül két olyat választottunk ki, amelyen az ENDO-EPI különbségek igen határozottan megfigyelhetőek voltak. Az $I_{Ca,L}$ mérése Nisoldipine érzékeny áramként történt.

A humán kamrai szívmemsejteken ENDO és EPI AP segítségével kapott áramgörbék nagy hasonlóságot mutattak a kutyan megfigyelt görbékkel.

3.3.1.2. Az $I_{Ca,L}$ profilja tengeri malac kamrai szívmemsejteken

A tengerimalac kamrai szívmem sejtjein az $I_{Ca,L}$ kiterjed az AP teljes hosszára eltérően a korábban tárgyalt kutya és humán sejteken megfigyeltektől. Bár az AP felszálló szárát követően az áram itt is gyorsan aktiválódik, de a gyors fázist egy további, lassabb növekedés követi. Az áram a plató alatt lapos csúcsot képez, majd előbb lassan, később egyre gyorsuló ütemben csökkenve az AP teljes lezajlása előtt szűnik meg. A tengeri malacok szívmemsejtjeiből hiányzik az I_{to} , emiatt az AP morfológiájában kutya és humán sejteken ismert ENDO-EPI irányú inhomogenitás itt nem figyelhető meg.

3.3.2. Kálium áramok

3.3.2.1. A Tranziens Outward Kálium áram (I_{to})

Az I_{to} méréséhez 1 mM koncentrációjú 4-aminopyridint használtunk. 1 Hz-es ingerlési frekvencián mérve az I_{to} az AP felszálló szárát követően igen gyorsan aktiválódik, a csúcsértékét 4.4 ± 0.7 ms alatt elérve. Ezt követően az áram monoexponenciális jelleggel csökken,

időkonstansának átlagértéke 7.4 ± 0.6 ms-nak adódott. 50 ms-al az AP csúcса után az áram már nem különíthető el az alapvonalától. Az áram csúcsértéke 3.0 ± 0.23 A/F, integrálja 29.7 ± 2.5 fC6pF volt ($n=10$). Az áram csúcsértéke mindig megelőzte az AP incisuráját és annak felszálló szárát 10.0 ± 0.8 ms-al követte. Az áram-feszültség görbén látható, hogy az I_{to} a -15 és +40 mV-os tartományban aktív, a csúcsértékét 8.8 ± 1.9 mV értéknél éri el. Nagyfokú lineáris korreláció volt megfigyelhető az egyes sejteken mért áramcsúcs nagysága és az AP incisurájának mélysége között.

3.3.2.2. A befelé egyenirányító kálium áram (I_{K1})

A befelé egyenirányító áram szemben a többi K^+ árammal a diastole alatt egy állandó pozitív (outward) értéket mutat, amely átlagértéke 0.26 ± 0.03 A/F ($n=7$). Az AP felszálló szárával egyidőben az áram meredeken csökkent, majd a plató alatt lassú monoton növekedést mutatott. Az AP hosszának felénél az áram nagysága 0.13 ± 0.03 A/F volt, amely még mindig csupán fele a diastole alatt mérhető értéknek. Az AP harmadik fázisa alatt -22.4 ± 0.8 A/F értéknél az áram növekedése felgyorsult és csúcsértékét (1.8 ± 0.1 A/F) a V_{max} után 1 ms-al követően érte el 58.3 ± 0.6 mV feszültségnél. Az I_{K1} integrál értéke 61.6 ± 6.2 fC/pF volt, amelyből 41.6 ± 2.7 fC/pF esett a terminális repolarizációra és 19.9 ± 6.0 fC/pF a plato időtartamára. Az I_{K1} szolgáltatotta az I_{net} 75%-át a V_{max} időpontjában, ennek megfelelően az AP harmadik fázisa alatti maximális repolarizáció időpontja és nagysága erős korrelációt mutatott az I_{K1} csúcs időpontjával és nagyságával. Hasonlóan az I_{to} és I_{Kr} esetében megfigyeltekhez, nem találtunk korrelációt az áramcsúcs amplitúdója és az AP hossza (APD_{90}) között.

3.3.2.3. A késői egyenirányító áram gyors komponense (I_{Kr})

Az AP Clamp kísérletekben az I_{Kr} monoton módon emelkedett az AP harmadik fázisa alatt látható csúcsig, majd ezt követően a nyugalmi membránpotenciál eléréséig meredeken csökkent. Az áramcsúcs átlagos amplitúdója 0.62 ± 0.08 A/F, az integrál értéke 57.6 ± 6.7 fC/pF volt ($n=9$), ami jó egyezést mutat más szerzők egyéb módszerekkel kapott eredményeivel [6]. Az AP hosszának felénél az áram nagysága mindössze 0.14 ± 0.03 A/F, ami az amplitúdó 23.1 $\pm$ 4.6%-a és lassú, késleltetett kezdeti növekedésre utal. Az áram növekedése $+17 \pm 3.5$ mV értéknél

gyorsul fel és a csúcsát -54.2 ± 1.7 mV-nál éri el. Az áram-feszültség görbe megmutatja, hogy az áram -75 és $+15$ mV tartományban aktív. Elemzéseink megmutatták, hogy az I_{Kr} csúcsa 5-10 millisecundummal megelőzi a harmadik fázis maximális repolarizációjának időpontját. A plato nagy része alatt az I_{Kr} a domináns áram, amely az I_{net} több mint 80%-át teszi ki. A harmadik fázis során azonban a felgyorsuló repolarizációhoz az I_{Kr} már csupán az I_{net} kevesebb, mint egyharmadával járul hozzá. Valószínűleg ennek a kismértékű hozzájárulásnak tulajdonítható, hogy az I_{Kr} csúcsának amplitúdója nem mutatott korrelációt sem a terminális repolarizáció maximális értékével (V_{max}), sem az AP hosszával (APD_{90}).

3.3.3. A klorid áram AP alatti profilja kutya kamrai szívizomsejteken

Az I_{Cl} kétfázisú áramként jelen volt az AP teljes hossza alatt. Az AP felszálló szára alatt az outward komponens gyorsan kiépült és az incizúra mélypontjának elérése előtt elérte csúcsát, majd csökkenni kezdett. A csökkenés kezdetben viszonylag gyorsan zajlott, az áram nagysága 30-40 ms-on belül a csúcérték mintegy harmadára esett. Ezt követően az áram az egész plato alatt közel lineáris módon csökkent a plato középső szakaszán 0 mV érték körül irányt váltva. Az AP harmadik fázisában az áram inward csúcsot adott, majd a repolarizáció lezajlásával egyidőben nagysága nullára csökkent. Az I_{Cl} outward fázisa alatt mind a csúcs értéke, mind az áram integrálja nagyobb volt az inward fázisban megfigyelhetőnél.

3.4. A kamrai szívizomsejtek membránáramainak koordinációja

Az AP jellegzetes feszültségprofilját a sejtmembrán ionáramainak finom egyensúlya, a depolarizáló és repolarizáló erők pillanatnyi eredője rajzolja meg. Minthogy az egyes ioncsatornák funkcionális állapotai (aktiváció, deaktiváció, inaktiváció, inaktivációból való visszatérés) közötti átmenet egyik legfontosabb meghatározója a mindenkori membránpotenciál értéke, a feszültségprofil visszahat az őt kialakító ionáramok dinamikájára. Az egyes ionáramok tehát a feszültségprofil alakításán keresztül saját AP alatti lefutásukat is befolyásolják, aktivációjukat és inaktivációjukat koordinálják. A szívizomsejtek egyes

ionáramainak erőssége között jelentős különbségek vannak, ezért hozzájárulásuk a membránpotenciál változásához is különböző lesz. Ily módon az egyes erősebb ionáramok mintegy „vezetik” a gyengébb ionáramok kiépülését, vagy lecsengését, ami az individuális áramok membránpotenciálon át történő koordinációjának felel meg. A következő szakaszokban a membránpotenciál és az egyes ionáramok, illetve az egyes ionáramok közötti koordináció tanulmányozása során kapott eredményeink bemutatása következik.

3.4.1. Az akciós potenciál és az ionáramok koordinációja

3.4.1.1. Az EPI sejtek dómjait az $I_{Ca,L}$ hozza létre

Amint azt láttuk, az EPI AP incisurája alatt $I_{Ca,L}$ jelentősen lecsökken az L-típusú kalcium csatornák deaktivációja miatt. Ez a zárt állapotú populáció azonban jelentős depolarizáló erőt képvisel, ha megnyílik. Amint az AP első fázisa alatt az I_{to} inaktiválódik, megszűnik egy jelentős repolarizáló erő és ezzel tér nyílik az $I_{Ca,L}$ számára, hogy a membránpotenciált megfordítsa. A növekvő feszültség egyre nagyobb számú kalcium csatornát nyit meg, s ez a pozitív visszacsatolás a membránpotenciált visszaviszi az AP csúcsának közelébe. A feltevés további bizonyítékául szolgál, hogy 1 μ M Nisoldipin jelenlétében az EPI sejtek dómja eltűnik).

3.4.1.2. Az AP és az IKs koordinációja

A chromanol nyújtja az AP-t

A chromanol kutya kamrai sejteken az AP hosszát frekvenciafüggő módon nyújtotta anélkül, hogy más paraméterekben változás következett volna be. 1 Hz-en történő ingerlés esetén az APD_{50} 152.0 ± 7.4 ms-ról 158.0 ± 10.9 ms-ra, az APD_{90} 200.5 ± 8.2 ms-ról 209.7 ± 10.8 ms-ra nőtt 10 μ M chromanol hatására. Ez a kismértékű, de statisztikailag szignifikáns ($p < 0.05$, $n=6$) nyúlás az ingerlés ciklushosszának növelésével egyre jelentősebbé vált. Ugyanakkor a nyugalmi membránpotenciál (-81.0 ± 2.8 vs -82.7 ± 2.1 mV), az akciós potenciál amplitúdó (99.4 ± 2.9 vs 101.2 ± 3.2 mV), a plató magasság (88.1 ± 3.3 vs 90.2 ± 3.5 mV), a felszálló szár maximális meredeksége (272 ± 23 vs 286 ± 31 V/s) esetében a 10 μ M chromanol nem okozott statisztikailag jelentős változást (az adatok 1 Hz ingerlési frekvenciára vonatkoznak).

A Chromanol hatása Isoproterenol vagy E-4031 jelenlétében

A 10 μ M chromanol AP hosszára gyakorolt hatását megvizsgáltuk mind 2 nM isoproterenol, mind 1 μ M E-4031 előkezelést követően. A 2 nM isoproterenollal történő előkezelés szignifikáns módon megemelte az AP plató magasságát anélkül, hogy a hosszát megváltoztatta volna. A plató emelő hatás statisztikailag szignifikánsnak bizonyult és a ciklushossz növelésével arányosan nőtt. 1 μ M E-4031 hasonló mértékben emelte a plató magasságot mint 2 nM isoproterenol, de ezen túlmenően az AP hosszát is frekvenciafüggő módon nyújtotta. 10 μ M chromanol hatására mindkét csoportban, valamennyi vizsgált frekvencián szignifikáns módon megnyúlt az AP, de az AP nyújtó hatásban az előkezeléstől függetlenül nem találtunk különbséget. Összefoglalva a tapasztalatokat megállapíthatjuk, hogy a Chromanol azonos mértékű AP nyújtást idézett elő azon sejteken, amelyeknek csak a plató magassága emelkedett meg és azokon a sejteken, amelyeken a plató magasság emelésén kívül még AP nyúlást is előidéztünk.

Az I_{Ks} modellezése

Megfigyeléseink megerősítése, illetve a látott összefüggések mechanizmusának megértése céljából számítógépes szimuláció segítségével tanulmányoztuk az AP hosszának, illetve plató magasságának hatását az I_{Ks} AP alatti profiljára. A szimulációhoz Viswanathan modelljét használtuk [7]. Voltage clamp viszonyokat modelleztünk, parancsjelként különböző hosszúságú és plató magasságú AP-kat használva. Az eltérő paraméterű AP-kat egy korábban általunk kutya kamrai szívizomsejten rögzített, tipikusnak mondható AP matematikai úton történő átszabásával állítottuk elő egy interpolációs algoritmus segítségével. Két AP sorozatot készítettünk, az egyik esetben a plató magasságát, a másik esetben pedig a hosszát változtattuk az élettani értékeket jelentősen meghaladóan széles határok között. Ezeket az AP-kat parancsjelként alkalmazva a modell segítségével meghatároztuk az áramok AP alatti lefutását, majd ezeket az áramjeleket hagyományos módon elemeztük. Az elemzéseink azt mutatták, hogy az I_{Ks} aktiválásában az AP plató magassága lényegesen nagyobb szerepet játszik, mint a hossza. Modellkísérleteink eredményei tehát összhangban vannak az előzőleg ismertetett

megfigyeléseinkkel. A Chromanol AP nyújtó hatása azért erősebb a magasabb platóval rendelkező AP-ken, mert azokon az I_{Ks} amplitúdója, így módon annak gátlásakor kieső áram nagysága nagyobb.

3.4.1.3. Az egyes ionáramok és az AP paraméterei közötti korrelációk elemzése

Adataink elemzése során világossá vált, hogy az egyes ionáramok nagysága jelentős sejt-sejt közötti különbséget mutat. Az áramcsúcsok alapján számított standard deviáció mértéke több esetben meghaladta az átlagok értékének felét, amely igen nagy egyedi szórást jelez. Ez annál is inkább érdekes megfigyelés, mert az AP paraméterek standard deviációinak átlaghoz viszonyított relatív nagysága ennél jóval kisebb. Természetes módon vetődik fel a kérdés, hogy felismerhető-e valamiféle mintázat, korreláció az egyes áramcsúcsok nagysága között, vagy az áramcsúcsok és az AP paraméterei között? Tükröződik-e például az erősebb, vagy gyengébb depolarizáló (vagy repolarizáló) áram az AP hosszában, vagy plato magasságában?

Mivel az APD_{90} és az $I_{Ca,L}$ csúcsának amplitúdója, vagy az $I_{Ca,L}$ általa hordozott töltésmennyiség között a hagyományos statisztikai eljárásokkal korrelációt nem tudtunk kimutatni, egy mesterségesen tisztított mintán végeztük el az analízist a lehetséges korreláció biztos kizárására. Az AP paraméterei és az egyes ionáramok paraméterei közötti korreláció hiányát ugyanis azzal is magyarázni lehet, hogy a nagy statisztikai ingadozás elfedi az egyébként jelenlévő korrelációt. Az $I_{Ca,L}$ és az I_{Ks} esetében a teljes halmazból kiválasztottuk az öt-öt legkisebb és legnagyobb töltésmennyiséget (Q_{NISO} és Q_{CHROMA}) szállító sejteket és ezek AP paramétereit hasonlítottuk össze egyszerű páratlan t-próbával. Létrehoztunk tehát két „kis ionárammal” és „nagy ionárammal” működő sejteket tartalmazó csoportot és arra voltunk kíváncsiak, hogy ezek AP paraméterei különböznek-e egymástól? Adataink azt mutatják, hogy az ilyen módon kialakított csoportok sejtjeinek AP-i között statisztikailag szignifikáns különbség nem volt. Következésképpen az egyes ionáramok paraméterei nem prediktívek az AP paramétereire.

3.4.1.4. A fordított frekvencia függés jelenségének vizsgálata

A különböző csatornagátlók, illetve aktivátorok esetén ismert, hogy az AP különböző paramétereire (alapértelmezésben a hosszára) gyakorolt szerhatás erőssége függ a szív működési frekvenciájától. Ezen frekvenciafüggő hatások közül a legismertebb az III-as osztályba tartozó antiaritmiás szerek fordított frekvencia függő (a továbbiakban FFF) hatása. A jelenség régóta ismert, de pontos mechanizmusa mindmáig nem tisztázott [8, 9]. Az AP és az ionáramok közötti koordinációra irányuló munkánk során adataink abba az irányba mutattak, hogy a FFF hatás egyik lehetséges tényezője lehet az AP hossza és a membránáramok közötti kapcsolat. Feltételeztük, hogy a FFF hatás minden olyan fajban jelen van, ahol az AP hossz – frekvencia összefüggés negatív (vagy fordított). A hipotézis tesztelésére különböző hatásmechanizmusú csatornákra ható szerek Az AP hosszára (a továbbiakban APD-re) gyakorolt hatását elemeztük. Azt kívántuk megmutatni, hogy a FFF hatás minden szer esetében jelentkezik, annak hatásmechanizmusától függetlenül.

Az első lépésben hat ismert szívhatású szer APD-re gyakorolt hatásának frekvenciafüggését mértük meg 0.2 – 3 Hz tartományban. A méréseket hegyes elektróddal végeztük multicelluláris preparátumon a sejtek dialízisének megelőzése érdekében. Adataink egyértelműen igazolták, hogy a különböző támadáspontú szerek minden esetben frekvenciafüggő módon fejtették ki hatásukat az APD-re, bár a Nicorandil és a Lidocain hatása egyenes arányban állt az ingerlési frekvenciával.

A következő lépésben az általunk javasolt magyarázat több fajra történő kiterjesztése érdekében öt állatfajon ismételtük meg a korábbi vizsgálatot különféle támadáspontú csatornagátlókkal és aktivátorokkal. A hipotézis további tesztelése céljából az adatokat ezúttal nem az ingerlési frekvencia, hanem az APD alapján elemeztük. Azt vizsgáltuk, hogy az APD értékei korrelálnak-e az ioncsatornákra ható szerek hatásának mértékével. Az előzőekkel egybevágóan, megfigyeléseink minden faj esetében megerősítették hipotézisünket, mely szerint a kontroll viszonyok között mért APD határozza meg az AP hosszában bekövetkező változás mértékét. Az arányosság lehet egyenes, vagy fordított, de a hosszabb AP-ken minden esetben nagyobb változásokat figyelhetünk meg, a rövidebbeken pedig kisebbeket.

3.4.2. Ionáramok közötti koordináció

3.4.2.1. A depolarizáló és repolarizáló áramok koordinációja tengeri malac kamrai izomsejtjein

Élettani viszonyok között, a szív ciklus során a depolarizáló és repolarizáló áramoknak egyensúlyban kell lenniük. Szekvenciális Akciós Potenciál Clamp technikával ugyanazon sejtek négy áramát ($I_{Ca,L}$, I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}) rögzítettük és azt vizsgáltuk, hogy bármely áram pár, vagy az áramok csoportjainak amplitúdója, vagy egyéb paraméterei között felismerhető-e bármilyen összehangolás, együttműködés. Meglepő módon az áramok páronként történő elemzése során csupán az $I_{Ca,L}$ és az I_{Ks} között figyeltünk meg értékelhető kapcsolatot. A két áram által az AP alatt szállított töltésmennyiség jó korrelációt mutatott ($r=0.79$). Ugyancsak szoros kapcsolatot figyeltünk meg az AP alatt elmozduló teljes töltésmennyiségek között (Q_{inward} versus $Q_{outward}$) ahol a korrelációs együtthatót 0.78-nak találtuk. Ezekből a megfigyelésekből két érdekes következtetést vonhatunk le. Egyrészt, ahogy a korábbi fejezetekben már érintettem, a késői egyenirányító kálium áram többek által megkérdőjelezett szerepe kapcsán hangsúlyoznunk kell, hogy a mi megfigyeléseink szerint az I_{Ks} a kamrai szívizomsejtek fontos repolarizáló árama. Ezen túlmenően az $I_{Ca,L}$ -al mutatott korrelációja miatt még azt is valószínűsíthetjük, hogy az I_{Ks} jelentős szerepet tölt be az AP adaptációjában. Másrészt, mivel a másik két repolarizáló áram esetében nem látunk semmiféle korrelációt, valószínűsíthetjük, hogy ezeknek a repolarizációban való részesedése nem szimpla „arányos teherviselés” alapján történik, hanem valamilyen, mindmáig fel nem tárt megosztás alapján. Valamilyen megosztásunk léteznie kell, hiszen a kifelé és befelé elmozduló töltések mennyisége azonos.

3.4.2.2. Az I_{Kr} és I_{K1} frekvenciafüggetlen áramok

Minthogy az AP frekvenciafüggő tulajdonságai az ionáramok frekvenciafüggő tulajdonságaiból származhatnak, kutya kamrai szívizomsejteken megvizsgáltuk az AP plató magasságát és hosszát meghatározó két kálium áram frekvenciafüggő sajátosságait 0.2 és 1.66 Hz között. Eredményeink azt mutatták, hogy az áramok nagysága csakúgy mint az AP maximális repolarizációs sebessége nem mutatott frekvenciafüggést. Emellett azonban azt is megfigyeltük, hogy a két áram között feltételezhető egyfajta összjáték. Amennyiben az egyik áram amplitúdója megnövekszik és ezzel a repolarizáció sebessége felgyorsulna, a membránpotenciál

gyorsabban éri el az alacsonyabb feszültségértékeket és ezzel a töltéshordozó K^+ -ra ható hajtóerő, valamint a másik áram aktivációját (a sajátjával együtt) lecsökkenti. Ez a fajta önszabályozó rendszer alkalmas lehet a terminális repolarizáció frekvenciától független sebességen tartására a B panelen mutatott megfigyeléseinknek megfelelően. Megfigyeltük ugyanakkor, hogy az I_{K1} által szállított töltésmennyiség mintegy háromszorosa az I_{Kr} által szállítottaknak, tehát a terminális repolarizáció beállításában az I_{K1} a domináns áram. Hasonló következtetésekre jutottak Gintant és *mtsai* hagyományos voltage clamp kísérletek adataiból [10].

3.4.2.3. Az $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} koordinációja

Amennyiben az $I_{Ca,L}$ -t Nifedipin érzékeny áramként mérjük meg az AP alatt olyan pipetta oldattal amely nem tartalmaz kalcium puffert, a kapott áramprofil az $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} kompozit árama lesz. Ilyen körülmények között a két áram elválaszthatatlan egymástól, ugyanis a belépő Ca^{2+} -k aktiválják az I_{NCX} -et és a voltage clamp technika alapelvéből következően az erősítőnk a két áram összegét fogja mérni. Farmakológiai módszerek és modellezés kombinációjával megkísérelhetjük a két áram szétválasztását. A SEA-0400 nevű gátlószer az I_{NCX} -et részlegesen, dóziszfüggő módon gátolja. Ha tehát meghatározzuk a SEA-0400 érzékeny áramot intracelluláris Ca^{2+} puffer jelenlétében és hiányában, az adatokból az I_{NCX} AP alatti lefutását meghatározhatjuk. A görbék vizsgálatakor feltűnik, hogy az elméleti megfontolásokkal szemben, a görbe korai szakaszán található outward komponens mérete nagyon kicsi és az inward csúcs is a várt érték alatt van [11, 12]. További nem várt megfigyelés, hogy EGTA jelenlétében az I_{NCX} teljes egészében outward irányú. Megfelel azonban a várakozásoknak, hogy a csúcst a plató végén találjuk, a terminális repolarizáció közelében, ahol az EAD-ok a leggyakrabban jelentkeznek. Az áramgörbék lefutásából megállapítható, hogy míg az AP kezdeti szakaszán és a plató alatt az $I_{Ca,L}$ a domináns áram, a plató végére már felnő az I_{NCX} és átveszi a domináns szerepet.

3.5. Az SR elemi kalciumfelszabadulási jelenségeinek koordinációja

A disszertáció eddigi szakaszában az ionáramok koordinációjának problémájával foglalkoztam. A kérdéskör kiterjesztéseként azonban indokolt azt is megvizsgálni, hogy a sejtplazma kalcium koncentrációjának szabályozásában felismerhetőek-e koordinációs jelenségek.. A sparkok közötti kommunikáció jelensége már hosszú ideje ismert [13-16]. A következőkben ismertetendő munkánk célja az volt, hogy statisztikai módszerekkel jellemezzük a sparkok közötti kommunikációt, vagyis kvantitatív leírását adjuk a feltételezett koordinációnak. Ehhez a vizsgálathoz nagyszámú sparkot kellett megvizsgálnunk. A nagy adatmennyiség indokolta, hogy a sparkok felismerését és statisztikai elemzését automatizáljuk.

3.5.1. Új, automatizált eljárás a sparkok felismerésére

A sparkok azonosítása hagyományosan a mikroszkópos felvételek megtekintésével történik, majd ezt követően a felvillanásokat tartalmazó képkockákat elemzik. Munkánk során patkány kamrai szívizom sejteken megfigyelhető sparkokat vizsgáltunk (lásd Módszerek fejezet). A sejtekről 200 darab 2D képkockát (512x512 pixel, 12 bites pontfeloldás) tartalmazó sorozatot készítettünk, amelyen az egyes felvételek 12 ms-os időközökben követték egymást. Az automatikus felismerő algoritmus/program számára elsőként ki kellett dolgozni és matematikailag megfogalmazni egy olyan feltételrendszert, amely segítségével a szívizomsejtekről készült fluorescens mikroszkópos felvételeken a sparkok egyértelműen azonosíthatóak voltak. Ezt követően el kellett készítenünk azt a programot, amely a digitális felvételeket beolvasta és elemezte. A program írására IDL nyelvet választottunk (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO). A program beolvasta a képkockákat, majd a sparkok felismerése céljából minden egyes képpont intenzitás értékét összehasonlította egyrészt az azonos képkockán található többi képpont, másrészt az egymást követő képkockák azonos koordinátájú képpontjainak intenzitás értékeivel.

A sparkok automatizált felismeréséhez a képkockák azon képpontjait kellett felismerni, melyek intenzitása az egymást követő felvételeken megnövekszik, majd egy csúcspont elérése után lecsökken. Mivel az egyes sejtek esetében a háttér intenzitása és a sejtek kalcium érzékeny festékekkel történő individuális töltődése miatti fluoreszcens intenzitásértékek igen széles határok között változtak, a kritériumok numerikus paramétereinek mindig az aktuális felvételek intenzitás értékeihez kellett alkalmazkodni.

3.5.2. A sparkok tulajdonságai

Az automatikus felismerő algoritmus segítségével 77 sejten rögzített, egyenként 10 másodperc hosszúságú képsorozaton 6670 sparkot azonosítottunk, majd elemeztünk.

3.5.2.1. A dinamikus spark frekvencia meghatározása

A kétdimenziós leképezés (szemben a jobban elterjedt „line scan” eljárással) lehetővé teszi a sejt alapterületének nagy részére kiterjedő megfigyelést és a sparkok egész sejtre vonatkozó gyakoriságának, frekvenciájának megmérését. Mivel a mérések patkány sejteken készültek és a patkányra jellemző az ugynevezett negatív frekvencia-erő összefüggés, a mérések előtt a sejteket minimum két percen keresztül 1 Hz frekvencián téringerléssel ingereltük, majd közvetlenül a mérés előtt tíz másodpercnyi ingerlésmentes szünetet iktattunk be. Ezzel a protokollal a patkány és egér sejtek SR-ra nyugalmi állapotban jellemző kalcium túltöltődés megszüntethető. A sparkok frekvenciájának időfüggését úgy állapítottuk meg, hogy a kumulatív spark számot az eltelt idő és a (sejt maszk meghatározásával) mért terület szorzatának a függvényében ábrázoltuk. Amennyiben egy lineáris összefüggést láttunk, a spark frekvencia konstans volt. Ebben az esetben a spark frekvenciát az egyenes meredekségéből kaptuk meg. A vizsgálat keretében lemért sejtek 75%-a konstans spark frekvenciával rendelkezett, a további vizsgálatokat ezeken végeztük (n=6670). A sejtek 8%-ában a spark frekvencia az idő előrehaladtával növekedett, míg 17%-ban csökkent. Ezt az összességében 25%-os instabil csoportot a további vizsgálatokból kizártuk. Tapasztalataink szerint az egyes sejtek kumulatív spark számának jelentős individuális szórása volt. A spark frekvencia

eloszlásgörbéje erősen aszimmetrikus alakú volt, szélső értékeit 1.7×10^{-6} és $1.3 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{ms}$ -nak találtuk. Az átlagra 2.2×10^{-5} , a mediánra $1.2 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{ms}$ értéket kaptunk.

Az általunk talált értékeknek az irodalmi adatokkal történő összevetése kissé problematikus, ugyanis 2D módszerrel végzett spark frekvencia meghatározásra vonatkozó publikált megfigyelést nem találtunk. Az irodalomban található mérések line scan technikával készültek, ami csupán indirekt, közelítő összehasonlításra ad lehetőséget. Ha abból indulunk ki, hogy a confocalis mikroszkóp laterális feloldása $\approx 0.25 \mu\text{m}$, míg az axiális feloldás $\approx 1 \mu\text{m}$ voltak, akkor méréseink során minden $1 \mu\text{m}$ -es sáv leképezésekor a fotonok egy $0.25 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} = 0.25 \mu\text{m}^3$ -os térfogathoz származnak. A közös mértékegységre történő konvertáláshoz a saját értékeinket meg kell szorozni $1/\mu\text{m}$ -el, amely az optikai tengely mentén történő mélységből következik. Az irodalomban található *line scan* módszerrel mért spark frekvencia értékek patkány kamrai sejteken $0.85 \text{ spark}/100 \mu\text{m}$ és $4.6 \text{ spark}/100 \mu\text{m}$ között találhatók [14, 17]. Ezek az adatok átszámítva a 3.4×10^{-5} és $1.8 \times 10^{-4} 1/\mu\text{m}^3/\text{ms}$ értékeket adják. Saját mérési adataink ugyanezen egységben kifejezve $1.7 \times 10^{-6} - 1.4 \times 10^{-4} 1/\mu\text{m}^3/\text{ms}$ -nek felelnek meg, ami jó egyezésnek felel meg, de az irodalomban található patkány adatoknál valamivel szélesebb sávot ad. Más fajokon azonban a mi adatainkhoz hasonlóan széles szórást találtak. Hüser és mtsai macska pitvari sejteken figyelte meg, hogy a spark frekvencia $2.4 \times 10^{-6} - 1.8 \times 10^{-4} 1/\mu\text{m}^3/\text{ms}$ tartományban szóródik [18]. Patkány és macska pitvaron, valamint nyúl kamrai sejteken ezekkel az értékekkel jól egyező spark frekvenciákat mértek más munkacsoportok is [18-20]. Megállapíthatjuk tehát, hogy az általunk megfigyelt spark frekvenciák az első 2D mérésekből származó adatok és az irodalmi értékekkel jó egyezést mutatnak.

3.5.2.2. A sparkok alakja szimmetrikus

A sparkok térbeli kiterjedését kétdimenziós Gauss görbével történő illesztés, majd az amplitúdó félmagasságánál történő szélesség x és y irányú mérésével határoztuk meg (FWHM: Full Width at Half Maximum). Az elemzésbe kizárólag azokat a sparkokat vontuk be, amelyek amplitúdója ($\Delta F/F_0$) a 0.2 értéket meghaladta, ezzel biztosítva a zajszintből való megbízható kiemelkedést. Ennek a kritériumnak az általunk összesen detektált 6670 sparkból 907 felelt meg. A kapott

szélességekből egyrészt átlagértéket számítottunk, másrészt minden spark esetén grafikusán ábrázoltuk az Y irányú kiterjedést az X irányú kiterjedés függvényében (FWMH_Y versus FWMH_X). A 907 vizsgált spark alapján a kiterjedések átlaga $\text{FWMH}_X=2.32\pm0.008 \mu\text{m}$ és $\text{FWMH}_Y=2.30\pm0.007 \mu\text{m}$ voltak (Mean $\pm$ S.E, $p>0.05$). Amikor a sparkok Y-tengely irányú kiterjedését ábrázoltuk az X-tengely irányú kiterjedésének függvényében, a pontok egy olyan halmazt alkottak, amelynek szimmetria tengelye 45° -os szöget zárt be a koordináta-rendszer tengelyeivel. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a sparkok a sejt síkjában szimmetrikus kiterjedésűek.

Mivel a méréseket di-8-ANEPPS-el töltött sejteken végeztük a sparkok térbeli eloszlásának vizsgálata céljából, felmerült annak lehetősége, hogy a szimmetrikus kiterjedés a T-tubulusok és a sparkok egymásra vetülése miatti műtermék. Ennek a lehetőségnek kizárására di-8-ANEPPS festés nélküli sejteken is tanulmányoztunk sparkokat. A vizsgálatba bevont 259 spark esetén az átlagértékek $\text{FWMH}_X=2.22\pm0.013 \mu\text{m}$ és $\text{FWMH}_Y=2.22\pm0.013 \mu\text{m}$ voltak (Mean $\pm$ S.E, $p>0.05$). A grafikus elemzés eredménye is megegyezett a di-8-ANEPPS-el töltött sejteken kapottakkal. Mindezek ismeretében megállapíthatjuk, hogy a sparkok szimmetrikus kiterjedése nem lehet mérési műtermék következménye.

Az a megfigyelésünk, hogy a sparkok kétdimenziós kiterjedése szimmetrikus, ellentétes korábbi ismereteinkkel, melyek szerint a sparkok a T-tubulusokkal párhuzamos irányban (Y-tengely, vagyis a sejt szélessége mentén) keskenyebbek, mint a sejt hossz tengelye irányában [13, 21]. A Parker és *mtsai* által publikált sparkok aszimmetriája igen jelentős, mintegy 2:1 (X:Y) arányú. Bár közleményeikben nem mérték meg az általuk rögzített sparkok kiterjedésének arányait, a jól látható aszimmetriát a Ca^{2+} kötött Fluo-3 diffúziós anizotrópiájával magyarázták [13]. Cheng és *mtsai* ennél lényegesen kisebb mértékű aszimmetriát találtak munkájuk során. Eredményeik azt mutatták, hogy a FWMH_Y mintegy 18%-al kisebb mint az FWMH_X [21]. Béka vázizmán nyugalomban ugyancsak szimmetrikus sparkokat figyeltek meg, de ezek a sparkok koffein hatására aszimmetrikussá váltak [22].

Az általunk tapasztalt szimmetria elméletileg származhatott volna a vizsgált sejteink véletlenszerű pozicionálásából, amikor a valójában aszimmetrikus sparkok random orientációja kiegyenlítette volna a kiterjedésbéli különbségeket, ezzel eredményezve a látszólagos

szimmetriát. Kísérleteinkben azonban éppen azért alkalmaztuk a di-8-ANEPPS festést, hogy a sejtek alakján kívül a T-tubulusok iránya is segítse a vizsgált sejt hossz tengelyének azonosítását és megfelelő beállítását. Emiatt sejtjeink X-Y irányú orientációja igen megbízható volt, vagyis a szimmetria nem lehetett pozícionálási hiba következménye.

A szimmetriaviszonyok téves értékelése származhatott volna képalkotási műtermékből is. A Zeiss 5 Live mikroszkóp esetében egy képvonal leképezése ugyanabban az időpillanatban történik, de két egymást követő vonal között 25 μ s különbség van (80Hz-es, 512x512 pixeles leképezést alapul véve). Az időkülönbségből eredő X-Y irányú képtorzítás nagysága függ a leképezett objektum (esetünkben a spark) életidejétől és arányos a kamera záridejének, valamint a spark időbeli lefolyásának viszonyával. Minthogy egy spark átlagos FWHM értéke $\approx 2\mu$ m és egy pixel mérete 0.12 μ m, egy spark leképezésének ideje ≈ 0.4 ms. A sparkok tipikus életideje ≈ 30 ms körül van, vagyis sokkal lassabbak, mint a leképezésükhöz szükséges idő. Tehát a szívben megfigyelhető, viszonylag lassú sparkok esetén a leképezési időből adódó X-Y irányú torzítás jelentéktelennek mondható, ezért feltételezhetjük, hogy a kép jól reprezentálja a valós viszonyokat.

A sparkok szimmetrikus szerkezete jelentős következményekkel jár a Ca^{2+} diffúziós viszonyaival kapcsolatos ismereteinkre. Az általunk megfigyelt diffúziós izotrópia azt sugallja, hogy a Z-vonalak mentén található nagy denzitású fehérje környezet [23] a korábbi feltételezésekkel szemben nincs mérhető hatással a Ca^{2+} diffúziójára. A sparkokat és kalcium hullámokat leíró korábbi matematikai modelljeink arra a feltételezésre épülnek, hogy a Ca^{2+} és Ca^{2+} -kötött Fluo-3 diffúziója anizotróp [16, 24, 25]. Az anizotróp viszonyoknak izotrópra történő cseréje jelentősen megváltoztatja a Ryanodine receptorok Ca^{2+} áramainak számított értékét. Ha például feltételezzük, hogy a diffúziós koefficiens az Y tengely mentén fele az X és Z tengelyének, az egyetlen spark létrehozásához szükséges kalcium áram 56%-a annak a mennyiségnek, amely izotróp diffúzió esetén adódik. Izotróp diffúziós viszonyok esetén ugyanis a gömb alakú spark térfogata az ellipszoid sparkénál nagyobb [25].

3.5.3. A sparkok koordinációja

A sparkok koordinációja alatt az individuális sparkok kialakulásában felismerhető összehangoltságot, az egyes sparkok közötti kapcsolat térbeli és időbeli sajátosságait értjük. Ennek tanulmányozása során azt kívántuk meghatározni, hogy egy adott spark milyen valószínűséggel vált ki egy újabb sparkot adott sugarú környezetében. A jelenség hasonló a pocsolóba hulló esőcseppekhez, amelyek becsapódva hullámgyűrűket váltanak ki a vízfelszínen ez lehet az elsődleges spark analógiája. A becsapódáskor azonban szertefröccsenő vízcseppek is keletkezhetnek, melyek maguk körül újabb, másodlagos hullámgyűrűket indíthatnak.

Az elemzéshez először definiáljuk az elsődleges és másodlagos spark fogalmát. Mindenekelőtt azt szükséges leszögezni, hogy az elsődleges és másodlagos jelzők kizárólag az analízis lebonyolításához szükséges fogalmak, ugyanis egy spark esetében, pusztán a spark tulajdonságainak (amplitúdó, kiterjedés, fennállási idő) vizsgálatával nem lehetséges eldönteni, hogy az spontán jelent meg egy adott helyen és időpillanatban (tehát elsődleges), vagy egy másik spark váltotta ki (vagyis másodlagos). Az elemzés során technikai szempontból minden sparkot elsődlegesnek tekintettünk amikor azonosító algoritmusunk detektálta. Ezt tekintve null időpontnak, további sparkokat kerestünk koordinátáinak $0.3 \mu\text{m} < r < 15 \mu\text{m}$ környezetében 15 ms-on belül. A távolság alsó értékét azért kellett nullánál nagyobbra választani, hogy az azonosító algoritmus a későbbi képkockákon önmagát az elsődleges sparkot ne azonosítsa másodlagos sparkként. A 15 ms nagyon szoros időtartománynak tűnhet, de figyelembe véve, hogy a sparkok átlagos kialakulási ideje 5 ms, lecsengési ideje pedig 10-15 ms körül van, ez az érték elgendően tág egy megbízható azonosításhoz, ugyanakkor nem okozza a másodlagos sparkok számának jelentős alulbecslését. Amint egy adott spark esetében a potenciális másodlagos sparkok azonosítása befejeződött, a spark kereső program a következő képkockára lépett és minden azon felbukkanó sparkot elsődleges sparkként kezelt (tehát az előző ciklusban másodlagosként azonosítottat is), majd ezzel indította a másodlagos sparkok keresését. Erre azért volt szükség, mert a másodlagos sparkok ugyanúgy kiválthattak újabb sparkokat a környezetükben mint az, amelyik őket létrehozta. Ismert a 4-8 tagból álló „ugráló” sparkok

(jumping sparks) fogalma, amikor a láncszerűen terjedő sparkok sorban aktiválják az időben utánuk következőket [26].

3.5.3.1. A sparkok közötti kapcsolat erőssége és annak távolságfüggése

A sparkok $f^*(r)$ tapasztalati gyakoriságát ezzel a függvénnyel illesztve jól látható, hogy az elsődleges sparkok mintegy 2 μm -es környezetében az újabb spark kialakulásának valószínűsége kiemelkedően magas. A sűrűséggörbén az $r \approx 0$ távolságban egy magas csúcs látható. Ez a csúcs mutatja azon sparkokat, amelyek az elsődleges spark közvetlen környezetében alakultak ki. A csúcs magasságát és szélességét a sparkok kapcsolatának erőssége (A) és a térkonstans (ρ) határozzák meg. Ha $A=0$, akkor a sparkok között nincs kapcsolat és az $r=0$ pont környezetében nem jelenik meg csúcs. Ekkor az elsődleges spark környezetében a sparkok várható gyakorisága megegyezik a nagy távolságban mért gyakorisággal. Az A paraméter értéke a kísérleti adatok alapján 45.9, ami a sparkok közötti erős kapcsolatra utal. A térkonstans (ρ) értéke 0.97 μm -nek adódott, ami azt jelenti, hogy a sparkok csak igen szűk környezetükben válhatnak ki újabb sparkokat, hatásuk 2 μm -nél távolabb már elhanyagolható.

3.5.3.2. A sparkok modellezése

A megfigyelt adatok ellenőrzése céljából modell vizsgálatot végeztünk. Ebben a sparkokat egy 40x40 μm kiterjedésű kétdimenziós síkban modelleztük. A CRU távolságot a valós érték tizedére csökkentettük (0.2x0.1 μm) annak érdekében, hogy a valós spark frekvenciánál nagyobb értéket kapjunk, ami felgyorsítja a modell futását. Minden CRU-hoz azonos spontán spark generálási valószínűséget rendeltünk. Ha egy CRU sparkot generált, akkor az r környezetében lévő CRU-k tüzelési valószínűségét a kísérleteinkben meghatározott φ értékre növeltük. A modell vizsgálatok alapján számított intrinsic gyakoriság (γ) $5 \times 10^{-4} \text{ 1}/\mu\text{m}^2/\text{ms}$ -nek adódott, ami jelentős eltérés a kísérletekben meghatározott értéktől. Az eltérés lehetséges oka, hogy az elsődleges spark környezetében megjelenő spark nem feltétlenül áll ok-okozati viszonyban az őt időben megelőző sparkkal. A spark r sugarú környezetben megjelenhet olyan spark (b) is, amelyet egy távolabb lévő spark indukál. Ezek a sparkok a sparkok közötti kapcsolatot jellemző (A) paraméter túlbecslését eredményezik. Ha azonban az A értékét az első elemzésben kapott

45.9-ről 29.75-re csökkentjük, a modellből számított γ értéke $7.7 \times 10^{-4} \text{ 1}/\mu\text{m}^2/\text{ms}$ lett, jól reprodukálva a kísérleti adatokból számoltat.

3.5.3.3. A sparkok vizsgálata alacsony Na^+ tartalmú oldatban

Analitikai eljárásunkat szeretnénk volna olyan viszonyok között tesztelni, amikor a sparkok intrinsic gyakorisága (esetleg egyéb paraméterei) eltérnek a nyugalmi állapotban mértektől. A sejtek egy csoportját ezért olyan Tyrode oldatban vizsgáltuk, melynek Na^+ tartalmát 145-ről 115 mM-ra csökkentettük, ozmotikusan azonos mennyiségű n-metil-D-glucamin-nal pótolva a hiányzó részt. Ilyen környezetben a szívizomsejtek SR-je Ca^{2+} -al túltöltődik (*Ca^{2+} overload*), amely ismert módon megnöveli a sparkok gyakoriságát. Ahogy várható volt, ilyen viszonyok között a sparkok gyakorisága megnőtt ($\gamma = 4.24 \times 10^{-5} \text{ 1}/\mu\text{m}^2/\text{ms}$), érdekes módon azonban a kapcsolat erőssége lecsökkent ($A = 15,31$), míg a térkonstans változatlan maradt ($\rho = 0,97 \mu\text{m}$). A sparkok gyakoriságát és amplitúdóját alapvetően meghatározza a CRU-k $(\text{Ca}^{2+})_i$ iránti érzékenysége. A $(\text{Ca}^{2+})_i$ magasabb alapértéke mellett az elsődleges spark környezetében több CRU aktiválódhat, ami megmagyarázza a megemelkedett intrinsic gyakoriságot. Az SR megemelkedett Ca^{2+} tartalma ugyancsak a frekvencia növekedésének irányában hat [ED 29, 30]. A kapcsolat erősségének csökkenését a sparkok amplitúdójának változása magyarázhatja. Feltételezhetően az átlagos spark amplitúdó Tyrode oldatban nagyobb, mint alacsony Na^+ tartalmú közegben, ugyanis a megemelkedett $(\text{Ca}^{2+})_i$ magasabb bazális fluoreszcencia értéket okoz, ami a sparkok mért amplitúdójának csökkenését eredményezheti. Az adatok elemzése megmutatta, hogy normál Tyrode oldatban a sparkok amplitúdója csakugyan magasabb mint alacsony Na^+ tartalmú közegben (0.136 vs. 0.117, $p < 10^{-4}$), ami valószínűsíti, hogy ezekben a kísérletekben a sparkok számát alulmértük és ez vezethetett az A paraméter alulbecslésére.

4. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

A munka során elért új tudományos eredmények, megállapítások és következtetések

1. Izolált emlős kamrai szívizomsejteken meghatároztuk az elsődleges kultúrában tartás alatt kifejlődő szerkezeti és funkcionális változásokat. Megállapítottuk, hogy a kultúrában tartott sejtek elektrofiziológiai célokra 48 órán át megbízhatóan felhasználhatóak.
2. Kifejlesztettük a Szekvenciális Akciós Potenciál Clamp technikát, mely lehetővé teszi több ionáram egyazon sejtben történő akciós potenciál alatti mérését.
3. Új, automatizált módszert dolgoztunk ki a sparkok detektálására és elemzésére.
4. Akciós potenciál clamp technika segítségével feltérképeztük az emlős kamrai szívizomsejtek kardinális ionáramainak ($I_{Ca,L}$, I_{NCX} , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks}) akciós potenciál alatti lefutását.
5. Tanulmányoztuk az $I_{Ca,L}$ transmuralis heterogenitását. Megállapítottuk, hogy endocardialis sejtekben az áram a korai csúcsot követően gyorsan inaktiválódik, epicardialis sejtekben pedig az első csúcsot követi egy második csúcs az incisura alatt.
6. Megállapítottuk, hogy az akciós potenciál incisura alatti repolarizációja képes deaktiválni az L-típusú kalcium csatornát és a deaktiválódott csatornák reaktivációja hozza létre az epicardialis sejtekre jellemző dómot.
7. Megmutattuk, hogy az akciós potenciál alatt az L-típusú kalcium csatornák képesek többszöri záródásra és megnyílásra, amely jelenség hozzájárul az akciós potenciál formájának kialakításához és elősegítheti a korai típusú utódepolarizációk (EAD) létrejöttét.
8. Először mutattuk meg kísérletesen, hogy a kamrai szívizomsejtek klorid árama az akciós potenciál alatt két fázisú. A korai fázis a repolarizációhoz, a késői fázis a depolarizációhoz járul hozzá.
9. Tanulmányoztuk a klorid áram szerepét a ritmuszavarok kialakulásában. Megfigyeltük, hogy a klorid áram gátlása fokozza az utódepolarizációs aritmiák kialakulásának esélyét.

10. Megfigyeltük, hogy a bikarbonát ion csökkenti kutya kamrai izomsejtekben az utódepolarizációs aritmiák kialakulásának gyakoriságát.
11. Megfigyeltük, hogy kutya kamrai szívizom sejtjeiben a befelé egyenirányító kálium áram és a késői egyenirányító kálium áram gyors komponense időben szinkronizált módon működik és csúcsaik egybe esnek az akciós potenciál terminális repolarizációjának legyorsabb szakaszával. Az időbeli szinkronitás ellenére a repolarizáció meredeksége és az áramok amplitúdója között csak az I_{K1} esetében találtunk korrelációt.
12. Megállapítottuk továbbá, hogy a befelé egyenirányító kálium áram csúcsa és a késői egyenirányító kálium áram gyors komponensének farokárama frekvenciafüggetlen szabályozás alatt áll.
13. Tanulmányoztuk a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének szerepét a repolarizációban. Megmutattuk, hogy az áram az akciós potenciál alakjának megformálásában jelentős szerepet tölt be. Feltártuk azt a koordinációs mechanizmus, melynek révén az áram aktivációját az akciós potenciál plató magassága szabályozza.
14. Megállapítottuk, hogy szívben a legtöbb ioncsatornára ható szer akciós potenciál hosszára gyakorolt hatásának erőssége az ingerlési frekvenciától függ.
15. Új hipotézist dolgoztunk ki a frekvencia függő hatások magyarázatául. Kísérleti adataink arra utalnak, hogy a jelenségért az akciós potenciál nyugalmi hosszának frekvenciafüggése a felelős. A hipotézist több fajon teszteltük és megerősítettük.
16. Megfigyeltük, hogy az emlős kamrai akciós potenciál alatti ionáramok varianciája egy egész nagyságrendet ér el. Kimutattuk, hogy ugyanakkor az ionáramok intenzitása és az akciós potenciálok paraméterei között nincs kapcsolat.
17. Először határoztuk meg és írtuk le a Na^+/Ca^{2+} csereáram akciós potenciál alatti lefutását kísérletes módszerrel. Megmutattuk, hogy az áram inward csúcsa az utódepolarizációk feszültségtartományában jelentkezik, késői komponense pedig az akciós potenciál végén jellegzetes utópotenciált hoz létre.
18. Megállapítottuk, hogy a patkány kamrai szívizomsejtjein megfigyelhető sparkok alakja szimmetrikus.

19. 2D eljárással először mértük meg patkány kamrai szívizomsejteken a megjelenő sparkok frekvenciáját. Megállapítottuk, hogy az nagyságrendileg jó egyezést mutat a line scan metodikával kapott eredményekkel, de a sejtek között megfigyelhető individuális szórást az irodalmi értékeknél magasabbnak találtuk.
20. Megállapítottuk, hogy patkány kamrai izomsejtekben a sparkok közötti kapcsolat erőssége és térkonstansa $A=29.75$ és $\rho=0,97 \mu\text{m}$. Megmutattuk, hogy SR Ca^{2+} -al történő túltöltését követően (Ca^{2+} overload) a kapcsolat erőssége csökken ($A=15,31$), míg a térkonstans értéke változatlan marad.

5. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Schwarzfeld TA, Jacobson SL. ISOLATION AND DEVELOPMENT IN CELL-CULTURE OF MYOCARDIAL-CELLS OF THE ADULT-RAT. Journal of molecular and cellular cardiology. 1981 1981; 13(6): 563-75.
- [2] Haddad J, Decker ML, Hsieh LC, Lesch M, Samarel AM, Decker RS. ATTACHMENT AND MAINTENANCE OF ADULT-RABBIT CARDIAC MYOCYTES IN PRIMARY-CELL CULTURE. American Journal of Physiology. 1988 Jul; 255(1): C19-C27.
- [3] Dubus I, Samuel JL, Marotte F, Delcayre C, Rappaport L. BETA-ADRENERGIC AGONISTS STIMULATE THE SYNTHESIS OF NONCONTRACTILE BUT NOT CONTRACTILE PROTEINS IN CULTURED MYOCYTES ISOLATED FROM ADULT-RAT HEART. Circulation research. 1990 Mar; 66(3): 867-74.
- [4] Spahr R, Jacobson SL, Siegmund B, Schwartz P, Piper HM. SUBSTRATE OXIDATION BY ADULT CARDIOMYOCYTES IN LONG-TERM PRIMARY CULTURE. Journal of molecular and cellular cardiology. 1989 Feb; 21(2): 175-85.
- [5] Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. Circulation research. 1994 Jun; 74(6): 1071-96.
- [6] Hua F, Gilmour RF. Contribution of I-Kr to rate-dependent action potential dynamics in canine endocardium. Circulation research. 2004 Apr 2; 94(6): 810-9.
- [7] Viswanathan PC, Shaw RM, Rudy Y. Effects of I-Kr and I-Ks heterogeneity on action potential duration and its rate dependence - A simulation study. Circulation. 1999 May 11; 99(18): 2466-74.
- [8] Hondeghem LM, Snyders DJ. CLASS-III ANTIARRHYTHMIC AGENTS HAVE A LOT OF POTENTIAL BUT A LONG WAY TO GO - REDUCED EFFECTIVENESS AND DANGERS OF REVERSE USE DEPENDENCE. Circulation. 1990 Feb; 81(2): 686-90.
- [9] Horvath B, Magyar J, Szentandrassy N, Birinyi P, Nanasi PP, Banyasz T. Contribution of I-Ks to ventricular repolarization in canine myocytes. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology. 2006 Sep; 452(6): 698-706.
- [10] Gintant GA. Characterization and functional consequences of delayed rectifier current transient in ventricular repolarization. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2000 Mar; 278(3): H806-H17.
- [11] Weber CR, Piacentino V, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM. Na⁺-Ca²⁺ exchange current and submembrane [Ca²⁺] during the cardiac action potential. Circulation research. 2002 Feb 8; 90(2): 182-9.
- [12] Grantham CJ, Cannell MB. Ca²⁺ influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes. Circulation research. 1996 Aug; 79(2): 194-200.
- [13] Parker I, Zang WJ, Wier WG. Ca²⁺ sparks involving multiple Ca²⁺ release sites along Z-lines in rat heart cells. Journal of Physiology-London. 1996 Nov 15; 497(1): 31-8.

- [14] Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and $[Ca^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996 Jan; 270(1): C148-C59.
- [15] Keizer J, Smith GD, Ponce-Dawson S, Pearson JE. Saltatory propagation of Ca^{2+} waves by Ca^{2+} sparks. *Biophysical journal*. 1998 Aug; 75(2): 595-600.
- [16] Izu LT, Wier WG, Balke CW. Evolution of cardiac calcium waves from stochastic calcium sparks. *Biophysical journal*. 2001 Jan; 80(1): 103-20.
- [17] Lukyanenko V, Györke S. Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves in saponin-permeabilized rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology-London*. 1999 Dec 15; 521(3): 575-85.
- [18] Huser J, Lipsius SL, Blatter LA. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *Journal of Physiology-London*. 1996 Aug 1; 494(3): 641-51.
- [19] Woo SH, Cleemann L, Morad M. Spatiotemporal characteristics of junctional and nonjunctional focal Ca^{2+} release in rat atrial myocytes. *Circulation research*. 2003 Jan 10; 92(1): E1-E11.
- [20] Satoh H, Blatter LA, Bers DM. Effects of $[Ca^{2+}]_i$, SR Ca^{2+} load, and rest on Ca^{2+} spark frequency in ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1997 Feb; 272(2): H657-H68.
- [21] Cheng H, Lederer MR, Xiao RP, Gomez AM, Zhou YY, Ziman B, et al. Excitation-contraction coupling in heart: New insights from Ca^{2+} sparks. *Cell calcium*. 1996 Aug; 20(2): 129-40.
- [22] Brum G, Gonzalez A, Rengifo J, Shirokova N, Rios E. Fast imaging in two dimensions resolves extensive sources of Ca^{2+} sparks in frog skeletal muscle. *Journal of Physiology-London*. 2000 Nov 1; 528(3): 419-33.
- [23] Pyle WG, Solaro RJ. At the crossroads of myocardial signaling - The role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circulation research*. 2004 Feb 20; 94(3): 296-305.
- [24] Izu LT, Means SA, Shadid JN, Chen-Izu Y, Balke CW. Interplay of ryanodine receptor distribution and calcium dynamics. *Biophysical journal*. 2006 Jul; 91(1): 95-112.
- [25] Izu LT, Mauban JRH, Balke CW, Wier WG. Large currents generate cardiac Ca^{2+} sparks. *Biophysical journal*. 2001 Jan; 80(1): 88-102.
- [26] Banyasz T, Chen-Izu Y, Balke CW, Izu LT. A new approach to the detection and statistical classification of Ca^{2+} sparks. *Biophysical journal*. 2007 Jun; 92(12): 4458-65.