dc_1149_15

MTA-DOKTORI ÉRTEKEZÉS

INTRACELLULÁRIS Ca^{2+} HOMEOSZTÁZIS-VÁLTOZÁSOK HATÁSAINAK ELEMZÉSE IZOLÁLT SZÍVPREPARÁTUMOKON

TÓTH ANDRÁS

2015

dc_1149_15

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK ... 2
RÖVIDÍTÉSEK ... 4
1. BEVEZETÉS ... 6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ... 8
2.1. A szívizomsejtek intracelluláris kalcium homeosztázisa ... 8
2.1.1. A Ca^{2+}_i ciklus transzportfolyamatai ... 8
2.1.2. A Ca^{2+} mozgások szabályozásának alapelvei – az egyensúly feltételei ... 10
2.1.3. Intracelluláris Ca^{2+} kompartmentek a szívben ... 13
2.1.4. A Ca^{2+} transzportfolyamatok $[Na^+]_i$-, és $[H^+]_i$-függése ... 16
2.2. Az intracelluláris Ca^{2+} változások és az akciós potenciál repolarizáció kapcsolata ... 17
2.2.1. A külső Ca^{2+} koncentráció hatása az akciós potenciál kinetikájára ... 17
2.2.2. Az $[Ca^{2+}]_i$ szerepe a Ca^{2+}-érzékeny K^+ áramok szabályozásában ... 17
2.2.3. A repolarizáló K^+ áramok Ca^{2+}_i-függő modulációja ... 19
2.2.4. A hiányzó/nem működő/talán mégis működő direkt kapcsolat – a szív alacsony konduktanciájú Ca^{2+}-aktivált kálium (SK) csatornái ... 22
2.3. A szív Na^+/Ca^{2+} kicserélője (NCX1) ... 23
2.3.1. Az NCX1 molekuláris biológiája ... 23
2.3.2. Az NCX fiziológiás működése és szabályozása ... 25
2.3.3. Az NCX farmakológiája ... 28
2.4. A szív $Na^{+/}H^+$ kicserélője (NHE) ... 31
2.4.1. Az NHE szerepe a pH_i és Na^+_i szabályozásában és a sejtműködésben ... 31
2.4.2. Az NHE fiziológiás szabályozása és gátlószerei ... 32
2.5. NCX gátlás következményei egészséges miokardiumban ... 33
2.5.1. Akut, részleges NCX gátlás hatása egészséges szívre ... 33
2.5.2. Az NCX expresszió módosításainak tanulságai ... 34
2.6. A Ca^{2+}_i háztartás zavarainak szerepe a ritmuszavarok kialakulásában ... 34
2.6.1. A szív Ca^{2+}_i-függő és Ca^{2+}_i-facilitált aritmogenezise ... 35
2.6.2. Aritmogenezis akut és krónikus iszkémia/reperfúziós szívbetegségekben ... 39
2.7. NCX és NHE gátlás hatásai beteg szívben ... 42
2.7.1. NCX gátlás antiaritmiás hatásai ... 43
2.7.2. NCX gátlás hatása iszkémia/reperfúzióban – aritmogenezis ... 43
2.7.3. NCX gátlás hatása iszkémia/reperfúzióban – kontraktilitás ... 44
2.7.4. NCX gátlás hatása a miokardiális stunning-ra és prekondicionálásra ... 46
2.7.5. NHE gátlás antiaritmiás hatásai iszkémia/reperfúzióban ... 46
3. CÉLKITŰZÉSEK ... 47
4. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK ... 48
4.1. Etikai engedélyek ... 48
4.2. Preparátumok ... 48
4.2.1. Izolált kamrai szívizomsejtek ... 48
4.2.2. Izolált multicelluláris preparátumok ... 49
4.2.3. Izolált perfundált (Langendorff) patkányszív ... 49
4.3. Optikai mérési protokollok izolált szívpreparátumokon ... 50
4.3.1. Ca^{2+} tranziens mérések ... 50
4.3.2. Koffein tranziens meghatározása ... 51
4.3.3. NADH mérések ... 52
4.3.4. Szívizomsejtek túlélési arányának meghatározása ... 52

dc_1149_15

4.4. Akciós potenciál és EKG mérések ... 52
4.5. Árammérési protokollok izolált szívpreparátumokon ... 53
4.5.1. Mérések „whole cell" patch clamp technikával ... 53
4.5.2. A Ca^{2+} áram ($I_{Ca,L}$) meghatározása ... 53
4.5.3. Az apamin-szenzitív K^+ áram (I_{SK-AS}) meghatározása ... 53
4.5.4. A befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) meghatározása ... 54
4.5.5. A késői Na^+ áram ($I_{Na,L}$) meghatározása ... 54
4.5.6. Az NCX áram meghatározásával kapcsolatos kísérleti protokollok ... 54
4.6. Kontrakció (sejtrövidülés) mérése izolált sejteken ... 55
4.7. További mérési technikák ... 55
4.7.1. Immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia ... 55
4.7.2. Proteinminták és Western blot analízis ... 56
4.7.3. Ca^{2+} fluxusok meghatározás SR membrán vezikulumokban ... 56
4.8. Modellek és kísérleti protokollok ... 57
4.8.1. LQT3 aritmia modell izolált sejteken és multicelluláris preparátumokon ... 57
4.8.2. Szimulált iszkémia/reperfúzió modell izolált kutya szívizomsejteken ... 57
4.8.3. Regionális iszkémia/reperfúzió modell izolált, perfundált patkányszívben ... 58
4.9. Anyagok ... 58
4.10. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis ... 59
5. EREDMÉNYEK ... 61
5.1. Ca^{2+}_i változások hatása a repolarizáló K^+ áramokra ... 61
5.1.1. Van-e fiziológiásan aktív SK2 csatorna egészséges szívizomban? ... 61
5.1.2. A befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) Ca^{2+}_i függése ... 65
5.2. Részleges NCX gátlás következményei egészséges szívizomban ... 72
5.2.1. Az NCX gátlás következményei izolált patkány szívizomsejteken ... 72
5.2.2. Az NCX gátlás következményei izolált kutya szívizomsejteken ... 74
5.3. Az NCX gátlás antiaritmiás hatásának analízise kísérletes szívbetegségekben ... 77
5.3.1. Fokozott késői Na^+ áram (I_{NaL}) esetén (LQT3 modell) ... 78
5.3.2. Szimulált iszkémia modellben ... 88
5.3.3. Patkány tranziens, regionális iszkémia/reperfúziós modellben ... 96
6. MEGBESZÉLÉS ... 102
6.1. A K^+ áramok Ca^{2+}_i függése és a repolarizáció adaptációja ... 102
6.1.1. A fiziológiás SK-AS áram hiánya – lehetséges okok és következmények ... 102
6.1.2. Az akciós potenciál és az I_{K1} Ca^{2+}-függésének elemzése ... 108
6.2. Miért nincs az NCX gátlásnak jelentős hatása a Ca^{2+}_i háztartásra és a kontraktilitásra egészséges kutya és humán szívizomban? ... 112
6.2.1. A „klasszikus" koncepció: NCX gátlás = markáns pozitív inotróp hatás ... 112
6.2.2. A valóság: NCX gátlás ≠ markáns pozitív inotróp hat ... 113
6.2.3. Miért nincs pozitív inotróp hatás kutya (és humán) kamrai szívizomsejteken ... 114
6.2.4. Miért van mégis pozitív inotróp hatás patkány szíven? ... 117
6.3. NCX gátlás hatása a Ca^{2+}_i túlterhelés okozta aritmogén változásokra ... 119
6.3.1. LQT szindróma modell – $I_{Na,L}$ emelkedés által indukált Ca^{2+}_i-túlterhelés ... 120
6.3.2. Szimulált iszkémia-reperfúzió ... 123
6.4. Az NCX, NHE és NCX+NHE gátlás antiaritmiás hatásainak összehasonlítása patkányszíven regionális I/R modellben ... 126
6.5. Összegzés - következtetések ... 130
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ... 132
8. HIVATKOZÁSOK ... 134
9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ... 157
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 160

dc_1149_15

RÖVIDÍTÉSEK

AF: pitvarfibrilláció
ANOVA: varianciaanalízis
AP: akciós potenciál
APD: akciós potenciál időtartama
ATP: adenozin-trifoszfát
AT-II: angiotenzin II
AV: atrioventrikuláris
BVR: beat-to-beat variabilitás
BAPTA: 1,2-bis(o-aminofenoxi)etán-tetraecetsav
Ca^{2+}_i ($[Ca^{2+}]_i$): intracelluláris Ca^{2+} (koncentráció)
$[Ca^{2+}]_{iD}/[Ca^{2+}]_{iS}$: diasztolés/szisztolés intracelluláris Ca^{2+} koncentráció
$[Ca^{2+}]_{mito}/[Ca^{2+}]_{sm}/[Ca^{2+}]_{SR}$: mitokondriális/szubmembrán/szarkoplazmás retikuláris Ca^{2+} koncentráció
$[Ca^{2+}]_o$: külső Ca^{2+} koncentráció
CaM: calmodulin
CaMKII: calmodulin kináz II
cAMP: ciklikus adenozin-monofoszf
CaMBD: calmodulin kötő domén
CaT: intracelluláris Ca^{2+} tranziens
CBD: Ca^{2+} kötő domén
CF: koronária áramlás
CICR: Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulás
CRC: kontrakciós-relaxációs ciklus
DAD: késői utópotenciál
DHPR: dihidropiridin receptor
DP: bal kamrai nyomás(developed pressure)
EAD: korai utópotenciál
ECC: excitáció-kontrakció csatolás
ECG: elektrokardiogram
EGTA: etilénglikol-tetraecetsav
E_m: membránpotenciál
E_{NCX}: NCX ekvilibrium potenciál
ER: endoplazmás retikulum
ERK: extracelluláris szignál aktivált kináz
ES: extraszisztolé
ET-1: endotelin 1
H^+_i ($[H^+]_i$): intracelluláris H^+ (koncentráció)
HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav
HF: szívelégtelenség
HR: szívfrekvencia
HSR: nehéz SR (vezikulumok)
HT: hipertrófia
IC_{50}: 50% gátláshoz tartozó koncentráció
$I_{Ca,L}$: L-típusú Ca^{2+} áram
$I_{Ca,T}$: T-típusú Ca^{2+} áram
I_f : a pacemaker sejtek „funny” árama
I_{K1} : befelé egyenirányító K^+ áram
I_{Kach} : Ach-függő K^+ áram
$I_{K\text{-}AS}$: apamin-érzékeny K^+ áram
I_{KATP} : ATP-függő K^+ áram
$I_{K(Ca)}$: Ca^{2+}-függő K^+ áram
I_{Kr} : a késői K^+ áram gyors komponense
I_{Ks} : a késői K^+ áram lassú komponense
I_{Kur} : ultragyors K^+ áram
I_{ti} : tranziens befelé irányuló K^+ áram
$I_{Na,L}$: késői Na^+ áram
I_{NCX}: NCX áram
I_{to}: tranziens kifelé irányuló K^+ áram
I/R: iszkémia/reperfúzió
${}_{fwd}I_{NCX}/{}_{rev}I_{NCX}$: forward/reverz NCX áram
K_{Ca} : Ca^{2+}-függő K^+ csatorna
KHB: Krebs-Henseleit bikarbonát
Kir : befelé egyenirányító K^+ csatorna
KO: knockout
LAD: baloldali arteria descendens
LQT: hosszú QT szindróma
LTC(C): L-típusú kalcium (csatorna)
LSR: könnyű SR (vezikulumok)
LVEDP: balkamrai végdiasztolés nyomás
LVSP: balkamrai szísztolés nyomás
MEM: minimum esszenciális médium
MI: miokardiális infarktus
NADH: nikotinsav-adenin dinukleotid
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
Na^+_i ($[Na^+]_i$): intracelluláris Na^+ (koncentráció)
Na_V : feszültségfüggő Na^+ csatorna
NCX(1): Na^+- Ca^{2+} kicserélő (1 izoform)
${}_{fwd}$NCX: kifelé irányuló NCX (Ca^{2+} transzport)
${}_{rev}$NCX befelé irányuló NCX (Ca^{2+} transzport)
NE norepinefrin (noradrenalin)
NHE(1): Na^+/H+ kicserélő (1 izoform)
NKA: Na^+/K^+ ATP-áz

dc_1149_15

PKA: protein kináz A

PKC: proteinkináz C

PLB: foszfolambán

PLM : foszfolemmán

PMCA : szarkolemma Ca^{2+} ATP-áz

PP: protein foszfatáz

QT_C : korrigált QT intervallum

mRNA: messenger ribonukleinsav

RyR2: rianodin receptor

SA: pitvarcsomó

SERCA: szarkoplazmás retikulum Ca^{2+} ATP-áz

SK: alacsony konduktanciájú K^+ csatorna

S.E.M.: az átlag sztenderd hibája

SL: szarkolemma, sejtmembrán

SR: szarkoplazmás retikulum

SR: szinusz-ritmus (aritmia kísérletek)

TM (TMS): transzmembrán (szegmens)

TRPC: tranziens receptor potenciál csatornaTrC : troponin C

XIP: NCX gátló peptid

VF: kamrafibrilláció

VT: kamrai tachycardia

dc_1149_15

1. BEVEZETÉS

ELŐSZÓ HELYETT

A szívizom intracelluláris Ca^{2+} homeosztázisával foglalkozni egyrészt rendkívül könnyű, másrészt rendkívül nehéz. Rendkívül könnyű, mert könyvtárnyi adat: kísérleti eredmény, matematikai modellekből, elméleti hipotézisekből származó információ áll rendelkezésre. Pontosan ugyanezen okból rendkívül nehéz is; bármit is gondol ki egy kutató, amit újnak, ismeretlennek hisz, valamilyen szintű/érvényességű válasz, valahol, biztosan megtalálható ebben a könyvtárnyi irodalomban. Ezenkívül ez a témakör azért is nehéz, mert az *elérhető információ érvényessége, validitása* – számos okból – sokszor bizonytalanabb, mint ahogy a természettudományokban általában megszoktuk. Köszönhető ez az *intracelluláris szabad kalcium ion* (Ca^{2+}_i) elképesztően összetett szerepének – az emlőssejtekben általában is, még inkább a szívizomsejtekben, melyek *fiziológiás működésében* a Ca^{2+}_i sokszorosan kitüntetett szerepet játszik – egyrészt a Ca^{2+}-függő sejtfolyamatok nagy száma, másrészt azok kiemelkedő – sokszor létfontosságú – jelentősége miatt. A teljesség igénye nélkül néhány alapvető funkciója: kulcsszerepe van az excitáció-kontrakció csatolásban; aktiválja a kontrakciós folyamatot és meghatározza annak mértékét; második messenger-ként működik szignáltranszdukciós folyamatokban; szabályozza az egyes neurotranszmitterek felszabadulását, stb. Számtalan – pl. az akciós potenciál (AP), a mitokondriális terminális oxidáció, vagy akár az apoptózis indukciója során aktiválódó – iontranszporter és enzim működése markánsan Ca^{2+}-függő. A Ca^{2+}_i változásai szinte *minden fontos sejtfolyamatban megjelennek*, általában *alapvető információt* hordoznak és *jelentős szabályozó* szerepet töltenek be. Egyetlen sejtben a párhuzamosan zajló, *egyidejűleg szorosan integrált és több szinten differenciált* élettani folyamatok csak részfolyamatokra bontva, azokat térben és időben kellően elkülönítve mehetnek végbe; ez a tény – finoman szólva – nem könnyíti meg a kutató dolgát, aki ezeket a folyamatokat próbálja megismerni, megérteni, elemezni, modellezni, és végső soron kedvezően befolyásolni. Akkor is, amikor minden jól működik, még inkább, ha valami elromlik – és rövid idő alatt súlyos, életveszélyes állapot alakulhat ki. *Bár paradoxonnak tűnik, fentiek figyelembevételével talán mégsem az: könyvtárnyi adat ide vagy oda, alapvető – sokszor eleminek tűnő – ismeretek hiányoznak ahhoz, hogy ezt a komplex, több szinten, szorosan kapcsolódó és kölcsönható – dinamikus – rendszert csak részben is felderítettnek tekinthessük és működési mechanizmusaiban kellő hatásfokkal gondolkodni tudjunk.*

Ars poetica

Az elmúlt > 10 évben végzett kutatói tevékenységem során a szív Ca^{2+}_i háztartásának funkcionális szempontból kiemelkedő jelentőségű komponenseit, a kontrakciós-relaxációs ciklust (CRC), a párhuzamosan zajló elektrofiziológiai változásokat, és ezek többszintű kölcsönhatásait vizsgáltam. Hadd legyek annyira személyes, hogy bevalljam – élveztem ezt a feladatot. Inspirált a tudat, hogy *valóban* fontos kérdéseket vizsgálhatok, olyan kérdéseket, melyekre bármennyire jelentéktelennek tűnő, érvényességében limitált válasz születik, annak helye van, jól felhasználható – és (bár egy elméleti kutatóintézetben talán mégsem ez az elsődleges) nem kizárólag *elméleti szempontból* lehet haszna, hanem – ha nem is holnap kerül humán alkalmazásra – *klinikai vonatkozásaiban* is.

MIÉRT?

„Európában több mint 4 millióan, az Európai Unióban (EU) több, mint 1.9 millióan halnak meg évente kardiovaszkuláris betegségek (CVD) következtében. Ez Európában az összes halálesetek

dc_1149_15

47%-a, az EU-ban 40%-a. A CVD a nők elsődleges halálozási oka minden európai országban és a férfiak elsődleges halálozási oka 6 kivételével minden európai országban. A koronária betegség (CHD) okozta halálozási arányok általában Közép- és Kelet-Európában magasabbak, mint Észak-, Dél- és Nyugat-Európában. Az agyi érkatasztrófák (stroke) halálozási aránya Közép- és Kelet-Európában sokszorosan magasabb, mint Észak-, Dél- és Nyugat-Európában. Az EU-ban a kardiovaszkuláris betegségek összes becsült költsége évente csaknem 196 milliárd €; ebből 54% az egészségügyi költség, 24% termeléskiesés, 22% a betegek informális gondozási költsége." (saját fordítás: ***European Cardiovascular Disease Stats 2012****)*

A statisztikai adatok szerint Európában évtizedek óta a halálozások közel 50%-a szív-, és érrendszeri betegségek következménye. Ez a szám Magyarországon is döbbenetesen nagy. Hogy mennyire, azt jól mutatják a tumor-okozta halálozásokhoz viszonyított arányok: a koronária betegség – ide tartozik az akut miokardiális infarktus (MI), a krónikus iszkémiás szívbetegség (CIHD) és a hirtelen szívhalál (SCD) is, de nincs benne a népesség folyamatosan emelkedő élettartama következtében mind gyakoribb szívelégtelenség (HF) – a halálozások több, mint 20%-áért, az agyvérzés (stroke) több, mint 10%-áért felel; ezzel szemben a rettegett gyomorrák mindössze 2-3%-áért, a vastag- és végbélrák 2-3%-áért, a tüdőrák 4-5%-áért tehető felelőssé.

1. táblázat Halálozások haláloki csoportok szerint (Magyarország, 2013) (Forrás: KSH)

Halálok	***Férfi***	***Nő***	***Összesen***	***%***
Fertőző és élősdi-okozta betegségek	396	508	904	0.7
Daganatok	18 060	15 214	33 274	26.2
A keringési rendszer betegségei	**27 600**	**35 379**	**62 979**	**49.7**
Az emésztőrendszer betegségei	3 741	2 649	6 390	5.0
Külső okok (pl. baleset)	3 981	2 143	6 124	4.8
Szándékos önártalom	1 588	505	2 093	1.7
Egyéb (tüdő, máj, stb.) betegségek	6 528	8 486	15 014	11.8
Összesen	**61 894**	**64 884**	**126 778**	**100.0**

A szív eredetű halálozások tekintélyes része végzetes aritmiák kialakulásához köthető – a szívelégtelenségben és iszkémiás szívbetegségben szenvedő betegek fele kamrai aritmiák (szívmegállás, kamrafibrilláció) következtében hal meg. Az agyi katasztrófák egyik leggyakoribb oka a pitvarfibrilláció. A halálos kimenetelű szívbetegségek legtöbbjében a szívizomsejtek Ca^{2+}_i háztartása súlyosan károsul; sok esetben ez a károsodás az elsődleges, kritikus tényező a betegség kialakulásában és/vagy progressziójában.

Az elmúlt évtizedekben az orvostudomány sok területén igen jelentős fejlődés történt, de a fejlődés sajnos jóval kevésbé gyors a szívbetegségek vonatkozásában. A *nagyon fontos, de részleges sikerek ellenére* az iszkémiás elváltozások és a szívelégtelenség progressziója ma még alig-alig befolyásolható, megelőzésükre pedig nem rendelkezünk kellően hatékony stratégiákkal. A jelenleg elérhető farmakológiai eszközök, gyógyszerek hatékonysága nem kielégítő, a rendelkezésre álló modern invazív technikák és készülékek rendkívül drágák és hosszabb távon nem jelentenek optimális, sem végleges terápiás megoldást.

Az áttöréshez, ahhoz, hogy a szívbetegségek terápiáját kielégítőnek mondhassuk, szignifikáns további fejlődés szükséges, ami magában foglalja *újabb terápiás célpontok azonosítását*, és ezekre alapozva a mainál hatékonyabb megelőzési/gyógyítási protokollok kifejlesztését.

E kiemelkedő jelentőségű cél elérésének egyik legkritikusabb feltétele a szívbetegségek patomechanizmusainak a jelenleginél átfogóbb és sokkal mélyebb megismerése. Ennek az erőfeszítésnek része az a sokéves kísérletes munka, melyen jelen értekezés alapul.

dc_1149_15

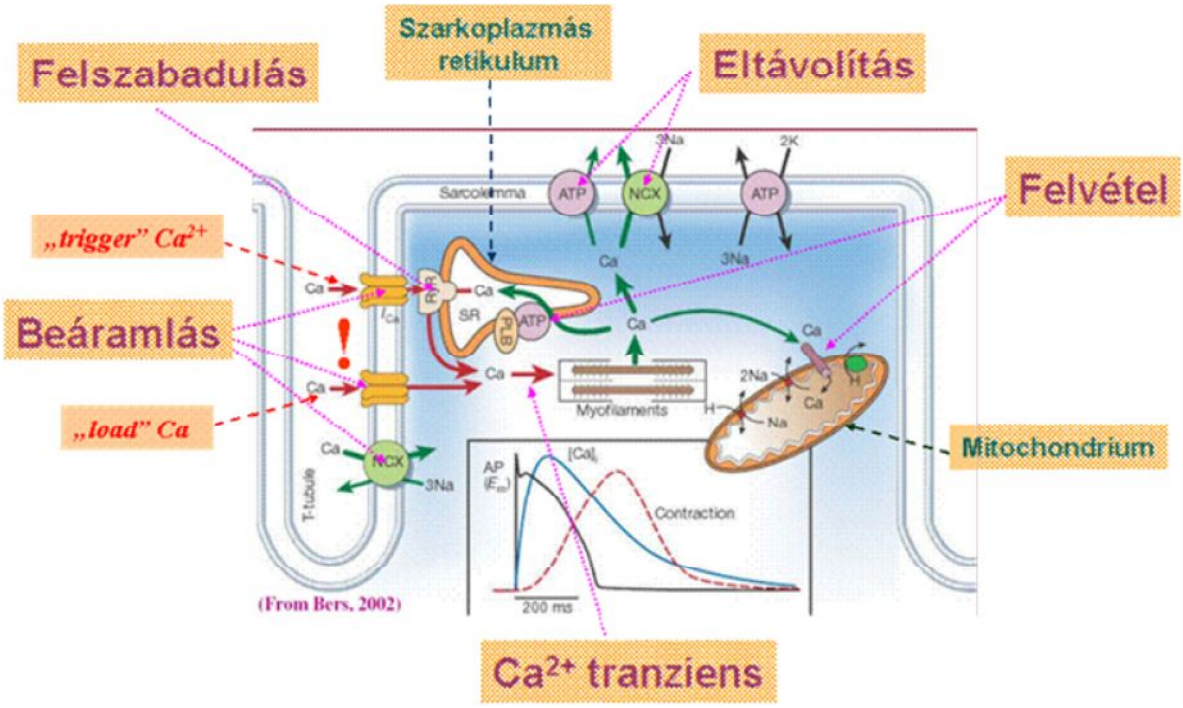
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szívizomsejtek intracelluláris kalcium homeosztázisa

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények szorosan kapcsolódnak a szívizomsejtek Ca^{2+}_i homeosztázisának fiziológiás, és/vagy kóros működéséhez, ezért első lépésként összefoglalom a fiziológiás szívciklus Ca^{2+}_i transzportfolyamataival és szabályozási mechanizmusaival, a Ca^{2+}_i kompartmentalizációjával, valamint az intracelluláris Na^+, illetve H^+ ionok (Na^+_i, H^+_i) ezeket számottevően befolyásoló hatásaival kapcsolatos alapvető ismereteinket. Az értekezés alapjául szolgáló, az SzTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében végzett kísérletes munkák – kizárólag első és utolsó szerzős dolgozatokban publikált – eredményeinek ***aktuális*** *értelmezése szempontjából feltétlenül releváns, de a dolgozatok megjelenését követően publikált irodalmi adatokat – az értekezés szerkezetének koherenciája megtartása érdekében – nem az* ***IRODALMI ÁTTEKINTÉS****, hanem a* ***MEGBESZÉLÉS*** *megfelelő alfejezetében foglaltam össze.*

2.1.1. A Ca^{2+}_i ciklus transzportfolyamatai

A szívizomsejtek elektromos aktivációjával, excitáció-kontrakció csatolásával, illetve a szív kontrakciós-relaxációs ciklusával (ECC) párhuzamos legfontosabb Ca^{2+} mozgásokat (Ca^{2+}_i ciklus) az 1. ábra foglalja össze (a témakör részletes áttekintéséért lásd **[1-4].**



1. ábra Kamrai szívizomsejtek Ca^{2+}_i ciklusának fontosabb transzportfolyamatai.

Kontrakció: A szívizomsejtek fiziológiás (gyors és erőteljes) kontrakciójának alapvető feltétele a citoszol szabad kalcium (Ca^{2+}_i) szintjének gyors és nagymértékű emelkedése.
Az AP depolarizációs és plató fázisai alatt az extracelluláris térből (főleg a T-tubulusokból) Ca^{2+} lép be a sejtbe, túlnyomórészt a szarkolemma (SL) L-típusú feszültségfüggő csatornáin (LTCC) keresztül. Ehhez a mérsékelt mennyiségű Ca^{2+}-hoz hozzáadódik az AP korai fázisában az SL Na^+/Ca^{2+} kicserélőjének (NCX) reverz irányú ($_{rev}$NCX) transzportja következtében a sejtbe belépő Ca^{2+}. Fiziológiás körülmények között a $_{rev}$NCX transzport hozzájárulása a belépő Ca^{2+} mennyiséghez jelentéktelen (< 10%), de amennyiben az

dc_1149_15

LTCC-k működése gátolt, a $_{rev}$NCX-en keresztül belépő Ca^{2+} mennyisége megnőhet és önmagában is képes a kontrakció aktiválására [5]. Emlős szívizomsejtekben a belépő Ca^{2+} jelentős része speciális sejtkompartmentbe, az SL és a szarkoplazmás retikulum (SR) közötti keskeny (10-15 nm szélességű) „restricted space"-be kerül, ahol markáns szubmembrán $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{sm}$) emelkedést hoz létre. Ez a lokális $[Ca^{2+}]_{sm}$ növekedés kulcsszerepet játszik a kontrakció elindításában (trigger), mivel hatására az SR-ből, annak rianodin-érzékeny Ca^{2+} csatornáin (RyR) keresztül, azonnali, sokkal nagyobb mértékű Ca^{2+} felszabadulás jön létre (calcium induced calcium release, CICR). Az SL és SR integrált Ca^{2+} tranziense (CaT) gyorsan aktiválja a miofilamentumokat, létrehozva a kontrakciót. A kamrai szívizomsejtekben különösen fejlett T-tubulus rendszer lehetővé teszi a CICR *teljes időbeli szinkronizálását,* így a miofilamentum-aktiváció közel egy időben történik a sejt teljes hosszában/keresztmetszetében. A pitvari és Purkinje sejtek ultrastruktúrája két igen fontos vonatkozásban eltér a kamrai sejtekétől: (1) a T-tubulus rendszer fejletlenebb; (2) az SR rendszer egyes elemei *nem* a SL LTC csatornáinak közvetlen közelében, hanem a sejt belsejében találhatók. Ennek következtében az ECC kinetikájában is lényeges eltérések figyelhetők meg; ezekben a sejtekben a miofilamentumok *aszinkron módon aktiválódnak*, az aktiváció a szubszarkolemmális térben indul és fokozatosan terjed a sejtek belsejébe.

A transz-szarkolemmális Ca^{2+} részesedése a citoplazma $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésében (azaz a CaT-ben) jelentős species függést mutat: patkányban és egérben alacsony (< 10%), tengerimalacban, illetve nagy emlősökben (nyúl, kutya, ember) ennél magasabb (> 30%). Egyes kórképekben (pl. terminális szívelégtelenség) a külső Ca^{2+} aránya még nagyobb lehet (50-60%). A szisztolé alatti $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés nagysága (a CaT amplitúdója) a beáramlott és felszabadult Ca^{2+} mennyiségén kívül a sejt Ca^{2+} puffer kapacitásától is függ. A miofilamentum-aktiválódás mértékét elsődlegesen a troponin C-hez (TnC) kötődő Ca^{2+} mennyisége határozza meg; fiziológiás tartományban csaknem teljesen lineáris a kapcsolat a $log[Ca^{2+}]_i$ és a kontrakciós erő (~ TnC aktiválódás mértéke) között. Újabb kísérleti adatok szerint a külső Ca^{2+} ionok néhány alternatív transzportmechanizmussal – feszültség aktivált [6], B-típusú [7], „store operated" kalcium (SOC) és tranziens receptor potenciállal rendelkező (TRP) [8, 9], illetve hiperpolarizáció-aktivált [10] csatornákon keresztül is beléphetnek a szívizomsejtekbe, de mai ismereteink alapján e transzport utak szerepe az SR Ca^{2+} tartalmának ($[Ca^{2+}]_{SR}$) , illetve a CaT nagyságának beállításában limitált.

Relaxáció: A szív fiziológiás (viszonylag gyors és teljes) relaxációjának alapvető feltétele az aktivátor Ca^{2+} gyors disszociációja a TnC-ről; ehhez viszont szükséges a szisztolé során az extracelluláris (EC) térből beáramlott, illetve az SR-ből felszabadult Ca^{2+} hasonlóan gyors és teljes eltávolítása a citoszolból. Az eltávolítás sebességének markáns csökkenése részleges relaxációhoz, ez pedig elégtelen kamratelődéshez vezethet. Funkcionális egyensúlyi állapotban a sejtből eltávolított Ca^{2+} mennyisége *meg kell, hogy egyezzen* az aktiváció során a sejtbe beáramló Ca^{2+} mennyiségével, ellenkező esetben a sejt kalciummal túltelítődhet (Ca^{2+} overload), vagy elveszítheti Ca^{2+} tartalmának nagy részét. Az elsődleges Ca^{2+} eltávolító mechanizmus az alacsony affinitású, de nagy kapacitású NCX „forward" irányú (Ca^{2+}-eltávolító) transzportaktivitása. A kicserélő – speciestől függően – a bejutó + felszabaduló Ca^{2+} 3 - 47%-át távolítja el. Az egyensúlyi állapot kialakulásának hasonlóan kritikus feltétele az SR-ből előzőleg felszabadult Ca^{2+} gyors visszajuttatása az SR-be. Ennek kizárólagos mechanizmusa az SR nagy kapacitású Ca^{2+}-ATPáz (SERCA2) pumpája általi aktív transzport. A SERCA2 kellő szintű aktivitása létfontosságú az SR Ca^{2+} tartalmának megőrzéséhez, ami alapfeltétele a kellő nagyságú CaT kialakulásának. A Ca^{2+} eltávolítás további mechanizmusa az SL szívizomsejtekben magas affinitású, de alacsony kapacitású Ca^{2+} pumpája (PMCA). A mérések szerint a fiziológiás NCX/PMCA transzportfluxus-arány 37 °C-on nagy emlősökben (nyúl, kutya, ember) > 10, így

dc_1149_15

összességében a PMCA részesedése a teljes Ca^{2+}_i eltávolításban < 5% [11]. Ennek következtében, jelen ismereteink szerint, a PMCA az NCX akut kiesését nem képes teljes mértékben kompenzálni. Fontos megjegyezni, hogy csökkenő $[Ca^{2+}]_i$ esetén az NCX transzportsebessége meredeken csökken [12]. Ilyenkor a PMCA valószínűleg hozzájárul a végdiasztolés $[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_{iD}$) finom beállításához. Ezenkívül a PMCA rendkívül fontos szerepet játszik több intracelluláris Ca^{2+} jelút szabályozásában. Ezt a hipotézist látszik igazolni a különböző szövetekben található hasítási (splice) variánsok nagy száma (> 30). A negyedik, a *fiziológiás* Ca^{2+} ciklus szempontjából ugyancsak kevésbé jelentős Ca^{2+} eltávolító mechanizmus a Ca^{2+} felvétele a mitokondriumokba, elsősorban azok Ca^{2+} uniporterén keresztül [13]. Jól működő szívizomsejtekben a mitokondriális $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{mito}$) változás valószínűleg csekély mértékű, és követi a $[Ca^{2+}]_i$ változásait. Fokozott Ca^{2+} felvételre csak szignifikánsan megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ (> 500 nM) esetén kerül sor [13], ezáltal a mitokondriumok intenzív Ca^{2+} felvétele biztonsági mechanizmust képez, mely hatékony védelmet nyújt a *tranziens* Ca^{2+}_i túltelődés sejtkárosító hatásaival szemben. Végezetül, egy részleteiben még ismeretlen, vélhetően ugyancsak védő hatású tranziens Ca^{2+} eltávolító mechanizmus *lehet* a Ca^{2+} fokozott felvétele a sejtmag terébe [14].
A Ca^{2+} eltávolító mechanizmusok között folyamatos *versengés* van a Ca^{2+}-ért; pillanatnyi transzportaktivitásuk és relatív súlyuk az eltávolítási folyamatban dinamikusan változik a szívciklus alatt. A szív egyenletes mechanikai aktivitásának fenntartásához létfontosságú a transz-szarkolemmális és intracelluláris Ca^{2+} transzportfluxusok precíz egyensúlya.
Az egyensúly jelentős mértékű, vagy krónikus sérülése – amennyiben mértéke meghaladja a funkcionális változás (pl. szimpatikus aktivitásfokozódás) fiziológiás mértékét – fokozatos Ca^{2+}_i túltelődéshez (ennek következtében meredeken emelkedő aritmia készséghez, illetve sejtkárosodáshoz és apoptózishoz), vagy fokozatos intracelluláris Ca^{2+} vesztéshez (ezáltal a szív pumpafunkciójának súlyos károsodásához – szívelégtelenség) vezethet.

A szívizomsejtek *afiziológiás* (kísérletes) nyugalmi (nem kontraháló) állapotában az *SR*-ből kismértékű, de folyamatos Ca^{2+} szivárgás figyelhető meg, annak Ca^{2+} csatornáin (RyR) keresztül. Ezzel párhuzamosan, kismértékű, de folyamatos Ca^{2+} szivárgás jön létre az EC térből a citoplazmába az *SL* Ca^{2+} csatornáin keresztül. Mindkét folyamat fokozatos $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéshez vezetne. A „felesleges” Ca^{2+}_i eltávolításáért az eltávolító mechanizmusok, elsősorban az NCX és a SERCA2 versengnek; a szivárgási/eltávolítási fluxusok kvantitatív viszonyától függően az SR Ca^{2+}-mal telődik (hosszú távon túltelődik; patkány), vagy fokozatosan Ca^{2+}-ot veszít (kutya, nyúl, humán). Fontos megjegyezni, hogy bár a szivárgó Ca^{2+} áramok, amennyiben túl nagy, patológiás mértéket érnek el, a Ca^{2+}_i háztartás súlyos zavarához vezethetnek, a fenti „nyugalmi” állapot *kísérletes beállítás* következménye, a szívizomsejteknek *nem fiziológiás* állapota.

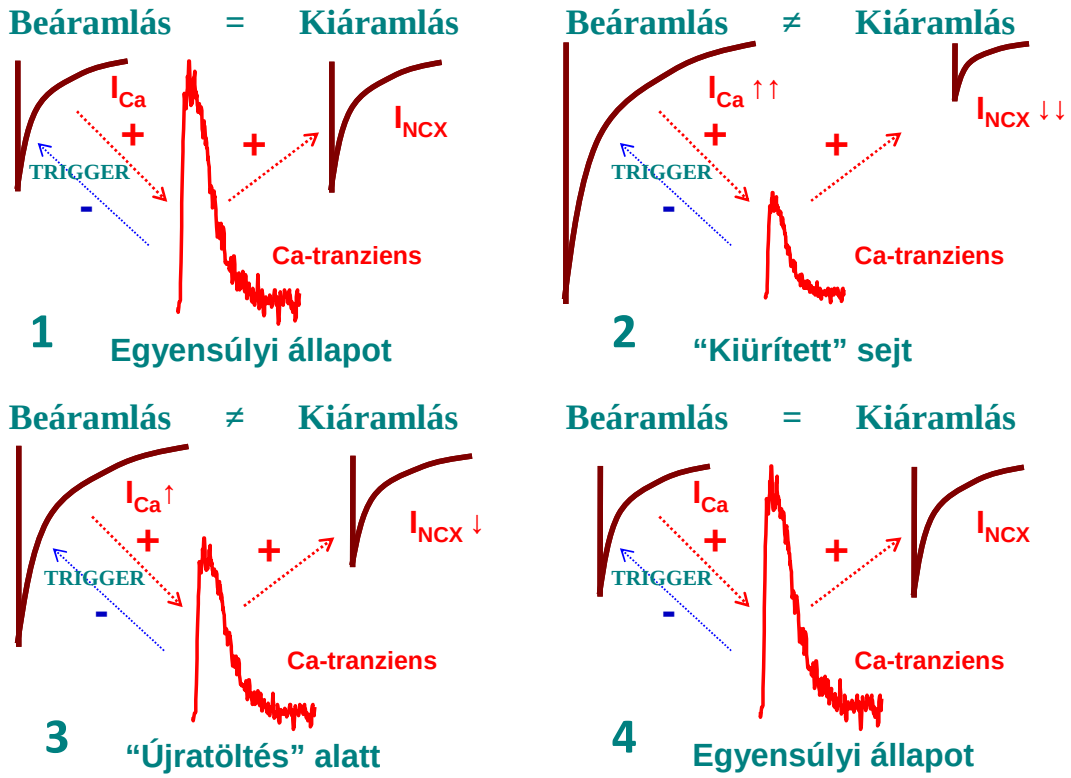
2.1.2. A Ca^{2+} mozgások szabályozásának alapelvei – az egyensúly feltételei

A szív kontrakciós-relaxációs ciklusa alatt végbemenő intra-, és transzcelluláris Ca^{2+} mozgások precízen szabályozottak (részletekért: [4, 15-18]). A homeosztatikus szabályozás két legfontosabb komponense a *trigger* Ca^{2+} beáramlás "lokális feed-back” kontrollja és az SR Ca^{2+}-tartalmának feed-back jellegű szabályozása (2. ábra). Mindkét mechanizmus az SL és az SR Ca^{2+} fluxusainak dinamikus kölcsönhatásán alapul.

A Ca^{2+} beáramlás lokális (szubmembrán) autoregulációja. A szív steady működése esetén a sejtek egyetlen szívciklus alatti Ca^{2+} felvétele megegyezik Ca^{2+} leadásukkal, azaz átlagos Ca^{2+} tartalmuk nem változik. A szisztolé alatt beáramló (trigger) Ca^{2+} mennyisége (I_{Ca}) főleg az aktivált LTC csatornák számától, valamint nyitott állapotuk valószínűségétől

dc_1149_15

(időtartamától) függ. Az aktivált LTC csatornák *számát* alapvetően a transzmembrán potenciálváltozások határozzák meg és kevésbé függ az aktuális ionkoncentrációktól. Ezzel szemben a csatornák *nyitvatartási valószínűsége* nagyon érzékeny a szubmembrán $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{sm}$) változásaira. A csatornák nagyfokú $[Ca^{2+}]_{sm}$ érzékenysége alapján az egyensúlyi Ca^{2+} beáramlást hatékony, a mindenkori CaT nagyságától függő lokális (szubmembrán) *negatív feed-back* mechanizmus szabályozza/korlátozza (2. ábra: I_{Ca} ↔ CaT interakció). Ha valamilyen okból a $Ca^{2+}{}_i$ szint csökken, az SR Ca^{2+} tartalma a csökkent visszavétel (SERCA2 transzportaktivitás) miatt csökken. Ennek következtében a CaT amplitúdója kisebb lesz – és ami még fontosabb – a $[Ca^{2+}]_{sm}$ is markánsan csökken. A kisebb CaT miatt csökken az NCX által eltávolított Ca^{2+} mennyisége, ugyanakkor a csökkentő $[Ca^{2+}]_{sm}$ jóval kevésbé gátolja az LTCC-ket, ami nyitvatartási valószínűségük markáns növekedésében nyilvánul meg. Mivel mindkét folyamat Ca^{2+} akkumulációhoz vezet, a sejtek $Ca^{2+}{}_i$ tartalma



fokozatosan nő, amíg ismét el nem éri az egyensúlyi állapotot, ahol stabilizálódik.

2. ábra A Ca^{2+} beáramlás (LTCC) és az SR Ca^{2+} tartalmának szorosan csatolt lokális autoregulációja.
A kezdeti transzportegyensúly (**1**) megbomlása esetén (pl. koffein alkalmazását követő „kiürülés" után) a $Ca^{2+}{}_i$ tranziens és az $I_{Ca,L}$ közti negatív feedback következtében az influx és efflux aránya eltolódik (**2**).
A módosult transzportfluxusok fokozatosan helyreállítják (**3**) az eredeti steady-state állapotot (**4**).

Az SR Ca^{2+} tartalmának autoregulációja. Az SR Ca^{2+} tartalma fontos szerepet játszik az ECC szabályozásában. Nagysága elsősorban a $[Ca^{2+}]_i$ függvénye, optimális szintjét szintén egy lokális autoregulációs mechanizmus stabilizálja. Az SR Ca^{2+} tartalmát meghatározó legfőbb tényezők: a Ca^{2+} transzporterek (RyR, SERCA2) transzportaktivitása, az intraluminális Ca^{2+}-kötő fehérjék (pl. kalszekvesztrin) mennyisége, végül az $[Ca^{2+}]_i$. A $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedése a CaT amplitúdó és időtartam növekedéséhez vezet **[15]**; ennek főbb háttérmechanizmusai: a RyR-ok luminális felszínéhez kötődő Ca^{2+} megnöveli azok nyitvatartási valószínűségét, másrészt az SR-ből történő Ca^{2+} felszabadulás hajtóereje is nő **[16]**. Fokozott Ca^{2+} beáramlás *önmagában* csak tranziens emelkedést hoz létre az $[Ca^{2+}]_{SR}$-ben. Ezért a transz-szarkolemmális Ca^{2+} fluxusok az SR Ca^{2+} tartalmának *tartós* növelését csak indirekt módon, a $[Ca^{2+}]_i$ *tartós* növelésén keresztül hozhatják létre (lásd 1. ábra: *load*

dc_1149_15

Ca^{2+}). Bár ez a tény első közelítésben meglepőnek tűnik, ésszerű magyarázatot adhat az SR Ca^{2+} leadása és felvétele közötti szoros csatolás. Másrészt, a SR Ca^{2+} tartalma erősen függ az átlagos $[Ca^{2+}]_i$-től. E szempontból a szisztolés és diasztolés $Ca^{2+}{}_i$ koncentrációknak ($[Ca^{2+}]_{iS}$, $[Ca^{2+}]_{iD}$), illetve a CaT időtartamának és kinetikájának egyaránt alapvető jelentősége van. Mivel a SERCA2 Ca^{2+} felvételének hatásfoka a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésével meredeken nő, a $[Ca^{2+}]_i$ *mérsékelt* növekedése is markáns $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedéshez vezet. Ha pedig a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés tartós, az SR túltelődik, ami az SR-ből fiziológiásan minimális szintű, spontán, inkoherens, lokális Ca^{2+} felszabadulások (azaz Ca^{2+} sparkok) drasztikus fokozódásához, végső soron aritmogén, aszinkron Ca^{2+} hullámok kialakulásához vezethet.

Az SR Ca^{2+} tartalmát optimalizáló és stabilizáló autoregulációs feedback mechanizmus a SL Ca^{2+} fluxusainak CaT-függő modulációján alapul. Ennek alapelvét ugyancsak a 2. ábra demonstrálja. A stimuláció leállítása után, 10 mM koffein oldat alkalmazását követően, az SR Ca^{2+} tartalma kiürül. A citoszolba kerülő Ca^{2+} aktiválja a $_{fwd}$NCX transzportot, ami ezt a Ca^{2+}-ot a sejtből el is távolítja. A koffein kimosását és a periodikus stimuláció újraindítását követően az első CaT-ek a normálisnál jóval kisebbek lesznek, hiszen az SR Ca^{2+} tartalma jelentősen csökkent. A kisebb CaT miatt az NCX által eltávolított Ca^{2+} mennyisége is jóval kevesebb, mint normál állapotban. Ezzel párhuzamosan, a markánsan alacsonyabb $[Ca^{2+}]_{sm}$ miatt az LTC csatornák nyitvatartási időtartama nő, ezért a Ca^{2+} beáramlás nagyobb lesz. A két hatás együttesen a transz-szarkolemmális fluxusok egyensúlyának *tranziens* felbomlásához, a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéséhez, ez pedig a $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedéséhez vezet. Periodikus stimuláció esetén a fokozatos $[Ca^{2+}]_{SR}$ növekedés következtében a CaT amplitúdója, ezáltal a $[Ca^{2+}]_i$ is, fokozatosan emelkedik, ami a Ca^{2+} beáramlás csökkenéséhez, ezzel párhuzamosan a Ca^{2+} eltávolítás növekedéséhez vezet. Ez a korrekciós folyamat mindaddig tart, amíg az SR Ca^{2+} tartalma helyre nem áll és a transzmembrán Ca^{2+} fluxusok újra egyensúlyba nem kerülnek **[4, 16]**. A lokális feedback hatékonyan szabályozza a $Ca^{2+}{}_{SR}$ szintet, mivel annak közvetlen érzékelésén alapul, míg az alternatív mechanizmusok (pl. foszforiláció) hatékonysága indirekt tényezőktől is függhet (cAMP szint). A $[Ca^{2+}]_{SR}$ tartós, markáns emelkedését több faktor is limitálja. A $[Ca^{2+}]_{SR}$ növekedésével párhuzamosan a SERCA2 *nettó* Ca^{2+} transzportja termodinamikai okokból fokozatosan csökken, a RyR2 receptorokon keresztül a Ca^{2+} szivárgás fokozatosan nő. Ha ez a szivárgás nem túl jelentős, a SERCA2 elérheti termodinamikai egyensúlyát, azaz a forward és reverz fluxusok kiegyenlítődnek, a nettó Ca^{2+} fluxus zérus lesz. Továbbá, ha a $[Ca^{2+}]_{SR}$ elér egy adott, általában igen magas küszöbértéket, nemcsak számos lokalizált Ca^{2+}spark jön létre, hanem azok összeolvadásával aszinkron Ca^{2+} hullámok is kialakulnak.

A $Ca^{2+}{}_i$ homeosztázis terhelés-adaptációjának alapelvei. Adott kamratelődés (diasztolés rosthossz) esetén a szív kontrakciós erejét a $[Ca^{2+}]_{iD}$, és a CaT nagysága együttesen határozza meg. „Dinamikus steady state" körülmények között (azaz állandó pulzusszám és perctérfogat esetén) a Ca^{2+} fluxusok egyensúlyban vannak, a transz-szarkolemmális be- és kiáramlás, illetve az SR-ből felszabaduló és oda visszapumpált Ca^{2+} mennyisége azonos. A szívizom inotropiájának fiziológiás adaptációját *külső, autonóm* szignálok vezérlik; hatékonyságukhoz nem szükséges a $[Ca^{2+}]_{SR}$ jelentős változása. A mechanikai terhelés változása esetén a kontrakciós erő beat-to-beat adaptációja főleg a CaT finomhangolásával történik, a $[Ca^{2+}]_{iD}$, és az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} pulzus autonóm, feed-forward jellegű modulációjával. Fokozott fizikai terhelés során a magasabb pulzusszám miatt megnő a *nettó* Ca^{2+} beáramlás, ami a $[Ca^{2+}]_{iD}$, és a $[Ca^{2+}]_{SR}$ *egyidejű* emelkedéséhez vezet.
A $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedése növeli a CaT amplitúdóját, ezáltal a kontrakciós erő is nagyobb lesz. Ezzel párhuzamosan a Ca^{2+} eltávolítás is fokozódik. Végül új egyensúlyi állapot alakul ki, melynek jellemzői a megemelkedett végdiasztolés $[Ca^{2+}]_i$, a fokozott Ca^{2+} felszabadulás az SR-ből, és a nagyobb CaT és kontrakciós erő.

dc_1149_15

2.1.3. Intracelluláris Ca^{2+} kompartmentek a szívben

„Az elmúlt néhány év során azonban nyilvánvalóvá vált, hogy ***az információt a Ca^{2+} szignálok frekvenciája és amplitúdója együttesen tartalmazza,*** *és a diszkrét (szignál)komponenseket az intracelluláris proteinek fejtik meg és fordítják le eltérő válaszokra." (saját fordítás* **[19]***)*
Fentiekhez hozzátehetjük: továbbá lokalizációja. A szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisának megértéséhez nélkülözhetetlen az intracelluláris Ca^{2+} kompartmentek jelentőségének felismerése. Mind a Ca^{2+} mozgások, mind más Ca^{2+}-függő folyamatok térben és időben elkülönülve, többszintű interakció keretében zajlanak. A Ca^{2+}_i hullám terjedését a belső membránok módosítják, így hozzájárulnak lokalizált intracelluláris Ca^{2+}_i kompartmentek (domének/mikrodomének) kialakulásához a citoszolban és a sejtorganellumokban. Bár nyugalomban az átlagos $[Ca^{2+}]$ a citoszolban, a mitokondriumokban és a sejtmagban közel azonos, aktivációt követően nagyságuk eltérően változik. A Ca^{2+} háztartás komplexitását (a szabályozó folyamatok hatékonyságát) dinamikusan változó kölcsönhatások is növelik.
A strukturális és funkcionális kompartmentek kapcsolata rendkívül sokrétű.

Citoszol: bár *elvileg* a citoplazmát közel homogén kompartmentnek szokás tekinteni, ez szívizomsejtekben *biztosan nem teljesül*; valójában rendkívül heterogén. Mivel a szívizom nem lehet tartósan nyugalmi állapotban, a citoszol ionkoncentrációi időben gyorsan és jelentősen változnak. A térbeli ioneloszlásokra és az ionfluxusokra ugyancsak a folyamatos változás jellemző. Az eltérő lokalizációjú, gyorsan változó aktivitású transzportfolyamatok következtében az ionmozgások részleteinek és szabályozási mechanizmusainak korrekt leírásához differenciális ioneloszlásokkal, azaz a citoszol elemi térfogataiban dinamikusan változó *ionszámokkal* kell*ene* számolni – ebben az értelemben a koncentráció klasszikus fogalma használhatatlan. Szívizomsejtekben *valódi* Ca^{2+}_i, Na^{+}_i, stb. ionkoncentrációk *nem definiálhatók;* az értekezésben használt $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^{+}]_i$, $[K^{+}]_i$ kifejezés alatt minden esetben *közelítő átlagkoncentráció értéket* kell érteni.

Szarkoplazmás retikulum (SR): a megbízható ECC szempontjából az SR nélkülözhetetlen, kitüntetett Ca^{2+} raktár. Szerepét, működését és a $[Ca^{2+}]_{SR}$ fiziológiás szabályozását az előzőekben részletesen ismertettük. Az SR túltöltődése, illetve a RyR-ok kórosan instabil működése aritmiák kialakulásához **[20]**, a $[Ca^{2+}]_{SR}$ tartós csökkenése a pumpafunkció progresszív károsodásához, hosszabb távon krónikus szívelégtelenséghez vezet **[21]**.

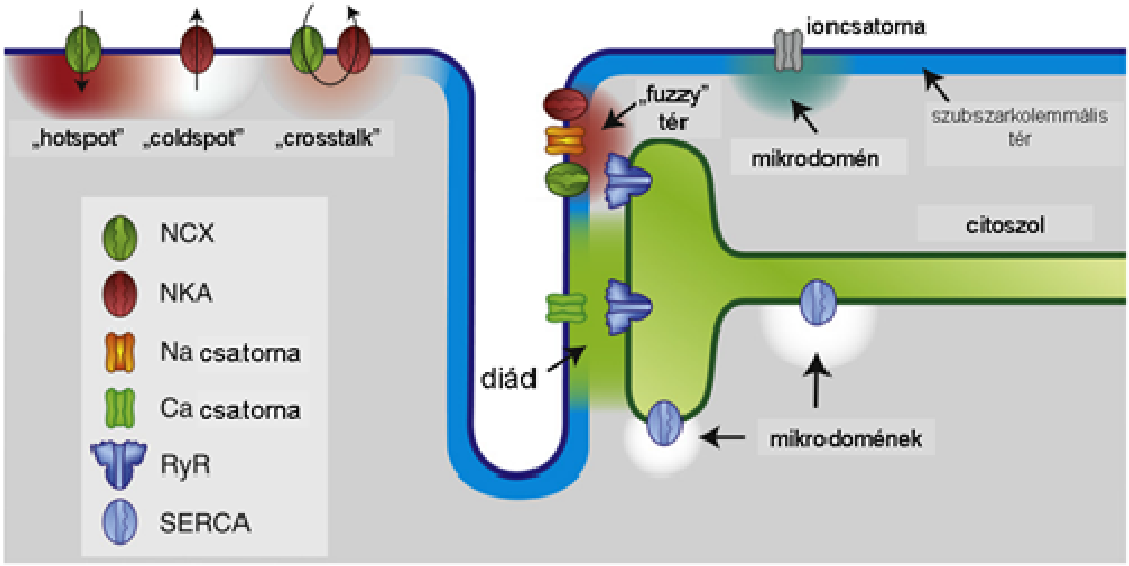
A mitokondrium és a sejtmag tere: A mitokondriumok a sejt aktivációja során gyors Ca^{2+} felvételre képesek az SL, illetve más membránok Ca^{2+} csatornái közelében kialakuló, igen magas $[Ca^{2+}]$-val rendelkező mikrodoménekből; ezáltal megelőzik túl nagy Ca^{2+}_i szignálok kialakulását/terjedését. Szignálformáló működésük rendkívül fontos a kompartmentalizált sejtfunkciók precíz, hatékony szabályozása szempontjából. Ugyanakkor *szelektíven* magas szignálok alakulnak ki az *aktív területek közelében található* mitokondriumokban ; ennek következtében azok aktiválódnak; az oxidatív foszforiláció és az ATP szintézis a megnőtt lokális szükségletnek megfelelően felgyorsul**.**

A mitokondriumok aktiválódása, illetve a maghártya és nukleoplazma puffer kapacitása jelentősen csillapítja a Ca^{2+}_i szignál sejtmag irányú terjedését. Ugyanakkor a sejtmag raktáraiban tárolt Ca^{2+} felszabadítása a nukleoplazmába magas *lokális* $[Ca^{2+}]_{nucl}$ szignált generálhat, ami szubnukleáris doménekre szűkülhet. A hipotetizált Ca^{2+}_{nucl} raktárak közé sorolhatók a mag mikrovezikulumai, illetve a maghártya betüremkedései a nukleoplazmába (nukleoplazmás retikulum). Az adatok szerint ciklikus ADP-ribóz, IP_3 és a $NADP^{+}$ is képes Ca^{2+} felszabadulást generálni a nukleoplazmába, de e mechanizmusok fiziológiás szerepe/jelentősége nem tisztázott **[23]**.

dc_1149_15

Egyéb intracelluláris Ca^{2+} kompartmentek: A szívizomsejtekben további kisebb-nagyobb Ca^{2+} kompartmentek is találhatók, melyek elsősorban az intracelluláris Ca^{2+} jelutakhoz kapcsolódnak. A Ca^{2+} mozgások szempontjából jelentőségük kisebb, vagy nem kellően tisztázott. Az elképzelések szerint a szívizomsejtekben található két nagy Ca^{2+} raktár, a szarkoplazmás és endoplazmás retikulum (SR, ER) funkcionálisan jelentősen eltérő kompartmenteket alkot. Míg az előbbi feladata az ECC szabályozása, utóbbi a „housekeeping" és transzkripciós feladatokhoz szükséges Ca^{2+} forrást biztosítja [24].

Domének, mikro/nanodomének: A kísérleti adatok alapján a tradicionálisan használt kompartment fogalom lényeges kiegészítésre/bővítésre szorul. Bár a membránnal határolt, önálló intracelluláris terek jelentősége vitathatatlan, egyre több adat szól amellett, hogy ezeknél jóval kisebb, membránnal nem, vagy csak részben határolt térfogatok is nagyon eltérően viselkedhetnek – a sejteken belül számolni kell strukturálisan kevéssé, viszont funkcionálisan jelentősen elkülönülő terekkel és mikroterekkel *(domének, mikrodomének)*. A domén koncepció lényegét a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra Példák (mikro)doménekre szívizomsejtekben. A szubszarkolemmális tér a szarkolemma alatti 10-20 nm vastagságú plazmaréteg, amelyben mind az átlagos, mind a lokális ionkoncentrációk szignifikánsan különböznek a citoszol ionkoncentrációitól (pl. aktív szívizomsejtben $[Na^+]_{sm} > [Na^+]_i$). A T-tubulusok membránja és az SR membránja közötti diádikus (restricted) térben (zöld színezés) a Ca^{2+} beáramlás (Ca csatorna)) és felszabadulás (RyR) következtében a $[Ca^{2+}]_{sm}$ jelentősen magasabb a citoszolban mérhető $[Ca^{2+}]_i$ értéknél. Aktív ioncsatornák/-transzporterek közelében az adott ion lokális koncentrációja magasabb (hotspot), vagy alacsonyabb (coldspot) lehet, mint a szubmembrán tér egyéb térfogataiban. Koexpresszió következtében több transzportfehérje együttesen is kialakíthat speciális mikro/nanodomént, melyben rendkívül szoros kölcsönhatás (crosstalk) jöhet létre az egyes transzporterek között (pl. a lokális $[Na^+]$ vonatkozásában az ankirin-B által kapcsolt NKA és NCX fehérjék között. Hasonló mikrodomént alkot az a szubszarkolemmális, eredetileg „fuzzy" térként definiált térfogat (barna színezés), amely vélhetően jelentősen átfed a diádikus térrel, és amelyen NCX, Ca és Na csatornák, valamint RyR-ok osztoznak [25].

Ilyen, jól definiált domén az alábbiakban ismertetett *szubmembrán* tér (amin belül speciális funkcióval rendelkező domének is azonosíthatók), de számos további, speciális funkcióval rendelkező domént is leírtak (pl. a Ca^{2+} jelutakkal kapcsolatban: a mitokondriumok és az SR között [26], preszinaptikus végződésekben [27], stb.). Az intracelluláris domének nagysága rendkívül változó; esetenként, például *egyetlen ioncsatorna* és szűk környezete esetén, talán még szemléletesebb nanodoménekről beszélni, hiszen ezek térfogata a 100 - 500 nm^3 tartományban van. Kiválóan reprezentálja a domén/mikrodomén/nanodomén koncepció kikerülhetetlenségét a PMCA már említett funkcionális diverzitása. Több Ca^{2+}

dc_1149_15

szignálút végső (kikapcsoló) mechanizmusát képezve a PMCA kiemelkedő szerepet játszik a Ca^{2+}_i háztartás finomszabályozásában. Emlős sejtekben a PMCA1 izoform mellett sejtspecifikus módon három további izoform (PMCA2-4) expresszálódhat harmincnál több hasítási variánssal. Bár *makroszkopikus* szinten az összes variáns funkciója azonos (u.m. Ca^{2+} eltávolítás), *mikroszkopikus* szinten, sejtspecifikus módon, mikrodoménekbe rendeződve, egyedi feladatokat végeznek **[28]**.

A szarkolemma szubmembrán tere: A Ca^{2+}_i (és a többi ion) mozgások szabályozása szempontjából a SL-t belülről határoló ~ 20 nm mélységű intracelluláris plazmaréteg kitüntetett szereppel rendelkezik, mivel a szubmembrán tér ionösszetétele jelentősen eltér a sejt belső (bulk) térfogatának összetételétől. A membrántranszporterek ezt a teret „látják", ezzel állnak szoros kapcsolatban, a transzportaktivitás szabályozásában fontos paraméterek (membránpotenciál, iongradiensek, stb.) aktuális értéke is a lokális viszonyok függvénye és nagymértékben független az „átlagos" értékektől (pl. becslések szerint szisztolé alatt a $[Ca^{2+}]$sm sokszorosa a $[Ca^{2+}]_{iS}$ aktuális értékének (3-10 µM vs. 0.8-1 µM) **[29]**. Fontos hangsúlyozni, hogy amint a 3. ábra modellje is demonstrálja, önmaga az SM tér is *nagyon heterogén* – számtalan kisebb-nagyobb, funkcionális szempontból eltérő szereppel rendelkező mikro/nanodomén található benne. Bár ma szubmembrán térről szinte csak az SL vonatkozásában beszélnek, hasonló terek léteznek a sejten belüli, iontranszportereket tartalmazó membránnal határolt struktúrák – SR, mitokondriumok, sejtmag esetében is.

A T-tubulus és a diád: Bár a T-tubulus rendszer morfológiailag az EC tér részét képezi, több szempontból is önálló domént alkot. Egyrészt ionösszetétele is eltér az intersticiális folyadéktól, másrészt a tubulusmembránban a transzporterek száma, eloszlása és denzitása is különbözik az SL egyéb területeitől (pl. az LTCC-k, NCX molekulák túlnyomó része itt található **[30, 31]**. Ezért szerepe kritikus az ionfluxusok nagyságának (AP, CICR), irányának ($_{rev}I_{NCX}$ vs. $_{fwd}I_{NCX}$) és arányainak meghatározásában. A tubulusok SM terében lévő mikrodomének – a trigger LTC csatornák és RyR receptorok alkotta „couplonok"-at (és azok funkcionális/strukturális stabilitását biztosító junctophilin-t, calsequestrin-t, triadint, junctin-t) integráló diádok **[32]**, valamint a NaV, NKA és NCX transzporterek alkotta „fuzzy space", melynek a legújabb adatok szerint része a szívizomban még tisztázatlan szerepű (vázizomban a hosszú távú Ca^{2+}-egyensúlyt biztosító) „store operated Ca^{2+} entry" (SOCE) csatornakomplex (CRAC: ORAI1 + STIM1) **[33]**, kitüntetett szerepet játszanak a Ca^{2+}i homeosztázisban. Több, a repolarizációban szerepet játszó K^+ csatorna ($K_{ir}2.1$) ugyancsak predominánsan itt található. Fiziológiás jelentőségüket jól mutatja, hogy a szívizomsejtek működése detubulációt követően súlyosan, irreverzibilisen károsodik **[34]**.

***Metodikai nehézségek*:** A Ca^{2+}-transzportfolyamatok nagymértékű kompartmentalizációja miatt a leggyakrabban alkalmazott, Ca^{2+}-érzékeny fluoreszcens festékkel mért, „átlagos koncentrációt" tükröző adatok, bár esetenként jól használhatók (pl. Ca^{2+} terhelés mérése), mind kevesebb új információt szolgáltatnak. A módszer sejtorganellumokra ($[Ca^{2+}]_{SR,}$ $[Ca^{2+}]_{mito}$) adaptált változatai viszonylag megbízhatóan alkalmazhatók **[35, 36]**, viszont a mikro/nanodomének vizsgálatára kifejlesztett legújabb technikák (membrán közeli (near membrane) Ca^{2+} festékek, teljes belső visszaverődésen alapuló (total internal reflectance fluorescence, TIRF) módszer **[37-39]**. jóval kevésbé kiforrottak, számos elvi és gyakorlati nehézséggel terheltek, továbbá a mérési adatok interpretációja is jóval bizonytalanabb. Ugyanez érvényes az indirekt módszerekkel mért **[40]**, illetve a számítógépes „in silico" modellekből származó értékekre **[41-43]**. Megbízható technika, mely lehetővé tenné egyedi Ca^{2+}_i mozgások/koncentrációk *kvantitatív* nyomon követését, nem áll rendelkezésre. A nehézségek mértékét jellemzi, hogy becslések szerint egy nyitott LTCC-től *10 nm* távolságra a $[Ca^{2+}]_{sm}$ már kevesebb, mint 20%-a a csatornában mérhető értéknek **[44]**.

dc_1149_15

2.1.4. A Ca^{2+} transzportfolyamatok $[Na^+]_i$-, és $[H^+]_i$-függése

A Ca^{2+} transzportfluxusokra a szívizomsejt aktuális Na^+_i és H^+_i tartalma jelentős moduláló hatást fejt ki. Ennek oka lehet az adott ion direkt kölcsönhatása egy transzporterrel (pl. a Na^+_i NCX gátló hatása), vagy koncentrációváltozásainak hatása a transzport hajtóerejére (pl. a pH_i csökkenés által indukált $[Na^+]_i$ emelkedés okozta Ca^{2+} akkumuláció – a $_{rev}$NCX transzport aktiválódásával).

$[Na^+]_i$-függés: A szívizomsejtekben nincsen a Ca^+ háztartáshoz hasonlóan *precíz* $[Na^+]_i$ szabályozás [45]. A mindenkori Na^+_i szint a beáramló Na^+ fluxustól és az eltávolított Na^+ mennyiségétől függ. Fiziológiás körülmények között a Na^+ felvétel és eltávolítás mértéke azonos, a nettó fluxus zéró. Egyetlen szívciklus alatt a citoszol Na^+ tartalma alig változik, mivel a beáramló Na^+ mennyisége kicsi és gyorsan eltávolításra is kerül. A Na^+ felvétel legfontosabb komponensei: a feszültségfüggő Na^+ (Na_V) csatornák, az NCX forward aktivitása, illetve acidózis során a Na^+/H^+ kicserélő (NHE). A Na^+ felvételre nem jellemző a Ca^{2+} felvételt precízen szabályozó autoreguláció, sem a szimpatikus aktivitásfokozódás felvételt növelő hatása. Az eltávolítás elsődleges effektora a Na^+/K^+ ATP-áz (NKA), de kóros körülmények között megnőhet a $_{rev}$NCX transzport jelentősége is. A CICR-t a Ca^{2+} és Na^+ transzporttal az NCX aktivitása köti össze, ezáltal a Na^+_i változások is részt vesznek az ECC szabályozásában (lásd [25]). Egyetlen szívciklus során a Na^+ beáramlás alatt a „fuzzy" térben kialakuló lokális tranziens $[Na^+]_i$ növekedés is befolyásolhatja az NCX áram (I_{NCX}) irányát. Többen megkísérelték a $[Na^+]_{sm}$ meghatározását a szubmembrán térben, de a magas, Na^+ beáramlás indukált lokális $[Na^+]$ kialakulását nem sikerült egyértelműen igazolni [46]. Sok kísérleti adat igazolja viszont, hogy hosszabb távú változás esetén a $[Na^+]_i$ emelkedés az E_{NCX} értékét negatív irányba tolja és ezáltal a $_{rev}I_{NCX}$ aktiválásával nettó Ca^{2+} felvételt generál, ami $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedéshez és nagyobb CaT kialakulásához vezet. A depolarizáció alatt a $_{rev}I_{NCX}$ aktiválódása következtében megnőtt Ca^{2+} felvétel további trigger Ca^{2+}-ot biztosít a RyR-ok aktiválására. Magas $[Na^+]_i$, a $_{rev}I_{NCX}$ aktiválásával önmagában is képes biztosítani az SR Ca^{2+} felszabadításához szükséges trigger Ca^{2+} mennyiséget, bár az I_{Ca} ezt sokkal jobb hatásfokkal teszi, azaz a trigger Ca^{2+} biztosítása elsődlegesen az I_{Ca} feladata, és a $_{rev}I_{NCX}$ aktivitásnak modulációs szerepe van.

A Na^+ transzport és a Ca^{2+}_i háztartás kölcsönhatásának részletei nem tisztázottak. *Egyrészt* a CaT alatt a $[Na^+]_i$ változások a SERCA2/NCX egyensúly befolyásolásával modulálják a citoszol fölös Ca^{2+} tartalmának eltávolítását, és az SR Ca^{2+} felvételét. *Másrészt*, az AP alatt az NCX a CICR-hez is hozzájárulhat, mivel a AP spike fázis alatt, a Na_V-ok közelében akkumulálódó Na^+, az SL *lokális* depolarizációjával együtt aktiválja a $_{rev}$NCX transzportot. Igy a diádikus térbe Ca^{2+} kerül. A bizonytalanság főleg a Na^+ akkumulációval jellemezhető kompartment méretében van [47]. Bár valószínű, hogy az nem a teljes citoszol, hanem a kiterjedt szubmembrán tér kisebb-nagyobb, lokalizált része, nem tisztázott, hogy ez egy mikrodomén („fuzzy space"), vagy ennél is kisebb nanodomén (spot),amelyet csak néhány membránprotein lát. A CICR, így a kontraktilitás finomhangolása, e mikro/nanodomének Na^+ tartalmának szabályozásától függ. Valószínűleg vannak olyan szubmembrán térfogatok is, melyekben az NKA aktivitása jelentős lokális Na^+ hiányt alakít ki.

$[H^+]_i$-függés, iszkémia/reperfúzió: A pH_i kismértékű változása (csökkenése) jelentősen befolyásolja (általában gátolja) a sejtfolyamatok aktuális sebességét (így a szívizomsejtek kontrakcióját is) ezért a pH_i precízen szabályozott. Normál pH_i esetén valamennyi, a regulációban résztvevő transzporter (a Na^+/H^+ (NHE1), Cl^-/OH^- és Cl^-/HCO^- kicserélők, valamint a Na+/HCO3– szimporter) aktivitása igen alacsony [48], ezért a Ca^{2+} transzportra gyakorolt hatásuk minimális. Ez a hatás szignifikánsan megnő kóros, a pH_i markáns változásával járó állapotokban. Az, hogy az Ca^{2+}_i változások mértéke és iránya milyen nagy mértékben függ a többi ionok szintváltozásaitól, legjobban talán iszkémia/reperfúzió

dc_1149_15

(I/R) során figyelhető meg. Az iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés négy fontos forrása közül három közvetlenül ionmozgásokhoz kötődik – a $Ca^{2+}{}_i$ túltelődéshez vezető $[Na^+]_i$ emelkedés okai a fokozott beáramlás (NHE aktiválódás) és a csökkent eltávolítás (NKA inaktiválódás); előbbiben kulcsszerepet játszik a fokozott $H^+{}_i$ eltávolítás. Végül a szintén markáns $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéshez vezető SL depolarizációban kritikus szerepe van a K^+ megnőtt kiáramlásának (K^+ csatornák) és csökkent felvételének (NKA inaktiváció).

2.2. Az intracelluláris Ca^{2+} változások és az akciós potenciál repolarizáció kapcsolata

A szív fiziológiás működése és az akciós potenciál repolarizációja alapvetően függ az SL K^+ csatornáinak precíz, szinkronizált működésétől. E csatornák legtöbbje a pitvarokban és kamrákban egyaránt expresszálódik. A K^+ áramok hozzájárulnak a pacemaker aktivitáshoz és a nyugalmi potenciál szabályozásához, ezáltal markánsan befolyásolják az AP alakját és időtartamát. Izolált szívizomsejteken és szövetpreparátumokon nyert kísérleti adatok és klinikai megfigyelések igazolják több repolarizáló K^+ áramot generáló ioncsatorna $[Ca^{2+}]_i$ érzékenységét. Az áramok közvetlen, a csatornaprotein és a $Ca^{2+}{}_i$ kölcsönhatáson, illetve közvetett, a Ca^{2+} jelutak aktiválásán alapuló modulációja fontos következményekkel jár a szívizomsejtek elektrofiziológiai paramétereire, mechanikai teljesítményére és fiziológiás adaptációjára, ezért a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás perturbációi súlyos szívműködési zavarokhoz vezethetnek. A következőkben összefoglalom az AP külső $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_o$) függésével és a sejtszintű antiaritmiás védelem szempontjából kiemelkedő jelentőségű, általunk is vizsgált, $Ca^{2+}{}_i$-érzékeny repolarizáló K^+ árammal (I_{K1}), és az alacsony konduktanciájú $Ca^{2+}{}_i$-aktivált K^+ (SK) csatornák máig megválaszolatlan kérdéseivel kapcsolatos ismereteket.

2.2.1. A külső Ca^{2+} koncentráció hatása az akciós potenciál kinetikájára

Az AP mindenkori hosszát a befelé, és a főleg az AP plató fázisában aktív, kifelé irányuló transzmembrán áramok között kialakuló, precízen szabályozott egyensúly határozza meg. Szívizomsejtekben a $[Ca^{2+}]_o$ csökkenése nyújtja, emelkedése rövidíti az AP-t **[49, 50]**. Hipokalcémia a korrigált QT (QT_c) intervallumot nyújtja, ezzel párhuzamosan az EAD-ok gyakoriságának fokozásával drasztikusan növeli az aritmiák kialakulási valószínűségét.
A hiperkalcémia markáns, szintén aritmogén, QT_c csökkenést hoz létre **[51]**. Hemodializált páciensekben, akikben a szérum $[Ca^{2+}]$ változó, egyértelmű, inverz kapcsolat van a QT_c intervallum hossza (és az aritmiák gyakorisága), és a szérum $[Ca^{2+}]$ között **[49, 50, 52, 53]**.

Az APD $[Ca^{2+}]_o$-függésének hátterében a K^+ áramok extra- és intracelluláris Ca^{2+} szintváltozásokkal szembeni érzékenysége rejlik **[54-56]**. A depolarizáció során beáramló Ca^{2+} mennyisége erősen függ a $[Ca^{2+}]_o$-tól. Izolált sejtekből származó adatok szerint emelkedő $[Ca^{2+}]_o$ rövidíti az AP-t és növeli az LTC csatornák áramának denzitását, viszont csökkent $[Ca^{2+}]_o$ esetén mind kamrai szívizomsejtekben **[57-59]**, mind Purkinje rost preparátumokban **[60, 61]** az $I_{Ca,L}$ amplitúdója csökkent és az APD megnyúlt, az $I_{Ca,L}$ gátlása a plató csökkenéséhez és az AP rövidüléséhez, $I_{Ca,L}$ növelése a plató növekedéséhez és AP megnyúláshoz vezetett. Fontos megjegyezni, hogy az AP Ca^{2+}-érzékenysége ennél jóval összetettebb. Egyrészt, mert a Ca^{2+} háztartás kulcsszereplői közötti kölcsönhatásokat (pl. a citoszol és SR $[Ca^{2+}]$ változásait, illetve az NCX forward aktivitásának Ca^{2+}-függését) ugyancsak figyelembe kellene venni, másrészt, mivel a változásokhoz más Ca^{2+}-érzékeny áramok, pl. háttér K^+ áramok is hozzájárulhatnak.

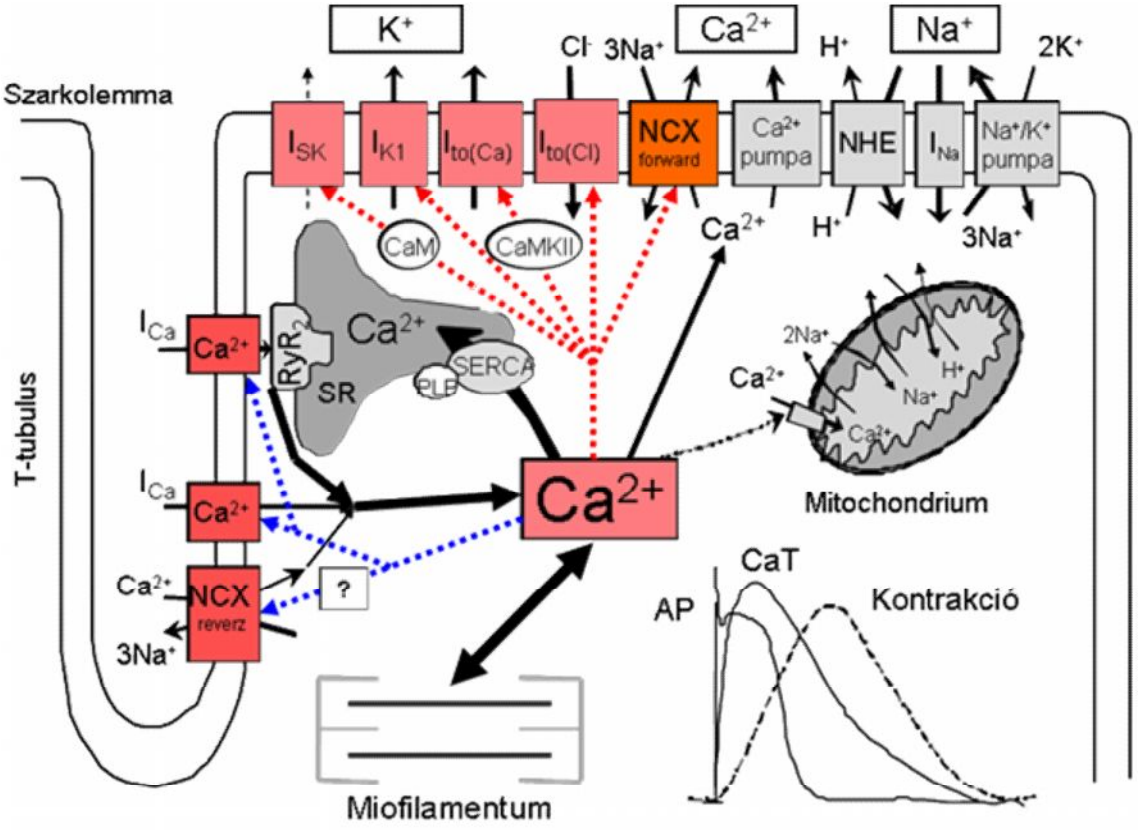
2.2.2. Az $[Ca^{2+}]_i$ szerepe a Ca^{2+}-érzékeny K^+ áramok szabályozásában

Több korai tanulmány igazolta a $[Ca^{2+}]_i$ és a K^+ permeabilitás szoros korrelációját a szívizomban **[62-65]**. Következtetéseik szerint a K+ permeabilitás értéke valószínűleg

dc_1149_15

$[Ca^{2+}]_i$-függő. Erre a hipotézisre az első közvetlen bizonyítékot Purkinje rost preparátumokon Isenberg [65], valamint Kass és Tsien [60] szolgáltatták. Azóta számtalan tanulmány igazolta a kifelé irányuló K^+ áramok szerepére az AP Ca^{2+}_i-függő változásaiban, de *fiziológiás körülmények között is aktív* Ca^{2+}-aktivált K^+ csatornákat a legutóbbi időkig (2008!) nem tudtak a szívizomsejtekben megbízhatóan kimutatni, mivel a molekuláris biológiai bizonyítékok ellenére, ellentmondásos működésük és szokatlan farmakológiai viselkedésük (hiányzó apamin-érzékenység) kérdésessé tette funkcionalitásukat.

A kísérleti adatok szerint a miokardium K^+ csatornáinak Ca^{2+}-függő szabályozása három különböző, de egymástól nem teljesen független mechanizmussal történhet (4. ábra).



4. ábra A Ca^{2+}_i iontranszporter szabályozó szerepe: A növekvő $[Ca^{2+}]_i$ gátolja az LTCC-k aktivitását, viszont közvetlen, vagy közvetett serkentő hatással van néhány repolarizáló K^+ áramra, illetve a $_{fwd}$NCX aktivitásra.

A Ca^{2+} ionok közvetlen hatása: Az Ca^{2+}_i közvetlenül hat a K^+ csatornaproteinre és módosítja annak permeabilitását. A közvetlen szabályozás jellemző példája az I_{K1}; a Ca^{2+} ionok feszültségfüggő gátló hatása blokkolja a K^+ kiáramlást. Ennek következtében a csatorna befelé egyenirányító karakterisztikát mutat [62-64].

Kalmodulin-függő reguláció: A kalmodulin (CaM) általánosan expresszálódó, kisméretű, (16,7 kD) Ca^{2+}-kötő protein, négy kötőhellyel. Két homológ doménjét flexibilis régió köti össze, mely Ca^{2+} felvételt követően erős kötés kialakulását biztosítja a CaM molekula és számos célprotein között. Mivel a szabályozandó proteinek többsége nem képes közvetlen Ca^{2+} kötésre, a CaM intracelluláris Ca^{2+} szenzorként működve kulcsszerepet játszik az intracelluláris Ca^{2+} jelátvitelben. Jó néhány, szívben előforduló (Na^+, Ca^{2+}, K^+) ioncsatorna modulációja azok CaM kötőhelyein, Ca^{2+}-kalmodulin mechanizmussal történik. CaM-függő szabályozás felelős többek között az SK csatornák [66], illetve a késői egyenirányító K^+ áram lassú komponensének (I_{Ks}) $[Ca^{2+}]_i$, függő aktivációjáért is [59, 67-70].

Közvetett szabályozás a Ca^{2+}-CaM-CaMKII jelúton keresztül: A CaMKII enzim egy multifunkcionális szerin-treonin proteinkináz, amely az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hatására számos target proteint foszforilálhat. Négy izoformja közül szívben a δ izoform expresszálódik jelentős mennyiségben. Dodekamer strukturába szerveződik, melynek külső felszínén találhatók a katalitikus domének. Ca^{2+}/CaM komplex hiányában a legtöbb (de nem összes) CaMKII a katalitikus domének autoinhibiciója következtében inaktív [71]. A CaM kinázok autofoszforilációja az enzim Ca^{2+}/CaM affinitásának közel 1000-szeres növekedését indukálja (CaM trapping) és megnyújtja aktív állapotának időtartamát. A kialakult "autonóm" aktivitás tovább növeli az aktív állapot élettartamát, amely így a CaM disszociációját követően is megmarad. Ezért a CaMKII aktivált állapotának időtartama jóval hosszabb lehet az CaT időtartamánál. Az enzim foszforilációja a 305 és 306 treonin csoportoknál gátolja a CaM-kötést és csökkenti az enzim aktivitását [72]. Ca^{2+} távollétében a reaktív oxigén species (ROS) is képes az enzim aktiválására [73]. Az AP morfológiája is fontos szerepet játszik a CaMKII aktivációban. Megnyúlt APD vagy magas szívfrekvencia túlaktiválhatja az enzimet [74, 75], ami tovább fokozhatja az APD megnyúlását [76]. Szívizomsejtekben a CaMKII aktivitását izoformjainak eloszlása és intracelluláris lokalizációja, valamint környezetének foszfatáz aktivitása is befolyásolja. A szarkolemma Na_V csatornáin, és számos a Ca^{2+}-háztartásban résztvevő proteinen (pl: az LTCC pórusformáló és β alegységei, foszfolemmán (PLM), RyR, SERCA2) kívül a CaMKII néhány, a szarkolemmában található feszültségfüggő K^+ (K_V) csatornát is foszforilálhat.

2.2.3. A repolarizáló K^+ áramok Ca^{2+}_i-függő modulációja

A befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}): Az I_{K1} a Kir2 csatorna alcsalád tagjainak (Kir2.1, Kir2.2, kismértékben a Kir2.3) áramintegrálja. A többi K_V árammal (I_{to1}, I_{Kur}, I_{Kr}, I_{Ks}) ellentétben, áram-feszültség (I-V) függvénye nagyobb inward, mint outward konduktanciát mutat, aminek oka az I_{K1} depolarizáció-indukált, feszültségfüggő, intracelluláris blokádja, amelyet kationok (Mg^{2+}, Ca^{2+}) és poliaminok (pl. spermidin, spermin) hoznak létre [64]. -30 mV-nál magasabb membránpotenciál mellett amplitúdója a kamrában nulla közeli szintre csökken, de a pitvarban nem [77]. Az I_{K1} konduktancia AP plató fázis alatti csökkenése az I-V függvényre a -20 – -60 mV potenciáltartományában jellemző negatív meredekség következménye, melyet a Kir2 csatornák fent említett blokádja (Ca^{2+}, Mg^{2+} és poliaminok) hoz létre, ami kialakítja a súlyos K^+ vesztés megakadályozása szempontjából nagy jelentőségű, a plató fázisra jellemző alacsony K^+ konduktanciát. A befelé egyenirányító karakterisztika ellenére az I_{K1} fiziológiás körülmények között outward áram (reverzál potenciál: -80 mV). Az I_{K1} a plató fázis végén aktiválódik [77] és a terminális repolarizáció alatt folyamatosan nő. A Kir2 csatornák minden kamrai és pitvari sejtben nagy számban expresszálódnak. Az áram nagy tengerimalac, nyúl és kutya, viszonylag gyenge humán szívizomsejtekben [78]. Áramsűrűsége az emlősfajok többségében – így tengerimalacban és kutyában is – nagyobb a kamrai, mint a pitvari szövetben, de közel ugyanakkora az epi-, endo-, és midmiokardiális sejtekben [79]. Denzitása alacsony nodális szövetben, ahol diasztolé alatt a membrán depolarizáltabb, mint munkaizomrostokban [79]. Az áram amplitúdóját katecholaminok PKA- vagy PKC-függő foszforilációval csökkentik [80, 81]. PIP2 direkt módon és más regulátorok kofaktoraként is aktiválja [82]. Koleszterol és tirozinkináz aktiváció downregulálja a Kir2.1 csatornákat [83].

Az I_{K1} Ca^{2+}-függése: Az I_{K1} Ca^{2+}-érzékenysége ismert, de az áram irányára és a modulátor hatás részleteire vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak. Az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés közvetlen hatása a Kir2 csatornák mérsékelt, feszültségfüggő gátlása. Mivel a $[Ca^{2+}]_i$ direkt hatásán kívül az I_{K1}-et több indirekt, $[Ca^{2+}]_i$-függő mechanizmus is szabályozhatja (PKC vagy Ca^{2+}/CaMKII), az I_{K1} változás az aktuális kísérleti feltételektől függően egyaránt

dc_1149_15

lehet gátlás vagy aktiváció. Néhány esetben az I_{K1} $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hatására csökkent **[63, 84, 85]**. de ezek az eredmények afiziológiás körülmények között születtek. Zaza és mts. **[86]** tengerimalac kamrai szívizomsejteken végzett, a fiziológiás viszonyokat jobban közelítő vizsgálataikból arra a következtetésre jutottak, hogy a $[Ca^{2+}]_{sm}$ tranziens emelkedése a plató fázis alatt jelentős szerepet játszhat a csatorna befelé egyenirányító viselkedésében. Egy másik, hasonló vizsgálatban szívelégtelen patkányból izolált kamrai sejtekben I_{K1} csökkenést figyelték meg **[80]**, ezt az SR-ből diasztolé alatt szivárgó Ca^{2+} által megemelt $[Ca^{2+}]_i$ gátló hatásának tulajdonították. Több vizsgálatban a létrehozott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés I_{K1} növekedést indukált. Izolált Purkinje rostokban a $[Ca^{2+}]_o$ emelése nemcsak a plató potenciált, hanem az I_{K1}-et is növelte **[60]**. Mindkét változás hozzájárult a megfigyelt APD rövidüléshez. Birka Purkinje rostban $CaCl_2$ hatására a "pacemaker farok áram" mindkét konduktancia komponense (g_{K1} és g_{K2}) megnőtt, illetve mindkettő csökkent vagy eltűnt EGTA alkalmazását követően **[65]**. Az I_{K1} Ca^{2+}-aktivált növekedését igazolták azok a mérések is, amelyekkel a metabolikus stressz indukált APD rövidülés mechanizmusát vizsgálták. Az APD rövidülést tartós hipoxia alatt általában K_{ATP} csatornák aktivációjának tulajdonították **[87]**, csakhogy az APD rövidülés jóval az I_{KATP} aktiválódása előtt létrejön. Ebből arra következtettek, hogy a korai APD rövidülésért nem az I_{KATP}, hanem egy másik ionáram felelős **[88-90]**. Az egyik lehetőség az I_{K1} növekedése volt. Ruiz-Petrich és mts. **[88]** nyúl szívben igazolták, hogy a hipoxia alatti repolarizáció gyorsulás és korai AP rövidülés Ba^{2+}-érzékeny. Tengerimalac szívizomsejtekben végzett vizsgálatok igazolták, hogy tartós metabolikus gátlás alatt markáns, I_{K1}-szerű, inward egyenirányító K^+ áram aktiválódik **[91]**. Piao és munkatársai leírták, hogy cianiddal kezelt vagy hipoxiás egér szívizomsejtekben az I_{K1} növekedése megelőzhető a $[Ca^{2+}]_i$ pufferelésével, ugyanakkor Ca^{2+}-mentes oldatban a cianid önmagában is létrehozta az I_{K1} növekedést **[92]**. Ezt az emelkedést az SR Ca^{2+}-felszabadításának gátlása, vagy Ca^{2+} tartalmának kiürítése eltüntette. Transzgenikus, I_{K1} KO egerekben az APD-t cianid, glibenklamid, és Ba^{2+} sem befolyásolta. Hasonló eredményeket kaptak erekből és tüdőből izolált simaizomsejteken **[93, 94]**.

Funkciói: Szívizomsejtekben az I_{K1} összetett funkcióval rendelkezik. Közel szelektív I_{K1} gátlás megnyújtja az AP-t, elsősorban annak terminális fázisában **[95]**. Az AP nyújtó hatás pitvarszövetben kisebb, mint kamraszövetben. Az I_{K1} a terminális repolarizáció, s ezáltal a repolarizációs rezerv egyik kritikus komponense **[96]**, főleg kamrai szívizomsejtekben, ahol denzitása magasabb, mint a pitvarsejtekben **[77]**. Elméletileg az I_{K1} modulációja a diasztolés $[Ca^{2+}]_i$, vagy a szisztolé alatti dinamikus $[Ca^{2+}]_i$ változások által közvetlen kapcsolatot képezhet a $[Ca^{2+}]_i$ háztartás és a repolarizáció adaptációja között. Egy ilyen kapcsolatnak fontos következményei lennének a fiziológiás és patológiás $[Ca^{2+}]_i$ tartományban is. Mivel az I_{K1} nagysága markánsan befolyásolja a terminális repolarizáció sebességét, Ca^{2+}-függő modulációja esszenciális komponense lehetne a szívizom fokozott szimpatikus aktivitás-függő adaptációjának. A feltételezés jogosnak tűnik, mivel igazolták a szívfrekvencia-növekedés, és Ca^{2+} beáramlás indukált, fiziológiás $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés I_{K1} növelő hatását. Ez a növekedés lehet, legalábbis részben, az oka a frekvenciafüggő APD rövidülésnek, amely fokozza a Ca^{2+} eltávolítás hatékonyságát, s ezáltal felgyorsítja a repolarizációt. A szívizomsejtek erősen negatív nyugalmi potenciáljának fenntartásában is az I_{K1} a kulcstényező. A nyugalmi potenciál beállításában játszott kritikus szerepét bizonyítja, hogy reverz potenciálja közel -80 mV **[77]**, és inward konduktanciája a hiperpolarizáció fokozódásával nő. A $[Ca^{2+}]_i$ gyors emelkedése, melyet általában az $_{rev}I_{NCX}$ aktivációja hoz létre (pl. a posztiszkémiás reperfúzió korai fázisában), szükségszerűen egy diasztolés inward áramot (I_{ti}) is indukál, továbbá az aritmia hajlamot jelentősen fokozó membrándepolarizációhoz vezethet. Ilyenkor a Ca^{2+}-indukált I_{K1} növekedés által indukált membránellenállás csökkenés rendkívül hatékony védelmi mechanizmusként szolgálhat,

dc_1149_15

mivel részben kompenzálja az I_{ti} depolarizáló hatását, valamint a nyugalmi potenciál stabilizálásával csökkenti az aritmiák kialakulási valószínűségét. Ugyanakkor, mivel normál körülmények között a diasztolés fázisban az I_{K1} konduktanciája kicsi, a Kir csatornák további funkciója, hogy az AP terjedése során a transzmembrán áram számára biztosítsák a biztonságos membrándepolarizációhoz szükséges bemeneti ellenállást **[97]**.

A tranziens kifelé irányuló áram (I_{to}): Az I_{to} két különböző áram (I_{to1} és I_{to2}) integrálja. Mindkét áram nélkülözhetetlen szerepet játszik az AP korai repolarizációjában **[98]**. Az első (I_{to1}) 4-aminopiridin (4-AP) érzékeny K^+ áram. A második (I_{to2}) 4-AP-re érzéketlen Cl- áram, viszont $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés aktiválja. Bár az I_{to2} a Ca^{2+}-ra érzékenyebb, az I_{to1} is jelentős Ca^{2+}-függést mutat **[99, 100]**. Az I_{to1} gyorsan aktiválódik és inaktiválódik (-30 mV-nál 1-2, illetve 5-10 ms alatt). Négy csatornafehérjéhez köthető, melyek közül a Kv4.1, Kv4.2, és Kv4.3 homológ szerkezetűek, a Kv1.4 strukturálisan és funkcionálisan is különböző. Kutya és humán szívben a Kv4.3 és a Kv4.2, nyúlban Kv1.4 az elsődleges komponens. Az I_{to} denzitása alacsonyabb endo-, mint epi- és midmiokardiális régiókban, de Purkinje rostokban és pitvarban is jelentős. Az áram több jelúton keresztül modulálható **[101, 102]**. A Kv4.3 csatorna jelentős $[Ca^{2+}]_i$ érzékenységet mutat, a szabályozás CaMKII-függő **[103, 104]**. Ennek alapján felvetették, hogy a CaMKII túlműködés hozzájárulhat az elektromos remodelinghez a pitvarfibrilláció korai fázisában. Alacsony $[Ca^{2+}]$i mellett az inaktiváció CaMKII-indukált lassulása kizárólag a CaMKII-ra érzékenyebb Kv4.3 csatornákra jellemző, és a Kv4.2 csatornák inaktivációja CaMKII-független, csak magas, vagy tranziens $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés lassítja. Az eltérés oka, hogy bár mindkettő CaMKII-érzékeny, a Kv4.2 protein foszforilációjához magas $[Ca^{2+}]_i$ szükséges, a Kv4.3 protein viszont nem mutatja ezt a függést. Szelektív I_{to1} gátlószer hiányában az áram szerepe az AP alakításában nehezen vizsgálható, ezért az AP morfológiára, $[Ca^{2+}]_i$-tranziensekre (CaT) és kontraktilitásra gyakorolt species-függő, komplex hatására vonatkozó kísérleti eredmények ellentmondásosak. Az elérhető irodalmi adatok alapján úgy tűnik, az I_{to1} nagysága és időtartama jelentős befolyást gyakorol az AP-ra (leginkább a plató fázis kinetikájára), ennek következtében az APD-re és Ca^{2+}_i háztartásra is. Mivel a legfontosabb Ca^{2+} transzporterek feszültségfüggőek, az AP kinetikájának I_{to1}-indukált változásai közvetlenül modulálják a $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} nagyságát, illetve ezeken keresztül közvetve befolyásolják az EC-csatolás mértékét és a szív kontraktilitását. Kutya Purkinje rostokban az I_{to1} gátlása szignifikánsan rövidítette az AP-t és fokozta a sejtrövidülést **[105, 106]**, de kamrasejtekben alig volt AP rövidítő hatása **[107]**). Hasonló eredményt kaptak tengerimalacban **[108]**; patkány és nyúl kamrai sejtekben az I_{to1} gátlás AP-megnyúlással, a Ca^{2+} beáramlás fokozásával/eltávolításának csökkenésével járt **[109-111]**, igazolva, hogy a Ca^{2+} transzporterek aktivitásának I_{to1}-függő modulációja növelheti a Ca^{2+} felvételt. Ha a $[Ca^{2+}]_{SR}$ csökken vagy az ECC hatékonysága romlik, ez a hatás a szív kontraktilitását fokozó kompenzációs mechanizmusként értelmezhető. Az áram markáns gátlása fokozott Ca^{2+} beáramlást, s így Ca^{2+} túltelődést okozhat, ami a Ca^{2+}-függő szignálmechanizmusok túlaktivációjához, fokozott aritmiahajlamhoz, K^+ csatorna downregulációhoz, abnormális remodelinghez és hipertrófiához vezet. Ugyanakkor az interakció kölcsönös, a Ca^{2+} ciklus fokozott aktiválása az I_{to1} leépülésével jár **[112]**. A gátlás további következménye, hogy az AP plató emelkedése befolyásolhatja a plató fázisban aktiválódó csatornák kapuzási kinetikáját és az ionokra ható mozgatóerőket; ezek a változások az AP alakján kívül a repolarizációs rezerv mértékét is változtathatják. Mivel az I_{to1} gátlás AP hatása nagyrészt indirekt, függ a többi feszültségfüggő ioncsatornát moduláló hatásoktól, a speciestől és a szövettípustól is **[113-116]**. Saját adataink szerint kutya epikardiális preparátumban az I_{to1} gátlása nyújtotta az AP-t, és ez a hatás fokozódott, ha a repolarizációs rezervet dofetilid kezeléssel jelentősen meggyengítettük **[117]**.

dc_1149_15

A többi repolarizáló K^+ áram Ca^{2+}-függése: Ellentétben az előzőekben tárgyalt K^+ áramokkal, a többi repolarizáló K^+ áram jóval gyengébb $Ca^{2+}{}_i$-függést mutat, amelynek mértéke, iránya és szerepe az irodalmi adatok tükrében sokszor bizonytalan. A késői egyenirányító K^+ áram gyors komponensének (I_{Kr}) nagyságát a $[Ca^{2+}]_i$ változásai alig befolyásolják, ugyanakkor az áram érzékeny a $[Ca^{2+}]_o$ változásaira. $[Ca^{2+}]_o$ emelkedés a csatornakomplex aktivációs görbéjének feszültségfüggését pozitív irányba tolja **[118]**. A késői egyenirányító K^+ áram lassú komponensének (I_{Ks}) feszültségfüggő kapuzása CaM-modulált **[59, 67-70]**. A CaM a csatornakomplex KCNQ1 egységéhez kötődik **[119, 120]**. Ugyancsak CaM szükséges a csatorna sejtfelszínre migrációjához és CaM közvetíti az I_{Ks} Ca^{2+}-függő modulációját is. Amennyiben ez az kapcsolat megszakad, az I_{Ks} inaktiválódik **[121]**. Tengerimalac **[122]** és nyúl **[123]** nodális sejtjeiben a CaM közreműködik a funny áram (I_f) Ca^{2+}-függő szabályozásában is.

2.2.4. A hiányzó/nem működő/talán mégis működő direkt kapcsolat – a szív alacsony konduktanciájú Ca^{2+}-aktivált kálium (SK) csatornái

Ca^{2+}-aktivált K^+ csatornák számos sejttípusban expresszálódnak, s mivel a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás és membránpotenciál között közvetlen kapcsolatot biztosítanak, kiemelkedő szerepük van simaizmokban és neuronokban is a K^+ konduktancia optimalizálásában. Szívizomsejtekben – meglepő módon – sem jelenlétük, sem fiziológiás aktivitásuk mértéke nem tisztázott. A korai vizsgálatokban soha nem találtak bizonyítékot SK csatornák jelenlétére a szívben **[124, 125]**. Újabb, molekuláris biológiai vizsgálatok szerint expressziójuk valószínűnek tűnik, de az expresszált csatornák *fiziológiás* aktivitásának igazolását célzó *funkcionális* tesztek ellentmondó eredményeket szolgáltattak. Az alacsony konduktanciájú Ca^{2+}-függő K^+ áram (I_{SK}) több közeli rokon csatorna ($K_{Ca}2.1$, KCa2.2, KCa2.3 és KCa3.1) áramának összege **[126-128]**. A BK csatornákkal ellentétben, melyeket a $[Ca^{2+}]_i$ és depolarizáció egyaránt aktivál, az SK csatornák feszültségváltozásra nem érzékenyek, és csak alacsony $[Ca^{2+}]_i$ (< 1 µM) esetén aktiválódnak. A csatornacsalád analóg szerkezetű többi tagját ($K_{Ca}4.1$, $K_{Ca}4.2$, $K_{Ca}5.1$) eredetileg szintén Ca^{2+}-aktiváltnak gondolták, de újabb vizsgálatok szerint csak a belső Na^+, Cl^-, és OH^- koncentrációkra érzékenyek, a $[Ca^{2+}]_i$ változásokra nem. A szív K_{Ca} csatornáinak megoszlásáról és főbb tulajdonságairól kevés, de ellentmondó információ érhető el. Az SK csatornák a $[Ca^{2+}]_i$ változását kalmodulinon (CaM) keresztül érzékelik. A CaM kötődik a C-terminális régió CaM-kötő doménjéhez (CaMBD) **[128-131]**. A CaM a csatorna kapuzásán kívül annak összeszerelésében és szarkolemmába mozgatásában is szerepet játszik **[132]**. Az SK csatornák pórusa négy CaM-kötő szekvenciát tartalmaz, melyek konstitutív módon négy CaM molekulát köthetnek. A pórus a négy Ca^{2+} ion $[Ca^{2+}]$i emelkedéssel indukált kötődését követően nyílik **[133]**.

Van? Nincs? Kísérleti eredmények: Vizsgálataink idején **(2008)** a szívizomsejtek SK csatornáiról elérhető adatok szinte kizárólag Chiamvimonvat laboratóriumából származtak. Ők a szívben molekuláris biológiai eszközökkel azonosítottak egy SK2 izoformot **[134]**, melynek eloszlása jelentős regionális különbségeket mutatott; ezek a csatornák elsősorban a pitvarban expresszálódtak. Szintén ők számoltak be egér pitvarból és kamrából izolált SK1/SK3 csatornaizoformok klónozásáról is **[132]**, egy későbbi munkájukban **[135]** pedig leírták, hogy az SK2 csatornák fizikailag nem kapcsolódnak az LTCC-khez, hanem egy citoszkeleton fehérjéhez, alfa-aktinin2-höz kötve kolokalizálódnak. Ugyancsak kimutatták SK csatornák expresszióját egér AV-nodális szövetben **[136]**. Adataik valószínűsítik mindhárom SK izoform expresszióját az egérszív minden régiójában. Elektrofiziológiai méréseket is végeztek, melyekben egér és humán szívizomsejtekben is igazolták az apamin-szenzitív (AS) Ca^{2+}-aktivált K^+ áram (I_{KS-AS}) aktivitását **[134]**. Egy későbbi munkájukban genetikailag módosított (SK2 null-mutáns vagy túlexpresszált) modellekben

dc_1149_15

AV-diszfunkciót mutató fenotípusokat kaptak. Az SK2 csatorna túlexpressziója az AV-csomó spontán akciós potenciáljainak rövidüléséhez és frekvenciájuk növekedéséhez, ablációja ezekkel ellentétes változásokhoz vezetett. Patch clamp mérésekben heterozigóta és homozigóta null-mutáns egerekből izolált pitvari szívizomsejtekben, elsősorban a repolarizáció késői fázisában, az AP drasztikus megnyúlását figyelték meg **[137]**.

A pitvarfibrilláció (AF) sikeresen indukálható volt a null-mutáns, de nem a vad típusú egerekben. Kamrafibrillációt (VF) egyik csoportban sem találtak. Következtetéseik szerint pitvarszövetben az I_{KS-AS} jóval nagyobb, mint kamraszövetben, és markánsan befolyásolja az AP repolarizációs profilját, ezért modulátorai képesek lehetnek a pitvari AP szelektív módosítására, ezért a pitvari SK csatornák AF betegekben új farmakológiai célpontot jelenthetnek a pitvari AP és kontrakció, illetve az AV átvezetés befolyásolása céljából. Mivel a KO egerekben lassult a repolarizáció, azt is megjósolták, hogy az SK csatornák gátlása rendellenes excitációt okoz és fokozza a pitvar aritmia-érzékenységét. Más szerzők adatai azonban ellentmondanak ennek az interpretációnak **[124]**. Tachycardia-indukált szívelégtelenség modellen a $[Ca^{2+}]_i$ és a membránpotenciál egyidejű meghatározásával végzett optikai mapping vizsgálatokból Chiamvimonvat és mts. arra következtettek, hogy a szívelégtelen sejtekben megfigyelt APD rövidülésért szintén az AS-SK csatornák felelősek **[138]**. 1 μM apamin alkalmazását követően a rekurrens spontán kamrafibrilláció (SVF) a HF csoportban megszűnt, az APD megnőtt, kontroll állatokban viszont az apamin kezelés nem befolyásolta az APD-t. Patch clamp mérésekkel azt is kimutatták, hogy szívelégtelen kamrai szívizomsejtekben az I_{KS-AS} denzitása megnő, a Ca^{2+} válaszgörbe balra tolódik, ami az áram fokozott Ca^{2+}-érzékenységét mutatja. Úgy vélték, hogy a csatorna upregulációja szívelégtelenségben az APD rövidüléséhez és rekurrens SVF kialakulásához vezethet.

A szív SK csatornáinak szerepére és jelentőségére vonatkozóan még ma is nehéz biztosat mondani. *Elméletileg* szerepük fontos lehet, mivel közvetlen kapcsolatot jelenthetnek az AP repolarizációja és a Ca^{2+} háztartás között. A mérési adatok alapján úgy tűnhet, hogy míg a neuronális K_{Ca} csatornák feladata az utóhiperpolarizáció kialakítása, a szívben az SK csatornák inkább a repolarizáció megerősítésében játszanak szerepet, különösen magas $[Ca^{2+}]_i$ esetén; végső soron ez a kapcsolat a szívfrekvencia aktivitás-indukált modulációját eredményezhetné. Vizsgálataink időpontjában **(2008)** az elérhető kísérleti adatok túlnyomó részben egyetlen laboratóriumból származtak, ezért mindenképpen indokoltnak tűnt ellenőrzésük, különösen mivel Chiamvimonvat és mts kísérleti adatai ellentmondtak a széles körben elfogadott repolarizációs rezerv hipotézisnek.

2.3. A szív Na^+/Ca^{2+} kicserélője (NCX1)

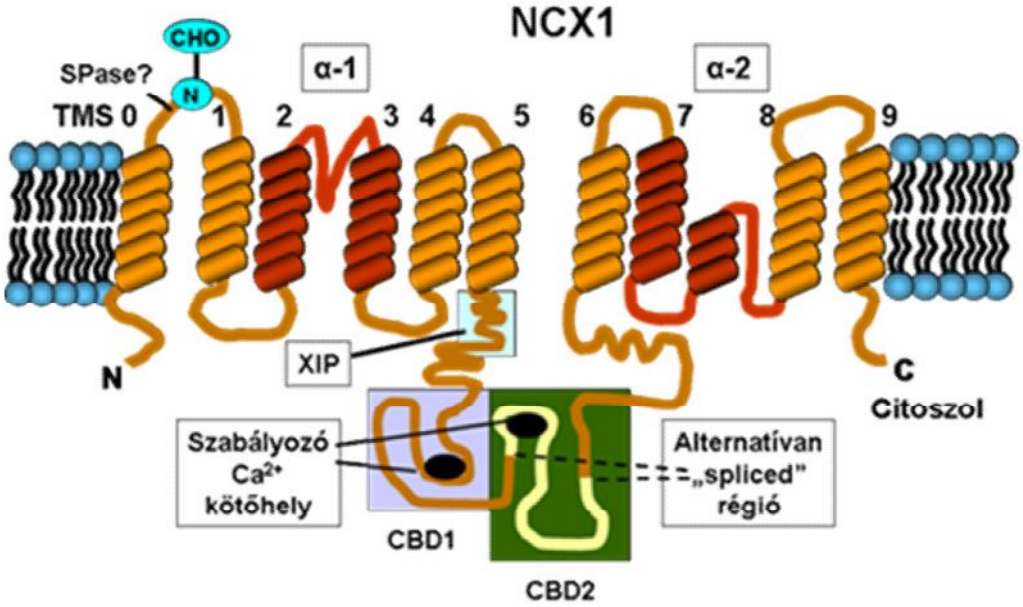
Ringer **[139]**, *valamint Daly és Clark* **[140]** *békaszíven végzett munkái igazolták, hogy a szív kontrakciós ereje a $[Ca^{2+}]_o$ emelkedésével és a $[Na^+]_o$ csökkenésével arányosan fokozódik, Von Wilbrandt és Koller* **[141]** *pedig arra következtettek, hogy a kontrakció nagyságát a külső ionkoncentrációk aránya határozza meg. A transzport háttérmechanizmusára felállított hipotézis* **[142]** *szerint a két ion verseng a membrántranszporter kötőhelyéért. A későbbi kísérletek* **[143]** *igazolták, hogy a szívben egy Na^+-függő Ca^{2+}-felvevő transzportmechanizmus működik.*

2.3.1. Az NCX1 molekuláris biológiája

Az emlősökben expresszált Na^+/Ca^{2+} kicserélő a sok elemből álló Ca^{2+}/CA szupercsalád tagja. Elsődleges feladata a transzmembrán Ca^{2+} fluxusok szabályozása. A Ca^{2+} transzport iránya reverzibilis, a pillanatnyi iongradiensek és az aktuális membránpotenciál függvénye. Ennek következtében, bár az NCX alapvető feladata a Ca^{2+} eltávolítása a sejtből (forward

dc_1149_15

transzport mód), adott körülmények között fordított irányú, Ca^{2+} akkumuláló aktivitása (reverz transzport mód) szignifikánsan hozzájárulhat a citoszol Ca^{2+} túltelődéséhez.
A Ca^{2+}/CA szupercsalád SLC 8 ága tartalmazza az emlősökban expresszálódó három NCX izoform variánst, melyeket egy-egy gén kódol. Az általánosan előforduló NCX1 izoform nagy mennyiségben expresszálódik a szívben, agyban és vesében, az NCX2 elsősorban az agyban, az NCX3 vázizomban és agyban. Poszt-transzkripciós szinten legalább 12 NCX1 és 3 NCX3 variáns ismert, az eltérések helye az intracelluláris elhelyezkedésű f-hurok „alternative splicing" régiója [144]. Az NCX1-et hat exon kódolja. Minden NCX variáns tartalmazza az A (szív, agy, vázizom) vagy **B** exont (vese, máj, tüdő, asztrociták), de sohasem mindkettőt [145, 146]. Az NCX1 sematikus szerkezete az 5. ábrán látható.



5. ábra Az NCX1 lineáris szerkezete [147]. Az aktív molekulában 9 TMS és két (α-1 és α-2) hurok található. Az intracelluláris elhelyezkedésű hidrofil f-hurok tartalmazza a fontosabb regulációs helyeket, illetve a két regulációs Ca^{2+}-kötőhelyet.

Kutya szívben a szignál peptid (TMS0) poszt-transzlációs eltávolítását követően a végleges protein 9 transzmembrán (TM) szegmenst alkot és 938 amino csoportból áll [148, 149]. Az N-terminális egység extracelluláris elhelyezkedésű, egy glikozilált régiót és egy hidrofób 5 transzmembrán (TM) szegmensből álló klasztert tartalmaz, melynek része a b-hurok és az NCX1 molekula két, 23 amino csoportból álló „α repeat" régiójának egyike (α-1). A konzervatív α repeat régiók szerkezete az összes NCX verzióban azonos [150]. A hidrofób C-terminális domén az NCX1 molekula intracelluláris elhelyezkedésű karboxil végén egy 4 TM szegmens, melynek része egy P-hurok jellegű domén, valamint a második „α repeat" (α -2). A membránban egymással szemben elhelyezkedő „α repeat"-ek középső része hurkot képez, amely az NCX funkcióhoz nélkülözhetetlen aminocsoportokat tartalmaz. A két hidrofób domén között egy intracelluláris, nagyrészt hidrofil, a teljes NCX protein több mint 50%-át kitevő, 550 amino csoportból álló hurok (f-loop) található [151]. Ez a régió felelős az NCX1 működés fiziológiás, transzdukciós mechanizmusok és intracelluláris messengerek (Ca^{2+}, Na^{+}, PIP_2, PKA, PKC, NO, ATP, foszfoarginin) általi szabályozásáért. Ugyancsak itt található több farmakológiai modulátor, antiaritmiás gyógyszer (amiodaron, bepridil) és amiloridszármazék kötőhelye. Az f-hurok N-terminális végén elhelyezkedő szekvencia neve XIP (e**X**changer **I**nhibitory **P**eptide) régió, mivel a homológ peptid bejuttatását követően az NCX aktivitás gátlódik [152, 153]. A Na+ és a foszfolipidek NCX szabályozó hatása is ehhez a területhez köthető. A XIP régiót egy α-kateninszerű domén,

dc_1149_15

majd két konzervatív „β-repeat” domén követi. Az f-hurok C-terminális végét hidrofób, magas prolintartalmú szekvencia képezi. Először TM egységként írták le, de citoplazmás elhelyezkedésű [151]. Az NCX izoformok 3D szerkezete még nem teljesen rekonstruált. Egy újabb, hipotetikus NCX1 modell szerint a két β-repeat az f-hurok belsejében egy-egy Ca^{2+} kötő doménhez tartozik (CBD1, CBD2), melyek immunoglobulin-szerű β-szendvics struktúrába épülnek be. A két CBD domén eltérően működik. A CBD1 magas affinitással köt négy Ca^{2+} iont, a Ca^{2+} kötést követően jelentős konformációváltozás jön létre [154]; ez felel a Ca^{2+} NCX1 regulátor hatásáért. Bár a CBD1 és CBD2 struktúrája analóg, utóbbi Ca^{2+} kötő affinitása alacsonyabb; a Ca^{2+} kötését követő konformációváltozás is jóval kisebb. A CBD2 létfontosságú strukturális része az „alternatív hasítási” régió. A szövetspecifikus hasítási sémák modulátor hatást fejtenek ki az NCX kinetikájára, amely vélhetően Ca^{2+}- és Na^{+}-függő aktivációjáért és inaktivációjáért is felelős. Egyes újabb eredmények szerint mindkét CBD struktúra kiemelkedő szerepet játszik az NCX Ca^{2+}-függő szabályozásában [154, 155]. A két CBD-t antiparallel szerkezetként modellezik, melyben a CBD1 Ca^{2+}-kötő helye a membránnal ellentétes irányba néz [156]. A két α-repeat régió, illetve a CBD-k között fennálló szekvenciális és szerkezeti hasonlóságok alapján feltételezhető, hogy az NCX molekula egy génduplikációs folyamat eredménye.

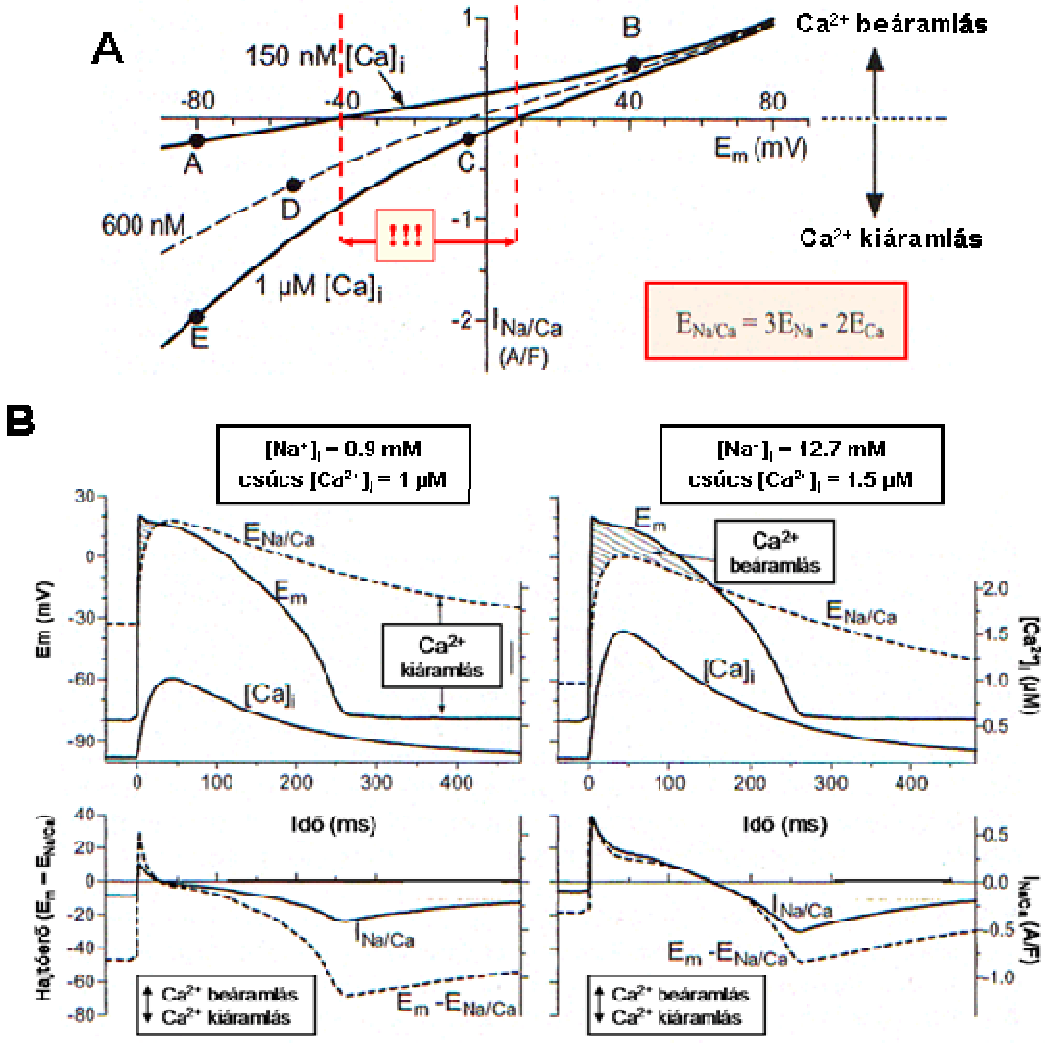
2.3.2. Az NCX fiziológiás működése és szabályozása

MEGJEGYZÉS! Mivel a jelen dolgozat alapjául szolgáló valamennyi vizsgálatunk az NCX1-re irányult, a továbbiakban NCX alatt minden esetben az NCX1 értendő.

Működés: Fiziológiás körülmények között a NCX működését az NKA által indukált Na^{+} gradiens vezérli. A transzportirány megfordulhat, a transzporter az NKA-hoz hasonlóan, szekvenciális ping-pong mechanizmussal működik [157, 158]. A fiziológiás szempontból jelentős forward és reverz módok esetén a transzport nem elektroneutrális. SL vezikulákon végzett mérések szerint az NCX fiziológiás körülmények között érvényes sztöchiometriája: 3 Na+ ↔ 1 Ca^{2+} cserearány [159], ezt sokan igazolták. Az NCX sztöchiometrikus számításokhoz szükséges reverzál potenciáljának meghatározása, a membránközeli Na^{+} és Ca^{2+} koncentrációk heterogenitása miatt rendkívül nehéz [160]. Változó sztöchiometriájú csereaktivitást is leírtak (3:1-től 5:1-ig) [161]. Mivel a transzmembrán Ca^{2+}/Na^{+} mozgás részletei nem ismertek, az ellentétek feloldásához további kísérleti munka szükséges. Az NCX képes magas transzportfluxust generálni (~ 30 pM/cm^2/s) [162, 163]. Szaturáló $[Ca^{2+}]_i$ esetén az I_{NCX} 250 pA értéket is elérhet [164], de fiziológiás körülmények között ennél egy nagyságrenddel kisebb. A megnőtt NCX áramnak különösen patológiás körülmények között van jelentősége, mivel ilyenkor az NCX expressziója ugyancsak fokozott lehet. A molekula citoszol felőli oldalán két regulációs és egyetlen transzport Ca^{2+} kötőhely, extracelluláris oldalán egyetlen transzport Ca^{2+} kötőhely található; két intracelluláris (egy-egy regulációs és transzport) és két extracelluláris, transzport Na^{+} kötőhellyel rendelkezik. Utóbbiak egyike egy kétvegyértékű vagy két egyvegyértékű, a másik egy egyvegyértékű kation kötésére képes. A Ca^{2+} és Na^{+} ionok versengnek az intra- és extracelluláris transzportkötőhelyekért. A kicserélő Ca^{2+} affinitása erősen aszimmetrikus: intracelluláris Ca^{2+}-ra több százszor magasabb, mint extracelluláris Ca^{2+}-ra (~ 0.5-5 μM vs. 0.1-1.5 mM). Kisebb az eltérés a Na^{+} affinitásokban (Na^{+}_i/Na^{+}_o: 10-30/50-80 mM) [162, 165]. A transzport Na^{+} kötőhelyek szelektívek, a transzport Ca^{2+} kötőhelyek kevésbé. A transzport feszültségfüggése a Na^{+} transzlokáció és/vagy kötés feszültségfüggésének következménye. Utóbbi a transzportsebesség limitáló tényezője [158, 165, 166]. A transzportált ionok az NCX-et intracelluláris oldaláról szabályozzák. Mivel az NCX a Ca^{2+} és Na^{+} ionokat ~ 3:1 arányban cseréli, transzportciklusonként ~ 1 nettó töltés/ciklus áramot generál; irányát a membránpotenciál (E_m) és az NCX ekvilibrium potenciáljának (E_{NCX}) aktuális viszonya

dc_1149_15

határozza meg (E_{NCX} = $3E_{Na}$ - $2E_{Ca}$), utóbbi a *lokális* transzmembrán Na^+ és Ca^{2+} gradiensek függvénye (6. ábra). Amikor E_m - E_{NCX} pozitív, Ca^{2+} lép be a sejtbe és kifelé irányuló áram jön létre, ha pedig negatív, a Ca^{2+} eltávolítása befelé irányuló áramot indukál [15]. Ezért a szívciklus alatt az I_{NCX} erősen függ az E_m változásaitól. Másrészt, az NCX aktivitás és az AP kinetikája közötti kapcsolat komplex, hiszen az I_{NCX} szintén befolyásolja az E_m értékét. A Ca^{2+} transzport irányától függően az I_{NCX} depolarizáló és repolarizáló hatást is kifejthet az AP-ra. Újabb adatok szerint a befelé irányuló I_{NCX} nemcsak az AP formájának kialakításában játszik szerepet, hanem kóros körülmények között az APD rövid távú variabilitásának fokozásával, annak aritmogén instabilitásához is jelentősen hozzájárulhat.



6. ábra Az NCX transzportaktivitásának irányát meghatározó tényezők nyúl kamrai szívizomsejt modellben: (**A**) A reverz potenciál pillanatnyi értéke markánsan függ a Ca^{2+}_i szinttől: 150 nM $[Ca^{2+}]_i$ mellett kb. - 40 mV, 1 µM-nál szignifikánsan magasabb, kb. + 10 mV; (**B**) A $[Na^+]_i$ emelkedése (pl. késői Na^+ áram miatt, vagy I/R során) szignifikánsan megnöveli a reverz NCX áram amplitúdóját és időtartamát (részletek a szövegben [15].

Az I_{NCX} fiziológiás AP alatti iránya még mindig nem tisztázott egyértelműen. Tengerimalacban az AP platója alatt az I_{NCX}-et kifelé irányulónak találták [167], patkány szívizomsejtekben a befelé irányuló I_{NCX} APD nyújtó hatásáról számoltak be [168]. Nyúl kamrai AP alatt végzett mérésekben az I_{NCX} nagyrészt befelé irányult [15, 169, 170], az irányváltás a depolarizáció után korábban (~ 32 ms) bekövetkezett, mint a klasszikus Luo-Rudy modell megjósolja (~ 100 ms) [171]. Az ellentmondó kísérleti adatokra alapozva több

dc_1149_15

matematikai modell megkísérelte az AP kinetikája és az ionáramok közötti kapcsolat matematikai analízisét. Egy korai modellben [172] kifelé irányuló I_{NCX} csak az AP kezdeti fázisában volt jelen, és az APD a $[Na^+]_i$ emelésével nőtt. Pufferelt $[Ca^{2+}]_i$ méréseken alapuló későbbi modellben a megnőtt I_{NCX} elsődleges hatása az APD nyújtása volt **[173]**. Tengerimalac kamrai szívizomsejtek Luo-Rudy modellje **[54, 171]** szerint a viszonylag magas $[Na^+]_i$ következtében a kifelé irányuló áram nagy és tartós. Egy XIP mérésekre alapozott modell szerint, amennyiben a $[Na^+]_i$ 5 mM alatti, az I_{NCX} befelé, amikor 10 mM feletti, kifelé irányul **[174]**. Egy nagyszámú, direkt és indirekt kísérleti adatra alapozott, komplex modell **[175, 176]** szerint, amennyiben a $[Na^+]_i$ a fiziológiás tartományba esik, az I_{NCX} az AP plató fázisában nagyrészt befelé irányul. A kutya kamrai szívizomsejtekre kidolgozott, az NCX és a RyR2 szoros kolokalizációját feltételező modellben **[177]** az I_{NCX} multi-inflexiós lefutású **[178]**. Az NCX elektrogén transzportaktivitása következtében az NCX áram – az AP depolarizációs fázisát megelőző SR-Ca^{2+} felszabadításon keresztül – a pacemaker sejtek depolarizációjához is hozzájárulhat **[179-184]**. Ez a hozzájárulás nem kizárólag az elektrogén transzport által jön létre, hanem tartalmazhat egy befelé irányuló Na^+ háttéráramot is **[185]**. A kísérleti adatok mindkét hipotézist igazolták **[186]**.

Szabályozás: Az NCX aktivitását nagyszámú extra- és intracelluláris faktor befolyásolja. Aktivátorai: $Ca^{2+}{}_i$, PIP_2, ATP, NO, extracelluláris egyvegyértékű ionok, szabad gyökök, PKC aktivátorok, valamint a proteolízisben és foszforilációban résztvevő számos faktor. Gátló hatásúak: $Na^+{}_i$, H^+, két- és háromértékű kationok, protein defoszforiláció és kis proteinek. Az NCX modulátorai: PKA, PKC, PP1 és PP2A (kalcineurin). Legfontosabb szabályozási mechanizmusai az $Na^+{}_i$-függő inaktiváció (**I1**) és $Ca^{2+}{}_i$-függő aktiváció (**I2**). A $Na^+{}_i$ szabályozási hely az f-hurok XIP régiójában, a Ca^{2+} szabályozási helyei (CBD1 és CBD2) a β-repeat szakaszokban találhatók. Minimális $[Ca^{2+}]_i$ nélkülözhetetlen mind a reverz, mind a $_{fwd}$NCX transzporthoz **[187-190]**. Hasonlóan, minimális $[Na^+]_i$ szükséges a $_{fwd}$NCX transzporthoz, de magas $[Na^+]_i$ esetén az I_{NCX} ~ 4 s időállandóval inaktiválódik. Ez a Na^+-függő inaktiváció magas $[Ca^{2+}]_i$ esetén nem jön létre. Magas $[Ca^{2+}]_i$ esetén a $Ca^{2+}{}_i$-függő aktiváció szükséges a befelé irányuló áram (Ca^{2+} eltávolítás) aktiválására. A magas affinitású regulációs pontok látszólagos Ca^{2+} affinitása intakt szívizomsejtekben 20 és 200 nM közé esik **[191, 192]**. Ez a regulációs hely Ca^{2+}-ra nem túl szelektív **[193, 194]**. Az f-hurok kimotripszines emésztése – az endogén $[Ca^{2+}]_i$ függés kiiktatásával – a kicserélő maximális aktiválódásához vezet.

Ezek a szabályozási mechanizmusok nagymértékben függnek az NCX molekula közelében fennálló, gyakorlatilag ismeretlen, lokális Ca^{2+} és Na^+ koncentrációktól. A maximális $[Ca^{2+}]_{sm}$ indirekt becslések alapján kapott értéke (~ 3.5 μM) a mért $[Ca^{2+}]_i$ értékeknél jóval nagyobb **[29]**. Ha ez valóban így van, az NCX szisztolé alatti legfontosabb szabályozó faktora nem az allosztérikus Ca^{2+}-függő aktiváció, hanem a transzlokációs helyek Ca^{2+} affinitása lenne; az allosztérikus szabályozás sokkal fontosabb lehet diasztolé alatt, amikor az NCX kevésbé aktív, ezáltal gátolva a Ca^{2+} túlzott kiürítését a sejtből. Hasonlóan, a Na^+-függő inaktiváció is csak jelentősen megemelkedett $[Na^+]_i$ (> 30 mM) mellett működhet. Bár a szívciklus során, fiziológiás körülmények között fennálló $[Na^+]_{sm}$ meghatározására irányuló erőfeszítések még nem jártak sikerrel, ez a mechanizmus vélhetően nem nyilvánul meg; az AP felszálló szára alatt a $Na^+{}_i$ emelkedés serkenti a $_{rev}$NCX transzportaktivitást. A Na^+-függő inaktiváció inkább egy biztonsági tartaléknak tekinthető, amely egyes kóros állapotokban (iszkémia), megakadályozza a sejt extrém mértékű Ca^{2+} túlterhelését.

A pH_i csökkenése erősen gátolja, emelkedése jelentősen serkenti az NCX aktivitást **[195]**. Viszonylag mérsékelt (0.4 egységnyi) pH_i csökkenés 90% NCX gátlást hoz létre. A gátlás α-kimotripszin érzékenysége arra mutat, hogy célpontja az f-hurkon található **[196]**. A gátló

dc_1149_15

hatás Na^+-függő, $[Na^+]_i$ emelkedésre fokozódik. Az ATP fontos, de nem nélkülözhetetlen NCX aktivátor [197], növeli a kicserélő $[Ca^{2+}]_i$ és $[Na^+]_o$ affinitását, és gátolja a Na^+-függő inaktivációt [198]. Elsődleges szerepe a PIP2 szintézis serkentése [199]. A PIP2, és más negatív töltésű foszfolipidek legfontosabb hatása a Na^+-függő inaktiváció gátlása a XIP régió és egy kevésbé ismert NCX régió autoinhibitoros kölcsönhatásának blokkolásával. A Ca^{2+} eltávolításra a $Ca^{2+}{}_i$ is mutat némi gátló hatást, mivel – vélhetően egy endogén, Ca^{2+}-függő foszfolipáz aktiválásával – magas $Ca^{2+}{}_i$ mellett az ATP hatása megfordul.

Több nemspecifikus regulációs proteinről ismert, hogy kötődik az NCX intracelluláris régióihoz, főleg az f-hurokhoz. Direkt kölcsönhatással, vagy a regulációs pontok foszforilációs állapotának módosításával valamennyi igazolt, esetleg javasolt szerepet játszik az NCX fiziológiás szabályozásában. A PKC szabályozó szerepére vonatkozó adatok nem egybehangzóak. Szívizomsejtekben Gq-proteineken keresztül aktiválhatja a kicserélőt [200, 201]. Az angiotenzin (AT-II) és endothelin (ET-1) serkentő hatása is PKC-mediált lehet, de mivel az NCX működéséhez nem szükséges a kicserélő foszforilációja, a PKC-függő moduláció szerepe vélhetően marginális [201]. A cAMP-PKA út hatására vonatkozó adatok ugyancsak ellentmondásosak. Egyes, a forskolin vagy izoproterenol NCX hatásait vizsgáló mérések találtak PKA-függő NCX aktivációt, mások nem. Újabb adatok szerint a PKA aktivációja nem befolyásolja az NCX működését [202].

A foszfolemmán (PLM) egyetlen transzmembrán doménből álló, 72 aminocsoportból álló foszfoprotein, amely a szívben nagy mennyiségben expresszálódik és igen fontos – a foszfolambán (PLB) SERCA2-t szabályozó működésével analóg – szerepet játszik az NKA szabályozásában [203, 204]. Az NCX hatékony endogén gátlószere, melyet a PKA egy (Ser68), a PKC két (Ser 68 és Ser 63) ponton foszforilálhat. Amíg azonban a NKA-t a defoszforilált, az NCX-et a Ser-68-on foszforilált PLM gátolja. A stimulálatlan állapotban részlegesen foszforilált PLM foszforilációja β-adrenerg stimuláció hatására fokozódik és ez az NCX aktivitás gátlásához, de az NKA aktiválásához vezet. A PLM túlexpressziója a szívkontrakció dinamikatartományának a downregulált NCX fenotípusára jellemző csökkenéséhez [205], downregulációja a dinamikatartomány túlzott NCX expresszió által kiváltott szélesedéséhez vezet [206]. Egyes adatok szerint egy másik kisméretű membrán foszfoprotein, a szorcin is képes az NCX aktivitás modulálására [207, 208].

Az NCX funkció olyan "lokális" faktoroktól is függ, mint az NCX molekula foszforilációs állapota, és szubcelluláris elhelyezkedése. A kísérleti adatok szerint az NCX foszforilációs állapotát egy makromolekula komplex szabályozza, amelyet fizikailag is összekapcsolódó regulációs és citoszkeleton proteinek alkotnak [209]: a PKA holoenzim, amely két PKA katalitikus alegységből és két azonos PKA regulációs alegységből áll, PP1, PP2A, PP2B, PKC, foszfolemmán, szerin-treonin protein foszfatáz és egy 14-3-3 protein ε izoformja. Mivel a 14-3-3 proteinek jó néhány jelátviteli út létfontosságú komponensei, regulációs kölcsönhatásuk az NCX molekulával igen valószínű. Néhány más protein (mAKAP, Ankiryn2, α-spektrin, kaveolin-3 annexin-5, stb.) is kapcsolódhat az NCX-hez. Ez a komplex struktúra és kölcsönhatás teszi lehetővé az NCX funkció precíz finomhangolását.

2.3.3. Az NCX farmakológiája

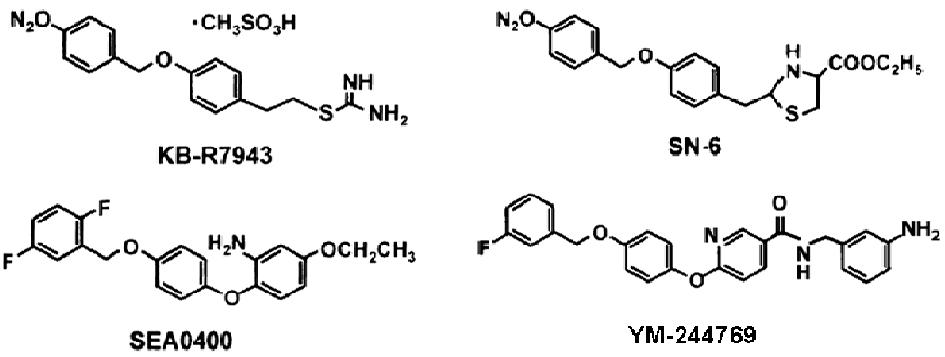
Ionok és antiaritmiás szerek: Egyes kétértékű (Co^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}, Cd^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}) és háromértékű (La^{3+}, Nd^{3+}, Tm^{3+}, Y^{3+}) kationok aspecifikusan gátolják az NCX-et [210, 211], közülük néhány transzportszubsztrát is lehet [212]. A gátlás részben direkt hatás, másrészt a Ca^{2+} ionok transzport kötőhelyeken történő helyettesítésének következménye. Leginkább a Ni^{2+} használatos (1-10 mM), bár gátló hatása feszültségfüggő és nem szelektív. Kissé jobb hatásfokkal gátolja a $_{rev}$NCX, mint a $_{fwd}$NCX transzportot. Egyes antiaritmiás hatóanyagok

dc_1149_15

(amiodaron, dronedaron, bepridil, aprindin, cibenzolin, azimilid-dihidroklorid) viszonylag gyenge szelektivitással gátolják az NCX áramot. Elvileg terápiás jelentőségük is lehet, mivel NCX gátló hatásuk integrálódik más proaritmiás áramok gátlásával. A III. osztályba tartozó amiodaron számos ionáramot gátol (I_{Na}, I_{CaL}, I_K, I_{K1}, I_{KACh}, I_{KNa}, I_{KATP}), az I_{NCX} gátló hatást jellemző IC_{50} értékei (3.6/3.3 μM, forward/reverz) a terápiás (0.1-10 μM) tartományba esnek. Krónikus alkalmazása nem befolyásolta az NCX mRNA szintet és az I_{NCX} nagyságát [213]. A IV osztályba sorolt bepridil is több ionáramot gátol (I_{Na}, I_{CaL}, I_{CaT}, I_{to}, I_K, I_{K1}, I_{KACh}, I_{Kna}, I_f) [214-219], és NCX gátló hatása is jelentős (IC_{50}: 8.1 μM; terápiás koncentrációja 0.5-5 μM). A szérumban albuminhoz is kötődik.

XIP és más peptidek: Megfelelő farmakológiai hatóanyagok hiányában egy 20 aminosav-csoportot tartalmazó peptidet az NCX f-loop autoinhibitor régiójának 219-238 szakasza alapján szintetizált XIP-et használták sikeresen az NCX működésének vizsgálatára [153, 220]. Ez a peptid az NCX Na+ regulátor kötőhelyéhez kapcsolódik és hatékonyan gátolja mindkét irányú transzportját (K_i = 0.1-1 μM). Mivel nem hatol át a sejtmembránon, *in vivo* nem használható, csak intracellulárisan, patch clamp mérésekben [221, 222]. Glikozilált formája arteria cerebralis okklúziós modellben intra-cerebroventrikuláris infúzióban adva markánsan növelte az infarktusos terület kiterjedését [223]. Néhány további peptid is kipróbálásra került: [224-227], de ezekre vonatkozó újabb adatok nem elérhetőek.

Benziloxifenil származékok: Az NCX gátlószerek farmakológiájában áttörést jelentett egy új molekula-csoport, a benziloxifenil származékok kifejlesztése (7. ábra).



7. ábra A leggyakrabban használt benziloxifenil származék NCX gátlók molekulaszerkezete.

A széles körben használt gátlószerek, különösen a „prototípus" KB-R7943 és a viszonylag legjobb szelektivitással rendelkező SEA0400 számos vizsgálatban került alkalmazásra.
A benziloxifenil gátlószereknek köszönhetően az NCX működésének és szabályozásának sok részletét sikerült tisztázni, továbbá jelentősen bővültek az NCX gátlás potenciális terápiás felhasználására vonatkozó ismereteink is. Ugyanakkor hangsúlyozni kell, hogy ezek a hatóanyagok *nem* szelektívek – ez a tény jelentősen megnehezítette a kísérleti eredmények értelmezését és bizonytalanná tette a következtetéseket. Ilyen értelemben a csoport újabb tagjai, az SN6 és YM-244769 sem tekinthetők lényeges előrelépésnek.

KB-R7943 (*2-2-4-4-nitrobenzil-oxifenil-etil-izotiourea-metán-szulfonát karbamidotiosav)* 1996-ban, bevezetésekor, a szelektívebb NCX gátlószerek prototípusa volt [228, 229], mivel más NCX gátlószereknél mérsékeltebb hatást gyakorol más iontranszporterekre (NHE, NKA, PMCA). Jóval hatékonyabban gátolja az NCX reverz irányú transzportját. Szívizomsejtekben ez az arány 20:1 (IC_{50}: 0.3/17 μM). NCX3 gátló hatása ~ 3x nagyobb, mint NCX1, vagy NCX2 gátló hatása. Bár sokszor szelektív NCX gátlóként hivatkoznak rá, jelentős, nemspecifikus hatása van néhány fontos ioncsatornára. Alacsony szelektivitása

dc_1149_15

ellenére sokáig referencia NCX gátlóként szerepelt (nem volt jobb), és előszeretettel alkalmazták az NCX sejtszintű fiziológiás/patológiás működésének tanulmányozására [230]. Nemrégiben igazolták, hogy gátolja a TRPC áramot [231] és a mitokondriális Ca^{2+} uniportert [232], ezáltal a tranziens permeabilitás pórus (PTP) Ca^{2+}-indukált aktiválódását.

SEA0400 (*2-4-2,5-difluorobenziloxi-fenoxi-5-etiloxi anilin*) hatékonyabb és szelektívebb, mint a KB-R7943 (pl. tengerimalac kamrasejteken 6.5 - 14.3x hatékonyabb, mint a KB-R7943 – a kifelé irányuló NCX áramra IC_{50}: 32-40/263-457 nM) [233, 234], továbbá 1 µM alatti koncentrációban a többi ioncsatornán/-transzporteren nincs mérhető hatása. 1 µM SEA0400 az I_{NCX}, I_{Na}, $I_{Ca,L}$, I_K, és I_{K1} áramokat > 80, 4, 9, 4, és 2%-kal, a közel azonos NCX gátló hatású 10 µM KB-R7943 > 80, 54, 55, 94 és 73%-kal csökkentette [233, 235]. Kutya kamrasejtekben a SEA0400 és a KB-R7943 a befelé/kifelé irányuló NCX áramot 111 ± 43/108±18 nM, illetve 3.35 ± 0.82/74.74±0.69 µM EC_{50}-nel, a Ca^{2+} áramot közel azonos, 3.6/3.2 µM EC_{50}-nel gátolták [236]. Unidirekcionális NCX áramon a SEA0400 gátlási hatékonysága, a KB-R7943-hez hasonlóan, erősen $[Na^+]_i$-függő.

SN-6 (*2-4-4-nitrofenil-metoxi-fenil-metil-4-tiazolidinkarboxilsav-etilészter*), a KB-R7943-ből kifejlesztett inhibitor [237, 238], ahhoz hasonlóan hatékonyabban gátolja a kifelé irányuló unidirekcionális I_{NCX}-et. Tengerimalac kamrasejteken a bidirekcionális NCX áram kifelé/befelé irányuló komponensére IC_{50}: 2.3/1.9 µM. A KB-R7943-hoz hasonlóan gátolja a I_{Na}, $I_{Ca,L}$, I_{Kr}, I_{Ks} és I_{K1} áramokat (13, 34, 33, 18, 13%). Az APD-t jelentősen rövidíti (az APD_{50}-et 34, az APD_{90}-et 25%-kal). Gátló hatása tripszinre nem érzékeny.

YM-244769 (*N-3-aminobenzil-6-4-3-fluorobenzil-oxi-fenoxi-nikotinamid*), csökkentett toxicitású, *orálisan is alkalmazható,* potens,NCX gátlószer [239]. Izolált tengerimalac kamrasejtekben a bidirekcionális NCX áram kifelé/befelé irányuló komponensére IC_{50}: 0.12/0.1 µM. Az unidirekcionális kifelé/befelé irányuló NCX áramra IC_{50}: 0.05/10 µM). Tripszin-inszenzitív és az NCX3-at gátolja a legjobb hatásfokkal (IC_{50} = 18 nM) [240].

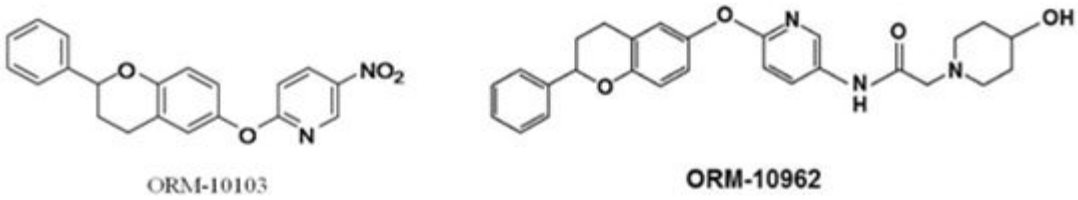
Izoform szelektivitás, hatásmechanizmus: A csoport minden tagja eltérő NCX izoform szelektivitást mutat, amit klinikai próbák tervezésénél figyelembe kell venni: a KB-R7943 hatékonyabb az NCX3, mint NCX1 és NCX2 esetében [212]. A SEA0400 legjobban az NCX1-et gátolja, az NCX2-t kevésbé, az NCX3-ra alig hat [241]. Az SN-6 az NCX1-en [237], az YM-244769 az NCX3-on [240] a leghatékonyabb Mutációs tanulmányok és elektrofiziológiai mérések magyarázatot nyújtottak a benziloxifenil származékok szokatlan szelektivitására [237, 241, 242]. Igazolták, hogy intakt sejteken a KB-R7943 és a SEA0400 is a külső oldalról, az α-2 repeat régiójában gátolják a kicserélőt. Ezenfelül gátlási hatékonyságuk függ az **I1** (Na^+-függő) inaktiváció mértékétől, ami valószínűsíti, hogy a gátlás Na^+-függő, inaktív állapotban alakul ki [243]. Ezért a benziloxifenil származékok kevésbé hatásosak fiziológiás (alacsony) $[Na^+]_i$ mellett; hatékonyságuk jelentősen megnő magas $[Na^+]_i$-val jellemezhető kóros körülmények között. Ez igen kedvező farmakológiai profil lehet például a $[Na^+]_i$ túlterheléssel járó iszkémia/reperfúziós károsodások esetén.

Újabb, szelektívebb gátlószerek (ORM anyagok). A benziloxifenil származékok tartósan uralták az NCX-re vonatkozó farmakológiai vizsgálatokat. A közelmúltban elérhetővé vált az Orion (Espoo, Finland) néhány, a SEA0400-nál jobb szelektivitással rendelkező anyaga. Ezek egyikét (ORM-10103) több vonatkozó kísérletsorozatunkban is használtuk, az újabb, még szelektívebb ORM-10962-vel kapcsolatos vizsgálatok jelenleg folynak (8. ábra).

ORM-10103 [*5-nitro-2-(2-fenilkroman-6-iloxi)piridin*]. Kutya kamrai szívizomsejtekben az NCX áramot viszonylag alacsony koncentrációban gátolta (EC_{50} ~ 780–960 nM) [244], ugyanakkor a patch clamp módszerrel mért I_{Ca} amplitudóját, illetve a I_{Na} nagyságát karakterizáló, konvencionális mikroelektród módszerrel mért dV/dt_{max} értéket még magas,

dc_1149_15

10 µM koncentrációban sem befolyásolta Nem befolyásolta szignifikánsan az I_{to}, I_{K1} és I_{Ks} nagyságát sem, viszont jelenlétében az I_{Kr} kismértékű, de szignifikáns csökkenést mutatott.



8. ábra A szelektív NCX gátló ORM-10103 (**A**) és ORM-10962 (**B**) molekulaszerkezete.

ORM-10962 [2-(4-hidroxipiperidin-1-il)-N-(6-((2-fenilkroman-6-il)oxi)piridin-3-il)-acetamid]. Kutya kamrai szívizomsejtekben az NCX áramot az ORM-10103-nál alacsonyabb koncentrációban gátolta (EC_{50}: 54/68 nM a forward/reverz transzportra), és még magas (1 µM) koncentrációban sem befolyásolta más transzmembrán ionáramok és pumpák (I_{Na}, I_{Ca}, NKA, I_{Kr}, I_{Ks}, I_{to} és I_{K1}) aktivitását. 0.5-1 µM ORM-10962 hatására az AP némi változást mutatott: szubepikardiális szívizomsejtekben és szívszövetben a repolarizáció időtartama megnőtt, viszont szubendokardiális sejtekben rövidült. M sejtekben és intakt Purkinje rostokban konzisztens AP változás nem jött létre. Érdekes módon 100 nM dofetiliddel kezelt, csökkent repolarizációs rezervvel rendelkező kamrai preparátumokban a gátlás nem okozott mérhető változást a repolarizációban (Jost N. és mts. publikáció alatt). *In vivo* regionális I/R modellben az ORM-10962 nem mutatott protektív hatást, strophantidin indukált aritmiák ellen viszont hatásosnak bizonyult (Leprán I. személyes információ).

Hiányzó NCX aktivátorok – szükségesek? Bár több szívbetegségben a kóros Ca^{2+} homeosztázist az NCX aktivitás fokozódása jellemzi, vannak kóros állapotok, amelyekben az NCX *aktiválása* segíthetne a módosult Ca^{2+}_i és Na^{+}_i szintek helyreállításában. Elméletileg, ezekben az állapotokban a $_{fwd}I_{NCX}$ serkentése csökkenthetné a Ca^{2+} túlterhelést és gyorsíthatná a normál Ca^{2+}_i szint helyreállását. Az aktiválás jótékony hatású lehet szív **[245]** és agyi **[223]** iszkémia esetén is, ezért a szelektív aktivátorok jelentős potenciális terápiás értékkel rendelkeznének. Szelektív NCX aktivátor azonban nem érhető el.

Néhány anyagról ismert, hogy aktiválja az NCX egyik, vagy mindkét transzportmódját.
A Li^+ NCX1 aktiváló hatása kisebb, mint NCX2/NCX3 aktiváló hatása. A aktiválás célpontja az α-2 repeat lehet **[212, 246]**. Többen igazolták, hogy az NCX redox ágensekre is érzékeny **[247-249]**. Ez fontos lehet oxidatív stressz során, mivel a fokozott ROS aktivitás módosíthatja a transzport sebességét. Néhány szerves NCX aktivátort is azonosítottak. G-protein csatolt receptoragonisták ($5HT_{2c}$, ET-1, hisztamin, AT-II) PKA-/PKC-dependens utakon serkentik az NCX-et **[201, 250-254]**. Több peptidről (konkanavalin-A, inzulin) is kimutatták, hogy aktiválja az NCX-et **[255, 256]**. Laboratóriumunkban a közelmúltban kezdtük el egy új, ígéretes NCX aktivátor (ORM-10792) vizsgálatát. Ha beváltja a hozzá fűzött reményeket ez lehet az első, experimentálisan használható szelektív NCX aktivátor.

2.4. A szív $Na^{+/}H^+$ kicserélője (NHE)

2.4.1. Az NHE szerepe a pH_i és Na^{+}_i szabályozásában és a sejtműködésben

A Na^+/H^+ kicserélő (NHE) a transzmembrán Na^+ gradiens energiáját használva egy intracelluláris H^+-t cserél egy extracelluláris Na^+-ra, ezáltal kritikus szerepet játszik az intracelluláris sav-bázis egyensúly, és az elektrolit és térfogat homeosztázis fenntartásában.

dc_1149_15

Molekuláris tulajdonságai jól ismertek [257-260]. Elsődleges feladata az intracelluláris pH beállítása/szabályozása [261]; a fölös protonok eltávolításával védi a sejtet az acidózistól. Fiziológiás pH_i mellett aktivitása alacsony, de már mérsékelt pH_i csökkenés is markánsan fokozza a protoneltávolítást, ez nagymértékű Na^+_i akkumulációval és a $_{rev}I_{NCX}$ aktiválódása következtében Ca^{2+}_i túltelődéssel járhat. Hipoxiában vagy acidózis során sokszorosan hatékonyabb, mint a pH_i reguláció más transzporterei. A Na^+ felvétel modulációjával részt vesz a transzmembrán Na^+ fluxusok, illetve a sejtvolumen szabályozásban. *Szimpatikus idegvégződésekben* aktivációja a noradrenalin fokozott felszabadulását és csökkent visszavételét okozza, ami fokozza a szív aritmiakészségét [262]. Fontos szerepet játszik a nekrotikus és apoptotikus szövetkárosodások kialakulásában, illetve az aritmia-hajlam fokozódásában, MI alatt/után és krónikus szívelégtelenségben. Emlős szívben elsősorban első izoformja (NHE1) expresszálódik (a következőkben *NHE* alatt mindig az *NHE1-et* értem). Főleg a membrán mikrodoménekben található, ahol szabályozza a pH-érzékeny proteinek aktivitását. T-tubulusokban – a RyR és NCX közvetlen közelében elhelyezkedve – modulálja az ECC-t; az interkaláris lemezeknél, a konnexin 43 szomszédságában elhelyezkedő NHE pedig segíti a sejt-sejt csatolást. Az NHE jelen van a kaveolákban és az adenil-ciklázon keresztül hat a cAMP-szintézisre. Részt vesz a citoszkeleton kialakításában és a plazmamembránban a regulációs fehérjék és szignálproteinek felépítésében [263]. Normál aktivitása szükséges a fiziológiás sejtnövekedéshez/-proliferációhoz. Mérsékelten fokozott aktivitása hosszabb távon (benignus) szívhipertrófiát okoz (sportszív) [264, 265]. Hangsúlyozni kell, hogy míg az NHE1 *akut (tranziens)* aktiválódása kardioprotektív hatású, mivel segíti a szívizomsejtek integritásának fenntartását, *tartósan fokozott (krónikus) aktivációja/expressziója* súlyos szívizom-károsodáshoz, markáns strukturális remodelinghez (malignus szívhipertrófia), fokozott aritmia-hajlamhoz, és a pumpafunkció zavarához vezethet. Az NCX elektrogén, az NHE elektroneutrális; mivel működésük szorosan csatolt, szívizomsejtekben az NCX szimultán aktiválódása miatt a fokozott proton eltávolítás depolarizáló áramot indukál (tranziens inward áram, I_{ti}). Az NCX kétirányú transzportaktivitásával szemben az NHE Na^+ transzportja mindig befelé irányul.

2.4.2. Az NHE fiziológiás szabályozása és gátlószerei

Szívizomsejtekben az NHE aktivitást több mechanizmus szabályozza [266]. Legfontosabb stimulusa az intracelluláris acidózis. Fiziológiás körülmények (oxidatív metabolizmus) között aktivitása minimális, de a pH_i csökkenés gyorsan aktiválja [260]. A meredek pH_i függés vélhetően az NHE allosztérikus regulációjának köszönhető, egy extra protonkötő helyen keresztül. Izolált szívizomsejtekben krónikus acidózis hatására mind expresszió ja, mind aktivitása fokozódik. Izolált perfundált szívben és LAD lekötött patkányokban az iszkémiás inzultus növeli az NHE mRNA szintet [267]. Az NHE aktivitását hormonok, növekedési faktorok is befolyásolják; acidózis, illetve tartós hipoxia vagy iszkémia által aktivált celluláris szignál proteinkinázok foszforilációs-defoszforilációs mechanizmussal modulálják. Foszforilációját követően az aktivációs pH érték eltolódása miatt a kicserélő magasabb pH értékeknél aktíválódik. AT II-indukált akiválódását p38 MAPK általi foszforilációja, az ERK szignálút gátlásával gátolja; ugyanez a kináz, az előbbitől független, apoptotikus úton, celluláris alkalózist indukálva, stimulálhatja is a kicserélőt.

A PKC és PKD valószínűleg csak indirekt módon befolyásolja az NHE aktivitását. PP1 és PP2A defoszforilációval gátolja a kicserélőt, a kalmodulin blokkolja autoinhibitor régióját . Ismert még néhány regulációs faktor: szénsav-anhidráz II, PIP2, HSP70 és CHP (kalcineurin homológ protein), de szerepük nem tisztázott. Az NHE expressziója transzkripciós szinten is szabályozott [268]. Míg a klinikumban is kipróbálható NCX gátló máig elérhetetlen, az NHE számos, akár humán vizsgálati célra is alkalmas gátlószerrel

dc_1149_15

rendelkezik. A klasszikus NHE inhibitor *amilorid* ugyan nem szelektív, mégis gyakran szerepelt klinikai tesztekben is [269]. Ugyancsak sok kísérleti és klinikai adat található a szelektívebb cariporidra/eniporidra vonatkozóan [270]. A számos (> 100) jelenleg elérhető NHE gátlószer közül az EIPA, HMA, DMA, HOE694 és BIX is gyakran szerepel kísérleti protokollokban; humán alkalmazásukkal kapcsolatban nincsenek megbízható eredmények.

2.5. NCX gátlás következményei egészséges miokardiumban

A korai, egészséges vagy beteg szíveken végzett, az NCX szerepére irányuló vizsgálatok során sok „NCX gátló" hatóanyagot alkalmaztak, de az adatok – mivel az alkalmazott hatóanyagok gyenge szelektivitása következtében a megfigyelt változásokban az NCX gátlás tényleges szerepe mindig bizonytalan volt – elvileg megbízhatatlanok. A javított szelektivitású benziloxifenil származék gátlószerek elérhetőségével a mérési adatok megbízhatósága javult, de az eredmények sokszor még így sem egyértelműek, elsősorban az I_{NCX} és $I_{Ca,L}$ egyidejű gátlása miatt. Bár a legtöbb KB-R7943-re alapozott munka szelektív (sőt, szelektív reverz) I_{NCX} gátlóról beszél, ez egyértelműen inkorrekt. Ezért fokozott óvatosság ajánlott a SEA0400, és még inkább a KB-R7943 adatok vonatkozásában. Ez különösen indokolt kísérletes szívbetegség modellek eredményeinek értékelésénél.

2.5.1. Akut, részleges NCX gátlás hatása egészséges szívre

Az AP kinetikája és az I_{NCX} közötti többszintű kapcsolat, az NCX elektrogén jellege, valamint $[Na^+]$ és $[Ca^{2+}]$ függése, szinte megjósolhatatlanná teszi az NCX gátlás hatását az AP alakjára és időtartamára. Az egyes ion (Ca^{2+}, Na^+, K^+ és H^+) transzporterek között a szubmembrán tér „restricted" kompartmentjében fennálló kölcsönhatások következtében az NCX bármilyen mértékű farmakológiai modulációja óhatatlanul a többi transzporter aktivitását is szignifikánsan módosít(hat)ja. A kicserélő blokádja következtében az ionhomeosztázisban végbemenő változások megbízható becsléséhez a jelenleginél sokkal mélyebben kellene értenünk ezt a komplex, sokszereplős kooperációt, továbbá a jelenleginél jóval több, részletesebb és főleg megbízhatóbb, a lokális ionkoncentrációkra és azok heterogén eloszlására vonatkozó kísérleti adatra lenne szükségünk.

Az akut NCX gátlás **akciós potenciálra** gyakorolt hatásaival kapcsolatos kísérleti adatok mennyisége kevés, az eredmények ellentmondásosak. Az NCX gátlást követően általában AP rövidülést tapasztaltak (lásd [271]). Kutya kamrasejtekben az $[Na^+]_i$ növelésével az AP időtartama az NCX áram reverz pontjának eltolódásával korrelálva csökkent, a gátló XIP alkalmazását követően, az aktuális $[Na^+]_i$-tól függően, APD rövidülés és megnyúlás is kialakult [174]. 5 mM $[Na^+]_i$ mellett az I_{NCX} depolarizáló, APD nyújtó hatású, ezért potenciálisan aritmogén; 10 mM $[Na^+]_i$ esetén a plató alatti nettó outward I_{NCX} repolarizáció gyorsító, APD rövidítő hatású. Az eredmények egyrészt bizonyították az NCX fontos szerepét az AP alakjának formálásában, másrészt leírták *szelektív* gátlásának várható következményeit is. A kevésbé szelektív KB-R7943 az AP késői plató fázisát nyújtotta; az APD_{50} rövidült, az APD_{90} megnőtt [272], viszont egy másik vizsgálatban a KB-R7943 sem nodális, sem kamrai szívszövetben nem okozott markáns elektrofiziológiai változásokat [273]. Ennek megfelelően KB-R7943 hatására az EKG regisztrátumokban sem alakult ki értékelhető változás [274]. A KB-R7943-nál jóval szelektívebb SEA0400 alkalmazását követően a KB-R7943 indukált, ellentétes irányú, APD_{50}/APD_{90} változások nem jöttek létre [272]. Saját korábbi, kutya kamrai szívizomsejteken végzett vizsgálatunk is hasonló eredményekhez vezetett: az AP morfológiájában 1µM SEA0400 nem okozott értékelhető változást [275]. Kutyában intravénásan alkalmazott SEA0400 hatására a QRS időtartam megnőtt, viszont a többi EKG paraméter nem változott [276]. Egy I/R protokoll során 1 µM SEA0400 kezelés nem módosította az AP alakját iszkémia előtt (alatta sem), viszont szignifikánsan meggyorsította helyreállását a reperfúzió után [277].

dc_1149_15

Az NCX gátlás hatása a szív **kontraktilitására** szintén nem egyértelmű, de az előzetes jóslatokkal szemben nagymértékű pozitív inotróp hatást senki sem talált. Ilyet KB-R7943 alkalmazását követően sem figyeltek meg **[272, 278, 279]**, sőt, a kontrakciós erő mérsékelten csökkent **[280-282]**. *Patkányban* 5 µM KB-R7943 nem módosította sem a steady-state kontrakciók, sem a $Ca^{2+}{}_i$ tranziens paramétereit, a $[Ca^{2+}]_{SR}$ és a „post-rest" érzékenyítés mértéke sem változott, ugyanakkor *tengerimalacban* ezek a paraméterek szignifikánsan csökkentek **[272]**. *Saját vizsgálataink* során **[283]** a SEA0400 izolált patkányszívben a szisztolés nyomást növelte, ugyanakkor a nyúlszív kontraktilitását nem befolyásolta. *Egy másik vizsgálatunkban* **[284]** 0.3 vagy 1 µM SEA0400 nem hozott létre szignifikáns változást sem a szisztolés/diasztolés bal kamrai nyomásokban, sem a CaT-ben. Nem befolyásolta a maximális nyomás eléréséhez szükséges időt, sem a $[Ca^{2+}]_i$ nagyságát, viszont mindkét koncentrációban szignifikánsan növelte a CaT lecsengési időállandóját.
A gátlás szelektivitását, transzportirány-függését és hatékonyságát is vizsgálták sertésből és egérből izolált szívizomsejteken, pufferelt és nem pufferelt $Ca^{2+}{}_i$ mellett is **[285]**. A SEA0400 effektíven gátolta az NCX forward transzportaktivitását, növelte az SR Ca^{2+} tartalmát és fokozta a sejtrövidülést. Szemben azokkal az adatokkal, melyek szerint a benziloxifenil származék NCX gátlók a reverz transzportirányra viszonylag szelektívek, a SEA0400 ebben a vizsgálatban közel azonos hatékonyságot mutatott a transzportirányokra, ha a Na^+ és Ca^{2+} gradiensek a normál tartományba estek. Kisebb mértékű $Ca^{2+}{}_i$ pufferelés esetében, ahogyan az várható volt, a blokád tartósabbnak bizonyult.

2.5.2. Az NCX expresszió módosításainak tanulságai

Patkányban a szívizomsejtek antiszensz kezelése 6 nap után az NCX 66%-ának eltűnésével járt **[205]**, a kontraktilis aktivitás mégsem változott. Hasonló patkánymodellben az NCX expressziójának 3-szorosára növelése sem befolyásolta az összehúzódás nagyságát **[206]**. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy fiziológiás $[Ca^{2+}]_o$ mellett az NCX modulációja minimális hatással van a kontrakció nagyságára. Az NCX gén célzott KO-ja következtében NCX hiányos ($NCX^{-/-}$) patkányembriók az intrauterin fejlődés 9-10-ik napján elpusztultak. Ugyanakkor, amikor az NCX globális KO-ja letálisnak bizonyult **[286-288]**, a nemrégiben kifejlesztett, szívspecifikus egér NCX-KO modell totálisan eltérő következményekhez vezetett **[289, 290]**. Bár ezekben az egerekben a szívizomsejteknek mindössze 10-20% expresszált NCX-et, az állatok problémamentesen felnőttek, és a dramatikusan (80%-kal) csökkent Ca^{2+} eltávolítás ellenére csak minimális kardiális diszfunkciót mutattak. További meglepetésre a Ca^{2+} háztartás fehérjéinek (SERCA2, PMCA, DHPR, RyR) expressziója sem mutatott nagy eltérést a kontroll állatokhoz képest. A KO állatok szívizomsejtjeiben az I_{Ca} 50%-kal alacsonyabb volt, mint vad-típusú testvéreikben, de a DHPR expressziója nem változott. Lényeges eltérés kizárólag az AP hosszában mutatkozott: a KO állatokban az APD lényegesen rövidebb volt; a felgyorsult repolarizáció és megrövidült plató fázis következtében a Ca^{2+} beáramlás drasztikusan, közel 80%-kal csökkent, pontosan annyival, amennyivel a Ca^{2+} eltávolítás. Homozigóta NCX túlexpresszált egerekben az NCX fehérje expressziója háromszorosára nőtt **[291]**. A KO egerekhez hasonlóan a megváltozott NCX aktivitást ezekben az állatokban is az I_{Ca} denzitás arányos növekedése kompenzálta.

2.6. A $Ca^{2+}{}_i$ háztartás zavarainak szerepe a ritmuszavarok kialakulásában

A szívritmuszavarok legfontosabb mechanizmusai: 1) fokozott automácia, 2) triggerelt aktivitás 3) „reentry" mechanizmusok és 4) ezek kombinációi. Fokozott automácia jöhet létre a nodális szövetek (SA és AV csomó), vagy Purkinje rostok elektrofiziológiai paramétereinek a megváltozott körülmények (pl. jelentősen fokozott szimpatikus tónus, iszkémia/reperfúzió, szívhipertrófia, pitvari vagy kamrai remodeling) által indukált eltolódása következtében. A triggerelt aritmiák háttere

dc_1149_15

rendkívül összetett (ioncsatornák, pumpák, kicserélők kóros működése) ami korai vagy késői utódepolarizációban (EAD, DAD) nyilvánul meg. Kialakulásukban igen nagy szerepet játszanak a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás lokális/fokális perturbációi. A reentry mechanizmusok elsődleges okai az abnormális impulzusvezetés, a refrakter fázis időtartamának random változása, illetve mindkettő kombinációja. Az aritmiák fenntartásában számos külső és belső tényező – közöttük ioncsatornák és -transzporterek – kritikus szerepet játszhat. Egyes aritmia típusok kialakulásában kiemelkedő szerepet játszik a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás perturbációja **[292-297]**. *Pl. a Ca^{2+} túlterhelés-indukált triggerelt aritmiák közvetlen, oki kapcsolatban állnak a Ca^{2+} egyensúly felbomlásával* **[298-301]**, *a kóros NCX aktivitással. A pitvar-/kamrafibrillációra jellemző aritmogén szubsztrát kialakulásához vezető strukturális/elektromos remodelinget a $Ca^{2+}{}_i$ túltelődés aktiválja, azaz kialakulásában a szignál-mechanizmust képezi, de fenntartásában vélhetően alig van* szerepe **[302-304]**. *Ebben a fejezetben a triggerelt aktivitás és az SL két kicserélőjének (NCX, NHE) túlműködése közötti oki kapcsolatra fókuszálunk, de röviden összefoglaljuk a többi szívritmuszavar-típus celluláris hátterét is.*

2.6.1. A szív $Ca^{2+}{}_i$-függő és $Ca^{2+}{}_i$-facilitált aritmogenezise

A $Ca^{2+}{}_i$ háztartás aritmogén perturbációi: *Sejt szinten* Ca^{2+}-függő aritmiák leggyakrabban abnormális membránpotenciál-változásokban (korai és késői utópotenciál, EAD, DAD) nyilvánulnak meg és a drasztikusan megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ ($Ca^{2+}{}_i$ overload) következtében alakulnak ki **[305, 306]**. A torz AP morfológia abnormális ECC-t és szignifikánsan csökkent kontrakciós erőt eredményez. *Szerv szinten* a Ca^{2+}-függő aritmogenezis legjobban az AP kialakulásában és szabálytalan terjedésében megnyilvánuló mikro-/makroheterogenitások kialakulásával magyarázható **[307]**. A Ca^{2+}-függő aritmogén állapotok közös ismérve, hogy az egyetlen szívizomsejtben kialakuló, abnormálisan magas $[Ca^{2+}]_i$ a szomszédos sejtekre átterjedve, nemcsak indirekt módon, membrán depolarizációval, hanem direkt módon, a sejtek réskapcsolatain keresztül, diffúzió által másodlagos Ca^{2+} felszabadulást indukálva is generalizálódhat **[308]**. Az $Ca^{2+}{}_i$ túlterhelés több aritmia típus indukciós mechanizmusa, amelyet a transzmembrán Ca^{2+} mozgások tartós, fokozott Ca^{2+} beáramláshoz vagy csökkent Ca^{2+} kiáramláshoz vezető aránytalanságai hoznak létre. Fokozott Ca^{2+} beáramlást okozhat az LTCC-k nyitvatartási valószínűségének növekedése és a megemelkedett $[Ca^{2+}]_o$. Csökkent Ca^{2+} kiáramláshoz vezethet a Na_V csatornák fokozott szivárgása, a NKA csökkent aktivitása, vagy az acidózis következtében kialakuló, fokozott Na^+/H^+ csere által generált $[Na^+]_i$ emelkedés. Mérsékelt, vagy tranziens $Ca^{2+}{}_i$ emelkedés – a hatékony intracelluláris puffer rendszerek működése miatt – csak jelentéktelen $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedést hozhat létre, viszont a Ca^{2+} fluxusok tartós kiegyensúlyozatlansága nagymértékű $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéshez, és ami ennél is veszélyesebb, a $[Ca^{2+}]_{SR}$ drasztikus növekedéséhez vezethet. Utóbbi következtében a spontán, sztohasztikus Ca^{2+} felszabadulások (sparkok) fiziológiás körülmények között alacsony kialakulási valószínűsége meredeken emelkedik **[309]**. Kórosan magas $[Ca^{2+}]_{SR}$ esetén a sparkok gyakorisága ugrásszerűen nő és a sejtben nagy valószínűséggel alakulnak ki fokozottan aritmogén, generalizált Ca^{2+} hullámok **[310]**.

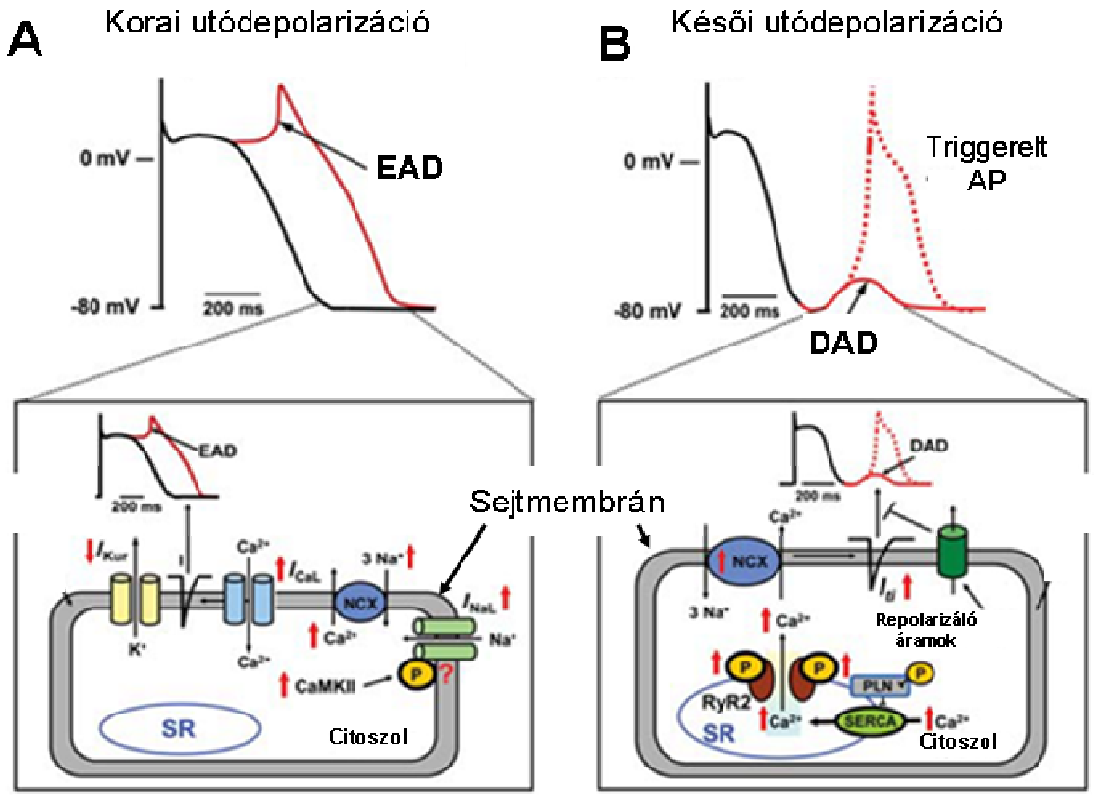
A megnőtt $Ca^{2+}{}_i$ másik következménye a szívizomsejtek között fiziológiás körülmények között tartósan nyitott réskapcsolatok lezáródása **[311]**. Ezek nyitott állapotának fenntartása az AP gyors és homogén terjedése szempontjából kritikus, a drámaian csökkenő konduktancia az AP terjedési sebességének akár több nagyságrendű lassulásához, az AP diszperzió markáns fokozódásához, funkcionális AP-reentryk kialakulásához vezet.

A K^+ csatornák szerepe: Egy adott K^+ áram növekedése vagy csökkenése egyaránt aritmogén lehet. A repolarizáló K^+ áramok upregulációja rövidíti az APD-t, és a refrakter periódusok markáns rövidítésével fokozhatja az AP-reentry kialakulásának valószínűségét. Downregulált K^+ áramok az APD-t megnyújtják, a nyújtás mértékétől függően aritmogén vagy antiaritmiás következményekkel. Mérsékelt APD növekedés általában csökkenti az

dc_1149_15

aritmiák kialakulási valószínűségét – azaz antiaritmiás hatású, jelentősebb AP megnyúlás viszont elősegítheti korai utódepolarizációk (EAD-ok) kialakulását, ezáltal Torsade de Pointes (TdP) aritmiához, súlyos esetben kamrafibrillációhoz és hirtelen szívhalálhoz vezethet [312]. A Ca^{2+}-függő K^+ csatornák Ca^{2+}-indukált kóros működése az abnormális Ca^{2+}-háztartás által indukált adaptációs remodeling egyik fontos következménye.

Triggerelt aritmiák: Triggerelt aktivitás esetén az aritmia fokális eredetű, kialakulását *az előző excitáció* indukálja. Tipikus kialakulási helyei a pulmonális vénák pacemaker sejtjei, a szinusz csomó területe, a jobb- és balkamrai kifolyási traktusok, valamint a commissura mitro-aortica, de a bárhol előforduló iszkémiás területek is, amelyekben a fokozódó Ca^{2+}_i és Ca^{2+}_{SR} túlterhelés a triggerelt aritmiák kialakulásának egyik legfőbb oka (9. ábra).



9. ábra A korai (***A***) és késői (***B***) utódepolarizáció kialakulási mechanizmusa. Az elnyújtott AP és a csatornák reaktiválódása a korai (EAD), a diasztolé alatti spontán depolarizáció a késői (DAD) utódepolarizáció kialakulásának kedvez (lásd [313]).

Korai utódepolarizáció ***(EAD)*** több mechanizmussal kialakulhat (9. ábra /A): (1) az LTC csatornák egy részének reaktivációja [171, 314-316], vagy tartós késői Na^+ áram ($I_{Na,L}$) következtében az AP *plató fázisa alatt* korai EAD alakul ki [317]; (2) az AP *terminális fázisában* bradykardiában, vagy részleges K^+ csatorna blokád esetén, elsősorban a Ca^{2+}-függő inward áram fokozott, gyors aktivációja miatt késői EAD jön létre. EAD gyakrabban fordul elő alacsony szívfrekvencia, illetve megnyúlt APD esetén. Kialakulásában fontos szerepet játszik a kóros NCX aktivitás is [318], elsősorban Purkinje rostokban, amelyekben az AP plató potenciálja kevésbé pozitív. A szarkolemma spontán Ca^{2+} felszabadulás következtében aktiválódó $_{fwd}I_{NCX}$ által generált depolarizációja lehetővé teszi a „window" Ca^{2+} áram, ez pedig az EAD kialakulását. Szívelégtelenségben az EAD kialakulási valószínűsége a K^+ csatornák downregulációja miatt lecsökkent repolarizációs rezerv, valamint az NCX upregulációja miatt megnőtt $_{fwd}I_{NCX}$ következtében jelentősen nő [319].

dc_1149_15

Késői utópotenciál ***(DAD)*** a szívciklus *diasztolés fázisában* alakul ki az SR-ből spontán kilépő Ca^{2+} hatására (9. ábra /B) **[320]**. Gyakrabban fordul elő igen magas szívfrekvenciák esetén, viszonylag rövid APD mellett. Kialakulását segítheti az I_{Ca} (→ a $[Ca^{2+}]_i$ + $[Ca^{2+}]_{SR}$) katecholamin-indukált növekedése. Az NCX kettős szerepet játszik a DAD kialakulásában. Egyrészt a citoszol és ezen keresztül az SR Ca^{2+} tartalmának szabályozásában betöltött szerepe miatt, mivel az SR Ca^{2+} túlterhelése a fokozott $_{rev}$NCX aktivitás következménye. Másrészt – mivel a SERCA2-t a magas $[Ca^{2+}]_i$ gátolja – a spontán $Ca^{2+}{}_i$ hullámok következtében létrejövő hirtelen, nagymértékű $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést végső soron a fokozott $_{fwd}$NCX aktivitás távolítja el. A DAD amplitúdója a frekvencianövekedéssel párhuzamosan nő, amíg el nem éri a küszöböt és ki nem alakul a triggerelt korai AP.

Tranziens inward áram (I_{ti}): Bár a szívciklus diasztolés fázisában a membránpotencial nyugalmi értékén, vagy annak közelében van, *nagy mennyiségű Ca^{2+} gyors felszabadulása* befelé irányuló árampulzust (tranziens inward áram, I_{ti}), aktiválhat, ami a plazmamembrán nagymértékű, tranziens depolarizációját hozhatja létre **[321]**. Az I_{ti} elsődleges forrása az $_{fwd}I_{NCX}$ (~ 85%), de az $I_{Cl(Ca)}$ is hozzájárulhat. Egészséges szívizomsejtekben a DAD kialakulásának elengedhetetlen feltétele a megemelkedett $[Ca^{2+}]_{SR}$, szívelégtelenségben viszont az I_{K1} downregulációja miatt a nyugalmi membránpotencial sokkal kevésbé stabil, és DAD viszonylag alacsony $[Ca^{2+}]_{SR}$ mellett is létrejöhet. **[80]**.

Vezetési aritmiák: Alapvető jellemzőjük az "aritmogén szubsztrát" kialakulása a szívizomsejtek jelentős „remodeling"-je, strukturális és/vagy elektrofiziológiai átalakulása következtében **[302-304, 322-326].** A szubsztrátot a szomszédos szívizomrétegek inhomogén vezetési tulajdonságai képezik (pl. iszkémia, vagy genetikus ioncsatorna-rendellenesség esetén a kórosan működő ioncsatornák random eloszlása). Az izomrétegek között kialakuló elektromos potenciálkülönbségek oka a vezetési időeltérés. Ez magyarázza, hogy a cirkulárisan folyó áram miért tud ismételten excitációt létrehozni.

Pitvarfibrilláció (AF): Az AF kialakulásához vezető komplex patomechanizmus részletei kevésbé tisztázottak. Valószínű, hogy a fibrillációt beindító mechanizmusok nem azonosak az AF terjedését és fennmaradását biztosító mechanizmusokkal. Kialakulása szorosan kapcsolódik a fokozott Ca^{2+} beáramlás következtében létrejövő Ca^{2+} túltelődéshez **[327-329].** A strukturális átalakulásban (remodeling) egyes Ca^{2+}-aktivált proteázok is szerepet játszanak **[330]**, az elektromos remodeling viszont egy, a $Ca^{2+}{}_i$ túlterhelés csökkentésére irányuló, egyes ioncsatornák (pl. LTCC) csökkent expressziójával jellemezhető, *celluláris kompenzációs mechanizmus* aktivációjának következménye. A csökkent Ca^{2+} beáramlás miatt az AP plató fázisa alacsonyabb, az AP rövidebb, ami elősegíti az AF kialakulását és krónikussá válását **[331]**. Újabb adatok szerint a pulmonális vénák terminális részében található, kóros körülmények között saját pacemaker aktivitással rendelkező **[332, 333]** sejtek is szerepet játszanak az AF kialakulásában **[334, 335]** és fenntartásában **[336, 337].**

Bár az SK csatornák lehetséges szerepét illetően hiányoznak a cáfolhatatlan bizonyítékok, aktiválódásuknak többen alapvető szerepet tulajdonítanak az AF kialakulásában. SK-KO egerekben a csatornák hiányában kialakuló APD megnyúlás pitvari EAD-ok valamint AF kialakulásához vezetett **[137]**. Mindazonáltal ez az eredmény nehezen értelmezhető, mivel a megnyúlt APD-t nem tartják AF facilitáló tényezőnek; mivel AF páciensekben a pitvari APD és ERP a remodeling következtében általában rövidül. Egy másik vizsgálat során azt találták, hogy a fokozott SK aktivitás az effektív refrakter periódus (ERP) rövidítésével járulhat hozzá a pitvari remodelinghez, így az SK csatorna upregulációja strukturális alapot szolgáltathat az aritmogén szubsztrát kialakulásához **[338]**. Hasonló eredményhez vezetett az a vizsgálat, amelyben újabb SK csatorna gátlók (UCL1684, ICA, NS8593) segítségével elemezték, hogy a pitvari SK csatornák gátlása járhat-e aritmogén következményekkel

dc_1149_15

[339]. Az NS8593, UCL1684 és ICA alkalmazását követően az AF minden preparátumban leállt. NS8593 előkezelés nem befolyásolta a QT intervallum hosszát, de a pitvari ERP-t megnyújtotta, izolált, perfundált tengerimalac szívben pedig gátolta az acetilcholin-indukált fibrillációt. Az NS8593 hasonló antiaritmiás hatást mutatott izolált, perfundált patkány és nyúlszívben, egy akut *in vivo* patkány AF modellben pedig rövidítette az AF időtartamát **[340]**. Ugyanakkor tengerimalacban a tartós pitvarfibrillációt még magas dózisú (1 µM) apaminkezelés sem állította le. A kísérleti eredmények egy része alapján felállított hipotézis szerint az új SK gátlók a QT intervallum nyújtása nélkül, a pitvari ERP megnyújtásával képesek megelőzni, illetve megszüntetni a fibrillációt, ezáltal új terápiás stratégiát jelenthetnek annak kezelésében. Érthetetlen viszont, hogy a K_{Ca} csatornák Ca^{2+}-függő gátlása miért *csak* az ERP alatt aktiválódik, amikor a $[Ca^{2+}]_i$ már alacsony, miért nem korábban, magasabb $[Ca^{2+}]_i$ mellett. (*Legújabb eredményekért lásd* ***6.1.1.*** *fejezet*)

Kamrai aritmiák: A kamrai aritmiákat szokásos két – benignus és malignus – csoportra osztani **[341, 342]**. A benignus aritmiák – ezek esetében anatómiai és/vagy elektrofiziológiai szubsztrát nem alakul ki – általában nem, a már kialakult aritmogén szubsztrátra épülő malignus aritmiák viszont mindig életveszélyesek. Előbbiek jellemző megnyilvánulása a jobb kamrai erek területéről kiinduló ektópiás aktivitás, utóbbiak közé tartozik a Torsade de Pointes aritmia és a kamrafibrilláció.

Torsade de Pointes (TdP): Polimorf tachycardiával jellemezhető kamrai aritmia típus. Kialakulását elősegíti a repolarizációs rezerv – a depolarizáló áramok növekedése vagy a repolarizáló áramok elnyomása miatti – markáns csökkenése, ami a kamrai elektromos heterogenitások felerősödéséhez, továbbá – kamrai EAD-ok kialakulásának elősegítésével – fokozott triggerelt aktivitáshoz vezet **[343]**. QT megnyúlás és T-hullám abnormalitások jellemzik, melyek az elektromos inhomogenitásokkal társulva, a három kamrai (endo-, epi, midmiokardiális (M)) sejtípus repolarizációs kinetikájában kialakuló fokozott tér- és időbeli diszperzió következtében, reentry-hez vezethetnek, ekkor a TdP hirtelen szívhalált okozó kamrafibrillációba mehet át. A heterogenitások elsődleges oka az M sejtek többi sejttípustól eltérő viselkedése; ezekben a bradykardia-indukált APD nyúlás – a kisebb I_{Ks} és nagyobb $I_{Na,L}$ és I_{NCX} következtében **[344]** aránytalanul nagy, ezért elektrofiziológiai értelemben átmenetet képeznek a másik két kamrai sejttípus és a Purkinje sejtek között.
A heterogenitásokat tovább fokozza egy alacsony küszöbbel rendelkező, gyorsan aktiválódó és inaktiválódó, a T-típusú Ca^{2+}-csatornákra jellemző, az epikardiális szívizomsejtekből hiányzó áram jelenléte az endokardiális szívizomsejtekben **[345]**.

Kamrafibrilláció (VF): A rendszerint hirtelen szívhalálhoz vezető aritmia *kialakulásában* kritikus szerepet játszanak a strukturális elváltozások (pl. szívelégtelenség, iszkémiás szívbetegségek). A *fenntartásáért* felelős mechanizmusok még mindig kiterjedt vita tárgyát képezik. Valószínű, hogy a VF dinamikus folyamat, olyan elektrofiziológiai „zavar", mely időben gyorsan változik. Az elektromos instabilitás kialakulásában és fenntartásában a membránpotenciál kóros modulációján keresztül szerepe lehet a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás zavarainak; egyrészt az SR-ből spontán, sztohasztikus Ca^{2+} felszabadulás, másrészt a CaT amplitúdója és az APD közötti (u.n. Ca-Vm) negatív csatolás miatt. Kóros esetben – pl. ha a Ca^{2+} felszabadulás az SR-ből (a gyenge CICR miatt), vagy a Ca^{2+} visszavétele az SR-be (az NCX/SERCA arány eltolódása révén) súlyos zavart szenved – CaT-alternánsok, és ennek következtében rendkívül aritmogén AP-alternánsok alakulhatnak ki, melyek elősegítik a fibrilláció szubsztrátját képező alternáló T-hullámok kialakulását **[346]**. A VF főbb mechanizmusai a folyamatosan változó depolarizációs hullámok, illetve azokat generáló „rotorok" **[347]**, melyek fenntartásában fontos szerepet játszhatnak a Purkinje rostok, egyrészt a reentry körök részeként, másrészt a fokális aktivitás forrásaként **[348, 349].**

dc_1149_15

A Ca^{2+}_i háztartás zavarainak szerepe genetikus eredetű aritmiákban: A leggyakoribb genetikus eredetű, klinikailag manifesztálódó aritmia szindrómákra (Anderson, Brugada, LQT, stb.) nem jellemző a közvetlen Ca^{2+}_i-függés. Az SR fokozott Ca^{2+} szivárgásához vezető RyR mutációkat mutattak ki aritmogén jobb kamrai diszpláziában (ARVD) és katecholaminerg polimorf ventrikuláris tachykardiában (CPVT) szenvedő páciensekben. Ez utóbbiak közül néhányban a kalszekvesztrin2 gén is mutáns **[350]**, míg az LQT szindróma egy különleges esetében az ankirin B génen található mutáció **[351]**.

2.6.2. Aritmogenezis akut és krónikus iszkémia/reperfúziós szívbetegségekben

A szívizom súlyos, hosszantartó iszkémiájának legfontosabb jellemzői az elégtelen energiatermelés és a salakanyagok gátolt eltávolítása, ami sejtszinten a kontrakciós erő drasztikus csökkenéséhez, az elektromos aktivitás instabilitásához, mitokondriális diszfunkcióhoz, végül nekrotikus vagy apoptotikus sejtpusztuláshoz vezet. Egész organizmus szinten a végállapot halálos kimenetelű aritmia, vagy a szív pumpafunkciójának összeomlása lehet. Az iszkémia legfontosabb jellemzői: acidózis, hipoxia, az energia metabolizmus csökkenése és emelkedett $[K^+]_o$. Az aritmogenezisben kitüntetett szerepet játszik az SL iontranszportereinek (NCX, NHE) kórosan fokozott aktivitása.

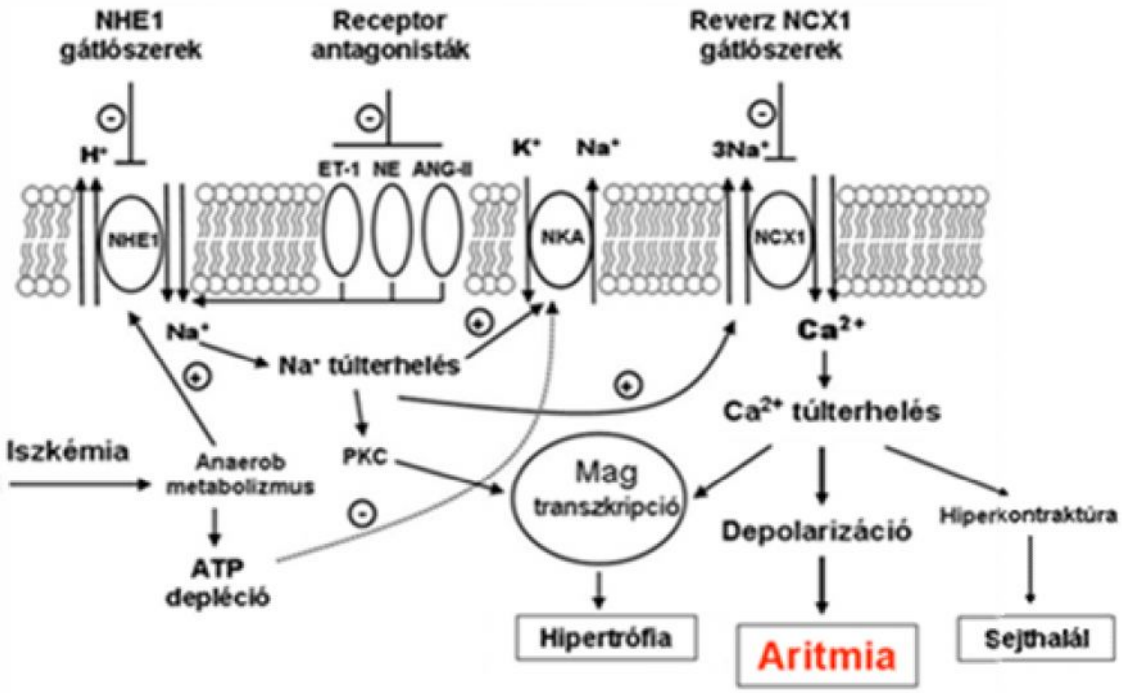
Az *acidózis* negatív inotróp hatásáért a pH_i csökkenése felelős. Az alacsony pH következtében a Ca^{2+} transzporterek (SERCA, RyR, NCX) aktivitása gátlódik. A CaT amplitúdója nem csökken, inkább nő, viszont a kifejtett erő nagysága és a maximális feszülés markánsan csökken **[352, 353]**, ami igazolja, hogy a negatív inotróp hatás a miofilamentumok szignifikánsan csökkent Ca^{2+} érzékenységének és turnover sebességének következménye, és a megnövekedett CaT a csökkenő Ca^{2+} érzékenységet kompenzáló változásnak tekinthető. A $[Ca^{2+}]_i$ és $[Na^+]_i$ megemelkednek **[354, 355]**, az utóbbi az NKA csökkent aktivitása, és az NHE fokozott proton eltávolítása következtében. Tartós acidózis alatt a pH_o csökkenés gátolja a NHE-t, és mivel az NCX is gátlódik **[356]**, a $[Na^+]_i$ emelkedés $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel párosul. Az SR Ca^{2+} felvétele is csökken, bár ezt tartósan magas Ca^{2+} tartalma túlkompenzálhatja.

A *hipoxia* Ca^{2+} háztartásra gyakorolt hatásai jól ismertek **[357-360]**. Egyik legfontosabb kóros következménye, hogy az NHE és a Na_V csatornák aktivációja által indukált fokozott Na^+ beáramlás és a csökkent Na^+ kiáramlás miatt a $[Na^+]_i$ szignifikánsan megnő. A magas $[Na^+]_i$ aktiválja a $_{rev}$NCX transzportot, (10. ábra), ennek következtében a $[Ca^{2+}]_i$ is markánsan megemelkedik. Az NKA fokozott energiadeficitje a Na^+ eltávolítás leállásához, így további Na^+_i akkumulációhoz vezet (40 mM $[Na^+]_i$ is kialakulhat), amelynek egyik lényeges következménye, hogy a transzmembrán K^+ gradiens – a fokozott K^+ kiáramlás miatt – fokozatosan csökken. A csökkent K^+ gradiens és a hipoxia direkt K^+ csatorna gátló hatása együttesen depolarizálják a membránt **[361, 362]**, ami tovább növelve a $_{rev}$NCX áramot, még nagyobb Ca^{2+} beáramlást hoz létre. Tartós hipoxia alatt az $[Ca^{2+}]_i$ tartós emelkedése Ca^{2+}_{SR} túlterheléséhez, a spontán Ca^{2+} felszabadulás markáns fokozódásához, ezáltal fokozott aritmogenezishez és további sejtkárosodások kialakulásához vezet.

Az *iszkémia* korai fázisában a $[Ca^{2+}]_i$ gyorsan emelkedhet **[352, 363, 364]**. Az emelkedés molekuláris mechanizmusa komplex **[365]**. A korai fázisban a sejt nem vesz fel jelentős mennyiségű Ca^{2+}-t a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés elsődleges forrása a SR **[366]**. Ha az $[Ca^{2+}]_i$ eléri a µM tartományt a RyR-ok nyitvatartási valószínűsége nagymértékben nő, **[367-369]**. Amikor az ATP elérhetőség csökken a SERCA2 aktivitás gátlódik, lehetővé téve a $[Ca^{2+}]_i$ gyors emelkedését **[352, 363, 364]**, ami tovább növeli a RyR nyitvatartási valószínűségét, ez pedig tovább fokozza a Ca^{2+} felszabadulást. Az iszkémia késői fázisában és még inkább a reperfúzió alatt a Ca^{2+} akkumulációja a $_{rev}$NCX transzport aktiválódása következtében megnőtt külső Ca^{2+} felvétel miatt tovább fokozódik, amit a megemelkedett $[Na^+]_i$ és a

dc_1149_15

membrándepolarizáció tovább gyorsít [370, 371]. Iszkémia során a mitokondriumok Ca^{2+}-ot vesznek fel [372]. Ez átmenetileg csökkenti az $Ca^{2+}{}_i$ akkumuláció sebességét, de tartós iszkémia és túl nagy felvett Ca^{2+} mennyiség végleges mitokondrium-károsodáshoz és ennek következtében sejtpusztuláshoz vezethet. A reperfúzió kezdeti fázisában a NHE újraaktiválódása a $[Na^+]_i$ másodlagos, gyors emelkedéséhez, ez pedig a $_{rev}I_{NCX}$ további aktiválásán keresztül a $[Ca^{2+}]_i$ gyors növekedéséhez és extrém méretű Ca^{2+}-túlterhelés kialakulásához vezethet, ami a reperfúzió-indukált szövetkárosodások és szignifikánsan megnőtt aritmia hajlam elsődleges oka. A fokozott transzmembrán Ca^{2+} szivárgás, a megnőtt $I_{Na,L}$ áram és a reperfúzió során termelődő szabad oxigéngyökök akkumulációja tovább növeli a Ca^{2+} túlterhelés által okozott szövetkárosodásokat. Az LTC csatornák a membrán depolarizációja következtében inaktiválódnak, ezért az iszkémia/reperfúzió alatti Ca^{2+} felvételben szerepük nem jelentős [373-375].



10. ábra A Na^+/H^+ kicserélő (NHE) és a Na^+/Ca^{2+} kicserélő (NCX) szoros kooperációja az I/R-indukált sejtkárosodások (hipertrófia, aritmia, apoptozis/nekrózis) kialakulásában (részletek a szövegben).

Az iszkémia alatt kialakuló Ca^{2+} túlterhelés számos káros folyamatot aktiválhat [376]. Semleges pH-n az intracelluláris proteázok és foszfolipázok már µM-os Ca^{2+} szint mellett is aktiválódnak, sejtstruktúrák megbontásához, végül membránkárosodások kialakulásához vezetve [377-379]. Extrém magas $[Ca^{2+}]_i$ aktiválja az apoptotikus mechanizmusokat és mitokondrium diszfunkcióhoz vezet. A $Ca^{2+}{}_i$ túlterhelés szerepet játszik a szívizom „dermedt - stunning" állapotának kialakulásában, ami a kontraktilis fehérjék (troponin I) Ca^{2+}-függő proteázok által mediált diszfunkciójának a következménye [380-382]. Miokardiális infarktus során az iszkémia-indukált változások elsősorban az infarktus széli zónájára lokalizálódnak, vagy igen nagy területen eloszlanak. A MI széli zónájában a I_{Ca} és a CaT gátlódik, helyreállási kinetikájuk lassul [383-385]. Az infarktust követően a I_{Ca} néhány napig nem változik [386], ezt követően csökken [385]. Az NCX funkció nem változik [387]. Túlélő szubendokardiális Purkinje sejtekben a $I_{Ca,L}$ és $I_{Ca,T}$ is csökken [388] és a szubcelluláris Ca^{2+} felszabadulás súlyosan sérül [389]. A károsodott szívszövetben kialakuló fokális elváltozások jelentősen hozzájárulhatnak az aritmogenezishez.

dc_1149_15

Kamrai aritmiák leggyakrabban akut MI, vagy CIHD során generálódhatnak. A könnyen halálos kimenetelűvé váló aritmiák alapjául szolgáló elsődleges mechanizmus a rostok orientációjával párhuzamosan kialakuló funkcionális vezetési blokk által létrehozott anizotróp reentry, melynek hátterében fokozott szöveti anizotrópia, inhomogén, lassú vezetés, a refrakter fázisok inhomogenitása és a heterogén eloszlású szöveti fibrózis áll.

A *fokozott szöveti heterogenitás* kialakulásának elsődleges oka a konnexin downreguláció **[390]**, melynek következtében a réskapcsolatok száma/mérete markánsan csökken, főleg a szívizomsejtek laterális részein. A *lelassult impulzusvezetés* hátterében a konnexinek és a Na_V csatornák inhomogén downregulációja áll; az I_K és I_{Na} inhomogén downregulációja pedig fokozza az AP *refrakter fázisának inhomogenitását*. A kamrai tachyaritmiákban kialakuló ektópiás komplexek (melyekben jelentősen megnő az EAD/DAD kialakulásának valószínűsége) elősegítik a gyakran kamrafibrillációhoz vezető rekurrens szignálterjedést. Iszkémiás szívbetegségekben triggerelt és re-entry eredetű aritmiák közel azonos számban fordulnak elő **[391-393]** és mindkettő gyakran vezet életveszélyes kamrai tachyaritmiához. A triggerelt aritmiák kialakulásában kiemelkedő szerepet játszik a fokozott NCX működés **[394]**, a reentry aritmiák strukturális alapja viszont sokkal összetettebb; az inhomogén NCX expresszió csak egyike a számos, *fokozott szöveti anizotrópiához* vezető kóros eltérésnek.

Reperfúzió: A reperfúzió során a $[Ca^{2+}]_i$ vagy a belépő külső Ca^{2+} következtében tovább növekszik – ami végül súlyos Ca^{2+} túltelődéshez és sejthalálhoz vezet, vagy fokozatosan normalizálódik, és a sejt túléli az inzultust **[395-397]**. Bár tartósan fennálló iszkémia alatt a $[Na^+]_i$ számottevően megemelkedik, ebben az alacsony pH_o miatt az NHE szerepe limitált. A reperfúzió kezdeti fázisában a pH_o gyorsan normalizálódik, de a pH_i még egy ideig alacsony marad. A jelentős pH gradiens maximálisan reaktiválja a Na^+/H^+ cserét és további gyors $[Na^+]_i$ emelkedést generál. Mivel a $[Ca^{2+}]_i$ is magas, az NCX Na^+-függő inaktivációja nem jöhet létre; a jelentősen megemelkedett $[Na^+]_i$ tovább gyorsítja az $_{rev}$NCX transzportaktivitást. A gyors és markáns $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés elősegíti a $Ca^{2+}{}_i$ túlterhelés kialakulását, ami szövetkárosodásokhoz, és szignifikánsan megnőtt aritmia hajlamhoz vezethet. Érdekes módon, míg alacsony Ca^{2+} tartalmú perfúzió protektív hatást mutatott, a $Ca^{2+}{}_o$ teljes eltávolítása paradox celluláris reperfúziós károsodásokhoz vezetett. A Ca^{2+} paradoxként ismert jelenség vélhetően a szarkolemma fokozott permeabilitásának és/vagy az interkaláris lemezek szétesésének tulajdonítható **[398-401]**.

A reperfúzió alatti másik súlyos károsító hatás nagymennyiségű szabad oxigéngyök gyors felszabadulásához köthető **[402]**, mivel a markánsan megnőtt szabadgyök genezis csökkent mennyiségű scavenger elérhetőségével párosul **[403-406]**. A szabadgyökök hozzájárulnak a Ca^{2+} túlterheléshez, és növelik az I_{ti} nagyságát, illetve a triggerelt aritmiák előfordulását **[407, 408]**, ezenkívül gyakorlatilag az összes Ca^{2+} transzportáló protein működését befolyásolják, beleértve a NCX-et is **[247, 409, 410]**. A Ca^{2+} szivárgás és a „window” Na^+ áram is emelkedhet, ami tovább fokozhatja a Ca^{2+} túlterhelést. A szívizomsejtek Ca^{2+} túlterhelése és a markánsan megnőtt szabadgyök képződés hosszú távon a miokardium súlyos miofilamentum diszfunkcióban megnyilvánuló bénult állapotához vezethet.

***Az NHE szerepe*:** A $Ca^{2+}{}_i$ túlterhelés kialakulásában, a reperfúziós fázis alatti Ca^{2+} felvétel felgyorsulásában az NHE kórosan magas transzportaktivitása kritikus szerepet játszik. Mérsékelt pH_i csökkenés is jelentősen fokozza a protoneltávolítást, ezáltal markáns $Na^+{}_i$ akkumulációt hoz létre, ami a $_{rev}$NCX transzport aktiválásával $Ca^{2+}{}_i$ túlterheléshez vezet.
A fokozott NHE aktivitás elősegíti a sejtméret növekedését (hipertrófia) **[264, 265]**, másrészt fontos szerepet játszik a nekrotikus és apoptotikus szövetkárosodások aktiválásában **[411]**. Az infarktus alatt/után, vagy szívelégtelenségben kialakuló fokozott aritmia hajlam egyik legfontosabb oka ugyancsak az iszkémia-indukált szívhipertrófia **[412]**.

dc_1149_15

2.7. NCX és NHE gátlás hatásai beteg szívben

Számos kísérleti eredmény igazolja, hogy az NCX nemcsak a szív Ca^{2+}_i háztartásának fiziológiás szabályozásában, de aritmogenezisében is kritikus szerepet játszik. Figyelembe véve a Ca^{2+} eltávolításában játszott alapvető jelentőségét, nem meglepő, hogy az NCX funkció kóros változásainak fontos szerepe lehet az aritmiák kialakulásában/fenntartásában is. Ismereteink a transzporter működéséről és szabályozásáról (különösen patológiás körülmények között, annak fokozott működése esetén) messze vannak az elégségestől. Az NCX funkció komplexitásából adódóan gátlásának következményei ugyancsak összetettek. Egyrészt a $_{rev}NCX$ aktivitás gátlása következtében csökken az AP korai fázisában beáramló Ca^{2+} mennyisége. Másrészt, a $_{fwd}NCX$ aktivitás gátlása miatt a CaT lecsengése elhúzódik, és a Ca^{2+}_{iD} szint is változhat. Harmadrészt, a SERCA2/NCX transzportarány az eltávolítás során nő, ezáltal az SR Ca^{2+} tartalma is emelkedhet. Végül, mivel a spontán diasztolés Ca^{2+} felszabadulás által indukált I_{ti} is lassabban alakul ki, a membrándepolarizáció nagysága is csökkenhet. Mindezek a változások közvetlenül befolyásolják a szív aritmia hajlamát és a kialakult aritmia állapot időtartamát/súlyosságát. Az NCX gátlás végeredménye az egyes hatások aktuális nagyságán, kinetikáján és interakcióján kívül markánsan függ a gátlószer farmakológiai paramétereitől (nemspecifikus hatások), ezért nehezen megjósolható.

Egy NCX gátlószer a kísérleti eredmények alapján két jelentősen eltérő szempont szerint értékelhető: egyrészt mint az adott szívbetegségre alkalmazott gyógyszer, hatékonyságával (terápiás eszközként), másrészt, mint a kóros NCX működés adott patomechanizmusban játszott szerepét analizáló farmakológiai modell (kísérleti eszközként). A korábbi kísérleti eredmények értelmezése számos esetben nem problémamentes. Egyrészt, mert az adatok túlnyomó részét nem kellően specifikus NCX gátlók alkalmazásával nyerték. Másrészt, míg egy hatóanyag terápiás hatását viszonylag egyszerű értékelni (hat, nem hat), a másik alapkérdés (az NCX tényleges szerepe az adott patomechanizmusban, és az NCX gátlás jelentősége az esetleges jótékony hatásban) megválaszolása sokkal kevésbé egyértelmű. A SEA0400 elérhetőségével, mely hosszú ideig a legszelektívebb és leghatékonyabb NCX gátlónak számított, megbízhatóbb adatok váltak elérhetővé, de ezek mennyisége limitált, továbbá humán szívizomsejteken/multicelluláris mintákon gyakorlatilag nem történtek mérések. Végül, a benziloxifenil származék gátlószerek I1 inaktiváció-függésének és ebből következő transzportirány szelektivitásának lehetnek ugyan hasznos következményei egyes Ca^{2+}-függő szívbetegségekben, de limitálhatják használhatóságukat a többiben.

NCX gátlás – lehet-e perspektívikus kardioprotektív stratégia? Az elmúlt időszakban az NCX szerkezetét, működését és szabályozásának részleteit tisztázó elméleti (molekuláris, fiziológiai, biofizikai és biokémiai) vizsgálatokat követően a klinikusok (kardiológusok, neurológusok, endokrinológusok, urológusok) érdeklődése is nagymértékben fokozódott az állatkísérletek eredményeinek klinikai alkalmazhatósága iránt. A fokozott érdeklődés azt a nem túl régi felismerést tükrözi, hogy az NCX expresszió és/vagy funkció zavarai számos, a morbiditási/mortalitási listák vezető helyein álló akut/krónikus betegség kialakulásához vezethet, illetve felgyorsíthatja azok progresszióját (pl. szívbetegségek, agykárosodások, hipertenzió, diabéteszes cardiomyopátia). A közelmúltban bekövetkezett jelentős fejlődés és a fokozott elvárások ellenére tudásunk, mind az elméleti, mind – és legfőképpen – a terápiás vonatkozásokat illetően még meglehetősen korlátozott. Bár az NCX Ca^{2+}-mediált betegségekben ma már elismerten perspektivikus terápiás célpont, a klinikai vizsgálatokat súlyos nehézségek hátráltatják. Még mindig nem ismert a kicserélő **3D** struktúrája és a struktúra-funkció kapcsolatra vonatkozó adatok száma is limitált, így a gyógyszerfejlesztés potenciális célpontjai sem nyilvánvalóak. Szintén nem kellően tisztázottak a szívciklus során az AP morfológiája és kinetikai paraméterei és az NCX áram közötti kölcsönhatás

dc_1149_15

részletei, aminek egyik legfőbb oka, hogy az nagymértékben függ a közvetlenül ma még nem mérhető (csak indirekt módon becsülhető) szubszarkolemmális ionkoncentrációktól. Jórészt ismeretlenek az SL egymás aktivitását kölcsönösen befolyásoló transzporterei közötti komplex, dinamikus kölcsönhatások részletei is. Végül a kísérleti eredmények értelmezését súlyosan nehezítő tényező volt az effektív és szelektív hatóanyagok hiánya; ezért egyre sürgetőbb az igény jobban használható NCX modulátorok kifejlesztésére.

2.7.1. NCX gátlás antiaritmiás hatásai

Az NCX blokád antiaritmiás hatásaira vonatkozó adatok a gátlószerekkel kapcsolatos nehézségek miatt, ellentmondásosak. Tanulságos példa erre egy akonitin-indukált triggerelt aritmiákra vonatkozó publikáció **[413]**, mely altatott tengerimalacon a KB-R7943 és a SEA0400 anti-/proaritmiás hatékonyságát elemezte. KB-R7943 alkalmazása leállította a kamrai tachycardiát, de a SEA0400, még a maximális 10 mg/kg dózisban is hatástalan volt. A KB-R7943 vélhetően nemcsak az NCX-et, hanem a Na^+ és Ca^{2+} csatornákat is gátolta, így megakadályozta a Na^+ és Ca^{2+} túltelődést is, ugyanakkor a szelektívebb SEA0400 – jóval kisebb nemspecifikus hatásai miatt – nem gátolta a triggerelt válaszok kialakulását. A szimuláció során bebizonyosodott, hogy az NCX nem játszhat fontos szerepet az akonitin-indukált aritmiák kialakulásában, azaz a KB-R7943 protektív hatása *nem* az NCX gátlás következménye. Egy másik kísérletben KB-R7943 előkezelés szignifikánsan megnövelte az aritmiák kialakulásához szükséges ouabain dózist és növelte a szívleálláshoz szükséges időtartamot **[279]**. Pacing-indukált AF során az akut ERP reverzibilisen lerövidül. KB-R7943 előkezelés a pitvari ERP-t dózisfüggően (ED_{50}=1.9 mg/kg) növelte **[273]**. A KB-R7943-kezelt pitvarfibrilláló, illetve normál szívritmussal rendelkező kutyákban az ERP változások mértéke és időviszonyai azonos KB-R7943 dózisok esetén nem különböztek, viszont altatott kutyákban a KB-R7943 nem csökkentette az ouabain-indukált aritmiák gyakoriságát **[274]**. Egy másik vizsgálatban a SEA0400 jelentősen gátolta a digitalis-indukált aritmiákat **[276]**. Korábbi kísérleti eredményeink szerint kutya preparátumokban SEA0400 (1 μM) alkalmazása után az EAD-ok és DAD-ok amplitúdója csökkent **[275]**. Patkány kamrai sejtekben a Na^+_o eltávolítása az NCX-en keresztül Ca^{2+} beáramlást hoz létre, ami $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéshez, aritmiák kialakulásához vezethet. 5 μM KB-R7943 a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést kivédte **[272]**, de a $[Ca^{2+}]_i$ csökkenés sebességét nem befolyásolta, ami arra mutat, hogy patkány kamrasejtekben az NCX által bejutó Ca^{2+} jelentősége korlátozott a normális ECC szempontjából, mivel a Ca^{2+} kiáramlás gátlása elegendő volt a glikozid inotrópia kialakulásához. Ugyanakkor a KB-R7943 magas $[Na^+]_i$ esetén gátolta a Ca^{2+} túltelődést és a spontán aktivitást, ami igazolja azt a feltételezést, hogy az NCX mediált nettó Ca^{2+} beáramlás kritikus szerepet játszik az aritmogén Ca^{2+} túltelődés kialakulásában.

2.7.2. NCX gátlás hatása iszkémia/reperfúzióban – aritmogenezis

Izolált sejtek és szövetek: 50 μM strophantidinnel előkezelt szívizomsejteken a KB-R7943 csökkentette a diasztolés $[Ca^{2+}]_i$-t és a strophantidin inotróp hatásának befolyásolása nélkül megszüntette a spontán Ca^{2+} oszcillációkat **[272]**. Patkányokban preiszkémiás alkalmazása megszüntette az I/R indukált kamrafibrillációt **[278]**. Egy másik vizsgálat szerint hasonló előkezelés nem befolyásolta a koronária leszorítás és reperfúzió-indukált aritmiákat **[414]**. Szubsztrátmentes hipoxiás médiumban inkubált tengerimalac papilláris izmokban reoxigenáció előtt és alatt alkalmazott 10 μM KB-R7943 szignifikánsan csökkentette a reoxigenációs időtartam alatt kialakuló aritmiák gyakoriságát és időtartamát **[415]**. Globális iszkémiát követő reperfúzió alatt, α1-adrenerg receptor stimulációt követően, fokozódik a szív inozitol(1,4,5)trifoszfát [Ins(1,4,5)P_3] szintézise, ami kamrafibrillációhoz vezethet. 10 μM KB-R7943 kivédte az Ins(1,4,5)P_3 emelkedést és a fibrilláció kialakulását **[416]**. A KB-

dc_1149_15

R7943 antiaritmiás hatását I/R modellben vizsgálták Langendorff-perfundált nyúlszíveken is [417]. Erre a modellre iszkémia és reperfúzió alatt egyaránt igen magas (50%) kamrai tachycardia (VT) és VF gyakoriság jellemző. 3 µM KB-R7943 előkezelést követően a iszkémiás és reperfúziós fázisokban egyaránt szignifikánsan csökkent a VT és VF gyakorisága. A mérések szerint a KB-R7943 volt az egyetlen hatóanyag, amely ebben az aritmia modellben az iszkémia-, illetve reperfúzió-indukált aritmiákat egyaránt gátolta.

In vivo: patkány I/R modellben az iszkémiát követően alkalmazott SEA0400 csökkentette a kamrafibrilláció kialakulási gyakoriságát és a mortalitást [418]. A SEA0400-hoz hasonlóan, az YM-244769 is hatékony volt az I/R-indukált VT és VF megelőzésére [239]. A patkányokon kapott eredményekkel szemben kutyákon sem az iszkémia előtt sem az utána 3.0 mg/kg dózisban alkalmazott SEA0400 nem csökkentette az I/R-indukált aritmiák gyakoriságát [276]. Ugyancsak kutyákon az iszkémia előtt alkalmazott (2, 5, 10 mg/kg) KB-R7943 sem gátolta I/R-indukált aritmiák kialakulását [274]. Iszkémia alatt 5 mg/kg KB-R7943 alkalmazását követően az egyetlen kardioprotektív hatás az aritmiás ütések számának csökkenése volt. Ebből arra következtettek, hogy mivel kutyában a KB-R7943 nem rendelkezik számottevő antiaritmiás potenciállal, nagyobb emlősökben I/R-indukált aritmiákkal szemben az NCX gátlás nem igazán használható stratégia.

2.7.3. NCX gátlás hatása iszkémia/reperfúzióban – kontraktilitás

Izolált sejtek/szívmodellek: Izolált szívizomsejtekben mind a KB-R7943 mind a SEA0400 effektíven megelőzte az I/R-indukált Ca^{2+} túltelődést. Patkány szívizomsejtekben szimulált iszkémia során 20 µM KB-R7943, amennyiben csak az anoxiás fázisban alkalmazták, nem befolyásolta a kontraktúra kialakulását, de markánsan csökkentette a Ca^{2+}_i akkumulációját és gátolta a reoxigenáció-indukált kontraktúra kialakulását [419]. Reoxigenált patkány szívizomsejtekben, Ca^{2+}-mentes médiumban, KB-R7943 jelenlétében a Ca^{2+} oszcillációk és a hiperkontraktúra is szignifikánsan csökkent [420]. Szintén patkány szívizomsejtekben 1 és 3 µM SEA0400 csökkentette a Ca^{2+} paradox-indukált sejtpusztulást [421]. Izolált perfundált patkányszívben, iszkémia előtt vagy után alkalmazva a KB-R7943 és SEA0400 is mérsékelte a kontraktilitás I/R károsodás miatti csökkenését [278, 418]. Patkányszív anoxia-reoxigenációs modelljében 20 µM KB-R7943 kezelés szignifikánsan csökkentette a reoxigenáció-indukált enzimfelszabadulást [419]. Hasonló kísérletben, a reperfúzió alatt alkalmazva, KB-R7943 markánsan csökkentette az iszkémiás károsodás mértékét: az iszkémiás periódust követően alacsonyabb végdiasztolés nyomást, magasabb balkamrai nyomás és kisebb LDH felszabadulást kaptak [420]. A KB-R7943 tengerimalac papilláris izomban kontroll állapotban nem befolyásolta a kontrakció paramétereit, de csökkentette az alacsony Na^+_o által generált kontraktúra nagyságát [415]. Ugyanebben a preparátumban, szubsztrátmentes hipoxiás médiumban 10 µM KB-R7943 szignifikánsan növelte a kamrai nyomást reoxigenáció után [272]. A kedvező hatás mértéke az alkalmazott koncentrációtól és az alkalmazás időzítésétől függött. Az LDH felszabadulást a reperfúzió első 5 percében alkalmazott 0.3–30 µM KB-R7943 dózisfüggően csökkentette, de amennyiben csak a 6-ik perc után alkalmazták, a jótékony hatás eltűnt. 5 µM KB-R7943 a reperfúzió első 10 percében alkalmazva csökkentette a kontraktilis diszfunkciót, LDH felszabadulást és a reperfúzió-indukált hiperkontraktúra következtében kialakuló szarkolemma károsodások okozta nekrózist (contraction band necrosis). Sertésben 5 µM KB-R7943 intrakoronáriás infúziója a reperfúzió kezdeti 10 percében csökkentette az infarktus méretét [422]. Ezek az eredmények alátámasztják azt a hipotézist, mely szerint a reperfúzió korai fázisában az NCX alapvetően reverz módban működik, Ca^{2+} túltelődést, hiperkontraktúrát és sejthalált generálva; gátlása pozitív következményekkel jár, viszont később akadályozza a $_{fwd}$NCX transzport Ca^{2+} eltávolító működését, ami a sejt helyreállása szempontjából végzetes lehet.

dc_1149_15

Langendorff-perfundált nyúlszívekben 3 µM KB-R7943 preiszkémiás alkalmazása negatív inotróp változást okozott, és ami még fontosabb, nem akadályozta meg a kontraktilis abnormalitásokat. A KB-R7943 hatás hiánya igazolni látszik az elképzelést, mely szerint a kontraktilis diszfunkció oka a miofilamentumok megváltozott Ca^{2+} érzékenysége **[417]**. Perfundált működő patkányszívben a KB-R7943 szignifikánsan gátolta az iszkémia alatti $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést. Reperfúziót követően a diasztolés $[Ca^{2+}]_i$ gyorsabban helyreállt a kezelt szívekben. KB-R7943 ugyancsak felgyorsította a szívizom aktuális terhelésére jellemző frekvencia-nyomás szorzat (RPP) reperfúzió alatti helyreállását **[423]**, ezért úgy gondolták, hogy a KB-R7943 a $_{rev}$NCX aktivitás gátlásával csökkenti az iszkémiás Ca^{2+} túlterhelést és javítja a miokardium-funkció helyreállását a reperfúziós fázisban. Langendorff-perfundált patkány szívekben 0.3 és 1 µM SEA0400 csökkentette az alacsony nyomású, majd normál perfúzió okozta mechanikai diszfunkciót **[418]**. No-flow iszkémia során 1 µM SEA0400 nem befolyásolta a kontrakciós erő csökkenését, de gátolta a kontraktúra kialakulását és jelentősen javította a kontraktilitás helyreállását a reperfúziót követően **[277]**. A jótékony hatás akkor is kialakult, ha a gátlószert *csak* iszkémia előtt/alatt, de akkor is ha *csak* a reperfúzió során alkalmazták. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy az NCX aktivitás gátlása – az iszkémia és/vagy a reperfúzió alatt – kardioprotektív hatású lehet és megkönnyítheti a szív kontrakciós aktivitásának helyreállását.

Egy igen részletes vizsgálatban nyúlszíveken is összehasonlították az eltérő szelektivitású és hatékonyságú KB-R7943 és SEA0400 kardioprotektív hatását **[424]**. Mindkét gátlószer csökkentette az infarktus kiterjedését (EC_{50} = 5.7 nM a SEA0400-ra), de a SEA0400 hatékonyabbnak bizonyult; az infarktusos terület méretcsökkenése 75%, illetve 40% volt. Nem volt viszont különbség az infarktusos terület nagyságában ha a gátlószert a regionális iszkémia előtt, vagy után alkalmazták. Míg 1µM SEA0400 javította a dP/dt posztiszkémiás helyreállását, a KB-R7943 még alacsony, 1 µM-os koncentrációban is gyengítette a szív mechanikai aktivitását. Magas, 5–20 µM KB-R7943 koncentráció a szívfrekvencia, bal kamrai nyomás és dP/dt gyors, markáns csökkenését okozta, így a KB-R7943 protektív hatékonysága a szívfunkcióra gyakorolt negatív hatása következtében erősen limitált. A jóval szelektívebb SEA0400 alkalmazása az iszkémiás szívkárosodás csökkenéséhez és a dP/dt javulásához vezetett. Egy újabb NCX gátlószer, az SN-6 is hatékonynak bizonyult I/R során; az NCX gátlásán kívül a károsító oxigéngyököket is eliminálta **[425]**. Az NCX gátlószerek I/R károsodásokkal szemben mutatott védő hatásának mechanizmusát és a hatás határait izolált patkányszíveken vizsgálták, 20/35 perces iszkémiát követő 60 perces reperfúzió során.

A gátlószereket (3-30 µM KB-R7943, vagy 0.3-1 µM SEA0400) iszkémia előtt vagy után alkalmazták **[426]**. Az eredmények szerin t súlyosabb (35 perces) iszkémia esetén sem az előtte, sem az utána alkalmazott KB-R7943 vagy SEA0400 kezelés nem javította a kontraktilis aktivitás posztiszkémiás helyreállását, továbbá nem csökkentette sem az I/R-indukált Na^+_i akkumulációt, sem a mitokondriális légzésfunkció-károsodást. Ugyanakkor mérsékeltebb, 20 perces iszkémia esetén, mind az előtte, mind az utána alkalmazott 10 µM KB-R7943, illetve 1 µM SEA0400 szignifikánsan csökkentette a reperfúzió-indukált Ca^{2+} akkumulációt és a szívizom magas energiájú foszfátjainak csökkenését, továbbá javította a szív kontraktilitásának helyreállását. A vizsgálat konklúziója szerint az NCX gátlószerek kardioprotektív hatása mérsékelt iszkémiában jelentős részben a mitokondriális Ca^{2+} túlterhelés okozta mitokondrium-károsodások csökkentésének következménye.

In vivo modellek: A SEA0400 hatékonyságát az I/R okozta károsodások csökkentésében patkány és kutya *in vivo* modellekben is vizsgálták. Patkányban a SEA0400 nagyrészt kivédte a balkamrai végdiasztolés nyomásemelkedést, illetve az ejekciós frakció drasztikus

csökkenését [427]. Altatott kutyában 1.0 mg/kg SEA0400 a hemodinamikai paramétereket nem befolyásolta, de enyhén nyújtotta a QRS időtartamot. Pre- és poszt-iszkémiás (1.0/0.3, 1.0, 3.0 mg/kg) alkalmazása nem csökkentette a bal arteria descendens (LAD) okklúzióval kiváltott regionális I/R által indukált kamrai aritmiák gyakoriságát, de 3.0 mg/kg dózisban csökkentette a digitálisz-indukált kamrai tachyaritmiák időtartamát [276].

2.7.4. NCX gátlás hatása a miokardiális stunning-ra és prekondicionálásra

A miokardium „kábult" állapota (stunning) megfigyelhető jó néhány klinikai beavatkozás (perkután transzluminális koronária angioplasztika, trombolízis, kardiopulmonális bypass) után [428]. Különböző stunning modellekben a KB-R7943 és a SEA0400 is szignifikánsan javította a szívizom helyreállását [421]. Egy izolált sejt modellben sikeresen igazolták, hogy a reperfúzió első 10 percében generált Ca^{2+} túlterhelés kiemelkedő szerepet játszik a stunning kialakulásában, mivel a Ca^{2+} beáramlás csökkentése szignifikánsan csillapította a szívizom kábultságát, a szív mechanikai diszfunkcióját, valamint a $[Ca^{2+}]_i$ oszcillációkat [429]. Altatott kutya modellben a szívfunkció posztiszkémiás helyreállása elégtelen volt mind a kontroll, mind az alacsony (5mg/kg) KB-R7943 dózissal kezelt csoportokban, ugyanakkor szignifikánsan javult a magas, (10mg/kg) KB-R7943 dózissal kezelt csoportban [430]. 1 perccel a reperfúzió előtt alkalmazva 0.3/1.0 mg/kg SEA0400, szignifikánsan javította a szegmensrövidülést [421]. Mindezek az adatok igazolják, hogy a stunning kialakulásának egyik meghatározó mechanizmusa a $_{rev}$NCX transzportaktivitása által létrehozott $Ca^{2+}{}_{iD}$ túlterhelés, továbbá az iszkémia előtt vagy után alkalmazott NCX gátlás, csökkentve a stunning időtartamát, jelentősen javíthatja a szívizom helyreállását.

A prekondicionálás kialakulásához kisebb mértékű Ca^{2+} túlterhelés szükségesnek látszik. A sevofluran prekondicionáló hatásáról kimutatták, hogy a PKC transzlokációjától függ, melyet vélhetően a fokozott, NCX-mediált Ca^{2+} beáramlás indukál [245]. Ez azt jelentené, hogy több prekondicionáló eljáráshoz hasonlóan a szívizom Ca^{2+} tartalmának altatógázok által indukált növekedése is protektív szignálkaszkádot generál. A prekondicionálással triggerelt kardioprotekció alatt kimutatott fokozott, a posztiszkémiás reperfúzió során talált csökkent $_{rev}$NCX aktivitás meggyőzően igazolta a protektív hatás kialakulását [431].

2.7.5. NHE gátlás antiaritmiás hatásai iszkémia/reperfúzióban

Mivel az iszkémia és a reperfúzió is jelentősen növelheti a kamrai aritmiák gyakoriságát, régóta feltételezik, hogy az NHE iszkémia és/vagy reperfúzió alatti gátlása kardioprotektív, antiaritmiás hatású lehet. Ezt a feltételezést számos kísérleti adat igazolja, melyek szerint az NHE gátlása csaknem teljesen meggátolja az I/R indukált aritmiák kialakulását. Kutyában a nemszelektív amilorid a kísérletes miokardiális infarktussal *in vivo* indukált tartós kamrai tachyaritmiák kialakulását még igen kis dózisban is megakadályozta [432]. Iszkémia előtt és reperfúzió alatt alkalmazva, izolált és *in vivo*, LAD lekötött patkány- és malacszíven, más szelektívebb NHE gátlószerek (HOE 694, EIPA) is hatékony védelmet nyújtottak a reperfúzió-indukált VF és a posztreperfúziós stunning kialakulásával szemben [433-435]. Az amilorid humán páciensekben is eléggé hatékonyan gátolta a szimptómás kamrai tachycardiák kialakulását (bár humán pacienseken hatékonysága kisebb volt, mint kutyákon) [269], és a később elvégzett klinikai vizsgálatok során is eredményesen gátolta a kamrai extraszisztolék kialakulását. Ugyanakkor a szelektívebb amilorid származékokkal (cariporid, eniporid) nagy létszámú páciensen végzett hasonló vizsgálatok eredményei ellentmondásosak (esetenként súlyos mellékhatásokról is beszámoltak) és összességükben nem váltották be az I/R előtti/alatti NHE gátláshoz fűződő fokozott elvárásokat [436-439]. Az, hogy a humán pácienseken nyert klinikai adatok miért mutatnak markáns eltéréseket az experimentális adatoktól, jelenleg nem tekinthető tisztázottnak [440].

dc_1149_15

3. CÉLKITŰZÉSEK

Elsődleges célkitűzésünk négy, elméleti és klinikai szempontból egyaránt fontos kérdéskör vizsgálata volt a szív Ca^{2+}_i háztartására és akciós potenciáljára jellemző paraméterek elemzésével, szívizomsejtekben, multicelluláris szövetmintákban és intakt szívekben.

1) *Milyen hatással van egyes, jelentős Ca^{2+}-függést mutató repolarizáló K^+ áramokra a $[Ca^{2+}]_i$ markáns változása; Ca^{2+}_i-függésük következtében emelkedik, vagy csökken a szív adaptációs képessége, illetve aritmia hajlama?*

a) Vannak-e egészséges szívizomban működő SK2 csatornák? Ha igen, változik-e az AP gátlásukat követően normális, illetve csökkent repolarizációs rezerv esetén?

b) Milyen irányban és mértékben befolyásolja a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése az AP repolarizáció késői fázisában és a nyugalmi potenciál beállításában és stabilizációjában kiemelkedő jelentőségű I_{K1} nagyságát. Lehet-e a $[Ca^{2+}]_i$-függésnek aritmogén következménye?

2) *Van-e fiziológiás körülmények között a részleges, szelektív NCX gátlásnak szignifikáns befolyásoló hatása a Ca^{2+}_i háztartásra és a miokardium kontraktilitására?*

a) Van-e a szelektív NCX gátlásnak mérhető hatása egészséges nagy emlős (kutya és humán) szív Ca^{2+}_i háztartására és kontraktilitására?

b) Eltérnek-e ezektől a kis emlős (patkány) szívben azonos körülmények között mért változások? Ha igen, miért?

c) Van-e eltérés a kevésbé szelektív NCX gátló SEA0400 és az újabb, szelektívebb ORM-10103 Ca^{2+}_i homeosztázisra gyakorolt hatásai között?

3) *Jelenthet-e egyes szívbetegség modellekben a szelektív, részleges NCX gátlás perspektivikus terápiás stratégiát a Ca^{2+}_i háztartás zavarai által generált aritmiák kialakulása ellen?*

a) Részleges, szelektív NCX gátlással csökkenthetők-e az $I_{Na,L}$ aktiválása következtében kialakuló $[Na^+]_i$ emelkedés aritmogén következményei a Ca^{2+}_i homeosztázisban és az AP paramétereiben?

b) Szimulált iszkémia/reperfúzió során részleges, szelektív NCX gátlás alkalmazásával csökkenthetők-e a Ca^{2+}_i háztartás aritmogén eltolódásai és az AP paramétereinek aritmogén változásai, illetve javíthatók-e a sejtek túlélési esélyei?

4) *Izolált, perfundált szívben a két kicserélő kombinált gátlásával fokozható-e az NCX vagy NHE gátlás reperfúziós aritmiákkal szemben kifejtett antiaritmiás hatása?*

a) Hogyan változnak a fontosabb hemodinamikai paraméterek a regionális I/R ciklus során kontroll, illetve NCX és/vagy NHE gátlóval előkezelt szívekben?

b) Alkalmas-e a részleges NCX gátlás a reperfúziós fázisban kialakuló kamrai aritmiák megelőzésére?

c) Hogyan viszonyul egymáshoz a részleges, szelektív NHE, illetve NCX gátlás hatékonysága az egyes reperfúziós aritmiatípusok vonatkozásában?

d) Fokozható-e a részleges NHE és/vagy NCX gátlás antiaritmiás hatékonysága a két gátlószer kombinált alkalmazásával?

dc_1149_15

4. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK

4.1. Etikai engedélyek

Az értekezés alapjául szolgáló kísérleti projektek megfelelnek az Európai Közösség, illetve az USA laboratóriumi állatok tartására és felhasználására vonatkozó irányelveinek (USA: NIH publication no 86–23, revised 1985). Kísérleti protokolljaink rendelkeznek a Szegedi Tudományegyetem „Állatvédő Tudományetikai Bizottság" engedélyével (engedélyszám No. 54/1999 Oej, I-74-9/2009). A humán donorokból származó egészséges szívekből a pulmonális- és aortabillentyűk a kísérleteket megelőzően eltávolításra és transzplantációra kerültek. A transzplantációt megelőzően a szervdonorok plazma expanderek, furosemid és dobutamin kivételével medikációban nem részesültek. Minden általunk használ humán kísérleti protokoll megfelel a Helsinki Deklaráció irányelveinek és rendelkezik a Szegedi Tudományegyetem „Humán Orvosbiológiai Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága" engedélyével (engedélyszám No. 717. No. 63/1997).

4.2. Preparátumok

4.2.1. Izolált kamrai szívizomsejtek

Az optikai (Ca^{2+}_i tranziens, NADH, stb.), méréseket kevés kivétellel, a patch clamp és single-cell AP méréseket minden esetben izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket legtöbbször kutya, nyúl, vagy patkányszívből, enzimatikus módszerrel izoláltuk.

Patkány. Felnőtt hím, 150–200 g súlyú, Sprague–Dawley patkányokból izolált szíveket, Langendorff szerint, retrográd irányban, az aortacsonkon keresztül, 2mM $CaCl_2$-ot tartalmazó, 37 °C-os Krebs–Henseleit oldattal perfundáltuk. Az oldat pH-ját, 5 percig 95% O_2 + 5% CO_2 keverékével telítve, 7.35 ± 0.05 értékre állítottuk be. Ezt követően a szuperfúziót átkapcsoltuk Ca^{2+}-mentes Krebs–Henseleit oldatra. 8 perc után a perfúziós oldatot 0.5 g/l kollagenáz (Type I, Sigma) + 0.5 g/l hialuronidáz + 200 μM $CaCl_2$ hozzáadásával kiegészítettük, és a szíveket 7 percig az enzimtartalmú oldattal perfundáltuk. A szeparációs eljárás végeztével a jobb kamrai izomszövetet kis darabokra vágtuk és óvatosan trituráltuk. A frissen izolált sejteket tároló oldatba helyeztük (mM-ban: HEPES 10.0, KOH 89.0, KCl 30.0, taurin 15.0, KH_2PO_4 10.0, glutamát 70.0, $MgCl_2$ 0.5, glukóz 10.0, EGTA 0.5; pH = 7.3) és felhasználásukig szobahőmérsékleten tároltuk.

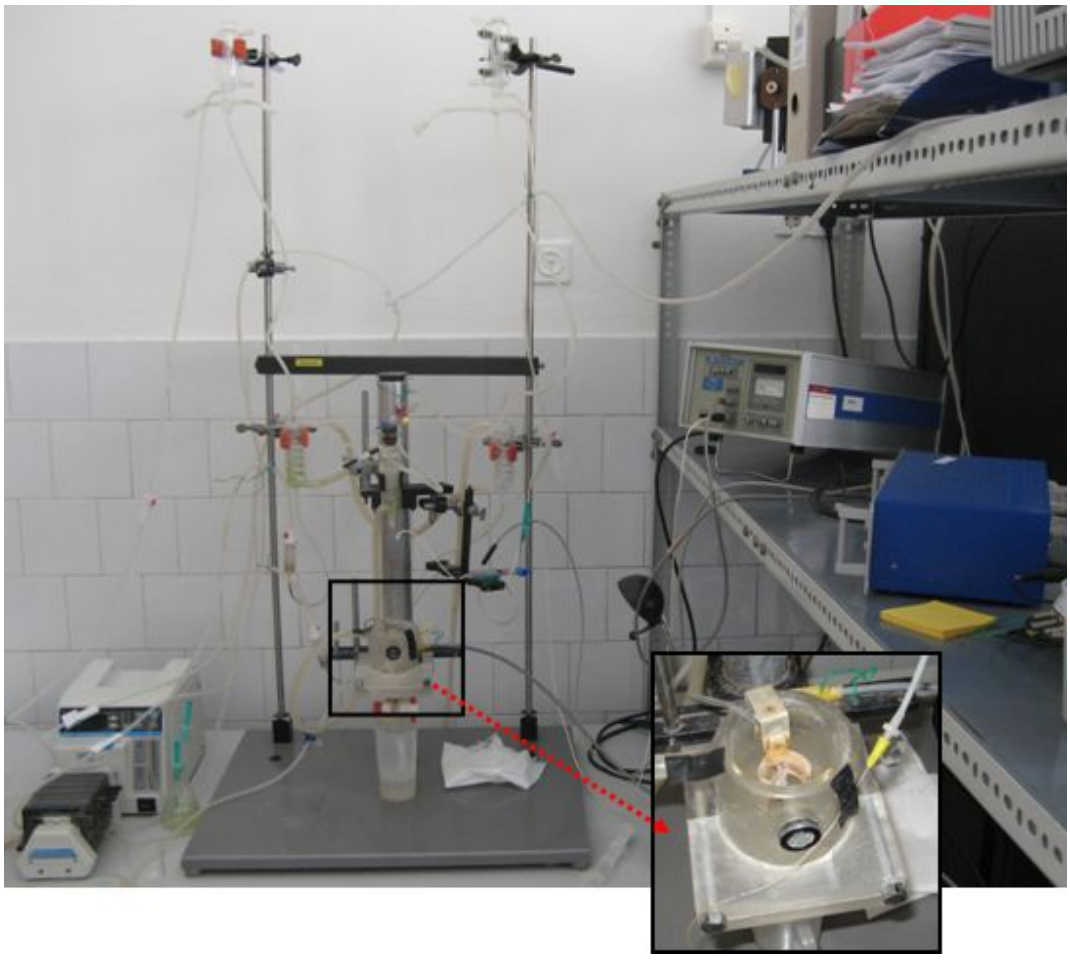
Kutya. Kamrai szívizomsejteket mindkét nemű felnőtt keverék kutyák szívéből szegmens-perfúziós módszerrel nyertünk. A 10–20 kg súlyú állatokat 30 mg/kg thiopental i.v. alkalmazásával altattuk. A mellkas nyitást követően a szívet eltávolítottuk, a bal kamra ék alakú szegmensét az anterior coronaria descendensen keresztül, Langendorff apparátus segítségével 1.2 mM $CaCl_2$ + 10mM HEPES + 2.5 g/l taurin + 0.175 g/l piruvát + 0.75 g/l ribóz hozzáadásával kiegészített módosított MEM (Minimum Essential Medium, Joklik módosítás, Sigma, M-0518) oldattal perfundáltuk (pH = 7.2). A vér eltávolítását követően a perfúziót 10 percre átkapcsoltuk Ca^{2+}-mentes MEM oldatra. A sejtszeparálást 0.5 g/l kollagenázzal (Sigma I) végeztük, 40 percig, 50-75 μM $CaCl_2$ jelenlétében. A 37 °C-on stabilizált oldatokat 100% oxigénnel buborékoltattuk. Végül a szegmens egy részét kisebb darabokra vágtuk és óvatosan megnyomkodtuk a sejtek kinyerése céljából. A frissen izolált sejteket felhasználásukig szobahőmérsékleten tároltuk. A sejtek > 60%-a a normál külső Ca^{2+} szint helyreállítása után szabályos alakot vett fel, jól azonosítható harántcsíkolattal.

dc_1149_15

4.2.2. Izolált multicelluláris preparátumok

Az AP méréseket általában multicelluláris preparátumon végeztük, melyet kutya kamrából (néha patkány, vagy humán szívből) izoláltuk. Mindkét nemű, 10–20 kg súlyú, felnőtt keverék kutyákat thiopentállal altattuk (30 mg/kg). A jobboldali mellkas nyitást követően a szívet gyorsan eltávolítottuk és azonnal jéghideg Tyrode oldattal (mM-ban: NaCl 144, NaH_2PO_4 0.33, KCl 4, $MgCl_2$ 1, glukóz 5.5, HEPES 5, and $CaCl_2$ 2) átöblítettük. A Tyrode oldat pH-ját 7.4-re állítottuk. Papilláris izmokat és trabekulákat a sejtizolálással **(4.2.1.)** párhuzamosan, a jobb kamrából, operációs mikroszkóp alatt izoláltunk. A preparátumot 40 ml térfogatú plexi kamrában 37 °C-os, oxigénnel telített Tyrode vagy Krebs–Henseleit oldattal perfundáltuk, illetve platina elektródokkal, kétszeres diasztolés feszültségküszöb amplitúdójú négyszögimpulzusokkal (1 Hz, 2 ms) folyamatosan stimuláltuk (Hugo Sachs Elektronik, model 215/II), és a Krebs–Henseleit oldatban legalább 60 percig hagytuk ekvilibrálódni. Az izolálási technika minden speciesre hasonló volt.

4.2.3. Izolált perfundált (Langendorff) patkányszív



11. ábra Az izolált szív mérésekre használt módosított Langendorff perfúziós rendszer. A szívet állandó nyomáson perfundáltuk, a koronáriaáramlást Doppler ultrahang rendszerrel mértük, a bal kamrai nyomást latex miniballon segítségével regisztráltuk. A 3 csatornás EKG méréseket platinaelektródokkal végeztük.

Hím 250 – 350 g súlyú Spraque-Dawley patkányokat thiopentállal (0.1 g/kg, i.p.) altattuk, és 500 IU (i.v.) heparinnal előkezeltük. A szíveket gyorsan eltávolítottuk, majd az aortánál felfogatva módosított Langendorff apparátuson (Experimetria, Magyarország) rögzítettük, (11. ábra), és retrográd irányban, állandó nyomáson (60-80 mmHg), módosított Krebs–

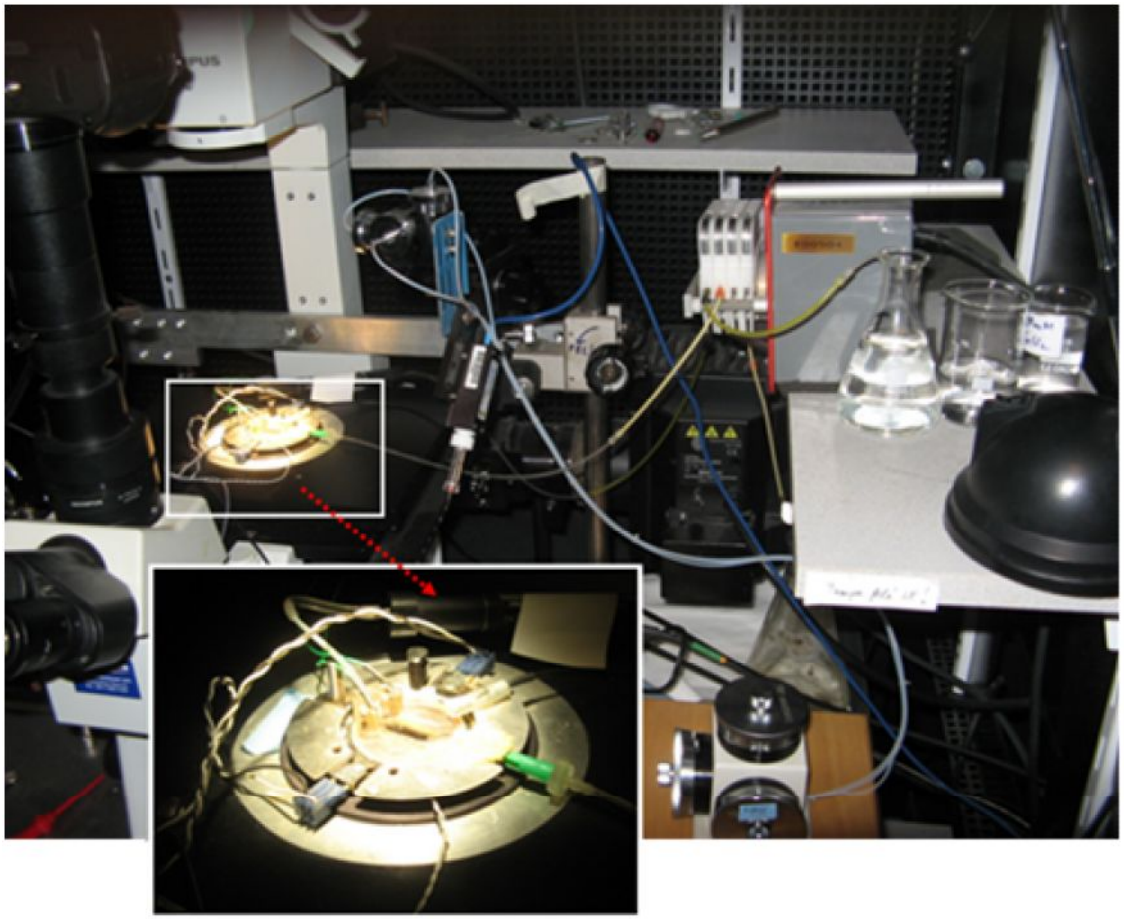
dc_1149_15

Henseleit bikarbonát (KHB) oldattal (mM-ban: $NaHCO_3$ 25; KCl 4.3; NaCl 118.5; $MgSO_4$ 1.2; KH_2PO_4 1.2; Na-piruvát 5; glukóz 11; $CaCl_2$ 2), 37 °C-on perfundáltuk. A KHB oldatban a pH-t karbogénnel (95% O_2 + 5% CO_2) buborékoltatva 7.4 ± 0.05 értéken stabilizáltuk. A koronária áramlást (CF) ultrahangos Doppler áramlásmérővel (T106, Transonic Systems Inc. USA) mértük, a bal kamrai nyomást (LVP) a kamrába mediális metszésen keresztül behelyezett elasztikus ballonnal folyamatosan regisztráltuk. A perfúziós nyomást, az perfúziós oldat hőmérsékletét, és 3 csatornás elektrokardiogramot (ECG) Experimetria gyártmányú transzducer erősítő rendszerrel + Haemosys szoftverre folyamatosan regisztráltuk A bal kamra kontraktilitására jellemző $\pm dP/dt_{max}$ értékeket és a szívfrekvenciát (HR) a mért LVP görbéből, off-line határoztuk meg.

4.3. Optikai mérési protokollok izolált szívpreparátumokon

4.3.1. Ca^{2+} tranziens mérések

A méréseket Olympus IX 71 invertált fluoreszcens mikroszkóppal (12. ábra) végeztük. Az izolált sejteket 15-35 percig töltöttük szobahőmérsékleten egy Ca^{2+}-érzékeny fluoreszcens festékkel (2 µM Fluo 4-AM). A feltöltött sejtszuszpenzióból egyetlen cseppet helyeztünk egy kis térfogatú sejtkamrába (RC47FSLP, Warner, USA).



12. ábra Izolált szívizomsejt Ca^{2+} tranziensének és ionáramainak egyidejű meghatározására alkalmas mérőrendszer. A CaT meghatározás vagy egyetlen hullámhosszon, vagy arányméréses (ratiometric) módszerrel történhet, az ionáramok meghatározása a patch clamp technika egészsejtes, vagy perforált patch konfigurációjában történik. Ionáram mérés helyett a sejt akciós potenciálja is meghatározható, konvencionális mikroelektród technikával.

dc_1149_15

A szuperfúzió elindítása előtt legalább 10 percet hagytunk a sejtek stabil letapadására, majd folyamatos 37 °C-os Tyrode szuperfúzió mellett 1 Hz téringerlést alkalmaztunk. Az optikai jeleket fotonszámláló modulokkal (H7828, Hamamatsu, Japan) 200 - 1000 Hz mintavételezéssel mértük. A fluoreszcens festéket 480 nm hullámhosszon gerjesztettük, az emittált fluoreszcenciát 535 nm-en határoztuk meg. Az adatfeldolgozást Experimetria gyártmányú Isosys software-rel végeztük. A mért fluoreszcencia intenzitásokat sötétáram, nemspecifikus háttér és bleaching artefaktokra korrigáltuk, majd digitálisan simítottuk.
A $[Ca^{2+}]_i$ változását általában kontroll értékre normalizált formában (F/F_0) fejeztük ki.
A kombinált optikai + patch clamp mérések során a Fluo 4-AM helyett a pipettaoldatban a Fluo 4 pentakálium sóját alkalmaztuk. Ebben az esetben téringerlés helyett a pipettán keresztül ingereltünk. A patch clamp mérések egy részében, mivel az optikai mérés célja ilyenkor csak a CaT kialakulásának igazolása volt, a meghatározott fluoreszcencia jelet nem korrigáltuk, csak simítottuk.

Egyes korai CaT mérésekben az aránymérő (ratiometric) fluoreszcencia módszert alkalmaztuk. A patkány szívizomsejteket 30 percig Fura-2-AM-mel (2 μM) inkubáltuk.

A sejteket xenon ívlámpával (Optosource, Cairn, UK) 360 + 380 nm hullámhosszakon gerjesztettük. A hullámhosszak kapcsolására (100 Hz) galvanométer monokromátort (Optoscan, Cairn, UK) használtunk. Az 510 mn-en emittált fluoreszcenciát analóg fotoelektron-sokszorozóval (PMT) detektáltuk. A demultiplexelt optikai jeleket (360/380 nm) *Acquisition Engine* software-rel (Cairn) dolgoztuk fel. A $[Ca^{2+}]_i$ változások becslésére nemspecifikus háttérfluoreszcencia-korrekciót követően a 360 és 380 nm-es gerjesztés mellett meghatározott fluoreszcencia intenzitásváltozások hányadosát (I_{360}/I_{380}) használtuk. Multicelluláris preparátumokon a CaT méréseket a sejtszintű CaT mérésekhez hasonlóan végeztük. A kutya, vagy patkány jobb kamrai szövetmintákat szobahőmérsékleten 25 μM Fluo 4-AM festékkel 50 percig töltöttük. A szövetmintát ez esetben is a „Quick Change" kamrában (RC47FSLP), Olympus IX 71 invertált fluoreszcens mikroszkópon 1 Hz téringerléssel stimuláltuk. Az optikai jeleket fotonszámláló fotomultiplier (Hamamatsu, H7828) modullal 0.2 - 1 kHz mintavételezés mellett határoztuk meg. A Fluo 4-et 480 nm-en gerjesztettük, az emittált fluoreszcenciát 535 nm-en mértük. Az adatfeldolgozást és analízist Isosys software-rel (Experimetria, Hungary) végeztük. A mért fluoreszcens adatokat a nemspecifikus háttér és bleaching artefaktokra korrigáltuk és simítottuk.
Az $[Ca^{2+}]_i$ változásait általában kontroll értékre normalizált formában (F/F_0) fejeztük ki.

4.3.2. Koffein tranziens meghatározása

A koffein-indukált $Ca^{2+}{}_i$ tranziensek meghatározása során a ~ 100 μm csúcsátmérőjű mikropipetta csúcsát mikromanipulátor segítségével a kiválasztott sejt közvetlen közelébe (< 100 μm távolságra) juttattuk. 1 perces kondicionálást (1 Hz) követően a 10 mM koffein tartalmú Tyrode oldatot mikropipettával 6 másodpercig, 50 mL/perc áramlási sebességgel közvetlenül a sejtfelszínre juttattuk. A kontroll koffein pulzust 2 perc után megismételtük. További 2 perc után a perfúziós oldatot NCX gátlót (1 μM SEA0400) tartalmazó Tyrode oldatra átkapcsoltuk, majd újabb 5 perc perfúzió után a koffein pulzuspárt megismételtük. A két pulzus között eltelt 2 perc időtartam általában több, mint elegendő volt az $[Ca^{2+}]_{SR}$ helyreállásához; amennyiben a pulzuspárra kapott tranziensek amplitúdója között 10%-nál nagyobb eltérést mérünk, a mérést elvetettük. A két kontroll és két teszt koffein görbét sötétáramra, nemspecifikus háttérre és a bleaching artefaktra korrigáltuk, majd átlagoltuk, végül az amplitúdóra normalizáltuk. A Ni^{2+} hatásának vizsgálata során a sejteket a koffein pulzust 15 másodperccel megelőzően indítva, 10 mM $NiCl_2$ tartalmú oldattal, a koffein pulzus végéig perfundáltuk.

dc_1149_15

4.3.3. NADH mérések

Az aerob → anaerob metabolikus átmenettel párhuzamosan az intramitokondriális NAD^+ tartalom egy része fokozatosan redukálódik. Mivel kizárólag a redukált forma fluoreszcens, a $[NADH]_{mito}$ emelkedése optikai úton is követhető, és mértéke az iszkémia mélységének elfogadott indikátora [441]. Ezekben a kísérletekben a NADH-t 360 nm hullámhosszon higanygőz ívlámpa (HBO 100/W3) segítségével gerjesztettük, a natív (túlnyomórészt $NADH_{mito}$-ból származó) szöveti fluoreszcenciát 450 nm-en detektáltuk. A háttérkorrigált NADH fluoreszcencia-növekedést a kísérlet végén, 10 mM NaCN alkalmazásával indukált maximális növekedés arányában kifejezve jellemeztük az iszkémia mélységét.

4.3.4. Szívizomsejtek túlélési arányának meghatározása

Natív, 1 Hz-en stimulált szívizomsejteken szimulált I/R protokollt alkalmaztunk. A túlélés elemzésére véletlenszerűen kiválasztott mikroszkóp látótérben (Olympus IX 71 invertált mikroszkóp, 20x objektív) reprezentatív, köralakú, túlnyomórészt szabályosan kontraháló sejteket tartalmazó régiókat (region of interest, ROI) jelöltünk ki, amelyekről Olympus fényképezőgéppel (C-7070) periodikusán állóképeket készítettünk.

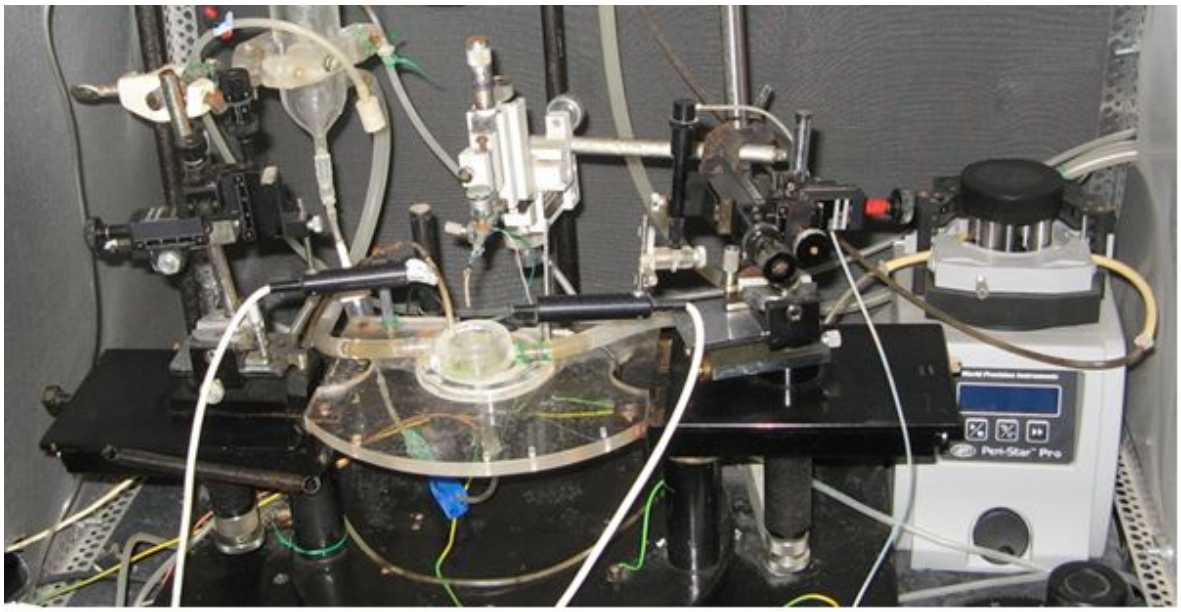
Az élő/elpusztult sejtek megkülönböztetésére gyakran alkalmazott vitális sejtfestés technika helyett egy másik, de hasonlóan megbízható módszert választottunk, amely az osztályozást morfológiai paraméterek (alak és látható harántcsíkolat) alapján végzi [442]. Az osztályozás során a megfigyelt sejteket két nagy csoportra osztottuk: **A:** szabályos alakú sejtek, intakt határokkal és jól azonosítható harántcsíkolattal; **B:** elpusztult vagy erős kontraktúrában lévő sérült sejtek, amelyekben a harántcsíkolat nem látható. A túlélő (működőképes) és elpusztult, vagy kontrakúrában lévő sejtek számát és arányát a protokoll során rendszeresen (0, 1.5, 3, 4, 10, 15, 23, 24, 26, 30 és 32 perc után) meghatároztuk.

4.4. Akciós potenciál és EKG mérések

Multicelluláris preparátumokon történő AP mérések céljából (13. ábra) 3 M KCl oldattal töltött, 10–20 MΩ ellenállású, hegyes mikroelektródokat erősítőhöz (Biologic, model VF 102) csatlakoztattuk, amelynek feszültségkimenetét kétsugaras memória oszcilloszkópon (Tektronix, M2230) monitoroztuk, továbbá 40 kHz-en mintavételeztük (ADA 3300, RTD, USA). Az APD_{90} meghatározása házi készítésű (HSE-APES), vagy Evokewave v1.49 (Unisip Ltd.) software-rel történt. A preparátumot akkor tekintettük megfelelőnek (közel fiziológiás állapotúnak), ha az AP amplitúdója 100 mV-nál nagyobb volt és a kontroll APD_{90} értékek kutya preparátumokban a 200–220 ms, patkány preparátumokban az 50–80 ms tartományba estek. Az out-of-range preparátumot kizártuk. Amennyire lehetett, a mérés során a teljes kísérleti protokollt egyetlen szúrásból teljesítettük, ha ez nem sikerült, egy új sejtből regisztrálva kíséreltük meg a mérés folytatását. Amennyiben az új sejtben az APD_{90} időtartama az előzőtől 5%-nál nagyobb mértékben eltért, a kísérletet elvetettük. Az on-line adatfeldolgozás optimalizálása céljából a mérésekben kettős mintavételezést alkalmaztunk; az AP kezdeti, gyors fázisában (50 ms-ig) 40 kHz, az ezt követő lassabb fázisban 1 kHz frekvencián. További jelszűrést nem alkalmaztunk.

Izolált szívizomsejtek akciós potenciálját, szintén a konvencionális mikroelektród technika alkalmazásával, 3 M-os KCl oldattal töltött, nagy ellenállású, hegyes mikroelektródok segítségével határoztuk meg. A potenciálváltozásokat Axoclamp 900A erősítővel (Axon Instruments) mértük, a regisztrált görbékből off-line Clampfit 10.0 software-rel (Molecular Devices) határoztuk meg az AP legfontosabb paramétereit (amplitúdó, APD_{25}, APD_{90}, trianguláció, plató potenciál), valamint a nyugalmi potenciált.

dc_1149_15



13. ábra Multicelluláris AP mérésre használt mérőberendezés. A rendszerrel egyidejűleg két (pl. kamrai és Purkinje) AP határozható meg. A mérések konvencionális mikroelektród technikával történnek.

4.5. Árammérési protokollok izolált szívpreparátumokon

4.5.1. Mérések „whole cell" patch clamp technikával

A kísérleti környezet azonos volt az optikai mérésekével (RC47FSLP sejtkama, Olympus IX 71 invertált mikroszkóp). A mikropipettákat boroszilikátüveg kapillárisokból (Clark Electromedical) microprocesszor-vezérelt horizontális pipettahúzóval (Sutter Instruments) készítettük. A pipetta feltöltését követően a mikroelektród ellenállása 1.5–2.5 MΩ volt.
Az áramokat Axopatch 1-D (Axon Instruments) erősítővel mértük, egészsejtes patch clamp konfigurációban. A gigaseal kialakításához finom szívást alkalmaztunk, a membránt is így, vagy rövid elektromos impulzusok alkalmazásával nyitottuk ki. A soros ellenállást 80%-ig kompenzáltuk. A membránáramokat 5-20 kHz mintavételi frekvenciával, Digidata 1200 vagy 1440A konverterrel digitalizáltuk, majd off-line analízis céljára tároltuk. Az analízist software (pClamp 6.0-10.0) kontroll mellett alul áteresztő szűrést követően végeztük.

4.5.2. A Ca^{2+} áram ($I_{Ca,L}$) meghatározása

Az $I_{Ca,L}$ mérésére a sejtek intracelluláris miliőváltozásainak megakadályozása céljából a perforált patch clamp módszert alkalmaztuk. Ez a módszer lehetővé teszi az $[Ca^{2+}]_i$ dinamikus változásainak vizsgálatát. A pipetta oldatot (mM-ban: K-glutamát 120, KCl 25, MgCl2 1, HEPES 10, és EGTA 5; pH 7.4) a mérést megelőzően 200 μg/ml amphotericin B-vel egészítettük ki, mely sejtmembránba jutását követően az ellenállás 15–20 MΩ –on stabilizálódott. Az $I_{Ca,L}$ mérési protokollban a külső oldat összetétele (mM-ban: NaCl 138, KCl 4, MgCl2 1, CaCl2 1.8, NaHPO4 0.33, glükóz 10, HEPES 10; pH 7.4) volt.

4.5.3. Az apamin-szenzitív K^+ áram (I_{SK-AS}) meghatározása

A külső oldat (mM-ban): N-metil-glukózamin 140.0, KCl 4.0, MgCl2 1.0, glukóz 5.0, és HEPES 10.0; pH = 7.4), a pipettaoldat (mM-ban: K-glukonát 144.0, MgCl2 1.15, BAPTA 5.0, HEPES 10.0; pH = 7.2) volt. A pipettaoldat Ca^{2+} koncentrációját ($[Ca^{2+}]_{pip}$) a WinMaxC software-ből [443] számolt $CaCl_2$ + BAPTA keverékkel 900 nM-ra állítottuk.

dc_1149_15

A Ca^{2+} és BAPTA gyors diffúziója alapján feltételezhető, hogy a sejt dialízisét követően a $[Ca^{2+}]_i$ és a $[Ca^{2+}]_{pip}$ *közelítőleg* megegyezik. A membránáramokat 100 nM apaminkezelés előtt és után is meghatároztuk. A külső oldat a I_{Na}, $I_{Ca,L}$, és I_{NCX} gátlása céljából Na^+- és Ca^{2+}-mentes volt. Az I_{SK-AS} nemspecifikus gátlásának elkerülése érdekében ioncsatorna gátlószert nem használtunk. Az SK-AS áramot, a sejtek intracelluláris miliőváltozásainak megakadályozására és a $[Ca^{2+}]_i$ dinamikus szabályozó szerepének vizsgálatát segítendő, a Ca^{2+} áramhoz hasonlóan, perforált patch clamp módszerrel is meghatároztuk (a részleteket lásd fenn). Ezekben a mérésekben a $[Ca^{2+}]_i$ egyidejű meghatározása érdekében a sejteket Fluo 4-AM (5 µM) festékkel is feltöltöttük.

4.5.4. A befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) meghatározása

Az I_{K1}-et egészsejtes patch clamp módszerrel határoztuk meg. A pipetta oldatot (mM-ban: kaszpartát 100, KCl 40, K_2ATP 5, $MgCl_2$ 1, HEPES 10; a pH = 7.2, KOH-dal beállítva) a megfelelő EGTA/BAPTA + $CaCl_2$ kombinációval pufferelték, illetve a CaT zavartalan kialakulása érdekében nem pufferelték. Ez utóbbi esetben a pipettaoldat készítéséhez Ca^{2+}-mentes vizet (Sigma) használtunk. Az oldat $[Ca^{2+}]$-ját ($[Ca^{2+}]_{pip}$) a WinMaxC software-rel számoltuk ki. A magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ tartalmú oldatban az aktuális ($[Ca^{2+}]_{pip}$ értékét Ca^{2+}-érzékeny elektróddal (WPI Inc.), 5 Hz mintavételi frekvencián ellenőriztük.

4.5.5. A késői Na^+ áram ($I_{Na,L}$) meghatározása

A szívizomsejteket a I_{NKA} és az $I_{Ca,L}$ gátlása céljából 20 µM ouabaint, illetve 1 µM nizoldipint tartalmazó K-mentes Cs-Tyrode oldattal (mM-ban: NaCl 135, CsCl 10, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 1, $BaCl_2$ 0.2, NaH_2PO_4 0.33, TEAC1 10, HEPES 10, glukóz 10; pH = 7.4, NaOH-dal beállítva) perfundáltuk. A pipettaoldat (mM-ban: CsOH 140, aszpartát 75, TEACl 20, Mg-ATP 5, HEPES 10, NaCl 10, EGTA 20, $CaCl_2$ 10; pH = 7.2, KOH-val beállítva) $[Ca^{2+}]$-ját (WinMaxC) 160 nM-ra állítottuk. Az $I_{Na,L}$-t 200 ms, -80 mV tartó potenciálról -20 mV-ra depolarizáló pulzusokkal aktiváltuk.

4.5.6. Az NCX áram meghatározásával kapcsolatos kísérleti protokollok

I_{NCX} meghatározása RAMP protokollal. Az I_{NCX} mérésére szintén az egészsejtes patch clamp technikát alkalmaztuk. A sejtet K^+-mentes oldattal (mM-ban: NaCl 135, CsCl 10, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 1, $BaCl_2$ 0.2, NaH_2PO_4 0.33, TEACl 10, HEPES 10, glukóz 10; pH = 7.4) perfundáltuk, amely a Na^+ , K^+, Ca^{2+}, és NKA áramok gátlása céljából 20 µM ouabaint, 1 µM nizoldipint és 50 µM lidokaint tartalmazott. A pipettaoldatban (mM-ban: CsOH 140, aszpartát 75, TEACl 20, Mg-ATP 5, HEPES 10, NaCl 20, EGTA 20 és $CaCl_2$ 10; pH = 7.2) a $[Ca^{2+}]_{pip}$ a WinMaxC software szerint 140 nM volt. A $CaCl_2$ és EGTA/BAPTA koncentrációk változtatásával eltérő $[Ca^{2+}]_{pip}$ értékek állíthatók be (55, 140, 500 és 1000 nM). Az I_{NCX}-et 0.05 Hz frekvenciájú, 100 mV/s sebességű ramp pulzusokkal határoztuk meg. A membránt -40 mV tartópotenciálról +60 mV-ra depolarizáltuk, majd -100 mV-ra hiperpolarizáltuk, végül a potenciál visszatért a -40 mV tartópotenciálra. A kifelé/befelé irányuló NCX áramokat először kontroll oldatban, majd 10 mM $NiCl_2$ tartalmú oldatban a ramp leszálló szárán, +40/-80 mV értékeknél határoztuk meg. Az I_{NCX}-et a Ni^{2+}-érzékeny különbségi árammal jellemeztük. Ha az NCX gátlás nagyságát is meg kívántuk határozni, a kontroll méréseket követően az áramot 1 µM SEA0400, illetve 10 µM ORM10103, majd 10 mM $NiCl_2$ jelenlétében ismét megmértük. A gátlás mértékét a gátlószer-indukált, illetve a gátlószer + Ni^{2+} indukált áramcsökkenések hányadosával jellemeztük.

A SEA0400-, vagy ORM 10103-érzékeny áram meghatározása. A normál körülmények között, illetve I_{NaL} aktivációt követően mért SEA0400- és ORM10103-érzékeny áramok

dc_1149_15

összehasonlításakor a Na^+, Ca^+, illetve NKA áramokat nem gátoltuk. Parancspotenciálként tipikus kamrai AP-t használtunk. A SEA0400- vagy ORM10103-függő áramokat az előzőekhez hasonlóan, különbségi áramként határoztuk meg. Egyes kísérleti protokollok esetében az NCX által szállított töltésmennyiséget is kiszámoltuk.

Az $I_{Na,L}$ és $_{rev}I_{NCX}$ egyidejű meghatározása. A pipettaoldat 15 mM NaCl-ot tartalmazott. A Ca^{2+}-aktivált Cl^- ($I_{Cl(Ca)}$) áramot 100 µM niflumínsavval gátoltuk. A I_{NaL} és $_{rev}I_{NCX}$ meghatározására 200 ms időtartamú, -80 mV-ról (tartópotenciál) -20 mV-ra, majd +40 mV-ra történő feszültségugrásokat alkalmaztunk. A kezeletlen (kontroll) csoportban a teljes áramot mértük, ezután 1 µM veratridin, majd 10 mM $NiCl_2$ alkalmazását követően a mérést megismételtük. A SEA0400 csoportban a sejteket 1 µM SEA0400-zal előkezeltük, ezután alkalmaztuk a fenti protokollt. Az I_{NCX}-et mindkét csoportban a kontroll (maximum) - Ni^{2+} kezelt (minimum) áramokhoz viszonyítva, relatív értékben adjuk meg.

Az $I_{Ca,L}$ és $_{fwd}I_{NCX}$ egyidejű meghatározása. A méréseket Cs-Tyrode oldatban végeztük. A pipettaoldat 5 mM NaCl-ot tartalmazott a $_{rev}I_{NCX}$ komponens minimalizálása céljából. A pipettaoldat [Ca^{2+}]-ját nem pufferelték. Az $I_{Ca,L}$ aktiválását 50 ms időtartamú, -80 mV-ról (tartópotenciál) 0 mV-ra történő feszültségugrással aktiváltuk. A farokáramot -80 mV-on határoztuk meg. A kezeletlen (kontroll) csoportban mért áramot összehasonlítottuk a 2 µM forskolinnal stimulált csoportban mért árammal. Az ORM10103 csoportban a sejteket 10 µM ORM10103-mel előkezeltük, ezután alkalmaztuk a forskolin stimulációt.

4.6. Kontrakció (sejtrövidülés) mérése izolált sejteken

A sejtrövidülést video detektor rendszerrel mértük (VED-105, Crescent Electronics, Sandy, UT, USA). A mérés alapelve az izotóniás kontrakció következtében elmozduló sejthatárok dinamikus követése a képen kijelölt két mozgatható rasztervonalon mérhető fényintenzitás-értékekből a sejthatárokat jelző fekete-fehér, illetve fehér-fekete átmenetek pozíciójának meghatározásával. A harántcsíkolat zavaró hatásából adódó mérési hibák minimalizálása céljából a baloldali ablakban kizárólag az első, a jobboldaliban kizárólag az utolsó átmenet pozíciója kerül rögzítésre. A kontrakció-indukált sejthossz-változásokat relatív skálán, a diasztolés hosszra normálva adjuk meg.

4.7. További mérési technikák

4.7.1. Immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia

Az izolált kutya és patkány kamrai szívizomsejteket acetonnal fixáltuk. Immunfestés előtt a mintákat kalciummentes foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) rehidráltuk és szobahőmérsékleten, 120 percig, majd 1% marha szérum-albumin tartalmú PBST (0.01% Tween-20 PBS) oldatban rögzítettük. Az indirekt immunfluoreszcens festést szobahőmérsékleten, 1:50 hígítású nyúl poliklonális anti-SK2 (anti-KCa2.2, Alomone) primer antitesttel, illetve 1:1000 hígítású Alexa Fluor 448 jelölt konjugált kecske anti-nyúl IgG (Molecular Probes) szekunder antitesttel végeztük. 60 perces, primer antitesttel végzett inkubációs periódust követően újabb 60 perces, szekunder antitesttel végzett inkubációs periódus következett. Az inkubációs periódusokat követően a mintákat PBST-vel átöblítettük. A kontroll mintákat csak a másodlagos antitesttel inkubáltuk. Mikroszkópos vizsgálatok céljára a sejteket Aqua Poly/Mount-ban (Polysciences Inc.) rögzítettük. Az immunfestett fluoreszcens minták képeit Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal, normál paraméter-beállítás mellett rögzítettük.

dc_1149_15

4.7.2. Proteinminták és Western blot analízis

Felnőtt kutya (n = 6) és patkány (Sprague–Dawley, n = 6) kamrai szövetből, illetve kutya és patkány kamrai szívizomsejtekből készített egészsejtes tisztított lizátumot használtunk. A szövetmintákat kisebb darabokra vágva Lysis puffer (50 mM Tris–HCl, 1% nonidet P-40, 0.5% deoxikolát, 150 mM NaCl, 10 g/l PMSF, 5 µM leupeptin, 5 µM aprotinin, 5 µg/l Na-vanadát) + proteázinhibitor koktélban (Sigma) Polytron-nal homogenizáltuk, majd 4 °C hőmérsékleten centrifugáltuk (10,000 g, 15 min). A proteinkoncentrációt a felülúszót leválasztva, BSA standard mellett, Löwry módszerrel mértük. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist 10% akrilamid/bis-akrilamid gélben végeztük. A frakcionált proteineket transzfer pufferben (25 mM Tris–HCl, 150 mM glicin, 20% metanol, pH = 8.3), polivinilidén-difluoride (Immobilon™-P, Millipore) membránra vittük. A nemspecifikus kötődés elkerülése céljából a blotokat rögzítettük (TBST + 10% zsírmentes tej (BioRad)), és a célantigéneket másnapig, 4 °C-on, primer antitesttel, nyúl polikloniális anti-SK2 (Anti-K_{Ca}2.2, Alomone) vagy egér monoklonális α-szarkomer-aktinnal (DAKO) jelöltük. A primer antitest kötődését tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl, vagy anti-egér szekunder antitesttel (DAKO) ellenőríztük, ezt követően javított kemolumineszcencia esszével (ECL Plus kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) tettük láthatóvá. A protein csíkok optikai denzitását Image J és Excel programok segítségével analizáltuk.

4.7.3. Ca^{2+} fluxusok meghatározás SR membrán vezikulumokban

Kutya bal kamrából nehéz SR (HSR) vezikulumokat és RyR2 csatornákat izoláltunk (részletekért lásd **[444]**, majd a vezikulumokat feltöltöttük Ca^{2+}-mal. A Ca^{2+} kiáramlás sebességét abszorpció mérésre konfigurált Fluoromax spektrofluorométerrel (Jobin-Yvon, NJ, USA), extravezikuláris [Ca^{2+}] méréssel becsültük. A korrigált abszorbanciaváltozást (A_{710}-A_{790}) a 710 és 790 nm-en leolvasott transzmittanciaértékekből számoltuk ki [445].
A vezikulumokat 92.5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 180 mM antipirilazo III (ICN Biomedicals, Aurora, USA), 54 mM $CaCl_2$, és 18.5 mM K-MOPS összetételű médiumban szuszpendáltuk; a végső protein koncentráció ~ 260 mg/mL volt. A vezikulumokat a követtében a megfelelő mennyiségű $CaCl_2$ hozzáadását követően Ca^{2+}-mal, aktívan feltöltöttük. A felvételt 1 mM ATP hozzáadásával indítottuk el. A Ca^{2+} kiáramlás sebességét a fényintenzitás változási sebességének, a SEA0400 alkalmazását megelőzően, illetve azt követően leolvasott értékeiből határoztuk meg. A SEA0400 SR-Ca^{2+} felszabadulásra gyakorolt hatását az alábbi két módszerrel vizsgáltuk:

(1) „No inhibition" protokoll. Az ATP-ADP konverzió befejezését követően újabb Ca^{2+} dózist adtunk, aminek célja az extravezikuláris [Ca^{2+}] 20 mM-ra emelésével a Ca^{2+} felszabadulás aktiválása volt. A SEA0400 alkalmazására a Ca^{2+} kiáramlás stabilizálódása után került sor. A Ca^{2+} kiáramlás sebességét a SEA0400 alkalmazása előtt és után ismételten meghatároztuk és összehasonlítottuk.

(2**) „No activation" protokoll***:* alkalmazása során a kívülről bevitt Ca^{2+} mennyisége az előzőeknél jóval kevesebb, az extravezikuláris [Ca^{2+}] 2 mM-ra emeléséhez elegendő volt. Így a bazális Ca^{2+} kiáramlás minimálisra csökkent. Ezt követően SEA0400 alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy fokozza-e az NCX gátlás a Ca^{2+} felszabadulást. A kísérlet végén a vezikulumok Ca^{2+} tartalmát Ca^{2+} ionofor (2 µM A23187) alkalmazásával határoztuk meg. Az extravezikuláris [Ca^{2+}] kalibrálására hasonló eljárást használtunk, azonos médiumban, szintén 2 mM A23187 jelenlétében, hozzáadott ATP nélkül. A kalibrációs görbe a [Ca^{2+}] lépcsőzetes emelését követően leolvasott A_{710} és A_{790} különbségeken (A_{710}-A_{790}) alapult. A szabad Ca^{2+} koncentrációkat az abszolút stabilitási konstansok és a Fabiato és Fabiato által publikált számítógép-program **[446]** segítségével számoltuk ki.

dc_1149_15

A SEA0400 a Ca^{2+} felvétel kezdeti sebességére gyakorolt hatását könnyű SR (LSR) vezikulumokon vizsgáltuk, a fentihez hasonló protokoll alkalmazásával, de ekkor a vezikulumokat először 15 percig inkubáltuk a SEA0400 adott koncentrációjával. A Ca^{2+} felvételt ATP hozzáadásával indítottuk, ezután hozzáadtuk a Ca^{2+}-t. A Ca^{2+} felvétel sebességét a Ca^{2+} hozzáadását követő 30 - 150 s intervallumban leolvasott intenzitás-változások lineáris regresszióval számolt meredekségéből határoztuk meg.

4.8. Modellek és kísérleti protokollok

4.8.1. LQT3 aritmia modell izolált sejteken és multicelluláris preparátumokon

Izolált szívizomsejtekben és szövetpreparátumokban az LQT3-ra jellemző aritmogén változásokat a késői nátriumáram ($I_{Na,L}$) aktiválásával generáltuk. E célból két különböző aktivátort használtunk: a kevésbé szelektív veratridint (0.5 µ) és a szelektívebb ATX II-t (2 nM). A kísérletekben az $I_{Na,L}$ aktiváció több súlyosan aritmogén következményét ($Ca^{2+}{}_i$ túltelődés, spontán diasztolés Ca^{2+} felszabadulás (spark), APD megnyúlás), illetve a részleges NCX gátlás ezekre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Multicelluláris, Purkinje + kamraszövet preparátumban meghatároztuk a $I_{Na,L}$ aktivációja következtében kialakuló APD diszperzió-növekedést és az NCX gátlás erre gyakorolt hatását. A vizsgálatokat 33 kísérleti csoporton (21 izolált sejt csoport, 12 szövetpreparátum csoport), 11 különböző protokoll használatával végeztük. Az alkalmazott árammérési protokollok leírás a **4.4.6.** fejezetben található, az egyes kísérleti csoportok ismertetésére részben az ***EREDMÉNYEK*** fejezetben, részben az ábrafeliratokban kerül sor.

4.8.2. Szimulált iszkémia/reperfúzió modell izolált kutya szívizomsejteken

A vizsgálatok során 4 kísérletsorozatot végeztünk: (1) sejttúlélési mérések; (2) NADH mérések; (3) $Ca^{2+}{}_i$ tranziens mérések; illetve (4) „singe cell" AP mérések. Az NCX maximális, de még szelektív gátlása érdekében 10 µM ORM-10103 dózist használtunk. Ebben a koncentrációban alkalmazva a gátlószer további ioncsatornákon érzékelhető hatást (kivéve minimális I_{Kr} gátlást) nem mutatott (**[447]**).

(1) Sejttúlélési kísérletek: Két kísérleti csoportot alakítottunk ki. Az I/R protokollok azonosak voltak az AP mérésekben alkalmazott protokollokkal (natív, kezeletlen és ORM-10103 kezelt sejtek). Mivel a normoxiás sejttúlélés legalább 1 óráig csaknem 100% volt, időkontroll (TC) mérésekre nem került sor.

(2) NADH mérések. Mivel a NADH önmagában is fluoreszcens, ezeket a kísérleteket natív, külső fluoreszcens festékkel fel nem töltött sejteken végeztük. Két kísérleti csoportot alakítottunk ki. Az első, időkontroll csoportban a sejteket végig oxigénnel telített Tyrode oldattal perfundáltuk; iszkémiát nem alkalmaztunk. A második sejtcsoportot alávetettük a teljes iszkémia/reperfúzió protokollnak.

(3) $Ca^{2+}{}_i$ tranziens mérések. Ezeket a méréseket Ca^{2+}-érzékeny fluoreszcens festékkel (Fluo 4-AM) feltöltött sejteken végeztük. Öt kísérleti csoportot alakítottunk ki. Az első (*időkontroll*) sejtcsoportot végig normoxiás oldattal szuperfundáltuk. A második (*kezeletlen*) sejtcsoporton alkalmaztuk az iszkémia/reperfuzió protokollt. A harmadik (*ORM-10103*) sejtcsoportot a kontroll periódus után, az iszkémia/reperfúzió ciklus előtt, szelektív NCX gátlószerrel, 10 µM ORM-10103-mal előkezeltük. A negyedik és ötödik kísérleti csoportok a második, illetve harmadik csoporttal megegyeztek, azzal a különbséggel, hogy ezeket a sejteket a $_{rev}$NCX transzportaktivitás fokozása érdekében NKA gátlószert, strophantidint (1 µM) tartalmazó oldattal szuperfundáltuk.

dc_1149_15

(4) AP mérések: Három kísérleti csoportot képeztünk. A protokollok mindenben azonosak voltak a Ca^{2+}_i tranziens mérések első három csoportjának protokolljaival (*időkontroll, kezeletlen, ORM-10103 kezelt*), viszont a méréseket natív, fluoreszcens festékkel fel nem töltött sejteken végeztük.

4.8.3. Regionális iszkémia/reperfúzió modell izolált, perfundált patkányszívben

Regionális iszkémia kialakítása céljából 6/0 fonott selyemfonallal a baloldali anterior descendens koronária artéria (LAD) köré hurkot képeztünk. A bal kamrába vízzel töltött latex ballont vezettünk, amelyet addig töltöttünk, míg a kontroll végdiasztolés nyomás (LVEDP) 4-8 mmHg értéket el nem ért. A szíveket a mérés kezdete előtt 10 percig hagytuk stabilizálódni. A hatóanyagok, illetve hordozó perfúzióját 5 perccel a LAD okklúziója előtt indítottuk és a protokoll alatt végig fenntartottuk. A szíveket randomizált módon 6 kísérleti csoportba osztottuk: a kontroll (CON) csoportban a szívet kizárólag a hordozót, dimetil szulfoxidot (DMSO), 0.01% végső koncentrációban tartalmazó KHB oldattal perfundáltuk. Három kísérleti csoportban a szíveket egyetlen gátlószert, 5 µM cariporidot (CAR); 1 µM SEA0400-at (SEA) vagy 1 µM ORM-10103-mat (ORM) tartalmazó KHB oldattal perfundáltuk. Két kísérleti csoportban az NHE és NCX gátlószerek kombinációját, 5 µM cariporid + 1 µM SEA0400 (SEA+CAR), illetve 5 µM cariporid + 1 µM ORM-10103 (ORM+CAR) alkalmaztuk.

Az I/R-indukált aritmiákat a LAD köré vezetett hurok 10 percig tartó megfeszítésével (a LAD leszorításával), majd ezt követő felengedésével váltottuk ki. A sikeres leszorítást a koronária áramlás szignifikáns csökkenése igazolta. Az iszkémiás károsodás kellő homogenitásának biztosítására és sebészeti artefaktok okozta hibák kiküszöbölése céljából, azokat a szíveket, melyek áramlása > 65% csökkenést mutatott, kizártuk. Hasonlóan kizártuk azokat a szíveket, melyekben az iszkémia alatt alakultak ki aritmiák. A 10 perces iszkémiát a leszorítás felengedése után 30 perces reperfúzió követte. A sikeres reperfúziót azonnali áramlásnövekedés igazolta. A regisztrált LVP és ECG görbék off-line analízisével meghatároztuk a sinus-ritmussal (SR), halmozott extraszisztoléval (ES, háromnál több egymás utáni extra ütés), kamrai tachycardiával (VT), valamint kamrafibrillációval (VF) jellemezhető periódusok időtartamát és gyakoriságát. A fibrilláció kialakulását az egyedi QRS komplexek hiánya igazolta.

4.9. Anyagok

Minden vegyszert – azok kivételével, amelyek származási helyét külön említjük - a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől vásároltunk. Minden végső oldatot a kísérlet napján frissen készítettünk. Az apamint 50 mM-os ecetsavban oldottuk és -20 °C-on, 100 µM-os törzsoldatban tároltuk. A $BaCl_2$-ot desztillált vízben oldottuk és 100 mM-os törzsoldatban tároltuk. Az AVE-0118-at, a HMR-1556-ot (mindkettő az Aventis Pharma ajándéka) és a dofetilidet (Richter ajándéka) dimetilszulfoxidban (DMSO) oldottuk, és 1 mM-os törzsoldatban tároltuk. Az inaktív és aktív CaMKII gátlókat (KN-92, illetve KN-93, Calbiochem) szintén DMSO-ban oldottuk, majd 1 mM-os törzsoldatokban tároltuk.

A SEA0400-at és a cariporidot (mindkettőt az SzTE Gyógyszerkémiai Intézetében szintetizálták), az ORM-10103 vegyületet (az Orion Pharma, Espoo, Finland ajándéka), valamint a két Ca^{2+}-érzékeny fluoreszcens festéket (Fura 2-AM és Fluo 4-AM), amelyek a Molecular Probes Inc. (később Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) termékei, szintén DMSO-ban oldottuk. A DMSO-ban oldott hatóanyagok törzsoldatait 4 °C-on tároltuk. A DMSO koncentráció a törzsoldatban, illetve a higított végső oldatokban 5% és

dc_1149_15

0.01% volt. A 0.01% koncentrációban rutinszerűen használt DMSO szívizomsejtekre gyakorolt hatását általában elhanyagolhatónak tekintik.

4.10. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

Adatfeldolgozás: Az egyes módszerek használatával kapcsolatos fontosabb adatfeldolgozási lépéseket a módszerek vagy protokollok részletes leírásánál ismertetjük. Az alábbiakban csak néhány speciális adatfeldolgozási lépés alapelveit foglaljuk össze.

(1) Az optikai (fluoreszcens) jelek korrekciója és normalizálása: A mérések során a Ca^{2+}-érzékeny festékkel feltöltött szívizomsejtek fluoreszcenciája akkor is változik, ha azok semmilyen moduláló hatásnak nincsenek kitéve. A nemspecifikus faktorok (artefaktok) közül a fontosabbak a háttérfluoreszcencia, a bleaching és a festék kiszivárgása (leakage), illetve aktív kipumpálása következtében bekövetkező fluoreszcenciacsökkenés.

A fluoreszcenciajelek korrektebb összehasonlítása céljából az artefaktokat a jelekből az adatfeldolgozás során el kell távolítani. A háttérfluoreszcencia nagyságát a sejt látótérből kimozgatásával lehet viszonylag megbízhatóan megbecsülni. A festékvesztés és a bleaching együttes hatását időkontroll kísérletekből lehet közelítően megbecsülni.

Mivel az egyes szívizomsejtek – még ha azonos izolációból származnak is – térfogatban rendkívül nagy variabilitást mutatnak, fluoreszcens festéktartalmuk a töltési fázis végén azonos $[Ca^{2+}]_i$ esetén is jelentősen különbözik. Ez a heterogenitás megnyilvánul az optikai jelek nagyságában is. Ezért a festéktartalom-eltérések következtében kialakuló, sokszor abnormálisan nagy, standard deviációk elkerülése érdekében a sejtfluoreszcencia értékeket minden esetben a kontroll periódusra normáltuk.

(2) Rövid távú APD és CaT variabilitások meghatározása: Az APD_{90} , APD_{25} és a CaT amplitúdó rövid távú „beat-to-beat" variabilitását a kísérlet steady-state intervallumából kiválasztott 50 egymást követő AP, vagy CaT quantitatív elemzésével határoztuk meg az alábbi formulák segítségével:

$$BVR_{ADP90} = \Sigma(APD_{90;i+1} - APD_{90;i})/(n_{ütés} \times \sqrt{2})$$

$$BVR_{ADP25} = \Sigma(APD_{25;i+1} - APD_{25;i})/(n_{ütés} \times \sqrt{2})$$

Mivel a korrigálatlan CaT amplitúdók nagymértékben függnek nemspecifikus faktoroktól (sejtméret, festék koncentráció és szivárgás), és ez a függés a variabilitásokban is megjelenne, a rövidtávú APD variabilitások meghatározására használt egyszerű formula nem alkalmazható a CaT variabilitás hiteles jellemzésére. Ezért a nyers variabilitás adatokat normalizáltuk az átlagos CaT amplitúdóval (CaT_{TC}), amelyet a párhuzamos időkontroll (TC) kísérletekből határoztunk meg, az alábbiak szerint:

$$BVR_{CaT} = \Sigma(CaT_{amplitúdó;i+1} - CaT_{amplitúdó;i}/(n_{ütés} \times \sqrt{2}) \times átlagosCaT_{TC\ amplitúdó}$$

(3) A Langendorff kísérletek kiértékelése: A legfontosabb hemodinamikai paramétereket (CF, HR, LVSP, LVEDP, DP, ±dP/dtmax) vagy közvetlenül mértük, vagy a regisztrált nyomásgörbékből számoltuk ki, a protokoll négy kritikus időpontjában: az ekvilibrációs (kontroll) periódus végén, az előkezelés végén, valamint az iszkémiás és a reperfúziós periódusok végén. A reperfúziós fázisra meghatározott értékeket folyamatos aritmiától mentes szívekből, vagy két aritmiás periódus közötti sinus-ritmus során határoztuk meg.

dc_1149_15

Az LVP és/vagy ECG görbék analízisével azonosított reperfúzió-indukált aritmiák súlyosságát három kulcsparaméter, az aritmia típusa (extraszisztolé (ES), kamrai tachycardia (VT) és kamrafibrilláció (VF)), valamint az aritmiás periódusok gyakorisága és átlagos időtartama alapján döntöttük el. Ezenkívül meghatároztuk a sinus-ritmussal (SR) jellemezhető periódusok időtartamát is. Fontos megjegyezni, hogy bár a 30 perces reperfúziós periódus alatt tranziens és fenntartott kamrafibrillációs periódusokat egyaránt megfigyelhettünk, mivel érdeklődésünk fókuszában a hatóanyagok a reperfúzió korai fázisában kialakuló kamrai aritmiákkal szemben tanúsított hatékonysága állt, a VF két altípusát az aritmia diagramok kiértékelése során nem különböztettük meg.

Mivel a regionális I/R protokollnak alávetett szívek közül sokban a fibrilláció, amennyiben kialakult – vélhetően, de nem szükségszerűen a szív elektrofiziológiai paramétereinek I/R-indukált irreverzibilis változásait tükrözve – tartósan fennmaradt, az ES és VT periódusok összidőtartama és gyakorisága szignifikánsan függ a VF-mentes periódusok összhosszától. Ezért, jóval realisztikusabb információ származtatása érdekében, ezen periódusok összidőtartamát normalizáltuk a VF-mentes periódusok összidőtartamára, továbbá, a zérussal, vagy nagyon kicsi értékkel történő osztás elkerülése érdekében azokban az esetekben, amikor a VF összidőtartam rendkívül kicsi (vagy 0) volt, (ez leginkább a cariporid-kezelt szívekre volt jellemző), a VF periódusok névleges összidőtartamához 5 percenként növekvő, 1 és 7 közötti pontszámot rendeltünk (azaz 0 - 5 perc közötti VF összidőtartam 1 értéknek felelt meg, 5 – 10 perc közötti 2 értéknek, stb.).

A gyakoriság mértékegysége: a(z) (abszolút) gyakoriság alatt általában az előfordulások számát értjük (azaz darabszámot), ezért nincs dimenziója. Az elemzés során mi relatív gyakoriságokat állapítottunk meg, azaz az abszolút előfordulási értékeket normalizáltuk a VF-mentes időszakok összidőtartamára, tehát hányadosként jellemeztük (előfordulások száma osztva a reperfúzió alatti VF-mentes periódusok összidőtartamával). Ezáltal ennek a paraméternek frekvencia dimenziója lett (1/perc).

Statisztikai számítások: A statisztikai számításokat a Statistica (Statsoft Inc. USA) program 9.0, vagy (eleinte) 7.0 verziójával végeztük. A kísérletek során meghatározott (mért vagy számított), a mérési artefaktokra szükség szerint korrigált adatokat általában *számtani átlag* ± *S.E.M.* formában adjuk meg. Két egyszerű kísérleti csoport adatainak összehasonlítására a Student féle páros vagy páratlan t-tesztet használtuk. Kettőnél több kísérleti csoport összehasonlítása esetén, az adott körülményektől függően, Bonferroni, vagy Tukey *post hoc* teszttel kiegészített egy, vagy több szempontú, illetve, a csoportok közötti varianciák homogenitásától függően, parametrikus, vagy nemparametrikus (Kruskal-Wallis féle) variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk. A kísérleti csoportokat statisztikusan szignifikánsan különbözőnek $p < 0.05$ esetben tekintettük. Néhány esetben, amikor az eltérések egyértelműek voltak ugyan, de a kísérleti adatok túl nagy szórást mutattak, a szignifikancia határ közeli ($p < 0.1$) értékeket külön jelöltük.

dc_1149_15

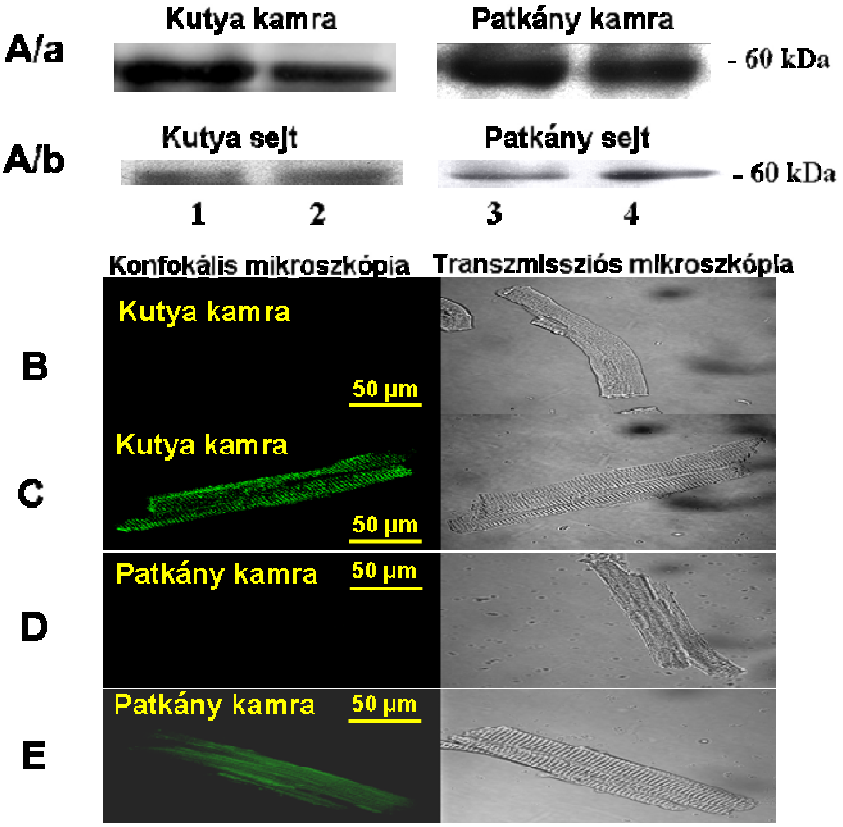
5. EREDMÉNYEK

5.1. Ca^{2+}_i változások hatása a repolarizáló K^+ áramokra

5.1.1. Van-e fiziológiásan aktív SK2 csatorna egészséges szívizomban?

A Ca^{2+}-aktivált K^+ csatornák számos sejttípusban (pl. neuronok) kiemelkedő szerepet játszanak. Mivel közvetlen kapcsolatot jelentenek a Ca^{2+} homeosztázis és az AP repolarizációja között, aktivitásuk a szívben is indokolt lehet, de hozzájárulásuk mértéke a szívizom repolarizációjához nem tisztázott. Xu és mts. szerint [134] *a szelektív SK csatorna gátló apamin mind egér, mind humán szívizomsejtekben növeli az APD-t. Ezek az eredmények ellentmondanak a repolarizációs rezerv hipotézisnek, mely szerint egy repolarizáló K^+ áram csökkenése esetén más repolarizáló K^+ áram kompenzációs emelkedése kivédi az APD markáns, aritmogén megnyúlását* [96]. *Kísérleteink célja az SK csatornák esetleges szerepének vizsgálata volt az AP repolarizációban. A következő kérdésekre kerestünk válasz: (1) Expresszálódik-e SK protein a szívizomsejtekben?; (2) Hat-e az apamin az AP repolarizációjára, illetve (3) a transzmembrán áramokra?*

SK2 csatornaprotein expressziója kutya és patkány kamrai szívizomban: Az expressziós kísérletek eredményeit a 14. ábra összegzi. A Western blot regisztrátumok (14. ábra /Aa**)** alapján biztonsággal feltételezhető, hogy az SK csatornaprotein jelentős számban, közel azonos mértékben expresszálódik mindkét species kamrai szívszöveteiben. Az érfalsimaizmok esetleges hozzájárulásának kiküszöbölésére az analízist izolált kamrai szívizomsejtekben megismételtük (14. ábra /Ab), és ugyanerre a konklúzióra jutottunk.

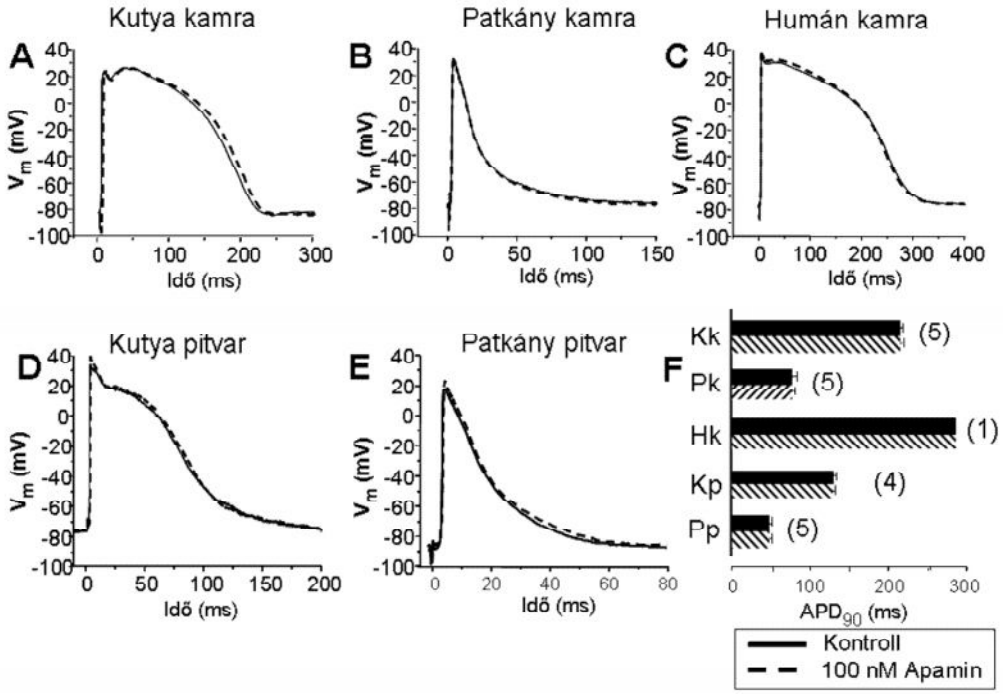


14. ábra SK2 csatornaprotein expressziója kutya, illetve patkány kamrai szívizomban. (**A**) Reprezentatív Western blotok kutya (**1, 2**) és patkány (**3, 4**) (n = 6/6) bal kamrai szívszövetből (**A/a**), illetve izolált szívizomsejtekből (**A/b**). (**B–E**): Konfokális (bal oldal), illetve transzmissziós (jobb oldal) mikroszkópfelvételek kutya (**B, C**) és patkány (**D, E**) kamrai szívizomsejtekről. Immunjelölt sejtek (**C, E** bal), illetve negatív kontrollként szolgáló, csak Alexafluor 488-cal jelölt (**B, D** bal) sejtek.

dc_1149_15

A váratlan eredmények alátámasztása céljából izolált, immunfestéssel jelölt kutya és patkány (14. ábra /C,E) szívizomsejtekben, konfokális mikroszkóppal is elvégeztük a vizsgálatot. Ennek eredménye még közvetlenebb módon igazolta a csatornaprotein intenzív jelenlétét a szívizomsejtek felszínén. A kontroll szívizomsejtek, melyeken immunfestést nem alkalmaztunk, nem mutatnak fluoreszcenciát sem (14. ábra /B,D).

Apamin hatása multicelluláris mintákból mért akciós potenciálokra: Konvencionális mikroelektród módszerrel 100 nM apamin hatását vizsgáltuk kutya, patkány és humán jobb kamrai papilláris izmokból és bal pitvari trabekulákból 1 Hz stimulusfrekvencia mellett regisztrált AP-re. A reprezentatív, egymásra illesztett AP párok összehasonlítása igazolja, hogy 45 perces apaminkezelés egyik preparátumban sem hozott létre az AP-ban észlelhető változást (15. ábra /A-E). A változások teljes hiánya alapján igen valószínűnek tűnik, hogy *fiziológiás körülmények között*, egészséges szívizomsejtekben, az igazolt protein expresszió ellenére sincsen mérhető SK áram (15. ábra /F).



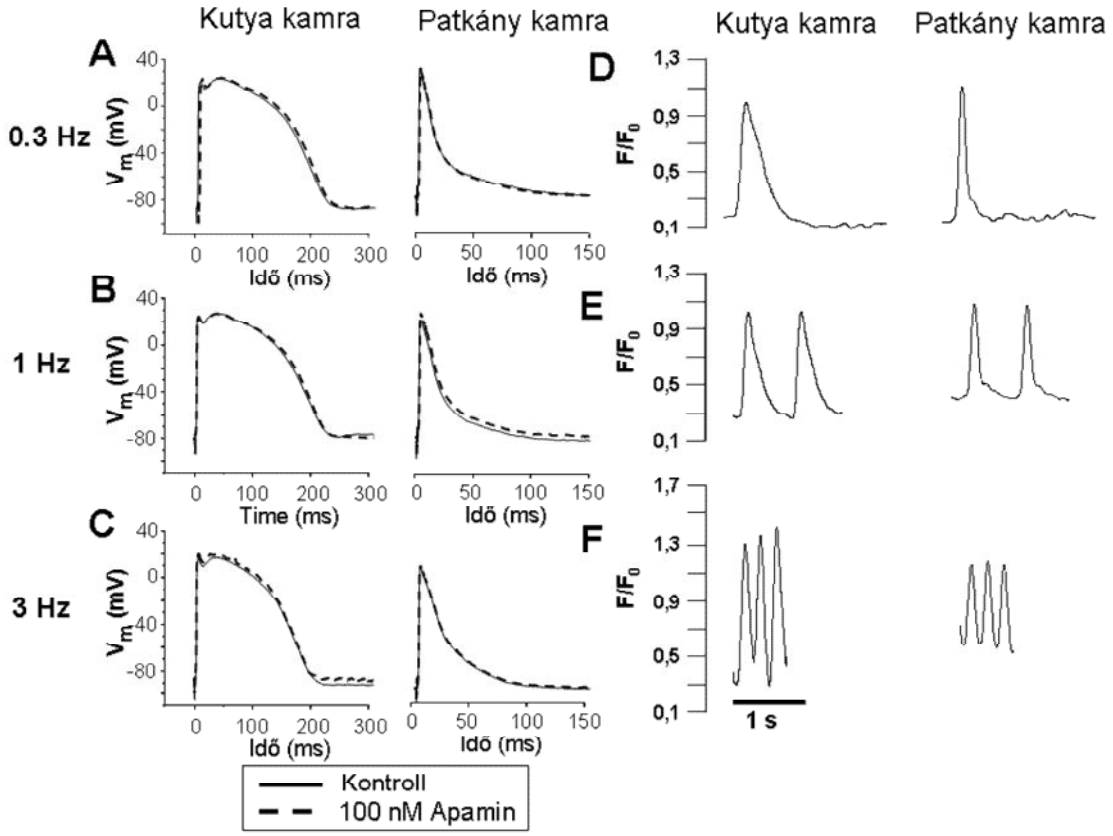
15. ábra 100 nM apamin hatása az AP morfológiájára multicelluláris preparátumokban 1Hz ingerlési frekvenciánál. Jobb kamrai **(A–C)**, illetve bal pitvari **(D-E)** szövetpreparátumokból regisztrált reprezentatív AP párok kontroll állapotban, illetve a 100 nM apaminkezelést követő 45. percben. A preparátumok: kutya (Kk), patkány (Pk), humán (Hk) jobb kamrai papilláris izom; kutya (Kp) és patkány (Pp) bal pitvari trabekula. **(F)** Átlagos APD_{90} értékek (**Itt és minden további ábrán**: mean ± S.E.M., zárójelben az n érték).

Mivel az SK csatorna aktivációja jelentősen függ a $[Ca^{2+}]_i$ változásaitól, megvizsgáltuk az apaminhatás feltételezett $[Ca^{2+}]_i$ függését kutya és patkány jobb kamrai papilláris izmokon, melyekben a $[Ca^{2+}]_i$ változását az *ingerlési frekvencia változtatásával* hoztuk létre.

A teljesen átfedő AP párok (16. ábra /A-C) ismét csak azt mutatják, hogy 100 nM apamin előkezelés – a $[Ca^{2+}]_i$ markáns, az egyidejűleg regisztrált $Ca^{2+}{}_i$ tranziensben jól követhető növekedése ellenére (16. ábra /D,E) – egyik preparátumban sem hozott létre mérhető AP változást. Kutyában az átlagos APD_{90} érték apamin előtt/után 0.3 Hz-nél ~ 217 ms, 1 Hz-nél ~ 208 ms, 3 Hz-nél ~ 188 ms. Patkányban az átlagértékek 0.3 Hz-nél ~ 84 ms, 1 Hz-nél ~ 73 ms, 3 Hz-nél ~ 71 ms. A kutya és patkány jobb kamrai preparátumokból 0.3, 1 és 3 Hz-en regisztrált tipikus $Ca^{2+}{}_i$ tranziensek a 16. ábra jobb oldalán láthatók. Maximális $[Ca^{2+}]_i$ koncentrációt kutya preparátumokban 3 Hz, patkány preparátumokban 0.3 Hz

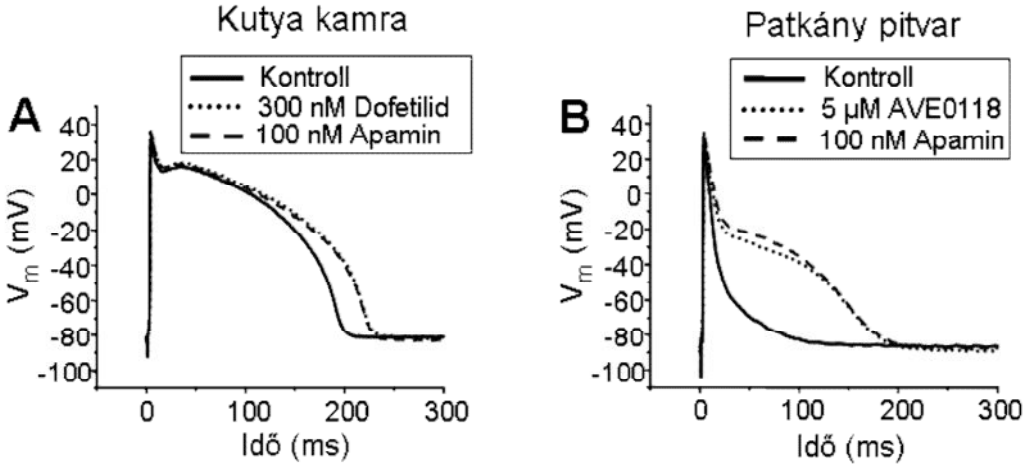
dc_1149_15

frekvenciánál kaptuk (az ismert pozitív/negatív „starcase" jelenség). Az AP-kben viszont a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ ellenére sem tudtunk értékelhető apaminhatást megfigyelni.



16. ábra Reprezentatív, 0.3, 1 és 3 Hz ingerlési frekvencián, kutya és patkány szövetpreparátumokból regisztrált AP párok (kontrollban és 100 nM apamin alkalmazását követően) **(A–C),** valamint a CaT-k **(D–F)**.

Az apaminválasz hiánya elvileg a repolarizációs rezerv kompenzációs aktivitásával is magyarázható, ezért a méréseket szignifikánsan gyöngített rezerv mellett megismételtük (17. ábra). Ekkor az apamin alkalmazását megelőzően az egyik fontos repolarizáló áramot, kutya papilláris izomban az I_{Kr}-t, patkány pitvari preparátumokban az I_{to}-t és I_{Kur}-t, 300 nM dofetilid, illetve 5µM AVE0118 alkalmazásával leblokkoltuk.

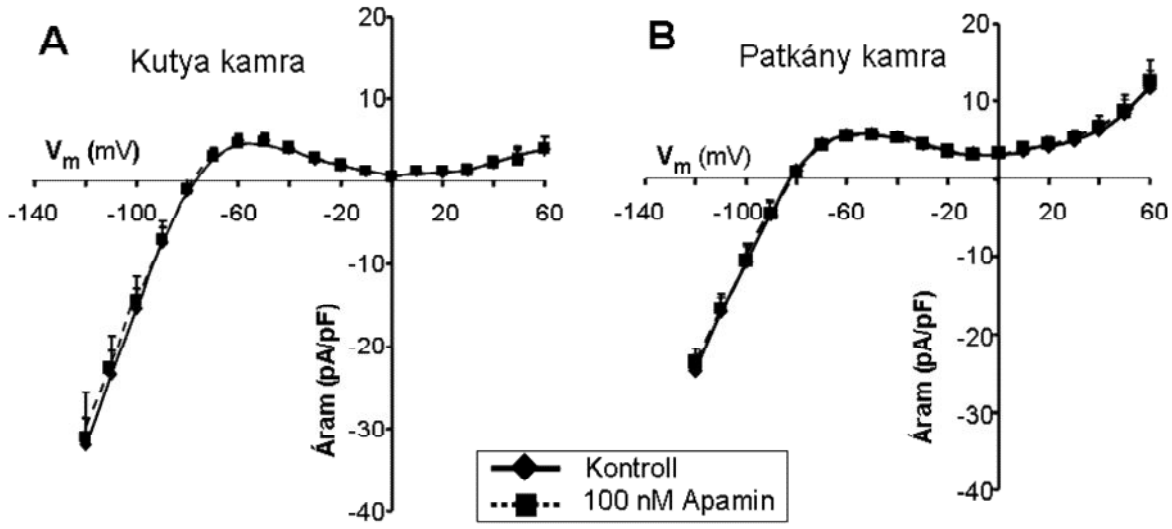


17. ábra 100 nM apamin hatása csökkentett repolarizációs rezervvel rendelkező kutya kamrai ***(A)***, illetve patkány pitvari ***(B)*** szövetpreparátumokban. A repolarizációs rezervet 300 nM dofetilid (kamra), illetve 5 µM AVE0118 (pitvar) előkezeléssel nagymértékben gyengítettük.

dc_1149_15

Annak ellenére, hogy – mint a szignifikáns AP megnyúlás mutatja – a repolarizációs rezerv mindkét preparátumban markánsan csökkent, ilyenkor sem sikerült apamin alkalmazásával az AP morfológiájának észlelhető változását létrehozni. Kutyában mért APD_{90} értékek: kontroll: 211 ± 3 ms, 300 nM dofetilid alkalmazását követően: 245 ± 6 ms, 100 nM apamin dofetilid jelenlétében végzett szuperfúziója után: 247 ± 6 ms. A megfelelő értékek patkány pitvari preparátumokban: kontroll 70.8 ± 5.2 ms, 5 μM AVE0400 alkalmazását követően: 148 ± 7 ms, 100 nM apamin AVE400 jelenlétében végzett szuperfúziója után: 148 ± 7 ms.

Apamin hatása kutya és patkány szívizomsejtek ionáramaira: Az apamin hatásának izolált szívizomsejteken történő vizsgálata céljából egész sejtes, valamint perforált patch clamp konfigurációban is megkíséreltük apamin-szenzitív áram jelenlétét kutya és patkány kamrai szívizomsejtekben közvetlenül igazolni.

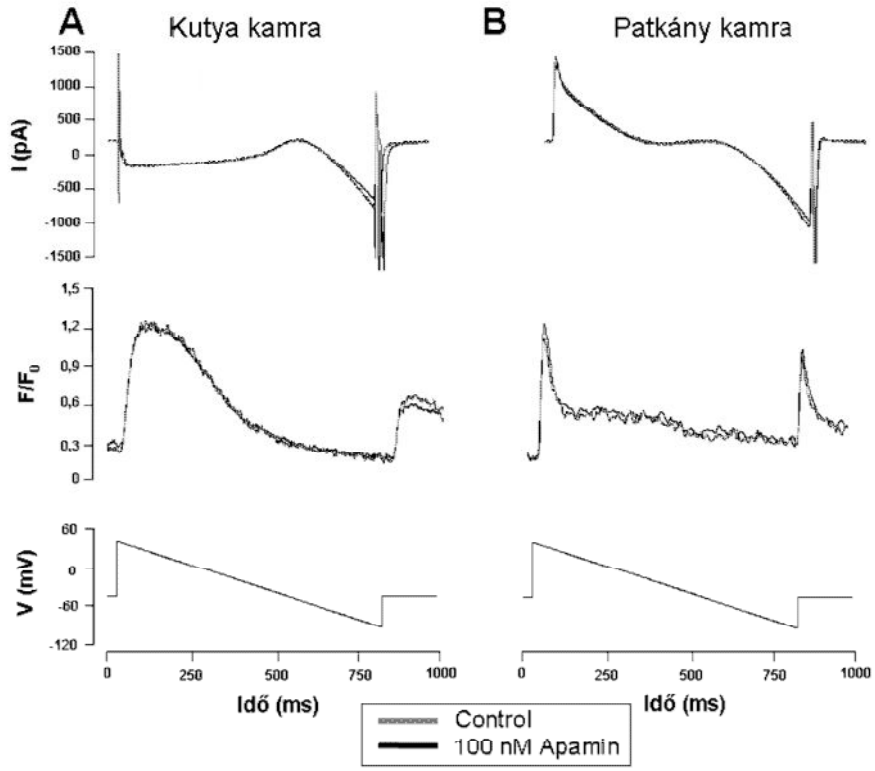


18. ábra 100 nM apamin hatása kutya ***(A)*** és patkány ***(B)*** steady-state kamrai szívizomsejtekből voltage clamp alatt regisztrált membránáramokra. Az I – V görbék a pulzus végén meghatározott membránáramot az aktuális membránpotenciál (V_m) függvényében ábrázolják. A 900 nM-ra pufferelt (WinMaxC) pipettaoldat hatására a $[Ca^{2+}]_i$ markánsan megemelkedett. A kísérletek során sejtrövidülés is megfigyelhető volt, igazolva a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedését (n = 7).

Egész sejtes konfigurációban a pipettaoldat $[Ca^{2+}]$-ját, az SK csatornák minél nagyobb mértékű aktivációja céljából a szisztolés $[Ca^{2+}]_i$-t megközelítő 900 nM értékre állítottuk be. Ilyen feltételek mellett az $[Ca^{2+}]_i$ jóval magasabb a normál diasztolés szintnél. A $[Ca^{2+}]_i$ emelkedését meggyőzően igazolja a sejtek észlelhető rövidülése. Az ionegyensúly elérését követően a tartópotenciálról -50 mV-ra depolarizáló 150 ms-os pulzusokat alkalmaztunk a -120 - +60 mV membránpotenciál tartományban. A kapacitásra normalizált pulzus végén meghatározott áramot a potenciál függvényében ábrázoltuk (18. ábra). A külső oldat és a pipetta oldat összetételéből adódóan ez az áram kizárólagosan K^+ áram volt, és – ahogyan azt a görbék egyértelműen igazolják – apamin hatására kismértékben sem változott.

A perforált patch clamp technika lényeges előnye, hogy a sejtek citoplazmája nem dializálódik. Az izolált kamrasejteket Ca^{2+}-érzékeny Fluo 4-AM festékkel töltöttük fel és a fluoreszcencia-változásokat is regisztráltuk. A membránt -50 mV-os tartópotenciálról először +40 mV-ra depolarizáltuk, majd -100 mV-ra hiperpolarizáltuk (175 mV/s) (19. ábra /A,B_{lenn}). 100 nM apamin alkalmazását követően a steady-state áram egyik speciesben sem változott (19. ábra /A,B_{fenn}). A depolarizáció-indukált CaT-k kialakulása (19. ábra /$A,B_{közép}$) igazolja, hogy a sejtekben a $Ca^{2+}{}_i$ transzport-ciklusok normálisan zajlottak.

dc_1149_15



19. ábra 100 nM apamin hatása kutya és patkány kamrasejtekből perforált patch clamp módszerrel mért transzmembrán áramokra (***A*** & ***B***, felső panel). Az áramot a sejteket −50 mV tartó potenciálról +40 mV-ra depolarizálva, majd −100 mV-ra hiperpolarizálva, „ramp" protokoll alkalmazásával határoztuk meg; a feszültségváltozás sebessége 175 mV/s volt (**A** & **B**, alsó panel). A sejteket a CaT-k (**A** & **B** középső panel) egyidejű regisztrálása céljából 5 µM Fluo 4-AM-mel töltöttük fel. A patch sérülésének jelzésére a pipettaoldat 5 mM EGTA-t is tartalmazott. Ebben a konfigurációban az apamin hatása különbségi áramban nyilvánulna meg, azonban ilyen áramot nem sikerült regisztrálni.

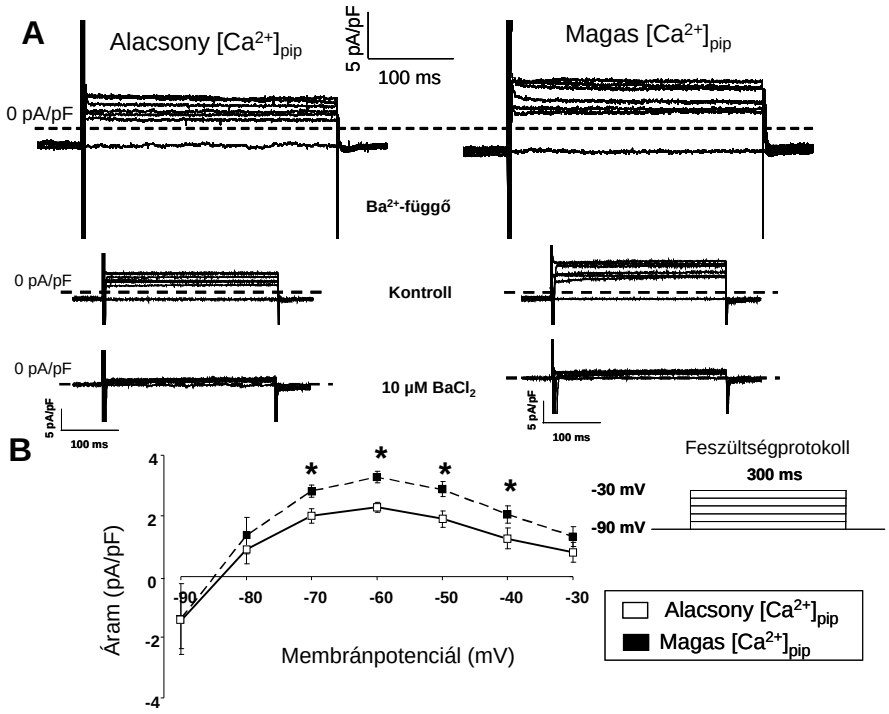
5.1.2. A befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) $Ca^{2+}{}_i$ függése

A befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) kulcsszerepet játszik a terminális repolarizációban és a szívizomsejtek nyugalmi potenciáljának stabilizálásában. Az áram $[Ca^{2+}]_i$-függésének részleteire vonatkozó adatok – az I_{K1} AP morfológiára gyakorolt befolyása ellenére – ellentmondásosak. Célunk a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés I_{K1} amplitúdóra, és az AP repolarizációra kifejtett módosító hatásainak elemzése volt. Amennyiben a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés negatívan befolyásolná az I_{K1} áramot, annak magas $[Ca^{2+}]_i$ esetén történő csökkenése aritmogén következményekkel járhatna. A következő kérdéseket vizsgáltuk: (1) Hogyan hat a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés az I_{K1}-re? (2) Mi a Ca^{2+}-függő I_{K1} moduláció háttérmechanizmusa? (3) Mi a hatása a $[Ca^{2+}]_o$ változásainak az AP-re és a $[Ca^{2+}]_i$-re? (4) Hogyan hat az I_{K1} Ca^{2+}-függő változása a repolarizációs rezervre?

Az I_{K1} Ca^{2+}-függő modulációja izolált kutya kamrai szívizomsejtekben: A Ca^{2+}-függés elemzése céljából egész sejtes patch clamp módszerrel meghatároztuk az I_{K1}-et kutya bal kamrai szívizomsejtekben. Az áramot a Ba^{2+}-függő áramkomponenssel jellemeztük.

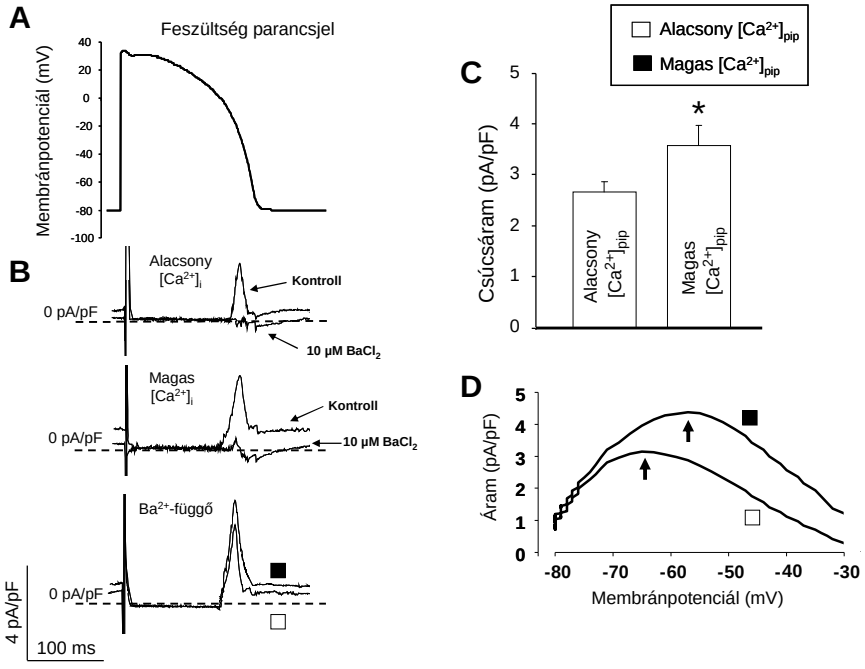
Az első kísérletsorozatban a pipetta $[Ca^{2+}]$-ját ($[Ca^{2+}]_{pip}$) a megfelelő Ca^{2+} + BAPTA keverékek segítségével alacsony (~ 160 nM) vagy magas (~ 900 nM) értékekre állítottuk be. Az egyensúlyi I_{K1} meghatározására 300 ms-os négyszögimpulzusokat alkalmaztunk (20. ábra /A). A méréseket 10 µM $BaCl_2$ adását követően megismételtük. Mint az ábrán látható, magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ (magas $[Ca^{2+}]_i$) jelenlétében a Ba^{2+}-függő áram szignifikánsan nagyobb volt, mint alacsony $[Ca^{2+}]_{pip}$ (alacsony $[Ca^{2+}]_i$) jelenlétében (20. ábra /B). A membránkapacitások között nem volt szignifikáns eltérés (145 ± 8, illetve 139 ± 10 pF).

dc_1149_15



20. ábra A steady-state I_{K1} $[Ca^{2+}]_{pip}$-függése kutya kamrai sejtekben. A $[Ca^{2+}]_{pip}$-et ~160 nM-ra, vagy ~900 nM-ra puffereltük. Az I_{K1}-et a $BaCl_2$-függő árammal jellemeztük. Reprezentatív I_{K1} görbék (**A)**, illetve I – U függvények **(B)**. A steady-state I_{K1} meghatározására a -90 mV és -30 mV közötti feszültségtartományban 300 ms-os négyszögimpulzusokat alkalmaztunk, majd a protokollt 10 μM BaCl2 jelenlétében megismételtük. A statisztikai analízis (ANOVA + Bonferroni ad hoc teszt) szerint a két I - U görbe között az eltérés szignifikáns (n = 7, mindkét csoportban).

Az I_{K1} Ca^{2+}-függő aktivációja az AP alatt: A kutya kamrai szívizomsejteken elvégzett mérésekben (21. ábra) az AP clamp technikát alkalmaztuk.

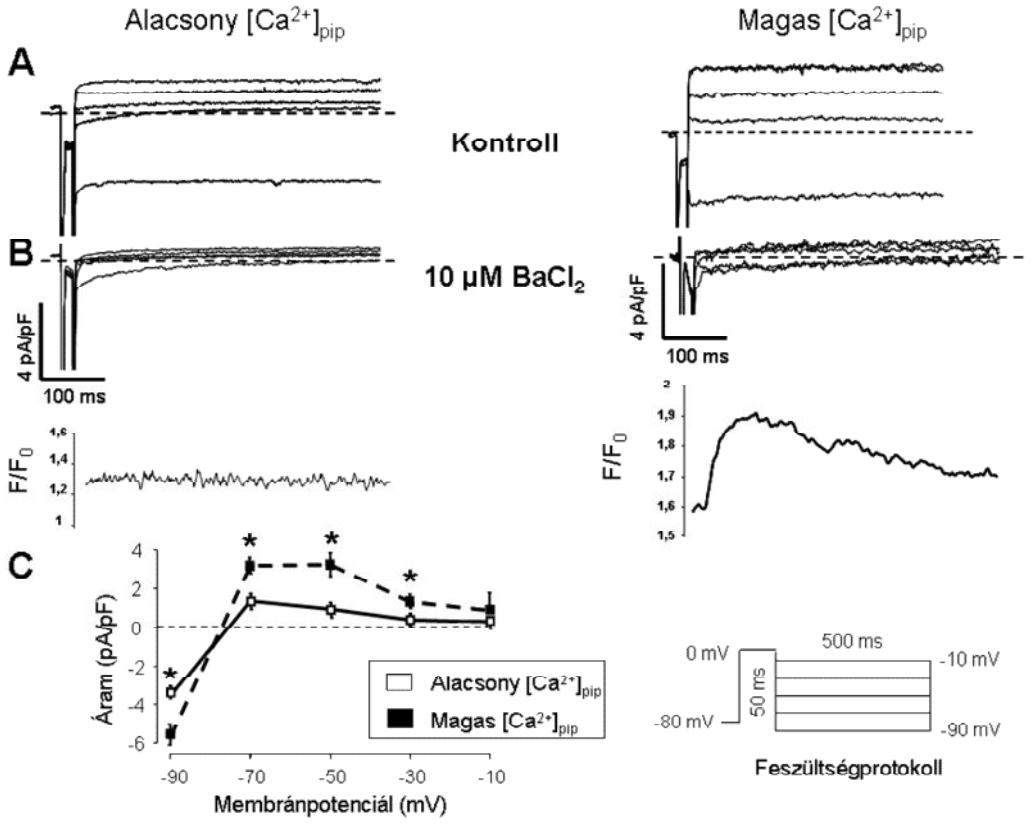


21. ábra Magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ hatása az I_{K1}-re tipikus kamrai AP alatt. Parancsjelként használt kamrai AP görbe **(A**). Az I_{K1}-et, mint Ba^{2+}-szenzitív (10 μM) áramot határoztuk meg. Reprezentatív regisztrátumok: mért és számított különbségi (I_{K1}) áramok **(B)**. Alacsony (~160 nM) és magas (~900 nM) $[Ca^{2+}]_{pip}$ mellett az AP parancsjellel meghatározott maximális I_{K1} értékek; közöttük szignifikáns ($p < 0.05$) a különbség (n = 7) **(C)**. I/U görbék, melyek az adott potenciál mellett meghatározott (Ba^{2+}-függő) I_{K1}-et mutatják alacsony (üres szimbólum), illetve magas (teli szimbólum) $Ca^{2+}]_{pip}$ mellett **(D)**. A nyilak a I_{K1} görbék maximumát mutatják.

dc_1149_15

A technika fontos előnye, hogy parancspotenciálként, az afiziológiás négyszögimpulzusok helyett tipikus kamrai AP formát (21. ábra /A) használ. Mint az előzőekben, az I_{K1}-et a Ba^{2+}-érzékeny árammal jellemeztük. Eredményeink alapján (21. ábra /B,C**)** nyilvánvaló, hogy a Ba^{2+}-szenzitív (~ I_{K1}) áram szignifikánsan nagyobb magas, mint alacsony $[Ca^{2+}]_{pip}$ jelenlétében (magas: -65 ± 1 mV; alacsony: -57 ± 1 mV, $p < 0.05$, n = 7). Az áram-feszültség függvényeken (21. ábra /D) megfigyelhető, hogy az áram maximum is eltolódik, kevésbé negatív membránpotenciál-értékek (-65 mV → -57 mV) felé.

A CaT hatása az I_{K1}-re: A „beat-to-beat" $[Ca^{2+}]_i$ változások I_{K1} moduláló hatásának jobb karakterizálása céljából megvizsgáltuk, hogy puffereletlen $[Ca^{2+}]_i$ változás esetén (azaz fiziológiás CaT mellett), nő-e az I_{K1} amplitúdója. Ennek érdekében feszültség-clampelt szívizomsejtekben meghatároztuk az I_{K1}-et a CaT jelenlétében, illetve hiányában; előbbi esetben a pipettaoldat 0 mM, utóbbi esetben 5 mM EGTA-t tartalmazott. A tranzienst rövid (50 ms) prepulzussal (-80 mV → 0 mV) aktiváltuk. Mint az várható volt, 5 mM EGTA jelenlétében sem a CaT, sem az I_{K1} nem változott; az I_{K1}, ahogyan normál $[Ca^{2+}]_o$ mellett is, viszonylag kicsi maradt. Ezzel szemben, ha a pipettaoldat nem tartalmazott EGTA-t, a CaT kialakulásával párhuzamosan az I_{K1} amplitúdója is szignifikánsan nőtt (22. ábra /A,B) a -70 ↔ -30 mV potenciáltartományban. Ugyancsak szignifikáns áramnövekedést indukált a szarkolemma hiperpolarizációja -90 mV-ra (22. ábra /C). A CaT alatt az áramban kisebb időfüggő változások (fluktuációk) is megfigyelhetők voltak, melyek vélhetően a $[Ca^{2+}]_i$ párhuzamos fluktuációit tükrözik.

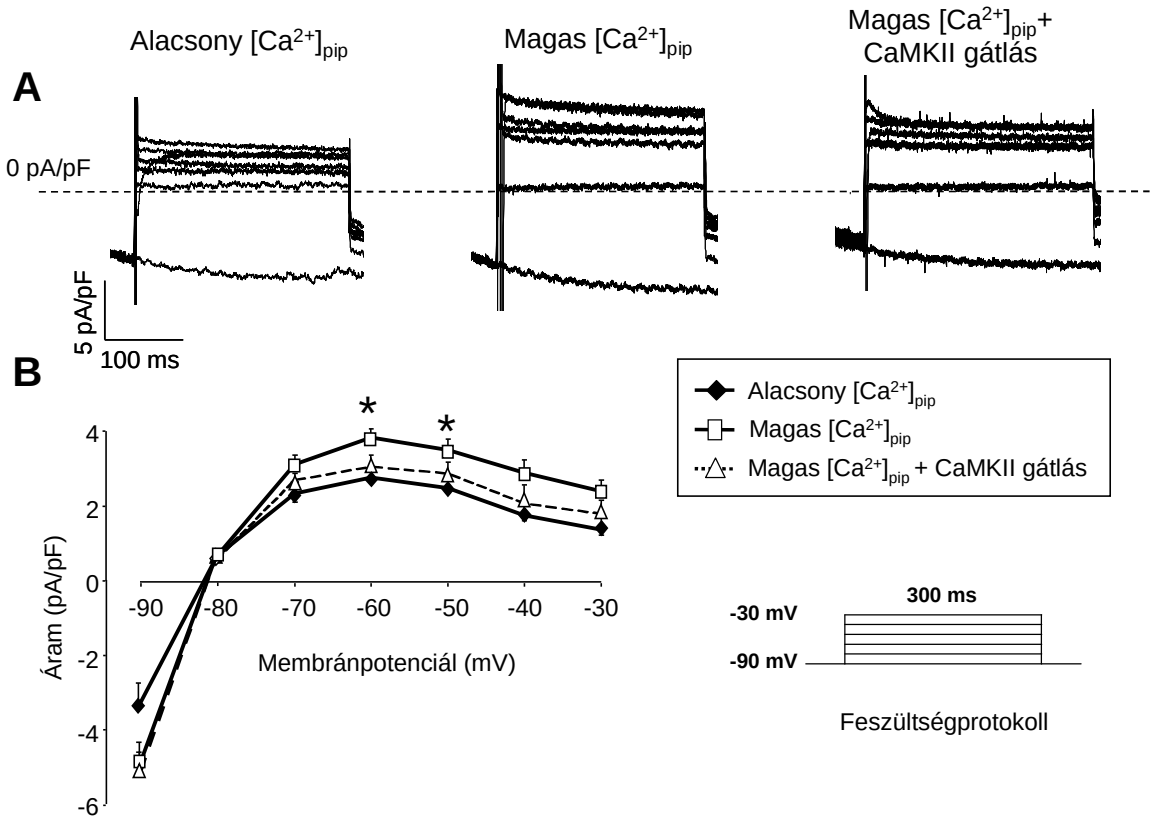


22. ábra Fiziológiás CaT I_{K1} növelő hatása izolált kutya kamrai szívizomsejtekben. **(A)** reprezentatív Ba^{2+}-érzékeny áramok, illetve **(B)** (korrigálatlan) Fluo-4 fluoreszcenciagörbék, 5 mM EGTA-t tartalmazó (alacsony $[Ca^{2+}]_{pip}$), illetve EGTA-mentes (magas $[Ca^{2+}]_{pip}$) pipettaoldat alkalmazása esetén (bal, illetve jobb panelek). A CaT kiváltását követően (50 ms, 80 mV → 0 mV prepulzus) 500 ms-os tesztpulzusokkal meghatároztuk az áramot (n = 8, mindkét csoportban). **(C)** A tesztpulzusok végén meghatározott I - V függvények, 5 mM EGTA jelenlétében (alacsony $Ca^{2+})_{pip}$, illetve hiányában (magas $Ca^{2+}{}_{pip}$). A statisztikus analízis (ANOVA + Bonferroni post hoc teszt) szignifikáns különbséget igazolt az alacsony és magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ mellett meghatározott I – V görbék között (n = 5 mindkét csoportban).

dc_1149_15

A Ca^{2+}-indukált I_{K1} emelkedés mechanizmusa: Egyes irodalmi adatok szerint nyúl kamrai szívizomsejtekben a CaMKII aktiválódását követően az I_{K1} nő **[448]**, ezért egy szelektív CaMKII gátló (KN-93), valamint annak inaktív formája (KN-92) segítségével vizsgáltuk, aktiválódik-e ez a CaMKII-függő mechanizmus kutya szívizomsejtekben. Három kísérleti csoportot képeztünk: (1) kontroll: ~160 nM $[Ca^{2+}]_{pip}$ + 1 µM KN-92; (2) ~ 900 nM $[Ca^{2+}]_{pip}$ + 1 µM KN-92; (3) ~ 900 nM $[Ca^{2+}]_{pip}$ + 1 µM KN-93. A steady-state I_{K1}-et jellemző $BaCl_2$-érzékeny áramot 300 ms-os feszültségpulzusok végén, a -90 mV ↔ -30 mV tartományban mértük (23. ábra /A). CaMKII gátlás hiányában (KN-92 jelenlétében) az alacsony és magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ csoportok között szignifikáns különbséget kaptunk; ez a különbség KN-93 alkalmazása után szignifikánsan kisebb lett (23. ábra /B).

Kiegészítő kísérletekben (n = 3) azt is igazoltuk, hogy a CaMKII aktivitása a CaT időtartama alatt nem állandó. Az LTC csatornák Ca^{2+} beáramlásának I_{K1} aktivációra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk a csatornagátló Nifedipin (10 µM) alkalmazásával. Bár az eredmények igazolták a Ca^{2+} beáramlás I_{K1}-aktiváló hatását, ez a hatás mérsékeltnek bizonyult.

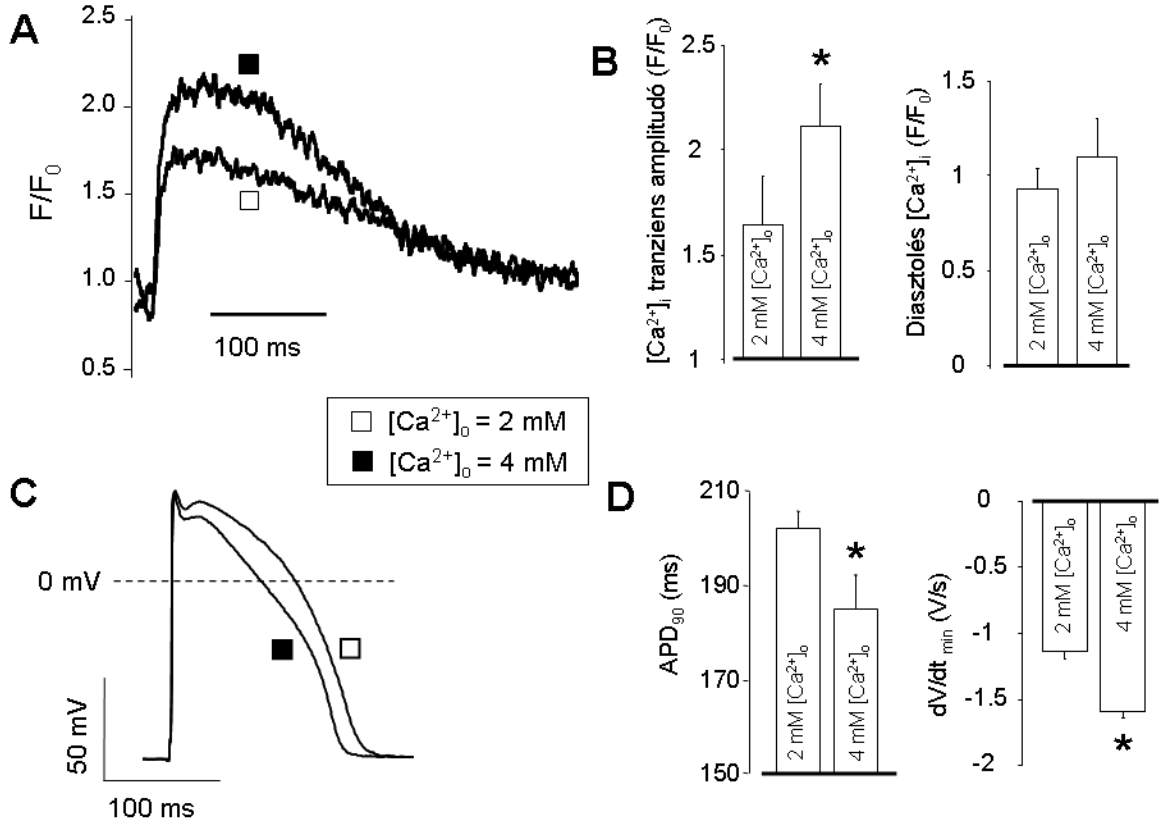


23. ábra A Ca^{2+}-indukált I_{K1} emelkedés CaMKII-függése. Reprezentatív I_{K1} görbék **(A)**. A Ba^{2+}-függő (10 µM $BaCl_2$) áramot alacsony $[Ca^{2+}]_{pip}$ + KN-92 (bal panel), magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ + KN-92 (középső panel), illetve magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ + KN-93 (CaMKII gátlás; jobb panel) alkalmazása mellett határoztuk meg. A Ba^{2+}-szenzitív áramra jellemző, fenti feltételek mellett meghatározott steady-state I–V összefüggések **(B)**. A statisztikus analízis (ANOVA + Bonferroni post hoc teszt) szignifikáns különbséget igazolt az alacsony és magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ mellett mért görbék, illetve az alacsony $[Ca^{2+}]_{pip}$ és magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ + CaMKII gátlás csoportok között (n = 8). A * a magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ és a $[Ca^{2+}]_{pip}$ + CaMKII gátolt csoportok közötti szignifikáns különbséget jelzi.

A $[Ca^{2+}]_o$ hatása a CaT-re és az AP morfológiájára multicelluláris preparátumban: Multicelluláris szívpreparátumokban az AP jóval stabilabb mint izolált szívizomsejtekben, és mivel nincs enzimatikus beavatkozás (emésztés), a szívizomsejtek ioncsatorna-eloszlása is fiziológiásnak tekinthető. Kutya jobb kamrai papilláris izmokban, 2 mM, vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ esetén vizsgáltuk az AP morfológiájának Ca^{2+}-függő változásait. Az alkalmazott

dc_1149_15

protokoll előnye, hogy minimalizálja az AP más intracelluláris jelutakon (pl. adrenerg mechanizmusokon) keresztül történő modulációját. A $[Ca^{2+}]_o$ 2 mM-ról → 4 mM-ra emelését követően a CaT amplitúdója, a $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedése nélkül, szignifikánsan (35 ± 11%) megnőtt (24. ábra /A,B). A felgyorsult terminális repolarizáció következtében, a CaT növekedésével párhuzamosan az APD_{90} szignifikánsan csökkent (202 ± 4 → 185 ± 8 ms) (24. ábra /C,D). A megfigyelést alátámasztja a $-dV/dt_{min}$, a $[Ca^{2+}]_o$ emelést követő, > 40%-os csökkenése (abszolút értékben növekedése) (-1.1 ± 0.06 → -1.6 ± 0.05 V/s; n = 5).

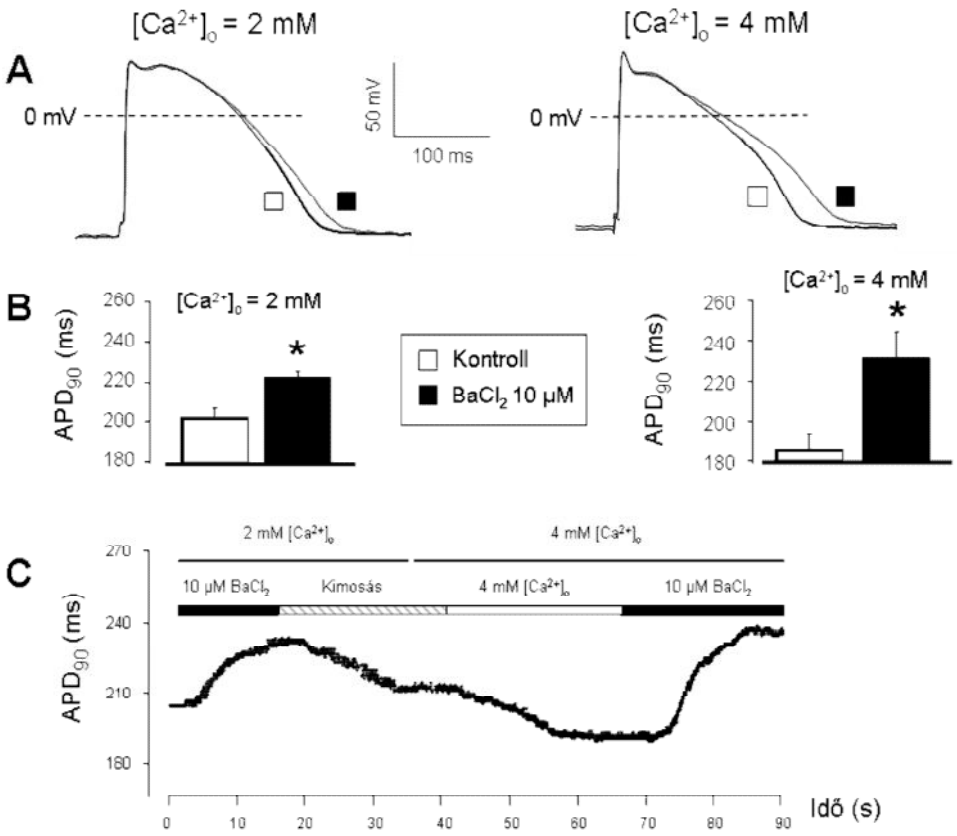


24. ábra A CaT ***(A, B)*** és AP ***(C, D)*** morfológiájának $[Ca^{2+}]_o$ függése kutya papilláris izomban. Reprezentatív **(A)** CaT, illetve **(B)** AP görbék, 2 mM, vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ jelenlétében. A CaT mérése fluoreszcens $Ca^{2+}{}_i$ indikátorral (Fluo-4) történt. A kvantitatív analízis előtt a mért fluoreszcencia-intenzitásokat nemspecifikus háttérre és bleaching-re korrigáltuk. **(C)** Átlagos CaT amplitúdó és $[Ca^{2+}]_{iD}$ értékek. **(D)** Papilláris izmokból meghatározott átlagos APD_{90} és terminális repolarizáció sebességminimum (dV/dt_{min}) értékek 2 mM, vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ jelenlétében (n = 5).

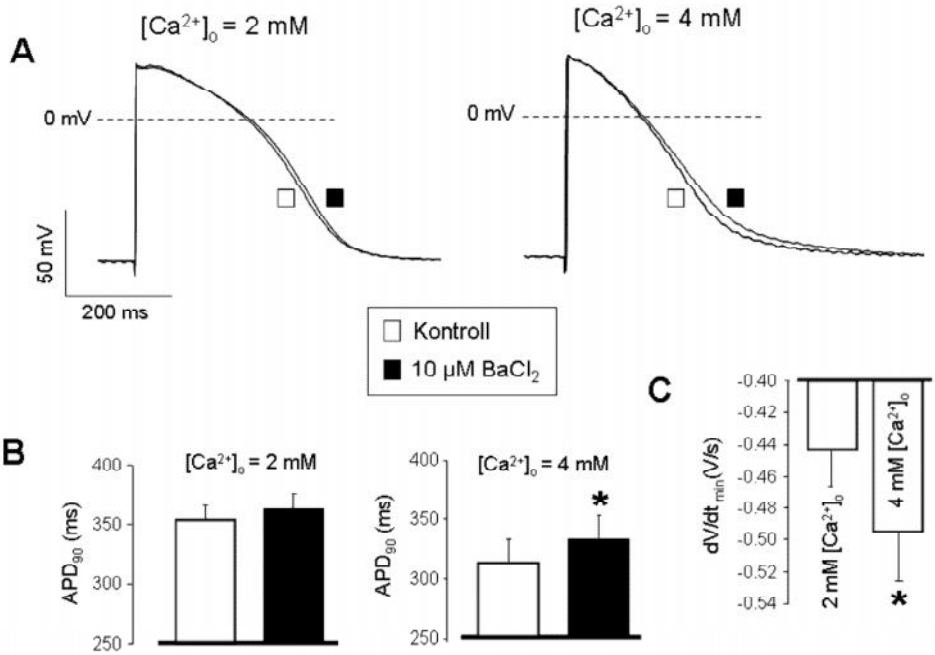
A Ba^{2+}-indukált I_{K1} gátlás APD-nyújtó hatását normál és magas $[Ca^{2+}]_o$ (2 mM, illetve 4 mM) mellett is megvizsgáltuk (25. ábra). A Ba^{2+}-indukált APD_{90} megnyúlás szignifikánsan (~ 100%-kal) nagyobb volt magas (4 mM), mint normál (2 mM) $[Ca^{2+}]_o$ mellett (normál: 202 ± 4 → 223 ± 3 ms, $p < 0.05$; magas: 185 ± 8.2 → 231 ± 13 ms; Δ = 11 ± 0.8% → 20 ± 1.9%) (25. ábra /A,B). A $BaCl_2$ 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ melletti alkalmazását követő kimosási fázis végén a teszt ugyanazon a preparátumon megismételhető volt 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett is (25. ábra /C).

Az AP Ca^{2+}-indukált változásainak további kvantitatív jellemzésére meghatároztuk az AP triangulációját ($T_{AP} = APD_{90} - APD_{25}$) is. A statisztikus analízis szerint 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett, $BaCl_2$ alkalmazását követően a trianguláció szignifikánsan nőtt (84 ± 4.3 → 102 ± 4.4 ms). 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett még ennél is nagyobb, szintén szignifikáns $BaCl_2$-indukált trianguláció-fokozódást kaptunk (112 ± 8 → 155 ± 14 ms).

dc_1149_15



25. ábra 10 µM $BaCl_2$ által indukált I_{K1} blokád APD nyújtó hatásának $[Ca^{2+}]_o$-függése kutya papilláris izomban. **(A)** 2 mM vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ jelenlétében, 10 µM $BaCl_2$ alkalmazását megelőzően, illetve azt követően regisztrált reprezentatív AP-k, illetve **(B)** meghatározott APD_{90} értékek. **(C)** A $BaCl_2$-indukált APD megnyúlás kinetikája 2 mM, illetve 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ jelenlétében (reprezentatív kísérlet).

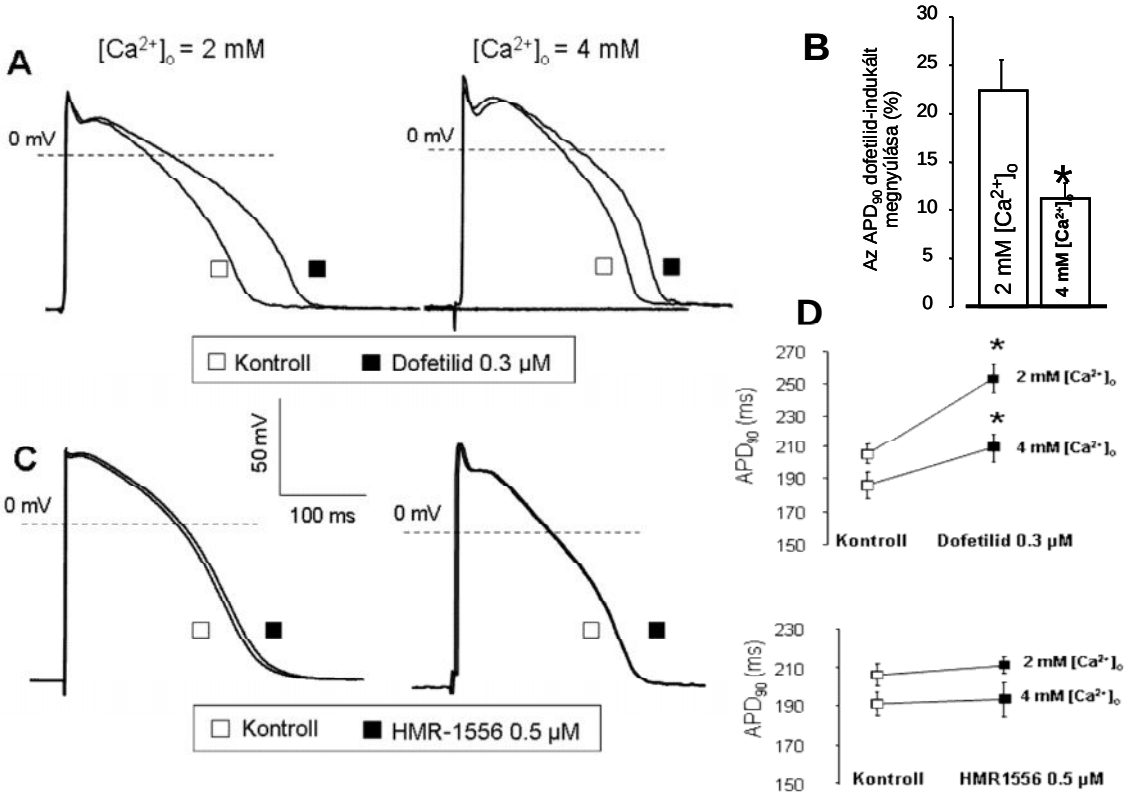


26. ábra Ba^{2+}-indukált I_{K1} blokád APD nyújtó hatásának $[Ca^{2+}]_o$-függése egészséges ***humán*** papilláris izomban. **(A)** 2 mM, vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ jelenlétében, 10 µM $BaCl_2$ alkalmazása előtt, illetve azt követően regisztrált reprezentatív AP-k. **(B)** Öt humán preparátumból 2mM, illetve 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett, 10 µM $BaCl_2$ alkalmazása előtt, illetve azt követően meghatározott APD_{90} értékek. **(C)** A $[Ca^{2+}]_o$ hatása a repolarizáció sebesség-minimumára (dV/dt_{min}) humán papilláris izmokban (n=5).

dc_1149_15

Az AP morfológia Ca^{2+}_i-függése egészséges humán miokardiumban (26. ábra): A $BaCl_2$ Ca^{2+}-függő hatásának mértéke markánsan eltért kutya, illetve humán jobb kamrai papilláris izmokban. Humán preparátumokban 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett $BaCl_2$ hatására az APD_{90} nem változott (354 ± 12 → 362 ± 14 ms, Δ = 2.4 ± 1.0%), (26. ábra /A), ezzel szemben, 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett a $BaCl_2$ szignifikáns APD_{90} megnyúlást hozott létre (314 ± 19 → 333 ± 21 ms; Δ = 6 ± 0.5%) (26. ábra /B), továbbá a $[Ca^{2+}]_o$ emelése szignifikánsan felgyorsította a repolarizáció végső fázisát is (-0.44 ± 0.02 → -0.49 ± 0.03 V/s) (26. ábra /C). Ez a hatás gyenge a kutya papilláris izmokhoz viszonyítva. Humán mintákon is meghatároztuk az AP triangulációját. A statisztikus analízis szerint 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett 10 μM $BaCl_2$ nem hozott létre szignifikáns trianguláció-növekedést (189 ± 12 ms → 176 ± 15 ms). Ezzel szemben 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett 10 μM $BaCl_2$ hatására a trianguláció szignifikánsan nőtt (195 ± 12 ms → 212 ± 11 ms). A triangulációs adatok összehasonlítása ugyancsak szignifikáns különbséget igazolt a két homológ kísérleti csoport között.

Az I_{K1} Ca^{2+}_i-függő hozzájárulása a repolarizációs rezervhez: Amennyiben a Ba^{2+}-függő áram a $[Ca^{2+}]_o$ emelése után szignifikánsan nő, akkor relatív hozzájárulása a repolarizációs rezervhez szintén nagyobb kell, hogy legyen.



27. ábra Magas $[Ca^{2+}]_o$, az I_{Ks} látható változása nélkül, szignifikánsan csökkentette az I_{Kr} hozzájárulását a repolarizációhoz (AP nyújtó hatás) kutya papilláris izmokban. **(A)** 0.3 μM dofetilid alkalmazása előtt, és után, 2 mM, vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett regisztrált reprezentatív AP párok. **(B)** 0.5 μM HMR-1556 alkalmazása előtt és után, 2 mM vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett regisztrált, reprezentatív AP párok. **(C)** 2 mM, vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett mért APD értékek; **(D)** 0.3 μM dofetilid 2m, vagy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett mért APD nyújtó hatása.

A repolarizáló áramok $[Ca^{2+}]$-függő redisztribúciójának vizsgálata céljából meghatároztuk az I_{Kr} és I_{Ks} hozzájárulását a repolarizációhoz normál, illetve magas $[Ca^{2+}]_o$ mellett. Szelektív I_{Kr} gátlást követően az APD_{90} megnyúlása szignifikánsan kisebb lett 4mM, mint 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett (27. ábra /A) (2 mM: kontroll: 205 ± 7 ms; dofetilid: 253 ± 9 ms; 4 mM: kontroll: 186 ± 8 ms, dofetilid 208 ± 9 ms, N.S.; relatív emelkedés: 24 ± 1.8 → 12 ± 1.1%, n = 5). Szelektív I_{Ks} gátlás – ismervén az I_{Ks} kontroll körülmények között igen

dc_1149_15

mérsékelt hozzájárulását a repolarizációs rezervhez, nem meglepően – egyik $[Ca^{2+}]_o$ mellett sem hozott létre szignifikáns APD_{90} megnyúlást (2 mM: kontroll: 206 ± 6 ms, HMR-1556: 212 ± 6 ms, N.S.; 4 mM: kontroll: 191 ± 7 ms, HMR-1556: 193 ± 5 ms, N.S.) (27. ábra /B,C). Az eredmények igazolják, hogy a magas $[Ca^{2+}]_o$ APD-rövidítő hatása nem tulajdonítható a platópotenciál emelkedés által felgyorsított I_{Kr} és/vagy I_{Ks} aktivációnak, hiszen az I_{K1} gátlását követően ellenkező irányú változásokat mértünk (25. & 26. ábrák). Mivel a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés szignifikánsan növelte a Ba^{2+}-függő áram (~ I_{K1}) hozzájárulását a terminális repolarizációhoz, ez a függés befolyást gyakorolhat annak nagyságára is.

5.2. Részleges NCX gátlás következményei egészséges szívizomban

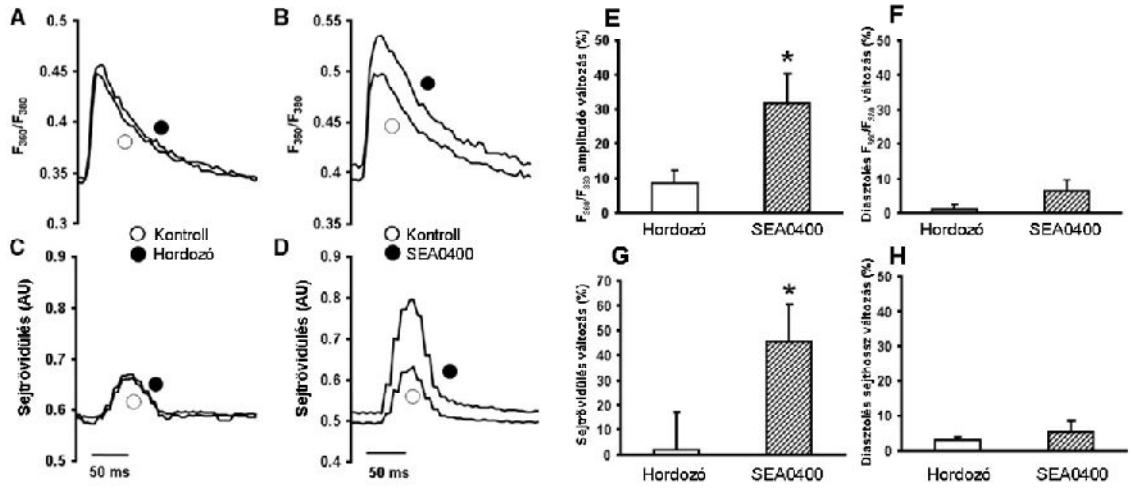
Mivel az elmúlt 2-3 év kivételével nem állt rendelkezésünkre eléggé szelektív NCX gátló, ezekben a kísérletekben az akkor legszelektívebb gátlószert használtuk. A SEA0400 alkalmazásával kapott eredmények, bár 1 µM koncentrációban hatása az LTCC-re nem elhanyagolható, nem különböznek szignifikánsan az új, szelektívebb ORM származékokkal nyert eredményektől. A SEA0400 lényeges tulajdonsága, hogy közel azonos mértékben gátolja az NCX mindkét irányú transzportaktivitását. Mivel az NCX működése a sejtek integritásának és aktivitásának fenntartásához nélkülözhetetlen, gátlása mindig részleges volt. A kísérletek fő célja a gátlás következményeinek összehasonlítása volt elektrofiziológiai paramétereikben lényegesen eltérő izolált patkány, és kutya szívizomsejteken. Az izolált, intakt patkányszíveken kapott eredményeket a későbbiekben ismertetem.

5.2.1. Az NCX gátlás következményei izolált patkány szívizomsejteken

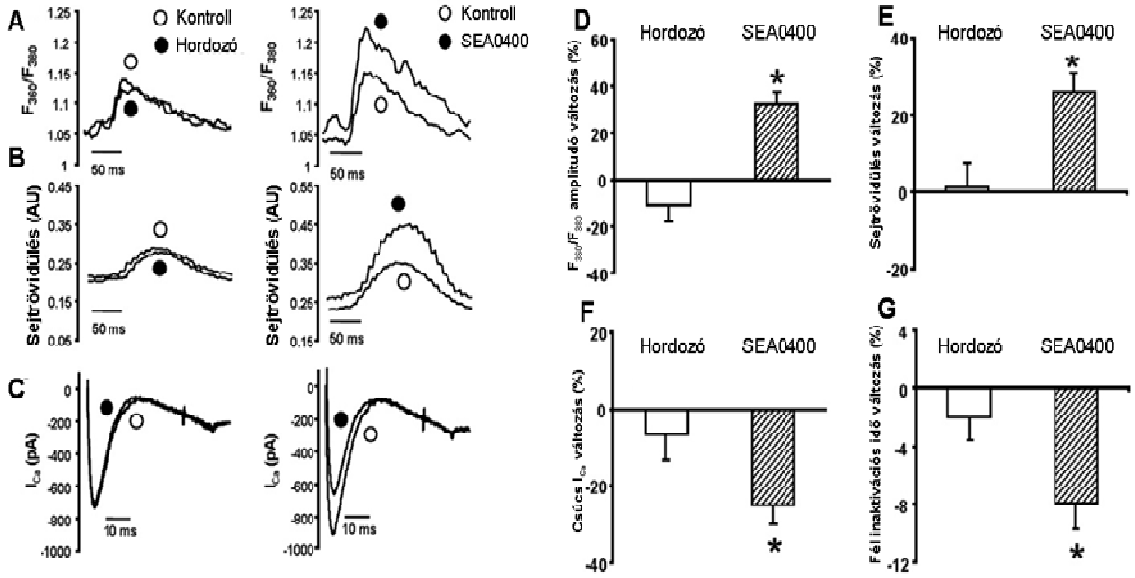
SEA400 hatása a CaT-re és a sejtrövidülésre: Ezekben a kísérletekben a részleges NCX gátlás Ca^{2+} háztartásra gyakorolt hatásait vizsgálatuk stimulált, izolált patkány kamrai szívizomsejteken. A CaT-t és sejtrövidülést 4 Hz-es téringerléssel stimulált, Ca^{2+}-érzékeny fluoreszcens festékkel (Fura 2-AM) feltöltött sejtekben mértük. Az inkubációs periódust követően a perfúziót átkapcsoltuk csak a hordozót (DMSO), vagy 0.3 µM SEA0400-t is tartalmazó oldatra. A maximális gátlás 5 percnél rövidebb idő alatt kialakult. A hordozó, vagy a SEA0400 alkalmazását megelőzően és követően regisztrált reprezentatív CaT és sejtrövidülés görbék a 28. ábrán láthatók. Önmagában a DMSO nem befolyásolta sem a CaT-t, sem a rövidülést (28. ábra /A,C). Ezzel szemben a SEA0400 megnövelte a CaT amplitúdóját, és a sejtrövidülést is (28. ábra /B,D). A gátlás hatására a $[Ca^{2+}]_{iD}$ több sejtben is emelkedett, amit a sejtrövidülés visszaigazolt. A DMSO, illetve a SEA0400 hatásait a 28. ábra /E-H panelek összegzik. A gátlás-indukált CaT amplitúdó-növekedés (SEA0400: 32 ± 8.8%, n = 6; hordozó: 8.5 ± 3.8%, n = 7) és sejtrövidülés (SEA0400: 46 ± 15%; hordozó: 12 ± 15%) statisztikusan szignifikánsnak bizonyult. Ezzel szemben a $Ca^{2+}{}_{iD}$ emelkedés és a diasztolés sejtrövidülés csak kismértékű, statisztikusan inszignifikáns volt ($Ca^{2+}{}_{iD}$ növekedés: SEA0400: 6 ± 3%; hordozó: 1 ± 1%; p = 0.13; sejthossz rövidülés: SEA0400: 6 ± 3%; hordozó: 3 ± 1%; p = 0.22). Mivel a CaT lecsengése jól tükrözi a CaT relaxációs kinetikáját, monoexponenciális illesztéssel a tranziens relaxációs időállandóját is meghatároztuk, amely nem mutatott szignifikáns változást, sem SEA0400-ra (67 ± 6 → 72 ± 2 ms, n = 6), sem DMSO-ra (78 ± 6 → 79 ± 4 ms, n = 7).

SEA400 hatása az $Ca^{2+}{}_i$ tranziensre, sejtrövidülésre és L-típusú Ca^{2+} áramra perforált patch clamp mérésekben: Téringerelt szívizomsejtekben perforált patch clamp módszerrel vizsgáltuk a SEA0400 CaT-re és sejtrövidülésre gyakorolt hatásait, illetve egyidejűleg az I_{Ca}-t is regisztráltuk. A szívizomsejteket 4 Hz-es kompozit feszültségparancs-sorozattal a patch pipettán keresztül stimuláltuk. A kontroll állapotban végzett méréseket, a hordozó, illetve 0.3 µM SEA0400 alkalmazását követően megismételtük. A mért, reprezentatív CaT, sejtrövidülés és $I_{Ca,L}$ görbék a 29. ábrán (/A-C panelek) láthatók.

dc_1149_15



28. ábra 0.3 µM SEA0400 hatása a CaT-re és sejtrövidülésre izolált, 4 Hz téringerléssel stimulált patkány szívizomsejtekben. A $[Ca^{2+}]_i$ jellemzésére a fluoreszcenciahányadost (F360/F380) használtuk, a sejtrövidülést önkényes egységekben (AU) adtuk meg. Minden mérés-szett egyetlen sejtből készült, a hordozó **(A, C)**, illetve 0.3 µM SEA0400 **(B, D)** alkalmazása előtt, illetve 5 perccel azt követően. A sejtekből kapott átlageredmények: (**E)** a CaT amplitúdóváltozása; **(F)** a $[Ca^{2+}]_{iD}$ változása; **(G)** a sejtrövidülés változása; **(H)** a végdiasztolés sejthossz-változás.



29. ábra Patkány szívizomsejtekben peforált patch clamp módszerrel egyidejűleg meghatározott ***(A)***CaT, ***(B)*** sejtrövidülés, és ***(C)*** $I_{Ca,L}$. A sejtet a mérés előtt feszültségparancs sorozattal (4 Hz, 25 s) a patch pipettán keresztül stimuláltuk. Minden mérés-szett egyetlen sejtből készült, **(A-C,** bal**)** a hordozó, illetve **(A-C,** jobb**)** 0.3 µM SEA0400 alkalmazása előtt, illetve 5 perccel azt követően. A patch clamp mérések átlageredményei: (**D)** a CaT amplitudóváltozása; **(E)** sejtrövidülés-változás; **(F)** a csúcs $I_{Ca,L}$ változása; **(H)** az $I_{Ca,L}$ 50%-os inaktivációs időtartamának változása (hordozó: n = 4, SEA0400: n = 5).

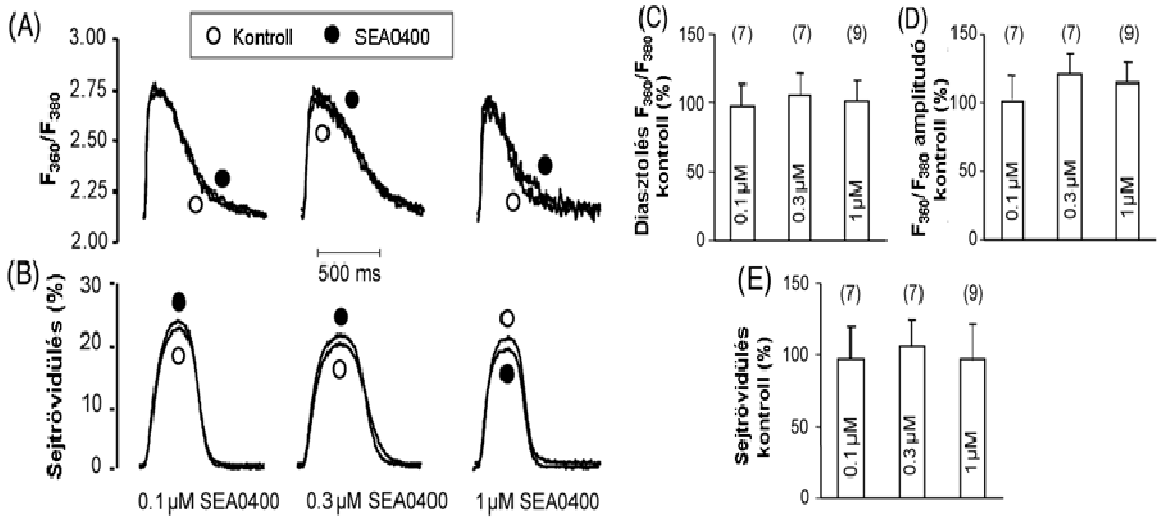
A téringerelt szívizomsejtekhez hasonlóan SEA0400 kezelést követően feszültség-clamp alkalmazása esetén is szignifikánsan nőtt a CaT nagysága (SEA0400: 32 ± 4.7%, n = 5; hordozó: 11 ± 6.9%; n = 4) és a sejtrövidülés (SEA0400: 26 ± 5.4%; hordozó: 0.9 ± 6.8%). Ezenkívül, a SEA0400 hatására mind az $I_{Ca,L}$ amplitúdója (SEA0400: -25 ± 5.0%, n = 5; hordozó: -6.5 ± 6.7%, n = 4), mind az áram 50%-os inaktivációjához szükséges időtartam (SEA0400: -7.9 ± 1.7%, n = 5; hordozó: -2.0 ± 1.5%, n = 4) szignifikánsan csökkent. A gátlószer hatásait százalékos változásban a 29. ábra /D-G panelek összegzik. A hordozóval összehasonlítva a SEA0400 a vizsgált paraméterekben statisztikailag szignifikáns változást indukált.

dc_1149_15

5.2.2. Az NCX gátlás következményei izolált kutya szívizomsejteken

A patkány szívizomsejteken végzett kísérleteket elvégeztük kutya szívizomsejteken is. A megfigyelés, hogy nagyobb emlősök szívén a részleges NCX gátlásnak egyáltalán nincs pozitív inotróp hatása, elvileg a gátlás az SR Ca^{2+} transzportra gyakorolt közvetlen hatásával, illetve a miofilamentumok Ca^{2+}-érzékenységének változásával is magyarázható.

SEA400 hatása az Ca^{2+}_i tranziensre és a sejtrövidülésre: A szívizomsejteket állandó, 1 Hz-es téringerléssel stimuláltuk. A stedy-state elérését követően a perfúziót átkapcsoltuk 0.1, 0.3 vagy 1 µM SEA0400-t tartalmazó oldatra. A maximális gátlás kevesebb, mint 5 perc alatt létrejött. A SEA0400 alkalmazása előtt és után regisztrált *reprezentatív* CaT és rövidülésgörbék a 30. ábra /A,B paneljein láthatók. A diasztolés fluoreszcenciahányadosra, F_{360}/F_{380} amplitúdóra és sejtrövidülésre meghatározott *átlagértékeket* az ábra /C-E paneljei összegzik. 0.1 - 1 µM koncentrációban a SEA0400 alkalmazása egyik paraméterben sem indukált szignifikáns változást, továbbá nem kaptunk szignifikáns eltérést a CaT 1 µM SEA0400 alkalmazása előtt, illetve után számított relaxációs időállandójára sem (269 ± 41, illetve 266 ± 17 ms, n = 9).

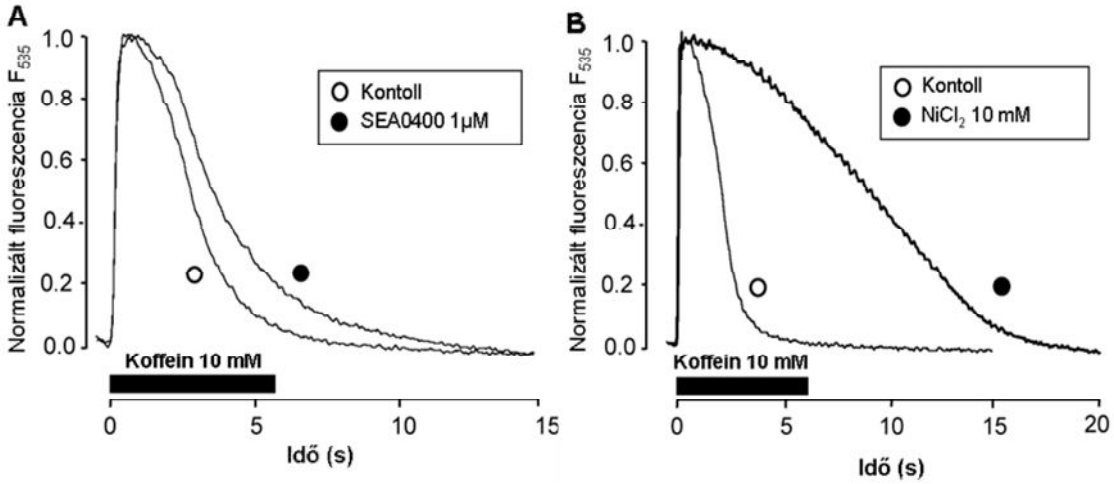


30. *ábra* 0.1, 0.3 és 1 µM SEA0400 hatása az CaT-re ***(A)*** és a sejtrövidülésre ***(B)*** konstans, 1 Hz-es téringerléssel stimulált kutya kamrai szívizomsejtekben. Az $[Ca^{2+}]_i$-t a F_{360}/F_{380} fluoreszcenciahányadossal, a sejtrövidülést a diasztolés sejthosszhoz viszonyítva jellemeztük. A regisztrátumok azonos sejtekből készültek SEA0400 alkalmazása előtt, illetve 5 perccel azt követően. A SEA0400 diasztolés fluoreszcenciahányadosra **(C)**, F_{360}/F_{380} amplitúdóra **(D)** és sejtrövidülésre **(E)** gyakorolt hatását a kontroll százalékában fejeztük ki. Zárójelben a vizsgált sejtek száma.

SEA0400 hatása a koffein-indukált Ca^{2+}_i tranziensekre: Mivel a CaT relaxációs kinetikája jól tükrözi a Ca^{2+}_i plazmából történő eltávolításának kinetikáját, az NCX gátlás következtében a gyors koffein szuperfúzió által kiváltott CaT lecsengési ideje megnyúlik **[449]**. Ezért a SEA0400 gátló hatását 6 s-ig tartó 10 mM-os koffein pulzussal kiváltott CaT-eken vizsgáltuk. A lecsengési időállandók összehasonlítása céljából az amplitúdóra normált tranzienseket egymásra illesztettük (31. ábra /A). A monoexponenciális illesztéssel meghatározott lecsengési időállandó 1 µM SEA0400 alkalmazását követően szignifikánsan nőtt (1.0 ± 0.05 → 1.3 ± 0.06 s, n = 10), de az időillesztett kontroll értékek nem változtak (0.96 ± 0.05 → 0.95 ± 0.04 s; N.S., n = 8). Az eredmények egyértelműen igazolják, hogy az adott feltételek mellett, a SEA0400 alkalmazható az NCX részleges gátlására. A gátlás hatékonysága kvantitatívan megbecsülhető az 1 µM SEA0400 és a közel 100% gátlási hatékonyságú 10 mM $NiCl_2$ alkalmazását követően regisztrált tranziensek (31. ábra /B)

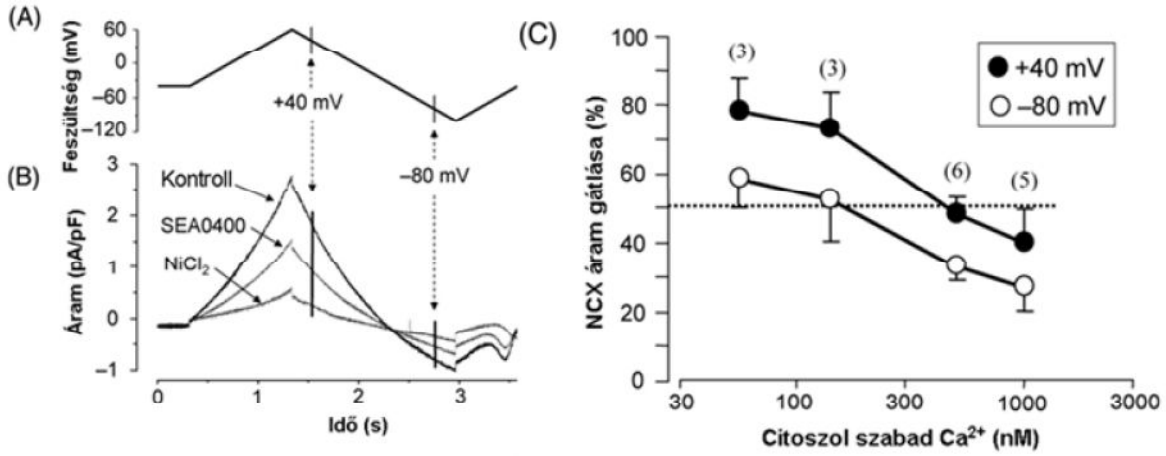
dc_1149_15

kinetikájának összehasonlításával. Mivel a $NiCl_2$ mellett mért tranziens leszálló szárára nem illeszthető monoexponenciális görbe, az 50% relaxációhoz szükséges időtartamot határoztuk meg, ami a $NiCl_2$ alkalmazását követően szignifikánsan, a többszörösére nőtt (1.3 ± 0.1 → 10 ± 1.3 s, n = 4). Bár 1 µM SEA0400 hatására a koffein-indukált CaT lecsengési időtartama ugyancsak megnyúlt, ez a megnyúlás a $NiCl_2$-ra mért drasztikus megnyúlásnál jóval kisebbnek bizonyult.



31. ábra 1 µM SEA0400 ***(A),*** illetve 10 mM $NiCl_2$ ***(B)*** hatása koffein (10 mM) szuperfúzióval kiváltott CaT-re. Reprezentatív, egymásra illesztett regisztrátumok. A koffein pulzus alkalmazása előtt a szívizomsejteket folyamatosan 1 Hz-en stimuláltuk. A stimulációt a regisztrálás időtartamára felfüggesztettük.

A SEA0400 Ca^{2+}_i-függő hatása az I_{NCX}-re: Fenti eredményeink valószínűsítik, hogy a SEA0400 gátlás hatékonysága $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés esetén nagymértékben lecsökken. Ezért következő lépésben meghatároztuk a gátlás mértékének Ca^{2+}_i-függését (32. ábra). Az NCX áramot Ni^{2+}-érzékeny áramként, a ramp leszálló szárán, a potenciált 1.6 s alatt +60 mV-ról -100 mV-ra változtatva határoztuk meg. A kifelé, illetve befelé irányuló áramokat +40mV és -80 mV membránpotenciál értékeknél olvastuk le (32. ábra /A,B).

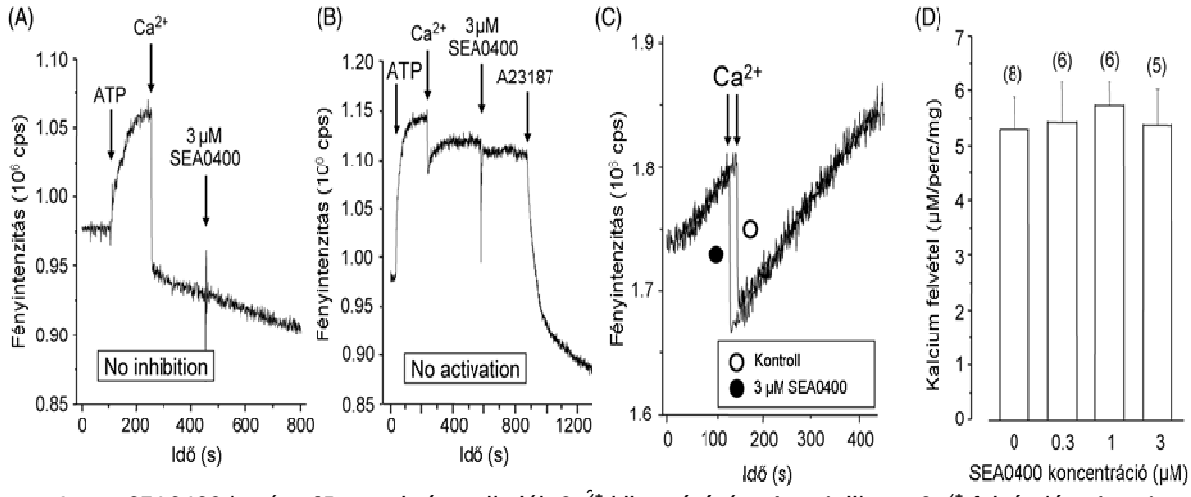


32. ábra SEA0400 hatása I_{NCX}-re a $[Ca^{2+}]_i$ függvényében. **(A)** Az NCX áramot „ramp" protokollal mértük. **(B)** Egymásra illesztett, K^+-mentes oldatban (kontroll), 1 µM SEA0400 jelenlétében, valamint 10 mM $NiCl_2$ alkalmazását követően mért áramgörbék. A kifelé irányuló (reverz), illetve befelé irányuló (forward) I_{NCX} nagyságát a ramp csökkenő szárán, +40 és –80 mV feszültségértékeknél (nyilak) határoztuk meg. **(C)** 1 µM SEA0400 reverz (+40 mV) és forward (-80 mV) I_{NCX} gátlásának mértéke a $[Ca^{2+}]_i$ függvényében. A szabad $[Ca^{2+}]$-t a pipettaoldat CaCl2 + EGTA tartalmának változtatásával 55, 140, 500, és 1000 nM-ra állítottuk be (zárójelben a sejtek száma).

dc_1149_15

A gátlás hatékonyságának $[Ca^{2+}]_i$ függését az 55 nM - 1 µM $[Ca^{2+}]_i$ tartományban, a pipettaoldat $Ca^{2+}{}_i$ + EGTA szintjének változtatásával határoztuk meg. Alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett 1µM SEA0400 mindkét áramot hatásosan gátolja. A kifelé irányuló áram ($_{rev}I_{NCX}$) gátlása kissé nagyobb mértékű, mint a befelé irányuló ($_{fwd}I_{NCX}$) áramé. A $[Ca^{2+}]_i$ 55 nM-ról 1 µM-ra növelése több, mint 50%-kal csökkentette az NCX gátlás hatékonyságát (32. ábra /C). Magas $[Ca^{2+}]_i$ (~ 1 µM) jelenlétében a viszonylag szelektív 1 µM koncentrációban a SEA0400 mindössze 28 ± 7%-kal csökkentette a $_{fwd}$NCX áramot. Az igencsak alacsony gátlási hatásfok indokolhatja a SEA0400 és $NiCl_2$ hatások szignifikáns eltéréseit (31. ábra).

A SEA0400 hatása a szarkoplazmás retikulum SR Ca^{2+} transzportjára. A SEA0400 esetleges intracelluláris Ca^{2+} kiáramlásra gyakorolt hatásait 20 µM extravezikuláris $[Ca^{2+}]$ mellett HSR vezikulumokon vizsgáltuk (33. ábra). Ilyenkor – mint azt az extravezikuláris $[Ca^{2+}]$ növekedés is igazolja (33. ábra /A) – a RyR receptorok *részlegesen nyitott* állapotban vannak (***'no inhibition'*** protokoll). SEA0400 alkalmazását követően – mint a Ca^{2+} felvételi görbe változatlan meredeksége mutatja – a Ca^{2+} felszabadulás sebessége nem változik. A mérés egyértelműen igazolja, hogy NCX gátlás a részlegesen nyitott RyR csatornák Ca^{2+} leadását egyáltalán nem befolyásolja. A Ca^{2+} felszabadulás sebességére 0, 0.3, 1 és 3 µM SEA0400 alkalmazása esetén 12 ± 0.9, 12 ± 1.1, 13 ± 1.2, és 13 ± 1.2 nmol/min/mg protein értékeket kaptunk (n = 7).



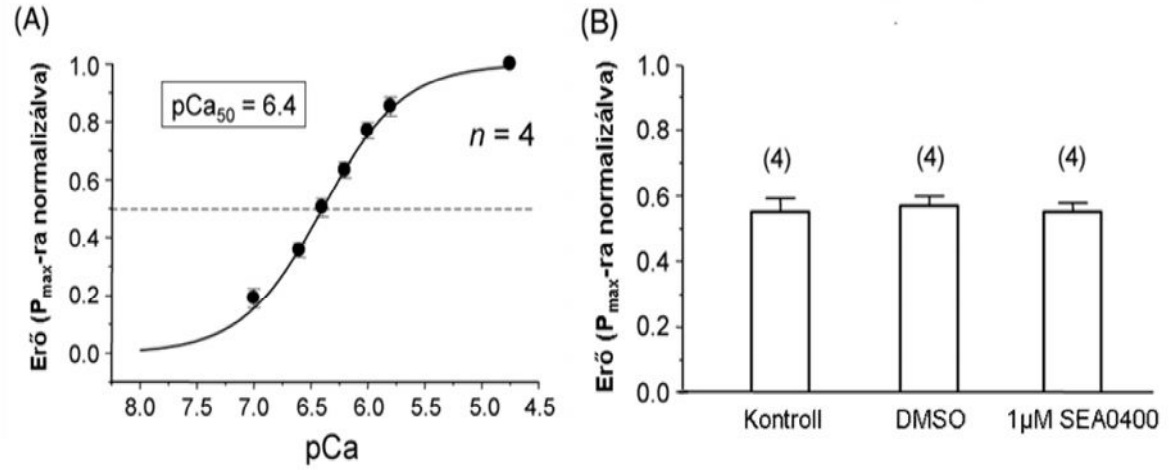
33. ábra SEA0400 hatása SR membránvezikulák Ca^{2+} kibocsátására ***(A, B)***, illetve Ca^{2+} felvételére ***(C, D)***. A fényintenzitás fordítottan arányos az extravezikuláris $[Ca^{2+}]$-val. **(A)** '***No inhibition***' protokollal készült regisztrátum. A vezikulákat $Ca^{2+}{}_o$ jelenlétében, ATP hozzáadásával Ca^{2+}-mal feltöltöttük, majd további Ca^{2+} hozzáadásával az extravezikuláris $[Ca^{2+}]$-t a RyR2 csatornák aktivációja céljából 20 µM-ra állítottuk be. A Ca^{2+} felszabadulás sebességét a SEA0400 alkalmazása előtt és után mért görbék meredekségéből számoltuk. A **(B)** '***No activation***' protokollal a SEA0400 nyugalomban lévő (zárt) RyR2 csatornákra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A vezikulák feltöltését követően az extravezikuláris $[Ca^{2+}]$-t 2 µM-ra állítottuk be. Ilyenkor a csatornák aktivációja elhanyagolható. Az aktiváció mértéke SEA0400 hozzáadására sem változott. Végül a vezikulák Ca^{2+} tartalmát Ca^{2+} ionoforral, (2 µM A23187) kiürítettük. **(C)** Az intenzitásgörbe Ca^{2+} hozzáadását követő szegmenséből meghatározott, a felvétel kezdősebességét mutató, reprezentatív, egymásra illesztett regisztrátumok. **(D)** A Ca^{2+} felvételt, az extravezikuláris $[Ca^{2+}]$ 10 µM-ra növelése céljából, 3 µM SEA0400 mellett, vagy hiányában, Ca^{2+} hozzáadásával aktiváltuk. A Ca^{2+} felvétel átlagsebessége 0, 0.3, 1, és 3 µM SEA0400 jelenlétében. Zárójelben a független mérések száma.

Hasonló meggondolással vizsgáltuk a SEA0400 *teljesen zárt* RyR csatornákra gyakorolt hatását ('***no activation***' protokoll). Ekkor jóval alacsonyabb, a küszöböt éppen meghaladó extravezikuláris $[Ca^{2+}]$-t állítottunk be. Tipikus, a '***no activation***' protokoll alkalmazása során kapott eredmények láthatók a 33. ábra /B paneljén. Az, hogy a regisztrátum középső szegmensének értéke állandó (a szegmens vízszintes) igazolja, hogy a RyR csatornák Ca^{2+} leadása ilyenkor elhanyagolható, túlnyomó többségük zárt állapotban van. Mérhető Ca^{2+} kiáramlás SEA0400 hatására sem jön létre, viszont a csatorna aktivátor A23187 jelentős

dc_1149_15

felszabadulást indukál, ezzel igazolva, hogy a vezikulák Ca^{2+} tartalma magas. 0, 0.3, 1, és 3 µM SEA0400 jelenlétében a Ca^{2+} felszabadulás mértékére 2.2 ± 0.31, 2.2 ± 0.3, 2.3 ± 0.28 és 2.3 ± 0.3 nmol/min/mg protein értékeket kaptunk (n = 6). A SERCA2 aktivitása ugyancsak megbecsülhető az extravezikuláris [Ca^{2+}] maximális pumpasebesség melletti időfüggő változásainak mérésével LSR vezikulák Ca^{2+} felvételének kezdeti sebességéből, amit 0, 0.3, 1, és 3 µM SEA0400 koncentrációk mellett is meghatároztunk (33. ábra /C,D). Ez a sebesség láthatóan független az alkalmazott SEA0400 koncentrációtól, igazolva, hogy a gátlószer nem befolyásolja a Ca^{2+} visszavételét az intracelluláris térből az SR lumenbe.

SEA0400 hatása a kontraktilis proteinek Ca^{2+} érzékenységére membránfosztott (skinned) szívizomsejtekben. Ezekben a mérésekben először az erő – pCa összefüggést határoztuk meg (34. ábra). A félaktivációs [Ca^{2+}] (pCa_{50}) meghatározása céljából a kontrakciós erőt fokozatosan emelkedő $Ca^{2+}{}_o$ értékek mellett mértük; a vizsgált preparátumokban a pCa_{50} értékére ~ 6.4 adódott (34. ábra /A). A maximális passzív, illetve Ca^{2+}-aktivált izometrikus erőket kontroll állapotban, valamint 1 µM SEA0400 alkalmazását követően, egyetlen $[Ca^{2+}]_o$ esetén (pCa = 6.4) négy, más-más szívből származó, permeabilizált sejtre határoztuk meg (34. ábra /B). Erre a két erőre 3.6 ± 1.7 kN/m^2, illetve 28 ± 9.8 kN/m^2 értékeket kaptuk. Mivel a SEA0400 DMSO-ben oldható, a kontroll kísérleteket DMSO jelenlétében is megismételtük. Mint az ábra mutatja, a SEA0400 jelenléte egyáltalán nem befolyásolja a Ca^{2+}-aktivált erő nagyságát (kontroll: 0.6 ± 0.03 P_{max}, SEA0400: 0.6 ± 0.04% P_{max}; pCa = 6.4), továbbá ez az erő még DMSO hozzáadását követően sem változik (0.6 ± 0.03% P_{max}). Eredményeink alapján biztonsággal állítható, hogy a Ca^{2+}-függő erő SEA0400-függő, modulációját nem limitálhatja a kontraktilis fehérjék Ca^{2+}-szaturációja.



34. ábra SEA0400 hatása a kontraktilis fehérjék Ca^{2+}-érzékenységére. **(A)** Négy „skinned" kutya szívizomsejt preparátumon meghatározott erő – pCa összefüggés. A folytonos vonalat a Hill egyenlet mérési adatokra illesztésével nyertük. **(B)** Kontroll állapotban, továbbá csak DMSO, illetve 1 µM SEA0400 (+ DMSO) jelenlétében pCa = 6.4-nél mért P_{max}-ra normalizált kontraktilis erő. Zárójelben a mérések száma.

5.3. Az NCX gátlás antiaritmiás hatásának analízise kísérletes szívbetegségekben

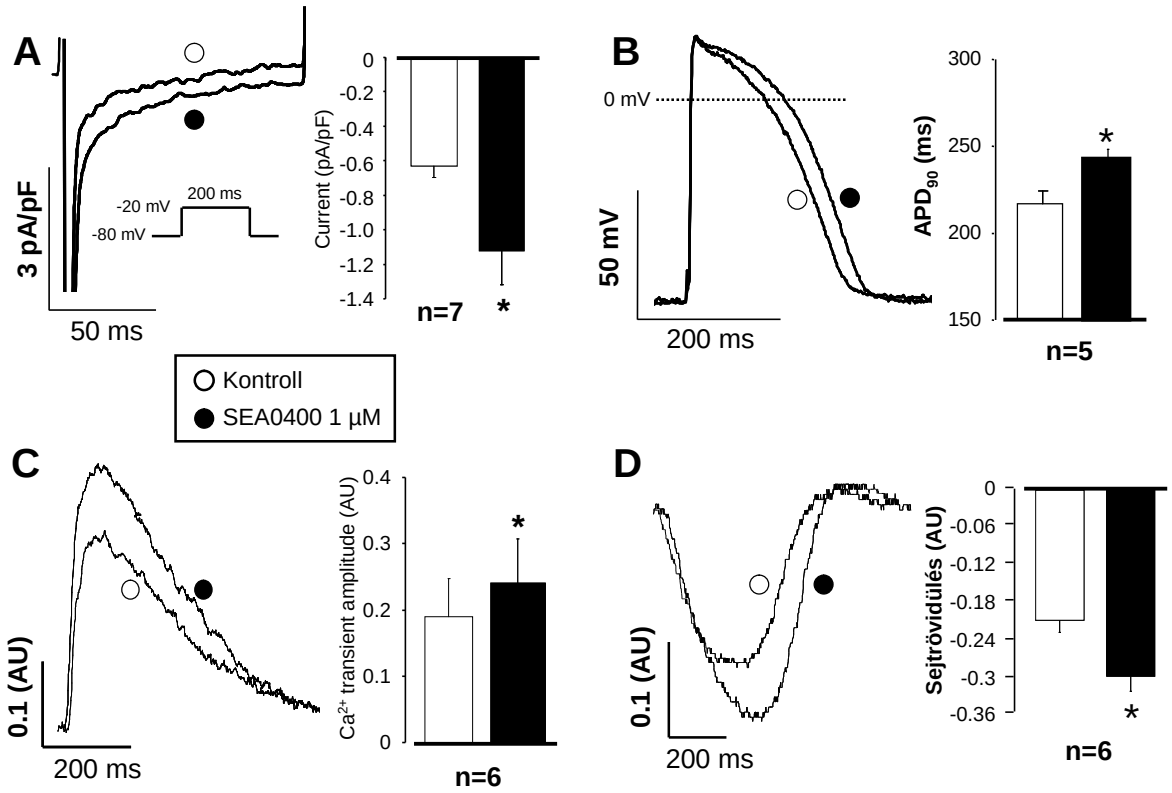
Több súlyos szívbetegségre egyaránt jellemző az NCX aktivitás elsődleges vagy kompenzatorikus jellegű fokozódása, ezért ezekben a betegségekben a kicserélő potenciális farmakológiai célpontot, gátlása ígéretes terápiás stratégiát jelenthet. A vonatkozó kísérleti projektek elsődleges célkitűzése a részleges NCX gátlás terápiás hatékonyságának elemzése volt. Ezenkívül a vizsgálatok célozták a Ca^{2+}-függő aritmogenezis háttérmechanizmusainak mélyebb megértését, és értékes információkat vártunk a triggerelt aritmiák kialakulási valószínűségének egy újabb, farmakológiai módszerekkel

dc_1149_15

történő csökkentésére vonatkozóan, annál is inkább, mivel a kísérletek nagy részében lehetőségünk volt a SEA0400-nál szelektívebb ORM-10103 használatára. Alábbiakban bemutatott vizsgálataink az ***első publikált adatokat szolgáltatják*** *egy funkcionális szempontból is szelektívnek tekinthető NCX gátlószer (ORM-10103) antiaritmiás hatékonyságáról egyes szívbetegség-modellekben.*

5.3.1. Fokozott késői Na^+ áram (I_{NaL}) esetén (LQT3 modell)

A fokozott késői Na^+ áram (I_{NaL}) egyrészt a genetikus hátterű LQT3 szindróma jellegzetes tulajdonsága, másrészt – ami talán még fontosabb – modellezheti az iszkémia és főként a reperfúzió során kialakuló, súlyos Ca^{2+}_i túltelődéshez vezető, drasztikus Na^+_i emelkedést is; az indukált Ca^{2+}_i túltelődés pedig az aritmogenezis egyik legfontosabb oka. Ebben a munkában 2 kérdésre kerestünk választ: (1) Van-e lényeges eltérés a jól ismert SEA0400 és az újabb, szelektívebb ORM-10103 NCX gátló hatásai között? (2) Részleges NCX gátlással kivédhetők-e a markáns $[Na^+]_i$ fokozódás aritmogén következményei?



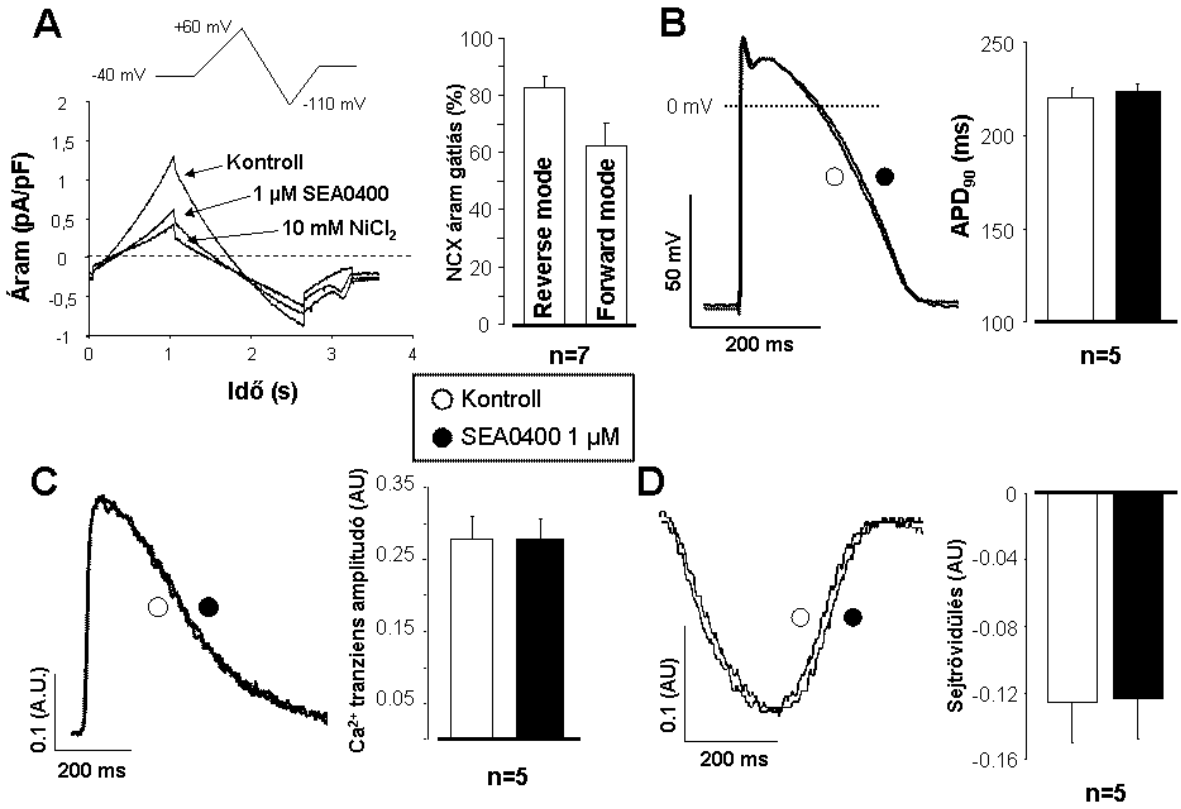
35. ábra I_{NaL} aktiváció hatása az APD-re, CaT-re és sejtrövidülésre izolált kutya kamrasejtekben. 2 nM ATX-II – inaktivációs kinetikájának lassításával – szignifikánsan megnövelte az $I_{Na,L}$-t **(A)**. Ennek következtében az APD megnyúlt **(B)**, a CaT amplitúdója megnőtt **(C)**, ami fokozott sejtrövidülést eredményezett **(D)**. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg, a ***** a kontrollhoz képest szignifikáns különbséget jelöl ($p < 0.05$). AU: önkényes egység.

A késői Na^+ áram aktiválása. Az áramot 2 nM ATX-II alkalmazásával aktiváltuk. Az ATX-II jól ismert hatása a Na^+ beáramlás jelentős fokozása az I_{Na} inaktivációjának késleltetése révén **[450]**. 2 nM ATX-II alkalmazása szignifikánsan növelte az $I_{Na,L}$ 200 ms depolarizációs pulzus végén mért amplitúdóját (-0.7 ± 0.1 → -1.1 ± 0.2 pA/pF, n = 7/3, (35. ábra /A). (*A második n szám a kísérleti állatok száma*). Ugyancsak szignifikánsan megnőtt az APD_{90} (219 ± 6 → 242 ± 4 ms, n = 5/5), (35. ábra /B), a CaT amplitúdója (0.18 ± 0.06 → 0.23 ± 0.07 AU, n=6/3), illetve a CaT növekedésével párhuzamosan a sejtrövidülés (-0.2 ± 0.02 → -0.3 ± 0.03 AU, n = 6/3) is (35. ábra /B,D). 1 µM veratridin

dc_1149_15

alkalmazását követően az ATX II-vel analóg változások jöttek létre (nem mutatjuk). A depolarizáló pulzus (200 ms, -20 mV) végén szignifikánsan megnőtt az I_{NaL} (-0.7 ± 0.02 → -1.6 ± 0.17 pA/pF, n = 7/3), a CaT amplitúdója (0.16 ± 0.03 → 0.21 ± 0.04 AU, n = 10/3), és szignifikánsan megnyúlt az APD_{90} is (207 ± 8 → 276 ± 6 ms, n = 5/5).

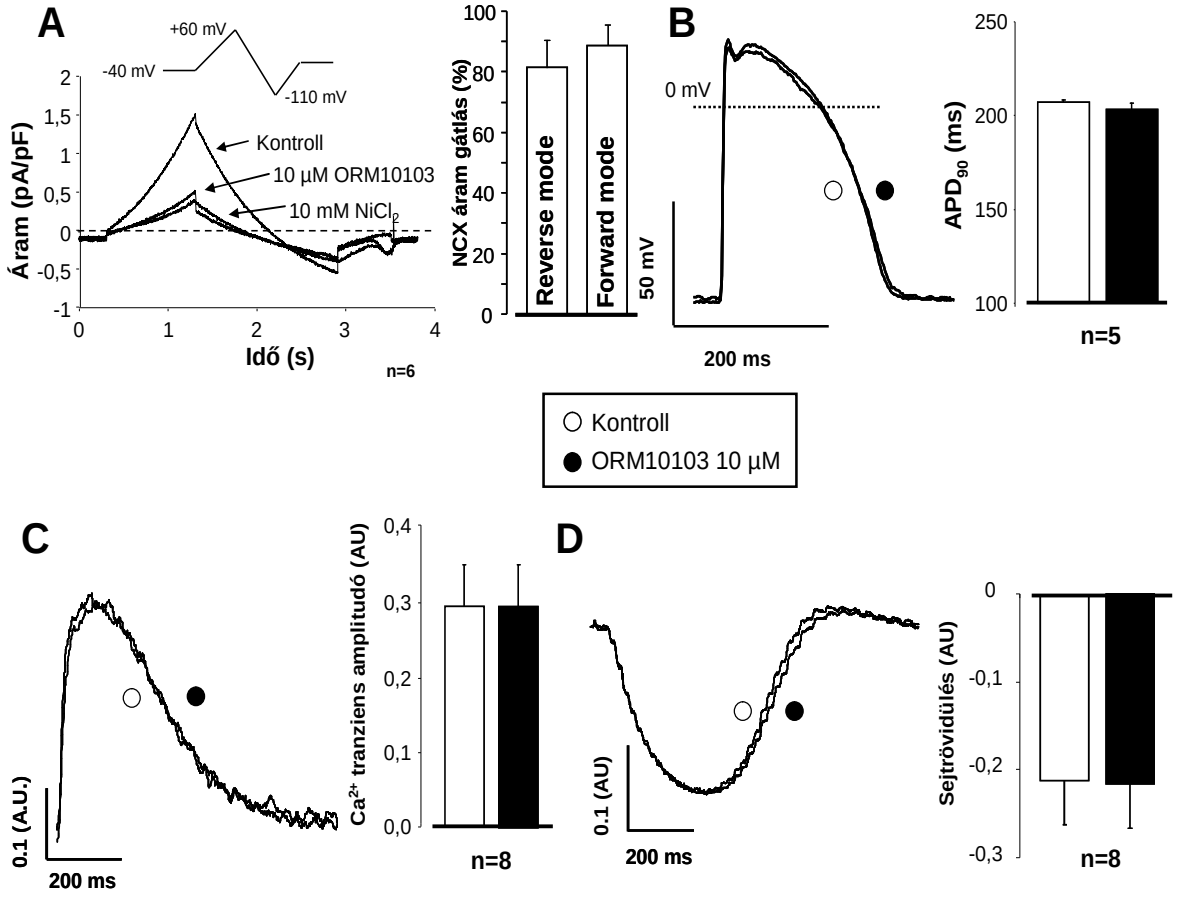
SEA0400 és ORM-10103 hatása az NCX áramra, APD-re és CaT-re: Ezekben a kísérletekben a pipettaoldat 10 mM NaCl-ot tartalmazott, a $[Ca^{2+}]_i$-ot WinMaxC-vel **[443]**, kiszámított megfelelő $CaCl_2$ + EGTA kombinációval ~ 160 nM-ra állítottuk be. 1 µM SEA0400 mind a reverz, mind a forward I_{NCX}-et szignifikánsan gátolta (83 ± 4%, valamint 62 ± 8%, n = 7/4) (36. ábra /A). A viszonylag magas mértékű I_{NCX} gátlás ellenére nem változott sem az APD_{90} (220 ± 8 *vs.* 222 ± 10 ms, n = 5/5), sem a CaT amplitúdója (0.27 ± 0.02 *vs.* 0.27 ± 0.02 AU, n = 5/3) vagy fél-relaxációs ideje (301 ± 24 *vs.* 300 ± 20 ms), sem pedig a sejtrövidülés (-0.13 ± 0.02 *vs.* -0.12 ± 0.02 AU, n = 5/3) (36. ábra /B-D).



36. ábra SEA0400 hatása az I_{NCX}-re, APD-re és CaT-re izolált kutya szívizomsejtekben. Az I_{NCX}-et, Ni^{2+}-szenzitív áramként, konvencionális ramp protokollal mértük, a leszálló szár +40 és -80 mV értékeinél. 1 µM SEA0400 jelentősen gátolta mind a reverz, mind a forward I_{NCX}-et **(A)**. Ugyanakkor sem az APD_{90} **(B)**, sem a CaT **(C)**, sem a sejtrövidülés **(D)** nem változott 1 µM SEA0400 alkalmazását követően.

A jóval szelektívebb (az $I_{Ca,L}$-t sem befolyásoló) ORM-10103, a SEA0400-hoz hasonlóan, szignifikáns I_{NCX} gátlást hozott létre, a gátlás mindkét transzportirányban – a SEA0400 gátló hatásához hasonlóan – közel azonosnak, de annál jóval magasabb szintűnek bizonyult (reverz: 82 ± 9%, forward: 88 ± 6%, n = 6/2), (37. ábra /A). A 10 µM ORM-10103 által indukált jelentős gátlás ellenére sem az APD_{90} (207 ± 2 *vs.* 204 ± 3 ms, n = 5/2), sem a CaT amplitúdója (0.3 ± 0.06 *vs.* 0.3 ± 0.06 AU, n = 8/3) sem a sejtrövidülés mértéke nem változott **(**37. ábra /B-D**)**, viszont a SEA0400 hatástalanságával szemben, a fél-relaxációs idő mérsékelt, de szignifikáns növekedést mutatott (292 ± 22 *vs.* 304 ± 23 ms, n = 8/3) (nem látható).

dc_1149_15

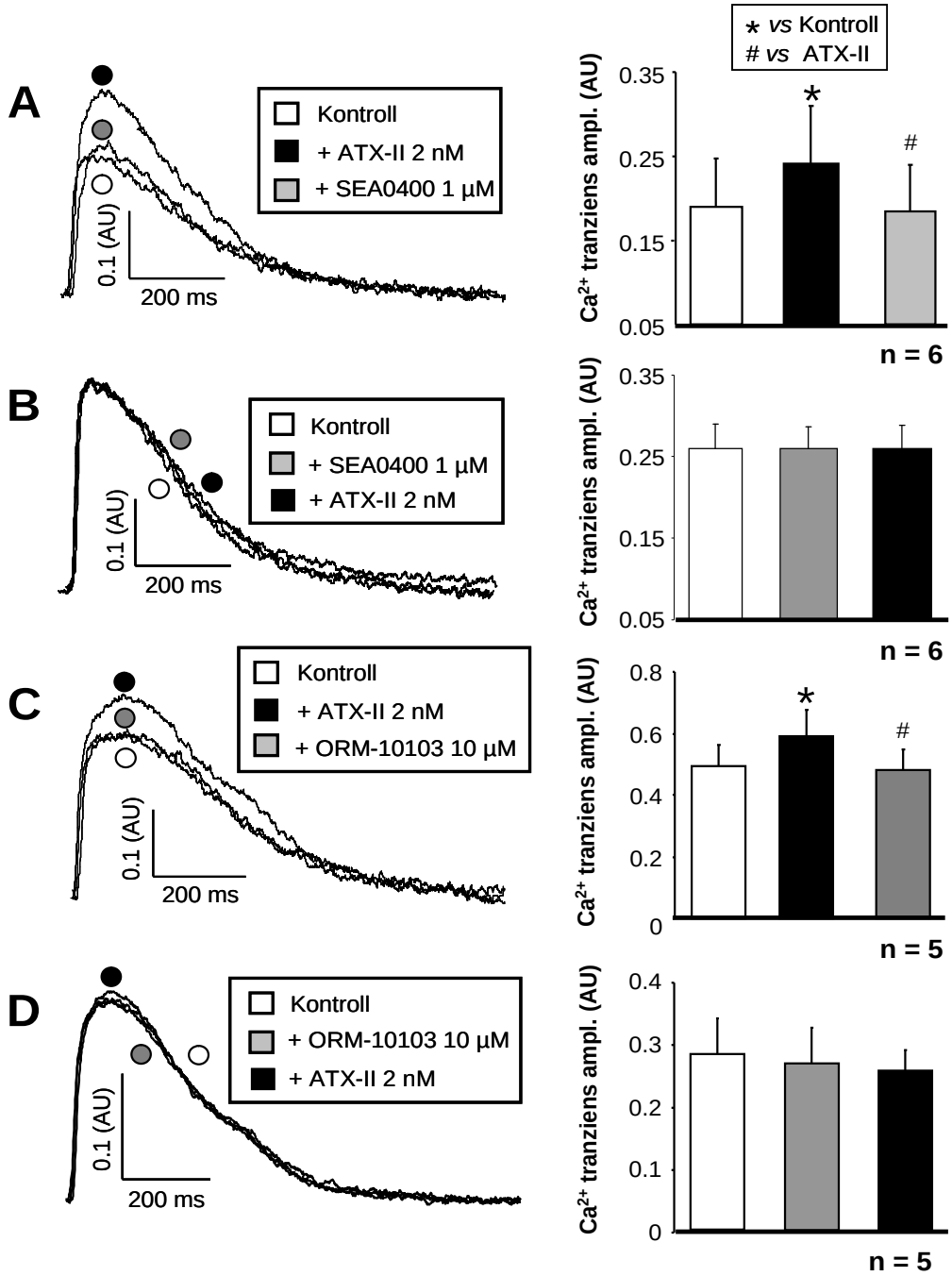


37. ábra ORM-10103 hatása az I_{NCX}-re, APD-re és CaT-re. A ramp protocoll alkalmazása során 10 µM ORM-10103 az I_{NCX}-et mindkét transzportirányban effektíven gátolta **(A)**, de a SEA0400-hoz hasonlóan az APD_{90}-et **(B)**, a CaT nagyságát **(C)**, és a sejtrövidülést **(D)** egyáltalán nem befolyásolta.

NCX gátlás hatása az ATX-II indukált CaT amplitúdó-, és sejtrövidülés-növekedésre: Az NCX gátlásának a CaT ATX II-indukált változásaira gyakorolt hatásait a 38. ábra összegzi. 2 nM ATX-II hatására a CaT amplitúdója szignifikánsan nőtt (0.25 ± 0.04 → 0.30 ± 0.04 AU, n = 6/3). Ez az emelkedés 1 µM SEA0400 hatására eltűnt (0.23 ± 0.04 AU, n = 6/3), (38. ábra /A). A sejtrövidülés hasonló, szintén szignifikáns változásokat mutatott (kontroll: -0.15 ± 0.01, ATX-II: -0.23 ± 0.01, ATX-II + SEA0400: -0.14 ± 0.01 AU, n = 6/3). Amennyiben elsőként a SEA0400-at alkalmaztuk, a gátlás kivédte a CaT (0.26 ± 0.03, 0.26 ± 0.03 és 0.26 ± 0.03 AU, n = 5/2) (38. ábra /B) és a sejtrövidülés (-0.13 ± 0.03, -0.12 ± 0.02 és -0.13 ± 0.03 AU, n = 6/2) ATX-II indukált növekedését.

A SEA0400 eredményekkel analóg, ugyancsak szignifikáns eredményeket kaptunk 10 µM ORM-10103 alkalmazásával is. Szelektív NCX gátlás visszafordította a ATX-II indukált CaT amplitúdónövekedést (0.49 ± 0.07 *vs.* 0.59 ± 0.09 *vs.* 0.48 ± 0.06 AU, n = 5/2), (38. ábra /C), ami ORM10103 előkezelés után ki sem alakult (kontroll: 0.23 ± 0.06, ORM-10103: 0.27 ± 0.06; ORM10103 + ATX II: 0.26 ± 0.003 AU, n = 5/2), (38. ábra /D). A sejtrövidülés mértékének változásai ez esetben is követték a $[Ca^{2+}]_i$ változásait: a gátlás helyreállította (kontroll: -0.24 ± 0.07, ATX-II: -0.31 ± 0.09; ATX-II + ORM-10103: -0.23 ± 0.07 AU, n = 5/2, $p < 0.05$), illetve kivédte a rövidülés ATX II-indukált növekedését (kontroll: -0.21 ± 0.07; ORM-10103: -0.22 ± 0.07; ORM-10103 + ATX II: -0.21 ± 0.08 AU, n = 5/2).

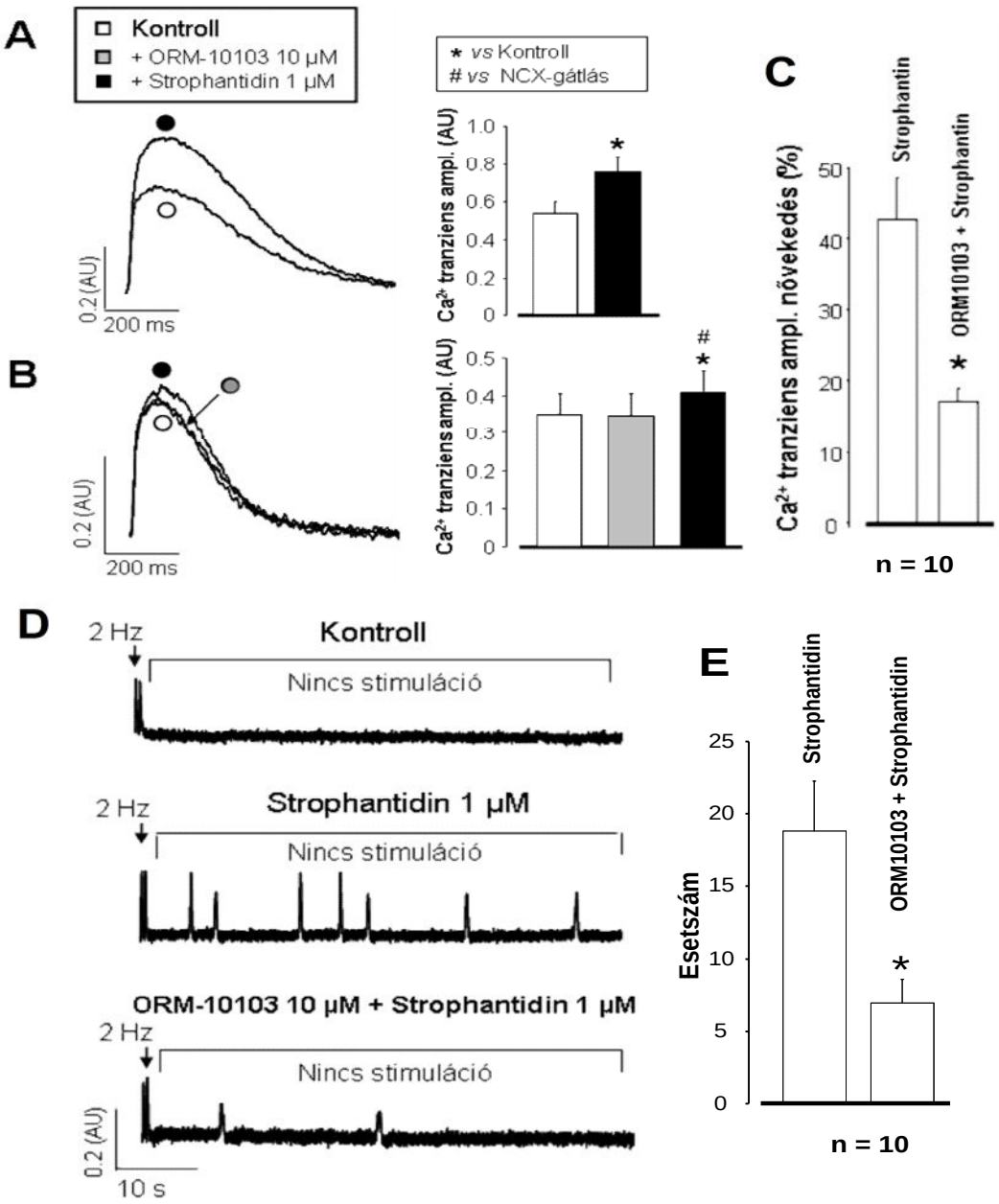
dc_1149_15



38. ábra Az NCX gátlás hatásosan gátolja az I_{NaL} aktiváció által indukált Ca^{2+}_i növekedést. 2 nM ATX-II előkezelés szignifikánsan növelte a CaT amplitúdóját, de az 1 µM SEA0400 alkalmazását követően helyreállt **(A.** 1 µM SEA0400 előkezelést követően az ATX-II nem növelte a CaT nagyságát **(B)**. Hasonló eredményt kaptunk, ha az NCX-et 10 µM ORM-10103-mal gátoltuk: az ATX-II indukált CaT emelkedés helyreállt, vagy ki sem alakult (**C, D)**. A statisztikai szignifikanciát ANOVA + Bonferroni post hoc teszt segítségével ellenőríztük. Az oszlopok és vonalak az átlag ± S.E.M. értékeket mutatják, a * és # a kontrollhoz és az ATX II kezelt csoporthoz viszonyított szignifikáns eltérést jelöli ($p < 0.05$).

ORM-10103 hatása a spontán diasztolés Ca^{2+}_i felszabadulásra: Ezekben a kísérletekben részleges I_{NCX} gátlás hatékonyságát vizsgáltuk kombinált strophantidin előkezelés + burst ingerlés aritmogén, számos spontán diasztolés lokális Ca^{2+}_i felszabadulást (spark) indukáló hatásával szemben, három randomizált - (1) kezeletlen, (2) 1 µM strophantidinnal kezelt, (3) strophantidin kezelést megelőzően 10 µM ORM-10103-mal előkezelt - szívizomsejt csoporton. A spontán diasztolés, lokális Ca^{2+}_i felszabadulási eseményeket rövid stimulus-sorozattal (2 Hz) indukáltuk, majd az ezt követő 2 perces nyugalmi időszakban számoltuk. 1 µM strophantidin szignifikánsan megnövelte az Ca^{2+}_i tranziensek amplitúdóját (0.54 ± 0.06 → 0.76 ± 0.07 AU, n = 10/4), (39. ábra /A).

dc_1149_15

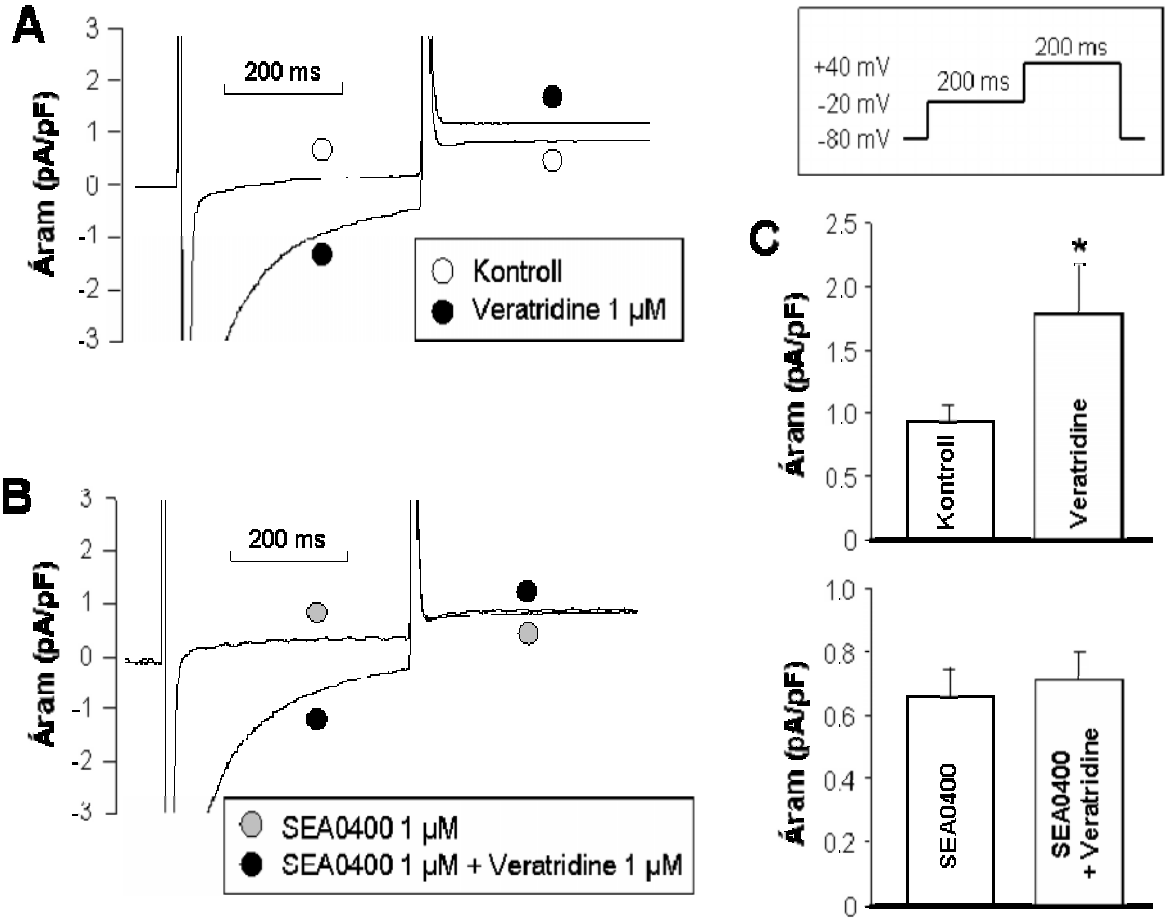


39. ábra 10 µM ORM-10103 antiaritmiás hatékonysága strophantidin provokáció során. **(A)** Az NKA transzportaktivitás gátlása (1 µM strophantidin) szignifikánsan növeli a CaT nagyságát. **(B, C)** Ezt a növekedést ORM-10103 előkezelés jelentősen csökkenti. Rövid, 2 Hz-es stimulussorozatot követően spontán diasztolés lokális Ca^{2+} felszabadulás (spark) strophantidin távollétében nem figyelhető meg (**D,** felső panel), ugyanakkor, 1 µM strophantidin jelenlétében számos Ca^{2+}-spark alakul ki (**D**, középső panel). ORM-10103 előkezelést követően a strophantidin provokáció jóval kevésbé eredményes; a létrejött Ca^{2+} sparkok száma jelentősen csökken (**D**, alsó panel, és (**E**)). A **B** panelre vonatkozó statisztikai szignifikanciát ANOVA + Bonferroni post hoc teszt segítségével igazoltuk.

Bár az ORM-10103 előkezelés önmagában nem befolyásolta a CaT-t, a strophantidin-indukált Ca^{2+}_i emelkedést az előkezelés nagymértékben csökkentette (kontroll: 0.35 ± 0.05, ORM-10103: 0.35 ± 0.05, ORM-10103 + strophantidine: 0.41 ± 0.05 AU, n = 10/4, N.S.), (39. ábra /B). Strophantidin hatására az CaT relatív amplitúdóemelkedése 43 ± 6% volt, míg ORM-10103 előkezelést követően az emelkedés csak 17 ± 2% volt (39. ábra /C**)**. Ezenkívül, míg a kezeletlen csoportban nem alakultak ki Ca^{2+}_i sparkok (39. ábra /D_{fenn}), 1 µM strophantidin hatására számos spark mutatkozott (39. ábra /$D_{közép}$), ugyanakkor számuk 10 µM ORM-10103 jelenlétében szignifikánsan csökkent (39. ábra /D_{lenn} & E).

dc_1149_15

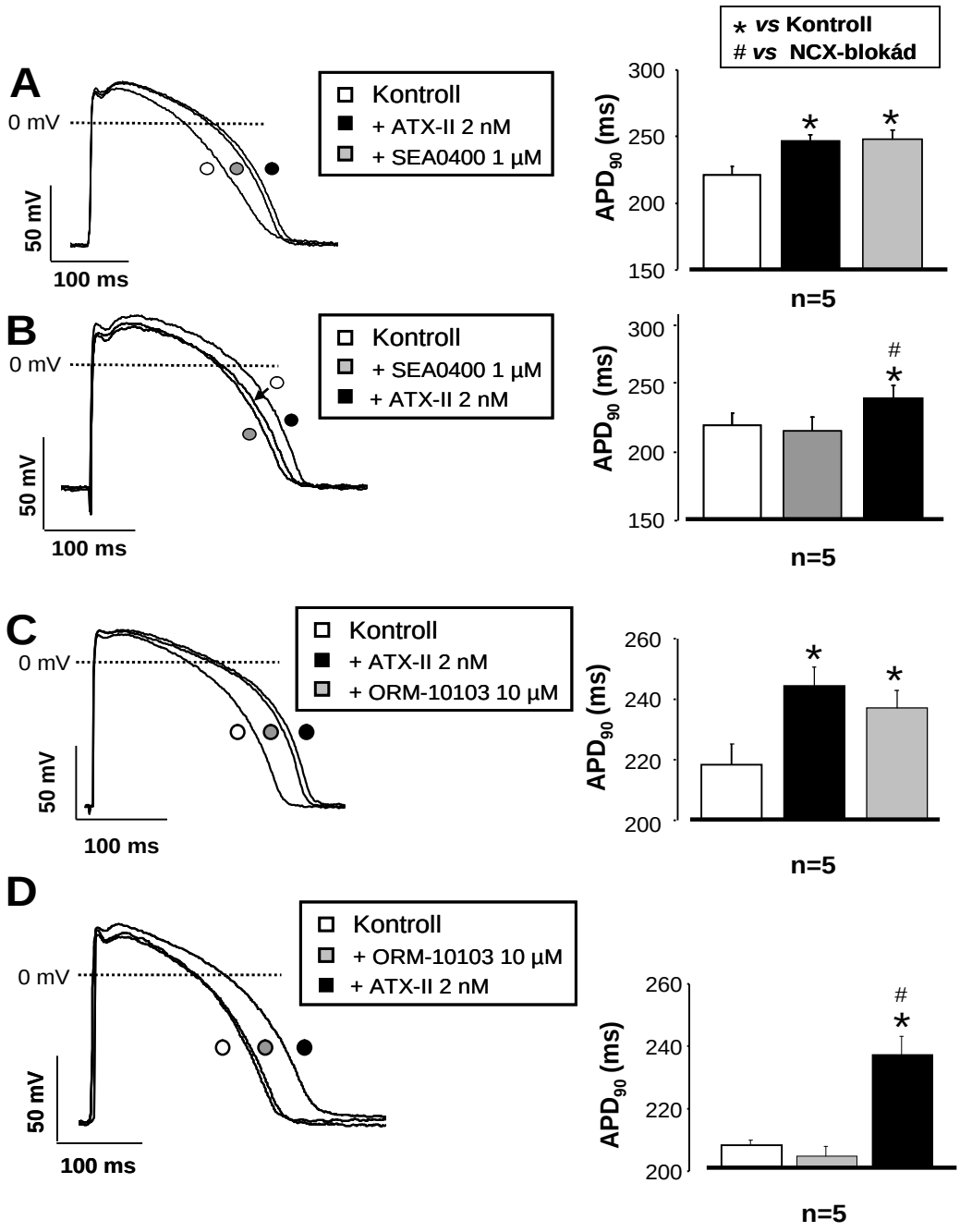
SEA0400 hatása a $_{rev}I_{NCX}$ $I_{Na,L}$-indukált emelkedésére: Ezekben a kísérletekben az $I_{Na,L}$ és $_{rev}I_{NCX}$ áramokat egyidejűleg határoztuk meg. A $_{rev}I_{NCX}$ aktivációját a pipettaoldat Na^+ tartalmának 15 mM-ra emelésével, illetve a $[Ca^{2+}]_i$ 160 nM-ra állításával segítettük. Ha az I_{NCX}-et a veratridin szuperfúziója előtt 1 µM SEA0400 előkezeléssel gátoltuk, a $I_{Na,L}$ és $_{rev}I_{NCX}$ közötti csatolás jelentősen gyengült. Bár önmagában a SEA0400 az $I_{Na,L}$ nagyságát nem befolyásolja, a magas Na^+ tartalom által indukált másodlagos I_{NCX} növekedést SEA0400 előkezelés kivédte. 1 µM veratridin jelenlétében a $_{rev}I_{NCX}$ amplitúdója jelentősen nőtt (kontroll: 0.93 ± 0.24 A/F, veratridin: 1.79 ± 0.43 A/F) (40. ábra /A,C). SEA0400 előkezelést követően az I_{NCX} veratridin hatására nem változott (SEA0400: 0.66 ± 0.12 pA/pF + veratridin: 0.71 ± 0.1 pA/pF), (n = 8/4, N.S.) (40. ábra /B,C). Veratridin helyett ATX-II-t (2 nM) alkalmazva lényegében azonos eredményeket kaptunk (nem mutatjuk).



40. ábra 1 µM SEA0400 hatása a veratridin-indukált $_{rev}I_{NCX}$ emelkedésre. **(A)** 1 µM veratridin (-20 mV-on mért) $I_{Na,L}$ aktiváló hatása a (+40 mV-on mért) $_{rev}I_{NCX}$ amplitúdóját megemeli, de **(B,C)** SEA0400 (1 µM) előkezelés ezt a növekedést megakadályozza. Az I_{NCX}-et a Ni^{2+}-érzékeny árammal jellemezzük. Az inzertben a pulzus protokoll látható.

SEA0400 és ORM-10103 nem gátolja az ATX-II APD-nyújtó hatását: Annak ellenére, hogy mind a SEA0400, mind a szelektívebb NCX gátló ORM10103 hatékonyan gátolta az ATX-II-indukált Ca^{2+}_i túlterhelést, mindkét gátlószer hatástalannak bizonyult az ATX-II markáns APD-nyújtó hatásával szemben. 1 µM SEA0400, sem előkezelés, sem utókezelés formájában alkalmazva nem befolyásolta az APD megnyúlás mértékét (41. ábra /A,B). Hasonlóan, az ORM10103 is hatástalan volt az ATX-II APD nyújtó hatásával szemben: sem nem védte ki, sem szignifikánsan nem csökkentette az ATX-II-indukált APD megnyúlást (41. ábra /C,D).

dc_1149_15

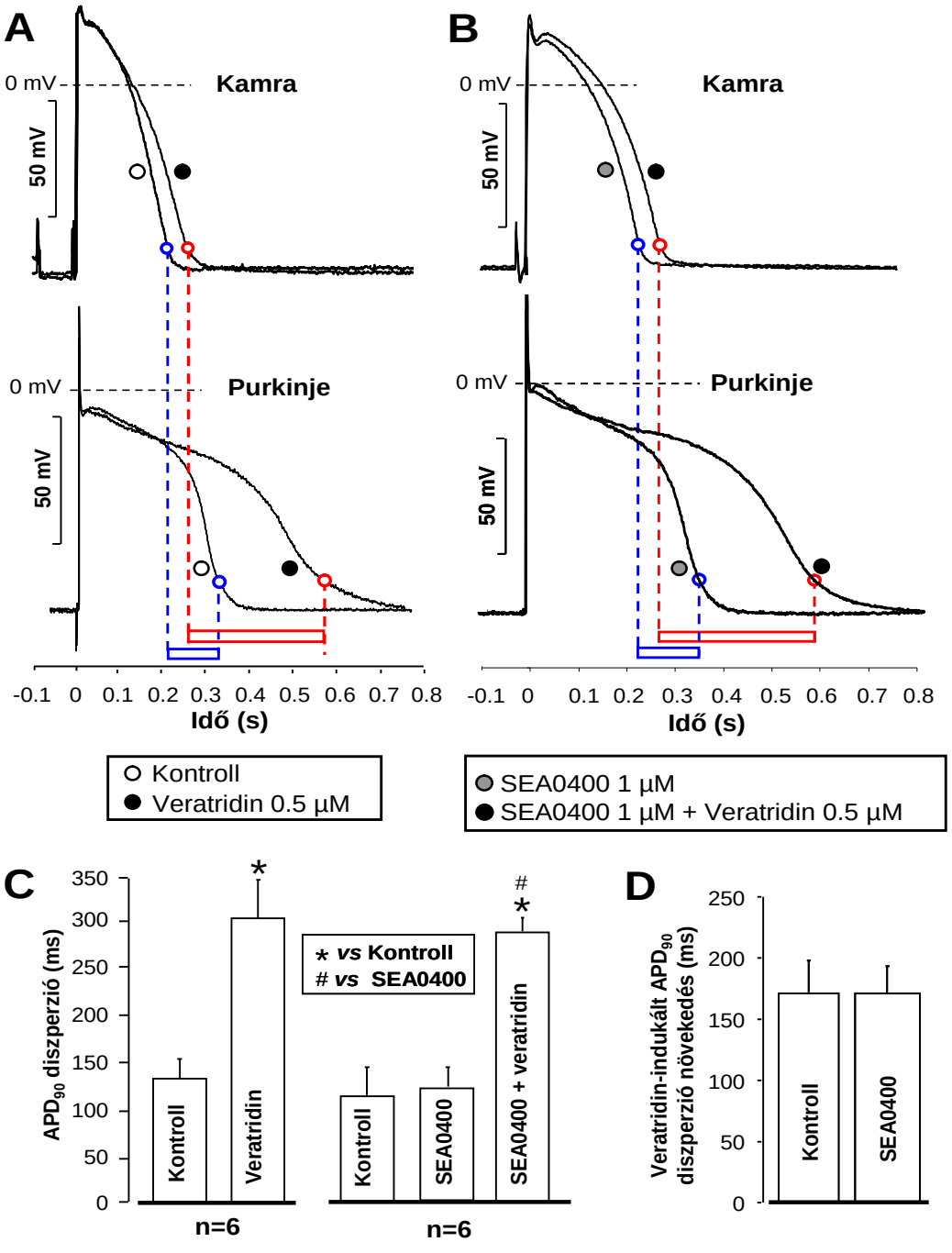


41. ábra Az NCX gátlása nem befolyásolja az I_{NaL} aktiváció által indukált APD megnyúlást. A kísérleti protokoll megegyezett a 38. ábrán alkalmazottal. Az $[Ca^{2+}]_i$ tranziens méréssel szemben az I_{NaL} aktiváció-indukált APD_{90} megnyúlást az NCX gátlás nem befolyásolta. Sem a SEA0400 **(A, B),** sem az ORM-10103 **(C, D)** nem fordította vissza, és nem is csökkentette szignifikánsan az ATX II-indukált APD megnyúlást, ami gyakran EAD kialakulásához vezet. A statisztikus analízist ANOVA plus Bonferroni post hoc teszttel végeztük.

SEA0400 hatása az APD diszperzióra kamra-Purkinje preparátumban. Ezekben a kísérletekben kutya bal kamrai multicelluláris (Purkinje rost + szívszövet) preparátumokon vizsgáltuk, hogy milyen mértékben befolyásolja a szelektív I_{NCX} gátlás az I_{NaL} aktiváció AP diszperziót fokozó hatását. A Purkinje rostok és kamrasejtek közötti APD_{90} diszperziót két randomizált kísérleti csoportban, két mikrolektród egyidejű alkalmazásával határoztuk meg. Az első csoportban csak veratridin kezelést alkalmaztunk, a másodikban a veratridin alkalmazása előtt 1 µM SEA0400 előkezelést végeztünk. A Purkinje-kamra preparátumon kontroll körülmények között meghatározott AP diszperzió mértéke 0.5 µM veratridin szuperfúzióját követően (132 ± 18 ms) szignifikánsan nőtt (303 ± 43 ms) (42. ábra /A,C**)**.

dc_1149_15

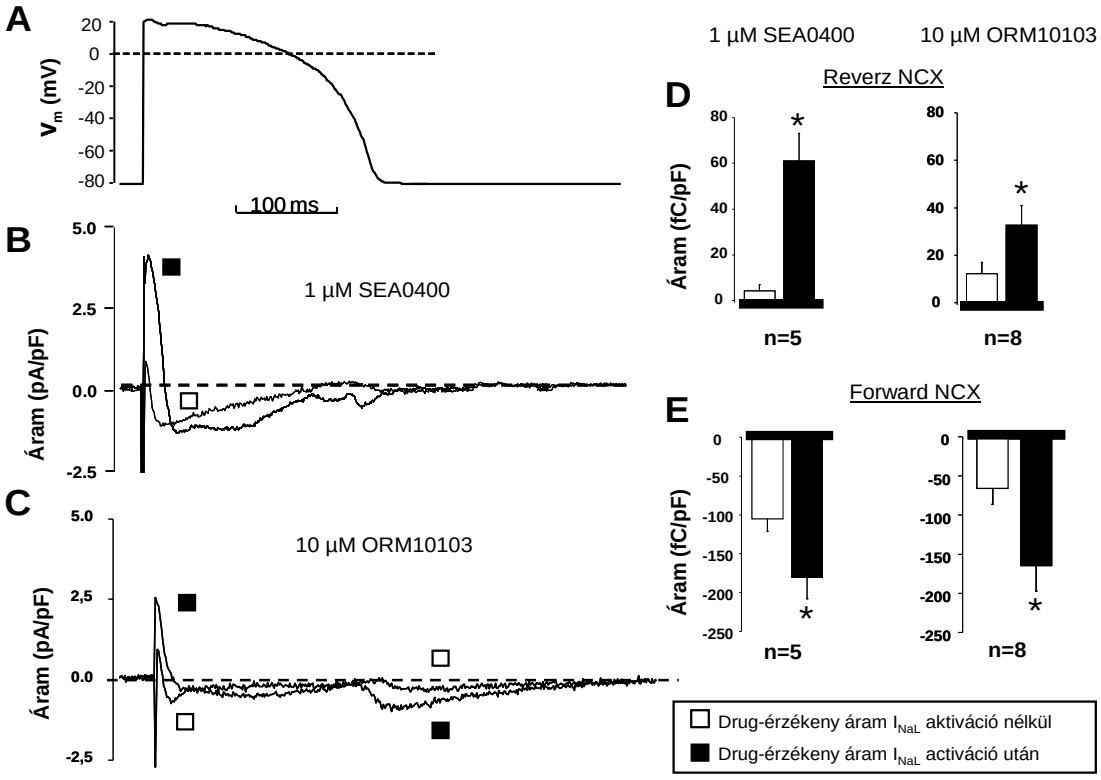
A kontroll csoportban mért APD_{90} diszperzió (108 ± 27 ms) nem változott 1 µM SEA0400 előkezelésre sem (112 ± 18 ms). A SEA0400 előkezelt csoportban 0.5 µM veratridin a diszperziót a kontroll csoporttal közel azonos mértékben növelte (282 ± 13 ms), (42. ábra /B,C**)**. A kontroll csoportban a veratridin kezelést követően az AP diszperzió növekedése 171 ± 27 ms volt. SEA0400 előkezelés a diszperzió növekedés mértékét nem befolyásolta (170 ± 22 ms, n = 6/6), (42. ábra /D).



42. ábra Az NCX gátlás hatástalan az I_{NaL} aktiváció indukált AP diszperziónövekedéssel szemben. A kamrai és Purkinje AP-t két mikroelektród segítségéve egyidejűleg határoztuk meg. A Purkinje-kamra diszperziót az összetartozó APD_{90} értékek különbségével definiáltuk. A diszperzió a kontroll csoportban (**A**, alsó jel) 0.5 µM veratridin alkalmazását követően szignifikánsan nőtt (**A**, felső jel). 1 µM SEA0400 előkezelés hatására az APD nem változott (**B**), továbbá a mért AP diszperzió, illetve annak veratridin-indukált emelkedése (**B**, alsó és felső jelek**)** közel akkorák voltak, mint a kontroll csoportban. (**C, D**) Az AP diszperzió veratridinkezelés előtt és után, a kontroll, illetve a SEA0400 előkezelt csoportokban, meghatározott értékei. A *, illetve # szignifikáns különbséget jelöl a kontroll és a SEA0400 előkezelt csoportokhoz képest ($p < 0.05$).

dc_1149_15

Az I_{NCX} kinetikai vizsgálata az $I_{Na,L}$ aktivációját követően: Az $I_{Na,L}$ aktiváció és az I_{NCX} kapcsolatának mélyebb vizsgálata céljából meghatároztuk az AP alatti I_{NCX} változásokat kontroll körülmények között, valamint az I_{NaL} aktivációját követően kialakuló magas $[Na^+]_i$ mellett. A pipettaoldat $[Na^+]$-ját 15 mM-ra állítottuk, a Ca^{2+}_i változásokat nem puffereltük, a közel fiziológiás állapotot egy reprezentatív AP parancspotenciál-pulzussal szimuláltuk (43. ábra /A). 1 µM SEA0400 alkalmazását követően az AP korai fázisában mérhető $_{rev}I_{NCX}$ mérsékelt volt (transzportált töltésmennyiség 4.1 ± 2.8 fC/pF) (43. ábra /B, D_{bal}). Ezt követően a $_{rev}I_{NCX}$ átfordult és ellenkező irányú, jóval nagyobb mértékű $_{fwd}I_{NCX}$ alakult ki (transzportált töltésmennyiség -105 ± 16 fC/pF) (43. ábra /B, E_{bal}).



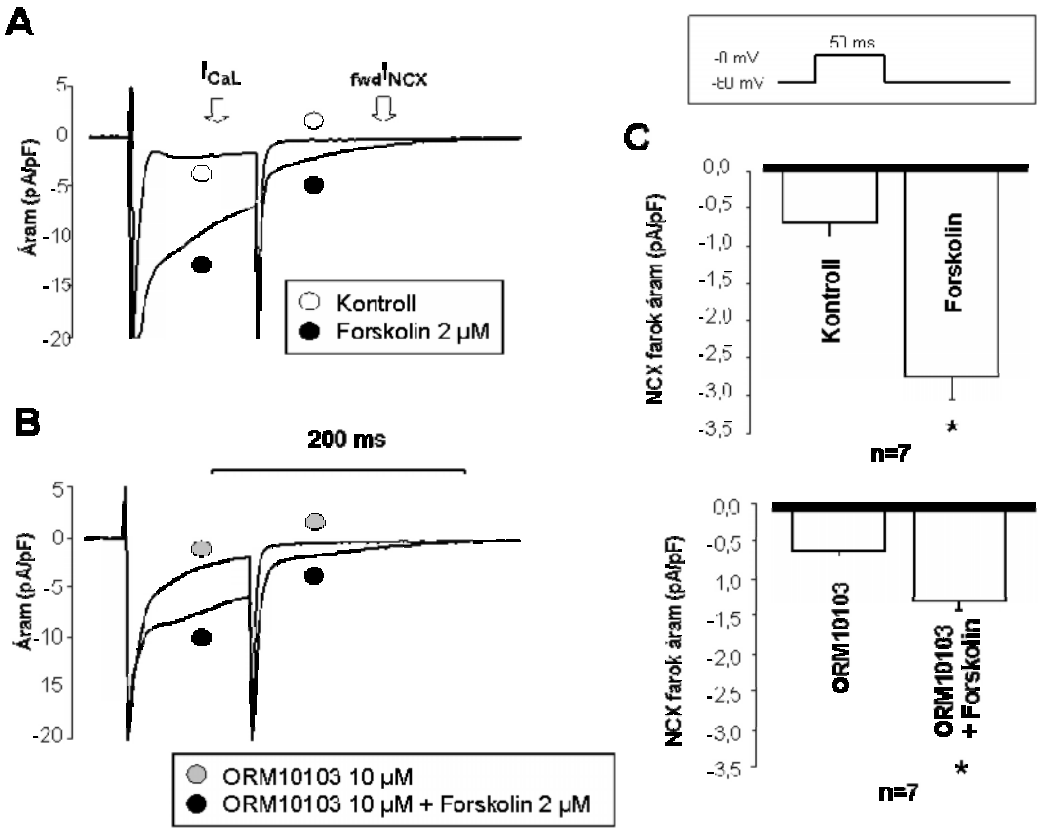
43. ábra Az I_{NCX} becslése az AP alatt. Az I_{NCX} egy reprezentatív AP (**A**) alatti kinetikájának becslésére céljából az áramot SEA0400 vagy ORM10103 (**B, C**) alkalmazását követően, különbségi áramként határoztuk meg. Kontroll körülmények között az AP korai fázisában az outward $_{rev}I_{NCX}$ elhanyagolható mértékű, és hamar átfordul inward irányba ($_{fwd}I_{NCX}$); 2 nM ATX-II a kompozit áramot, s így a $_{rev}I_{NCX}$ amplitúdóját is szignifikánsan növeli (**D**), továbbá az átfordulás későbbre tolódik, és a $_{fwd}I_{NCX}$ is szignifikánsan nő (**E**). Fontos megjegyezni, hogy egy áramkomponens által szállított nettó töltésmennyiség nem szükségszerűen változik a csúcsáram amplitúdójával arányosan.

A nettó töltéstranszport az AP alatt -101 ± 16 fC/pF volt. A $I_{Na,L}$ aktivációját követően mind a $_{rev}I_{NCX}$, mind a $_{fwd}I_{NCX}$ számottevően nőtt (transzportált töltésmennyiség 61 ± 12, illetve -180 ± 27 fC/pF), a nettó töltéstranszport 119 ± 19 fC/pF értékre emelkedett. Fontos hangsúlyozni, hogy bár a I_{NaL} aktivációját követően a kontrollhoz viszonyítva mindkét I_{NCX} komponens jelentősen emelkedett, a nettó töltéstranszport *csak mérsékelten* nőtt (-101 ± 16 *vs.* -119 ± 19 fC/pF, N.S., n = 5/4). A 10 µM ORM10103 alkalmazását követően kontroll körülmények között megbecsült I_{NCX} komponensek nagysága és kinetikája is hasonló volt a SEA0400 alkalmazását követően becsült értékekhez (43. ábra /C, D_{jobb}, E_{jobb}) ($_{rev}I_{NCX}$: 12 ± 5, $_{fwd}I_{NCX}$: -65 ± 21 fC/pF; nettó töltés: -54 ± 17 fC/pF; n = 8/5). Ugyanakkor 2 nM ATX alkalmazását követően az ORM-érzékeny áramok amplitudója és kinetikája is markánsan eltért a SEA0400 alkalmazását követően mért értékektől ($_{rev}I_{NCX}$: 33 ± 8, $_{fwd}I_{NCX}$: -164 ± 33 fC/pF; nettó töltés: -148 ± 43 fC/pF n = 8/5). A nettó töltések közötti eltérés ugyancsak

dc_1149_15

szignifikánsnak bizonyult (-54 ± 17 *vs.* -148 ± 43 fC/pF). Meg kell jegyezni, hogy az I_{NCX} komponensek kvantitatív becslése a SEA0400 esetén lényeges limitációval rendelkezik, mivel a gátlószer az I_{NCX} hatékony gátlása mellett az I_{Ca}-ot is gátolja (1 µM SEA0400 közel 20%-kal) **[236]**. Ugyanakkor az ORM-10103 nem rendelkezik I_{Ca} gátló hatással **[451]**. Ezenkívül a számítások során elhanyagoltuk az $I_{Na,L}$-aktiváció által indukált APD nyúlást, ezáltal figyelmen kívül hagytuk a hosszabb plató fázis során kialakuló extra Ca^{2+} fluxust is.

ORM10103 hatása a forskolin-indukált áramnövekedésre: Ezekben a kísérletekben a 44. ábra inzertjében látható feszültségpulzussal meghatároztuk a Ca^{2+} aktivált $_{fwd}I_{NCX}$ áramot, melynek növelése céljából a pipettaoldat $[Na^+]$-ját alacsony szinten tartottuk (5 mM), a membránpotenciált -80 mV-ra hiperpolarizáltuk, a $Ca^{2+}{}_i$-t nem pufferelték, és a Ca^{2+} beáramlást forskolinnal (2 µM) stimuláltuk.



44. ábra Forskolin hatása a I_{Ca}-ra és az NCX farokáramra. A kezeletlen (kontroll) csoporthoz képest 2 µM forskolin alkalmazását követően mind az I_{CaL} **(A)**, mind az NCX farokáram jelentősen nő **(C** fent**)**. 10 µM ORM10103 előkezelés a kontroll áramot nem növelte meg (nem mutatjuk), ugyanakkor 2 µM forskolin ez esetben is szignifikánsan növelte mindkét áramot **(B-C).**

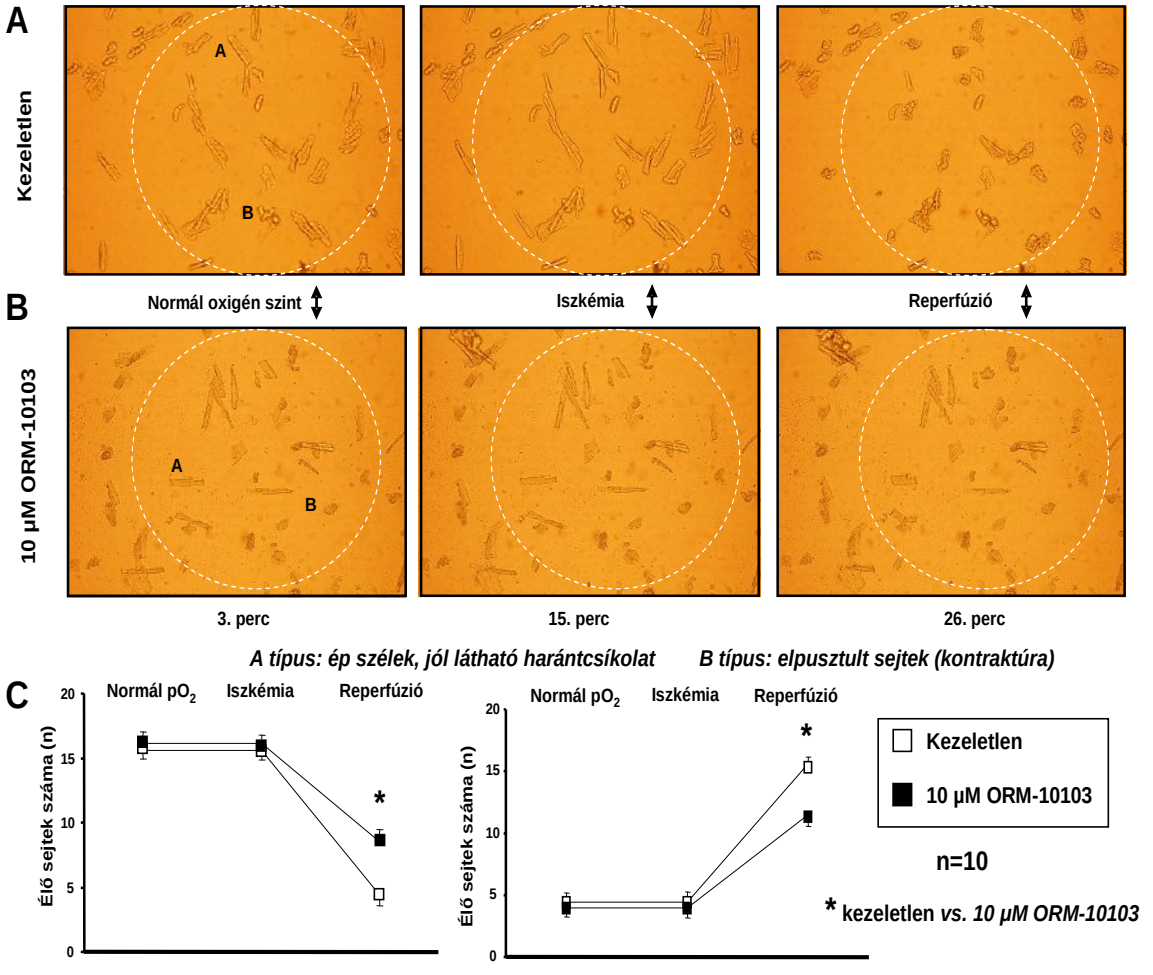
A kezeletlen csoportban 2 µM forskolin alkalmazását követően a farokáram amplitudója szignifikánsan megnőtt (-0.69 ± 0.2 pA/pF *vs.* -2.8 ± 0.3 pA/pF, n = 7/3) (44. ábra /A,C). A második csoportot forskolin kezelést megelőzően 10 µM ORM-10103-mal előkezeltük, hogy ezáltal teszteljük az ORM-10103 hatékonyságát a $_{fwd}I_{NCX}$ másodlagos emelkedésének kivédésében (44. ábra /B,C). Önmagában a gátlószer nem befolyásolta az NCX farokáram amplitúdóját (-0.71 ± 0.1 *vs.* -0.63 ± 0.1 pA/pF; N.S; n = 7). Az ORM-10103 alkalmazását követően megismételt forskolin provokáció a farokáramot ugyan most is szignifikánsan növelte (-0.6 ± 0.1 *vs.* -1.3 ± 0.6 pA/pF, n = 7/3), viszont a két csoport összehasonlítása azt mutatja, hogy az ORM-10103 előkezelt csoportban ez az emelkedés szignifikánsan kisebb volt, mint a kezeletlen csoportban (-2.8 ± 0.3 *vs.* -1.3 ± 0.6 pA/pF, n = 7/3), továbbá a I_{Ca} aktivációja is hasonló csökkenést mutatott (-5.4 ± 0.6 *vs.* -3.7 ± 0.5 pA/pF; N.S; n = 7/3).

dc_1149_15

5.3.2. Szimulált iszkémia modellben

A vizsgálat során izolált kutya kamrai szívizomsejtekben a szelektív NCX gátlás hatásait elemeztük (1) a sejtek túlélésére, (2) a CaT, illetve (3) az AP paramétereire, szimulált iszkémia/reperfúzió modellben, amit önmagában (mérsékelt, low-flow iszkémia modell), vagy strophantidin provokáció mellett (súlyos, now-flow iszkémia modell) alkalmaztunk. A CaT-t Ca^{2+}-érzékeny fluoreszcens festékkel (Fluo 4), az AP-t intracelluláris elektróddal mértük. Az NCX gátlásra ORM-10103-t használtunk, az aerob → anaerob átmenetet a sejtek NADH fluoreszcenciájának monitorozásával ellenőriztük.

Szelektív NCX gátlás hatása a szívizomsejtek túlélésére: A 45. ábra /A,B paneleken reprezentatív kontroll, illetve ORM-10103 előkezelésben részesült sejteket tartalmazó látótérfelvételek láthatók. Túlélés analízisre a normoxiás periódus kezdetén ~ 10 -10 túlnyomórészt intakt, normálisan kontraháló szívizomsejtet tartalmazó területet (region of interest – ROI, fehér körök) választottunk (bal oldali képek). Morfológiai jellegzetességeik alapján a ROI-ban található sejteket két csoportra osztottuk: ***A típus:*** hosszúkás, ép határral, azonosítható harántcsíkolattal rendelkező sejtek. ***B típus:*** elpusztult/rossz állapotú, azonosítható harántcsíkolat nélküli sejtek, túlnyomórészt kontraktúrában.

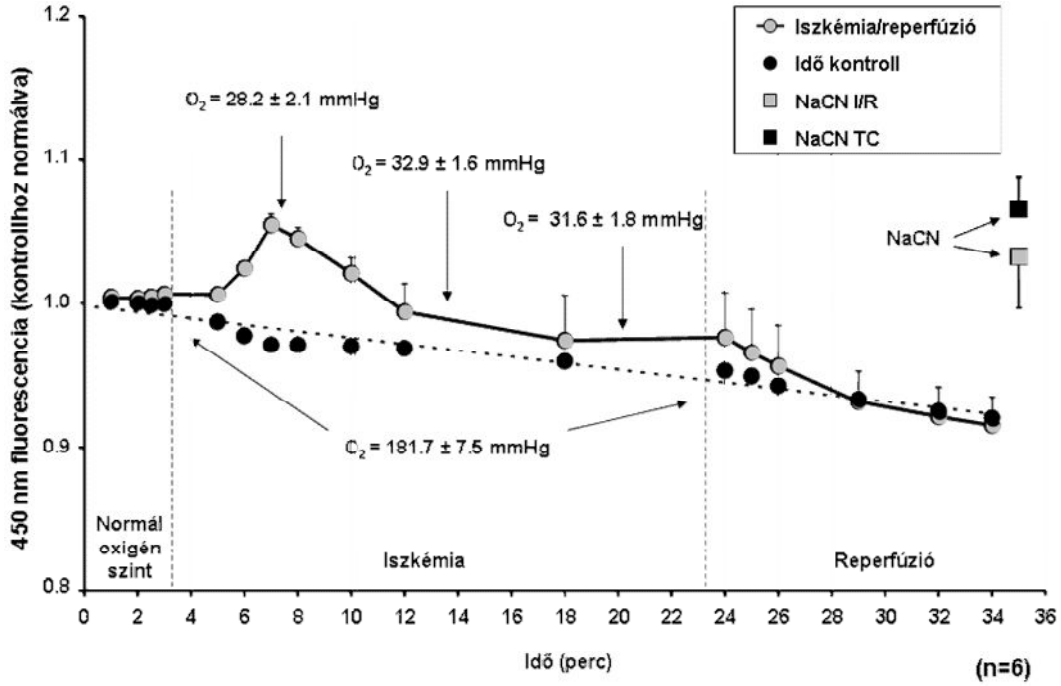


45. ábra 10 µM ORM-10103 hatása a szívizomsejtek túlélésére. Reprezentatív látóterek kezeletlen **(A)**, illetve ORM-10103-mal kezelt **(B)** sejteken végzett kísérletekből. A ROI képét digitális fényképezőgéppel periódikusan rögzítettük. A szívizomsejtek osztályozása morfológiai paramétereik alapján történt: ***A típus:*** szabályos alakú sejtek, látható harántcsíkolattal, ép szélekkel,; ***B típus:*** elpusztult, vagy rossz állapotú sejtek, kontraktúrában, felismerhető harántcsíkolat nélkül. A szimulált iszkémiás ciklus előtt (a 3. percben), alatt (a 15. percben) és után (a 26. percben) meghatározott ép, illetve elpusztult sejtek aránya **(C)**.

dc_1149_15

Az iszkémiás periódus végén a sejtek még mindkét csoportban nagyrészt intaktnak tűntek (középső képek), a reperfúziós periódus végére viszont a kezdetben ép sejtek jelentős része kontraktúrába került (jobb oldali képek). Ez a megfigyelés különösen érvényes a kezeletlen sejtcsoportokra. A normoxiás, iszkémiás, illetve reperfúziós fázisok végén meghatározott eloszlásokat a 45. ábra /C panel tartalmazza. Normoxiában a sejtmegoszlás mindkét csoportban közel azonos volt, és az intakt sejtek domináltak (kontroll: 78%, kezelt: 81%). Iszkémia egyik csoportban sem hozott létre jelentős változást, ezzel szemben a reperfúzió során a kontroll sejtek túlnyomó része súlyosan károsodott: az intakt sejtek 71%-ában (112/156) alakult ki kontraktúra. 10 µM ORM-10103 alkalmazása egyértelműen protektív hatásúnak bizonyult: az ORM-10103-mal kezelt sejtek közül szignifikánsan kevesebb, mindössze 47% (76/161) került kontraktúrába a reperfúzió során.

Az intracelluláris iszkémia jellemzése a NADH fluoreszcencia elemzésével: Az iszkémia kialakulását és mélységét natív szívizomsejteken végzett NADH fluoreszcencia analízissel állapítottuk meg, amely során a sejtek természetes fluoreszcenciájának iszkémia-indukált változásait hasonlítottuk össze az időkontroll (normoxiás) sejteken mért nemspecifikus fluoreszcencia-változásokkal. A celluláris iszkémia relatív mélységének becslésére a reperfúziós fázis végén a terminális légzési lánc ($cytaa_3$) gyakran alkalmazott gátlószerét, cianidot (NaCN) használtunk, ami közel maximális NAD^+ redukciót hoz létre. A NADH fluoreszcencia mérések eredményei a 46. ábrán láthatók.



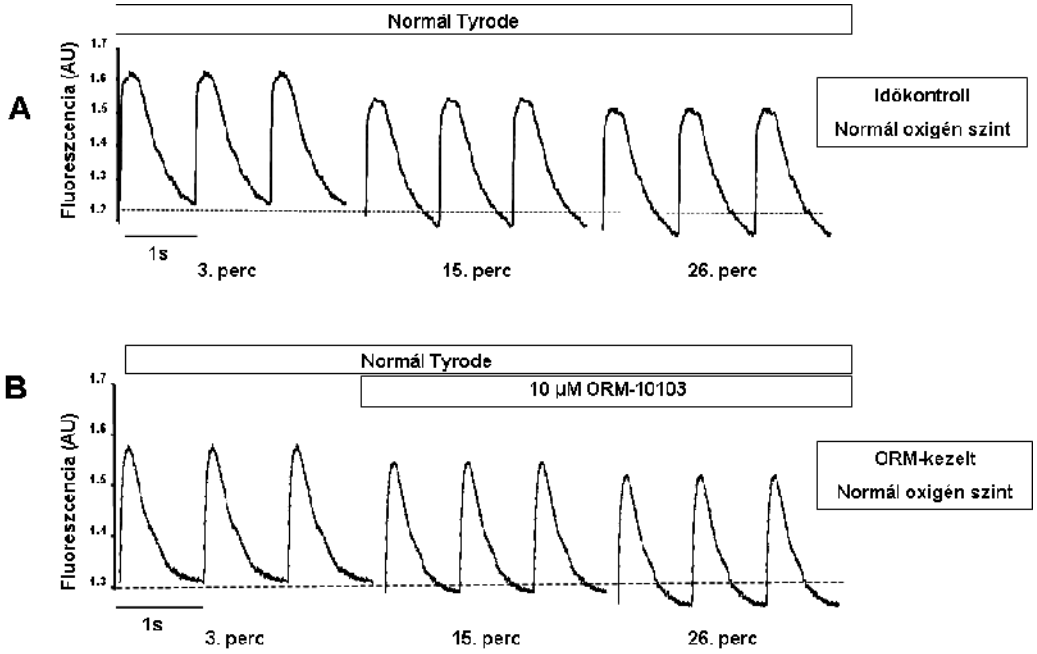
46. ábra Szimulált iszkémia/reperfúziós ciklus hatása a NADH szint natív szívizomsejtekben. A NADH-t 360 nm-en gerjesztve a sejtfluoreszcenciát 450 nm-en regisztráltuk. A fluoreszcencia nemspecifikus, bleaching okozta változásait normoxiás (időkontroll) sejtekből becsültük meg. A szimulált iszkémiás protokoll végén, maximális NADH redukció kiváltása céljából 10mM cianidot (NaCN) alkalmaztunk (n = 6).

Az iszkémiának alá nem vetett, időkontroll sejtekben a fluoreszcenciában csak mérsékelt, fokozatos, valószínűleg nagyrészt nemspecifikus (bleaching) csökkenést tapasztaltunk. Szimulált iszkémia során a fluoreszcencia szignifikánsan megnőtt. A perfúziós oldatváltást követően ~ 30 s-ig tartott, mire az új oldat elérte a kamrát és további ~ 1 percre volt szükség az aerob → anaerob átmenet kiváltásához szükséges, alacsony kamrai pO_2 eléréséhez. Az iszkémia-indukált NADH változásokat a mért, nyers fluoreszcencia értékek korrekciójával, az időkontroll kísérletekből becsült nemspecifikus változások kivonásával

dc_1149_15

határoztuk meg, majd a fluoreszcencia-értékeket a normoxiás periódusban meghatározott, bleaching-korrigált átlagértékhez normalizáltuk. Az iszkémia korai fázisában a [NADH] meredeken emelkedett (8.4 ± 0.4%; n = 6). A későbbi szakaszra jellemző a fluoreszcencia-intenzitás ingadozása, ami vélhetően a kamrai pO_2 szint fluktuációit tükrözi. Reperfúzió során a NADH fokozatosan visszatért a kiindulási szintre, néha kismértékű, inszignifikáns alullövés is megfigyelhető volt. Cianid kezelés a szimulált iszkémiánál szignifikánsan nagyobb NAD^+ redukciót okozott (iszkémiás sejtek: 12 ± 3%, időkontroll sejtek: 15 ± 2%, n = 4). A kísérletek során a pO_2 szintet a kamra középső részéről vett 50 µl-es mintákban vérgázanalizátorral (ABL 505, Radiometer, Denmark) periódikusan meghatároztuk. Normoxiában a kamrai pO_2 elegendő volt az oxidatív anyagcsere fenntartásához, (182 ± 8 mmHg, n = 25), iszkémiás perfúzió során a pO_2 érték minden esetben 40 mmHg (33 ± 2 mmHg, n = 25) alatt volt.

Szelektív NCX gátlás hatása a Ca^{2+}_i tranziensre: A 47-49. ábrákon reprezentatív CaT görbepárok láthatók**.** Az időkontroll kísérletekben mind a tranziens amplitúdója, mind alapvonala kismértékben, egyenletesen csökkent (47. ábra /A). Ez a fokozatos csökkenés vélhetően a festék kiszivárgásának és/vagy aktív kipumpálásának következménye. Meglepő módon, normoxiás körülmények között a tranziens amplitúdója és kinetikája 10 µM ORM-10103 hatására nem mutatott észrevehető változást (47. ábra /B).



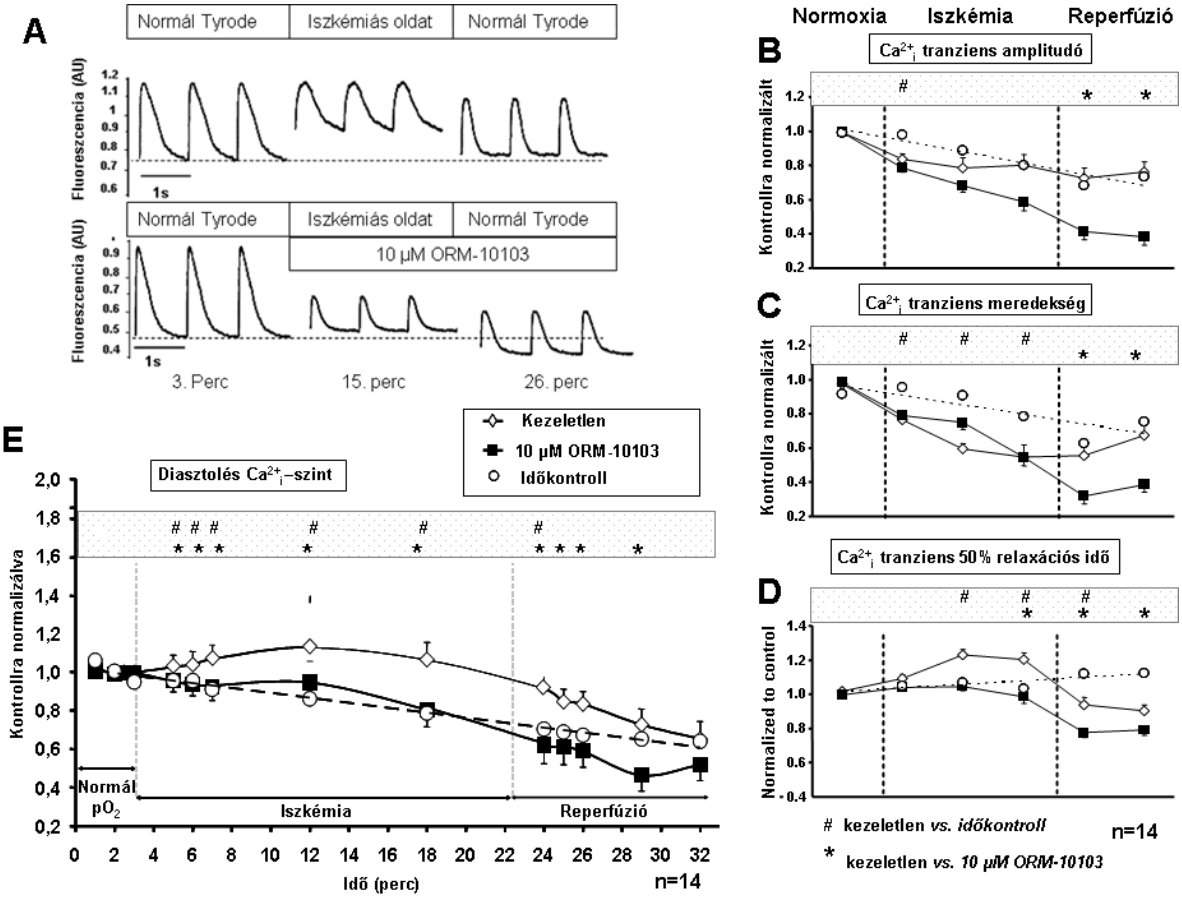
47. ábra Reprezentatív CaT-k kezeletlen (időkontroll) és ORM-10103 kezelt normoxiás szívizomsejtekből. A CaT méréseket Ca^{2+}-érzékeny fluoreszcens festékkel, Fluo 4-AM-mel feltöltött szívizomsejteken végeztük. Az időkontroll méréseket a festék kiszivárgása/kipumpálása következtében kialakuló nemspecifikus fluoreszcenciaváltozások becslésére használtuk **(A)**. A normoxiás szívizomsejtek nagy részében 10 µM ORM-10103 a CaT nagyságában, alakjában és lecsengési kinetikájában nem hozott létre mérhető változást **(B)**. Néhány sejtben kisebb amplitúdócsökkenést is megfigyeltünk.

A 48-49. ábrákon mutatott reprezentatív CaT görbéket a festékszivárgásra/kiválasztásra és a nemspecifikus háttérfluoreszcenciára is korrigáltuk. Előbbi az időkontroll kísérletekből, utóbbi a mérés elején+végén a sejt látómezőből kimozgatásával becsülhető. Ugyanakkor, ellentétben a többi *számított* görbével, a bemutatott *eredeti* görbéket nem normalizáltuk. Kétféle szignifikancia értéket határoztunk meg (**#**, ***).** Mindkét jel szignifikáns különbséget jelöl: a # a kezeletlen és az időkontroll, a * a kezeletlen és az ORM-10103-mal kezelt értékek között. Az iszkémia során a CaT amplitúdója és kinetikája kezeletlen (48. ábra /A),

dc_1149_15

és strophantidin-kezelt (49. ábra /A) sejtekben is szignifikánsan változott. A normoxiás (bal oldali) görbékhez képest 10 µM ORM-10103 a változásokat nem gátolta/fordította vissza, sőt, a CaT amplitúdóját és kinetikáját tovább módosította (középső görbék). Reperfúzió során a 4 kísérleti csoport (kezeletlen, strophantidinnel, ORM-10103-mal, illetve mindkettővel kezelt) egyike sem állt helyre (jobb oldali görbék).

A *strophantidinnel nem kezelt* sejtekben az I/R ciklus során a CaT főbb paramétereiben indukált változásokat a 48. ábra /B-E panelek összegzik. A CaT amplitúdójában (48. ábra /B) az időkontrollhoz képest szignifikáns különbséget csak az iszkémia kezdeti fázisában kaptunk (0.84 ± 0.03 vs. 0.98 ± 0.02; n = 14). 10 µM ORM-10103 a CaT amplitúdóját fokozatosan, a reperfúzió során már szignifikánsan csökkentette (0.76 ± 0.06 vs. 0.38 ± 0.05; n = 14).

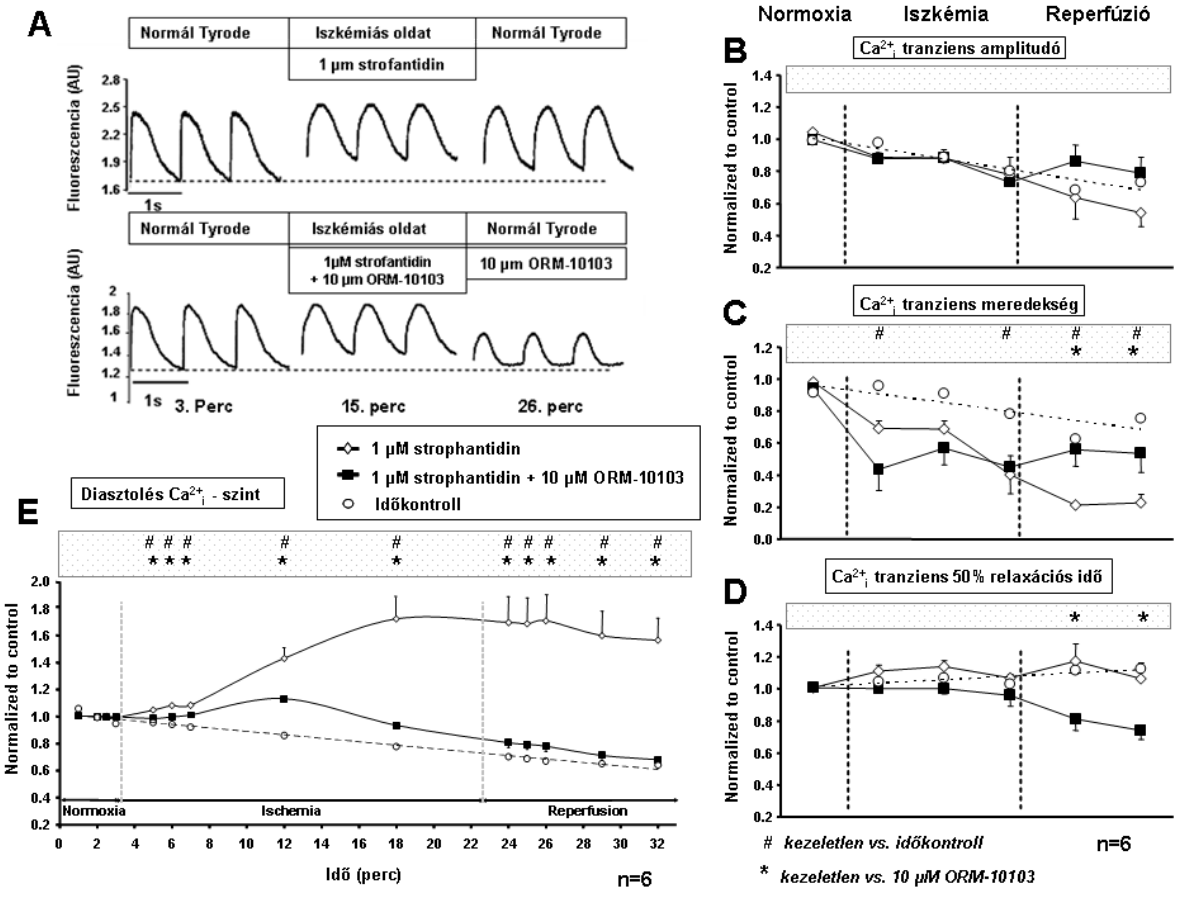


48. ábra A CaT paramétereiben szimulált I/R során kialakuló változások, illetve 10 µM ORM-10103 kezelés hatása ezekre a paraméterekre strophantidinnel nem előkezelt sejtekben. **(A)** Reprezentatív kezeletlen (felső) és ORM-kezelt (alsó) CaT-k szimulált iszkémia előtt, alatt és után. A CaT görbéket festékszivárgásra és nemspecifikus háttérfluoreszcenciára korrigáltuk, de nem normalizáltuk. Minden kísérlet önkontrollos volt, az összes fluoreszcenciaértéket az ugyanazon sejtből a kontroll periódusban percenként meghatározott értékek átlagára normalizáltuk. **(B-E)** A főbb CaT paraméterek I/R indukált változásai és 10 µM ORM-10103 hatása a tranziensek **(B)** nagyságára, **(C)** meredekségére, illetve **(D)** félrelaxációs idejére. Az értékeket a mérés 3. (kontroll), 6., 10., 15. (korai, közép és kései iszkémiás fázis), valamint 26. és 30. percében (korai és késői reperfúziós fázis) határoztuk meg. **(E)** A $[Ca^{2+}]_{iD}$ változások nagyobb időfelbontásban. **(C)** A CaT meredekségét a felszálló szárra, annak maximális változásánál (a deriváltgörbe maximumánál) illesztett egyenesből számított értékkel jellemeztük. A fluoreszcenciaértékeket párosított, vagy nem párosított Student t próbával analizáltuk. A # és a * szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget jelöl az időkontroll és a kezeletlen, illetve a kezeletlen és az ORM-10103 kezelt értékek között. Az egymáshoz közeli görbék okozta félreérthetőség elkerülése végett mindkét szignifikancia jelölést külön sorban, a vonatkozó panel fölött helyeztük el.

dc_1149_15

A kezeletlen sejtekben a CaT meredeksége az iszkémia során fokozatosan, szignifikánsan csökkent (0.75 ± 0.07 *vs.* 0.54 ± 0.05, n = 14), amit az ORM-kezelés nem befolyásolt **(**48. ábra /C). Reperfúzióban a CaT meredeksége a kísérleti csoportokban ellentétesen változott: kezeletlen sejtekben helyreállt, ORM-kezelt sejtekben tovább csökkent (0.67 ± 0.09 *vs.* 0.39 ± 0.04; n = 14) és az eltérés szignifikáns lett. Az időkontrollhoz képest az iszkémia a kezeletlen sejtekben a CaT fél-relaxációs idejében (RT_{50}) szignifikáns változást okozott (48/D), ami reperfúzió alatt eltűnt; esetenként mérsékelt alullövés is kialakult. Ugyanakkor a késői iszkémiás és reperfúziós fázisokban az ORM-10103 az RT_{50}-et a kezeletlen sejtekhez képest szignifikánsan csökkentette (0.9 ± 0.03 *vs.* 0.8 ± 0.03; n = 14).

Strophantidin-kezelt szívizomsejtekben I/R alatt a CaT amplitúdójában szignifikáns változás nem alakult ki (49. ábra /B). A tranziens meredeksége az időkontrollhoz képest iszkémia és reperfúzió alatt egyaránt fokozatosan, szignifikánsan csökkent (49. ábra /C). ORM-10103 az iszkémiás meredekségcsökkenést nem befolyásolta, viszont szignifikánsan behatárolta a reperfúzió-indukált csökkenést (0.55 ± 0.1 vs. 0.21 ± 0.02; n = 6). Az ORM-10103-mal nem kezelt sejtekben az RT_{50} iszkémia és reperfúzió alatt is alig különbözött az időkontroll sejtekben mért értéktől (49. ábra /D), viszont a gátlás következtében a paraméter reperfúzió alatt szignifikánsan csökkent (1.2 ± 0.11 vs. 0.81 ± 0.06; n = 6).



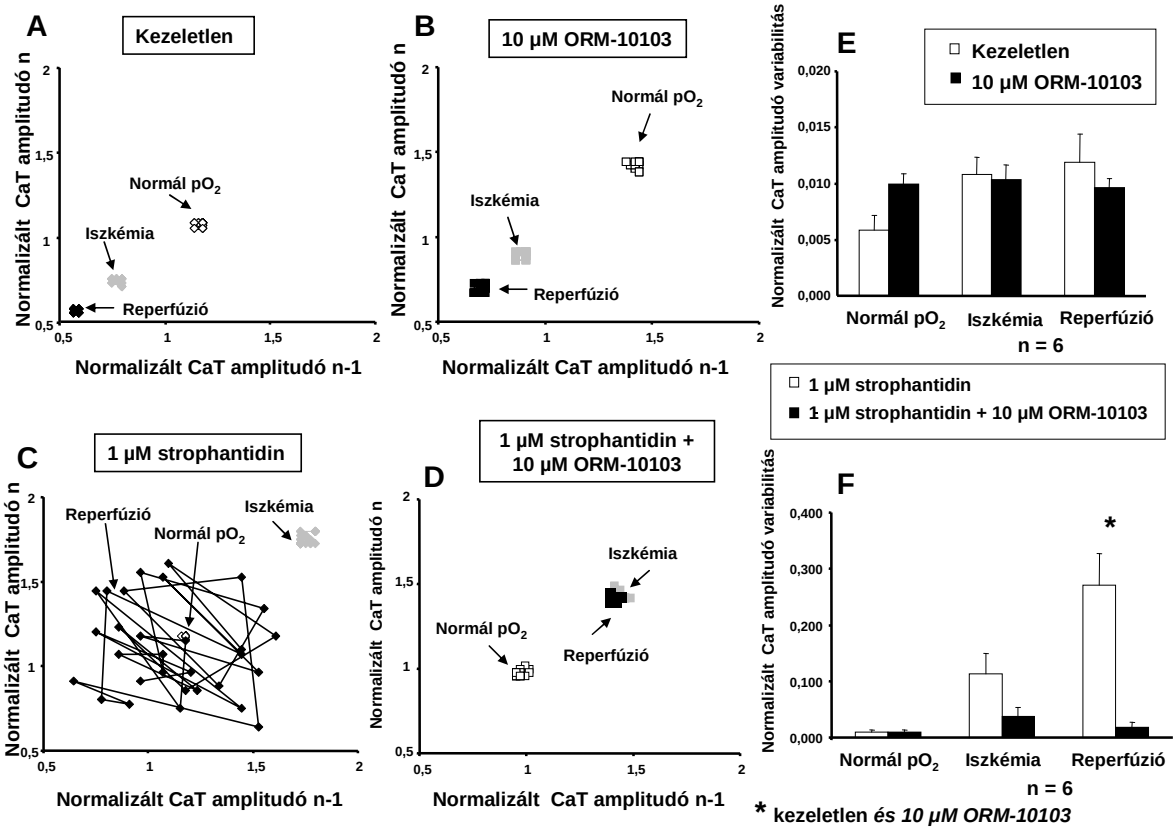
49. ábra A CaT paramétereiben kialakuló változások szimulált I/R során, strophantidinnel kezelt szívizomsejtekben, valamint 10 µM ORM-10103 kezelés hatása a CaT paramétereire. **(A)** Iszkémia előtt, alatt és után kezeletlen (felső) és ORM-kezelt (alsó) sejtekből mért reprezentatív CaT görbék. **(B-E)** Iszkémia/ reperfúzió indukált változások a CaT paraméterekben, illetve 10 µM ORM-10103 hatása a CaT amplitúdójára **(B)**, meredekségére **(C)**, fél-relaxációs idejére **(D)**, valamint a $[Ca^{2+}]_{iD}$-re **(E)**. Minden mérés, kiértékelés és grafikai ábrázolás a 48. ábra analóg paneljével megegyező módon történt.

Az ORM-kezelés legfontosabb következményét a $[Ca^{2+}]_{iD}$ értékek összehasonlítása teszi nyilvánvalóvá (49. ábra /E). Mint az várható volt, az iszkémia már a második percben

dc_1149_15

szignifikáns, $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedést hozott létre; ez reperfúzió alatt végül is normalizálódott, bár annak korai fázisában (< 6 perc) még szignifikánsan magasabb volt, mint az időkontroll sejtekben (1.04 ± 0.03 *vs.* 0.92 ± 0.02; n = 14). 10 µM ORM-10103 előkezelés lényegében megakadályozta a $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedését, sőt, az az iszkémiás fázis végére az időkontroll alá csökkent (0.73 ± 0.08 *vs.* 0.64 ± 0.06, N.S.; n=14). Ezekben a sejtekben a $[Ca^{2+}]_{iD}$ a reperfúzió alatt végig kisebb volt, mint a kontroll sejtekben.

A kezeletlen sejtekben már iszkémia alatt is kialakuló szignifikáns $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedés a strophantidin-kezelt sejtekben további jelentős, szignifikáns emelkedést mutatott (49. ábra /E) és a reperfúziós periódus során végig nagyon magas maradt. ORM-10103 hatására a drasztikus I/R indukált $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedés eltűnt; ezekben a sejtekben a $[Ca^{2+}]_{iD}$ nem különbözött szignifikánsan a kontroll értékektől (0.71 ± 0.06 *vs.* 0.65± 0.06; N.S., n=6). Az ORM-10103 reperfúzió alatt gyakorolt jótékony hatása még nyilvánvalóbb a CaT amplitúdó rövidtávú variabilitásainak vizsgálatát követően. A kísérleti csoportokra jellemző Poincare diagramokat a 50. ábra /A-D panelek mutatják. A kezeletlen, illetve ORM10103-kezelt csoportokra számított átlagértékeket a 50. ábra /E panel összegzi.
A diagramok alapján látható, hogy kezeletlen sejtekben a CaT variabilitásában jelentős I/R indukált változás nem alakult ki.



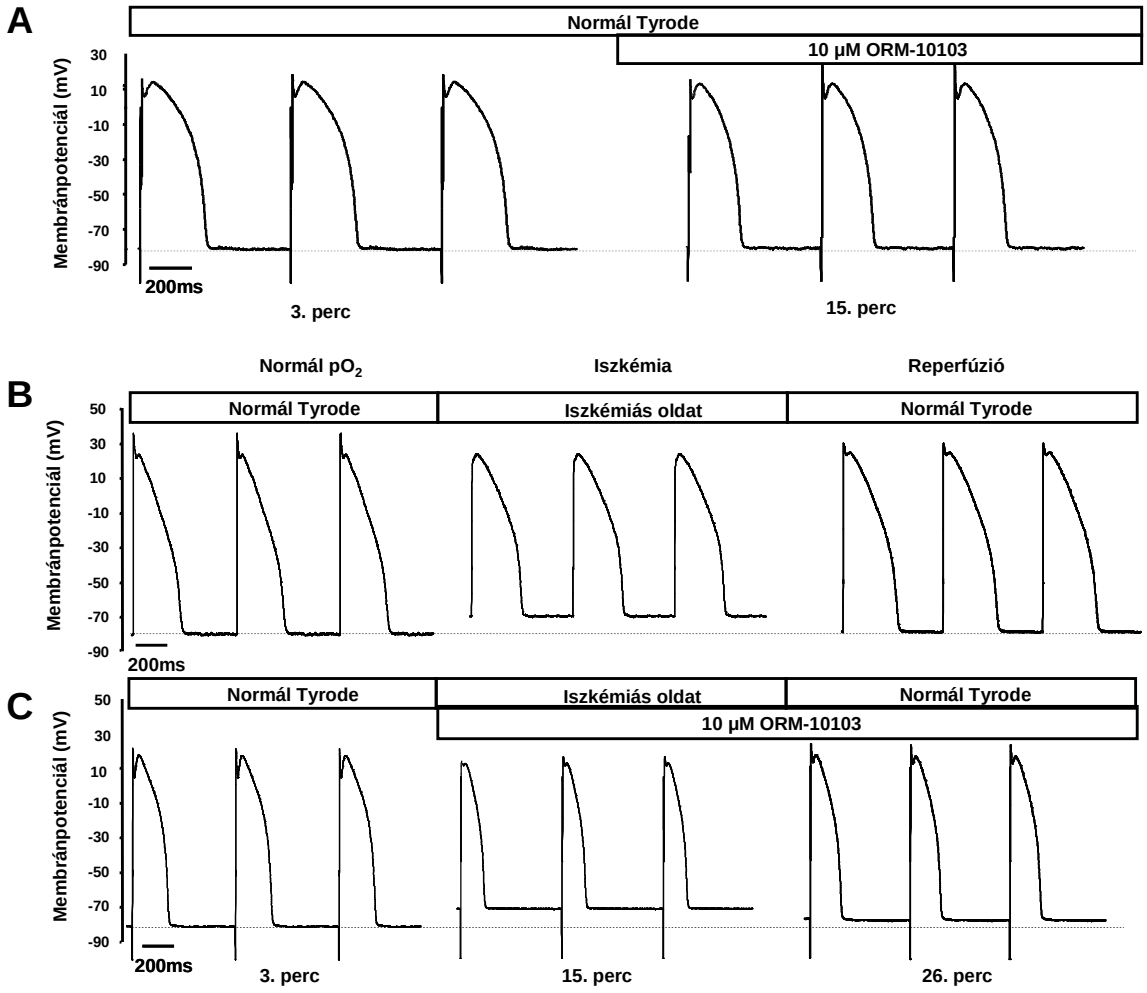
50. ábra 10µM ORM-10103 hatása a CaT amplitúdó variabilitására. A kezeletlen **(A)**, ORM-, strophantidin- és strophantidin+ORM-kezelt csoportokra jellemző Poincare diagramok **(B)**, **(C)**, (**D**). A strophantidinnel nem kezelt **(E)**, illetve kezelt **(F)** sejtekből meghatározott átlagos variabilitások.

10 µM ORM-10103 kezelés mindkét esetben kismértékű, inszignifikáns csökkenést okozott (0.011 ± 0.002 *vs.* 0.010 ± 0.001 és 0.012 ± 0.003 *vs.* 0.010 ± 0.001; n = 6). Iszkémia alatt a strophantidin szignifikánsan megnövelte a rövid távú variabilitást (0.11 ± 0.04 *vs.* 0.04 ± 0.02; n = 6), (50. ábra /F), ami reperfúzió alatt drasztikusan tovább

dc_1149_15

emelkedett (0.27 ± 0.06 *vs.* 0.02 ± 0.01; n = 6). Ez a markáns rövidtávú variabilitás-fokozódás ORM-10103 alkalmazását követően elmaradt.

Szelektív NCX gátlás hatása az AP paramétereire: Reprezentatív, izolált sejteken mért AP görbék láthatók az 51. ábrán**.** Normoxiában 10 µM ORM-10103 hatására az APD, az amplitudó és a nyugalmi potenciál érzékelhető változása nélkül, kismértékben rövidült (51. ábra /A)**.** Szimulált iszkémia során az AP alakja szignifikánsan megváltozott, és a nyugalmi potenciál depolarizálódott de reperfúzió alatt mindkét paraméter helyreállt (51. ábra /$B_{közép,}$ B_{jobb}). Az ORM-10103 normoxiás sejtekben látott AP rövidítő hatása I/R során még nyilvánvalóbbá vált (51. ábra /C**)**, viszont az AP görbén további ORM-10103-indukált változás nem látható, azaz ORM-kezelés az I/R indukált membrándepolarizációt jelentősen nem csökkentette.



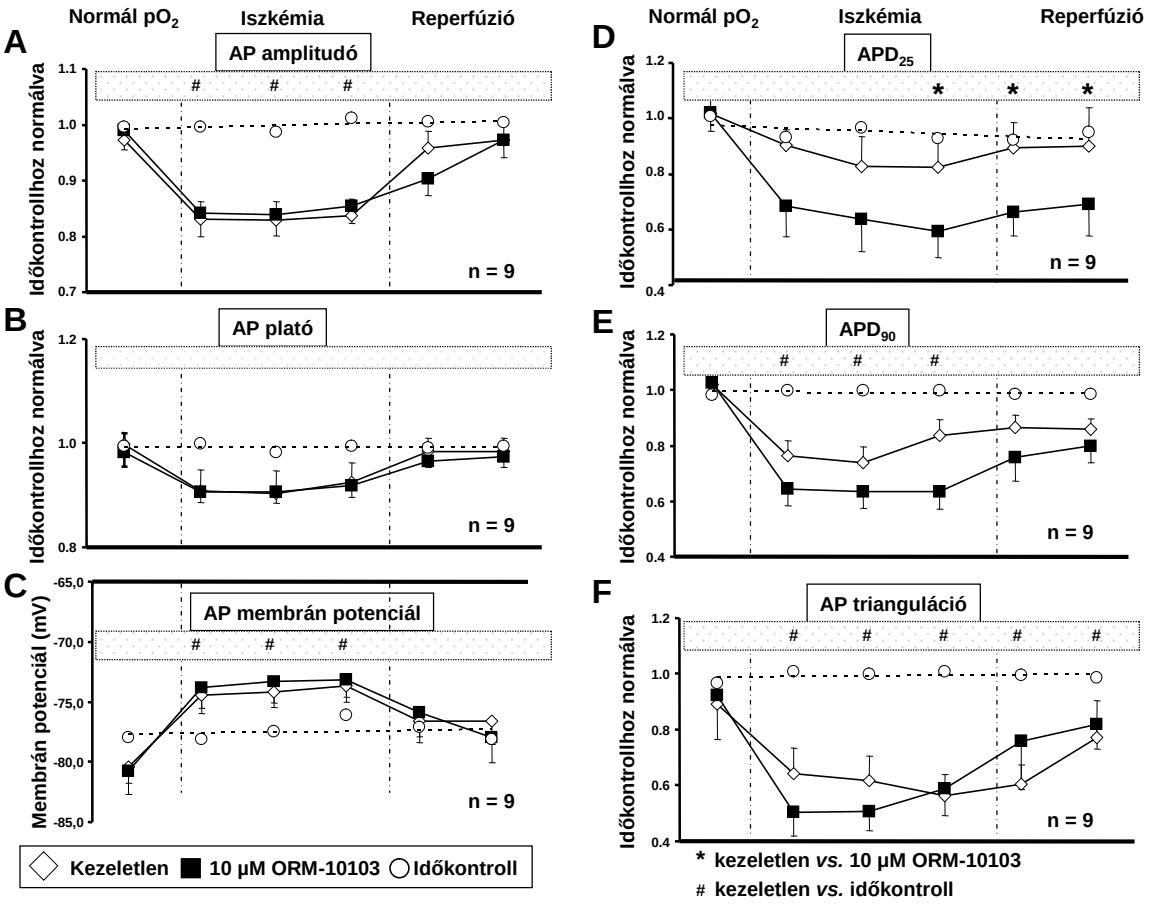
51. ábra Reprezentatív, natív sejteken mért AP görbék. 10 µM ORM-10103 hatása normoxiás sejtekre **(A)**. Szimulált I/R hatása az AP-re kezeletlen **(B)**, illetve ORM-10103-kezelt **(C)** szívizomsejteken.

Az AP karakterisztikus paramétereiben kezeletlen és ORM-10103-kezelt szívizomsejteken szimulált I/R során kialakuló változásokat az 52. ábra összegezi. A normoxiás sejtekhez viszonyítva, az AP amplitúdója iszkémia hatására szignifikánsan, a plató potenciál értéke jelentősen, de nem szignifikánsan csökken (52. ábra /A,B), a nyugalmi membránpotenciál pedig markánsan depolarizálódik (52. ábra /C). A reperfúzió alatt a paraméterek jórészt helyreálltak. ORM-10103 előkezelés sem az iszkémia-indukált változások nagyságát, sem a fenti paraméterek helyreállását nem befolyásolta. Meghatároztuk az AP kinetikai

dc_1149_15

változásainek quantitatív jellemzésére gyakran használt paraméterek, az APD_{25} és APD_{90} (52. ábra /D&E) értékeit, és ezekből az AP triangulációját (52. ábra /F). Iszkémia alatt az APD_{25} enyhén csökkent, de reperfúzió alatt helyreállt. A kezeletlen sejtekhez képest jóval nagyobb APD_{25} csökkenés jött létre ORM-10103 kezelt sejtekben; ez az iszkémia kései fázisában szignifikánssá vált és a reperfúzió alatt sem normalizálódott (0.9 ± 0.09 *vs.* 0.66 ± 0.09; n = 9).

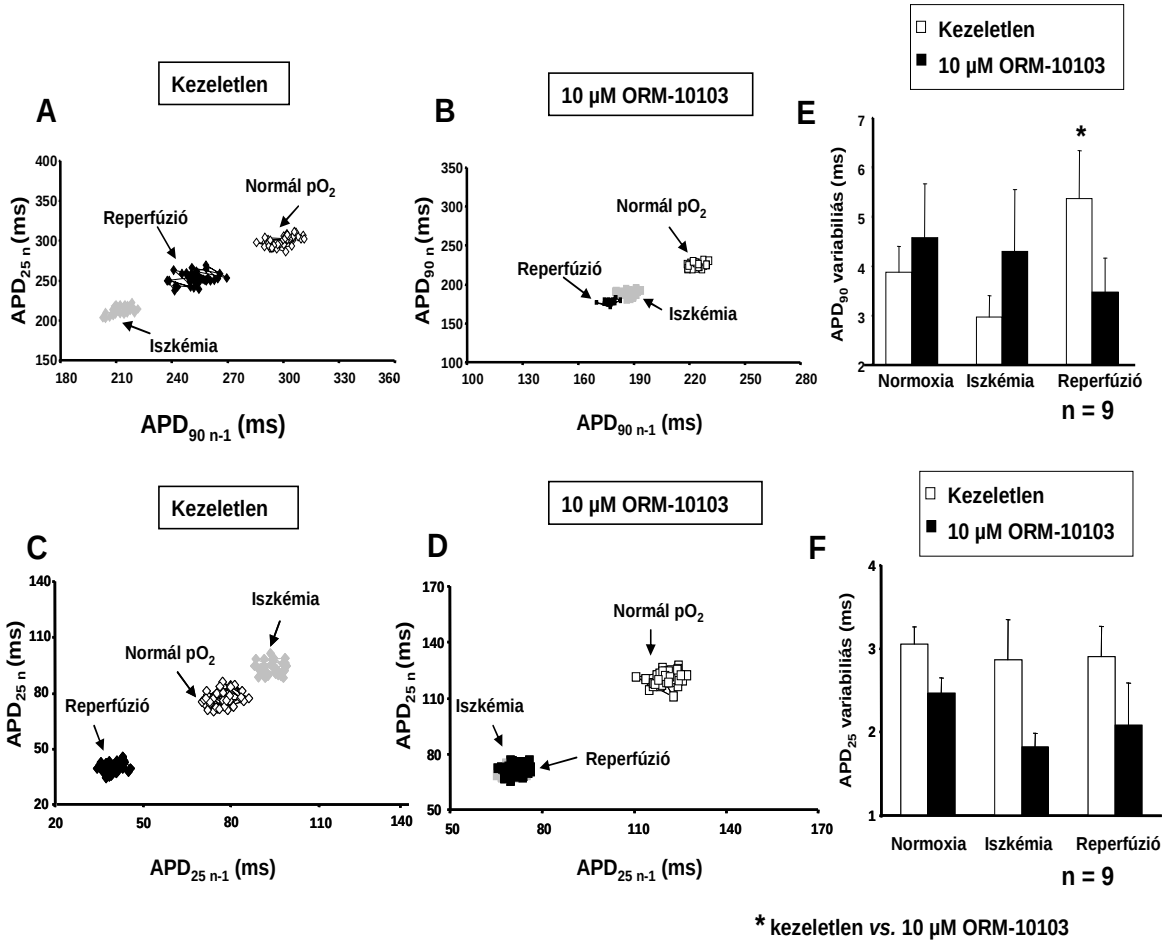
Az APD_{90} értékekben hasonló, de jelentősen nagyobb iszkémia-indukált rövidülés jött létre, de a két csoport között sem iszkémia, sem reperfúzió alatt nem volt szignifikáns eltérés. Iszkémia az időkontroll sejtekhez képest az AP triangulációjának jelentős, szignifikáns csökkenését hozta létre mindkét csoportban, de a csoportok közötti különbség most sem bizonyult szignifikánsnak (0.61 ± 0.07 *vs.* 0.76 ± 0.17; n = 9).



52. ábra Néhány AP paraméter változásai szimulált I/R során, illetve 10μM ORM-10103 kezelés hatása ezekre a paraméterekre strophantidinnel nem előkezelt szívizomsejtekben. **(A)** amplitúdó; **(B)** plató szint; **(C)** nyugalmi membránpotenciál; **(D)** APD_{25}; **(E)** APD_{90}; **(F)** trianguláció. Az értékeket a 48. ábrával azonos időpontokban határoztuk meg. A nyugalmi potenciál kivételével az összes értéket a normoxiás (kontroll) periódusra normalizáltuk és a releváns (párosított vagy nem párosított) Student t próbával analizáltuk. A # és * szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget jelölnek az időkontroll és a kezeletlen, illetve a kezeletlen és az ORM-10103 kezelt értékek között. Mindkét szignifikancia jelölést külön sorban helyeztük el.

ORM-10103 előkezelés az AP alapvető paramétereire iszkémia/reperfúzió során gyakorolt hatásának további analízise céljából meghatároztuk az egyes csoportok rövid távú APD_{90} és APD_{25} variabilitásait. Kezeletlen és ORM-10103 kezelt szívizomsejtek reprezentatív Poincare diagramjai láthatók az 53, ábra /A,B, illetve az 53. ábra /C,D paneleken, míg a két paraméter átlagértékeit az 53, ábra /E,F panelek tartalmazzák.

dc_1149_15



53. ábra 10 μM ORM-10103 előkezelés hatása az APD_{90} és APD_{25} variabilitására. Reprezentatív, kezeletlen **(A,B)**, illetve ORM-10103 előkezelt **(C,D)** szívizomsejtekből meghatározott APD_{90} és APD_{25} variabilitás diagramok, valamint összegzett APD_{90} és APD_{25} variabilitás értékek **(E,F)**.

Normoxiás körülmények között az APD variabilitások mindkét csoportban hasonlóak voltak. A kezeletlen csoport APD_{90} variabilitásában az iszkémia mérsékelt, inszignifikáns csökkenést okozott, az ORM-10103 kezelt csoportban nem jött létre mérhető változás. Ugyanakkor az APD_{25} variabilitás nem változott a kontroll csoportban, viszont ORM-10103 kezelést követően csökkenő tendenciát mutatott. Reperfúzió során az egyetlen szignifikáns változás az APD_{90} variabilitás fokozódása volt a kezeletlen csoportban. ORM-10103 előkezelés ezt a növekedést kivédte (5.4 ± 1 *vs.* 3.5 ± 0.7 ms; n = 9).

5.3.3. Patkány tranziens, regionális iszkémia/reperfúziós modellben

Az izolált perfundált patkányszíveken végzett vizsgálatok elsődleges célja az egyedi vagy kombinált NCX és NHE gátlás poszt-iszkémiás, reperfúzió-indukált aritmiákkal szemben megnyilvánuló kardioprotektív hatásának összehasonlító elemzése volt.

Hemodinamikai paraméterek. A hemodinamikai paraméterek (koronária áramlás (CF), szívfrekvencia (HR), bal kamrai szisztolés nyomás (LVSP), bal kamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP), bal kamrai nyomásmaximum (developed pressure, DP), illetve a miokardium kontraktilitására jellemző maximális nyomásváltozások ($\pm dP/dt_{max}$)) hat kísérleti állatcsoportból (kontroll – CON; cariporid/SEA0400/ORM10103 előkezelt – CAR/SEA/ORM; valamint a két kombinált – SEA+CAR/ORM+CAR) a kísérleti protokoll egyes fázisainak (kontroll, előkezelés, iszkémia, reperfúzió) végén meghatározott, és/vagy számított értékeit a 2. Táblázat összegezi.

dc_1149_15

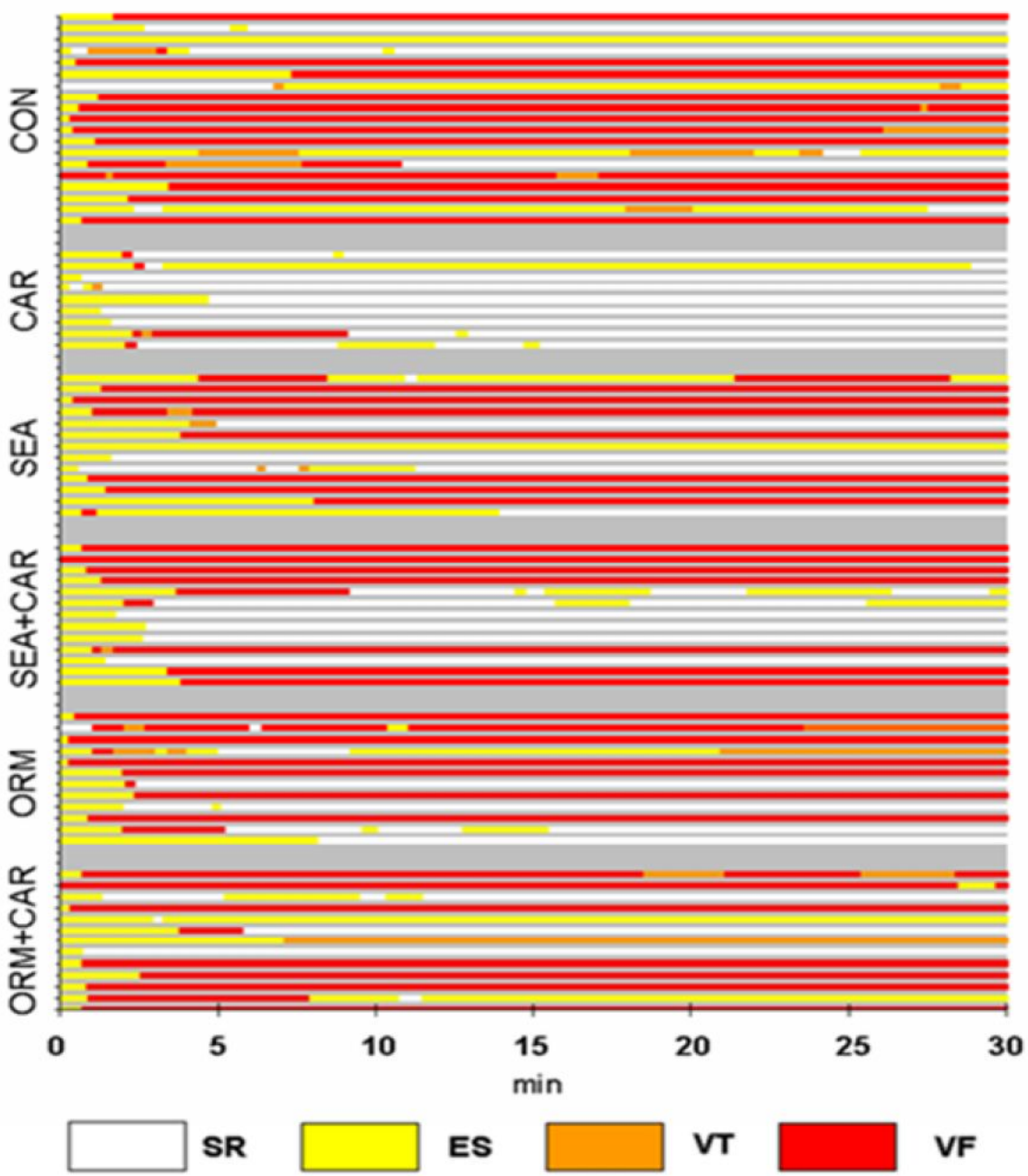
	Kontroll	Előkezelt	Iszkémia	Reperfúzió
CF (ml/min)				
CON	17 ± 0.9	17 ± 1.0	9 ± 0.9 *	15 ± 1.4
CAR	19 ± 1.5	18 ± 1.5	13 ± 1.8 *	16 ± 2.3
SEA	16 ± 0.8	16 ± 1.1	10 ± 1.4 *	14 ± 1.3
ORM	16 ± 1.1	17 ± 1.1	9 ± 0.9 *	15 ± 1.5
SEA + CAR	16 ± 1.4	15 ± 1.3	9 ± 1.1 *	13 ± 1.6
ORM + CAR	20 ± 0.9	20 ± 1.05	11 ± 1.3 *	16 ± 1.3 §
HR (ütés/min)				
CON	313 ± 11	295 ± 10	280 ± 12 *	277 ± 12 §
CAR	325 ± 13	320 ± 11	310 ± 12	280 ± 14 §
SEA	297 ± 10	301 ± 11	294 ± 12	281 ± 20 §
ORM	311 ± 12	308 ± 12	302 ± 12	303 ± 19 §
SEA + CAR	303 ± 15	288 ± 21	287 ± 18	308 ± 28 §
ORM + CAR	343 ± 09	310 ± 13	309 ± 11	279 ± 07 §
LVSP (mmHg)				
CON	101 ± 3	102 ± 3	55 ± 6 *	73 ± 07 §
CAR	101 ± 3	98 ± 2	55 ± 7 *	88 ± 02 §
SEA	92 ± 3	90 ± 4	47 ± 6 *	74 ± 05 §
ORM	96 ± 3	94 ±7	37 ± 5 *	61 ± 16 §
SEA + CAR	92 ± 4	94 ± 5	47 ± 6 *	55 ± 12 §
ORM + CAR	95 ± 3	98 ± 3	39 ± 4 *	90 ± 07 §
LVEDP (mmHg)				
CON	5.0 ± 1.4	5.0 ± 1.6	5.6 ± 1.6	18.0 ± 4.8 §
CAR	7.4 ± 1.5	7.8 ± 1.5	8.1 ± 1.2	15.0 ± 3.9 §
SEA	5.9 ± 0.7	5.4 ± 1.1	6.3 ± 1.3	11.2 ± 6.3 §
ORM	5.8 ± 0.5	4.3 ± 0.8	5.3 ± 0.9	5.1 ± 0.3 §
SEA + CAR	5.1 ± 1.1	7.4 ± 2.3	7.4 ± 2.5	15.7 ± 7.4 §
ORM + CAR	5.5 ± 0.9	4.3 ± 0.9	4.0 ± 0.8	21.1 ± 8.1 §
DP (mmHg)				
CON	96 ± 3	97 ± 3	55 ± 5 *	55 ± 06 §
CAR	93 ± 4	90 ± 4	47 ± 7 *	72 ± 06 §
SEA	86 ± 3	85 ± 5	41 ± 6 *	63 ± 08 §
ORM	90 ± 3	90 ± 6	32 ± 4 *	61 ± 12 §
SEA + CAR	85 ± 4	86 ± 6	39 ± 6 *	39 ± 11 §
ORM + CAR	89 ± 3	94 ± 3	35 ± 4 *	69 ± 08 §
+dp/dt$_{max}$ (mmHg/s)				
CON	2678 ± 124	2721 ± 140	1510 ± 147 *	1587 ± 155 §
CAR	2388 ± 199	2422 ± 186	1344 ± 181 *	2222 ± 238 §
SEA	2315 ± 176	2361 ± 209	1238 ± 138 *	1583 ± 186 §
ORM	2691 ± 172	2791 ± 259	1166 ± 113 *	1714 ± 295 §
SEA + CAR	2666 ± 193	2733 ± 170	1533 ± 170 *	1600 ± 358 §
ORM + CAR	2191 ± 096	2208 ± 100	975 ± 088 *	1640 ± 208 §
-dp/dt$_{max}$ (mmHg/s)				
CON	-1942 ± 070	-1963 ± 075	-994 ± 094 *	-1150 ± 125 §
CAR	-1722 ± 151	-1733 ± 113	-966 ± 148 *	-1422 ± 098 §
SEA	-1784 ± 093	-1723 ± 127	-938 ± 104 *	-1266 ± 120 §
ORM	-2108 ± 113	-2175 ± 171	-891 ± 079 *	-1400 ± 296 §
SEA + CAR	-1822 ± 111	-1822 ± 145	-911 ± 116 *	-1166 ± 322 §
ORM + CAR	-1825 ± 093	-1891 ± 096	-808 ± 067	-1480 ± 131 §

2. Táblázat. A 6 kísérleti csoportra meghatározott hemodinamikai paraméterértékek (koronária áramlás (CF); szívfrekvencia (HR); bal kamrai szisztolés nyomás (LVSP); bal kamrai végdiasztolés nyomás (LVEDP); bal kamrai maximális nyomás (developed pressure, DP), kontraktilitás (±dp/dt)) a négy kísérleti fázis (kontroll, előkezelési, iszkémia és reperfúzió periódusok) végén. Az **n** számok az első három oszlopra: CON=19; CAR=9; SEA=13; ORM=12 SEA+CAR=12; ORM+CAR=13; a reperfúzió oszlopra: CON=8; CAR=9; SEA=6; ORM=7; SEA+CAR=6; ORM+CAR=5. Szignifikancia jelzések: ***** és **§**: $p < 0.05$ a kontrollhoz képest az iszkémia (azonos **n** számok) és a reperfúziós (eltérő **n** számok) csoportok (ANOVA).

Aritmia diagramok. A 6 csoportra elvégzett aritmiaanalízis grafikus, áttekintő eredményeit az 54. ábra integrált aritmia diagramja szemlélteti. A szívek előkezelése a hordozóval

dc_1149_15

(DMSO), egy NCX, vagy NHE gátlóval, és ezek kombinációjával a mért hemodinamikai paraméterek egyikében sem hozott létre szignifikáns változást. Ezzel szemben iszkémia a kontrollhoz képest több paraméterben (CF, LVSP, DP, ± dP/dt_{max}) szignifikáns csökkenést okozott. Más paraméterek (HR, LVEDP) nem változtak



54. ábra Az összes szívre meghatározott aritmia eloszlást tartalmazó grafikus integráldiagram. X tengely: reperfúziós idő; Y tengely: 78 szív aritmia diagramja (minden vizszintes csík egyetlen szívet reprezentál). Az egyes aritmiatípusok időtartamát színekkel kódoltuk: fehér: szabályos szinusz ritmus (**SR**); sárga: halmozott extraszisztolé (**ES**); barna: kamrai tachycardia (**VT**); vörös: kamrafibrilláció (**VF**).

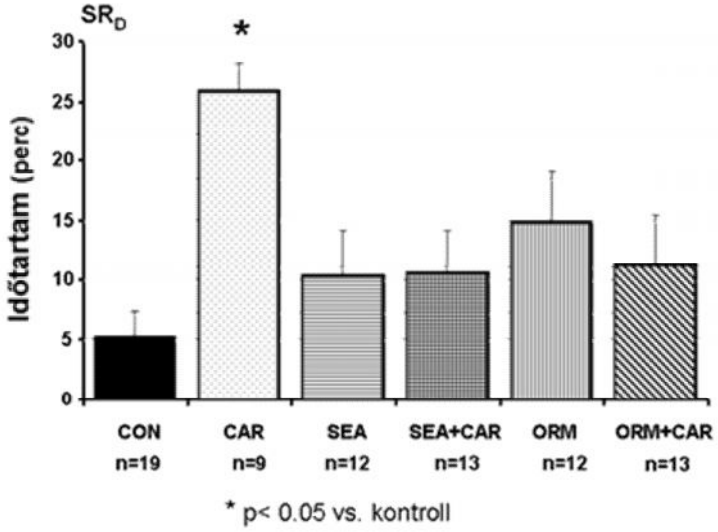
A reperfúziós fázis során a koronáriaáramlás (CF) helyreállt, a LVSP, DP és a ±dP/dt_{max} szignifikánsan a kontroll alatt maradtak, ugyanakkor a LVEDP minden kísérleti csoportban szignifikáns emelkedést mutatott. (Fontos hangsúlyozni, hogy a reperfúziós adatoknál az **n** értékek jóval kisebbek, mint az összes többi esetben.) Érdekes és fontos eredmény, hogy az elvégzett statisztikai analízis (egyutas ANOVA) szerint a *kontroll és teszt csoportok között* szignifikáns különbséget *egyetlen kísérleti fázisban sem kaptunk*. Viszonylag rövid (10

dc_1149_15

perces) regionális iszkémiás periódust követően kontroll patkány szíveken (csak a hordozó DMSO-t kapták) a leggyakoribb reperfúzió-indukált aritmiatípus a kamrafibrilláció volt.
A szelektív NHE gátló cariporid antiaritmiás hatékonysága ebben a kísérleti modellben, valóban kiemelkedőnek bizonyult. A kontroll csoportban gyakori (sokszor irreverzibilis) fibrillációs intervallumok száma, és különösen azok hossza, cariporid előkezelés hatására drasztikusan csökkent. Az NCX gátlószerek (SEA0400 és ORM-10103) hatékonysága, önmagukban vagy cariporiddal együtt alkalmazva, az 54. ábra integrált aritmiadiagramja alapján nehezen ítélhető meg. Mindazonáltal, ebből a diagramból is nyilvánvaló, hogy ezek kevésbé voltak hatékonyak, mint a cariporid önmagában. Annak érdekében, hogy az előkezelések eredményessége közötti látszólag mérsékelt, de elvileg fontos különbségeket – különösen a kevéssé súlyos reperfúziós aritmiatípusok (ES és VT) vonatkozásában – megbízhatóan karakterizálni lehessen, elvégeztük az aritmia adatok kvantitatív analízisét.

A normál sinus-ritmus (SR) és a reperfúzió-indukált aritmiatípusok (ES, VT és VF) összehasonlító elemzése. A 30 perces reperfúziós fázis során szabályos sinus-ritmussal jellemezhető periódusok teljes időtartamát (SR_D) az 55. ábrán tüntettük fel. Az SR_D kontroll értékét (5.3 ± 2.1 perc) a vizsgálat során felhasznált kontroll állatok összegyűjtött adataiból határoztuk meg. Az összes többi csoportra kapott értéket ehhez viszonyítottunk.

Önmagában alkalmazva a cariporid szignifikánsan nyújtotta a normál SR periódusok teljes időtartamát a reperfúzió során (26 ± 2.4 perc). Bár a többi farmakológiai beavatkozás is jótékony hatást mutatott, szignifikáns SR_D növekedést egyik sem hozott létre. A négy, NCX inhibitort is alkalmazó csoportból háromban a gátlási hatékonyság közel azonos volt (SEA: 10 ± 3.9; SEA+CAR: 11 ± 3.6, ORM+CAR: 11 ± 4.2 perc), a cariporid utáni legjelentősebb javulást az ORM-10103-mal kezelt csoportban kaptuk (15 ± 4.2 perc).

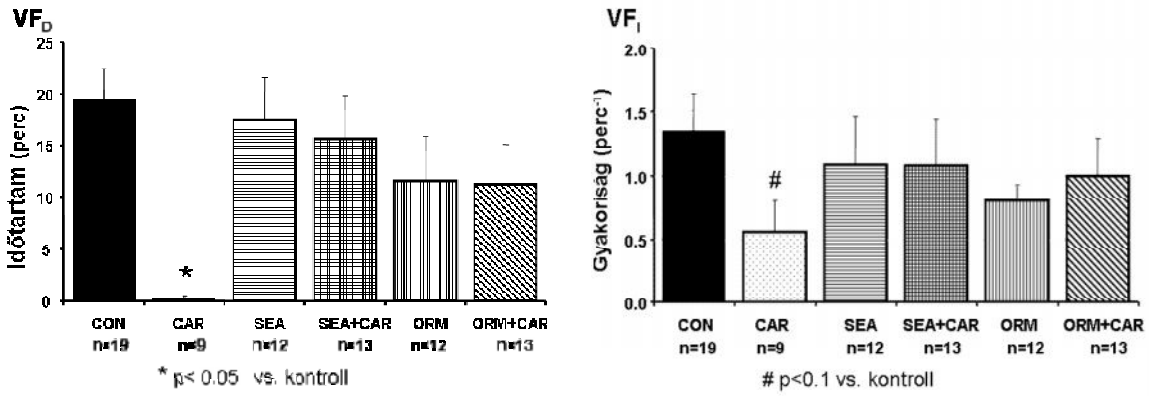


55. ábra A reperfúziós fázisban szabályos sinus ritmussal jellemezhető periódusok összidőtartama (SR_D: perc) a hat kísérleti csoportra. A gátlószerek, illetve gátlószer-kombinációk SR_D növelő hatékonyságát a kontroll csoportra vonatkoztatva vizsgáltuk. * = $p < 0.05$, a kontroll csoporthoz képest.

A VF periódusok összes kísérleti csoportra meghatározott abszolút gyakoriság és időtartam értékeit az 56. ábrán ábrázoltuk. Kontroll szívekben a VF átlagos időtartama (VF_D) (19 ± 3.0 perc) és gyakorisága (VF_I) (1.4 ± 0.24 $perc^{-1}$) magas volt, és ami még figyelemre méltóbb, a reperfúziós fázis végén a csoportot alkotó 19 szívből 11 tartósan fibrillált. Az önmagában alkalmazott cariporid a kontroll szívekhez képest szignifikánsan csökkentette a fibrillációs epizódok gyakoriságát (0.55 ± 0.24 $perc^{-1}$), még jobban átlagos időtartamát (0.25 ± 0.21 perc). A reperfúzió végén a csoportot alkotó 9 szív egyike sem fibrillált. Ezzel

dc_1149_15

szemben az NCX gátlók, bár vitathatatlanul mérsékelt jótékony hatást mutattak, nem csökkentették szignifikánsan a VF periódusok gyakoriságát és/vagy időtartamát; sem a SEA0400 (I: 1.1 ± 0.4 perc^{-1}; D: 18 ± 4.1 perc), sem az ORM-10103 (I: 0.8 ± 0.1 perc^{-1}; D: 12 ± 4.3 perc). Ebben a vonatkozásban kedvezőbbnek tűnt az ORM-10103 antifibrillációs hatékonysága. Bár a tartósan fibrilláló szívek számában nem volt különbség (ORM-10103: 6/12, SEA0400: 7/13), az ORM-10103-kezelt csoportban a SEA0400-kezelt csoporthoz képest valamivel kisebb volt a VF epizódok átlagos időtartama.



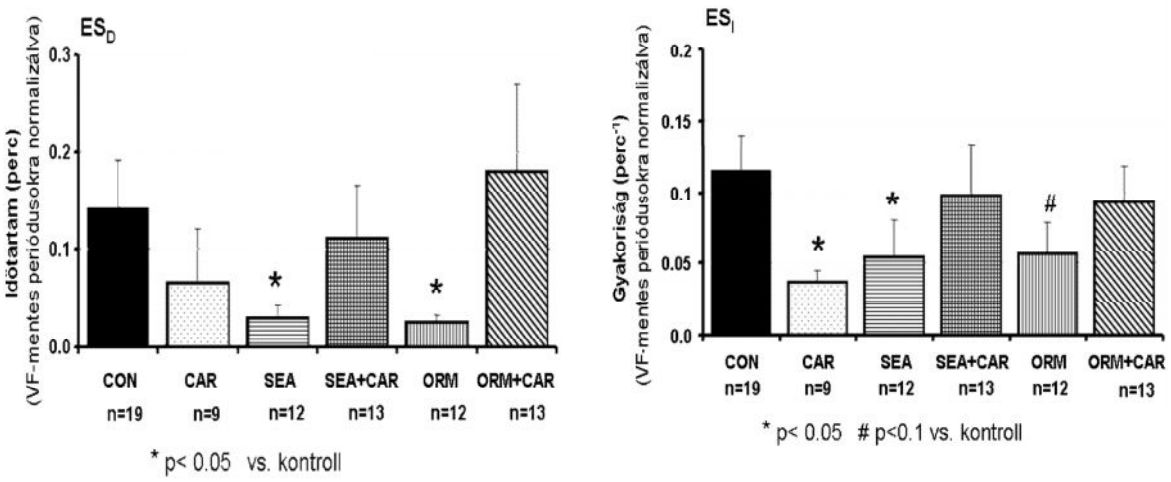
56. ábra A kamrafibrillációs (VF) periódusok abszolút időtartama (VF_D) és gyakorisága (VF_I) a reperfúziós fázisban. Két eltérő szignifikanciaszintet számítottunk ***** = $p < 0.05$; **#** = $p < 0.1$, a kontroll csoporthoz képest.

Meglepetésünkre, ha a cariporidot nem önmagában, hanem NCX inhibitorral *egyidejűleg* alkalmaztuk, hozzáadása nemhogy nem javította, esetenként inkább rontotta az NCX gátlót magában alkalmazva kapott, mérsékelt anti-VF védelmet (SEA+CAR, I: 1.1 ± 0.36 perc^{-1}; D: 16 ± 4.1 perc; ORM+CAR, I: 1.0 ± 0.29 perc^{-1}; D: 11 ± 3.9 perc). Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy a kétféle gátlószer egyidejű alkalmazása esetén az NCX gátlás mérsékelt hatását jelentősen potencírozó kölcsönhatás helyett a cariporid jelenléte nehezen értelmezhető, hatásvesztő (loss of action) következménnyel jár.

Ahogy a MÓDSZEREK fejezetben ismertettük, realisztikusabb összehasonlítás céljából a reperfúziós fázis alatt kialakuló ES és VT epizódok gyakoriságát és időtartamát minden egyes szív esetében a VF-mentes periódusok időtartamára normáltuk, így a paraméterek a VF periódusok gyakoriságától és hosszától lényegében függetlenné váltak. Az alább megadott ES és VT időtartam és gyakoriság adatok tehát nem a teljes 30 perces, hanem a VF-mentes reperfúziós időtartamra vonatkoznak.

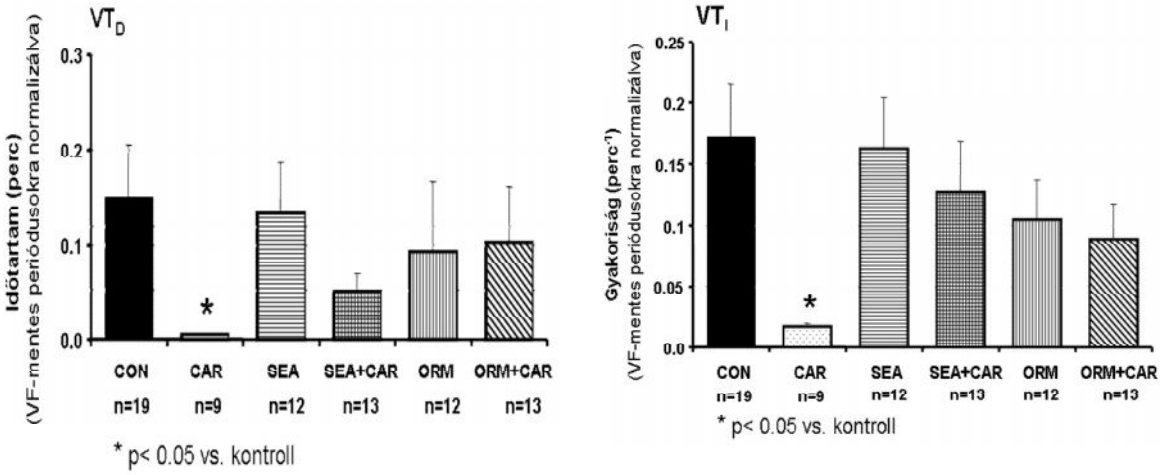
A reperfúziós fázisban kialakuló *halmozott extraszisztolés* epizódok (ES) relatív időtartamára (ES_D: perc) és gyakoriságára (ES_I: perc^{-1}) számított értékeket az 57. ábra összegzi. Kontroll szívekben az ES intervallumok gyakorisága (ES_I) (0.11 ± 0.02 min^{-1}) és időtartama (ES_D) (0.14 ± 0.04 perc) igen magas volt. Önmagában alkalmazva, a cariporid szignifikánsan csökkentette a gyakoriságot (0.03 ± 0.01 perc^{-1}) és jelentősen rövidítette az epizódok átlagos időtartamát (0.07 ± 0.05 min). Az ES epizódok gyakorisága és főleg időtartama mindkét NCX gátlószer alkalmazását követően szignifikánsan csökkent (ES_I: SEA: 0.05 ± 0.02 min^{-1}; ORM: 0.05 ± 0.02 perc^{-1}; ES_D: SEA: 0.02 ± 0.01 perc; ORM: 0.02 ± 0.01 perc^{-1}). Mint várható volt, utóbbi esetben az NCX gátlás antiaritmiás hatékonysága egyértelműen jobb volt, mint az NHE gátlásé. Ezzel szemben, egy NCX gátlószerrel együtt alkalmazva a cariporid nemcsak, hogy nem fokozta azok kiváló hatását, de gyakorlatilag el is tüntette azt; mind az ES periódusok időtartama, mind gyakorisága magasabb volt, mint akár NCX, akár NHE gátlás esetén (ES_D: SEA+CAR: 0.11 ± 0.05 perc, ORM+CAR: 0.17 ± 0.09 perc; ES_I: SEA+CAR: 0.09 ± 0.03 perc^{-1}; ORM+CAR: 0.09 ± 0.02 perc^{-1}).

dc_1149_15



57. ábra A halmozott extraszisztolés epizódok (ES) relatív időtartama (ES_D) és gyakorisága (ES_I). A szívek reperfúzió-indukált ES érzékenységének reálisabb megközelítése céljából a az adott szíven meghatározott időtartam és gyakoriság értékeket normalizáltuk a fibrilláció-mentes periódusok összidőtartamára; * = $p < 0.05$, **#** = $p < 0.1$ (a kontroll csoporthoz képest).

A reperfúziós fázis során kialakuló kamrai tachycardia (VT) epizódokra meghatározott, normalizált gyakoriság és átlagos időtartam adatokat a 58. ábrán összegeztük. A többi aritmia típushoz hasonlóan kontroll szívekben a VT periódusok gyakorisága (0.17 ± 0.04 $perc^{-1}$) és átlagos időtartama (0.14 ± 0.05 perc) relatíve magas volt. Legeredményesebb védelemnek a gyakoriságot és összidőtartamot egyaránt szignifikánsan csökkentő cariporid kezelés (VT_I: 0.01 ± 0.002 min^{-1}; VT_D: 0.005 ± 0.001 min) bizonyult. Ezzel szemben – bár rendelkeztek antitachycardiás hatással – a VT epizódok időtartamát vagy gyakoriságát (az ES epizódokkal ellentétben) egyik NCX gátlószer sem csökkentette szignifikánsan (SEA: 0.13 ± 0.05 perc és 0.16 ± 0.04 $perc^{-1}$; ORM: 0.09 ± 0.07 perc és 0.10 ± 0.03 $perc^{-1}$). Sőt, amikor a cariporiddal *egyidejűleg* NCX inhibitort is alkalmaztunk, a cariporid kezeléssel elért kimagasló védelem – az ES epizódokra tapasztaltakkal analóg módon – mindkét NCX gátló hatására jelentősen leromlott és alig haladta meg az önmagában alkalmazott gátlószer által kialakított mérsékelt védelmet (VT_D: SEA+CAR: 0.05 ± 0.05 perc; ORM+CAR: 0.10 ± 0.05 perc; VT_I: SEA+CAR: 0.13 ± 0.06 $perc^{-1}$; ORM+CAR: 0.09 ± 0.07 $perc^{-1}$).



58. ábra A ventrikuláris tachycardia (VT) priódusok relatív időtartama (VT_D) és relatív gyakorisága (VT_I). Az **57.** ábrához hasonlóan a meghatározott időtartam (perc) és gyakoriság ($perc^{-1}$) értékeket normalizáltuk ugyanazon szíven mért VF-mentes periódusok összidőtartamára; * = $p < 0.05$ (a kontroll csoporthoz képest).

dc_1149_15

6. MEGBESZÉLÉS

Az értekezésben ismertetett kísérletes vizsgálatok négy, az előzetes irodalmi adatok alapján még meg nem válaszolható, elméleti és klinikai szempontból is jelentős kérdést elemeznek:

1) Milyen hatással lehetnek egyes, nagymértékű Ca^{2+}-függést mutató, repolarizáló K^+ áramokra a $[Ca^{2+}]_i$ változásai; az áramok $Ca^{2+}{}_i$-függése következtében fokozódik, vagy csökken a szív adaptációs képessége, illetve aritmia hajlama?

2) Van-e fiziológiás körülmények között az NCX részleges, szelektív gátlásának jelentős befolyásoló hatása a Ca^{2+} háztartásra és a kontraktilitásra? Ha van, milyen mértékű?

3) Jelenthet-e a szelektív NCX gátlás perspektívikus terápiás stratégiát a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás zavarai által indukált aritmiák kialakulása ellen?

4) Fokozza-e az NCX gátlás, illetve az NHE gátlás antiaritmiás hatását a két kicserélő kombinált gátlása reperfúziós aritmiák kialakulása ellen?

6.1. A K^+ áramok $Ca^{2+}{}_i$ függése és a repolarizáció adaptációja

A $Ca^{2+}{}_i$ háztartás változásainak hatását két, az AP fiziológiás repolarizálója szempontjából fontos K^+ áram, a Ca^{2+}-CaM függést mutató alacsony konduktanciájú, apamin-érzékeny SK áram (I_{SK-AS}) és a Ca^{2+}-CaM-CaMKII úton Ca^{2+}-függő, befelé egyenirányító K^+ áram (I_{K1}) vonatkozásában vizsgáltuk. Bár elméletileg az I_{SK-AS} a szív $Ca^{2+}{}_i$ homeosztázisa és repolarizációja közötti közvetlen kölcsönhatás biztosításával a frekvenciafüggő adaptáció egyik fontos tényezője lehetne, ma még nemcsak az egészséges szívizomban betöltött fiziológiás szerepe bizonytalan, de aktivitásának léte és mértéke is vitatott. Vizsgálatunk célja az I_{SK-AS} fiziológiás működésének igazolása vagy cáfolata volt. A másik általunk vizsgált K^+ áram (I_{K1}) kiemelkedő szerepe a fiziológiás repolarizációban egyértelműen igazolt, ezért ez esetben fő célunk a non-adrenerg $Ca^{2+}{}_i$ emelkedés I_{K1}-re gyakorolt hatásának iránya, és az áram kamrai repolarizáció alatti $[Ca^{2+}]_i$ függésének elemzése volt .

6.1.1. A fiziológiás SK-AS áram hiánya – lehetséges okok és következmények

A szívfrekvencia változásai markánsan befolyásolják a $Ca^{2+}{}_i$ szintet és az APD-t is, melynek frekvenciafüggő modulációja alapvetően a repolarizáló K^+ áramok kinetikájának változásaival hozható kapcsolatba. Ha az I_{SK-AS} a szívszövetben fiziológiás körülmények között is aktív lenne, jelentős szerepe lehetne az APD $[Ca^{2+}]_i$-vezérelt, frekvenciafüggő adaptációjában, mivel a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás és az AP repolarizáció közötti közvetlen kétirányú kapcsolat nagymértékben fokozhatná a szív funkcionális adaptációs készségét és ezáltal csökkenthetné a $Ca^{2+}{}_i$-függő aritmia kialakulásának valószínűségét. Valamilyen, bár nem feltétlenül direkt kapcsolatot mutatnak azok a megfigyelések, amelyek szerint a $[Ca^{2+}]_i$ és/vagy a $Ca^{2+}{}_i$ transzporterek aktivitásának krónikus változása esetén a repolarizáló K^+ csatornák expressziója is szignifikánsan változik **[137]**.

A klasszikus (tagadó) vélekedéssel szemben *Chiamvimonvat és csoportja apamin-szenzitív SK2 csatornák* expresszióját és jelentős mértékű aktivitását írták le mind egér, mind humán szívizomsejtekben **[134], [135]**. Ezért vizsgálataink során a következő alapkérdésekre kerestünk választ: 1) Kimutatható-e molekuláris biológiai módszerekkel az SK-AS csatornaprotein jelentős mértékű *expressziója* izolált szívizomsejtekben? 2) Okozhatja-e az apaminkezelés az *APD* – a Chiamvimonvat csoport által leírt – *szignifikáns növekedését*? 3) Kimutatható-e fiziológiásan aktív I_{SK-AS} áram alacsony, illetve magas $[Ca^{2+}]_i$ mellett szívizomsejtekben? 4) Fokozódik-e az apamin-indukált APD megnyúlás a repolarizációs tartalék markáns gyöngítését követően?

dc_1149_15

A Chiamvimonvat csoport eredményei és következtetései. Adataik szerint pitvari sejtekben az SK-AS csatorna expressziója jóval magasabb, de jelentős fehérjeexpressziót mutattak ki kamrai sejtekben is. Mivel az apamin-indukált APD növekedés is sokkal nagyobb volt pitvarsejtekben, szerintük a pitvari miokardium lényegesen érzékenyebb apaminra. Azt is leírták, hogy az egyes SK csatorna izoformok eltérő mértékben expresszálódnak pitvari, illetve kamrai szívizomsejtekben **[132]**. Egér KO modellből kapott kísérleti adataik alapján felvetették, hogy az SK2 csatornák működési zavara jelentősen *hozzájárulhat a humán AF* kialakulásához **[137]**, ezért a csatornák farmakológiai modulációja ígéretes terápiás eszköz lehet a humán AF megelőzésében, illetve kezelésében. Mivel sokszorosan igazolt, hogy az egér szívizomsejtek mind ioncsatorna összetételükben, mind repolarizációjuk kinetikájában markánsan eltérnek a humán (és kutya) szívizomsejtektől, az elsősorban egérből származó adatok alapján a humán AF kialakulására, még inkább krónikussá válására vonatkozóan nehéz megbízható következtetéseket levonni. Következtetésképpen, az egér KO modellre alapozott humán AF-re vonatkozó hipotézist *mindenképpen validálni kell* pitvarfibrilláló humán, esetleg releváns nagyobb emlősből származó szövetpreparátumokon és sejteken.

Fentieken kívül, elsősorban egérből nyert elektrofiziológiai mérési adataikra alapozva következtetéseket vontak le az I_{SK-AS} AP repolarizációban játszott szerepére vonatkozóan is **[134]**. Kísérleti adataik és a belőlük levont következtetéseik azonban ellentmondanak az széleskörűen elfogadott repolarizációs rezerv hipotézisnek. Ezért szükségesnek tartottuk, hogy *fiziológiás körülmények* között, humán, kutya (és patkány) mintákon megvizsgáljuk az I_{SK-AS} tényleges szerepét és súlyát a repolarizációs folyamatban.

Eredményeink egyáltalán nem támogatják a Chiamvimonvat csoport következtetéseit. Bár saját molekuláris biológiai méréseink eredményei (14. ábra) megerősítették a csatorna viszonylag jelentős mértékű expresszióját kamrai szívizomsejtekben – *eredményeikkel ellentétben* – az SK csatornák leghatékonyabb, szelektívnek tekintett gátlószere – az apamin – *egyetlen, általunk vizsgált preparátumban sem befolyásolta az AP morfológiáját*, ami azt bizonyítja, hogy ezek a csatornák *fiziológiás* körülmények között elhanyagolható módosító hatást fejtenek ki a szívizomsejtek repolarizációjára. Bár nagyobb gyakorlati jelentőségük miatt mi a kamrai SK-AS csatornákra fókuszáltunk (15. ábra /A-C), néhány pitvari preparátumot is megvizsgáltunk; az apamin – hasonlóan a kamrai AP-hez – a pitvari AP morfológiájában sem kutyában, sem patkányon nem okozott mérhető változást (15. ábra /D,E). A homlokegyenest eltérő kísérleti eredmények nehezen értelmezhetők. Feltételezve, hogy mindkét adatsor korrekt, az eltérés oka a mérési körülményekben, vagy a species-különbségekben lehet. Mindkét lehetőséget a lehető legtöbb oldalról körüljártuk.

1) Az első kísérletsorozatban kutya, patkány és humán *multicelluláris* preparátumokban *hegyes mikroelektródokkal* mértük az akciós potenciálokat (a Chiamvimonvat csoport viszont perforált patch clamp technikát alkalmazott *izolált* egér szívizomsejteken **[134]**). Általánosan elfogadott, hogy az izolált sejteken végzett AP mérés – bár gyakran használt módszer (mi is alkalmaztuk, igaz hegyes mikroelektródokkal) – nem a legmegbízhatóbb módszer az APD kismértékű változásainak kvantitatív meghatározására. A multicelluláris mérések további vitathatatlan előnye, hogy izolált szívizomsejtekben, az enzimes emésztés miatt, mindig feltételezhető az SL K^+ csatornáinak kisebb-nagyobb károsodása, ami az AP megnyúlásához, jelentős instabilitásához, váratlan morfológiai változásaihoz, valamint az alkalmazott gátlószerek hatásának csökkenéséhez vagy fokozódásához vezethet.

2) A második kísérletsorozatban kutyából és patkány kamrából izolált szívizomsejteken mi is végeztünk I_{KS-AS} méréseket, voltage clamp módszer alkalmazásával (18. ábra). Mivel az I_{SK} feszültségfüggése gyenge, széles membránpotenciál tartományban aktív kellene, hogy legyen **[134, 452]**. Méréseinkben szupramaximális (100 nM !!!) apamin *egyetlen vizsgált*

dc_1149_15

membránpotenciálnál sem befolyásolta az I – V összefüggést – sem kutya, sem patkány szívizomsejteken. Ez az eredmény ismét éles ellentétben van az AP platójára jellemző membránpotenciál tartományban az általuk mért 4 pA/pF apamin-érzékeny árammal, és igazolja, hogy az I_{SK-AS} nem játszhat lényeges szerepet a kamrai sejtek repolarizációjában. A méréseikből közölt áramérték is természetellenesen magas, közelítőleg megegyezik az általunk vizsgált szívizomsejtek *teljes* membránáramával (lásd 18. ábra /A,B).

3) Alternatív magyarázatként szolgálhat, hogy a fiziológiás $[Ca^{2+}]_i$ növekedés által aktivált I_{SK-AS} nem elég nagy ahhoz, hogy a repolarizációs tartalék ne legyen képes kompenzálni a gátlás következtében kialakuló repolarizáló K^+ áramdeficitet. A kérdés tisztázása céljából megvizsgáltuk az apamin hatását olyan preparátumokon, melyekben kritikus repolarizáló áramok (kutya: I_{Kr}, patkány: I_{Kur} + I_{to}) gátlását követően a repolarizációs rezerv igazoltan, markánsan meggyengült (17. ábra). Bár az előkezelések a vártnak megfelelően szignifikáns APD megnyúlást hoztak létre, az apamin még olyankor sem befolyásolta a repolarizáció sebességét, amikor egy-egy fontos repolarizáló áramot kiiktattunk.

4) A következő kísérletsorozatban az apaminhatás $[Ca^{2+}]_i$-függését vizsgáltuk (15. ábra). A fluorometriás mérések szerint a kamrasejtekben a legmagasabb $[Ca^{2+}]_i$ kutyában 3 Hz, patkányban 0.3 Hz ingerlési frekvenciánál alakul ki. Az apamin hatásában viszont nem kaptunk frekvenciafüggő eltérést, azaz a legmagasabb fiziológiás $[Ca^{2+}]_i$ is alacsonynak bizonyult a feltételezett SK csatornák aktiválásához. Ugyanezt a következtetést vontuk le izolált sejt mérésekből, melyekben – a pipettaoldat 900 nM Ca^{2+} szintje következtében – a $[Ca^{2+}]_i$ valószínűleg meglehetősen magas (a normál szisztolés $[Ca^{2+}]_i$ érték közelében) volt, ugyanúgy, mint amikor a perforált patch clamp módszert használva nem gátoltuk a $[Ca^{2+}]_i$ dinamikus változásait (19. ábra). *Egyetlen alkalmazott kísérleti felállásban sem kaptunk mérhető apaminhatást.*

5) Elvileg nem zárhatók ki a species-különbségek – kísérleteinkben főleg multicelluláris kutya preparátumokon dolgoztunk, a Chiamvimonvat csoport viszont egér izolált sejteken **[134]**. Mivel elektrofiziológiai szempontból a kutya és humán szívizomsejtek rendkívül hasonlóak **[96, 453, 454]**, az egér és patkány sejtek – mind Ca^{2+}_i háztartásuk, mind AP morfológiájuk tekintetében – szinte azonosak **[455]**, kísérleteinkben az apaminhatás hiánya nem magyarázható csak species-különbségekkel. Ezenkívül mindkét csoport végzett méréseket egészséges humán szívmintákon is, *szintén markánsan eltérő eredményekkel.*

Meg kell jegyezni, hogy a Chiamvimonvat csoport adatait kívülünk mások is cáfolták. Két, Langendorff-perfundált szíveken, illetve – méréseinkhez hasonlóan – multicelluláris és izolált sejtpreparátumokon végzett vizsgálatok során sem kaptak apamin-indukált APD változást **[138, 456]**, így az *SK-AS csatornák* aktív szerepe a szívben igen valószínűtlen.

Ha vannak a szívben SK-AS csatornák miért nem hat rájuk az apamin? Bár több csoport is igazolta, ezért nehezen vitatható, hogy a szívizomsejtekben *valamilyen* formában jelen vannak az SK csatornák, alapvető kérdések maradtak megválaszolatlanok. Amennyiben: 1) feltételezzük, hogy *működő* SK csatornák vannak a szívben, és a leírt hatások ezeknek tulajdoníthatók, 2) meg kívánjuk érteni a szív élet- és kórtanában játszott szerepüket, 3) farmakológiai modulációjukra alapozva hatékony kardioprotektív klinikai stratégiákat szeretnénk kifejleszteni, ezek a kérdések mindenképpen válaszra szorulnak.

1) Ismert, hogy főleg a kamrai, de a pitvari sejtek is jelentős repolarizációs tartalékkal rendelkeznek. Hogyan jöhet akkor létre szignifikáns APD megnyúlás szelektív SK-AS csatorna blokád következtében?

A *kamrai* repolarizáció biztonságát és stabilitását a repolarizációs tartalék léte garantálja **[96, 453, 457],** mely a repolarizáló áramok kölcsönhatásán alapul **[454]**. Kompenzáció

dc_1149_15

hiányában egyik K^+ áram meggyengülése markáns APD megnyúláshoz vezetne; ilyenkor más repolarizáló K^+ áramok kompenzatorikus növekedése normalizálja a repolarizációt és megakadályozza az APD jelentős változását. Kamrai sejtekben szignifikáns AP megnyúlás *egyetlen* K^+ áram gátlásával *nem hozható* létre **[96, 453, 457],** ezért az $I_{K,Ca}$ gátlás markáns APD nyújtó hatása nagyon valószínűtlen. A *pitvari* AP érzékenyebb, változékonyabb; külső hatásokra (szívfrekvencia emelkedésre) jellegzetes triangulációja jön létre, ami frekvencia-adaptációjának fontos komponense. Az AP 2-3. fázisában az I_{to} inaktivációját követően az I_{Kur} a legfontosabb repolarizáló áram; az I_{Kr} és I_{Ks} szerepe kevésbé jelentős. Az I_{Kur} ismerten Ca^{2+}-függő; a pitvari AP frekvencia-adaptációja hátterében az I_{Kur} fokozott, CaMKII-indukált inaktivációja áll **[458, 459]**. Bár csatornasűrűsége, illetve konduktanciája alacsonyabb, nyitvatartási valószínűsége pedig kisebb, mint a kamrában, az I_{K1} a pitvarban is aktív, sőt, a terminális repolarizáció alatt, valamint a nyugalmi potenciál beállításában és stabilizálásában a legfontosabb K^+ áram. Végezetül, a konstitutív $I_{K,,ACh}$ is hozzájárulhat a normális repolarizációhoz. Mindezekből kifolyólag az SK csatornák általuk hipotetizált *túlsúlya* a pitvari repolarizációban egészen valószínűtlen. Egy másik fontos érv az $I_{K,Ca}$ blokád APD nyújtó hatása ellen a pitvari repolarizációs tartalék **[459]**; ez mindenképpen megakadályozná az APD nagyobb mértékű növekedését. Ugyanakkor, mivel a nettó repolarizáló áram – és így a repolarizációs tartalék is – lényegesen gyengébb a pitvari sejtekben, a pitvari AP jóval érzékenyebb a K^+ csatornasűrűség/-funkció módosulására – arra a károsodásra is, ami az enzimes sejtizolálás során jöhet létre.

2) Létezhetnek-e apaminra nem érzékeny SK csatornák a szívben?

Az apamint hatékonysága és karakterisztikus SK csatornatípus-függő szelektivitása alapján (IC_{50} = 2.9 nM, 0.074 nM, 0.33 nM az SK1, SK2, SK3 csatornákra) *referencia* SK gátlószernek tekintik **[460]**, ezért látszólagos hatástalanságát nehéz indokolni. Két újabb tanulmány azonban indokolhatja apamin-érzéketlen SK csatornák létezésének lehetőségét. Egyrészt, CHO sejtekben stabilan expresszált SK1–3 csatornák *közel felét* az apamin még szupramaximális koncentrációban (~1 µM) *sem* gátolta **[461]**, másrészt, találtak apaminra, illetve a még szelektívebb scyllatoxinra *is érzéketlen humán SK3* csatornákat **[462]**. Az elérhető kísérleti adatok alapján úgy tűnik, hogy a SL-ben aktív SK csatornák vagy nem léteznek, vagy egyedi, blokádjuk hatékonyságát csökkentő tulajdonságokkal rendelkeznek. Diness **[339]** több lehetséges magyarázatot vetett fel, hogy az apamin miért hatástalan, míg az újtípusú SK gátlószerek eredményesnek bizonyulnak: 1) a szívizomsejtekben olyan fontos *kiegészítő csatornafehérje-alegységek* találhatók, melyek akadályozzák az apamin kötődését; 2) az apamingátlás mértéke jelentősen csökken a csatorna (de)foszforilációja következtében; 3) az apamin, más SK csatornagátlókkal szemben, külön-külön kötési, illetve gátlási mechanizmusokkal rendelkezik, így lehetséges, hogy az SK csatornák az apamin kötődését követően is nyitott állapotban maradjanak **[461, 463]**; azaz az SK gátlók között az apamin egyedi, a negatív modulátoroktól/pórusblokkolóktól lényegesen eltérő tulajdonságokat mutat. A legnagyobb nehézség ezekkel az érvekkel, hogy egyrészt szokatlanok, másrészt – bizonyító adatok hiányában – teoretikusak. Bár elvileg mindhárom elképzelésnek lehet létjogosultsága, önmagában egyik sem alkalmas minden kísérleti eredmény (pl. az apamin 50% blokkoló hatása) magyarázatára. Hasonló, teoretikus érvek az SK csatornák aktív voltának igazolására is találhatók. Például, a szelektívnek tekintett apaminnal szemben, az új gátlószerek szelektivitása kevésbé tisztázott. Másrészt, bármely *akut* AF modell *per se* instabil, mivel még nem alakulhatott ki a humán pitvarfibrillációra, illetve a krónikus AF modellekre is jellemző *strukturális* remodeling. Ez a tény önmagában is magyarázhatja, hogy a szerek alkalmazása miért gátolja az AF kialakulását, illetve miért szünteti meg a kialakult fibrillációt az alkalmazott kísérleti modellekben. Azt különösen nehéz értelmezni, hogy a feltételezett K_{Ca} csatornák Ca^{2+}-függő gátlása miért *kizárólag az*

dc_1149_15

ERP alatt, azaz *jelentősen csökkent* $[Ca^{2+}]_i$ *mellett* nyilvánul meg, miért nem korábban, lényegesen magasabb $[Ca^{2+}]_i$ mellett. Az APD egyidejű megnyúlása nélküli ERP megnyúlás (*postrepolarization refractoriness*) jellemzően I/B, néha I/A vagy I/C osztályú antiaritmiás szerek alkalmazását követően jön létre. Mindazonáltal, az ellentét Li és mts. **[137]** és Diness és mts. **[339]** adatai között látszólagos is lehet, mivel a repolarizáció sebességének emelkedése és csökkenése is elősegítheti aritmiák kialakulását **[464, 465]**.

3) Lehetséges, hogy SK csatornák jelen vannak a felnőtt szívben, de nem működőképesek?

Bár fiziológiás szerepük erősen kérdéses, *vannak* érvek SK (SK-szerű) csatornák fizikai jelenlétére a szívben. Először, embrionális szívben ezek a csatornák expresszálódnak és vélhetően működnek is, mivel pluripotens őssejtekben SK csatornák aktiválódása vezérli azok szívizomsejtté, elsősorban nodális sejtté alakulását [466]. Másodszor, több olyan csatornatípus is inaktív fiziológiás körülmények között (pl. K_{ATP} csatornák), amely kóros körülmények között aktiválódik. Az SK csatornák analóg viselkedése részben kísérletileg is igazoltnak tűnik: szívelégtelen nyulak epikardiális sejtjeiben az $I_{SK\text{-}AS}$ amplitúdója megnőtt **[138]**. Furcsa módon igen magas áramdenzitást (8 pA/pF) mértek – ekkora nettó membránáram hatalmas APD megnyúlást hozna létre – de az apamin-indukált APD nyúlás mindössze 15 ms volt, ami erősen megkérdőjelezi az eredmények fenti interpretációját. Egy másik példa fizikailag jelenlévő, de funkcionálisan inszignifikáns csatornára a Kv1.5 protein, mely expresszálódik mind pitvari, mind kamrai szívizomsejtekben, a hozzátartozó áram (I_{Kur}) viszont csak a pitvarsejtekben aktív **[467]**. Az is ismert, hogy az ioncsatornák mozgatása a szarkolemmába precízen szabályozott, de könnyen meghibásodó folyamat **[468, 469]**. Újabb elképzelések szerint a működő ioncsatornák mindig multimolekuláris fehérjekomplexek, ezért a csatornafehérje-mutációk hibás **3D** szerkezet kialakulásához vezethetnek; a hibás térszerkezetű (misprocessed) proteinek nem jutnak a membránba, ami a fenotípus elvesztésével jár. Pl., KCNQ1-CaM interakció szükséges a protein összeállításához és membránba juttatásához. A KCNH2 mutációk működésének vizsgálata szerint a protein hibás összeállítása gyakori jelenség **[470]**.

Összefoglalva, (2008-as) ismereteink alapján egyaránt elképzelhető, hogy a szívben az SK csatornák: 1) jelen vannak, de fiziológiásan inaktívak, 2) jelen vannak de nem jutnak el a sejtmembránba, 3) jelen vannak, de egy még nem tisztázott ok miatt nem működőképesek.

Aritmogén lehetne-e egy fiziológiásan aktív SK csatorna? Érdekes elméleti kérdés, hogy milyen változást okozna a szívizomsejtekben fiziológiásan is aktív SK csatornák jelenléte. A válasz nyilvánvalóan függ attól, hogy a (vélhetően nagy számban jelenlevő) csatornák milyen mértékben aktiválódnának. Ha nagyrészt zárt állapotban lennének, aktivitásuk hatása feloldódna a repolarizációs rezervben; gátlásukat követő APD megnyúlás vélhetően minimális lenne, és csak kórosan csökkent repolarizációs rezerv mellett jöhetne létre markáns APD megnyúlás. Ezzel szemben nagyszámú SK csatorna egyidejű aktiválódása esetén elképzelhető lenne a rövid QT szindrómához, illetve az iszkémiás állapothoz hasonló, nagyobb mértékű, fokozottan aritmogén APD rövidülés.

Legújabb fejlemények (2009-)*:* Közleményünk megjelenése óta számos tanulmány látott napvilágot, amelyek elsősorban az SK csatornák egyes szívbetegségek során bekövetkező aktivációjára vonatkoznak. Bár a kísérleti eredmények interpretációja változatlanul igen bizonytalan, sok adat támogatja SK csatorna izoformok (SK1-3) aktiválódását, illetve a szelektív (?) SK gátlás pozitív terápiás hatását ezekben a kórképekben. A szívben az SK3 csatornaeloszlás viszonylag egyenletes, viszont SK1 és SK2 csatornák főleg a pitvarban expresszálódnak. Ennek következtében SK csatornák főleg a pitvarok repolarizációjában játszhatnak jelentősebb szerepe **[471]**, ugyanakkor újabb adatok szerint kóros körülmények

dc_1149_15

között részt vehetnek a kamrai repolarizációban, valamint befolyásolhatják a vezetési rendszer működését is. [472-475].

Jelenleg az I_{SK} aktiválódása (upregulációja) pitvarfibrillációban tűnik a legvalószínűbbnek. Magas frekvenciával stimulált kutya AF modellben az *SK1* csatornák expressziója fokozódott, nyitott állapotának valószínűsége megnőtt [476]. Egy hasonló nyúl AF modellben az *SK2* csatornák membránba épülése gyorsult [338]. Újabb adatok szerint [474, 475] egérszívben az *SK3* csatornák szerepet játszanak a pitvari repolarizációban; ezen csatornák variánsai szorosan kapcsolhatók a humán pitvarfibrilláció érzékenységhez [477]. Az SK3 csatornák overexpressziója APD és AERP rövidüléshez vezet, ami elősegítheti reentry-k kialakulását az AF során [478]. Li és mts. már idézett eredményei szerint SK2 KO egerekben az APD megnyúlását követően is AF alakul ki, leginkább a fokozott trigger aktivitás (pitvari TdP) következtében. Kamrai SK csatornák aktivációja és némi hozzájárulása a repolarizációhoz szívelégtelenségben tűnik valószínűnek. Szívelégtelen nyúlmodellben, rekurrens VF-ban az SK blokád APD nyúláshoz és a VF leállásához vezetett [472]. A jelenséget heterogén I_{SK} upregulációval, illetve a magas $[Ca^{2+}]_i$ APD rövidítő hatása miatt fokozott késői (fázis 3) EAD-ok kialakulásával magyarázták; ezek szerint az I_{SK} aktiválódása mind a trigger, mind a szubsztrát oldal vonatkozásában aritmogén következményekkel járna. *Oki kapcsolat* létét azonban erősen megkérdőjelezi, hogy szívelégtelen kamrában nagymértékű I_{SK} növekedés mellett az AP megnyúlás mindössze 5% (?) volt. Az SK csatornák aktivációja a vezetési rendszer működését is befolyásolta. SK2 KO egér modellben PR intervallum megnyúlást és az AV sejtek APD megnyúlásához köthető bradycardiát hozott létre [136]. A csatornák overexpressziója fordított irányú változásokhoz és az AV nodális sejtek fokozott spontán aktivitásához vezetett. Hasonló egérmodellben az SK3 csatornák fokozott expressziója gyakran komplett AV blokkhoz és hirtelen halálhoz vezető súlyos bradycardiát okozott [475]. Az SK overexpressziós kísérletek szögesen ellentétes megfigyeléseinek oka nem világos.

Viszonylag sok adat található a pitvari SK csatornák farmakológiai modulációjának következményeit illetően. A csatornák gátlása apaminnal vagy UCL-1684-gyel fokozott AF készséget okozott [479]. Apamin alkalmazása AP alternánsok kialakulásához vezetett és nőtt a repolarizáció heterogenitása. Sokkal kevesebb kamrára vonatkozó adat érhető el. Szívelégtelen kamrában az I_{SK} gátlása apaminnal AP megnyúláshoz, fokozott triggerelt aktivitáshoz és TdP kialakulásához vezetett [473]. Ugyanakkor akut patkány infarktus modellben apamin alkalmazását követően a kamra aritmia-érzékenysége csökkent, a sérült területen az APD megnyúlt, az ERP megnőtt [480], azonban ezek az adatok is bizonytalanok, mivel az újabb gátlószerekkel kapott eredmények interpretációját változatlanul megnehezíti, hogy egyes antiaritmiás szerekhez (amiodaron, vernekalant, ranolazin) hasonlóan, vélhetően ezek a gátlószerek sem szelektívek. Pl. az a megfigyelés, hogy alkalmazásuk az APD *minimális* növekedése mellett (sőt, anélkül is) markáns AERP megnyúlást indukál, jelentős pitvari I_{Na} gátló hatásukra enged következtetni [481, 482]. Egy további fontos lehetőség vetődött fel Hancock és mts. mérései alapján, melyek apamin-érzékeny homomer SK2 csatornák mellett apaminra nem, UCL1684-re viszont érzékeny *heteromer SK2-SK3 csatornák* jelenlétét is igazolják egér pitvari szívizomsejtekben [483].

Összefoglalásul tehát leszögezhető, hogy bár potenciálisan igen fontos terápiás célpontot jelenthetnek, a kísérleti adatok *mennyiségének* növekedése ellenére a szívizomsejtek SK csatornáinak működésével kapcsolatos *bizonytalanság* csak mérsékelten csökkent. Az *SK csatorna „káosz”* feloldásához, a csatornák fiziológiás/patológiás szerepének, illetve farmakológiai profiljának tisztázásához további kísérletes munkára és jóval szelektívebb gátlószerekre van szükség.

dc_1149_15

6.1.2. Az akciós potenciál és az I_{K1} Ca^{2+}-függésének elemzése

Az I_{K1} létfontosságú repolarizáló áram, amely kitüntetett szerepet játszik a terminális repolarizációban és a nyugalmi potenciál stabilizációjában [77, 96]; mint ilyen, a szív repolarizációs tartalékának fontos eleme [96]. Mivel jónéhány egymással is kölcsönható szignálút – közülük több ismerten $[Ca^{2+}]_i$-érzékeny – konvergál az áramot létrehozó ioncsatornákon [63, 65, 80, 81, 92, 448], regulációja is komplex. Ugyanakkor az I_{K1} Ca^{2+}-függésére vonatkozó adatok meglehetősen ellentmondásosak. $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hatására az I_{K1}, és/vagy a Kir2.x csatornák gátlódtak [62, 63, 84], máskor az áram megnőtt [60, 65, 92, 484]. A kísérleti adatok szórásának oka a körülmények és/vagy az alkalmazott állatmodellek eltérése is lehet, bár az eredmények olykor még közel azonos körülmények között is különböznek. Az AP morfológiájának formálásában – különösen Ca^{2+} túlterhelés esetén – játszott kiemelkedő szerepére tekintettel vizsgálatunk elsődleges célja a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés I_{K1} moduláló hatásainak analízise volt, olyan kísérleti körülmények között, amikor további Ca^{2+}-érzékeny mechanizmusok kevésbé aktívak. Ennek érdekében a $Ca^{2+}{}_i$ emelkedést nem a szokásos adrenerg aktivációval, hanem multicelluláris preparátumokban a $[Ca^{2+}]_o$ emelésével, izolált sejtes kísérletekben pedig a $[Ca^{2+}]_i$ közvetlen modulációjával, pufferelt, illetve nem pufferelt Ca^{2+}-tartalmú pipettaoldatok alkalmazásával hoztuk létre. Bár a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése miatt több Ca^{2+}-függő szignálút aktiválódhat, ismereteink szerint a PKA/PKC jelutak ilyenkor nem működnek; így lehetővé válik adataink megbízható értelmezése. A következő kérdéseket vizsgáltuk: 1) Hogyan hat az AP-re a $[Ca^{2+}]_o$ növelése? 2) Hogyan változik izolált szívizomsejtekben az I_{K1} a $[Ca^{2+}]_i$ változások hatására? Hogyan modulálja multicelluláris szívpreparátumokban a $[Ca^{2+}]_i$ az AP-t? Van-e különbség e tekintetben a kutya és humán preparátumok között? Van-e mérhető különbség a dinamikus CaT és a steady state $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés által indukált AP változások között?

Az AP Ca^{2+}-függése. Meggyőző irodalmi adatok bizonyítják, hogy az AP morfológiájának kialakításában, valamint a szív fiziológiás adaptációs válaszaiban, csakúgy, mint patológiás körülmények között kialakuló elektrofiziológiai és strukturális átalakulásában, $[Ca^{2+}]_i$-függő mechanizmusok kritikus szerepet játszanak [49, 50, 52]. Szívelégtelenség vagy I/R során az AP morfológiájának $[Ca^{2+}]_i$-függő változásai szignifikánsan hozzájárulhatnak az aritmia hajlam fokozódásához. Ismert jelentőségük dacára a $Ca^{2+}{}_i$ homeosztázis zavarainak az AP morfológiájára gyakorolt hatásai máig nem tisztázottak. Ezt a tényt hangsúlyozzák Grandi és mts. [485], amikor leírják, hogy az AP kialakulásának fejlett matematikai modellje *sem képes* magyarázni a $[Ca^{2+}]_o$ és a QT intervallum hossza közötti inverz összefüggést. Az SL ioncsatornáinak funkcionális expresszióját és kapuzási paramétereit a $Ca^{2+}{}_i$ szintváltozások nemcsak direkt, hanem indirekt módon, különböző szignálutakon keresztül is befolyásolhatják. [99, 104, 448, 486, 487]. Adrenerg aktiváció során a PKA és PKC szintén képesek K^+ csatornák (I_{Kr}, I_{Ks}, I_{K1}) modulációjára [80, 81, 488-490]. A $Ca^{2+}{}_i$-indukált CaMKII aktiváció hatása sokszor átfedi a PKA vagy PKC aktiváció hatását. Mivel egyes ioncsatornákat a $Ca^{2+}{}_i$ közvetlenül is befolyásolhat, továbbá egy csatornaproteint sokszor a CaMKII, PKA és PKC egyaránt foszforilálhatja néhány K^+ áram többszintű szabályozással rendelkezik. A szabályozó mechanizmusok átfedése miatt az AP végső formáját számos, direkt és indirekt kölcsönhatásban álló modulációs hatás alakítja ki. Az $I_{Ca,L}$ és I_{NCX} nem kizárólag a $Ca^{2+}{}_i$ homeosztázis résztvevői, hanem a $Ca^{2+}{}_i$ változások membránpotenciál változásokká alakításában is szerepet játszanak. Az $I_{Ca,L}$ inaktiváció $[Ca^{2+}]_i$-függő gyorsulása, melynek következtében a plató fázis alatt a befelé irányuló áram csökken, nagyrészt önmagában is magyarázhatja az AP rövidülését [485]. A K^+ csatornák közül a miokardiumban is expresszálódó [132, 134] SK csatornák jelenthetnék a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás és AP repolarizációja közötti legközvetlenebb szabályozási utat, de fiziológiás szerepük – expressziójuk igazolása ellenére – nem tisztázott (lásd **6.1.1.** fejezet). Mivel a

dc_1149_15

$[Ca^{2+}]_o$ csökkenése után az I_{Ks} nő **[491]** és a PKA aktivációja is I_{Ks} emelkedéshez, továbbá frekvenciafüggő APD rövidüléshez vezet, elvileg az I_{Ks} is közvetítheti a $[Ca^{2+}]_i$ változásait az AP-ra. **[489, 492]**. Végül, a Ca^{2+}-aktivált Cl^- áram is hozzájárulhat az AP Ca^{2+}-indukált adaptációjához, de szerepének vizsgálatát megnehezíti a szelektív gátlószerek hiánya. Mivel mindezek az áramok egyidejűleg is aktiválódhatnak, a Ca^{2+}-indukált AP adaptáció komplex folyamat, melyben az egyes áramok szerepének szétválasztása szinte lehetetlen.

Az I_{K1} $[Ca^{2+}]_i$-függése szívizomsejtekben. Az I_{K1} $[Ca^{2+}]_i$-függését a patch clamp technika egészsejtes konfigurációjában vizsgáltuk kutya kamrai szívizomsejtekben, négy kísérleti csoportban. Először, a steady state I_{K1} jellemzése céljából, meghatároztuk a Ba^{2+}-szenzitív áramot (20. ábra). Másodszor, AP clamp módszerrel mértük az I_{K1} változásait (21. ábra). Harmadszor a nem pufferelt $[Ca^{2+}]_{pip}$ emelésének a steady-state I_{K1}-re kifejtett hatását vizsgáltuk (22. ábra), végül a negyedik kísérletsorozat célja a $Ca^{2+}{}_i$-függő I_{K1} aktiváció háttérmechanizmusának tisztázása volt (23. ábra). Kísérleti eredményeink – az alkalmazott módszertől függetlenül – igazolják az I_{K1} I - V összefüggésének markáns eltolódását a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hatására. A mérések során a Ba^{2+}-függő áramként meghatározott I_{K1} szignifikánsan nőtt a -70mV és -40 mV közötti membránpotenciál tartományban (20-22. ábrák); ezt a növekedést a fokozott CaMKII aktivitás hozta létre. Izolált szívizomsejteken kapott eredményeink megerősítik a korai, Purkinje rostokon végzett mérések eredményeit, melyek szerint a $[Ca^{2+}]_o$ emelését követően az I_{K1} nő és az AP rövidüléséhez is fokozott mértékben járul hozzá **[65]**. Adataink szintén támogatják a hipoxia-indukált AP rövidülés mechanizmusára vonatkozó megfigyeléseket, melyek szerint, néhány más $[Ca^{2+}]_i$-modulált áram ($I_{Ca,L}$, I_{NCX}, I_{Cl}) változásával együtt a $[Ca^{2+}]_i$-függő I_{K1} növekedés is hozzájárul a rövidülés korai fázisának kialakulásához **[91, 92, 493]**. Ugyanakkor kísérleti eredményeink – melyek szerint a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése egyértelműen *növeli* az I_{K1}-et – ellentmondanak néhány hasonló vizsgálat megfigyeléseinek **[63, 80, 84-86]**. Az első három esetben az ellentmondás magyarázható az általuk használt afiziológiás kísérleti körülményekkel. Zaza és mts. **[86]** vizsgálataiban a $[Ca^{2+}]_i$ csökkentése növelte az I_{K1}-et, de ez a növekedés (és az isoproterenol-indukált I_{K1} csökkenés) kizárólag az AP *plató fázisának* megfelelő potenciáltartományban jött létre, a terminális repolarizáció kinetikája nem változott, ami ellentmond az I_{K1} vélt domináns szerepének. Végül Fauconnier és mts. kísérleti adatai **[80]** is értelmezhetők eltérő módon. Ők az I_{K1} szívelégtelenségben megfigyelt csökkenését az SR fokozott diasztolés szivárgása következtében kialakuló elsősorban a mérsékelt $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedésnek tulajdonították. Az NCX fokozott és a SERCA2 egyidejűleg csökkent aktivitása miatt azonban ezekben a sejtekben jelentős intracelluláris Ca^{2+} vesztés **[494]**, valamint a szisztolés $Ca^{2+}{}_i$ szint szignifikáns csökkenése jön létre, ezért igen valószínűnek tűnik, hogy a Kir2.x csatornákat aktiváló $[Ca^{2+}]_i$ ugyancsak erősen csökkent.

Ca^{2+}-indukált AP morfológia változások multicelluláris preparátumokban. Az AP *mérsékelt* változásai multicelluláris preparátumban megbízhatóbban mérhetők, ezért a kísérleteket papilláris izmokon is elvégeztük. Az adrenerg aktiváció elkerülése céljából a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedését a $[Ca^{2+}]_o$ növelésével, azaz a Ca^{2+} beáramlás fokozásával biztosítottuk; ekkor a Ca^{2+} ciklus autoregulációja miatt [4] az egyensúlyi $[Ca^{2+}]_i$ is megnő, ami nagyobb CaT-ek kialakulásához vezet. A 24. ábra /A,B paneleken látható, hogy 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ alkalmazása után a CaT-ek amplitúdója szignifikánsan nő, míg a $[Ca^{2+}]_{iD}$ csak minimálisan emelkedik. Hipotézisünknek megfelelően **[58]** a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ az APD-t kutya (24. ábra /C,D) és humán (26. ábra /A,B) papilláris izmokban is markánsan rövidítette, ami közvetlen bizonyítéka a befelé, illetve kifelé irányuló áramok egyensúlyában létrejött szignifikáns $[Ca^{2+}]_i$-in dukált eltolódásnak. A membránpotenciál-változások sebességét elemezve nyilvánvaló, hogy a magasabb $[Ca^{2+}]_i$ hatására a dV/dt_{max} (a repolarizáció sebességindexe) – valószínűleg a nagyobb kifelé, és/vagy kisebb befelé irányuló áramok

dc_1149_15

miatt – a terminális repolarizáció fázisában szignifikánsan nőtt (24. ábra /D és 26. ábra /C). Fontos megjegyezni, hogy a 24. ábrán összegzett kísérletekben az AP-ket mindig először 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett regisztráltuk, és ezt követően került sor 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ jelenlétében a mérésre. Mivel a szövetminták instabilitása esetén a rögzített sorrend szisztematikus hibához vezethet, időkontroll méréseket is végeztünk; a 60 perces kontroll periódus során sem az AP morfológiájában, sem az APD_{90}-ben nem kaptunk szignifikáns változást.

A $[Ca^{2+}]_o$ emelése fokozta az AP háromszögesedését is: az APD_{25} erősebben rövidült, mint az APD_{90}. Elvileg az AP komplex Ca^{2+}-függése miatt a háromszögesedés fokozódása és csökkenése egyaránt elképzelhető, mivel aktuális értékét több $[Ca^{2+}]_i$-függő és -független ionáram (I_{Ca}, I_{NCX}, I_{Kr}, I_{Ks}, I_{K1}) változásai is befolyásolhatják, továbbá a $Ca^{2+}{}_i$ emelkedés az interakciót is fokozhatja. Az AP háromszögesedés I_{K1} növekedés-indukált emelkedését magyarázhatja, hogy magas $[Ca^{2+}]_i$ mellett a $I_{Ca,L}$ csökken (azaz az APD_{25} rövidül), viszont az $_{fwd}I_{NCX}$ vélhetően nő, ezért az APD_{90} időtartományában a depolarizáló áram is nő. Az LTC csatornák felgyorsult Ca^{2+}-függő inaktivációja az AP plató fázisa alatt a magas $[Ca^{2+}]_i$ AP rövidítő hatásának ismert mechanizmusa **[92]**, melyet eredményeink is igazolnak **[485]**. Az AP terminális fázisában az LTC csatornák már inaktívak, ezért a terminális repolarizáció 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett megfigyelt $BaCl_2$-indukált sebességnövekedésének és a fokozott AP háromszögesedésnek az oka vélhetően egy másik mechanizmus, leginkább a megnőtt I_{K1} fokozott hozzájárulása lehet.

A megemelt $[Ca^{2+}]_i$ APD moduláló hatásának további lehetséges magyarázata – különösen, ha az APD rövidüléssel egyidejűleg a plató potenciál is emelkedik – a késői repolarizáló K^+ áramok növekedése. Elvileg az I_{K1} mellett a késői egyenirányító K^+ áram mindkét komponense (I_{Kr} and I_{Ks}) is gyorsíthatja a terminális repolarizációt. Ezért megvizsgáltuk a késői egyenirányító áramok szerepét a $Ca^{2+}{}_i$ indukált APD rövidülésben. Multicelluláris mintákban magas $[Ca^{2+}]_o$ mellett szelektív I_{Kr} gátlás (dofetilid, 0.3 µM) nem okozott APD megnyúlást, ugyanakkor a dofetilid APD nyújtó hatása szignifikánsan csökkent (29. ábra /A,C,D); ezzel szemben I_{Ks} szelektív (HMR-1556, 0.5 µM) gátlását követően az APD megnyúlása mind normál, mind emelt $[Ca^{2+}]_o$ mellett elhanyagolható volt (29. ábra /B,C). Az a tény, hogy $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése esetén a dofetilid kisebb APD megnyúlást hozott létre, kizárja a Ca^{2+}-függő I_{Kr} növekedés szerepét. Az I_{Kr} gátlás csökkent hatékonysága magyarázható a magas $[Ca^{2+}]_i$ APD rövidítő hatásával **[495]**, ami lerövidíti a késői egyenirányító áramok aktivációs időtartamát. Mindazonáltal, a magas $[Ca^{2+}]_i$ direkt APD rövidítő hatása csak részben magyarázza a dofetilid kisebb hatását, mivel a mérsékelt APD rövidülés nem indokolhatja az APD megnyúlás $BaCl_2$-indukált fokozódását. Az I_{Kr} blokád csökkent APD nyújtó hatásának alternatív magyarázata szerint a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés következtében megnőtt repolarizációs tartalék miatt nőhet más kifelé irányuló áramok (pl. I_{K1}) hozzájárulása is. Akármelyik magyarázat helyes, eredményeink igazolják Grandi modelljének egyik fontos következtetését, amely szerint a késői egyenirányító áramok repolarizációt gyorsító képessége magas $[Ca^{2+}]_i$ esetén jelentősen csökken **[485]**.

Az I_{Kr} és I_{Ks} áramokkal kapott negatív eredményekkel szemben az I_{K1} szelektív gátlásának APD nyújtó hatását a $[Ca^{2+}]_i$ emelése kutya, és humán papilláris izmokban is jelentősen fokozta (26-27. ábrák). Az eredmények igazolják azt a feltételezést, amely szerint $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés esetén, adrenerg aktiváció hiányában is szignifikánsan nő az I_{K1} részesedése az AP repolarizációjában, azaz a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés a repolarizációs tartalékon belül az áramok jelentős redisztribúciójához vezet. Végül meg kell jegyezni, hogy a Ca^{2+}, kétértékű ion lévén, nagymértékben hozzájárul a szarkolemmán lokalizált felületi töltéshez (Frankenhaeuser-Hodgkin hatás), ezért a $[Ca^{2+}]_o$ változása ílymódon is befolyásolhatja a ioncsatornák kapuzási paramétereit. A lehetőség kizárására úgy is megvizsgáltuk az I_{K1}

dc_1149_15

Ca^{2+}-függését, hogy a külső oldatban a kétértékű ionok (Ca^{2+} és Mg^{2+}) összkoncentrációját a kísérlet időtartama alatt állandó szinten tartottuk. A Ba^{2+} indukált áram csökkenése a mérési körülmények módosítása esetén jóval nagyobb volt magas $[Ca^{2+}]_o$ jelenlétében.

Ca^{2+}-indukált I_{K1} változások – kutya vs. humán. A 25. és 26. ábrák összehasonlítása alapján nyilvánvaló, hogy a $BaCl_2$ hatása az APD-re, valamint a terminális repolarizáció sebességére jóval kisebb humán, mint kutya multicelluláris preparátumokban, olyannyira, hogy humán mintákban 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ mellett 10 µM $BaCl_2$ *egyáltalán nem nyújtotta* az APD-t. Ez a jelentős különbség vélhetően az I_{K1} szignifikánsan kisebb hozzájárulásának következménye. A hipotézist korábbi vizsgálatunk eredményei is alátámasztják, melyek szerint a repolarizációs tartalékban az I_{Kr} részesedése szignifikánsan nagyobb humán, mint kutya kamrai szívizomban, továbbá, valószínűleg nem kis részben a sokkal kisebb I_{K1} miatt, humán szívizomban a teljes repolarizációs tartalék is jóval kisebb **[496]**. Ezek a megfigyelések indokolhatják a mérsékelt Ba^{2+} hatást, a Ba^{2+}-függő áram kisebb mértékű Ca^{2+}-indukált növekedését, illetve a repolarizáció mérsékelt sebességét humán mintákban.

A triangulációs paraméterekben talált különbségek kialakulásához a humán szívizomban jóval gyengébb I_{K1} és más repolarizáló K^+ áramok is hozzájárulhatnak. A humán mintákban mind alacsony, mind magas $[Ca^{2+}]_o$ jelenlétében tapasztalt magasabb kontroll triangulációs értékek elsődleges oka a szignifikánsan kisebb repolarizációs hajtóerő lehet. Ez magyarázhatja a $BaCl_2$ AP triangulációra gyakorolt szignifikánsan alacsonyabb hatását is a humán mintákban.

Az I_{K1} „multifaktoriális" szabályozása. Jelentős $[Ca^{2+}]_i$-függésén kívül az I_{K1} érzékeny a csatornaprotein foszforilációs/defoszforilációs állapotát befolyásoló tényezőkre is – ismert, hogy bár a PKA, PKC és CaMKII egyaránt modulálhatja, mindhárom enzim szerepe más. Adrenerg stimuláció során a PKA **[81]** és PKC **[80]** csökkentheti az I_{K1} nagyságát; ezzel szemben akut CaMKII aktiváció növelte az áramot **[448]**. Logikusnak tűnik, hogy az APD aktuális körülményekhez történő adaptációjának elősegítésére az elkülönülő modulációs jelutak (PKA, PKC, CaMKII és $[Ca^{2+}]_i$) egyidejűleg hatva a Kir2.x csatornákra, közösen finomhangolják az I_{K1} amplitúdóját. Eredményeink támogatják azt az elképzelést, hogy intakt szívszövetben, az adrenerg stimuláció távollétében, magas $[Ca^{2+}]_i$ esetén az I_{K1} aktivációjában elsődleges a CaMKII hatása **[448]**. A PKA és PKC szimpatikus aktivációja más ionáramok ($I_{Ca,L}$, I_{Ks}, I_{Cl}) befolyásolásával jelentős szerepet játszik az AP formájának kialakításában **[497]**, de esetleges I_{K1} gátló hatásuk, a repolarizációs tartalék csökkentése és a nyugalmi membránpotenciál depolarizációja miatt súlyos aritmogén következményekkel is járhat. Az egyidejű $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés és CaMKII aktiváció, a PKA/PKC indukált I_{K1} csökkenés behatárolásával és ellensúlyozásával végső soron növelheti az I_{K1} mértékét, illetve az AP normalizálásával megelőzheti az aritmogenezist. Eltérő kísérleti körülmények és/vagy patológiás állapotok (szívelégtelenség) az ellentétes irányú hatások egyensúlyának megbomlásával és az I_{K1} amplitúdó számottevő csökkenésével járhatnak. Ez a felismerés elősegítheti az I_{K1} $Ca^{2+}{}_i$-érzékenységével kapcsolatos eltérő eredmények értelmezését.

Limitációk. Mivel az I_{K1} összetett áram, melyet különböző típusú, még nem egyértelműen azonosított csatornák hoznak létre, aktuálisan meghatározott nagysága *jelentősen függhet* az alkalmazott kísérleti körülményektől.

I_{K1} vs. Ba^{2+}-érzékeny áram. A korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan az I_{K1}-et mi is a 10 µM $BaCl_2$-ra érzékeny áramként definiáltuk. Ebben a dózisban a Ba^{2+} igazoltan nem fejt ki mérhető hatást a többi repolarizáló áramra (I_{to}, I_{Kr}, I_{Ks}) **[96]**. Ugyanakkor, nagyon kevés információval rendelkezünk a Ba^{2+} háttér (szivárgó) **[498]**, illetve a K_{Ca} csatornákra gyakorolt hatásairól. Mindezekért az I_{K1} szignifikáns Ca^{2+}-függése nem köthető egyetlen

dc_1149_15

csatornatípushoz, továbbá nem zárható ki az esetleg jelenlévő, apaminra nem érzékeny SK csatornák aktiválódásának lehetősége sem **[499]**; legalábbis részben, ezek is felelősek lehetnek a repolarizációs kinetika Ca^{2+} függéséért. Az AP komplex viselkedése és erősen nemlineáris karaktere miatt a Ba^{2+}-érzékeny, és más áramok relatív részesedése a magas $[Ca^{2+}]_i$ által indukált APD változásokban nem igazán megjósolható; a kérdés megfelelő tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

Alacsony vs. magas $[Ca^{2+}]_i$. Általánosan elfogadott, hogy a patch clamp mérések során a pipettaoldat ionkoncentrációi hamar egyensúlyba kerülnek a citoszol ionkoncentrációival. Ez a feltételezés egyértékű ionokra nagyon valószínű, de nem feltétlenül igaz a $[Ca^{2+}]$-ra. Néhány lehetséges magyarázat: (1) a $Ca^{2+}{}_i$ eloszlás magas térbeli/időbeli heterogenitása; (2) ennek következtében az „átlagos $[Ca^{2+}]_i$" hiánya; (3) a kétértékű ionok lassú diffúziója; (4) a celluláris Ca^{2+} transzporterek heterogén térbeli eloszlása és időbeli aktivitása. Következésképpen, a jelentősen leegyszerűsített értelmezésű $[Ca^{2+}]_i$ mégsem lesz azonos az aktuális $[Ca^{2+}]_{pip}$ értékkel, bár vélhetően nem tér el túlságosan attól. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy néhány esetben – magas $[Ca^{2+}]_{pip}$ mellett – megfigyelhető volt a szívizomsejtek kisebb kontraktúrája, ami valószínűsíti a $Ca^{2+}{}_i$ szint jelentős emelkedését.

Steady-state $[Ca^{2+}]_i$ vs. $[Ca^{2+}]_i$ tranziens. Kísérleti adataink egyértelműen igazolják, hogy a membránpotenciál változásain kívül az I_{K1}-et a magas $[Ca^{2+}]_i$ is aktiválja. Elvileg ez az aktiváció létrejöhet közvetlenül, a magas lokális $[Ca^{2+}]_i$ által indukálva, vagy közvetve, $[Ca^{2+}]_i$-aktivált szignálutakon keresztül. A $[Ca^{2+}]_i$-indukált I_{K1} növekedésben nemcsak a tartós $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés, hanem az AP-indukált CaT is szerepet játszhat. Bár a CaT és az I_{K1} eltérő kinetikája a szívciklus alatt látszólag ellentmond ennek a feltételezésnek, fontos hangsúlyozni, hogy az I_{K1} aktivációja nem feltétlenül azonnali. Amennyiben közvetett, létrejöhet a tranziens csúcsához képest némi késéssel is. Eredményeink támogatják az I_{K1} CaMKII-mediált, közvetett aktivációjának lehetőségét, de további szignálmechanizmusok hozzájárulását sem lehet kizárni. Jelenleg a $[Ca^{2+}]_i$ tranziens közvetlen közreműködésére nincsen közvetlen bizonyítékunk, csak néhány támogató érvünk: (1) A $[Ca^{2+}]$ nagymértékű térbeli/időbeli heterogenitása miatt „átlagos" $[Ca^{2+}]_i$ a szívizomsejtekben nem alakulhat ki. A funkcionális heterogenitás mértékére a lokális Ca^{2+} mozgások hatása valószínűleg jóval nagyobb, mint az általánosan használt, Ca^{2+}-érzékeny fluoreszcens festékekre alapozott módszerekkel nyert adatok alapján tűnik, és szignifikánsan módosíthatja bármely Ca^{2+}-függő folyamat, vagy enzim *lokális* aktivitását. (2) Nagy emlősökben (beleértve az embert is) a szívciklus alatt az átlagos lokális $[Ca^{2+}]_i$ szükségszerűen jóval magasabb aktív (amikor *mind az AP, mind a CaT* kialakul), mint inaktív szívizomsejtekben (amikor a $[Ca^{2+}]_i$ tartósan a diasztolés szint közelében van). Ez a megállapítás különösen érvényes az ioncsatornákat körülvevő szubmembrán régióra. (3) Növekvő szívfrekvencia esetén a $[Ca^{2+}]_i$ tranziens nagysága, továbbá a végdiasztolés $Ca^{2+}{}_i$ szint emelkedik. (4) Adataink támogatják a CaMKII aktiváció szerepét a $[Ca^{2+}]_i$ -indukált I_{K1} emelkedésben. A CaMKII, vagy bármely más Ca^{2+}-függő szignálút késleltetett aktiválódása elfogadható magyarázatot adhat az áram általunk is megfigyelt késleltetett emelkedésére. Analóg mechanizmus figyelhető meg a mitokondriális enzimek Ca^{2+}-indukált aktivációja során.

6.2. Miért nincs az NCX gátlásnak jelentős hatása a $Ca^{2+}{}_i$ háztartásra és a kontraktilitásra egészséges kutya és humán szívizomban?

6.2.1. A „klasszikus" koncepció: NCX gátlás = markáns pozitív inotróp hatás

A szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} háztartásában az NCX elsődleges feladata a citoszol, s ezen keresztül az SR Ca^{2+} tartalmának egyensúlyban tartása, s ezáltal a CaT stabilizálása

dc_1149_15

és optimalizálása. Ennek a feladatnak az NCX az LTC csatornák aktivációja során a sejtbe áramló (trigger) Ca^{2+} eltávolításával tesz eleget. A „klasszikus" elképzelés szerint ebből következően az akut, részleges NCX gátlást (teljes gátlás a sejt pusztulásához vezetne) fokozatos $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésnek kell követnie, mindaddig, míg a megnőtt $[Ca^{2+}]_{i\ fwd}$NCX transzport gyorsító hatása – az NCX direkt Ca^{2+}-függő aktiválásán keresztül – kompenzálja a gátolt transzportermolekulák kieséséből adódó transzportcsökkenést. A modell szerint a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ és a SERCA2/NCX arány eltolódása a $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedéséhez vezet, a megnőtt $[Ca^{2+}]_i$ *és* $[Ca^{2+}]_{SR}$ pedig – amennyiben az SR-ből felszabaduló *Ca^{2+} frakció* nagysága nem változik – szükségszerűen növeli a CaT amplitúdóját és a $[Ca^{2+}]_{iD}$-t; a változások eredményeképpen kialakuló pozitív inotróp hatás pedig biztosítja a miokardium kontraktilitásának jelentős fokozódását. Farmakoterápiás szempontból ez a mechanizmus kiemelkedő jelentőségű lehet a $[Ca^{2+}]_{SR}$ és CaT amplitúdó csökkenésével jellemezhető szívelégtelenségben, mivel a szelektív NCX gátlás jótékony, pozitív inotróp hatása nagymértékben javíthatná a szív gyengült pumpafunkcióját. A legelső NCX gátlók kifejlesztésének fő célja a pozitív inotróp hatás elérése volt; ha a fenti hipotézis teljesülne, a rendkívül veszélyes szívglikozid terápia régen időszerű kiváltásával vagy kiegészítésével lehetővé válna az elégtelen pumpateljesítmény hasonló mértékű, de jóval veszélytelenebb módon történő növelése. A feltételezések szerint ugyanis a szívglikozid terápiával szemben az NCX gátlásnak nem lehetnek aritmogén következményei, mivel a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$, még a spontán, sztochasztikus Ca^{2+} felszabadulási események (sparkok) számának fokozódása esetén sem okozhat szignifikáns SL depolarizációt, vagy DAD aktivitást, mivel ezek elsődleges forrása, a $_{rev}$NCX aktivitás ilyenkor gátolt.

6.2.2. A valóság: NCX gátlás ≠ markáns pozitív inotróp hatás

Az eredmények a fenti, logikusnak látszó hipotézist nem támogatják: az NCX viszonylag magas szintű *akut* gátlását követően általában *nem jön létre markáns pozitív inotróp válasz*. Kutya és tengerimalac sejtekben a kontraktilitás *nem változik, esetleg csökken* **[284, 413]**, *patkány és egér szívizomsejtekben pedig szignifikánsan nő ugyan, de a vártnál jóval kisebb mértékben* **[235, 283]**. Sőt, ami még ennél is meglepőbb: egerekben a szívben expresszálódó NCX majdnem teljes KO-ja sem járt súlyos funkcionális következményekkel, mivel az I_{NCX} ~ 80%-os csökkenését egyéb iontranszporterek, elsősorban az LTCC aktivitásának adaptációs változásai kompenzálják **[289, 290]**. A részleges NCX gátlás *akut* hatásaival kapcsolatos további fontos megfigyelés annak nagymértékű species függése: detektálható változás kutyában és tengerimalacban *nincs*, egérben és patkányban *van* – bár a vártnál kisebb. Mivel a jelentős pozitív inotróp válasz hiányának részletes, mechanizmus szintű magyarázata nem állt rendelkezésre és az irodalmi adatok is ellentmondtak egymásnak, *két kísérletsorozatban* megvizsgáltuk az NCX gátlás következményeit izolált *kutya és patkány* kamrai sejtekre. Ezenkívül *kontroll* körülmények között *későbbi kísérleteink során* is elemeztük az NCX gátlás hatását az aktuálisan vizsgált multicelluláris preparátumok és/vagy izolált szívizomsejtek $Ca^{2+}{}_i$ háztartására, egyes elektrofiziológiai paramétereire és kontraktilitására. Kísérleti eredményeink *egyrészt* megerősítették az irodalmi adatokat; igazoltuk, hogy kutya kamrai szívizomsejtekben a közel szelektívnek tekinthető SEA0400 által indukált részleges NCX blokád hatására *nem változik* a CaT nagysága, és ebből következően a kontraktilitás. Ezzel szemben patkány szívizomsejtekben szignifikánsan, *de mérsékelten* nő a CaT és a kontraktilitás is. Kísérleti eredményeink újabb információkat szolgáltattak a lehetséges háttérmechanizmusokra vonatkozóan is. Későbbi vizsgálataink egyrészt megerősítették fenti megfigyeléseinket, másrészt új információkat is szolgáltattak: egyrészt az NCX gátlás akciós potenciálra gyakorolt hatásaival, másrészt az új, a

dc_1149_15

SEA0400-nál szelektívebb NCX gátlószer – az ORM-10103 - (ennek következtében, a nagyobb mértékű NCX gátlás) hatásaival kapcsolatban.

Eredményeink nagyrészt támogatják a KB-R7943 **[272, 278, 279]**, illetve SEA0400 **[276, 283]** alkalmazásával nyert korábbi adatokat, ugyanakkor ellentmondanak Hobai és mts. kutya szívizomsejtekből *XIP* alkalmazását követően nyert megfigyeléseinek **[221]**, melyek szerint ~27% NCX gátlás ~50% szisztolés $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést indukált. Az ellentmondás vélhetően a SEA0400 farmakológiai tulajdonságainak tulajdonítható, specifikusan annak, hogy egyrészt nagyobb mértékben gátolja az reverz, mint a forward irányú transzportaktivitást, másrészt mérsékelt $I_{Ca,L}$ gátló hatással is rendelkezik. Fontos hangsúlyozni, hogy későbbi méréseink során a szelektívebb, az $I_{Ca,L}$-t *nem gátló* ORM-10103 hatása a $[Ca^{2+}]_i$-re és a kontraktilitásra lényegében megegyezett a SEA0400 hatásaival. Ennek következtében jóval valószínűbbnek tűnik az eltérések másik lehetséges oka, mégpedig az, hogy a szívelégtelen szívekből származó sejtek válasza az (ilyenkor jelentősen fokozott) NCX aktivitás gátlására lényegesen eltér az egészséges szívizomsejtek válaszától.

6.2.3. Miért *nincs* pozitív inotróp hatás kutya (és humán) kamrai szívizomsejteken

Hogy az alkalmazott NCX gátlószerek miért nem növelik nagyobb emlősök (kutya, nyúl, ember) és a tengerimalac kamrai szívizomsejtjeinek kontraktilitását, jelenleg nem ismert.
A várt $Ca^{2+}{}_i$/CaT emelkedés, illetve markáns pozitív inotróp válasz elmaradásának okára *több, elvileg eltérő* magyarázat adható, különböző lehetséges háttérmechanizmusokkal:

(1) A gátlószer (SEA0400) nem specifikus (pleiotróp) hatása a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységére és/vagy az SR Ca^{2+} fluxusaira

(2) A használt inhibitor (SEA0400) gátlási hatékonyságának $[Ca^{2+}]_i$-függő csökkenése

(3) A gátlás közel zéró nettó hatása az SL Ca^{2+} fluxusokra, aminek lehetséges oka:

- az $I_{Ca,L}$ NCX-függő modulációja és a gátlás $[Ca^{2+}]_i$ függése
- a ${}_{rev}I_{NCX}/{}_{fwd}I_{NCX}$ egyensúly módosulása a gátlást követően
- magas *NCX* proteinsűrűség, vagy más NCX- és/vagy SR-független mechanizmusok
- a load LTC csatornák trigger LTC csatornáknál kisebb aktivitása/nagyobb gátlása
- az SL *Ca^{2+} fluxusainak* viszonylag korlátozott szerepe az EC-csatolásban

(4) Mindezen faktorok valamilyen komplex, sokváltozós kombinációja

(5) Egyéb, jelenleg még ismeretlen mechanizmus(ok)

Fontos hangsúlyozni, hogy bármely háttérmechanizmus kismértékű, de kompenzálatlan eltolódása magyarázhatja az NCX gátlás következményeinek species-függését, azaz hogy a nagy emlős sejtekre jellemző stabil $Ca^{2+}{}_i$ egyensúly kis emlős sejtekben eltolódik.

1) A SEA0400 közvetlen, nemspecifikus hatása az SR Ca^{2+} fluxusaira és a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységére. Mivel a vizsgálatokat a korlátozott szelektivitású SEA0400 alkalmazásával végeztük, elsőként megvizsgáltuk, van-e a gátlószernek *direkt* hatása az SR Ca^{2+} fluxusaira. Eredményeink szerint a SEA0400 3 µM-nál alacsonyabb koncentrációban *nem változtatja meg a RyR-ok konduktanciáját, sem kapuzási kinetikáját*, s így nem befolyásolja az SR Ca^{2+} kibocsátását, sem Ca^{2+} visszavételét (33. ábra); ezek fluxusát a külső és belső Ca^{2+} koncentrációk determinálják. Ezzel párhuzamosan azt is igazoltuk, hogy a SEA0400 a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenységét sem módosítja (34. ábra). Ezek az eredmények, illetve az a megfigyelés, hogy a gátlás következtében a CaT nagysága és kinetikája nem változik, egyértelműen igazolják, hogy a SEA0400-nak *nincs mérhető hatása* az SR Ca^{2+} transzportjára kutya kamrai szívizomsejtekben. Mivel a

dc_1149_15

SEA0400 0.3 µM koncentrációban a transzmembrán áramokat sem módosította [236] , az eredmények a részleges, szelektív NCX gátlás szívizomsejtekre gyakorolt hatását illetően reprezentatívnak tekinthetők. Ugyanakkor hangsúlyozni kell, hogy 0.3 µM SEA0400 alkalmazása esetén, elsősorban magas (1 µM körüli) $[Ca^{2+}]_i$ esetén, az NCX gátlás mértéke viszonylag alacsony. Ezért is fontosak újabb eredményeink, melyek a 10 µM ORM-10103 által létrehozott jóval erőteljesebb gátlás mellett is megerősítették megfigyeléseinket.

2) A SEA0400 gátlási hatékonysága $[Ca^{2+}]_i$-függően csökken. Irodalmi adatok és saját méréseink [236] szerint 1 µM SEA0400 alacsony (~ 100 nM) $[Ca^{2+}]_i$ mellett a $_{fwd}I_{NCX}$ több, mint 50%-át blokkolja. Ez a szignifikáns gátló potenciál magyarázza a nagymértékű $[Ca^{2+}]_i$ felhalmozódással, megnőtt CaT-sel és markáns pozitív inotróp válasszal kapcsolatos várakozásokat. A kutya szívizomsejteken végzett mérések során az is nyilvánvalóvá vált – és a negatív eredmények egyik okát képezheti – hogy a SEA0400 NCX-gátló hatékonysága erősen függ az aktuális Ca^{2+}_i szinttől. A $[Ca^{2+}]_i$-t ~55 nM-ról ~1 µM-ra (szisztolés szintre) emelve, a gátlás mértéke csaknem felére, ~28%-ra csökkent. Mivel a szubszarkolemmális térben a $[Ca^{2+}]_i$ sokkal magasabb (5-10 µM) értéket is elérhet, fiziológiás körülmények között a SEA0400 *átlagos* gátlási hatékonysága ennél is lényegesen alacsonyabb lehet. Ezt a feltételezést saját kísérleti eredményeink ugyancsak alátámasztják. A SEA0400 által indukált NCX gátlás a $[Ca^{2+}]_i$ szisztolés szint közelébe történő emelése esetén markánsan csökkent hatékonysága leolvasható a 32. ábráról. A csökkent gátlási hatékonyság legvalószínűbb oka vélhetően a *nem gátolt kicserélő molekulák fokozott Ca^{2+}_i-függő aktivációja* következtében szignifikánsan megemelkedő $_{fwd}$NCX transzportaktivitás.

3) A SEA0400 zéró nettó hatása a transzmembrán Ca^{2+} transzportra. Mivel a SEA0400 a mérések szerint nem befolyásolja az SR Ca^{2+} fluxusait, a gátlás-indukált kontraktilitás-fokozódás elmaradására az a hipotézis adhat elfogadható magyarázatot, amely szerint a transzmembrán Ca^{2+}_i mozgások gátlás következtében kialakuló ellentétes irányú változásai tartósan kiegyenlítik egymást. A transzport – a gátlás pillanatnyi mértékétől független – egyensúlyát – külön-külön, vagy együttesen – több háttérmechanizmus is biztosíthatja.
A) A $_{rev}I_{NCX}/_{fwd}I_{NCX}$ egyensúly gátlást követő eltolódása: Az a megfigyelés, hogy fiziológiás körülmények között a jelentős mértékű $_{fwd}I_{NCX}$ gátlást követő Ca^{2+} kiáramlás-csökkenés nem hoz létre nettó $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést, a $_{rev}I_{NCX}/_{fwd}I_{NCX}$ *arány* dinamikus adaptációjával is magyarázható. Elvileg ez az adaptáció vagy a $_{rev}I_{NCX}$ egyidejű csökkenésének lehet következménye (mérséklődik a depolarizáció alatti Ca^{2+}_i emelkedés), vagy annak, hogy a nem gátolt $_{fwd}I_{NCX}$ frakció kellően nagy a fiziológiás relaxációhoz szükséges $_{fwd}Ca^{2+}$ fluxus biztosításához; a két mechanizmus egyidejűleg is aktív lehet. Az első lehetőséget támogató irodalmi adatok [243] – és saját eredményeink (32. ábra) – szerint a SEA0400 $_{rev}$NCX gátló hatása kissé nagyobb, mint $_{fwd}$NCX gátló hatása. Ennek következtében a gátlást követően a Ca^{2+} beáramlás akut csökkenése valamivel nagyobb lehet az eltávolítás csökkenésénél.
A második lehetőséget támogathatja viszont az a logikus, de kísérletesen nem vizsgálható hipotézis, mely szerint részleges NCX gátlást követően a nem gátolt NCX molekulák *környezetében megemelkedő lokális* $[Ca^{2+}]_{sm}$ *direkt* aktiváló hatása miatt a nem gátolt transzporter molekulák forward transzportfluxusának növekedése a $_{rev}I_{NCX}$ transzportfluxus párhuzamos csökkenésével *együtt* biztosítja a $[Ca^{2+}]_i$ változatlan szinten tartását.

B) Az $I_{Ca,L}$ NCX-függő modulációja és a gátlás $[Ca^{2+}]_i$ függése: A kísérleti adatok szerint NCX gátlószer alkalmazását követően az LTC csatornák árama csökken [235], sőt, a génmanipulált egereken végzett kísérletek tanulsága szerint ez a csökkenés igen nagymértékű (~80%) is lehet [289, 290]. (Fontos hangsúlyozni azonban, hogy a KO kísérletekben az $I_{Ca,L}$ *adaptív csökkenése nem akut gátlást követően* – azaz viszonylag gyorsan – hanem jóval lassabban, több nap alatt alakul ki). Elvileg az $I_{Ca,L}$ akut csökkenése

dc_1149_15

mögött két mechanizmus állhat. Egyrészt lehetséges, hogy az áramcsökkenés a gátlószer *$I_{Ca,L}$-re kifejtett direkt, pleiotróp hatásának* következménye; másrészt az $I_{Ca,L}$ csökkenés *indirekt* oka az LTC csatornák környezetében a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel párhuzamosan megnőtt $[Ca^{2+}]_{sm}$ gátló feedback hatása is lehet. A gátlószer $I_{Ca,L}$-re kifejtett jelentős *direkt* mellékhatásának ellentmond (bár cáfolatnak elégtelen) a megfigyelés, hogy az akut gátlást követő $I_{Ca,L}$ csökkenés nemcsak SEA0400, hanem az eltérő kémiai szerkezettel rendelkező, ORM-10103 alkalmazását követően is kialakul. Még ha feltételeznénk is, hogy mindkét gátlószer hasonló mellékhatással rendelkezik, akkor is valószínűtlen, hogy a mellékhatás *pont akkora*, amekkora az egyensúly fenntartásához szükséges. Ezzel szemben a csökkent NCX aktivitás *indirekt* (lokális feedback-en alapuló) $I_{Ca,L}$ modulátor hatásának jelentőségét irodalmi adatokon **[1-4]** és saját előzetes adatainkon **[236]** kívül igazolják a 29. ábrán látható eredmények is. Mivel 0.3 µM SEA0400 *direkt* $I_{Ca,L}$ gátló hatása elhanyagolható **[236]**, az $I_{Ca,L}$ csökkenés oka a $[Ca^{2+}]_{sm}$ emelkedés *indirekt*, negatív feedback hatása lehet.

Bár magas $[Ca^{2+}]_i$ mellett a gátlás hatékonyságának csökkenése következtében a Ca^{2+} eltávolítás gátlás-indukált csökkenése is kisebb, annak érdekében, hogy a CaT nagysága egyáltalán ne változzon, ezt a csökkenést is ellensúlyoznia kell egy, a Ca^{2+} beáramlás mértékében azonos csökkentését biztosító mechanizmusnak. Korábbi eredményeink **[236]** szerint kutya kamrasejtekben 1 µM SEA0400 hatására az $I_{Ca,L}$ ~20%-kal csökken, így az egyensúly egyszerűen elérhető. Ezzel szemben, mivel 0.3 µM SEA0400 alkalmazása esetén az I_{Ca} gátlás mértéke minimális (< 5%), ugyanakkor az NCX gátlás mértéke alig kisebb, mint 1 µM SEA0400 alkalmazása mellett, az egyensúly fenntartásához további, járulékos mechanizmusok *is* szükségesek. Néhány lehetőséget az alábbiakban ismertetünk.

C) Magas NCX csatornasűrűség az SL felületén és/vagy további NCX- és SR-független mechanizmusok. Irodalmi adatok szerint **[500]** az NCX jelentős tartalék kapacitással rendelkezik. Az NCX tartalék, illetve más, NCX-független Ca^{2+} eltávolító (PMCA) vagy SR-független Ca^{2+} felvevő mechanizmusok (mitokondrium) egyidejű fokozott aktiválódása jelentősen hozzájárulhat a $[Ca^{2+}]_i$ stabilizálásához, bár az aktiválásukhoz szükséges kapcsoló szignál hiányában (a SEA0400 nem hoz létre diasztolés vagy szisztolés $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést) jelenleg nem világos, hogyan történhet aktiválásuk. Ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a mérsékelt, *lokális* $[Ca^{2+}]_{sm}$ változásokat a konvencionális, *átlagos* $[Ca^{2+}]_i$ változásokat követő (általunk is használt) technikák nem képesek nyomon követni.

D) A „load" LTC csatornák „trigger" LTC csatornáknál kisebb aktivitása, vagy nagyobb gátlása. Elvileg érdekes és potenciálisan fontos, de érdemben alig vizsgálható lehetőség a két funkcionálisan eltérő LTC csatornapopuláció membránfelszíni eloszlásának, illetve sűrűségének heterogenitásaiból, valamint a gátlás esetleges heterogenitásaiból adódó hatás. Az LTC csatornák eloszlására vonatkozó adatok szerint azok ~75%-a a T-tubulus membránban diádikus komplexet alkot **[501]**. A fennmaradó 25% LTCC eloszlása sem egyenletes: lipid „raft"-okban, kaveolákban, a sejtmagban, sőt, az SR mitokondrium felé eső felszínén klasztereket alkotva **[502-505]**, jelentős szerepet játszanak egyes Ca^{2+}-függő jelutak aktiválásában. Bár az aktivitás és/vagy gátlás heterogenitásaira vonatkozóan nem érhetők el irodalmi adatok, elvi jelentőségüket az is mutatja, hogy a *nem-tubuláris* LTC csatornák inaktivációs kinetikája – kisebb mértékű Ca^{2+}-függő inaktivációjuk miatt – jóval lassúbb **[506]**. A T-tubulusok eltávolítása (~75-80% $I_{Ca,L}$ csökkenés) nem okoz mérhető változást az SR Ca^{2+} töltöttségében, ami igazolja a nem-tubuláris LTC csatornák jelentőségét a $[Ca^{2+}]_i$ és $[Ca^{2+}]_{SR}$ szabályozásában **[34]**.

E) Az SL Ca^{2+} transzportfluxusainak limitált szerepe az EC-csatolásban: Kísérleti eredményeink (43. ábra) támogatják azt a feltételezést, mely szerint az AP alatt fiziológiás körülmények között csak kismértékű nettó I_{NCX} generálódik, ennek következtében az áram

dc_1149_15

változásainak AP moduláló hatását teljes mértékben kompenzálhatják a repolarizáló K^+ áramok – azaz a szívizomsejtek jelentős repolarizációs tartaléka.

Több egyidejűleg aktiválódó, ellentétes hatású mechanizmus. Önmagában a fentiekben leírt háttérmechanizmusok egyike sem tűnik elégségesnek, hogy megvilágítsa, miért nem jön létre kutya szívizomsejtekben 0.3, vagy 1 µM SEA0400 (sőt, 10 µM ORM-10103) hatására a CaT növekedése és a kontraktilitás fokozódása, viszont *több*, ellentétes hatású mechanizmus *egyidejű aktiválódása* magyarázhatja a megfigyeléseket. NCX-független kompenzatorikus mechanizmusok szerepét a Ca^{2+}_i eltávolításban igazolják azok az adatok, melyek szerint embrionális NCX-KO egérszívekben közel normális CaT-ek alakulnak ki.

Egyéb? Az előzőekben részletezett, többé-kevésbé ismert regulációs mechanizmusokon kívül nem zárható ki más, ma még alig ismert transzportmechanizmusok aktiválódása az NCX gátlást követően. Ebből a szempontból különösen érdekes lehet néhány specifikus, vagy nemspecifikus TRP csatorna hozzájárulása, ami egyes karakterisztikus tulajdonságaik (pl. a TRPC, NCX és NKA kolokalizációja **[507]** ismeretében meglehetősen valószínűnek tűnik. Jelenleg ez a kérdés nyitott, mivel az egyes TRP csatornák hozzájárulásának igazolásához, valamint a hozzájárulás mértékének meghatározásához további kísérletes munkára, illetve specifikus gátlószerek kifejlesztésére egyaránt szükség van.

6.2.4. Miért van *mégis* pozitív inotróp hatás patkány szíven?

A nagy emlősökből származó adatok különböznek a rágcsálókon (patkány, egér) végzett vizsgálatok eredményeitől; utóbbiakban 1 µM SEA0400 alkalmazását követően mind a CaT, mind a sejtrövidülés nő **[508]**, ami igazolja, hogy közvetlenül a gátlás után a kifelé és befelé irányuló Ca^{2+} fluxusok különbsége – a nagy emlősökkel szemben, ahol a nettó fluxus zéró – rágcsálókban egyértelműen befelé irányuló. Egy adott, a kiindulásinál magasabb $[Ca^{2+}]_i$ elérését követően a fluxusok kiegyenlítődnek, ezáltal egy új egyensúlyi állapot alakul ki. Az speciesek között látott eltérés vélhetően az előzőekben elemzett mechanizmusok közül egy, vagy több eltolódásához/aktiváldásához köthető. Mivel a nagy emlősökhöz hasonlóan, rágcsálókban sem valószínű, hogy a gátlás *direkt* hatással lenne az SR Ca^{2+} transzportjára, a kvantitatív változás részben a gátlószer tulajdonságainak, részben a transzmembrán Ca^{2+} fluxusok egyensúlyának gátlás-indukált eltolódásából adódik.

A SEA0400 gátlási hatékonysága $[Ca^{2+}]_i$-függően csökken. A SEA0400 NCX hatásának $[Ca^{2+}]_i$-függése, amit először kutya szívizomsejtekben mutattunk ki (lásd fenn), a gátlószer fontos, karakterisztikus tulajdonsága. Az I_{NCX} $[Ca^{2+}]_i$-függését a ${}_{rev}I_{NCX}$-re Xenopus oocitákban mutatták ki **[242, 243]**; a ${}_{fwd}I_{NCX}$ hasonló függését először mi igazoltuk. A gátlási hatékonyság $[Ca^{2+}]_i$-függése kapcsolatban lehet az áram Na^+-függő inaktivációjának SEA0400-indukált felgyorsulásával, amely $[Na^+]_i$ emelkedés hatására fokozódik, $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés gátolja **[509]**. Ebből az is következik, hogy a SEA0400 gátló hatása, amint azt az NCX 1.1 izoformot expresszáló Xenopus oocitákban kimutatták magasabb $[Na^+]_i$ esetén erősödik **[243]**. Ezek az eredmények együttesen magyarázhatják a megfigyelést, hogy kutya (és humán) szívben, I/R során (amikor az iszkémiás sejtekben az I_{NCX} a magas $[Na^+]_i$ következtében nagyrészt reverz irányú) miért képes a SEA0400 az NCX gátlásával az I/R indukált Ca^{2+} túltelődés kivédésére anélkül, hogy Ca^{2+} túltelődés alakulna ki a környező, *nem iszkémiás* sejtekben – annak ellenére, hogy ezekben az I_{NCX} nagyrészt forward irányú.

A SEA0400 zérótól különböző nettó hatása a transzmembrán Ca^{2+} transzportra

A) A ${}_{rev}I_{NCX}/{}_{fwd}I_{NCX}$ egyensúly módosulása a gátlást követően: Az NCX gátlás *végső* kimenetele – számos más tényező mellett – függ a reverz/forward NCX transzportfluxusok arányától a sejt Ca^{2+}_i transzportegyensúlyában, továbbá a kétféle aktivitási mód gátlásának

dc_1149_15

arányától. Például a KB-R7943-ról kimutatták, hogy a legtöbb kísérleti felállásban jóval hatékonyabban gátolja a reverz, mint a forward Ca^{2+} transzportot. Ennek következtében szignifikánsan csökken az NCX-facilitált Ca^{2+} beáramlás, patkány szívizomsejtekben *mégsem* változott a KB-R7943 alkalmazását követően a CaT amplitúdója és a kontrakció nagysága **[272]**. Ezzel szemben tengerimalac szívizomsejtekben a gátlást követően mindkét paraméter *szignifikánsan csökkent* **[272]**. Ez az eltérés jól reprezentálja az NCX Ca^{2+} háztartásban betöltött szerepének markáns species-függését. Ugyanakkor, másokkal együtt mi is igazoltuk, hogy a KB-R7943-mal ellentétben a SEA0400, bár nem teljesen, de közel azonos mértékben gátolja kutya és tengerimalac szívben az NCX forward, és reverz transzportját **[236]**. Kísérleti adataink (28-29. ábrák) igazolják a gátlási profilok eltérésére alapozott hipotézist, mely szerint a KB-R7943 alkalmazásával kapott kísérleti eredmények és a SEA0400-indukált I_{NCX} blokád következményei eltérnek egymástól. Méréseink szerint 0.3 µM SEA0400 alkalmazását követően a CaT amplitúdója, és ennek következtében a sejtek rövidülése mind téringerelt, mind feszültség clampelt patkány szívizomsejtekben szignifikánsan nőtt. Bár korábbi eredményeink **[236]** szerint ebben a gátlószer koncentrációban az I_{NCX} gátlása ~50%, a SEA0400 alkalmazását követően mégsem láttunk Ca^{2+} túlterhelésre utaló változásokat. Ennek alapján igen valószínű, hogy a szívizomsejtek Ca^{2+} háztartására vonatkozó lokális autoregulációs modellnek megfelelően SEA0400 jelenlétében a Ca^{2+} homeosztázis új steady-state egyensúlyi állapotba került.

B) Az $I_{Ca,L}$ NCX-függő modulációja és a gátlás $[Ca^{2+}]_i$ függése. A Ca^{2+} beáramlás és kiáramlás közötti új egyensúly kialakulásához a Ca^{2+} beáramlásnak ugyancsak csökkennie kell. A hipotézis tesztelésére perforált patch clamp mérésekben egyidejűleg regisztráltuk a CaT és a $I_{Ca,L}$ változásait. Eredményeink szerint 0.3 µM SEA0400 alkalmazását követően az $I_{Ca,L}$ maximális amplitúdója valóban csökken, és inaktivációja is gyorsul. Mivel ebben a koncentrációban a SEA0400 feszültség clamp-elt szívizomsejtekben *direkt* módon nem modulálja az $I_{Ca,L}$-t **[235]**, az $I_{Ca,L}$ csökkenés vélhetően a csökkent Ca^{2+} eltávolítás *indirekt* – a CaT amplitúdójának növekedéséhez köthető – következménye. A jelenség elsődleges háttérmechanizmusa az LTCC-k CaM-mediált, Ca^{2+}-függő inaktivációja lehet **[510]**, ami a Ca^{2+} ciklus beat-to-beat autoregulációjában kritikus szerepet játszó negatív feedback mechanizmus alapját képezi; a $_{fwd}$NCX aktivitás gátlásának hatására megemelkedő $[Ca^{2+}]_i$ miatt nő az SR Ca^{2+} felvétele, ami a felszabaduló Ca^{2+} mennyiségének növekedéséhez vezet. Ezt az elképzelést alátámasztja a megfigyelés, mely szerint SEA0400 alkalmazását követően a $[Ca^{2+}]_{iD}$ is emelkedik. Bár ez az emelkedés mérsékelt és a statisztikailag szignifikáns szintet nem éri el, mégis elegendőnek bizonyulhat a $[Ca^{2+}]_{SR}$, valamint a szubszarkolemmális térben kialakuló $[Ca^{2+}]$ fokozatos növeléséhez, ami viszont gyorsítja az LTC csatornák inaktivációját. Mivel ilyenkor – a csökkent $I_{Ca,L}$ *és* a $_{rev}I_{NCX}$ SEA0400-indukált gátlása miatt mérséklődő Ca^{2+} beáramlás ellenére –nő a CaT amplitúdója, az új egyensúlyi állapotban nagy valószínűséggel a CICR erősítése is módosul. Az új egyensúlyi állapot kialakulása részleteinek tisztázásához további vizsgálatokra van szükség.

C) Az SL Ca^{2+} fluxusainak korlátozott szerepe. A CaT növekedésének fenti értelmezése szerint a növekedésért elsősorban az NCX-mediált Ca^{2+} kiáramlás-csökkenés által generált $[Ca^{2+}]_{SR}$ emelkedés következtében létrejövő nagyobb Ca^{2+} felszabadulás okolható, azonban *elméletileg* a transzmembrán Ca^{2+} eltávolítás sebességcsökkenése *direkt* módon is növelheti a tranziens amplitúdóját. Patkányban az NCX tényleges hozzájárulása a relaxáció alatti $[Ca^{2+}]_i$ csökkenéshez a SERCA-hoz képest viszonylag csekély **[511]**, ezért nagyon valószínűtlen, hogy ez a mechanizmus szignifikánsan hozzájárulna a CaT növekedéséhez. Ez a hozzájárulás azért sem tűnik valószínűnek, mivel a CaT lecsengési időkonstansa SEA0400 hatására *nem változik*, ez pedig egyúttal arra is bizonyíték, hogy a SEA0400 *direkt* hatása a SERCA2 transzportsebességére csak minimális mértékű lehet.

dc_1149_15

D) Az akciós potenciálok között fennálló különbségek: A SEA0400 NCX gátló hatásában megfigyelt species különbségek további, igen fontos magyarázata lehet, hogy kis rágcsálók akciós potenciáljából – magas szívfrekvenciájuk miatt – szinte teljesen hiányzik az elkülönülő plató fázis [78], ezért rágcsálókban a szívciklus alatt a nagyobb emlősökhöz képest az NCX hosszabb ideig működik forward transzport módban [29], ami pedig egyértelműen a fokozott Ca^{2+} eltávolításnak kedvez. Ezért *is* növekedhet a CaT amplitúdója, és fokozódhat a kontrakciós erő az NCX gátlását követően.

Összegzés és limitációk. Vizsgálataink egyik fontos következtetése, hogy a szívizomsejtek kontraktilitása részleges, szelektív NCX gátlás esetén a $[Ca^{2+}]_{iD}$ szignifikáns emelkedése nélkül is fokozódhat. Bár a gátlás hatására a $[Ca^{2+}]_{iD}$ is némiképp emelkedni látszik, az emelkedés a mérések szórási tartományában marad. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy amennyiben a sejt Ca^{2+} eltávolító kapacitása az NCX gátlás következtében csökken, a proaritmiás kockázat növekedésének megakadályozása érdekében nem célszerű további $[Ca^{2+}]_{iD}$-t növelő hatóanyag alkalmazása, mivel a $[Ca^{2+}]_{iD}$-t egyébként csak kismértékben növelő hatását az NCX gátlás számottevően felerősítheti. Ugyanakkor a gátlás alig mérhető hatása a $[Ca^{2+}]_{iD}$-re különös jelentőséggel bírhat szívelégtelenségben, mivel ilyenkor a $[Ca^{2+}]_{iD}$ eleve magasabb az optimálisnál, és a $[Ca^{2+}]_{iD}$-t még tovább emelő hatóanyagok alkalmazása az aritmia hajlam fokozódása miatt egyértelműen kontraindikált. Ebben a vonatkozásban a SEA0400 alkalmazásával nyert eredményeink megerősítik Hobai és mts.[222] megfigyeléseit, akik a XIP alkalmazását követően mértek ugyan CaT amplitúdó növekedést, de ugyancsak a $[Ca^{2+}]_{iD}$ szignifikáns emelkedése nélkül. Szerintük ez az SR Ca^{2+} felvétel Ca^{2+}-függő stimulációjának következménye, és igen fontos, a Ca^{2+}_i túltelődés megelőzésére szolgáló autoregulációs védőmechanizmus. Logikusnak tűnik a feltételezés, hogy ez a mechanizmus az alkalmazott kísérleti feltételek között is folyamatosan aktív.

Érdemes megemlíteni, hogy patkány kamrai szívizomsejtekben, a csökkent NCX aktivitás CaT-re és kontraktilitásra gyakorolt dinamikus hatásainak elemzése során, Tadros és mts. [205] lényegesen eltérő következtetésekre jutottak. Ők az NCX-expressziót adenovírus-mediált antiszensz oligonukleotid módszerrel gátolták és azt tapasztalták, hogy a csökkent NCX expresszió Ca^{2+} háztartásra gyakorolt hatása jelentősen függ a külső $[Ca^{2+}]$-tól, melynek fiziológiás szintje (1.8 mM) mellett a gátlás nem okozott szignifikáns CaT amplitudóemelkedést. Az eredményeink közötti ellentmondás valószínűleg az NCX aktivitást csökkentő kísérleti protokollok közti különbségre vezethető vissza, mivel az antiszensz oligonukleotid módszerrel létrehozott NCX-KO 72 óra alatt alakul ki, és ez a viszonylag hosszú időtartam lehetővé teszi a Ca^{2+} háztartás *adaptív*, az NCX aktivitás csökkenését kompenzáló, változásait. Ezzel szemben a mi esetünkben a szelektív NCX gátlószer *akut* alkalmazása miatt ezek a lassú, adaptív változások nem jöhetnek létre. Ők az $I_{Ca,L}$ nagyságában sem figyeltek meg változást az NCX gátlást követően. Vélhetően ez az ellentmondás is elsősorban a használt kísérleti módszerek közötti eltérésekből következik, mivel ők az $I_{Ca,L}$ nagyságát az Ca^{2+}_i fiziológiásnak nem tekinthető, alacsony szintre történt pufferelését követően, konvencionális patch clamp technikával mérték, a kísérleteinkben alkalmazott *perforált* patch clamp technika viszont lehetővé teszi a Ca^{2+}_i dinamikus változásait (CaT), ezáltal az általunk mért $I_{Ca,L}$ csökkenés vélhetően a Ca^{2+} ciklus NCX gátlást követő autoregulációs adaptációjának a következménye.

6.3. NCX gátlás hatása a Ca^{2+}_i túlterhelés okozta aritmogén változásokra

A vizsgálatok legfontosabb célja a szívbetegségek során kialakuló Ca^{2+}_i-függő változások sejtszintű háttérmechanizmusainak, valamint az NCX szelektív gátlásának, mint esetleges perspektívikus kardioprotektív stratégiának részletes elemzése volt. Egymáshoz szorosan kapcsolódó modelleket

dc_1149_15

használtunk: az LQT szindróma modellben a $I_{Na,L}$ emelkedését követően, a szimulált iszkémia modellben az I/R alatt kialakuló extra- és intracelluláris ionmiliőt jól közelítő körülmények között határoztuk meg az akciós potenciál, illetve a $Ca^{2+}{}_i$ homeosztázis kulcsparamétereiben fokozott $Ca^{2+}{}_i$ és $Ca^{2+}{}_{SR}$ terhelés hatására kialakuló, potenciálisan aritmogén eltolódásokat, továbbá vizsgáltuk a részleges, szelektív NCX gátlás hatékonyságát ezek megelőzésére/csökkentésére.

6.3.1. LQT szindróma modell – $I_{Na,L}$ emelkedés által indukált $Ca^{2+}{}_i$-túlterhelés

Koncepció. Az *első* kísérleti csoportban a farmakológiai hatóanyagok (ATX-II, SEA0400 és ORM-10103) egyes membránáramokra és a karakterisztikus fiziológiás paraméterekre (CaT amplitúdó, sejtrövidülés, APD) gyakorolt hatását elemeztük (35-37. ábrák). A *második* csoportban közel fiziológiás körülmények között a szelektív NCX gátlás hatásait vizsgáltuk a $Ca^{2+}{}_i$-háztartás $I_{Na,L}$ növekedés indukált eltolódásaira (38. ábra), valamint strophantin hatására kialakuló fokozottan aritmogén állapotra (39. ábra). A *harmadik* csoportban is a szelektív I_{NCX} gátlás hatásait vizsgáltuk az $I_{Na,L}$ aktiválásával indukált APD nyúlásra (41. ábra) és a veratridin hatásra kialakuló AP diszperziófokozódásra (42. ábra).

A gátlás hatásainak jobb karakterizálása céljából két, kissé eltérő kísérleti felállást alkalmaztunk. 1) Amikor az $I_{Na,L}$ aktivátort az I_{NCX} gátlás előtt alkalmaztuk, a kérdés az volt, hogy az NCX blokád alkalmas-e az $I_{Na,L}$ növelése, illetve a Na^+/K^+ pumpa gátlása következtében kialakuló APD növekedés és/vagy $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés *visszafordítására*. 2) Amikor pedig az NCX gátlót alkalmaztuk először, a kérdés az volt, hogy a gátlás képes-e *megelőzni* az $I_{Na,L}$ aktiváció aritmogén következményeit. Mivel az $[Na^+]_i$-generált, ${}_{rev}I_{NCX}$-mediált fokozott Ca^{2+} terhelés és a ${}_{fwd}I_{NCX}$ aktivitás fokozódása következtében kialakuló I_{ti} emelkedés egyaránt szignifikánsan hozzájárulhat az aritmogén APD megnyúláshoz, hipotézisünk szerint az I_{NCX} szelektív gátlása markánsan csökkentheti az APD megnyúlás mértékét. A *negyedik* kísérleti csoportban egyrészt megkíséreltük az AP alatt közvetlenül meghatározni az NCX áramot (43. ábra), másrészt vizsgáltuk a célzott ${}_{rev}I_{NCX}$, illetve ${}_{fwd}I_{NCX}$ gátlás következményeit veratridin (40. ábra) és forskolin (44. ábra) alkalmazását követően, a gátlás antiaritmiás mechanizmusainak tisztázása céljából, továbbá, hogy megértsük, miért nem változik a CaT amplitúdója a gátlást követően.

NCX gátlás kivédi a $Ca^{2+}{}_i$ emelkedést és a diasztolés Ca^{2+} felszabadulást. Mindkét alkalmazott NCX gátlószer hatékonyan csökkentette az előzőleg megnövelt $Ca^{2+}{}_i$ szintet, illetve kivédte a $I_{Na,L}$-mediált $Ca^{2+}{}_i$ emelkedést (38. ábra). Az ATX-II előkezelés hatására fokozódó Na^+ beáramlás serkenti a ${}_{rev}I_{NCX}$ aktivitást, ami $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéshez, és a CaT amplitúdójának növekedéséhez vezet. Mindkét alkalmazott NCX gátlószer szignifikánsan csökkentette a ${}_{rev}I_{NCX}$ nagyságát, meggátolta a további Ca^{2+} beáramlást, és a $[Ca^{2+}]_i$-t eredeti értékére állította vissza. Ha viszont először az NCX-et gátoltuk, az I_{NaL} ezt követő aktivációja nem hozott létre mérhető $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést. Az adatok egyértelműen igazolják a reverz NCX transzport gátlás funkcionális dominanciáját az adott kísérleti körülmények között, és egyértelműen támogatják azt az elképzelést, hogy a szelektív I_{NCX} gátlás a $[Ca^{2+}]_i$ modulációján keresztül fejti ki antiaritmiás hatását. A hipotézis további tesztelése céljából a NKA-t strophantidinnel gátoltuk. A gátlás az APD rövidüléséhez, fokozott $[Na^+]_i$-hoz és az SR Ca^{2+} túltelődéséhez, ezáltal aritmogén Ca^{2+} pulzusok (sparkok) fokozott kialakulásához vezet [512]. ORM-10103 alkalmazását követően – elsősorban az SR ${}_{rev}I_{NCX}$-mediált Ca^{2+} túltelődésének gátlása miatt – a strophantidin-indukált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés szignifikánsan mérséklődött és a pacing-indukált diasztolés Ca^{2+} pulzusok (sparkok) száma is drasztikusan csökkent (39. ábra). A gátlás jótékony hatása – figyelembe véve korábbi eredményeinket – azzal magyarázható, hogy az adott állapotban a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás zavarait csaknem kizárólag a ${}_{rev}I_{NCX}$ növekedése okozza.

dc_1149_15

A $_{rev}I_{NCX}$ közvetlen kapcsolatot biztosít az $I_{Na,L}$ és a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás között. A 38-39. ábrák eredményeinek megbízhatóbb értelmezése céljából további kísérleteket is végeztünk.
Az I_{NCX} gátlás hatékonysága az $I_{Na,L}$-mediált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel szemben kielégítően magyarázható, ha létezik a hipotetizált "$_{rev}$NCX-mediált direkt kapcsolat" a Na^+ beáramlás és a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés között. A csatolás jobb karakterizálása érdekében szoros, direkt kölcsönhatást modelleztünk a 40. ábrán látható kétlépcsős protokoll alkalmazásával.
A veratridin-indukált $I_{Na,L}$ növekedés miatt kialakuló $[Na^+]_i$ emelkedés következtében az NCX reverzpotenciálja negatívabb értékek irányába tolódik. +40 mV tesztpotenciál esetén ez az eltolódás a $_{rev}I_{NCX}$ növelésével fokozza a Ca^{2+} beáramlást és markáns kifelé mutató áramot generál. 1 µM SEA0400 előkezelést követően ez a másodlagos $_{rev}I_{NCX}$ növekedés eltűnt. Az eredmények alapján egyértelműen valószínűsíthető, hogy az $I_{Na,L}$ aktivációjához kapcsolódó $_{rev}I_{NCX}$ növekedés kiemelkedő szerepet játszik a szív aritmogenezisében és érthetővé válik a gátlás 38-39. ábrákon látható jótékony, antiaritmiás hatása.

NCX gátlás nem csökkenti az aritmogén APD nyúlást és APD diszperzió fokozódást. Szelektív NCX blokád, a CaT-en kapott eredményekkel ellentétben, az AP hosszát vagy alakját – sem előkezelésként, sem ATX-II kezelés után alkalmazva – nem befolyásolta (41. ábra). A hatástalanság oka vélhetően komplex. Elméletileg az $I_{Na,L}$ fokozódását követő APD nyúlás kétféleképpen is létrejöhet: 1) *direkt módon*, a megnőtt $I_{Na,L}$ közvetlen APD nyújtó hatásával, illetve 2) *indirekt módon*, az $I_{Na,L} \rightarrow I_{NCX}$ kapcsolat AP modulátor hatásán keresztül. Valószínű, hogy az NCX gátlásnak nincs (vissza)hatása az $I_{Na,L}$ nagyságára; ez részben magyarázhatja, hogy a gátlás miért nem képes a markáns APD megnyúlást megakadályozni. Ugyanakkor problematikus az ATX-II alkalmazását követően az AP alatti I_{NCX} változások közvetlen becslése. Erre mi a SEA0400- vagy ORM-10103-érzékeny áramot használtuk (lásd 43. ábra). Az $I_{Na,L}$ aktiválását követően mindkét esetben nagy valószínűséggel megnőtt mind a $_{rev}I_{NCX}$, mind a $_{fwd}I_{NCX}$. Normál körülmények között a két áram egyidejű gátlása és az APD_{90} közeli időtartományban viszonylag kicsi I_{NCX} miatt az áram hozzájárulása a kamrai repolarizációhoz igen mérsékelt. Érdemes megjegyezni, hogy az ORM10103- és SEA0400-szenzitív áramok ATX-II adását követően meghatározott kinetikája némileg eltér egymástól. Mivel a protokoll jelentős korlátozásokkal használható, a konklúzióval is óvatosan kell bánni. Feltételezésünk szerint az eltérés az ORM-10103 jobb szelektivitásával magyarázható; ugyanezen okból az ORM-10103-szenzitív áram is pontosabb becslést adhat az I_{NCX} AP alatti tényleges kinetikájára vonatkozóan. Az $I_{Na,L}$ aktivációját követően, az APD megnyúlásával egyidejűleg, a $[Ca^{2+}]_i$ szintén nő, az ezt követő NCX gátlás a $[Ca^{2+}]_i$-t az APD mérhető megváltozása nélkül csökkenti.

A látszólagos ellentmondásra alternatív magyarázat is adható. Elképzelhető ugyanis, hogy a CaT csökkenése negatív feed-back mechanizmussal késlelteti az $I_{Ca,L}$ inaktivációját, és ezáltal megnyújtja az APD-t. Ezért, amennyiben az NCX gátlás *direkt* módon, például I_{NCX}-mediált hatással, rövidítené az APD-t, a rövidülést a gátlás *indirekt* hatása (pl. az $I_{Ca,L}$-mediált APD megnyúlás) nagymértékben ellensúlyozná. Így tehát az $I_{Na,L}$-indukált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést követő NCX gátlás két, párhuzamosan kialakuló, de ellentétes irányú hatást gyakorolhat az APD-re: egyrészt *direkt* módon, az I_{NCX} gátlásával rövidítheti, másrészt *indirekt* módon – a $[Ca^{2+}]_i$ csökkentésével, s ennek következtében az $I_{Ca,L}$ növelésével – meg is nyújthatja azt. A két egymást ellensúlyozó hatás pillanatnyi viszonya szorosan befolyásolhatja az I_{NCX} gátlás – mindezek miatt nehezen megjósolható – végső hatását az AP hosszára és morfológiájára; ezek egyes aritmia modellekben és/vagy speciesekben jelentősen eltérőek lehetnek. Ez a komplex kölcsönhatás adhat megfelelő magyarázatot arra, hogy miért csökkentette az APD-t sotalol/veratridin provokációt követően a SEA0400 **[513]**, míg – hasonló kísérleti körülmények között – Langendorff-perfundált nyúl szívekben dofetilid előkezelést követően a TdP gyakorisága megnőtt **[283, 514]**.

dc_1149_15

A szelektív NCX blokád hatástalannak bizonyult a $I_{Na,L}$ aktiváció-indukált kamra-Purkinje APD diszperziónövekedés kivédésére, vagy csökkentésére (42. ábra). Bár az I_{NaL} és a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás NCX gátlást követő szétkapcsolódásának még ilyenkor is van hatása, ez a hatás az APD vonatkozásában jelentéktelen. Abból, hogy a gátlószerek az APD-re hatástalanok, arra is következtethetünk, hogy hatásuk a fokozott APD diszperzióra sem lehet jelentős. Bár ez a következtetés ellentmond egyes irodalmi adatoknak [513], más megfigyeléseket támogat [283, 514]. A saját adataink és Milberg [513] adatai közötti ellentmondás oka nem egyértelmű; egyaránt lehet az eltérő kísérleti felállás és vizsgálati módszer vagy species különbségek következménye, de okozhatják a SEA0400 $I_{Ca,L}$ és NCX gátlásának minimális változásai. Az eltérések okának tisztázásához további vizsgálatokra van szükség.

Az I_{NCX} - AP kapcsolat. Mivel nem sikerült kísérletes úton, általános érvénnyel tisztázni sem az I_{NCX} morfológiáját, sem mindenkori szerepét az AP formálásában, eredményeink értelmezést segíthetnék az „in silico" AP modellek – ha azok következtetései viszonylag egyértelműek lennének. Mivel nem ez a helyzet, inkább kísérleti eredményeink segíthetnek a szimulációs AP modellek egymástól eltérő következtetéseinek értelmezésében.

I_{NCX} szimulációs modellek. Bár több számítógépes modellben megkísérelték megbecsülni, a kísérletes és szimulációs erőfeszítések ellenére sincs egyetértés az NCX áram kamrai AP alatti irányváltásának időpontjára vonatkozóan. Tengerimalac modellekben [174, 515] a $_{rev}I_{NCX}$ időtartama meglehetősen hosszú (~100 ms). Ezzel szemben Bers és csoportja [29] az általuk kifejlesztett nyúl modellből jóval rövidebb $_{rev}I_{NCX}$ időtartamot jósoltak (~10 ms).

A humán kamrai AP-re kifejlesztett modell [516] plató fázis szinte teljes időtartama alatt befelé irányuló NCX áramot jósol, viszont több kutya modellben [177, 178] az áramirány megfordulása a számítások szerint a plató fázis utáni időszakra esik, tehát az NCX az AP alatt alapvetően kifelé irányuló áramot generál. Bár speciesfüggő eltérések (AP alakja, $Ca^{2+}{}_i$ és $Na^{+}{}_i$ szintek) fontos szerepet játszhatnak az adatok szórásában, azt is figyelemre méltó, hogy az azonos speciesre (tengerimalacra) kifejlesztett modellekből számolt adatok is szignifikánsan eltérnek. A szimulációs eredmények ellentmondásai vélhetően az NCX aktivitást dominánsan meghatározó szubmembrán Ca^{2+}, és Na^{+} mozgások, illetve dinamikus membránpotenciál változások következetlen interpretációjából adódhatnak.

Az I_{NCX} gátlás szimulációja. Az NCX gátlás AP-ra gyakorolt hatását illetően Li és Rudy [517] arra a következtetésre jutottak, hogy magas stimulációs frekvencia esetén Purkinje és kamrai szívizomsejtekben, az APD rövidülését okozó legfontosabb tényező az I_{NKA} mediált $[Na^{+}]_i$ akkumuláció. Ugyanakkor Purkinje sejtekben az I_{NCX} és $I_{Na,L}$ is jelentős szerepet játszik. Az NCX-KO egér modellben [518] 70%-os NCX gátlást követően a befelé irányuló áram csökkent, az APD kismértékben rövidült. Egy másik, integrált matematikai modell [413] azt vizsgálta, játszhat-e szerepet az akonitin-indukált aritmiák kialakulásában az NCX. A modell az akonitin-indukált membránpotenciál oszcillációkat megfelelően rekonstruálta, de a jó egyezés a SEA0400 hatás figyelembevételét követően romlott, ezért következtetéseik szerint az NCX gátlás alkalmatlan az oszcillációk elnyomására. Saját eredményeink inkább a Weber modell következtetéseit támogatják [29], amelyek szerint az I_{NCX} túlnyomórészt befelé irányul, a $_{rev}I_{NCX}$ időtartama rövid, és az irányváltás 10 ms-on belül bekövetkezik.

Az ORM-10103 antiaritmiás hatékonysága a $_{rev}I_{NCX}$ gátlás következménye. Az ORM-10103 antiaritmiás mechanizmusának tisztázása céljából a 44. ábrán összegzett kísérletek célkitűzése a "szelektív" $_{fwd}I_{NCX}$ gátlás következményeinek elemzése volt. Az adatok szerint normál körülmények között – amikor a Ca^{2+} beáramlást nem stimuláltuk – 10 µM ORM-10103 nem befolyásolta a -80 mV-nál meghatározott farokáramot, ami $_{fwd}I_{NCX}$-nek

dc_1149_15

tekinthető. Ez a megfigyelés látszólag ellentmond a tradicionális ramp protokollal mért eredményeknek (37. ábra /A), és igazolhatja, hogy zavartalan Ca^{2+} ciklus alatt az NCX gátlása realisztikusabb információt szolgáltathat a gátlás tényleges hatékonyságáról. Ez az eredmény segíthet a gátlószerek látszólagos, a CaT kinetikájára vonatkozó (38. ábra /C) hatástalanságának értelmezésében. Ugyanakkor Ca^{2+}_i túlterhelés esetén szignifikáns $_{fwd}I_{NCX}$ gátló hatást kaptunk (44. ábra /A-C), amit az bizonyít, hogy az ORM-10103 markánsan csökkentette az NCX farokáram forskolin-indukált növekedését. Ez a megfigyelés még jobban kiemeli a $_{rev}I_{NCX}$ gátlás jelentőségét az ORM-10103 antiaritmiás hatásában.

Limitációk. *SEA0400 vs. ORM-10103:* A részleges NCX gátlás hatékonyságát a $[Na^+]_i$ emelkedés okozta Ca^{2+}_i terhelés fokozódás aritmogén következményeinek csökkentésére az elérhető legszelektívebb NCX gátlószerekkel vizsgáltuk. A SEA0400 jól karakterizált és meglehetősen szelektív **[241]**, bár némi $I_{Ca,L}$ gátló hatással is rendelkezik **[236]**, 1 µM koncentrációban alkalmazva a SEA0400 az első szelektívnek tekinthető I_{NCX} gátlószer volt, ezért gyakran használták. Ma már elérhetővé váltak szelektívebb NCX gátlószerek is hasonlóan alacsony EC_{50} értékekkel (ORM-10103; EC_{50}: 0.78/0.96 µM, a reverz/forward I_{NCX}-re) **[447, 519]**. Az ORM-10103, a Ca^{2+} háztartás szempontjából elhanyagolható I_{Kr} gátlástól eltekintve, még 10 µM koncentrációban sem okoz mérhető változást a többi – főleg a kritikus $I_{Ca,L}$ – áramban. Mivel kísérleteinkben nem tudtunk gátló hatásuk között lényeges eltérést kimutatni, a két gátlószert vagylagosan alkalmaztuk.

TX-II vs. veratridin: Az előkészítő mérések során, melyek célja multicelluláris mintákban az optimális APD nyújtás mértékének meghatározása volt, mind az ATX-II (2 nM), mind a veratridin (1 µM) kellően hatásosnak bizonyult, ezért a kettőt vagylagosan használtuk. Az egyetlen megfigyelt különbség a steady-state lassúbb beállása volt veratridin alkalmazását követően. Ezért előnyben részesült az ATX-II, kivéve a Purkinje-kamra preparátumokat, melyekben 0.5 µM veratridin is markáns AP diszperziófokozódást indukált. Az eltérés oka vélhetően az endokardiális szövetminták papilláris izmokhoz képest kissé csökkent ATX-II érzékenysége. Purkinje rostokon a veratridin szintén jelentős hatást mutatott.

A sejtszintű CaT mérésekben, a multicelluláris preparátumokhoz hasonlóan, ATX-II-t alkalmaztunk, ami – a veratridinnel ellentétben – a CaT amplitúdóját a lecsengési kinetika torzulása nélkül, markánsan növelte. A veratridin CaT torzító hatása nagyobb APD növelő hatásának következménye lehet. Bár – ahogyan az a 40. ábrán is látható – mindkét anyag alkalmas a I_{NaL} és $_{rev}I_{NCX}$ közötti szoros csatolás demonstrálására, az alkalmazott kísérleti körülmények között 1 µM veratridin sokkal jobban megnyújtotta az $I_{Na,L}$ lefutását, ennek következtében a $_{rev}I_{NCX}$ növekedés is nagyobb volt.

6.3.2. Szimulált iszkémia-reperfúzió

Mivel az NCX kulcsszerepet játszik a $[Ca^{2+}]_i$ homeosztázis egyensúlyának fenntartásában, a transzport irányában, vagy mértékében bekövetkező kóros változások jelentős hatást gyakorolnak a szív kontrakciós aktivitására és elektrofiziológiai paramétereire. A megnőtt $_{rev}I_{NCX}$ a fokozatos Ca^{2+} felvétel következtében $[Ca^{2+}]_i$ és $[Ca^{2+}]_{SR}$ túlterhelést okoz (pl. iszkémia/reperfúzió), az emelkedett $_{fwd}I_{NCX}$ pedig a fokozatos Ca^{2+} vesztés miatt markáns $[Ca^{2+}]_i$ és $[Ca^{2+}]_{SR}$ csökkenéshez vezethet (pl. krónikus szívelégtelenség) **[520-522]**. *Szelektív NCX gátlás mindkét esetben helyreállíthatja a Ca^{2+}_i egyensúlyt és effektív védelmet jelenthet a kóros állapot progressziójával szemben. Bár korábbi tanulmányok fontos információkat szolgáltattak a gátlás következményeiről (pl.* **[422, 523]**), *az eredmények megbízható értelmezését a használt gátlószerek nem kielégítő szelektivitásából adódó bizonytalanság jelentősen nehezítette. Mi a szimulált iszkémia/reperfúziós mérések során egy új hatóanyagot (ORM-10103) használtunk, mely a SEA0400-nál jobb szelektivitással rendelkezik és nem befolyásolja más, a Ca^{2+} háztartásban fontos szerepet játszó transzporterek aktivitását* **[524]**.

dc_1149_15

Iszkémia mértéke. A szimulált I/R protokoll egyik kritikus pontja a kellő mértékű hipoxia beállítása a mérőkamrában. A szívizomsejtek hipoxiás állapotát a $[NADH]_{mito}$ változásának fluorometriás követésével igazoltuk. Iszkémia során a mitokondriumokban az oxidatív anyagcseregátlás következtében a NADH tartalom jelentősen megnő, amit a natív szöveti fluoreszcencia növekedése igazol [525]. A *maximális* rövidtávú $[NADH]_{mito}$ növekedés jól becsülhető cianid alkalmazásával; az iszkémia, illetve a cianid kezelés által indukált fluoreszcencia-fokozódás hányadosa megbízhatóan jellemzi a kialakult intracelluláris iszkémia mértékét. Kísérleteinkben a szimulált iszkémia által létrehozott fluoreszcencia-növekedés jóval kisebb volt a cianid-indukált növekedésnél (46. ábra), tehát a protokoll során az oxidatív metabolizmus markánsan csökkent ugyan, de nem volt teljesen gátolt [526]. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen a kamrában az oxigén szint alacsony volt ugyan, de nem zéró (32.9 ± 1.6 mmHg). Ezért az általunk használt szimulált iszkémia protokoll sokkal alkalmasabb az infarktusos terület széli zónájára jellemző „low-flow", mint a centrális régióban kialakuló „now-flow" állapot modellezésére. Mint a 46. ábrán látható, a NADH fluoreszcencia az iszkémiás periódus végéig az időátlag felett maradt, és csak a reperfúzió alatt normalizálódott. A fluoreszcencia-intenzitás iszkémiás periódus során kialakuló látszólagos csökkenésért vélhetően nem a bleaching önmagában a felelős, hiszen időkontroll kísérletekből meghatározott mértéke jóval kisebbnek adódott.

A csökkenés bleaching-független komponense elvileg két forrásból származhat. Egyrészt a kamrai pO_2 vélhetően igen közel volt az izolált, aktív szívizomsejtekre jellemző kritikus pO_2 szinthez, ezért a kamrai pO_2 kisebb változása is a $[NADH]_{mito}$ markáns eltolódásához vezethet. A másik ok az lehet, hogy mivel a szuperfúziós oldat nem tartalmaz glukózt, az iszkémia során a szubsztrát-elérhetőség ugyancsak fokozatosan csökkent, ami a $NADH_{mito}$ tartalom részleges reoxidációjához vezethet. A kérdés eldöntésére a használt kísérleti felállásban nincs mód, mindkét magyarázat érvényes lehet [527].

Ca^{2+}_i tranziens. ORM-mel nem előkezelt szívizomsejteken az iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_i$ felhalmozódás minden jellegzetes következménye megfigyelhető. A $[Ca^{2+}]_{iD}$ jelentősen megnőtt (48. ábra /E), és mivel ezzel egyidejűleg a CaT amplitúdója kevésbé csökkent (48. ábra /B), a szisztolés $[Ca^{2+}]_i$ szintén megemelkedett. A CaT kinetikai paraméterei szintén változtak; felszálló szárának meredeksége csökkent (48. ábra /C); az 50%-os relaxáció (RT_{50}) időtartama pedig jelentősen nőtt (48. ábra /D). A változások háttere meglehetősen összetett: egyrészt az ATP tartalékok kimerülésével párhuzamosan a SERCA aktivitása is lassul, ami az SR Ca^{2+} tartalmának csökkenéséhez vezet, ezáltal a CaT meredeksége és amplitúdója csökken; a nyugalmi membránpotenciál depolarizációja mérsékli a $_{fwd}I_{NCX}$, a magas $[Na^+]_i$ növeli a $_{rev}I_{NCX}$ nagyságát. A lelassult SERCA *és* $_{fwd}$NCX aktivitás, valamint a megnőtt $_{rev}I_{NCX}$ a $[Ca^{2+}]_{SR}$ csökkenéséhez és egyidejűleg a Ca^{2+} beáramlás fokozódásához és $[Ca^{2+}]_i$ növekedéshez, továbbá az eltávolítandó Ca^{2+}_i mennyiségének növekedéséhez vezet [364, 528]. A reperfúzió során a CaT amplitúdója és meredeksége, illetve (lassan) a $[Ca^{2+}]_{iD}$ helyreállt [529], az RT_{50} is lecsökkent. A CaT relaxációjának a reperfúzió során látott felgyorsulása mögött valószínűleg a $[K^+]_i$ gyors helyreállása, ezáltal a membrán repolarizációja állhat, amely szignifikánsan megnöveli a $_{fwd}$NCX aktivitás hatékonyságát és serkenti az $[ATP]_i$ helyreállását, ez pedig normalizálja a SERCA aktivitását. Az RT_{50} kontroll szint alá csökkenése a Ca^{2+} háztartás reperfúzió alatti "overshoot"-ját tükrözheti [530]. Normál pO_2 mellett az ORM-10103 előkezelés egyáltalán nem befolyásolta a CaT-t (47. ábra), de szignifikáns hatást gyakorolt annak I/R-indukált változásaira. Bár ezek a változások a reperfúzió során váltak szignifikánssá a CaT amplitúdója (48. ábra /B) és meredeksége (48. ábra /C) fokozatosan csökkent. Az amplitúdóban megfigyelt csökkenés alapján jogosnak tűnik az az elképzelés, mely szerint a $_{rev}$NCX-mediált beat-to-beat Ca^{2+} beáramlás szerepe kritikus a iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_{SR}$ csökkenés következményeinek

dc_1149_15

kompenzálásában. További lényeges megfigyelés, hogy ORM-10103 előkezelés kivédi az iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedést (48. ábra /E), valamint az RT_{50} megnyúlását (48. ábra /D). A reperfúzió alatt ezek a paraméterek szignifikánsan tovább csökkentek, ami közvetlenül alátámasztja hipotézisünket, mely szerint I/R során az NCX blokád legjelentősebb hatása a Na^+_i-túltelődés által indukált $_{rev}$NCX aktivitásfokozódás igen hatékony gátlása **[429]**. Ezt a következtetést a strophantidines kísérletek eredményei (49. ábra) még inkább megerősítik. A strophantidin az NKA gátlásán keresztül gyorsítja a Na^+ felhalmozódást, ami a reverz NCX transzportaktivitás időtartamát is megnyújtja. Az iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_{iD}$ növekedés csaknem megduplázódott (51. ábra /E), továbbá a strophantidinnel nem előkezelt sejtekkel ellentétben, a reperfúzió alatt tovább emelkedett. ORM-10103 alkalmazásával ez az emelkedés eredményesen kivédhető volt.

Az ORM-10103 egy további igen ígéretes kardioprotektív hatását az 50. ábra demonstrálja. Strophantidinnel nem kezelt szívizomsejteken a CaT variabilitása mérsékelt (50. ábra /A), ami azt igazolja, hogy az SR Ca^{2+} felszabadulás transzmembrán Ca^{2+} fluxusokat moduláló feedback szabályozása jól működik. Ezekben a sejtekben az ORM-10103 nem okozott szignifikáns változást a variabilitásban (50. ábra /B,E). Ezzel szemben, a strophantidinnel előkezelt szívizomsejtekben a CaT variabilitása iszkémia, de különösen reperfúzió alatt nagymértékben fokozódik (50. ábra /C), ami direkt bizonyíték arra, hogy a trigger és a feed-back rendszerek között fennálló finom dinamikus egyensúly felbomlott, ami a beat-to-beat Ca^{2+} felszabadulás jelentős fluktuációihoz és a Ca^{2+} homeosztázis instabilitásához vezet **[531]**. ORM-10103 alkalmazását követően az I/R-indukált CaT variabilitás-fokozódás elmaradt (50. ábra /D,F). A kardioprotektív hatás leginkább az I/R-indukált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés markáns csökkentésével magyarázható. Mivel a nagyfokú CaT variabilitást szokás az aritmia hajlam igen érzékeny, sejtszintű indikátorának tekinteni **[532]**, az eredményekből levonható az a következtetés, hogy az ORM-10103 kezelés várhatóan számottevően csökkenti a szív I/R-indukált triggerelt aritmiáinak gyakoriságát.

AP morfológia. Az I/R-indukált aritmiák általában két, egymástól viszonylag független intracelluláris mechanizmus egyikével jönnek létre: $[Ca^{2+}]_i$ túltelődés, vagy szarkolemma depolarizáció **[523]**. A $[Ca^{2+}]^i$ túltelődés az SR Ca^{2+} tartalmának fokozott szivárgásához vezet, és így nagymértékben fokozza a spontán diasztolés Ca^{2+} felszabadulás események (sparkok) kialakulási valószínűségét **[429]**. A létrejövő Ca^{2+}-függő befelé irányuló áram (nagyrészt $_{fwd}I_{NCX}$) serkenti a súlyos kamrai aritmiák kialakulását **[275]**. Iszkémia alatt az APD szignifikánsan rövidül. A markánsan megnőtt K^+_i kiáramlás következtében létrejövő membrándepolarizáció gátolja a Na^+ és Ca^{2+} csatornák aktivitását és jelentősen lassítja a Ca^{2+}_i eltávolítását **[533]**. Ezzel szemben, a megemelkedett $[Ca^{2+}]_{iD}$, a $_{fwd}I_{NCX}$ aktiválásával, serkenti a Ca^{2+} kiáramlást. Végezetül, az ATP szint csökkenése által aktivált $I_{K(ATP)}$ további repolarizáló áramot biztosít. A Ca^{2+} és a repolarizáló K^+ áramfluxusok redisztribuciója szubsztanciálisan hozzájárulhat a reperfúzió alatti rövidtávú APD_{90} és CaT variabilitás-fokozódáshoz. Normál pO_2 mellett az ORM-10103 kezelés az AP rövidülését hozta létre (51. ábra /A), vélhetően a $_{fwd}I_{NCX}$ gátlásán keresztül. Az AP-ben további változásokat nem lehetett kimutatni. Iszkémia alatt a sejtmembrán depolarizálódott (51. ábra /B), és a csúcspotenciál eltűnt; reperfúzió során mindkét paraméter normalizálódott. Az I/R-indukált AP elváltozásokkal szemben a szívizomsejtek ORM-10103 előkezelése nem volt hatékony (51. ábra /C). A kezelés elégtelensége az iszkémiás AP változások kivédésére még inkább szembetűnő a 52. ábrán. A lényegesen alacsonyabb AP amplitúdó (52. ábra /A) és plató szint (52. ábra /B), a fokozott trianguláció (52. ábra /F) és a membránpotenciál markáns depolarizációja (52. ábra /C) az ORM-10103 kezelés ellenére lényegében változatlan maradt, az iszkémia-indukált APD csökkenés mértéke pedig nagyobb lett (52. ábra /D-E). Az ORM-10103 kezelés hatástalansága az AP aritmogén zavarainak kivédésére összetett

dc_1149_15

okokkal magyarázható. Bár az AP morfológiájának a $[Ca^{2+}]_i$ változások fontos modulátorai [534], az mégis elsősorban a befelé irányuló Na^+ és Ca^{2+} áramok, illetve a kifelé irányuló K^+ áramok egyensúlyától függ. Az ORM-10103 a késői egyenirányító K^+ áram gyors komponensének (I_{Kr}) minimális csökkentésén kívül, nincsen hatással ezekre az áramokra [524]. Ez lehet az AP szelektív NCX blokádra mutatott érzéketlenségének elsődleges magyarázata. Az ORM-10103 egyetlen jótékony hatása az AP paramétereire a fokozott reperfúzió által létrehozott magas APD_{90} variabilitás szignifikáns csökkentése (53. ábra), ami elsősorban a $Ca^{2+}{}_i$ háztartás fokozott stabilitásának köszönhető, ami vélhetően a csökkent $[Ca^{2+}]_i$ túlterhelés és alacsonyabb $[Ca^{2+}]_{iD}$ következménye [429].

A szívizomsejtek túlélése: A szelektív NCX gátlás jótékony, a szívizomsejtek I/R-indukált károsodásaival szemben kifejtett védő hatásának bizonyítására az egyik legalkalmasabb közvetlen módszer kezelt és kezeletlen szívizomsejtek túlélési arányainak összehasonlítása (45. ábra). A kísérletekben nem használtunk vitális festéket, helyette az ugyancsak jól használható, Maddaford és mts. [442] által leírt csoportosítási módszert alkalmaztuk, mely a szívizomsejtek túlélését alakjuk és harántcsíkolatuk láthatósága alapján dönti el. Ez a módszer több előnnyel is járhat; egyszerűbb, gyorsabb, a sejtfunkciókat egyáltalán nem befolyásolja, és kellő gyakorlattal a sérült vagy elpusztult szívizomsejtek megbízhatóan megkülönböztethetők a legfeljebb enyhe kontraktúrát mutató, túlélő szívizomsejtektől. Az egyértelmű eredmények igazolják hipotézisünket, mely szerint a részleges, szelektív NCX gátlás viszonylag hatékonyan védi a sejteket a végzetes I/R-indukált károsodásoktól. Bár a kísérletek a védő hatás mechanizmusára vonatkozóan nem nyújtanak információt, a védő hatás valószínű magyarázata az lehet, hogy az ORM-10103 a $_{rev}I_{NCX}$ gátlásával gátolja az I/R-indukált $Ca^{2+}{}_i$ túlterhelés kialakulását, amely utóbbi $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedéshez, kontraktúrához és mitokondrium-funkció károsodáshoz vezethet [17, 531]. A gátlás további pozitív, a sejtek túlélését elősegítő hozzájárulása CaT és az APD stabilizáló hatása lehet, a két paraméter I/R-indukált variabilitás-fokozódásának gátlásán keresztül [535].

Limitációk: A 45. ábrán látható adatok *elvileg* különböznek a 46-53. ábrákon összegzett adatoktól. A "túlélési" kísérleteket ugyanis „teljes" sejtpopulációkon végeztük – a kísérlet kezdetén a ROI kiválasztásának egyetlen lényeges kritériuma az volt, hogy a látótérben nagyrészt viszonylag ép, a feszültségstimulusra ritmusosan összehúzódó sejtek legyenek. Mind saját adataink (45. ábra), mind a korábbi irodalmi adatok [536] egyértelműen igazolják, hogy a szívizomsejtek jelentős része *nem éli túl* a szimulált iszkémia protokollt, hanem – leginkább a reperfúzió során – elpusztul. Mivel az ezáltal befejezhetetlen, egyedi sejteken végzett kísérletekből paraméterértékeket soha nem számoltunk, minden sejtszintű adat (NADH, CaT, AP) egy jól behatárolt sejtcsoportból – a túlélő sejtekből – származik.

6.4. Az NCX, NHE és NCX+NHE gátlás antiaritmiás hatásainak összehasonlítása patkányszíven regionális I/R modellben

Kiindulópont. Az akut I/R szívkárosodások magas mortalitásának egyik leggyakoribb oka életveszélyes kamrai aritmiák kialakulása. Ezek hátterében igen gyakran a $Na^+{}_i$ és $Ca^{2+}{}_i$ homeosztázis zavarai állnak, amelyek $Na^+{}_i$ felhalmozódáshoz, $Ca^{2+}{}_i$ túlterheléshez és posztiszkémiás kamrai aritmiák kialakulásához vezetnek [296]. Az adatok szerint ezek a kóros folyamatok szorosan kapcsolódnak a SL két létfontosságú iontranszportere, a pH_i és $[Ca^{2+}]_i$ homeosztázis szabályozásában kulcsszerepet játszó NHE és NCX túlműködéséhez [257, 537]. A kísérletek többségében ezek bármelyikének gátlása jelentősen csökkentette a kamrai aritmiák gyakoriságát és/vagy súlyosságát [276, 538-540]. Ezért jogos lehet az az elképzelés, hogy e transzporterek aktivitásának normalizálása farmakológiai eszközökkel perspektívikus stratégia lehet a reperfúzió-indukált aritmogenezis megelőzésére. Az NHE

dc_1149_15

gátlást, mint kardioprotektív, antiaritmiás kezelést, klinikai tesztekben már kipróbálták, de rutinszerű klinikai használatát jelentősen nehezíti, hogy az ígéretes kísérleti eredményekkel szemben, a gátlás hatékonyságára klinikai vizsgálatok során kapott adatok meglehetősen ellentmondásosak **[439]**. Mivel a humán adatok nem meggyőzőek, logikus a feltételezés, hogy az NHE gátlás összekapcsolása egy másik, ugyancsak kardioprotektív beavatkozással javíthatja annak antiaritmiás hatékonyságot. Bár az NHE gátlás kiegészítése egyidejű NCX gátlással kétségkívül elvileg fontos lehetőség, ezt a lehetőséget még nem vizsgálták.

Az NHE-vel ellentétben az NCX – az I/R-indukált aritmogenezis patomechanizmusában játszott kiemelkedő szerepe ellenére – csak az elmúlt időszakban exponálódott, mint lehetséges farmakológiai célpont **[541]**. A késlekedés egyik oka az lehet, hogy míg rendelkezésre állnak jól karakterizált, szelektív NHE gátlószerek, a szelektív NCX gátlás terápiás hatásosságának értékelését a legutóbbi időkig akadályozta a hatékony és specifikus gátlószerek hiánya, amiből kifolyólag a korai kísérleti eredmények értelmezése sokszor megbízhatatlanná vált **[236]**. Az NCX szívbetegségekben alkalmazott farmakológiai modulációjának eredményességére vonatkozó adatok hiányának másik oka a transzporter komplex és igen kevéssé tisztázott fiziológiás szabályozása; egyrészt *mindkét irányú* transzportaktivitása elengedhetetlen a szívizomsejtek fiziológiás működéséhez, másrészt *bármely irányú* transzportaktivitásának zavara szívbetegségek kialakulásához vagy progressziójához vezet **[537, 542]**. Izolált, Langendorff-perfundált patkányszíveken végzett kísérleteinkben részletesen elemeztük két NCX gátlószer, a viszonylag szelektív SEA0400 és a szelektívebb ORM-10103 hatékonyságát reperfúzió-indukált aritmiákkal szemben. A SEA400 antiaritmiás hatásaira vonatkozó kevés kísérleti adat ellentmondásos, bár nagyrészt pozitív **[275, 276, 413, 543]**, míg ORM-10103 adatok csak rövid ideje – saját laboratóriumunkból – elérhetők **[244, 544, 545]**. A SEA0400 mérsékelt LTC csatornagátló hatással rendelkezik **[236]**, az ORM-10103, bár minimális I_{Kr} gátló hatása van, a Ca^{2+} homeosztázis fontos transzportereinek aktivitását egyáltalán nem befolyásolja A cariporid kiváló szelektivitással rendelkezik, más fontos ioncsatornákra nem hat **[546, 547]**. Végső soron az NCX gátlás antiaritmiás hatékonyságát jelentősen a két pleiotrop hatás egyike sem módosíthatja. Az NCX gátlószereket önmagukban, vagy az NHE gátlóval egyidejűleg alkalmaztuk. Munkahipotézisünk szerint NCX és NHE gátlószerek egyidejű alkalmazása képes jelentősen fokozni azok külön-külön mutatott antiaritmiás hatékonyságát.

Kísérleti modell. Új hatóanyagok antiaritmiás hatékonyságának tanulmányozására gyakran alkalmaznak Langendorff-perfundált izolált szív modelleket **[548]**. Az általunk használt protokoll lényege a baloldali arteria descendens (***LAD***) leszorításával létrehozott rövid (10 perces) regionális iszkémia, és az ezt követő, ugyancsak rövid (30 perces) reperfúzió. A modell előnye, hogy rövid időtartam alatt, jól definiált körülmények között vizsgálható egy adott hatóanyag antiaritmiás hatékonysága. A modell mind a túlélés, mind a normál sinus-ritmus helyreállása szempontjából kritikus aritmiatípusa a kamrafibrilláció (VF). Kontroll szívekben, beavatkozás nélkül, a kamrafibrilláció kialakulási valószínűsége – ahogyan azt kísérleteink során mi is tapasztaltuk (54. és 56. ábrák) – általában kiemelkedően magas, csaknem 100% [538], és bár tranziens VF periódusok is gyakran megfigyelhetők, a legtöbb esetben a VF, ha egyszer kialakul, spontán nem szűnik meg; a fibrilláló szív nem képes a sinus-ritmus helyreállítására **[549]**. A kísérletek során a kamrafibrilláción kívül halmozott extraszisztolék (ES) és kamrai tachykardia (VT) is rendszeresen kialakultak.

Az NHE gátlás hatékonysága: Az NHE gátlás antiaritmiás hatékonyságát számos munkában vizsgálták. In vitro és in vivo modellekben cariporid *preiszkémiás* alkalmazása szignifikánsan csökkentette az I/R-indukált aritmogenezist **[547]**, viszont *posztiszkémiás* alkalmazása esetén, bár mind a VF gyakoriságát, mind a halálesetek számát csökkentette, a

dc_1149_15

mortalitás nem változott szignifikánsan **[418, 538, 550]**. Saját, cariporid *preiszkémiás* alkalmazásával nyert eredményeink is az előkezelés markáns antiaritmiás hatékonyságáról tanúskodnak, és támogatják az analóg vizsgálatok következtetéseit **[435, 539, 540, 551].** Mint a 55-58. ábrákon látható, a cariporid szignifikánsan növelte a normál sinus-ritmus időtartamát és – az ES_D kivételével – csökkentette az összes aritmia paraméter értékét. Antiaritmiás hatékonysága kiemelkedően magas volt a reentry típusú VT és a VF esetében is; alkalmazását követően mindkét aritmia típus csaknem teljesen megszűnt. A nagymérvű anti-VF és anti-VT hatékonyság háttere nem teljesen tisztázott. Irodalmi adatok szerint a reperfúzió korai fázisában a fokozott NHE aktivitás fokozza az APD rövidülését, s ezáltal fokozottan érzékenyíti a szívet a reentry típusú aritmiákra. Az NHE gátlása a szív aritmia érzékenységét markánsan csökkenti **[552]**, ezenkívül gyorsítja az AP terjedését és csökkenti az iszkémia-indukált AP diszperzió fokozódását **[553]**, vélhetően elsősorban a sejtek elektromos szétkapcsolásának késleltetésével. Mivel az AP diszperzió növekedése kritikus tényező a VT és a VF kialakulásában és fennmaradásában, az AP-terjedés gyorsítása és a diszperzió csökkentése fontos tényezői lehetnek a gátlószer anti-VT és anti-VF hatásának.

Az NCX gátlás antiaritmiás hatékonysága. Eredményeink szerint a *SEA0400* antiaritmiás hatékonysága nagymértékben függ az aritmiatípustól. Alkalmazásával a triggerelt aritmiák (ES) gyakorisága és időtartama (57. ábra) markánsan csökkent, de a blokád hatékonysága az aritmiamentes SR periódusok hossznövekedésére, a VF és VT kialakulásának gátlására és időtartamuk csökkentésére mérsékeltnek bizonyult (55. és 57. ábrák). Az ORM-10103 és a SEA0400 szerkezete erősen különbözik, az ORM szelektivitása jóval nagyobb **[244].** Antiaritmiás hatásaikat összehasonlítva látható, hogy az ORM-10103 mérsékelten, de a SEA0400-nál kissé jobban növelte az aritmiamentes periódusok időtartamát (55. ábra), és a SEA0400-tól eltérően, csökkentette a VF és VT gyakoriságát és időtartamát is (56. és 58. ábrák), a triggerelt aritmiákkal (ES) szemben viszont közel azonosan hatékonyak (57. ábra). Bár az eltérések a kísérletek többségében egyértelműek voltak, a nagy szórások miatt standard statisztikai eljárások alkalmazásával nem bizonyultak szignifikánsnak.

A gátlás reperfúzió-indukált aritmiákkal szemben látott aritmiatípus-függő hatékonysága komplex; ellentétes következményekkel járó tényezők kölcsönhatásának eredőjétől függ. A triggerelt aritmiákkal szembeni hatékony védelem, mint korábbi vizsgálatainkban, most is elsősorban a $_{rev}I_{NCX}$ gátlásához köthető, melynek következtében a reperfúzió-indukált $Ca^{2+}{}_i$ (túl)terhelés szignifikánsan csökken **[222, 423, 554]**. Ezzel szemben a gátlás hasonlóan jelentős védő hatásának hiánya a két másik aritmia típus (VF és VT) vonatkozásában azt mutatja, hogy ezek kialakulásának és fennmaradásának megelőzéséhez, a $Ca^{2+}{}_i$ túlterhelés csökkentésén kívül a fokozott reentry-aktivitás elnyomása is alapvető fontosságú **[543]**.

Kísérleti modellünkben kontroll szívekben az aritmia-időtartamban kiemelkedően a VF részesedése volt a legnagyobb, ami a farmakológiai vizsgálat kimenetelére döntő befolyást gyakorolt. Eredetét tekintve a VF komplex, reentry típusú aritmia; kialakulásában és fennmaradásában az AP fokozott diszperziója és a nyugalmi potenciál I/R-indukált térbeli és/vagy időbeli heterogenitása kritikus tényező. Mivel azonban az NCX gátlás kevéssé alkalmas a szív szubsztrát-dependens aritmiákkal szembeni védelmére, az NCX gátlás igen mérsékelt anti-VF hatékonysága logikus. Ezenkívül, mivel ebben az aritmia modellben az iszkémia rövid és nem teljes, a $[Ca^{2+}]_i$ iszkémia alatti és reperfúziót követő emelkedése viszonylag mérsékelt, ugyanakkor erősen heterogén. Ebből következően a $_{rev}I_{NCX}$ aktiválása valószínűleg szintén mérsékelt, de heterogén; az NCX gátlás hatása a sejtek I/R-indukált $[Ca^{2+}]_i$ (túl)terhelésére, a súlyos, tartós iszkémiával szemben, nagyon egyenlőtlen. Másrészt, mindkét NCX gátlószer csökkentette a lokális, károsodott régiókban kialakuló Ca^{2+}-függő (triggerelt) aritmiák gyakoriságát. Ez a csökkenés összhangban van az irodalmi

dc_1149_15

adatokkal, melyek az EAD-ok és DAD-ok mértékének hatékony csökkentéséről számoltak be [275]. Az NCX gátlás szignifikáns antiaritmiás hatása elsősorban olyankor várható, amikor a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése nagy és/vagy a $Ca^{2+}{}_i$ és/vagy $Ca^{2+}{}_{SR}$ túlterhelés tartós (pl. nagy területen kialakuló, teljes, vagy krónikus iszkémia esetén).

Kombinált NHE + NCX gátlás antiaritmiás hatékonysága. A vizsgálat legváratlanabb eredménye, hogy NCX gátlóval egyidejűleg alkalmazva a cariporid nem képes az NCX gátlással önmagában elért antiaritmiás védelem javítására, sőt a kombinált NCX + NHE gátlás hatékonysága általában jóval kisebb volt, mint az önmagában alkalmazott cariporid hatékonysága. A normál SR periódusok időtartamára a SEA+CAR kezelés hatása ugyanakkora volt, mint a SEA0400 hatása önmagában, sőt, ORM+CAR együttes alkalmazását követően a paraméter értéke az ORM-10103 hatásához képest még csökkent is (55. ábra). A kapott eredmények mindkét NCX gátló és mindhárom aritmiatípus esetén hasonlóak: NHE gátló + egy NCX gátló egyidejű alkalmazása nemhogy nem javította, de inkább rontotta az NCX gátlószerrel kapott mérsékelt antiaritmiás hatást. Míg az egyedi gátlószerekkel nyert eredmények teljesen logikusak, a kombinációkkal végzett kísérletek eredményei meglepőnek tűnnek. Bárki azt várhatná, hogy a kombinált gátlás antiaritmiás hatékonysága meghaladja, de legalábbis eléri bármely résztvevő egyedi hatékonyságát. Az a váratlan megfigyelés, hogy a cariporid *önmagában* szignifikánsan magasabb antiaritmiás hatékonyságot mutat, mint egy NCX gátlóval *együttesen* alkalmazva, azt mutatja, hogy ezekben a csoportokban az NCX gátlás *limitáló tényező*. A korlátozó hatás oka nem világos és tisztázása további vizsgálatokat igényel. Mindazonáltal, a látott jelenség logikus, de hipotetikus és leegyszerűsített magyarázata a következő lehet. Az adott protokollban a cariporid antiaritmiás hatása az NCX gátlás szinergikus hatásával jelentősen már nem fokozható, mivel mind az NHE, mind a $_{rev}$NCX gátlása megfelelő védelmet nyújt a $[Na^+]_i$-indukált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel szemben. Ezt a feltételezést alátámasztják az NCX gátlás és a kombinált NCX+CAR gátlás csaknem megegyező eredményei.

A cariporid csökkenő hatékonyságának magyarázata vélhetően az *aritmogén szubsztrátra* kifejtett jótékony hatásának *inaktivációja;* a kombinált csoportokban az NCX gátlószer egyedi *anti-antiaritmiás* hatással ellensúlyozta a cariporid AP diszperzió-fokozódást gátló hatását és helyreállította a szív reentry-aritmia érzékenységét. Az indirekt proaritmiás hatás nyilvánvalóan nem jelenik meg, amikor a cariporidot önmagában alkalmazzuk. A cariporid hatás eltűnése („loss of action") a SEA0400 és ORM-10103 szignifikáns $_{fwd}I_{NCX}$ gátló hatásának direkt következménye lehet. Az eredmények láttán ugyanis nagy biztonsággal feltételezhető, hogy önmagában alkalmazva a cariporid anti-VF hatása a térbeli és/vagy időbeli heterogenitás fibrilláció kiváltásához szükséges kritikus szint alá csökkentésében nyilvánul meg. Ezért a $_{fwd}I_{NCX}$ egyidejű gátlása, mivel ilyenkor a sejtek Ca^{2+} ciklusának normalizásához szükséges $Ca^{2+}{}_i$ eltávolító transzportaktivitás gátlódik, a heterogenitás növeléséhez vezethet, s így jelentős ellenkező irányú hatást fejthet ki. Ez a hatás azokban a szívizomsejtekben, melyekben az iszkémia szintja alacsony és így a $[Ca^{2+}]_i$ terhelés kisebb, vélhetően sokkal kevésbé jelentős, mint azon sejtekben, amelyekben a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés jóval nagyobb. Másrészt, az NHE gátlás hatása normális, nem iszkémiás miokardiumban nem jelenik meg, mivel normál pH_i esetén az NHE nagyrészt inaktív. Ugyanakkor az NCX gátlás kétségtelenül befolyásolja a $Ca^{2+}{}_i$ háztartást, valamint az AP kinetikáját, de az iszkémiás és nem iszkémiás miokardiumban valószínűleg eltérő hatásfokkal. Ezért a gátlószerek kombinált használata esetén a másodlagos $_{fwd}I_{NCX}$ gátlás a heterogenitás csökkentése helyett annak fokozódásához vezet, végső soron a kritikus szint fölé növelve azt, s ezáltal nagyrészt semlegesíti az NHE gátlás igen hatékony VF-gátló hatását. A hipotézis érvényességének igazolásához természetesen további kísérletek szükségesek.

dc_1149_15

Limitációk: A kísérleti protokoll fontos limitációja, hogy a gátlószereket csak egyetlen koncentrációban alkalmaztuk. Bár több koncentráció használatával a gátlás hatékonysága mellett annak koncentráció-függése is jól jellemezhető, egyetlen, optimálisan választott koncentráció is jól használható információt szolgáltat a gátlás hatékonyságáról. Sok hasonló vizsgálatban is egyetlen koncentrációt alkalmaztak egy új hatóanyag I/R károsodásokat gátló hatásának jellemzésére **[277, 555-559]**; a gátlás koncentráció-függését nem elemezték. Ezért meggyőződésünk, hogy adataink így is informatívak. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az optimális koncentráció kiválasztása kulcsfontosságú ahhoz, hogy az adatok reprezentatívak legyenek. Ezért a hatóanyagok alkalmazott koncentrációit különös gonddal állapítottuk meg – elsősorban az NCX gátlók vonatkozásában.

Az adatfeldolgozás másik lényeges limitációja, hogy tartósan szabálytalan szívritmus (VT vagy VF) esetén a reperfúzió során a hemodinamikai paraméterek korrekt meghatározása nehezebb, vagy megvalósíthatatlan. Ezért valamennyi, a reperfúziós fázisra meghatározott, a 2. táblázatban összegzett hemodinamikai adat olyan szívből származik, amelyben *nem alakult ki tartós aritmia*, vagy a leolvasás két aritmiás periódus között, *sinus-ritmussal* jellemezhető állapotban történt. Ez a kiértékelési gyakorlat, bár értékes információkkal szolgál, szisztémás hibát okozhat, ezért ezeket az adatokat kvalitatívnak kell tekinteni.

A harmadik limitáció, hogy mivel az ES és VT periódusok gyakoriság és időtartam értékeit befolyásolja a VF-mentes időtartamok hossza, reálisabb adatok nyerése érdekében a kapott összidőtartamokat a VF-mentes összidőtartamokra normáltuk. Bár az időtartamra normált értékek nem tekinthetők teljesen függetlennek, biztosan pontosabb becslést adnak a két aritmia típus VF-mentes periódusokban várható gyakoriságára és időtartamára.

Szelektív NCX gátlás – mégis perspektívikus kardioprotektív stratégia lehet?!

Bár az igéretes experimentális adatokkal szemben a másik kritikus iontranszporter, az NHE gátlásával kapcsolatos klinikai eredmények nem kielégítőek, ennek sok oka lehet, többek között az alkalmazott gátlószer nem optimális használata. Mindazonáltal, elvileg az NHE blokád kombinációja másik kardioprotektív beavatkozással jóval eredményesebb terápiás stratégiát jelenthet. Például, az egyidejű NHE *és* NCX gátlás – *megfelelő kombinációban* – mindenképpen érdekes és perspektívikus, további vizsgálatokat igénylő lehetőség, de jelen tudomásunk szerint, saját – bár ellentmondásos eredményekhez vezető – tanulmányunkat megelőzően, vagy azóta, hasonló vizsgálatra nem került sor. Ugyancsak perspektívikus stratégia lehet az NCX és/vagy NHE gátlás kombinációja LTCC, foszfolamban, esetleg a mitokondriális PTP gátlásával. Akut Ca^{2+} túltelődés kivédésére ígéretes próbálkozás lehet a $_{fwd}I_{NCX}$ fluxus szelektív gyorsítása, de ilyenkor a fokozott diasztolés depolarizáció és a triggerelt aritmiák kialakulása potenciális veszélyt jelenthet. Végül mindenképpen érdemes a gyógyszerfejlesztők figyelmét felhívni a KB-R7943-hoz hasonló farmakológiai profillal rendelkező, de annál jóval szelektívebb $_{rev}I_{NCX}$ gátlószerek viszonylag megbízhatóan megjósolható magas hatékonyságára $Ca^{2+}{}_i$ túlterhelés-indukált károsodások kivédésében.

6.5. Összegzés - következtetések

Vizsgálataink eredményeit áttekintve meggyőződéssel állíthatjuk, hogy a célkitűzésekben feltett kérdések domináns részére sikerült elfogadható, logikus választ találnunk. A Ca^{2+}-függő K^+ áramokkal kapcsolatban megállapítottuk, hogy fiziológiás körülmények között a kamrai szívizomban az I_{SK-AK} szerepe lényegében elhanyagolható, ezzel szemben fokozott $Ca^{2+}{}_i$ terhelés esetén az I_{K1} jelentősége a terminális repolarizációban és a repolarizációs rezervben szignifikánsan nő.

dc_1149_15

Vizsgálataink kiterjedtebb részének célja a Ca^{2+}-függő szívbetegségek kialakulásában és progressziójában sokszor kritikus szerepet játszó NCX működésének és szabályozásának, illetve a szelektív NCX gátlás, mint egy új, perspektívikus, antiarritmiás és kardioprotektív stratégia várható hatékonyságának elemzése és alkalmazási nehézségeinek felderítése volt. Megállapítottuk, hogy a rágcsálókban tapasztaltakkal szemben, fiziológiás körülmények között egészséges (illetve nem károsodott) szívizomsejtekben az NCX magas szintű gátlása sem befolyásolja a Ca^{2+}_i homeosztázis működését, viszont a várt jótékony pozitív inotróp hatás sem alakul ki. Megállapítottuk, hogy a szelektív NCX gátlás effektíven kivédi vagy csökkenti az I_{NaL} aktiválás következtében, vagy iszkémia/reperfúzió során kialakuló kóros, fokozott $_{rev}I_{NCX}$ aktivitás által indukált Ca^{2+}_i-túlterhelést, a túlterhelés-okozta aritmogén Ca^{2+}-spark aktivitás fokozódást, illetve triggerelt aritmiákat, továbbá számottevően javítja a sejtek túlélését. Ugyanakkor a gátlás antiaritmiás hatékonyságát behatárolja, hogy nem védi ki a nyugalmi membránpotenciálban és az akciós potenciálban kialakuló aritmogén eltolódásokat. Végül lényeges megfigyelés, hogy az elmúlt időszakban gyakran használt, de kevéssé szelektív SEA0400 és az újabb, szelektívebb ORM-10103 hatásai lényegében megegyeznek, ami visszamenőleg validálhat számos korábbi megfigyelést és megfontolást.

Mindazonáltal tisztában vagyunk azzal, hogy a feltett kérdésekre általunk megfogalmazott válaszok messze nem tekinthetők kőbe vésettnek, és azzal is, hogy számtalan igen fontos információ még egyáltalán nem érhető el. Ezért valamennyi vizsgált kérdéskörben további kísérletes és „in silico" munka szükséges az összefüggések mélyebb elemzése, a kísérleti eredmények minél eredményesebb gyakorlati, esetleg klinikai felhasználása céljából.

KUTATÁSAINK JELENTŐSÉGE, TÁVLATAI

MENNYIT ÉR?

A Medline ugyan nem válaszol közvetlenül erre a kérdésre, de segít józannak maradnunk. Ha begépelem ezt a keresőszót, *calcium: 509 488* publikáció válik elérhetővé. Ha azt, hogy *calcium+heart: 54 216*; *arrhythmia: 202 966; arrhythmia+heart: 128 919* (*2015-11-28*). Valamennyi publikáció összes szerzője mély meggyőződéssel állítja, hogy munkája fontos. Én is. Lehetséges, hogy igazunk lesz. Mennyire? Választ rá a jelen nem, csak a jövő adhat. *Addig is reménykedem: talán hozzájárultam egy csavarral a gépezethez.*

MERRE TOVÁBB?

Egy kutató ne próbáljon jósolni – nem ért hozzá! Annál is inkább, mert bár sok-sok éve szívbetegségekkel foglalkozik, mégsem klinikus. Ami viszont kutatásaim során leszűrődött bennem az, hogy a szív fantasztikusan megépített szerkezet. 80 év alatt ~ 10^8 dobbanás – szinte hiba nélkül. Sokat kell tenni, hogy elromoljon. Sajnos ez egyre gyakrabban sikerül.

Népességünk ~ 50%-a szív és érrendszeri betegségben hal meg – a kettő elválaszthatatlan. Az orvostudomány, bár a fejlődés kétségkívül óriási, folyamatosan lépéshátrányban van. A Ca^{2+}_i homeosztázis idő- és térbeli komplexitása, a párhuzamosan zajló folyamatok nagy száma és kritikus szerepe, illetve a vizsgálati és terápiás módszerekkel szemben támasztott igények szükségszerű maximalizmusa különösen nehézzé teszi az NCX(Ca^{2+}_i)-dependens szívbetegségek „egyszerű és végleges – …a teespoonful sugar and…" jellegű gyógyítását.

A magam részéről sokkal jobban hiszek az okos megelőzésben. Nem én találtam ki, de én is vallom: egészséges életmód, racionális étkezés, mindennapos mozgás és – mindennél inkább – az első számú önellenség a *stressz* maximális kiiktatása. Természetesen kellenek további eszközök: génhiba korrekció, beépíthető eszközök, műszív, végül, de nem utolsó sorban: újabb gyógyszerek és gyógyszerkombinációk. *Talán még NCX modulátorok is.*

dc_1149_15

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Újszerűnek tekinthető tudományos eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze.

1/a) Bár az SK2 csatornaprotein mind kutya, mind patkány szívizomban expresszálódik, multicelluláris preparátumokban, *fiziológiás körülmények között, az akciós potenciál apaminra nem érzékeny* még jelentősen gyöngített repolarizációs rezerv mellett sem. Kamrai szívizomsejtekben SK-AS áram magas $[Ca^{2+}]_i$ mellett sem mérhető.

1/b) Kutya kamrai szívizomsejtekben az I_{K1} szignifikánsan nagyobb magas $[Ca^{2+}]_i$, mint alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett, fiziológiás CaT esetén is. A CaMKII szelektív gátlása kivédi a $[Ca^{2+}]_i$-emelkedés indukált I_{K1} növekedést. A $[Ca^{2+}]_o$ emelését követően az I_{K1} gátlás APD_{90} nyújtó hatása és az AP triangulációja szignifikánsan nő. Hasonló irányú, de jóval mérsékeltebb változások jönnek létre humán miokardiumban. A $[Ca^{2+}]$ emelkedést követően az I_{K1} relatív hozzájárulása a kamrai repolarizációs rezervhez ugyancsak jelentősen nő.

2/a) Kutya kamrai szívizomsejtekben normoxiás körülmények között az NCX gátlás nem hoz létre szignifikáns változást az AP és a CaT morfológiájában, sem a sejtrövidülés mértékében. A gátlás a RyR2 csatornák Ca^{2+} leadását/felvételét, illetve a kontraktilis proteinek Ca^{2+}-érzékenységét sem módosítja. A $[Ca^{2+}]_i$ mérsékelt emelkedése viszont szignifikánsan csökkenti a gátlás hatékonyságát.

2/b) Patkány kamrai szívizomsejtekben normoxiás körülmények között NCX gátlás hatására a CaT amplitúdója és a sejtrövidülés mérsékelten, de szignifikánsan nő, ezzel egyidejűleg csökken az $I_{Ca,L}$ amplitúdója és az áram 50%-os inaktivációjához szükséges időtartam.

2/c) Az alkalmazott vizsgálati körülmények között a mérsékelten szelektív SEA0400 és a jóval szelektívebb ORM-10103 hatásai gyakorlatilag megegyeznek. Ez az megfigyelés *visszamenőleg validál* számos korábbi, a SEA0400 alkalmazásával nyert kísérleti eredményt és következtetést.

3/a) Kutya kamrai szívizomsejtekben az $I_{Na,L}$ aktivációját követően mind a ${}_{rev}I_{NCX}$, mind a ${}_{fwd}I_{NCX}$ nő, de a nettó töltéstranszport alig változik; szelektív NCX gátlás nem befolyásolja sem az aktivált $I_{Na,L}$ nagyságát, sem az $I_{Na,L}$-indukált APD_{90} megnyúlás és AP diszperzió növekedés mértékét, sem a CaT morfológiáját, sem a sejtrövidülést, sem a ${}_{fwd}I_{NCX}$-et reprezentáló farokáram nagyságát, de hatékonyan kivédi a magas $[Na^+]_i$ által indukált ${}_{rev}I_{NCX}$ fokozódást és szignifikánsan csökkenti a forskolin-indukált ${}_{fwd}I_{NCX}$ növekedést.

3/b) Strophantidin provokáció esetén szignifikánsan emelkedik a diasztolés Ca^{2+} sparkok száma, de szelektív NCX gátlással ez a növekedés szinte teljesen kivédhető.

dc_1149_15

4/a) Szimulált iszkémia/reperfúzió modellben, reperfúzió alatt, *strophantinnal nem kezelt* szívizomsejtekben (low-flow iszkémia modell) a CaT amplitúdója és meredeksége, valamint az RT_{50} NCX gátlás hatására szignifikánsan csökken; a gátlás az iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedés nagyságát szignifikánsan csökkenti.

Strophantinnal előkezelt sejtekben (no-flow iszkémia modell) az iszkémia-indukált $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedés jóval nagyobb mértékű; reperfúzió alatt a $[Ca^{2+}]_{iD}$ végig magas marad, továbbá a rövid távú CaT variabilitás is szignifikánsan nő. Szelektív NCX gátlás hatására az I/R indukált drasztikus $[Ca^{2+}]_{iD}$ emelkedés nagyrészt eltűnik és a variabilitás jelentős fokozódása is elmarad.

Az I/R indukált nyugalmi potenciál, APD és rövidtávú APD variabilitás változásokat az NCX gátlás legtöbbször egyáltalán nem befolyásolja, esetenként csökkenti, de soha nem védi ki, vagy nem csökkenti jelentősen.

4/b) 20 perces mérsékelt iszkémia során (low-flow modell) a szívizomsejtek nem szenvednek irreverzibilis károsodást, az elpusztult sejtek száma minimális; a 15 perces reperfúzió során viszont a kezeletlen sejtek 71%-a károsodik (kontraktúra). Ezzel szemben az ORM-10103 kezelt sejtek mindössze 47%-a szenved károsodást.

5/a) Regionális I/R protokoll alkalmazása esetén az izolált, perfundált patkányszív előkezelése NCX vagy NHE gátlóval, illetve ezek kombinációjával, nem okoz szignifikáns változást a mért hemodinamikai paraméterekben, továbbá a kísérlet egyik fázisában sem jön létre szignifikáns eltérés a *kontroll és teszt csoportok közt*.

5/b) Az NCX aktivitás gátlása csak kissé növeli a sinus-ritmussal jellemezhető periódusok időtartamát; nem befolyásolja, vagy csak mérsékelten csökkenti a VF és VT periódusok relatív időtartamát és kialakulásuk gyakoriságát; ugyanakkor a gátlás markánsan csökkenti az ES epizódok gyakoriságát, és átlagos időtartamát.

5/c) Az NHE gátlás szinte minden aritmia paraméter vonatkozásában hatékonyabb, mint a szelektív NCX gátlás; egyetlen kivétel a halmozott ES-ek relatív időtartama. Különösen nagy az eltérés a reentry jellegű aritmiák vonatkozásában.

5/d) Ha az NCX inhibitorral *egyidejűleg* NHE gátlószert is alkalmazunk, az nemhogy nem javítja, hanem sokszor rontja az NCX gátlás amúgy is igen mérsékelt antiaritmiás hatását.

dc_1149_15

8. HIVATKOZÁSOK

[1] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002 Jan 10; 415(6868): 198-205.
[2] Bers D. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force: Springer; 2001.
[3] Wier WG, Balke CW. Ca(2+) release mechanisms, Ca(2+) sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. Circ Res. 1999 Oct 29; 85(9): 770-6.
[4] Eisner DA, Choi HS, Diaz ME, O'Neill SC, Trafford AW. Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. Circ Res. 2000 Dec 8; 87(12): 1087-94.
[5] Wasserstrom JA, Vites AM. The role of Na(+)-Ca2+ exchange in activation of excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. J Physiol. 1996 Jun 1; 493 (Pt 2): 529-42.
[6] Sasaki N, Mitsuiye T, Noma A. Effects of mechanical stretch on membrane currents of single ventricular myocytes of guinea-pig heart. Jpn J Physiol. 1992; 42(6): 957-70.
[7] Coulombe A, Lefevre IA, Baro I, Coraboeuf E. Barium- and calcium-permeable channels open at negative membrane potentials in rat ventricular myocytes. J Membr Biol. 1989 Oct; 111(1): 57-67.
[8] Uehara A, Yasukochi M, Imanaga I, Nishi M, Takeshima H. Store-operated Ca2+ entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. Cell Calcium. 2002 Feb; 31(2): 89-96.
[9] Satoh S, Tanaka H, Ueda Y, Oyama J, Sugano M, Sumimoto H, et al. Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca2+ channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis. Mol Cell Biochem. 2007 Jan; 294(1-2): 205-15.
[10] Kupittayanant P, Trafford AW, Diaz ME, Eisner DA. A mechanism distinct from the L-type Ca current or Na-Ca exchange contributes to Ca entry in rat ventricular myocytes. Cell Calcium. 2006 May; 39(5): 417-23.
[11] Puglisi JL, Bassani RA, Bassani JW, Amin JN, Bers DM. Temperature and relative contributions of Ca transport systems in cardiac myocyte relaxation. Am J Physiol. 1996 May; 270(5 Pt 2): H1772-8.
[12] Hilgemann DW, Collins A, Matsuoka S. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. J Gen Physiol. 1992 Dec; 100(6): 933-61.
[13] Miyata H, Silverman HS, Sollott SJ, Lakatta EG, Stern MD, Hansford RG. Measurement of mitochondrial free Ca2+ concentration in living single rat cardiac myocytes. Am J Physiol. 1991 Oct; 261(4 Pt 2): H1123-34.
[14] Abrenica B, Gilchrist JS. Nucleoplasmic Ca(2+)loading is regulated by mobilization of perinuclear Ca(2+). Cell Calcium. 2000 Aug; 28(2): 127-36.
[15] Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Press. 2001.
[16] Eisner DA, Trafford AW, Diaz ME, Overend CL, O'Neill SC. The control of Ca release from the cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation. Cardiovasc Res. 1998 Jun; 38(3): 589-604.
[17] Diaz ME, Graham HK, O'Neill S C, Trafford AW, Eisner DA. The control of sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac muscle. Cell Calcium. 2005 Sep-Oct; 38(3-4): 391-6.
[18] Dibb KM, Eisner DA, Trafford AW. Regulation of systolic [Ca2+]i and cellular Ca2+ flux balance in rat ventricular myocytes by SR Ca2+, L-type Ca2+ current and diastolic [Ca2+]i. J Physiol. 2007 Dec 1; 585(Pt 2): 579-92.
[19] Parekh AB. Ca2+ microdomains near plasma membrane Ca2+ channels: impact on cell function. J Physiol. 2008 Jul 1; 586(13): 3043-54.
[20] Chelu MG, Wehrens XH. Sarcoplasmic reticulum calcium leak and cardiac arrhythmias. Biochem Soc Trans. 2007 Nov; 35(Pt 5): 952-6.
[21] Duan DD. A leakage leads to failure: roles of sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak via RyR2 in heart failure progression. Hypertension. Apr; 55(4): 849-51.
[22] Eisner V, Csordas G, Hajnoczky G. Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle - pivotal roles in Ca(2)(+) and reactive oxygen species signaling. J Cell Sci. Jul 15; 126(Pt 14): 2965-78.
[23] Gerasimenko JV, Sherwood M, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. NAADP, cADPR and IP3 all release Ca2+ from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. J Cell Sci. 2006 Jan 15; 119(Pt 2): 226-38.
[24] Lee D, Michalak M. Membrane associated Ca2+ buffers in the heart. BMB Rep. Mar; 43(3): 151-7.
[25] Aronsen JM, Swift F, Sejersted OM. Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling. J Mol Cell Cardiol. Aug; 61: 11-9.

dc_1149_15

[26] Szalai G, Csordas G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnoczky G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. J Biol Chem. 2000 May 19; 275(20): 15305-13.
[27] Gentile L, Stanley EF. A unified model of presynaptic release site gating by calcium channel domains. Eur J Neurosci. 2005 Jan; 21(1): 278-82.
[28] Strehler EE, Filoteo AG, Penniston JT, Caride AJ. Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. Biochem Soc Trans. 2007 Nov; 35(Pt 5): 919-22.
[29] Weber CR, Piacentino V, 3rd, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM. Na(+)-Ca(2+) exchange current and submembrane [Ca(2+)] during the cardiac action potential. Circ Res. 2002 Feb 8; 90(2): 182-9.
[30] Best JM, Kamp TJ. Different subcellular populations of L-type Ca2+ channels exhibit unique regulation and functional roles in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. Feb; 52(2): 376-87.
[31] Yang Z, Pascarel C, Steele DS, Komukai K, Brette F, Orchard CH. Na+-Ca2+ exchange activity is localized in the T-tubules of rat ventricular myocytes. Circ Res. 2002 Aug 23; 91(4): 315-22.
[32] Scriven DR, Asghari P, Moore ED. Microarchitecture of the dyad. Cardiovasc Res. May 1; 98(2): 169-76.
[33] Collins HE, Zhu-Mauldin X, Marchase RB, Chatham JC. STIM1/Orai1-mediated SOCE: current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Aug 15; 305(4): H446-58.
[34] Kawai M, Hussain M, Orchard CH. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. Am J Physiol. 1999 Aug; 277(2 Pt 2): H603-9.
[35] Kawai M, Konishi M. Measurement of sarcoplasmic reticulum calcium content in skinned mammalian cardiac muscle. Cell Calcium. 1994 Aug; 16(2): 123-36.
[36] Sheu SS, Sharma VK. Rapid report: a novel technique for quantitative measurement of free Ca2+ concentration in rat heart mitochondria. J Physiol. 1999 Jul 15; 518 (Pt 2): 577-84.
[37] McCarron JG, Chalmers S, Olson ML, Girkin JM. Subplasma membrane Ca2+ signals. IUBMB Life. Jul; 64(7): 573-85.
[38] Demuro A, Parker I. Imaging single-channel calcium microdomains by total internal reflection microscopy. Biol Res. 2004; 37(4): 675-9.
[39] Wang SQ, Wei C, Zhao G, Brochet DX, Shen J, Song LS, et al. Imaging microdomain Ca2+ in muscle cells. Circ Res. 2004 Apr 30; 94(8): 1011-22.
[40] Terracciano CM, MacLeod KT. Measurements of Ca2+ entry and sarcoplasmic reticulum Ca2+ content during the cardiac cycle in guinea pig and rat ventricular myocytes. Biophys J. 1997 Mar; 72(3): 1319-26.
[41] Livshitz L, Acsai K, Antoons G, Sipido K, Rudy Y. Data-based theoretical identification of subcellular calcium compartments and estimation of calcium dynamics in cardiac myocytes. J Physiol. Sep 15; 590(Pt 18): 4423-46.
[42] Ruiz-Baier R, Gizzi A, Rossi S, Cherubini C, Laadhari A, Filippi S, et al. Mathematical modelling of active contraction in isolated cardiomyocytes. Math Med Biol. Sep; 31(3): 259-83.
[43] Lee YS, Liu OZ, Sobie EA. Decoding myocardial Ca(2)(+) signals across multiple spatial scales: a role for sensitivity analysis. J Mol Cell Cardiol. May; 58: 92-9.
[44] Church PJ, Stanley EF. Single L-type calcium channel conductance with physiological levels of calcium in chick ciliary ganglion neurons. J Physiol. 1996 Oct 1; 496 (Pt 1): 59-68.
[45] Bers DM, Barry WH, Despa S. Intracellular Na+ regulation in cardiac myocytes. Cardiovasc Res. 2003 Mar 15; 57(4): 897-912.
[46] Silverman B, Warley A, Miller JI, James AF, Shattock MJ. Is there a transient rise in sub-sarcolemmal Na and activation of Na/K pump current following activation of I(Na) in ventricular myocardium? Cardiovasc Res. 2003 Mar 15; 57(4): 1025-34.
[47] Despa S, Kockskamper J, Blatter LA, Bers DM. Na/K pump-induced [Na](i) gradients in rat ventricular myocytes measured with two-photon microscopy. Biophys J. 2004 Aug; 87(2): 1360-8.
[48] Leem CH, Lagadic-Gossmann D, Vaughan-Jones RD. Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. J Physiol. 1999 May 15; 517 (Pt 1): 159-80.
[49] Nappi SE, Virtanen VK, Saha HH, Mustonen JT, Pasternack AI. QTc dispersion increases during hemodialysis with low-calcium dialysate. Kidney Int. 2000 May; 57(5): 2117-22.
[50] Covic A, Diaconita M, Gusbeth-Tatomir P, Covic M, Botezan A, Ungureanu G, et al. Haemodialysis increases QT(c) interval but not QT(c) dispersion in ESRD patients without manifest cardiac disease. Nephrol Dial Transplant. 2002 Dec; 17(12): 2170-7.
[51] Huang TC, Cecchin FC, Mahoney P, Portman MA. Corrected QT interval (QTc) prolongation and syncope associated with pseudohypoparathyroidism and hypocalcemia. J Pediatr. 2000 Mar; 136(3): 404-7.
[52] Genovesi S, Rivera R, Fabbrini P, Dossi C, Bonforte G, Mircoli L, et al. Dynamic QT interval analysis in uraemic patients receiving chronic haemodialysis. J Hypertens. 2003 Oct; 21(10): 1921-6.

dc_1149_15

[53] Severi S, Grandi E, Pes C, Badiali F, Grandi F, Santoro A. Calcium and potassium changes during haemodialysis alter ventricular repolarization duration: in vivo and in silico analysis. Nephrol Dial Transplant. 2008 Apr; 23(4): 1378-86.
[54] Faber GM, Rudy Y. Action potential and contractility changes in [Na(+)](i) overloaded cardiac myocytes: a simulation study. Biophys J. 2000 May; 78(5): 2392-404.
[55] Shannon TR, Wang F, Puglisi J, Weber C, Bers DM. A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte. Biophys J. 2004 Nov; 87(5): 3351-71.
[56] Bondarenko VE, Szigeti GP, Bett GC, Kim SJ, Rasmusson RL. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Sep; 287(3): H1378-403.
[57] Hoffman BF, Suckling EE. Effect of several cations on transmembrane potentials of cardiac muscle. Am J Physiol. 1956 Aug; 186(2): 317-24.
[58] Leitch SP, Brown HF. Effect of raised extracellular calcium on characteristics of the guinea-pig ventricular action potential. J Mol Cell Cardiol. 1996 Mar; 28(3): 541-51.
[59] Bai CX, Namekata I, Kurokawa J, Tanaka H, Shigenobu K, Furukawa T. Role of nitric oxide in Ca2+ sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K+ current in cardiac myocytes. Circ Res. 2005 Jan 7; 96(1): 64-72.
[60] Kass RS, Tsien RW. Control of action potential duration by calcium ions in cardiac Purkinje fibers. J Gen Physiol. 1976 May; 67(5): 599-617.
[61] Temte JV, Davis LD. Effect of calcium concentration on the transmembrane potentials of Purkinje fibers. Circ Res. 1967 Jan; 20(1): 32-44.
[62] Mazzanti M, DiFrancesco D. Intracellular Ca modulates K-inward rectification in cardiac myocytes. Pflugers Arch. 1989 Jan; 413(3): 322-4.
[63] Mazzanti M, DeFelice LJ. Ca modulates outward current through IK1 channels. J Membr Biol. 1990 Jun; 116(1): 41-5.
[64] Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg2+. Nature. 1987 Jan 8-14; 325(7000): 156-9.
[65] Isenberg G. Cardiac Purkinje fibres: [Ca2+]i controls the potassium permeability via the conductance components gK1 and gK2. Pflugers Arch. 1977 Oct 19; 371(1-2): 77-85.
[66] Schumacher MA, Rivard AF, Bachinger HP, Adelman JP. Structure of the gating domain of a Ca2+-activated K+ channel complexed with Ca2+/calmodulin. Nature. 2001 Apr 26; 410(6832): 1120-4.
[67] Johnson JP, Jr., Balser JR, Bennett PB. A novel extracellular calcium sensing mechanism in voltage-gated potassium ion channels. J Neurosci. 2001 Jun 15; 21(12): 4143-53.
[68] Nitta J, Furukawa T, Marumo F, Sawanobori T, Hiraoka M. Subcellular mechanism for Ca(2+)-dependent enhancement of delayed rectifier K+ current in isolated membrane patches of guinea pig ventricular myocytes. Circ Res. 1994 Jan; 74(1): 96-104.
[69] Tohse N. Calcium-sensitive delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular cells. Am J Physiol. 1990 Apr; 258(4 Pt 2): H1200-7.
[70] Viswanathan PC, Shaw RM, Rudy Y. Effects of IKr and IKs heterogeneity on action potential duration and its rate dependence: a simulation study. Circulation. 1999 May 11; 99(18): 2466-74.
[71] Cruzalegui FH, Kapiloff MS, Morfin JP, Kemp BE, Rosenfeld MG, Means AR. Regulation of intrasteric inhibition of the multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Dec 15; 89(24): 12127-31.
[72] Maier LS, Bers DM. Role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. Cardiovasc Res. 2007 Mar 1; 73(4): 631-40.
[73] Howe CJ, Lahair MM, McCubrey JA, Franklin RA. Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases. J Biol Chem. 2004 Oct 22; 279(43): 44573-81.
[74] Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Schulman H, Sung RJ. KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca++/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Dec; 287(3): 996-1006.
[75] Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. Circ Res. 2004 Apr 2; 94(6): e61-70.
[76] Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balser JR, Anderson ME. Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. Nat Cell Biol. 2000 Mar; 2(3): 173-7.
[77] Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). J Mol Cell Cardiol. 2001 Apr; 33(4): 625-38.
[78] Varro A, Lathrop DA, Hester SB, Nanasi PP, Papp JG. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. Basic Res Cardiol. 1993 Mar-Apr; 88(2): 93-102.
[79] Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. Circ Res. 2002 May 17; 90(9): 939-50.

dc_1149_15

[80] Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S. Ca2+-dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? Cardiovasc Res. 2005 Nov 1; 68(2): 204-12.
[81] Koumi S, Wasserstrom JA, Ten Eick RE. Beta-adrenergic and cholinergic modulation of inward rectifier K+ channel function and phosphorylation in guinea-pig ventricle. J Physiol. 1995 Aug 1; 486 (Pt 3): 661-78.
[82] Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Activation of inwardly rectifying potassium (Kir) channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2): interaction with other regulatory ligands. Prog Biophys Mol Biol. 2007 Jul; 94(3): 320-35.
[83] Levitan I. Cholesterol and Kir channels. IUBMB Life. 2009 Aug; 61(8): 781-90.
[84] Matsuda H, Cruz Jdos S. Voltage-dependent block by internal Ca2+ ions of inwardly rectifying K+ channels in guinea-pig ventricular cells. J Physiol. 1993 Oct; 470: 295-311.
[85] Delmar M, Ibarra J, Davidenko J, Lorente P, Jalife J. Dynamics of the background outward current of single guinea pig ventricular myocytes. Ionic mechanisms of hysteresis in cardiac cells. Circ Res. 1991 Nov; 69(5): 1316-26.
[86] Zaza A, Rocchetti M, Brioschi A, Cantadori A, Ferroni A. Dynamic Ca2+-induced inward rectification of K+ current during the ventricular action potential. Circ Res. 1998 May 18; 82(9): 947-56.
[87] Nichols CG, Lederer WJ. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. Am J Physiol. 1991 Dec; 261(6 Pt 2): H1675-86.
[88] Ruiz Petrich E, Leblanc N, deLorenzi F, Allard Y, Schanne OF. Effects of K+ channel blockers on the action potential of hypoxic rabbit myocardium. Br J Pharmacol. 1992 Aug; 106(4): 924-30.
[89] Ruiz Petrich E, Ponce Zumino A, Schanne OF. Early action potential shortening in hypoxic hearts: role of chloride current(s) mediated by catecholamine release. J Mol Cell Cardiol. 1996 Feb; 28(2): 279-90.
[90] Baiardi G, Zumino AP, Petrich ER. Effects of barium and 5-hydroxydecanoate on the electrophysiologic response to acute regional ischemia and reperfusion in rat hearts. Mol Cell Biochem. 2003 Dec; 254(1-2): 185-91.
[91] Muramatsu H, Sato R, Okumura H. Early increase in K+ conductance during metabolic inhibition by cyanide in guinea pig ventricular myocytes. Nippon Ika Daigaku Zasshi. 1990 Aug; 57(4): 308-21.
[92] Piao L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Cardiac IK1 underlies early action potential shortening during hypoxia in the mouse heart. J Mol Cell Cardiol. 2007 Jul; 43(1): 27-38.
[93] Park WS, Han J, Kim N, Ko JH, Kim SJ, Earm YE. Activation of inward rectifier K+ channels by hypoxia in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Dec; 289(6): H2461-7.
[94] Dipp M, Nye PC, Evans AM. Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Aug; 281(2): L318-25.
[95] Wettwer E, Hala O, Christ T, Heubach JF, Dobrev D, Knaut M, et al. Role of IKur in controlling action potential shape and contractility in the human atrium: influence of chronic atrial fibrillation. Circulation. 2004 Oct 19; 110(16): 2299-306.
[96] Biliczki P, Virag L, Iost N, Papp JG, Varro A. Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve. Br J Pharmacol. 2002 Oct; 137(3): 361-8.
[97] Delmar M, Glass L, Michaels DC, Jalife J. Ionic basis and analytical solution of the wenckebach phenomenon in guinea pig ventricular myocytes. Circ Res. 1989 Sep; 65(3): 775-88.
[98] Sorota S. Insights into the structure, distribution and function of the cardiac chloride channels. Cardiovasc Res. 1999 May; 42(2): 361-76.
[99] Colinas O, Gallego M, Setien R, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT, Casis O. Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Oct; 291(4): H1978-87.
[100] Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Schrader LA, Wu GY, Gatchel JR, et al. Calcium-calmodulin-dependent kinase II modulates Kv4.2 channel expression and upregulates neuronal A-type potassium currents. J Neurosci. 2004 Apr 7; 24(14): 3643-54.
[101] Fedida D, Shimoni Y, Giles WR. Alpha-adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. J Physiol. 1990 Apr; 423: 257-77.
[102] Nakamura TY, Coetzee WA, Vega-Saenz De Miera E, Artman M, Rudy B. Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K+ current, by PKC. Am J Physiol. 1997 Oct; 273(4 Pt 2): H1775-86.

dc_1149_15

[103] Sergeant GP, Ohya S, Reihill JA, Perrino BA, Amberg GC, Imaizumi Y, et al. Regulation of Kv4.3 currents by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Feb; 288(2): C304-13.
[104] Roeper J, Lorra C, Pongs O. Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K+ channel KV1.4 regulated by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase. J Neurosci. 1997 May 15; 17(10): 3379-91.
[105] Nanasi PP, Knilans TK, Richards IS, Varro A, Lathrop DA. Biphasic effect of tetraethylammonium on canine purkinje fibre action potential configuration. Gen Pharmacol. 1992 Jul; 23(4): 733-8.
[106] Dong M, Yan S, Chen Y, Niklewski PJ, Sun X, Chenault K, et al. Role of the transient outward current in regulating mechanical properties of canine ventricular myocytes. J Cardiovasc Electrophysiol. 2010 Jun 1; 21(6): 697-703.
[107] Sun X, Wang HS. Role of the transient outward current (Ito) in shaping canine ventricular action potential--a dynamic clamp study. J Physiol. 2005 Apr 15; 564(Pt 2): 411-9.
[108] Dong M, Sun X, Prinz AA, Wang HS. Effect of simulated I(to) on guinea pig and canine ventricular action potential morphology. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Aug; 291(2): H631-7.
[109] Bassani RA, Altamirano J, Puglisi JL, Bers DM. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca2+ reloading in mammalian ventricular myocytes. J Physiol. 2004 Sep 1; 559(Pt 2): 593-609.
[110] Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM. Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. J Physiol. 1996 Jun 15; 493 (Pt 3): 733-46.
[111] Sah R, Ramirez RJ, Kaprielian R, Backx PH. Alterations in action potential profile enhance excitation-contraction coupling in rat cardiac myocytes. J Physiol. 2001 May 15; 533(Pt 1): 201-14.
[112] Bassani RA. Transient outward potassium current and Ca2+ homeostasis in the heart: beyond the action potential. Braz J Med Biol Res. 2006 Mar; 39(3): 393-403.
[113] Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I(to)) in normal and diseased myocardium. J Mol Cell Cardiol. 2001 May; 33(5): 851-72.
[114] Shibata EF, Drury T, Refsum H, Aldrete V, Giles W. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. Am J Physiol. 1989 Dec; 257(6 Pt 2): H1773-81.
[115] Mubagwa K, Flameng W, Carmeliet E. Resting and action potentials of nonischemic and chronically ischemic human ventricular muscle. J Cardiovasc Electrophysiol. 1994 Aug; 5(8): 659-71.
[116] Apkon M, Nerbonne JM. Alpha 1-adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent K+ current in rat ventricular myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Nov; 85(22): 8756-60.
[117] Virag L, Jost N, Papp R, Koncz I, Kristof A, Kohajda Z, et al. Analysis of the contribution of Ito to repolarization in canine ventricular myocardium. Br J Pharmacol. Mar 17.
[118] Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of external Ca2+ and K+ in gating of cardiac delayed rectifier K+ currents. Pflugers Arch. 1992 Feb; 420(2): 180-6.
[119] Shamgar L, Ma L, Schmitt N, Haitin Y, Peretz A, Wiener R, et al. Calmodulin is essential for cardiac IKS channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. Circ Res. 2006 Apr 28; 98(8): 1055-63.
[120] Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. Circ Res. 2006 Apr 28; 98(8): 1048-54.
[121] Walsh KB, Kass RS. Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed IK by protein kinases A and C. Am J Physiol. 1991 Dec; 261(6 Pt 1): C1081-90.
[122] Rigg L, Mattick PA, Heath BM, Terrar DA. Modulation of the hyperpolarization-activated current (I(f)) by calcium and calmodulin in the guinea-pig sino-atrial node. Cardiovasc Res. 2003 Feb; 57(2): 497-504.
[123] Hagiwara N, Irisawa H. Modulation by intracellular Ca2+ of the hyperpolarization-activated inward current in rabbit single sino-atrial node cells. J Physiol. 1989 Feb; 409: 121-41.
[124] Eisner DA, Vaughan-Jones RD. Do calcium-activated potassium channels exist in the heart? Cell Calcium. 1983 Dec; 4(5-6): 371-86.
[125] Schetz JA, Anderson PA. Pharmacology of the high-affinity apamin receptor in rabbit heart. Cardiovasc Res. 1995 Nov; 30(5): 755-62.
[126] Feletou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? Br J Pharmacol. 2009 Feb; 156(4): 545-62.
[127] Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Oct 14; 94(21): 11651-6.
[128] Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, Kaczmarek LK. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 30; 94(20): 11013-8.

dc_1149_15

[129] Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, et al. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. Science. 1996 Sep 20; 273(5282): 1709-14.
[130] Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, et al. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. Nature. 1998 Oct 1; 395(6701): 503-7.
[131] Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, et al. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. J Biol Chem. 1999 Feb 26; 274(9): 5746-54.
[132] Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, et al. Differential expression of small-conductance Ca2+-activated K+ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Dec; 289(6): H2714-23.
[133] Joiner WJ, Khanna R, Schlichter LC, Kaczmarek LK. Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca2+-activated K+ channels. J Biol Chem. 2001 Oct 12; 276(41): 37980-5.
[134] Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, et al. Molecular identification and functional roles of a Ca(2+)-activated K+ channel in human and mouse hearts. J Biol Chem. 2003 Dec 5; 278(49): 49085-94.
[135] Lu L, Zhang Q, Timofeyev V, Zhang Z, Young JN, Shin HS, et al. Molecular coupling of a Ca2+-activated K+ channel to L-type Ca2+ channels via alpha-actinin2. Circ Res. 2007 Jan 5; 100(1): 112-20.
[136] Zhang Q, Timofeyev V, Lu L, Li N, Singapuri A, Long MK, et al. Functional roles of a Ca2+-activated K+ channel in atrioventricular nodes. Circ Res. 2008 Feb 29; 102(4): 465-71.
[137] Li N, Timofeyev V, Tuteja D, Xu D, Lu L, Zhang Q, et al. Ablation of a Ca2+-activated K+ channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation. J Physiol. 2009 Mar 1; 587(Pt 5): 1087-100.
[138] Chua SK, Chang PC, Maruyama M, Turker I, Shinohara T, Shen MJ, et al. Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel and Recurrent Ventricular Fibrillation in Failing Rabbit Ventricles. Circ Res. 2011 Feb 24.
[139] Ringer S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. J Physiol. 1883 Jan; 4(1): 29-42 3.
[140] Daly Ide B, Clark AJ. The action of ions upon the frog's heart. J Physiol. 1921 Mar 15; 54(5-6): 367-83.
[141] Wilbrandt W, Heimann H. [Not Available.]. Helv Physiol Pharmacol Acta. 1948; 6(5): 750-64.
[142] Luttgau HC, Niedergerke R. The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. J Physiol. 1958 Oct 31; 143(3): 486-505.
[143] Reuter H, Seitz N. The ionic dependence of calcium efflux from guinea pig auricles. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol. 1968; 259(2): 190.
[144] Kofuji P, Lederer WJ, Schulze DH. Mutually exclusive and cassette exons underlie alternatively spliced isoforms of the Na/Ca exchanger. J Biol Chem. 1994 Feb 18; 269(7): 5145-9.
[145] Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. Tissue specificity and alternative splicing of the Na+/Ca2+ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. Am J Physiol. 1997 Apr; 272(4 Pt 1): C1250-61.
[146] He S, Ruknudin A, Bambrick LL, Lederer WJ, Schulze DH. Isoform-specific regulation of the Na+/Ca2+ exchanger in rat astrocytes and neurons by PKA. J Neurosci. 1998 Jul 1; 18(13): 4833-41.
[147] Blaustein MP, Charpentier TH, Weber DJ. Getting a grip on calcium regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007 November 20, 2007; 104(47): 18349-50.
[148] Durkin JT, Ahrens DC, Pan YC, Reeves JP. Purification and amino-terminal sequence of the bovine cardiac sodium-calcium exchanger: evidence for the presence of a signal sequence. Arch Biochem Biophys. 1991 Nov 1; 290(2): 369-75.
[149] Hryshko LV, Nicoll DA, Weiss JN, Philipson KD. Biosynthesis and initial processing of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca2+ exchanger. Biochim Biophys Acta. 1993 Sep 5; 1151(1): 35-42.
[150] Schwarz EM, Benzer S. Calx, a Na-Ca exchanger gene of Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 16; 94(19): 10249-54.
[151] Nicoll DA, Ottolia M, Lu L, Lu Y, Philipson KD. A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na+-Ca2+ exchanger. J Biol Chem. 1999 Jan 8; 274(2): 910-7.
[152] Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca2+ exchanger. Science. 1990 Oct 26; 250(4980): 562-5.
[153] Li Z, Nicoll DA, Collins A, Hilgemann DW, Filoteo AG, Penniston JT, et al. Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca2+ exchanger. J Biol Chem. 1991 Jan 15; 266(2): 1014-20.

dc_1149_15

[154] Nicoll DA, Sawaya MR, Kwon S, Cascio D, Philipson KD, Abramson J. The crystal structure of the primary Ca2+ sensor of the Na+/Ca2+ exchanger reveals a novel Ca2+ binding motif. J Biol Chem. 2006 Aug 4; 281(31): 21577-81.
[155] Besserer GM, Ottolia M, Nicoll DA, Chaptal V, Cascio D, Philipson KD, et al. The second Ca2+-binding domain of the Na+ Ca2+ exchanger is essential for regulation: crystal structures and mutational analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Nov 20; 104(47): 18467-72.
[156] Hilge M, Aelen J, Vuister GW. Ca2+ regulation in the Na+/Ca2+ exchanger involves two markedly different Ca2+ sensors. Mol Cell. 2006 Apr 7; 22(1): 15-25.
[157] Khananshvili D. Distinction between the two basic mechanisms of cation transport in the cardiac Na(+)-Ca2+ exchange system. Biochemistry. 1990 Mar 13; 29(10): 2437-42.
[158] Hilgemann DW, Nicoll DA, Philipson KD. Charge movement during Na+ translocation by native and cloned cardiac Na+/Ca2+ exchanger. Nature. 1991 Aug 22; 352(6337): 715-8.
[159] Pitts BJ. Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. Coupling to the sodium pump. J Biol Chem. 1979 Jul 25; 254(14): 6232-5.
[160] Fujioka Y, Komeda M, Matsuoka S. Stoichiometry of Na+-Ca2+ exchange in inside-out patches excised from guinea-pig ventricular myocytes. J Physiol. 2000 Mar 1; 523 Pt 2: 339-51.
[161] Dong H, Dunn J, Lytton J. Stoichiometry of the Cardiac Na+/Ca2+ exchanger NCX1.1 measured in transfected HEK cells. Biophys J. 2002 Apr; 82(4): 1943-52.
[162] Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. J Physiol. 1987 Mar; 384: 199-222.
[163] Chapman RA, Coray A, McGuigan JA. Sodium/calcium exchange in mammalian ventricular muscle: a study with sodium-sensitive micro-electrodes. J Physiol. 1983 Oct; 343: 253-76.
[164] Hilgemann DW. Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. Annu Rev Physiol. 1997; 59: 193-220.
[165] Matsuoka S, Hilgemann DW. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Ion and voltage dependencies of the transport cycle. J Gen Physiol. 1992 Dec; 100(6): 963-1001.
[166] Kappl M, Hartung K. Rapid charge translocation by the cardiac Na(+)-Ca2+ exchanger after a Ca2+ concentration jump. Biophys J. 1996 Nov; 71(5): 2473-85.
[167] Grantham CJ, Cannell MB. Ca2+ influx during the cardiac action potential in guinea pig ventricular myocytes. Circ Res. 1996 Aug; 79(2): 194-200.
[168] duBell WH, Boyett MR, Spurgeon HA, Talo A, Stern MD, Lakatta EG. The cytosolic calcium transient modulates the action potential of rat ventricular myocytes. J Physiol. 1991 May; 436: 347-69.
[169] Bers DM, Weber CR. Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes. Ann N Y Acad Sci. 2002 Nov; 976: 500-12.
[170] Despa S, Brette F, Orchard CH, Bers DM. Na/Ca exchange and Na/K-ATPase function are equally concentrated in transverse tubules of rat ventricular myocytes. Biophys J. 2003 Nov; 85(5): 3388-96.
[171] Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. Circ Res. 1994 Jun; 74(6): 1071-96.
[172] Noble D, Noble SJ, Bett GC, Earm YE, Ho WK, So IK. The role of sodium-calcium exchange during the cardiac action potential. Ann N Y Acad Sci. 1991; 639: 334-53.
[173] Janvier NC, Harrison SM, Boyett MR. The role of inward Na(+)-Ca2+ exchange current in the ferret ventricular action potential. J Physiol. 1997 Feb 1; 498 (Pt 3): 611-25.
[174] Armoundas AA, Hobai IA, Tomaselli GF, Winslow RL, O'Rourke B. Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. Circ Res. 2003 Jul 11; 93(1): 46-53.
[175] Weber CR, Ginsburg KS, Bers DM. Cardiac submembrane [Na+] transients sensed by Na+-Ca2+ exchange current. Circ Res. 2003 May 16; 92(9): 950-2.
[176] Shannon TR, Bers DM. Integrated Ca2+ management in cardiac myocytes. Ann N Y Acad Sci. 2004 May; 1015: 28-38.
[177] Greenstein JL, Hinch R, Winslow RL. Mechanisms of excitation-contraction coupling in an integrative model of the cardiac ventricular myocyte. Biophys J. 2006 Jan 1; 90(1): 77-91.
[178] Sher AA, Noble PJ, Hinch R, Gavaghan DJ, Noble D. The role of the Na+/Ca2+ exchangers in Ca2+ dynamics in ventricular myocytes. Prog Biophys Mol Biol. 2008 Jan-Apr; 96(1-3): 377-98.
[179] Ju YK, Allen DG. Intracellular calcium and Na+-Ca2+ exchange current in isolated toad pacemaker cells. J Physiol. 1998 Apr 1; 508 (Pt 1): 153-66.
[180] Huser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca2+ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. J Physiol. 2000 Apr 15; 524 Pt 2: 415-22.

dc_1149_15

[181] Rigg L, Heath BM, Cui Y, Terrar DA. Localisation and functional significance of ryanodine receptors during beta-adrenoceptor stimulation in the guinea-pig sino-atrial node. Cardiovasc Res. 2000 Nov; 48(2): 254-64.
[182] Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. Circ Res. 2001 Jun 22; 88(12): 1254-8.
[183] Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG. beta-Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca(2+) release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. Circ Res. 2002 Jan 11; 90(1): 73-9.
[184] Bucchi A, Baruscotti M, Robinson RB, DiFrancesco D. I(f)-dependent modulation of pacemaker rate mediated by cAMP in the presence of ryanodine in rabbit sino-atrial node cells. J Mol Cell Cardiol. 2003 Aug; 35(8): 905-13.
[185] Kang TM, Hilgemann DW. Multiple transport modes of the cardiac Na+/Ca2+ exchanger. Nature. 2004 Feb 5; 427(6974): 544-8.
[186] Sanders L, Rakovic S, Lowe M, Mattick PA, Terrar DA. Fundamental importance of Na+-Ca2+ exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sino-atrial node. J Physiol. 2006 Mar 15; 571(Pt 3): 639-49.
[187] Allen TJ. The effects of manganese and changes in internal calcium on Na-Ca exchange fluxes in the intact squid giant axon. Biochim Biophys Acta. 1990 Nov 30; 1030(1): 101-10.
[188] Allen TJ, Baker PF. Intracellular Ca indicator Quin-2 inhibits Ca2+ inflow via Na/Ca exchange in squid axon. Nature. 1985 Jun 27-Jul 3; 315(6022): 755-6.
[189] DiPolo R. Calcium influx in internally dialyzed squid giant axons. J Gen Physiol. 1979 Jan; 73(1): 91-113.
[190] DiPolo R, Beauge L, Rojas H. In dialyzed squid axons Ca2+i activates Ca2+o-Na+i and Na+o-Na+i exchanges in the absence of Ca chelating agents. Biochim Biophys Acta. 1989 Jan 30; 978(2): 328-32.
[191] Fujioka Y, Hiroe K, Matsuoka S. Regulation kinetics of Na+-Ca2+ exchange current in guinea-pig ventricular myocytes. J Physiol. 2000 Dec 15; 529 Pt 3: 611-23.
[192] Miura Y, Kimura J. Sodium-calcium exchange current. Dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. J Gen Physiol. 1989 Jun; 93(6): 1129-45.
[193] Trac M, Dyck C, Hnatowich M, Omelchenko A, Hryshko LV. Transport and regulation of the cardiac Na(+)-Ca2+ exchanger, NCX1. Comparison between Ca2+ and Ba2+. J Gen Physiol. 1997 Mar; 109(3): 361-9.
[194] Condrescu M, Chernaya G, Kalaria V, Reeves JP. Barium influx mediated by the cardiac sodium-calcium exchanger in transfected Chinese hamster ovary cells. J Gen Physiol. 1997 Jan; 109(1): 41-51.
[195] Doering AE, Lederer WJ. The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. J Physiol. 1993 Jul; 466: 481-99.
[196] Espinosa-Tanguma R, DeSantiago J, Rasgado-Flores H. Alpha-chymotrypsin deregulation of the sodium-calcium exchanger in barnacle muscle cells. Am J Physiol. 1993 Oct; 265(4 Pt 1): C1118-27.
[197] Blaustein MP, Santiago EM. Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons. Biophys J. 1977 Oct; 20(1): 79-111.
[198] DiPolo R, Beauge L. In squid axons, ATP modulates Na+-Ca2+ exchange by a Ca2+i-dependent phosphorylation. Biochim Biophys Acta. 1987 Mar 12; 897(3): 347-54.
[199] Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na+,Ca2+ exchange and KATP potassium channels by PIP2. Science. 1996 Aug 16; 273(5277): 956-9.
[200] Ballard C, Mozaffari M, Schaffer S. Signal transduction mechanism for the stimulation of the sarcolemmal Na(+)-Ca2+ exchanger by insulin. Mol Cell Biochem. 1994 Jun 15; 135(1): 113-9.
[201] Ballard C, Schaffer S. Stimulation of the Na+/Ca2+ exchanger by phenylephrine, angiotensin II and endothelin 1. J Mol Cell Cardiol. 1996 Jan; 28(1): 11-7.
[202] Ginsburg KS, Bers DM. Isoproterenol does not enhance Ca-dependent Na/Ca exchange current in intact rabbit ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2005 Dec; 39(6): 972-81.
[203] Chen Z, Jones LR, O'Brian JJ, Moorman JR, Cala SE. Structural domains in phospholemman: a possible role for the carboxyl terminus in channel inactivation. Circ Res. 1998 Feb 23; 82(3): 367-74.
[204] Bossuyt J, Despa S, Martin JL, Bers DM. Phospholemman phosphorylation alters its fluorescence resonance energy transfer with the Na/K-ATPase pump. J Biol Chem. 2006 Oct 27; 281(43): 32765-73.
[205] Tadros GM, Zhang XQ, Song J, Carl LL, Rothblum LI, Tian Q, et al. Effects of Na(+)/Ca(2+) exchanger downregulation on contractility and [Ca(2+)](i) transients in adult rat myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Oct; 283(4): H1616-26.

dc_1149_15

[206] Zhang XQ, Song J, Rothblum LI, Lun M, Wang X, Ding F, et al. Overexpression of Na+/Ca2+ exchanger alters contractility and SR Ca2+ content in adult rat myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Nov; 281(5): H2079-88.
[207] Seidler T, Miller SL, Loughrey CM, Kania A, Burow A, Kettlewell S, et al. Effects of adenovirus-mediated sorcin overexpression on excitation-contraction coupling in isolated rabbit cardiomyocytes. Circ Res. 2003 Jul 25; 93(2): 132-9.
[208] Smith GL, Elliott EE, Kettlewell S, Currie S, Quinn FR. Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in a rabbit model of myocardial infarction. J Cardiovasc Electrophysiol. 2006 May; 17 Suppl 1: S57-S63.
[209] Schulze DH, Muqhal M, Lederer WJ, Ruknudin AM. Sodium/calcium exchanger (NCX1) macromolecular complex. J Biol Chem. 2003 Aug 1; 278(31): 28849-55.
[210] Wakabayashi S, Goshima K. Comparison of kinetic characteristics of Na+-Ca2+ exchange in sarcolemma vesicles and cultured cells from chick heart. Biochim Biophys Acta. 1981 Jul 20; 645(2): 311-7.
[211] Trosper TL, Philipson KD. Effects of divalent and trivalent cations on Na+-Ca2+ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. Biochim Biophys Acta. 1983 May 26; 731(1): 63-8.
[212] Iwamoto T, Pan Y, Nakamura TY, Wakabayashi S, Shigekawa M. Protein kinase C-dependent regulation of Na+/Ca2+ exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. Biochemistry. 1998 Dec 8; 37(49): 17230-8.
[213] Watanabe Y, Matsuoka I, Kimura J. Chronic administration of amiodarone does not affect Na+/Ca2+ exchange current in guinea pig cardiac ventricular myocytes. Jpn J Pharmacol. 2002 Sep; 90(1): 21-7.
[214] Yatani A, Brown AM, Schwartz A. Bepridil block of cardiac calcium and sodium channels. J Pharmacol Exp Ther. 1986 Apr; 237(1): 9-17.
[215] Cohen CJ, Spires S, Van Skiver D. Block of T-type Ca channels in guinea pig atrial cells by antiarrhythmic agents and Ca channel antagonists. J Gen Physiol. 1992 Oct; 100(4): 703-28.
[216] Wang JC, Kiyosue T, Kiriyama K, Arita M. Bepridil differentially inhibits two delayed rectifier K(+) currents, I(Kr) and I(Ks), in guinea-pig ventricular myocytes. Br J Pharmacol. 1999 Dec; 128(8): 1733-8.
[217] Berger F, Borchard U, Hafner D. Effects of the calcium entry blocker bepridil on repolarizing and pacemaker currents in sheep cardiac Purkinje fibres. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1989 Jun; 339(6): 638-46.
[218] Hara Y, Nakaya H. SD-3212, a new class I and IV antiarrhythmic drug: a potent inhibitor of the muscarinic acetylcholine-receptor-operated potassium current in guinea-pig atrial cells. Br J Pharmacol. 1995 Nov; 116(6): 2750-6.
[219] Mori K, Kobayashi S, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Inhibitory effects of class I and IV antiarrhythmic drugs on the Na+-activated K+ channel current in guinea pig ventricular cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1998 Dec; 358(6): 641-8.
[220] Chin TK, Spitzer KW, Philipson KD, Bridge JH. The effect of exchanger inhibitory peptide (XIP) on sodium-calcium exchange current in guinea pig ventricular cells. Circ Res. 1993 Mar; 72(3): 497-503.
[221] Hobai IA, Maack C, O'Rourke B. Partial inhibition of sodium/calcium exchange restores cellular calcium handling in canine heart failure. Circ Res. 2004 Aug 6; 95(3): 292-9.
[222] Hobai IA, O'Rourke B. The potential of Na+/Ca2+ exchange blockers in the treatment of cardiac disease. Expert Opin Investig Drugs. 2004 Jun; 13(6): 653-64.
[223] Pignataro G, Tortiglione A, Scorziello A, Giaccio L, Secondo A, Severino B, et al. Evidence for a protective role played by the Na+/Ca2+ exchanger in cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in male rats. Neuropharmacology. 2004 Mar; 46(3): 439-48.
[224] Hiller R, Shpak C, Shavit G, Shpak B, Khananshvili D. An unknown endogenous inhibitor of Na/Ca exchange can enhance the cardiac muscle contractility. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Oct 14; 277(1): 138-46.
[225] Shpak C, Hiller R, Shpak B, Boyman L, Khananshvili D. The low molecular weight inhibitor of NCX1 interacts with a cytosolic domain that differs from the ion-transport site of the Na/Ca exchanger. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Nov 26; 324(4): 1346-51.
[226] Boyman L, Hiller R, Shpak B, Yomtov E, Shpak C, Khananshvili D. Advanced procedures for separation and analysis of low molecular weight inhibitor (NCXIF) of the cardiac sodium-calcium exchanger. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Nov 25; 337(3): 936-43.
[227] Khananshvili D, Baazov D, Weil-Maslansky E, Shaulov G, Mester B. Rapid interaction of FRCRCFa with the cytosolic side of the cardiac sarcolemma Na(+)-Ca2+ exchanger blocks the ion transport without preventing the binding of either sodium or calcium. Biochemistry. 1996 Dec 10; 35(49): 15933-40.

dc_1149_15

[228] Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na+/Ca2+ exchange in cells expressing NCX1. J Biol Chem. 1996 Sep 13; 271(37): 22391-7.
[229] Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the Na+/Ca2+ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. Br J Pharmacol. 1996 Oct; 119(3): 555-63.
[230] Amran MS, Homma N, Hashimoto K. Pharmacology of KB-R7943: a Na+-Ca2+ exchange inhibitor. Cardiovasc Drug Rev. 2003 Winter; 21(4): 255-76.
[231] Kraft R. The Na+/Ca2+ exchange inhibitor KB-R7943 potently blocks TRPC channels. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Sep 14; 361(1): 230-6.
[232] Santo-Domingo J, Vay L, Hernandez-Sanmiguel E, Lobaton CD, Moreno A, Montero M, et al. The plasma membrane Na+/Ca2+ exchange inhibitor KB-R7943 is also a potent inhibitor of the mitochondrial Ca2+ uniporter. Br J Pharmacol. 2007 Jul; 151(5): 647-54.
[233] Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, et al. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na+-Ca2+ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. J Pharmacol Exp Ther. 2001 Jul; 298(1): 249-56.
[234] Matsuda T, Koyama Y, Baba A. Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca(2+) for drug development: pharmacology of SEA0400, a specific inhibitor of the Na(+)-Ca(2+) exchanger. J Pharmacol Sci. 2005 Mar; 97(3): 339-43.
[235] Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. Br J Pharmacol. 2002 Mar; 135(5): 1096-100.
[236] Birinyi P, Acsai K, Banyasz T, Toth A, Horvath B, Virag L, et al. Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na+/Ca2+ exchange current and L-type Ca2+ current in canine ventricular cardiomyocytes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005 Jul; 372(1): 63-70.
[237] Iwamoto T, Inoue Y, Ito K, Sakaue T, Kita S, Katsuragi T. The exchanger inhibitory peptide region-dependent inhibition of Na+/Ca2+ exchange by SN-6 [2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester], a novel benzyloxyphenyl derivative. Mol Pharmacol. 2004 Jul; 66(1): 45-55.
[238] Iwamoto T, Kita S. Development and application of Na+/Ca2+ exchange inhibitors. Mol Cell Biochem. 2004 Apr; 259(1-2): 157-61.
[239] Kuramochi T, Kakefuda A, Yamada H, Tsukamoto I, Taguchi T, Sakamoto S. Discovery of an N-(2-aminopyridin-4-ylmethyl)nicotinamide derivative: a potent and orally bioavailable NCX inhibitor. Bioorg Med Chem. 2005 Jun 2; 13(12): 4022-36.
[240] Iwamoto T, Kita S. YM-244769, a novel Na+/Ca2+ exchange inhibitor that preferentially inhibits NCX3, efficiently protects against hypoxia/reoxygenation-induced SH-SY5Y neuronal cell damage. Mol Pharmacol. 2006 Dec; 70(6): 2075-83.
[241] Iwamoto T, Kita S, Uehara A, Imanaga I, Matsuda T, Baba A, et al. Molecular determinants of Na+/Ca2+ exchange (NCX1) inhibition by SEA0400. J Biol Chem. 2004 Feb 27; 279(9): 7544-53.
[242] Bouchard R, Omelchenko A, Le HD, Choptiany P, Matsuda T, Baba A, et al. Effects of SEA0400 on mutant NCX1.1 Na+-Ca2+ exchangers with altered ionic regulation. Mol Pharmacol. 2004 Mar; 65(3): 802-10.
[243] Lee C, Visen NS, Dhalla NS, Le HD, Isaac M, Choptiany P, et al. Inhibitory profile of SEA0400 [2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline] assessed on the cardiac Na+-Ca2+ exchanger, NCX1.1. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Nov; 311(2): 748-57.
[244] Jost N, Nagy N, Corici C, Kohajda Z, Horvath A, Acsai K, et al. ORM-10103, a novel specific inhibitor of the Na+/Ca2+ exchanger, decreases early and delayed afterdepolarizations in the canine heart. Br J Pharmacol. 2013 Oct; 170(4): 768-78.
[245] Bouwman RA, Salic K, Padding FG, Eringa EC, van Beek-Harmsen BJ, Matsuda T, et al. Cardioprotection via activation of protein kinase C-delta depends on modulation of the reverse mode of the Na+/Ca2+ exchanger. Circulation. 2006 Jul 4; 114(1 Suppl): I226-32.
[246] Iwamoto T, Uehara A, Nakamura TY, Imanaga I, Shigekawa M. Chimeric analysis of Na(+)/Ca(2+) exchangers NCX1 and NCX3 reveals structural domains important for differential sensitivity to external Ni(2+) or Li(+). J Biol Chem. 1999 Aug 13; 274(33): 23094-102.
[247] Reeves JP, Bailey CA, Hale CC. Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. J Biol Chem. 1986 Apr 15; 261(11): 4948-55.
[248] Amoroso S, Tortiglione A, Secondo A, Catalano A, Montagnani S, Di Renzo G, et al. Sodium nitroprusside prevents chemical hypoxia-induced cell death through iron ions stimulating the activity of the Na+-Ca2+ exchanger in C6 glioma cells. J Neurochem. 2000 Apr; 74(4): 1505-13.
[249] Santacruz-Toloza L, Ottolia M, Nicoll DA, Philipson KD. Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na(+)-Ca(2+) exchanger. J Biol Chem. 2000 Jan 7; 275(1): 182-8.

dc_1149_15

[250] Shipston MJ, Armstrong DL. Activation of protein kinase C inhibits calcium-activated potassium channels in rat pituitary tumour cells. J Physiol. 1996 Jun 15; 493 (Pt 3): 665-72.
[251] Stengl M, Mubagwa K, Carmeliet E, Flameng W. Phenylephrine-induced stimulation of Na+/Ca2+ exchange in rat ventricular myocytes. Cardiovasc Res. 1998 Jun; 38(3): 703-10.
[252] Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, Haas HL. Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. J Neurosci. 2001 Dec 1; 21(23): 9273-9.
[253] Eriksson KS, Stevens DR, Haas HL. Serotonin excites tuberomammillary neurons by activation of Na(+)/Ca(2+)-exchange. Neuropharmacology. 2001 Mar; 40(3): 345-51.
[254] Woo SH, Morad M. Bimodal regulation of Na(+)--Ca(2+) exchanger by beta-adrenergic signaling pathway in shark ventricular myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 13; 98(4): 2023-8.
[255] Gupta MP, Makino N, Khatter K, Dhalla NS. Stimulation of Na+-Ca2+ exchange in heart sarcolemma by insulin. Life Sci. 1986 Sep 22; 39(12): 1077-83.
[256] Makino N, Zhao D, Dhalla NS. Stimulation of heart sarcolemmal Na+-Ca2+ exchange by concanavalin A. Biochem Biophys Res Commun. 1988 Jul 15; 154(1): 245-51.
[257] Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. Circ Res. 1999 Oct 29; 85(9): 777-86.
[258] Avkiran M. Basic biology and pharmacology of the cardiac sarcolemmal sodium/hydrogen exchanger. J Card Surg. 2003 Jan-Feb; 18 Suppl 1: 3-12.
[259] Fliegel L. Molecular biology of the myocardial Na+/H+ exchanger. J Mol Cell Cardiol. 2008 Feb; 44(2): 228-37.
[260] Slepkov ER, Rainey JK, Sykes BD, Fliegel L. Structural and functional analysis of the Na+/H+ exchanger. Biochem J. 2007 Feb 1; 401(3): 623-33.
[261] Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P. Intracellular pH regulation in heart. J Mol Cell Cardiol. 2009 Mar; 46(3): 318-31.
[262] Dampney RA, Coleman MJ, Fontes MA, Hirooka Y, Horiuchi J, Li YW, et al. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2002 Apr; 29(4): 261-8.
[263] Baumgartner M, Patel H, Barber DL. Na(+)/H(+) exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. Am J Physiol Cell Physiol. 2004 Oct; 287(4): C844-50.
[264] Cingolani HE, Ennis IL. Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy. Circulation. 2007 Mar 6; 115(9): 1090-100.
[265] Karmazyn M, Kilic A, Javadov S. The role of NHE-1 in myocardial hypertrophy and remodelling. J Mol Cell Cardiol. 2008 Apr; 44(4): 647-53.
[266] Wakabayashi S, Hisamitsu T, Nakamura TY. Regulation of the cardiac Na(+)/H(+) exchanger in health and disease. J Mol Cell Cardiol. Aug; 61: 68-76.
[267] Gan XT, Chakrabarti S, Karmazyn M. Modulation of Na+/H+ exchange isoform 1 mRNA expression in isolated rat hearts. Am J Physiol. 1999 Sep; 277(3 Pt 2): H993-8.
[268] Yang W, Wang H, Fliegel L. Regulation of Na+/H+ exchanger gene expression. Role of a novel poly(dA.dT) element in regulation of the NHE1 promoter. J Biol Chem. 1996 Aug 23; 271(34): 20444-9.
[269] Duff HJ, Mitchell LB, Kavanagh KM, Manyari DE, Gillis AM, Wyse DG. Amiloride. Antiarrhythmic and electrophysiologic actions in patients with inducible sustained ventricular tachycardia. Circulation. 1989 Jun; 79(6): 1257-63.
[270] ten Hove M, van Emous JG, van Echteld CJ. Na+ overload during ischemia and reperfusion in rat hearts: comparison of the Na+/H+ exchange blockers EIPA, cariporide and eniporide. Mol Cell Biochem. 2003 Aug; 250(1-2): 47-54.
[271] Janvier NC, Boyett MR. The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. Cardiovasc Res. 1996 Jul; 32(1): 69-84.
[272] Satoh H, Ginsburg KS, Qing K, Terada H, Hayashi H, Bers DM. KB-R7943 block of Ca(2+) influx via Na(+)/Ca(2+) exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca(2+) overload in rat ventricular myocytes. Circulation. 2000 Mar 28; 101(12): 1441-6.
[273] Miyata A, Zipes DP, Hall S, Rubart M. Kb-R7943 prevents acute, atrial fibrillation-induced shortening of atrial refractoriness in anesthetized dogs. Circulation. 2002 Sep 10; 106(11): 1410-9.
[274] Miyamoto S, Zhu BM, Kamiya K, Nagasawa Y, Hashimoto K. KB-R7943, a Na+/Ca2+ exchange inhibitor, does not suppress ischemia/reperfusion arrhythmias nor digitalis arrhythmias in dogs. Jpn J Pharmacol. 2002 Nov; 90(3): 229-35.
[275] Nagy ZA, Virag L, Toth A, Biliczki P, Acsai K, Banyasz T, et al. Selective inhibition of sodium-calcium exchanger by SEA-0400 decreases early and delayed after depolarization in canine heart. Br J Pharmacol. 2004 Dec; 143(7): 827-31.

dc_1149_15

[276] Nagasawa Y, Zhu BM, Chen J, Kamiya K, Miyamoto S, Hashimoto K. Effects of SEA0400, a Na+/Ca2+ exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in the in vivo dogs. Eur J Pharmacol. 2005 Jan 4; 506(3): 249-55.
[277] Namekata I, Nakamura H, Shimada H, Tanaka H, Shigenobu K. Cardioprotection without cardiosuppression by SEA0400, a novel inhibitor of Na+-Ca2+ exchanger, during ischemia and reperfusion in guinea-pig myocardium. Life Sci. 2005 Jun 3; 77(3): 312-24.
[278] Nakamura A, Harada K, Sugimoto H, Nakajima F, Nishimura N. [Effects of KB-R7943, a novel Na+/Ca2+ exchange inhibitor, on myocardial ischemia/reperfusion injury]. Nippon Yakurigaku Zasshi. 1998 Feb; 111(2): 105-15.
[279] Watano T, Harada Y, Harada K, Nishimura N. Effect of Na+/Ca2+ exchange inhibitor, KB-R7943 on ouabain-induced arrhythmias in guinea-pigs. Br J Pharmacol. 1999 Aug; 127(8): 1846-50.
[280] Fujita S, Endoh M. Influence of a Na+-H+ exchange inhibitor ethylisopropylamiloride, a Na+-Ca2+ exchange inhibitor KB-R7943 and their combination on the increases in contractility and Ca2+ transient induced by angiotensin II in isolated adult rabbit ventricular myocytes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1999 Nov; 360(5): 575-84.
[281] Kurogouchi F, Furukawa Y, Zhao D, Hirose M, Nakajima K, Tsuboi M, et al. A Na+/Ca2+ exchanger inhibitor, KB-R7943, caused negative inotropic responses and negative followed by positive chronotropic responses in isolated, blood-perfused dog heart preparations. Jpn J Pharmacol. 2000 Feb; 82(2): 155-63.
[282] Yang HT, Sakurai K, Sugawara H, Watanabe T, Norota I, Endoh M. Role of Na+/Ca2+ exchange in endothelin-1-induced increases in Ca2+ transient and contractility in rabbit ventricular myocytes: pharmacological analysis with KB-R7943. Br J Pharmacol. 1999 Apr; 126(8): 1785-95.
[283] Farkas AS, Acsai K, Nagy N, Toth A, Fulop F, Seprenyi G, et al. Na(+)/Ca(2+) exchanger inhibition exerts a positive inotropic effect in the rat heart, but fails to influence the contractility of the rabbit heart. Br J Pharmacol. 2008 May; 154(1): 93-104.
[284] Szentandrassy N, Birinyi P, Szigeti G, Farkas A, Magyar J, Toth A, et al. SEA0400 fails to alter the magnitude of intracellular Ca(2+) transients and contractions in Langendorff-perfused guinea pig heart. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2008 Jul; 378(1): 65-71.
[285] Ozdemir S, Bito V, Holemans P, Vinet L, Mercadier JJ, Varro A, et al. Pharmacological inhibition of na/ca exchange results in increased cellular Ca2+ load attributable to the predominance of forward mode block. Circ Res. 2008 Jun 6; 102(11): 1398-405.
[286] Koushik SV, Wang J, Rogers R, Moskophidis D, Lambert NA, Creazzo TL, et al. Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization. FASEB J. 2001 May; 15(7): 1209-11.
[287] Reuter H, Henderson SA, Han T, Mottino GA, Frank JS, Ross RS, et al. Cardiac excitation-contraction coupling in the absence of Na(+) - Ca2+ exchange. Cell Calcium. 2003 Jul; 34(1): 19-26.
[288] Pott C, Goldhaber JI, Philipson KD. Genetic manipulation of cardiac Na+/Ca2+ exchange expression. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Oct 1; 322(4): 1336-40.
[289] Henderson SA, Goldhaber JI, So JM, Han T, Motter C, Ngo A, et al. Functional adult myocardium in the absence of Na+-Ca2+ exchange: cardiac-specific knockout of NCX1. Circ Res. 2004 Sep 17; 95(6): 604-11.
[290] Pott C, Philipson KD, Goldhaber JI. Excitation-contraction coupling in Na+-Ca2+ exchanger knockout mice: reduced transsarcolemmal Ca2+ flux. Circ Res. 2005 Dec 9; 97(12): 1288-95.
[291] Terracciano CM, Souza AI, Philipson KD, MacLeod KT. Na+-Ca2+ exchange and sarcoplasmic reticular Ca2+ regulation in ventricular myocytes from transgenic mice overexpressing the Na+-Ca2+ exchanger. J Physiol. 1998 Nov 1; 512 (Pt 3): 651-67.
[292] Houser SR. When does spontaneous sarcoplasmic reticulum CA(2+) release cause a triggered arrythmia? Cellular versus tissue requirements. Circ Res. 2000 Oct 27; 87(9): 725-7.
[293] Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. Cardiovasc Res. 2004 Feb 1; 61(2): 208-17.
[294] Scoote M, Williams AJ. Myocardial calcium signalling and arrhythmia pathogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Oct 1; 322(4): 1286-309.
[295] Boyden PA, ter Keurs H. Would modulation of intracellular Ca2+ be antiarrhythmic? Pharmacol Ther. 2005 Nov; 108(2): 149-79.
[296] Ter Keurs HE, Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. Physiol Rev. 2007 Apr; 87(2): 457-506.
[297] Sipido KR, Varro A, Eisner D. Sodium calcium exchange as a target for antiarrhythmic therapy. Handb Exp Pharmacol. 2006(171): 159-99.
[298] Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. Subcell Biochem. 2007; 45: 523-37.
[299] Rubart M, Zipes DP. Mechanisms of sudden cardiac death. J Clin Invest. 2005 Sep; 115(9): 2305-15.

dc_1149_15

[300] Pogwizd SM, Bers DM. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. Trends Cardiovasc Med. 2004 Feb; 14(2): 61-6.
[301] Sipido KR. Calcium overload, spontaneous calcium release, and ventricular arrhythmias. Heart Rhythm. 2006 Aug; 3(8): 977-9.
[302] Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ, et al. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. Circulation. 2001 Feb 6; 103(5): 769-77.
[303] Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2002 May; 54(2): 230-46.
[304] Nattel S, Li D. Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation. Circ Res. 2000 Sep 15; 87(6): 440-7.
[305] Zhao Z, Wen H, Fefelova N, Allen C, Baba A, Matsuda T, et al. Revisiting the ionic mechanisms of early afterdepolarizations in cardiomyocytes: predominant by Ca waves or Ca currents? Am J Physiol Heart Circ Physiol. Apr 15; 302(8): H1636-44.
[306] Kimura S, Cameron JS, Kozlovskis PL, Bassett AL, Myerburg RJ. Delayed afterdepolarizations and triggered activity induced in feline Purkinje fibers by alpha-adrenergic stimulation in the presence of elevated calcium levels. Circulation. 1984 Dec; 70(6): 1074-82.
[307] Laurita KR, Katra R, Wible B, Wan X, Koo MH. Transmural heterogeneity of calcium handling in canine. Circ Res. 2003 Apr 4; 92(6): 668-75.
[308] Miura M, Boyden PA, ter Keurs HE. Ca2+ waves during triggered propagated contractions in intact trabeculae. Am J Physiol. 1998 Jan; 274(1 Pt 2): H266-76.
[309] Diaz ME, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA. Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca2+ content and sarcolemmal Ca2+ fluxes in isolated rat ventricular myocytes during spontaneous Ca2+ release. J Physiol. 1997 May 15; 501 (Pt 1): 3-16.
[310] Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and [Ca2+]i waves in cardiac myocytes. Am J Physiol. 1996 Jan; 270(1 Pt 1): C148-59.
[311] Tribulova N, Seki S, Radosinska J, Kaplan P, Babusikova E, Knezl V, et al. Myocardial Ca2+ handling and cell-to-cell coupling, key factors in prevention of sudden cardiac death. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Dec; 87(12): 1120-9.
[312] Fabritz L, Kirchhof P, Franz MR, Eckardt L, Monnig G, Milberg P, et al. Prolonged action potential durations, increased dispersion of repolarization, and polymorphic ventricular tachycardia in a mouse model of proarrhythmia. Basic Res Cardiol. 2003 Feb; 98(1): 25-32.
[313] Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. Eur Heart J. Aug; 33(15): 1870-7.
[314] January CT, Riddle JM. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca2+ current. Circ Res. 1989 May; 64(5): 977-90.
[315] Shorofsky SR, January CT. L- and T-type Ca2+ channels in canine cardiac Purkinje cells. Single-channel demonstration of L-type Ca2+ window current. Circ Res. 1992 Mar; 70(3): 456-64.
[316] Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E. Inhibition and rapid recovery of Ca2+ current during Ca2+ release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. Circ Res. 1995 Jan; 76(1): 102-9.
[317] Boutjdir M, Restivo M, Wei Y, Stergiopoulos K, el-Sherif N. Early afterdepolarization formation in cardiac myocytes: analysis of phase plane patterns, action potential, and membrane currents. J Cardiovasc Electrophysiol. 1994 Jul; 5(7): 609-20.
[318] Volders PG, Vos MA, Szabo B, Sipido KR, de Groot SH, Gorgels AP, et al. Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts. Cardiovasc Res. 2000 Jun; 46(3): 376-92.
[319] Stengl M, Ramakers C, Donker DW, Nabar A, Rybin AV, Spatjens RL, et al. Temporal patterns of electrical remodeling in canine ventricular hypertrophy: focus on IKs downregulation and blunted beta-adrenergic activation. Cardiovasc Res. 2006 Oct 1; 72(1): 90-100.
[320] Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. Circ Res. 2001 Jun 8; 88(11): 1159-67.
[321] Llach A, Molina CE, Fernandes J, Padro J, Cinca J, Hove-Madsen L. Sarcoplasmic reticulum and L-type Ca(2)(+) channel activity regulate the beat-to-beat stability of calcium handling in human atrial myocytes. J Physiol. Jul 1; 589(Pt 13): 3247-62.
[322] Bosch RF, Nattel S. Cellular electrophysiology of atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2002 May; 54(2): 259-69.
[323] Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. Physiol Rev. 2007 Apr; 87(2): 425-56.

dc_1149_15

[324] Chan CS, Lin YJ, Chang SL, Lo LW, Hu YF, Chao TF, et al. Early repolarization of surface ECG predicts fatal ventricular arrhythmias in patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy and symptomatic ventricular arrhythmias. Int J Cardiol. Oct 15; 197: 300-5.
[325] Slade AK, Saumarez RC, McKenna WJ. The arrhythmogenic substrate--diagnostic and therapeutic implications: hypertrophic cardiomyopathy. Eur Heart J. 1993 Sep; 14 Suppl E: 84-90.
[326] Chou CC, Zhou S, Hayashi H, Nihei M, Liu YB, Wen MS, et al. Remodelling of action potential and intracellular calcium cycling dynamics during subacute myocardial infarction promotes ventricular arrhythmias in Langendorff-perfused rabbit hearts. J Physiol. 2007 May 1; 580(Pt.3): 895-906.
[327] Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Power J, Allessie MA. Electrical remodeling due to atrial fibrillation in chronically instrumented conscious goats: roles of neurohumoral changes, ischemia, atrial stretch, and high rate of electrical activation. Circulation. 1997 Nov 18; 96(10): 3710-20.
[328] Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ. Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. Circulation. 1996 Dec 1; 94(11): 2968-74.
[329] Sun H, Chartier D, Leblanc N, Nattel S. Intracellular calcium changes and tachycardia-induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes. Cardiovasc Res. 2001 Mar; 49(4): 751-61.
[330] Brundel BJ, Henning RH, Kampinga HH, Van Gelder IC, Crijns HJ. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2002 May; 54(2): 315-24.
[331] Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. Circulation. 1997 Dec 2; 96(11): 4027-35.
[332] Blom NA, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Poelmann RE, Mentink MM, Ottenkamp J. Development of the cardiac conduction tissue in human embryos using HNK-1 antigen expression: possible relevance for understanding of abnormal atrial automaticity. Circulation. 1999 Feb 16; 99(6): 800-6.
[333] Perez-Lugones A, McMahon JT, Ratliff NB, Saliba WI, Schweikert RA, Marrouche NF, et al. Evidence of specialized conduction cells in human pulmonary veins of patients with atrial fibrillation. J Cardiovasc Electrophysiol. 2003 Aug; 14(8): 803-9.
[334] Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. N Engl J Med. 1998 Sep 3; 339(10): 659-66.
[335] Chen SA, Hsieh MH, Tai CT, Tsai CF, Prakash VS, Yu WC, et al. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the pulmonary veins: electrophysiological characteristics, pharmacological responses, and effects of radiofrequency ablation. Circulation. 1999 Nov 2; 100(18): 1879-86.
[336] Honjo H, Boyett MR, Niwa R, Inada S, Yamamoto M, Mitsui K, et al. Pacing-induced spontaneous activity in myocardial sleeves of pulmonary veins after treatment with ryanodine. Circulation. 2003 Apr 15; 107(14): 1937-43.
[337] Jais P, Hocini M, Macle L, Choi KJ, Deisenhofer I, Weerasooriya R, et al. Distinctive electrophysiological properties of pulmonary veins in patients with atrial fibrillation. Circulation. 2002 Nov 5; 106(19): 2479-85.
[338] Ozgen N, Dun W, Sosunov EA, Anyukhovsky EP, Hirose M, Duffy HS, et al. Early electrical remodeling in rabbit pulmonary vein results from trafficking of intracellular SK2 channels to membrane sites. Cardiovasc Res. 2007 Sep 1; 75(4): 758-69.
[339] Diness JG, Sorensen US, Nissen JD, Al-Shahib B, Jespersen T, Grunnet M, et al. Inhibition of small-conductance Ca2+-activated K+ channels terminates and protects against atrial fibrillation. Circ Arrhythm Electrophysiol. Aug; 3(4): 380-90.
[340] Skibsbye L, Diness JG, Sorensen US, Hansen RS, Grunnet M. The duration of pacing-induced atrial fibrillation is reduced in vivo by inhibition of small conductance Ca(2+)-activated K(+) channels. J Cardiovasc Pharmacol. Jun; 57(6): 672-81.
[341] Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death--executive summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death) Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. Eur Heart J. 2006 Sep; 27(17): 2099-140.
[342] Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, et al. Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. Eur Heart J. 2001 Aug; 22(16): 1374-450.

dc_1149_15

[343] Antzelevitch C, Sicouri S. Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations. Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. J Am Coll Cardiol. 1994 Jan; 23(1): 259-77.
[344] Antzelevitch C. Ionic, molecular, and cellular bases of QT-interval prolongation and torsade de pointes. Europace. 2007 Sep; 9 Suppl 4: iv4-15.
[345] Wang HS, Cohen IS. Calcium channel heterogeneity in canine left ventricular myocytes. J Physiol. 2003 Mar 15; 547(Pt 3): 825-33.
[346] Pastore JM, Girouard SD, Laurita KR, Akar FG, Rosenbaum DS. Mechanism linking T-wave alternans to the genesis of cardiac fibrillation. Circulation. 1999 Mar 16; 99(10): 1385-94.
[347] Pertsov AM, Davidenko JM, Salomonsz R, Baxter WT, Jalife J. Spiral waves of excitation underlie reentrant activity in isolated cardiac muscle. Circ Res. 1993 Mar; 72(3): 631-50.
[348] Tabereaux PB, Walcott GP, Rogers JM, Kim J, Dosdall DJ, Robertson PG, et al. Activation patterns of Purkinje fibers during long-duration ventricular fibrillation in an isolated canine heart model. Circulation. 2007 Sep 4; 116(10): 1113-9.
[349] Dosdall DJ, Tabereaux PB, Kim JJ, Walcott GP, Rogers JM, Killingsworth CR, et al. Chemical ablation of the Purkinje system causes early termination and activation rate slowing of long-duration ventricular fibrillation in dogs. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 Aug; 295(2): H883-9.
[350] Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, et al. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circ Res. 2002 Oct 18; 91(8): e21-6.
[351] Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. Nature. 2003 Feb 6; 421(6923): 634-9.
[352] Allen DG, Orchard CH. The effects of changes of pH on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. J Physiol. 1983 Feb; 335: 555-67.
[353] Hulme JT, Orchard CH. Effect of acidosis on Ca2+ uptake and release by sarcoplasmic reticulum of intact rat ventricular myocytes. Am J Physiol. 1998 Sep; 275(3 Pt 2): H977-87.
[354] Deitmer JW, Ellis D. Interactions between the regulation of the intracellular pH and sodium activity of sheep cardiac Purkinje fibres. J Physiol. 1980 Jul; 304: 471-88.
[355] Bountra C, Vaughan-Jones RD. Effect of intracellular and extracellular pH on contraction in isolated, mammalian cardiac muscle. J Physiol. 1989 Nov; 418: 163-87.
[356] Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY. Effects of pH on Na+-Ca2+ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. Circ Res. 1982 Feb; 50(2): 287-93.
[357] Reimer KAJRB. The Heart and Cardiovascular System. 2nd ed. New york, NY: Raven press; 1992.
[358] Jennings RB, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Myocardial ischemia and reperfusion. Monogr Pathol. 1995; 37: 47-80.
[359] Goldhaber JI. The Myocardium. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 1997.
[360] Opie LH. The Heart Physiology:From Cell to circulation. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1998.
[361] Haddad GG, Liu H. Different O2-sensing mechanisms by different K+ channels. Adv Exp Med Biol. 2000; 475: 441-52.
[362] Baczko I, Giles WR, Light PE. Resting membrane potential regulates Na(+)-Ca2+ exchange-mediated Ca2+ overload during hypoxia-reoxygenation in rat ventricular myocytes. J Physiol. 2003 Aug 1; 550(Pt 3): 889-98.
[363] Cobbold PH, Bourne PK. Aequorin measurements of free calcium in single heart cells. Nature. 1984 Nov 29-Dec 5; 312(5993): 444-6.
[364] Lee JA, Allen DG. Changes in intracellular free calcium concentration during long exposures to simulated ischemia in isolated mammalian ventricular muscle. Circ Res. 1992 Jul; 71(1): 58-69.
[365] Zucchi R, Ronca F, Ronca-Testoni S. Modulation of sarcoplasmic reticulum function: a new strategy in cardioprotection? Pharmacol Ther. 2001 Jan; 89(1): 47-65.
[366] Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. Annu Rev Biochem. 1987; 56: 395-433.
[367] Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan DM. Structure and function of ryanodine receptors. Am J Physiol. 1994 Jun; 266(6 Pt 1): C1485-504.
[368] Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca2+ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. Pharmacol Rev. 1997 Mar; 49(1): 1-51.
[369] Meissner G. Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. Cell Calcium. 2004 Jun; 35(6): 621-8.
[370] Haigney MC, Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na(+)-Ca2+ exchange. Circ Res. 1992 Sep; 71(3): 547-57.

dc_1149_15

[371] Kusuoka H, Camilion de Hurtado MC, Marban E. Role of sodium/calcium exchange in the mechanism of myocardial stunning: protective effect of reperfusion with high sodium solution. J Am Coll Cardiol. 1993 Jan; 21(1): 240-8.
[372] Duchen MR. Mitochondria and Ca(2+)in cell physiology and pathophysiology. Cell Calcium. 2000 Nov-Dec; 28(5-6): 339-48.
[373] Murphy JG, Marsh JD, Smith TW. The role of calcium in ischemic myocardial injury. Circulation. 1987 Jun; 75(6 Pt 2): V15-24.
[374] Nayler WG. The calcium antagonist drugs. Med J Aust. 1988 Dec 5-19; 149(11-12): 682-6.
[375] Opie LH. Myocardial stunning--are calcium antagonists useful? Cardiovasc Drugs Ther. 1994 Aug; 8 Suppl 3: 533-41.
[376] Zucchi R, Ghelardoni S, Evangelista S. Biochemical basis of ischemic heart injury and of cardioprotective interventions. Curr Med Chem. 2007; 14(15): 1619-37.
[377] Chien KR, Peau RG, Farber JL. Ischemic myocardial cell injury. Prevention by chlorpromazine of an accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction. Am J Pathol. 1979 Dec; 97(3): 505-29.
[378] Farber JL, Chien KR, Mittnacht S, Jr. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. Am J Pathol. 1981 Feb; 102(2): 271-81.
[379] Pontremoli S, Melloni E. Extralysosomal protein degradation. Annu Rev Biochem. 1986; 55: 455-81.
[380] Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca2+ activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. J Clin Invest. 1987 Mar; 79(3): 950-61.
[381] Carrozza JP, Jr., Bentivegna LA, Williams CP, Kuntz RE, Grossman W, Morgan JP. Decreased myofilament responsiveness in myocardial stunning follows transient calcium overload during ischemia and reperfusion. Circ Res. 1992 Dec; 71(6): 1334-40.
[382] Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. Circ Res. 1997 Mar; 80(3): 393-9.
[383] Kim YK, Kim SJ, Kramer CM, Yatani A, Takagi G, Mankad S, et al. Altered excitation-contraction coupling in myocytes from remodeled myocardium after chronic myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol. 2002 Jan; 34(1): 63-73.
[384] Licata A, Aggarwal R, Robinson RB, Boyden P. Frequency dependent effects on Cai transients and cell shortening in myocytes that survive in the infarcted heart. Cardiovasc Res. 1997 Feb; 33(2): 341-50.
[385] Dun W, Baba S, Yagi T, Boyden PA. Dynamic remodeling of K+ and Ca2+ currents in cells that survived in the epicardial border zone of canine healed infarcted heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Sep; 287(3): H1046-54.
[386] Aggarwal R, Boyden PA. Diminished Ca2+ and Ba2+ currents in myocytes surviving in the epicardial border zone of the 5-day infarcted canine heart. Circ Res. 1995 Dec; 77(6): 1180-91.
[387] Pu J, Robinson RB, Boyden PA. Abnormalities in Ca(i)handling in myocytes that survive in the infarcted heart are not just due to alterations in repolarization. J Mol Cell Cardiol. 2000 Aug; 32(8): 1509-23.
[388] Boyden PA, Pinto JM. Reduced calcium currents in subendocardial Purkinje myocytes that survive in the 24- and 48-hour infarcted heart. Circulation. 1994 Jun; 89(6): 2747-59.
[389] Boyden PA, Barbhaiya C, Lee T, ter Keurs HE. Nonuniform Ca2+ transients in arrhythmogenic Purkinje cells that survive in the infarcted canine heart. Cardiovasc Res. 2003 Mar; 57(3): 681-93.
[390] Kanno S, Saffitz JE. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. Cardiovasc Pathol. 2001 Jul-Aug; 10(4): 169-77.
[391] de Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Wilde AA, Coronel R, Becker AE, et al. Reentry as a cause of ventricular tachycardia in patients with chronic ischemic heart disease: electrophysiologic and anatomic correlation. Circulation. 1988 Mar; 77(3): 589-606.
[392] Jia Y, Takimoto K. GATA and FOG2 transcription factors differentially regulate the promoter for Kv4.2 K(+) channel gene in cardiac myocytes and PC12 cells. Cardiovasc Res. 2003 Nov 1; 60(2): 278-87.
[393] Qin D, Zhang ZH, Caref EB, Boutjdir M, Jain P, el-Sherif N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. Circ Res. 1996 Sep; 79(3): 461-73.
[394] Pogwizd SM. Clinical potential of sodium-calcium exchanger inhibitors as antiarrhythmic agents. Drugs. 2003; 63(5): 439-52.
[395] Bourdillon PD, Poole-Wilson PA. Effects of ischaemia and reperfusion on calcium exchange and mechanical function in isolated rabbit myocardium. Cardiovasc Res. 1981 Mar; 15(3): 121-30.
[396] Poole-Wilson PA, Harding DP, Bourdillon PD, Tones MA. Calcium out of control. J Mol Cell Cardiol. 1984 Feb; 16(2): 175-87.

dc_1149_15

[397] Schumacher CA, Baartscheer A, Coronel R, Fiolet JW. Energy-dependent transport of calcium to the extracellular space during acute ischemia of the rat heart. J Mol Cell Cardiol. 1998 Aug; 30(8): 1631-42.
[398] Ruigrok TJ, Burgersdijk FJ, Zimmerman AN. The calcium paradox: a reaffirmation. Eur J Cardiol. 1975 Jun; 3(1): 59-63.
[399] Greve G, Rotevatn S, Saetersdal T, Oksendal AN, Jynge P. Ultrastructural studies of intercalated disc separations in the rat heart during the calcium paradox. Res Exp Med (Berl). 1985; 185(3): 195-206.
[400] Oksendal AN, Jynge P, Sellevold OF, Rotevatn S, Saetersdal T. The calcium paradox phenomenon: a flow rate and volume response study of calcium-free perfusion. J Mol Cell Cardiol. 1985 Oct; 17(10): 959-72.
[401] Piper HM. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. Cardiovasc Res. 2000 Jan 1; 45(1): 123-7.
[402] Goldhaber SZ. Pulmonary embolism thrombolysis: broadening the paradigm for its administration. Circulation. 1997 Aug 5; 96(3): 716-8.
[403] Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera CM, Albertini A, et al. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity. J Mol Cell Cardiol. 1985 Oct; 17(10): 937-45.
[404] Shlafer M, Myers CL, Adkins S. Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia. J Mol Cell Cardiol. 1987 Dec; 19(12): 1195-206.
[405] McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science. 1974 Aug 9; 185(150): 529-31.
[406] Rowe GT, Eaton LR, Hess ML. Neutrophil-derived, oxygen free radical-mediated cardiovascular dysfunction. J Mol Cell Cardiol. 1984 Nov; 16(11): 1075-9.
[407] Barrington PL, Meier CF, Jr., Weglicki WB. Abnormal electrical activity induced by free radical generating systems in isolated cardiocytes. J Mol Cell Cardiol. 1988 Dec; 20(12): 1163-78.
[408] Matsuura H, Shattock MJ. Membrane potential fluctuations and transient inward currents induced by reactive oxygen intermediates in isolated rabbit ventricular cells. Circ Res. 1991 Feb; 68(2): 319-29.
[409] Coetzee WA, Ichikawa H, Hearse DJ. Oxidant stress inhibits Na-Ca-exchange current in cardiac myocytes: mediation by sulfhydryl groups? Am J Physiol. 1994 Mar; 266(3 Pt 2): H909-19.
[410] Goldhaber JI. Free radicals enhance Na+/Ca2+ exchange in ventricular myocytes. Am J Physiol. 1996 Sep; 271(3 Pt 2): H823-33.
[411] Wang Y, Meyer JW, Ashraf M, Shull GE. Mice with a null mutation in the NHE1 Na+-H+ exchanger are resistant to cardiac ischemia-reperfusion injury. Circ Res. 2003 Oct 17; 93(8): 776-82.
[412] Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA, Ruddy TD, Fulop J, Rakowski H, et al. Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. Prog Cardiovasc Dis. 1985 Jul-Aug; 28(1): 1-83.
[413] Amran MS, Hashimoto K, Homma N. Effects of sodium-calcium exchange inhibitors, KB-R7943 and SEA0400, on aconitine-induced arrhythmias in guinea pigs in vivo, in vitro, and in computer simulation studies. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jul; 310(1): 83-9.
[414] Lu HR, Yang P, Remeysen P, Saels A, Dai DZ, De Clerck F. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats: a role of Na+ and Ca2+ influx. Eur J Pharmacol. 1999 Jan 22; 365(2-3): 233-9.
[415] Mukai M, Terada H, Sugiyama S, Satoh H, Hayashi H. Effects of a selective inhibitor of Na+/Ca2+ exchange, KB-R7943, on reoxygenation-induced injuries in guinea pig papillary muscles. J Cardiovasc Pharmacol. 2000 Jan; 35(1): 121-8.
[416] Woodcock EA, Arthur JF, Harrison SN, Gao XM, Du XJ. Reperfusion-induced Ins(1,4,5)P(3) generation and arrhythmogenesis require activation of the Na(+)/Ca(2+) exchanger. J Mol Cell Cardiol. 2001 Oct; 33(10): 1861-9.
[417] Elias CL, Lukas A, Shurraw S, Scott J, Omelchenko A, Gross GJ, et al. Inhibition of Na+/Ca2+ exchange by KB-R7943: transport mode selectivity and antiarrhythmic consequences. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Sep; 281(3): H1334-45.
[418] Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Onishi M, Tanaka Y, Hamano-Takahashi A, et al. Protective effects of SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na+/Ca2+ exchanger, on myocardial ischemia-reperfusion injuries. Eur J Pharmacol. 2003 Jan 1; 458(1-2): 155-62.
[419] Ladilov Y, Haffner S, Balser-Schafer C, Maxeiner H, Piper HM. Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na+/Ca2+ exchanger. Am J Physiol. 1999 Jun; 276(6 Pt 2): H1868-76.

dc_1149_15

[420] Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schafer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, et al. Role of the reverse mode of the Na+/Ca2+ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. Cardiovasc Res. 2001 Aug 1; 51(2): 241-50.
[421] Takahashi T, Takahashi K, Onishi M, Suzuki T, Tanaka Y, Ota T, et al. Effects of SEA0400, a novel inhibitor of the Na+/Ca2+ exchanger, on myocardial stunning in anesthetized dogs. Eur J Pharmacol. 2004 Nov 28; 505(1-3): 163-8.
[422] Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabes JA, Pina P, et al. Effect of inhibition of Na(+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. Cardiovasc Res. 2002 Sep; 55(4): 739-48.
[423] Seki S, Taniguchi M, Takeda H, Nagai M, Taniguchi I, Mochizuki S. Inhibition by KB-r7943 of the reverse mode of the Na+/Ca2+ exchanger reduces Ca2+ overload in ischemic-reperfused rat hearts. Circ J. 2002 Apr; 66(4): 390-6.
[424] Magee WP, Deshmukh G, Deninno MP, Sutt JC, Chapman JG, Tracey WR. Differing cardioprotective efficacy of the Na+/Ca2+ exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Mar; 284(3): H903-10.
[425] Hotta Y, Nagatsu A, Liu W, Muto T, Narumiya C, Lu X, et al. Protective effects of antioxidative serotonin derivatives isolated from safflower against postischemic myocardial dysfunction. Mol Cell Biochem. 2002 Sep; 238(1-2): 151-62.
[426] Motegi K, Tanonaka K, Takenaga Y, Takagi N, Takeo S. Preservation of mitochondrial function may contribute to cardioprotective effects of Na+/Ca2+ exchanger inhibitors in ischaemic/reperfused rat hearts. Br J Pharmacol. 2007 Aug; 151(7): 963-78.
[427] Yoshiyama M, Nakamura Y, Omura T, Hayashi T, Takagi Y, Hasegawa T, et al. Cardioprotective effect of SEA0400, a selective inhibitor of the Na(+)/Ca(2+) exchanger, on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. J Pharmacol Sci. 2004 Jun; 95(2): 196-202.
[428] Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. Physiol Rev. 1999 Apr; 79(2): 609-34.
[429] Wei GZ, Zhou JJ, Wang B, Wu F, Bi H, Wang YM, et al. Diastolic Ca2+ overload caused by Na+/Ca2+ exchanger during the first minutes of reperfusion results in continued myocardial stunning. Eur J Pharmacol. 2007 Oct 15; 572(1): 1-11.
[430] Yoshitomi O, Akiyama D, Hara T, Cho S, Tomiyasu S, Sumikawa K. Cardioprotective effects of KB-R7943, a novel inhibitor of Na+/Ca2+ exchanger, on stunned myocardium in anesthetized dogs. J Anesth. 2005; 19(2): 124-30.
[431] Li SZ, Wu F, Wang B, Wei GZ, Jin ZX, Zang YM, et al. Role of reverse mode Na+/Ca2+ exchanger in the cardioprotection of metabolic inhibition preconditioning in rat ventricular myocytes. Eur J Pharmacol. 2007 Apr 30; 561(1-3): 14-22.
[432] Duff HJ, Lester WM, Rahmberg M. Amiloride. Antiarrhythmic and electrophysiological activity in the dog. Circulation. 1988 Dec; 78(6): 1469-77.
[433] du Toit EF, Opie LH. Role for the Na+/H+ exchanger in reperfusion stunning in isolated perfused rat heart. J Cardiovasc Pharmacol. 1993 Dec; 22(6): 877-83.
[434] Scholz W, Albus U, Lang HJ, Linz W, Martorana PA, Englert HC, et al. Hoe 694, a new Na+/H+ exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. Br J Pharmacol. 1993 Jun; 109(2): 562-8.
[435] Sack S, Mohri M, Schwarz ER, Arras M, Schaper J, Ballagi-Pordany G, et al. Effects of a new Na+/H+ antiporter inhibitor on postischemic reperfusion in pig heart. J Cardiovasc Pharmacol. 1994 Jan; 23(1): 72-8.
[436] Theroux P, Chaitman BR, Danchin N, Erhardt L, Meinertz T, Schroeder JS, et al. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. Circulation. 2000 Dec 19; 102(25): 3032-8.
[437] Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, et al. The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. J Am Coll Cardiol. 2001 Nov 15; 38(6): 1644-50.
[438] Rupprecht HJ, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheibeta HP, et al. Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. Circulation. 2000 Jun 27; 101(25): 2902-8.
[439] Mentzer RM, Jr., Lasley RD, Jessel A, Karmazyn M. Intracellular sodium hydrogen exchange inhibition and clinical myocardial protection. Ann Thorac Surg. 2003 Feb; 75(2): S700-8.
[440] Murphy E, Allen DG. Why did the NHE inhibitor clinical trials fail? J Mol Cell Cardiol. 2009 Feb; 46(2): 137-41.

dc_1149_15

[441] Barlow CH, Chance B. Ischemic areas in perfused rat hearts: measurement by NADH fluorescence photography. Science. 1976 Sep 3; 193(4256): 909-10.
[442] Maddaford TG, Hurtado C, Sobrattee S, Czubryt MP, Pierce GN. A model of low-flow ischemia and reperfusion in single, beating adult cardiomyocytes. Am J Physiol. 1999 Aug; 277(2 Pt 2): H788-98.
[443] Patton C, Thompson S, Epel D. Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. Cell Calcium. 2004 May; 35(5): 427-31.
[444] Esteve E, Smida-Rezgui S, Sarkozi S, Szegedi C, Regaya I, Chen L, et al. Critical amino acid residues determine the binding affinity and the Ca2+ release efficacy of maurocalcine in skeletal muscle cells. J Biol Chem. 2003 Sep 26; 278(39): 37822-31.
[445] Sarkozi S, Szentesi P, Jona I, Csernoch L. Effects of cardiac glycosides on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. J Physiol. 1996 Sep 15; 495 (Pt 3): 611-26.
[446] Fabiato A, Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. J Physiol (Paris). 1979; 75(5): 463-505.
[447] Jost N, Nagy N, Corici C, Kohajda Z, Horvath A, Acsai K, et al. ORM-10103, a novel specific inhibitor of the Na+/Ca2+ exchanger, decreases early and delayed afterdepolarizations in the canine heart. Br J Pharmacol. Oct; 170(4): 768-78.
[448] Wagner S, Hacker E, Grandi E, Weber SL, Dybkova N, Sossalla S, et al. Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2009 Jun; 2(3): 285-94.
[449] Bassani RA, Bassani JW, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca2+ transport reduce [Ca2+]i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. J Physiol. 1992; 453: 591-608.
[450] Shryock JC, Song Y, Rajamani S, Antzelevitch C, Belardinelli L. The arrhythmogenic consequences of increasing late INa in the cardiomyocyte. Cardiovasc Res. Sep 1; 99(4): 600-11.
[451] Jost N, Nagy N, Kohajda Z, Horvath A, Corici C, Acsai K, et al. ORM-10103, a novel specific inhibitor of the sodium/calcium exchanger, decreases early and delayed afterdepolarization in the canine heart. Br J Pharmacol. May 3.
[452] Wang W, Watanabe M, Nakamura T, Kudo Y, Ochi R. Properties and expression of Ca2+-activated K+ channels in H9c2 cells derived from rat ventricle. Am J Physiol. 1999 May; 276(5 Pt 2): H1559-66.
[453] Varro A, Balati B, Iost N, Takacs J, Virag L, Lathrop DA, et al. The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. J Physiol. 2000 Feb 15; 523 Pt 1: 67-81.
[454] Jost N, Virag L, Bitay M, Takacs J, Lengyel C, Biliczki P, et al. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. Circulation. 2005 Sep 6; 112(10): 1392-9.
[455] Gussak I, Chaitman BR, Kopecky SL, Nerbonne JM. Rapid ventricular repolarization in rodents: electrocardiographic manifestations, molecular mechanisms, and clinical insights. J Electrocardiol. 2000 Apr; 33(2): 159-70.
[456] Diness JG, Sorensen US, Nissen JD, Al-Shahib B, Jespersen T, Grunnet M, et al. Inhibition of small-conductance Ca2+-activated K+ channels terminates and protects against atrial fibrillation. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2010 Aug 1; 3(4): 380-90.
[457] Roden DM. Taking the "idio" out of "idiosyncratic": predicting torsades de pointes. Pacing Clin Electrophysiol. 1998 May; 21(5): 1029-34.
[458] Hatem SN, Coulombe A, Balse E. Specificities of atrial electrophysiology: Clues to a better understanding of cardiac function and the mechanisms of arrhythmias. J Mol Cell Cardiol. Jan; 48(1): 90-5.
[459] Maleckar MM, Greenstein JL, Giles WR, Trayanova NA. Electrotonic coupling between human atrial myocytes and fibroblasts alters myocyte excitability and repolarization. Biophys J. 2009 Oct 21; 97(8): 2179-90.
[460] Levin SG, Shamsutdinova AA, Godukhin OV. Apamin, a selective blocker of SK(Ca) channels, inhibits posthypoxic hyperexcitability but does not affect rapid hypoxic preconditioning in hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. Neurosci Lett. 2010 Oct 22; 484(1): 35-8.
[461] Dale TJ, Cryan JE, Chen MX, Trezise DJ. Partial apamin sensitivity of human small conductance Ca2+-activated K+ channels stably expressed in Chinese hamster ovary cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2002 Nov; 366(5): 470-7.
[462] Wittekindt OH, Visan V, Tomita H, Imtiaz F, Gargus JJ, Lehmann-Horn F, et al. An apamin- and scyllatoxin-insensitive isoform of the human SK3 channel. Mol Pharmacol. 2004 Mar; 65(3): 788-801.
[463] Weatherall KL, Goodchild SJ, Jane DE, Marrion NV. Small conductance calcium-activated potassium channels: from structure to function. Prog Neurobiol. Jul; 91(3): 242-55.

dc_1149_15

[464] Andalib A, Brugada R, Nattel S. Atrial fibrillation: evidence for genetically determined disease. Curr Opin Cardiol. 2008 May; 23(3): 176-83.
[465] Michael G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. Cardiovasc Res. 2009 Feb 15; 81(3): 491-9.
[466] Kleger A, Seufferlein T, Malan D, Tischendorf M, Storch A, Wolheim A, et al. Modulation of calcium-activated potassium channels induces cardiogenesis of pluripotent stem cells and enrichment of pacemaker-like cells. Circulation. 2010 Nov 2; 122(18): 1823-36.
[467] Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Delpon E. I(Kur)/Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. Expert Opin Investig Drugs. 2009 Apr; 18(4): 399-416.
[468] Steele DF, Eldstrom J, Fedida D. Mechanisms of cardiac potassium channel trafficking. J Physiol. 2007 Jul 1; 582(Pt 1): 17-26.
[469] Schumacher SM, Martens JR. Ion channel trafficking: a new therapeutic horizon for atrial fibrillation. Heart Rhythm. Sep; 7(9): 1309-15.
[470] Bokil NJ, Baisden JM, Radford DJ, Summers KM. Molecular genetics of long QT syndrome. Mol Genet Metab. Sep; 101(1): 1-8.
[471] Nattel S. Calcium-activated potassium current: a novel ion channel candidate in atrial fibrillation. J Physiol. 2009 Apr 1; 587(Pt 7): 1385-6.
[472] Chua SK, Chang PC, Maruyama M, Turker I, Shinohara T, Shen MJ, et al. Small-conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. Circ Res. Apr 15; 108(8): 971-9.
[473] Chang PC, Hsieh YC, Hsueh CH, Weiss JN, Lin SF, Chen PS. Apamin induces early afterdepolarizations and torsades de pointes ventricular arrhythmia from failing rabbit ventricles exhibiting secondary rises in intracellular calcium. Heart Rhythm. Oct; 10(10): 1516-24.
[474] Zhang XD, Timofeyev V, Li N, Myers RE, Zhang DM, Singapuri A, et al. Critical roles of a small conductance Ca(2)(+)-activated K(+) channel (SK3) in the repolarization process of atrial myocytes. Cardiovasc Res. Feb 1; 101(2): 317-25.
[475] Mahida S, Mills RW, Tucker NR, Simonson B, Macri V, Lemoine MD, et al. Overexpression of KCNN3 results in sudden cardiac death. Cardiovasc Res. Feb 1; 101(2): 326-34.
[476] Qi XY, Diness JG, Brundel BJ, Zhou XB, Naud P, Wu CT, et al. Role of small-conductance calcium-activated potassium channels in atrial electrophysiology and fibrillation in the dog. Circulation. Jan 28; 129(4): 430-40.
[477] Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, et al. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. Nat Genet. Mar; 42(3): 240-4.
[478] Antzelevitch C, Burashnikov A. Overview of Basic Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. Card Electrophysiol Clin. Mar 1; 3(1): 23-45.
[479] Hsueh C-H, Chang P-C, Hsieh Y-C, Reher T, Chen P-S, Lin S-F.
[480] Gui L, Bao Z, Jia Y, Qin X, Cheng ZJ, Zhu J, et al. Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca2+-activated K+ channels. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Jan 1; 304(1): H118-30.
[481] Zygmunt AC, Nesterenko VV, Rajamani S, Hu D, Barajas-Martinez H, Belardinelli L, et al. Mechanisms of atrial-selective block of Na(+) channels by ranolazine: I. Experimental analysis of the use-dependent block. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Oct; 301(4): H1606-14.
[482] Burashnikov A, Di Diego JM, Zygmunt AC, Belardinelli L, Antzelevitch C. Atrium-selective sodium channel block as a strategy for suppression of atrial fibrillation: differences in sodium channel inactivation between atria and ventricles and the role of ranolazine. Circulation. 2007 Sep 25; 116(13): 1449-57.
[483] Hancock JM, Weatherall KL, Choisy SC, James AF, Hancox JC, Marrion NV. Selective activation of heteromeric SK channels contributes to action potential repolarization in mouse atrial myocytes. Heart Rhythm. May; 12(5): 1003-15.
[484] Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. Physiol Rev. 1999 Jul; 79(3): 917-1017.
[485] Grandi E, Pasqualini FS, Pes C, Corsi C, Zaza A, Severi S. Theoretical investigation of action potential duration dependence on extracellular Ca2+ in human cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 2009 Mar; 46(3): 332-42.
[486] Soltis AR, Saucerman JJ. Synergy between CaMKII substrates and beta-adrenergic signaling in regulation of cardiac myocyte Ca(2+) handling. Biophys J. Oct 6; 99(7): 2038-47.
[487] Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, et al. Regulation of the transient outward K(+) current by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. Circ Res. 1999 Oct 29; 85(9): 810-9.

dc_1149_15

[488] Heath BM, Terrar DA. Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, IKr, through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes. J Physiol. 2000 Feb 1; 522 Pt 3: 391-402.
[489] Lo CF, Numann R. Independent and exclusive modulation of cardiac delayed rectifying K+ current by protein kinase C and protein kinase A. Circ Res. 1998 Nov 16; 83(10): 995-1002.
[490] Terrenoire C, Clancy CE, Cormier JW, Sampson KJ, Kass RS. Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. Circ Res. 2005 Mar 18; 96(5): e25-34.
[491] Kurokawa J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current I(ks)in heart. J Mol Cell Cardiol. 2001 May; 33(5): 873-82.
[492] Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, et al. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. Science. 2002 Jan 18; 295(5554): 496-9.
[493] Ruiz-Petrich E, de Lorenzi F, Chartier D. Role of the inward rectifier IK1 in the myocardial response to hypoxia. Cardiovasc Res. 1991 Jan; 25(1): 17-26.
[494] Bers DM, Despa S, Bossuyt J. Regulation of Ca2+ and Na+ in normal and failing cardiac myocytes. Ann N Y Acad Sci. 2006 Oct; 1080: 165-77.
[495] Banyasz T, Horvath B, Virag L, Barandi L, Szentandrassy N, Harmati G, et al. Reverse rate dependency is an intrinsic property of canine cardiac preparations. Cardiovasc Res. 2009 Nov 1; 84(2): 237-44.
[496] Jost N, Virag L, Comtois P, Ordog B, Szuts V, Seprenyi G, et al. Ionic mechanisms limiting cardiac repolarization reserve in humans compared to dogs. J Physiol. Sep 1; 591(Pt 17): 4189-206.
[497] Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. Circ Res. 2000 Dec 8; 87(12): 1095-102.
[498] Ma XY, Yu JM, Zhang SZ, Liu XY, Wu BH, Wei XL, et al. External Ba2+ block of the two-pore domain potassium channel TREK-1 defines conformational transition in its selectivity filter. J Biol Chem. Nov 18; 286(46): 39813-22.
[499] Nagy N, Szuts V, Horvath Z, Seprenyi G, Farkas AS, Acsai K, et al. Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? J Mol Cell Cardiol. 2009 Nov; 47(5): 656-63.
[500] Dan P, Lin E, Huang J, Biln P, Tibbits GF. Three-dimensional distribution of cardiac Na+-Ca2+ exchanger and ryanodine receptor during development. Biophys J. 2007 Oct 1; 93(7): 2504-18.
[501] Scriven DR, Asghari P, Schulson MN, Moore ED. Analysis of Cav1.2 and ryanodine receptor clusters in rat ventricular myocytes. Biophys J. Dec 15; 99(12): 3923-9.
[502] Cavalli A, Eghbali M, Minosyan TY, Stefani E, Philipson KD. Localization of sarcolemmal proteins to lipid rafts in the myocardium. Cell Calcium. 2007 Sep; 42(3): 313-22.
[503] Calaghan S, White E. Caveolae modulate excitation-contraction coupling and beta2-adrenergic signalling in adult rat ventricular myocytes. Cardiovasc Res. 2006 Mar 1; 69(4): 816-24.
[504] Schroder E, Byse M, Satin J. L-type calcium channel C terminus autoregulates transcription. Circ Res. 2009 Jun 19; 104(12): 1373-81.
[505] Viola HM, Arthur PG, Hool LC. Evidence for regulation of mitochondrial function by the L-type Ca2+ channel in ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2009 Jun; 46(6): 1016-26.
[506] Brette F, Salle L, Orchard CH. Differential modulation of L-type Ca2+ current by SR Ca2+ release at the T-tubules and surface membrane of rat ventricular myocytes. Circ Res. 2004 Jul 9; 95(1): e1-7.
[507] Goel M, Zuo CD, Sinkins WG, Schilling WP. TRPC3 channels colocalize with Na+/Ca2+ exchanger and Na+ pump in axial component of transverse-axial tubular system of rat ventricle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Feb; 292(2): H874-83.
[508] Tanaka H, Namekata I, Takeda K, Kazama A, Shimizu Y, Moriwaki R, et al. Unique excitation-contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na+-Ca2+ exchanger. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005 Jun; 371(6): 526-34.
[509] Iwamoto T, Watanabe Y, Kita S, Blaustein MP. Na+/Ca2+ exchange inhibitors: a new class of calcium regulators. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2007 Sep; 7(3): 188-98.
[510] Findlay I. Physiological modulation of inactivation in L-type Ca2+ channels: one switch. J Physiol. 2004 Jan 15; 554(Pt 2): 275-83.
[511] Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. Circ Res. 2000 Aug 18; 87(4): 275-81.
[512] Pueyo E, Husti Z, Hornyik T, Baczko I, Laguna P, Varro A, et al. Mechanisms of ventricular rate adaptation as a predictor of arrhythmic risk. Am J Physiol Heart Circ Physiol. May; 298(5): H1577-87.

dc_1149_15

[513] Milberg P, Pott C, Fink M, Frommeyer G, Matsuda T, Baba A, et al. Inhibition of the Na+/Ca2+ exchanger suppresses torsades de pointes in an intact heart model of long QT syndrome-2 and long QT syndrome-3. Heart Rhythm. 2008 Oct; 5(10): 1444-52.
[514] Farkas AS, Makra P, Csik N, Orosz S, Shattock MJ, Fulop F, et al. The role of the Na+/Ca2+ exchanger, I(Na) and I(CaL) in the genesis of dofetilide-induced torsades de pointes in isolated, AV-blocked rabbit hearts. Br J Pharmacol. 2009 Mar; 156(6): 920-32.
[515] Sarai N, Kobayashi T, Matsuoka S, Noma A. A simulation study to rescue the Na+/Ca2+ exchanger knockout mice. J Physiol Sci. 2006 Jun; 56(3): 211-7.
[516] Grandi E, Pandit SV, Voigt N, Workman AJ, Dobrev D, Jalife J, et al. Human atrial action potential and Ca2+ model: sinus rhythm and chronic atrial fibrillation. Circ Res. Oct 14; 109(9): 1055-66.
[517] Li P, Rudy Y. A model of canine purkinje cell electrophysiology and Ca(2+) cycling: rate dependence, triggered activity, and comparison to ventricular myocytes. Circ Res. 2011 Jun 24; 109(1): 71-9.
[518] Pott C, Yip M, Goldhaber JI, Philipson KD. Regulation of cardiac L-type Ca2+ current in Na+-Ca2+ exchanger knockout mice: functional coupling of the Ca2+ channel and the Na+-Ca2+ exchanger. Biophys J. 2007 Feb 15; 92(4): 1431-7.
[519] Terracciano CM, Hancox JC. ORM-10103: a significant advance in sodium-calcium exchanger pharmacology? Br J Pharmacol. Oct; 170(4): 765-7.
[520] Diaz RJ, Wilson GJ. Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models. Cardiovasc Res. 2006 May 1; 70(2): 286-96.
[521] Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. Circ Res. 1987 Feb; 60(2): 153-68.
[522] Frohlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. Eur Heart J. Jun; 34(23): 1714-22.
[523] MacDonald AC, Howlett SE. Differential effects of the sodium calcium exchange inhibitor, KB-R7943, on ischemia and reperfusion injury in isolated guinea pig ventricular myocytes. Eur J Pharmacol. 2008 Feb 2; 580(1-2): 214-23.
[524] Jost N, Nagy N, Corici C, Kohajda Z, Horvath A, Acsai K, et al. ORM-10103, a novel specific inhibitor of the Na+/Ca2+ exchanger, decreases early and delayed afterdepolarizations in the canine heart. British Journal of Pharmacology. Oct; 170(4): 768-78.
[525] Barlow CH, Harden WR, 3rd, Harken AH, Simson MB, Haselgrove JC, Chance B, et al. Fluorescence mapping of mitochondrial redox changes in heart and brain. Crit Care Med. 1979 Sep; 7(9): 402-6.
[526] Lu J, Zang WJ, Yu XJ, Chen LN, Zhang CH, Jia B. Effects of ischaemia-mimetic factors on isolated rat ventricular myocytes. Exp Physiol. 2005 Jul; 90(4): 497-505.
[527] Eng J, Lynch RM, Balaban RS. Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. Biophys J. 1989 Apr; 55(4): 621-30.
[528] Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. Annu Rev Physiol. 2008; 70: 23-49.
[529] O'Brien JD, Ferguson JH, Howlett SE. Effects of ischemia and reperfusion on isolated ventricular myocytes from young adult and aged Fischer 344 rat hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 May; 294(5): H2174-83.
[530] Talukder MA, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. Cardiovasc Res. 2009 Dec 1; 84(3): 345-52.
[531] Eisner DA, Diaz ME, Li Y, O'Neill SC, Trafford AW. Stability and instability of regulation of intracellular calcium. Exp Physiol. 2005 Jan; 90(1): 3-12.
[532] Tokuno T, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y. Protective effect of benidipine against the abnormal electrical activity in single ventricular myocytes of the guinea pig under simulated ischemic conditions and reperfusion. Jpn J Pharmacol. 2000 Mar; 82(3): 199-209.
[533] Lukas A, Antzelevitch C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular epicardium and endocardium to ischemia. Role of the transient outward current. Circulation. 1993 Dec; 88(6): 2903-15.
[534] Louch WE, Ferrier GR, Howlett SE. Changes in excitation-contraction coupling in an isolated ventricular myocyte model of cardiac stunning. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Aug; 283(2): H800-10.
[535] Diaz ME, O'Neill SC, Eisner DA. Sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuation is the key to cardiac alternans. Circ Res. 2004 Mar 19; 94(5): 650-6.
[536] Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. Int J Cardiol. 2005 Apr 20; 100(2): 179-90.
[537] Khananshvili D. The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) - structure, function, and regulation in health and disease. Molecular aspects of medicine. 2013 Apr-Jun; 34(2-3): 220-35.

dc_1149_15

[538] Aye NN, Xue YX, Hashimoto K. Antiarrhythmic effects of cariporide, a novel Na+-H+ exchange inhibitor, on reperfusion ventricular arrhythmias in rat hearts. Eur J Pharmacol. 1997 Nov 27; 339(2-3): 121-7.
[539] Xue YX, Aye NN, Hashimoto K. Antiarrhythmic effects of HOE642, a novel Na(+)-H+ exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in animal hearts. Eur J Pharmacol. 1996 Dec 19; 317(2-3): 309-16.
[540] Yasutake M, Ibuki C, Hearse DJ, Avkiran M. Na+/H+ exchange and reperfusion arrhythmias: protection by intracoronary infusion of a novel inhibitor. Am J Physiol. 1994 Dec; 267(6 Pt 2): H2430-40.
[541] Iwamoto T. Forefront of Na+/Ca2+ exchanger studies: molecular pharmacology of Na+/Ca2+ exchange inhibitors. J Pharmacol Sci. 2004 Sep; 96(1): 27-32.
[542] Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. Heart failure reviews. 2009 Dec; 14(4): 213-24.
[543] Chou CC, Chang PC, Wen MS, Lee HL, Chu Y, Baba A, et al. Effects of SEA0400 on arrhythmogenicity in a Langendorff-perfused 1-month myocardial infarction rabbit model. Pacing Clin Electrophysiol. May; 36(5): 596-606.
[544] Kormos A, Nagy N, Acsai K, Vaczi K, Agoston S, Pollesello P, et al. Efficacy of selective NCX inhibition by ORM-10103 during simulated ischemia/reperfusion. Eur J Pharmacol. 2014 Oct 5; 740: 539-51.
[545] Nagy N, Kormos A, Kohajda Z, Szebeni A, Szepesi J, Pollesello P, et al. Selective Na /Ca exchanger inhibition prevents Ca overload induced triggered arrhythmias. Br J Pharmacol. 2014 Jul 30.
[546] Madonna R, De Caterina R. Sodium-hydrogen exchangers (NHE) in human cardiovascular diseases: interfering strategies and their therapeutic applications. Vascular pharmacology. 2013 Nov-Dec; 59(5-6): 127-30.
[547] Scholz W, Albus U, Counillon L, Gogelein H, Lang HJ, Linz W, et al. Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. Cardiovasc Res. 1995 Feb; 29(2): 260-8.
[548] Liao R, Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Jul 15; 303(2): H156-67.
[549] Avkiran M, Ibuki C. Reperfusion-induced arrhythmias. A role for washout of extracellular protons? Circ Res. 1992 Dec; 71(6): 1429-40.
[550] Zhang Y, Chen J, Zhang F, Xia Q. Cariporide attenuates myocardial ischaemia, reperfusion injury and apoptosis in isolated rat hearts. Acta cardiologica. 2006 Dec; 61(6): 637-41.
[551] Scholz W, Albus U. Na+/H+ exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion. Basic Res Cardiol. 1993 Sep-Oct; 88(5): 443-55.
[552] Wirth KJ, Maier T, Busch AE. NHE1-inhibitor cariporide prevents the transient reperfusion-induced shortening of the monophasic action potential after coronary ischemia in pigs. Basic Res Cardiol. 2001 Apr; 96(2): 192-7.
[553] Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D, Padilla F, Inserte J, Barrabes JA, Ruiz-Meana M, et al. Pre-treatment with the Na+/H+ exchange inhibitor cariporide delays cell-to-cell electrical uncoupling during myocardial ischemia. Cardiovasc Res. 2003 Apr 1; 58(1): 109-17.
[554] Wang J, Zhang Z, Hu Y, Hou X, Cui Q, Zang Y, et al. SEA0400, a novel Na+/Ca2+ exchanger inhibitor, reduces calcium overload induced by ischemia and reperfusion in mouse ventricular myocytes. Physiol Res. 2007; 56(1): 17-23.
[555] Matsumoto T, Miura T, Miki T, Genda S, Shimamoto K. Blockade of the Na+-Ca2+ exchanger is more efficient than blockade of the Na+-H+ exchanger for protection of the myocardium from lethal reperfusion injury. Cardiovasc Drugs Ther. 2002 Jul; 16(4): 295-301.
[556] Hartmann M, Decking UK. Blocking Na(+)-H+ exchange by cariporide reduces Na(+)-overload in ischemia and is cardioprotective. J Mol Cell Cardiol. 1999 Nov; 31(11): 1985-95.
[557] Milberg P, Pott C, Frommeyer G, Fink M, Ruhe M, Matsuda T, et al. Acute inhibition of the Na(+)/Ca(2+) exchanger reduces proarrhythmia in an experimental model of chronic heart failure. Heart Rhythm. 2012 Apr; 9(4): 570-8.
[558] Namekata I, Shimada H, Kawanishi T, Tanaka H, Shigenobu K. Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial Ca2+ overload. Eur J Pharmacol. 2006 Aug 14; 543(1-3): 108-15.
[559] Dhein S, Krusemann K, Engelmann F, Gottwald M. Effects of the type-1 Na+/H+-exchange inhibitor cariporide (Hoe 642) on cardiac tissue. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1998 Jun; 357(6): 662-70.

dc_1149_15

9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

1. Szepesi J, Acsai K, Sebok Z, Prorok J, Pollesello P, Levijoki J, Papp JG, Varro A, **Toth A**
Comparison of the efficiency of Na+/Ca^{2+} exchanger or Na+/H+ exchanger inhibition and their combination in reducing coronary reperfusion-induced arrhythmias
JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 66:(2) pp. 215-226. (2015)

2. Nagy N, Kormos A, Kohajda Z, Szebeni A, Szepesi J, Pollesello P, Levijoki J, Acsai K, Virag L, Nanasi PP, Papp JG, Varro A, **Toth A**
Selective Na /Ca exchanger inhibition prevents Ca overload induced triggered arrhythmias.
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 171:(24) pp. 5665-5681. (2014)

3. Kormos A, Nagy N, Acsai K, Vaczi K, Agoston S, Pollesello P, Levijoki J, Szentandrassy N, Papp JG, Varro A, **Toth A**
Efficacy of selective NCX inhibition by ORM-10103 during simulated ischemia/reperfusion.
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 740: pp. 539-551. (2014)

4. Nagy N, Acsai K, Kormos A, Sebők Zs, Farkas A, Jost N, Nánási PP, Papp JGy, Varró A, **Tóth A**
[Ca^{2+}]i-induced augmentation of the inward rectifier potassium current (IK1) in canine and human ventricular myocardium.
PFLÜGERS ARCHIV - EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY 465:(11) pp. 16211635. (2013)

5. Nagy N, Marton Z, Kiss L, Varro A, Nanasi PP, **Toth A**
Role of Ca($^{2+}$)-Sensitive K(+) Currents in Controlling Ventricular Repolarization: Possible Implications for Future Antiarrhytmic Drug Therapy.
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 18:(24) pp. 3622-3639. (2011)

6. **Toth A**, Kiss L, Varro A, Nanasi PP
Potential therapeutic effects of Na+/Ca^{2+} exchanger inhibition in cardiac diseases
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 16:(25) pp. 3294-3321. (2009)

7. Nagy N, Szűts V, Horváth Z, Seprényi Gy, Farkas AS, Acsai K, Prorok J, Bitai M, Kun A, Pataricza J, Papp JGy, Nánási PP, Varró A, **Tóth A**
Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization?
JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY 47:(5) pp. 656-663. (2009)

8. Birinyi P, **Toth A**, Jona I, Acsai K, Almassy J, Nagy N, Prorok J, Gherasim I, Papp Z, Hertelendi Z, Szentandrassy N, Banyasz T, Fulop F, Papp JGy, Varro A, Nanasi PP, Magyar J ***(megosztott első szerző)***
The Na+/Ca^{2+} exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca^{2+} transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes
CARDIOVASCULAR RESEARCH 78:(3) pp. 476-484. (2008)

9. Acsai K, Kun A, Farkas AS, Fülöp F, Nagy N, Balázs M, Szentandrássy N, Nánási PP, Papp JGy, Varró A, **Tóth A**
Effect of partial blockade of the Na(+)/Ca($^{2+}$)-exchanger on Ca($^{2+}$) handling in isolated rat ventricular myocytes
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 576:(1-3) pp. 1-6. (2007)

TOVÁBBI ELSŐ ÉS UTOLSÓ SZERZŐS KÖZLEMÉNYEK

10. **Tóth A**
Optical techniques for intracellular calcium determination in the heart
In: Jost N, Muntean D (szerk. Principles and Experiments Guide in Electrophysiology and Molecular Biology. 183 p.
Timisoara: University of Medicine and Pharmacy Victor Babes, 2014. pp. 63-81.

11. **Tóth A**, Varró A
Role of NCX 1 and NHE1 in ventricular arrhythmia: [Chapter 30] In: Tripathi ON, Ravens U, Sanguinetti MC (szerk.) Heart rate and rhythm: Molecular basis, pharmacological modulation & clinical implications. Heidelberg; London; New York: Springer, pp. 543-561. (2011)

12. Prorok J, Kovács PP, Kristóf A, Nagy N, Tombácz D, Tóth JS, Ördög B, Jost N, Virág L, Papp JGy, Varró A, **Tóth A**, Boldogkői Zs *(megosztott utolsó szerző)*
Herpesvirus-mediated delivery of a genetically encoded fluorescent Ca2+ sensor to canine cardiomyocytes
JOURNAL OF BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY 2009: Paper 361795. 12 p. (2009)

13. **Toth A**, Pal M, Intaglietta M, Johnson PC
Contribution of anaerobic metabolism to reactive hyperemia in skeletal muscle
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 292:(6) pp. H2643-H2653. (2007)

dc_1149_15

14. Ruttner Z, Ivanics T, Slaaf DW, Reneman RS, Ligeti L, **Toth A**
A novel model for the in vivo monitoring of uterine microcirculation and intracellular free calcium changes in rat
MICROVASCULAR RESEARCH 59:(2) pp. 213-220. (2000)

15. **Toth A**, Ivanics T, Ruttner Z, Slaaf DW, Reneman RS, Ligeti L
Quantitative assessment of [ca2+](i) levels in rat skeletal muscle in vivo
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 275:(5) pp. H1652-H1662. (1998)

16. **Toth A**, Pal M, Tischler ME, Johnson PC
Are there oxygen-deficient regions in resting skeletal muscle?
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 39:(6) pp. H1933-H1939. (1996)

17. **Toth A**, Tischler ME, Pal M, Koller A, Johnson PC
A multipurpose instrument for quantitative intravital microscopy
JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY 73:(1) pp. 296-306. (1992

18. Orosz M, **Tóth A**
Tracheális simaizom kontrakciója in vitro a környezeti hőmérséklet csökkentésére
KÍSÉRLETES ORVOSTUDOMÁNY 35: pp. 52-55. (1983)

EGYÉB, TELJES KÖZLEMÉNYEK

19. Bányász T, Szentandrássy N, **Tóth A**, Nánási PP, Magyar J, Chen-Izu Y
Cardiac Calmodulin Kinase: A Potential Target for Drug Design.
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 18:(24) pp. 3707-3713. (2011)

20. Jost N, Nagy N, Corici C, Kohajda Zs, Horváth A, Acsai K, Biliczki P, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, **Tóth A**, Papp JGy, Varró A, Virág L
ORM-10103, a novel specific inhibitor of the sodium/calcium exchanger, decreases early and delayed afterdepolarization in the canine heart.
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 170:(4) pp. 768-778. (2013)

21. Farkas AS, Acsai K, Nagy N, **Tóth A**, Fülöp F, Seprényi G, Birinyi P, Nánási PP, Forster T, Csanády M, Papp JGy, Varró A, Farkas A
Na(+)/Ca($^{2+}$) exchanger inhibition exerts a positive inotropic effect in the rat heart, but fails to influence the contractility of the rabbit heart
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 154:(1) pp. 93-104. (2008)

22. Pecze L, Szabo K, Szell M, Josvay K, Kaszas K, Kusz E, Letoha T, Prorok J, Koncz I, **Toth A**, Kemeny L, Vizler C, Olah Z
Human keratinocytes are vanilloid resistant
PLOS ONE 3:(10) p. e3419. (2008)

23. Szentandrassy N, Birinyi P, Szigeti G, Farkas A, Magyar J, **Toth A**, Csernoch L, Varro A, Nanasi PP
SEA0400 fails to alter the magnitude of intracellular Ca^{2+} transients and contractions in Langendorff-perfused guinea pig heart
NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 378:(1) pp. 65-71. (2008)

24. Tóth-Molnár E, Venglovecz V, Ozsvari B, Rakonczay Z, Varró A, Papp JGy, **Tóth A**, Lonovics J, Takács T, Ignáth I, Iványi B, Hegyi P
New experimental method to study acid/base transporters and their regulation in lacrimal gland ductal epithelia
INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE 48:(8) pp. 3746-3755. (2007)

25. Farkas AS, Acsai K, **Tóth A**, Dezsi L, Orosz Sz, Forster T, Csanády M, Papp JGy, Varró A, Farkas A
Importance of extracardiac alpha(1)-adrenoceptor stimulation in assisting dofetilide to induce torsade de pointes in rabbit hearts
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 537:(1-3) pp. 118-125. (2006)

26. Hegyi P, Rakonczay Z, Tiszlavicz L, Varró A, **Tóth A**, Rácz G, Varga G, Gray MA, Argent BE
SLC26 transporters and the inhibitory control of pancreatic ductal bicarbonate secretion.
In: Chadwick DJ, Goode J (szerk.) Epithelial anion transport in health and disease : the role of the SLC26 transporters family. 273 p.
Konferencia helye, ideje: London, Nagy-Britannia, 2005.03.01-2005.03.03. Chichester: John Wiley and Sons, Inc., 2006. pp. 164-176. (Novartis Foundation Symposium; vol. 273.)

27. Birinyi P, Acsai K, Banyasz T, **Toth A**, Horvath B, Virag L, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Fulop F, Nanasi P
Effects of SEA0400 and KB-R7943 on Na+/Ca^{2+} exchange current and L-type Ca^{2+} current in canine ventricular cardiomyocytes
NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 372:(1) pp. 63-70. (2005)

dc_1149_15

28. Hegyi P, Ördög B, Rakonczai Z Jr, Takács T, Lonovics J, Szabolcs A, Sári R, **Tóth A**, Papp JGy, Varró A, K Kovács M, Gray AM, Argent BE, Boldogkoi Zs
Effect of herpesvirus infection on pancreatic duct cell secretion
WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 11:(38) pp. 5997-6002. (2005)

29. Hegyi P, Rakonczay Z, Tiszlavicz L, Varro A, **Toth A**, Racz G, Varga G, Gray MA, Argent BE
Protein kinase C mediates the inhibitory effect of substance P on HCO3- secretion from guinea pig pancreatic ducts
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY 288:(5) pp. C1030-C1041. (2005)

30. op den Buijs J, Miklos Z, van Riel NAW, Prestia CM, Szenczi O, **Toth A**, Van der Vusse GJ, Szabo C, Ligeti L, Ivanics T
Beta-adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes
LIFE SCIENCES 76:(10) pp. 1083-1098. (2005)

31. Glasz T, Hortovanyi E, Mozes G, Kiss A, Lotz G, Kaposi P, Szik A, Kardos M, Sziller I, Nagy B, Ban Z, **Toth A**, Kassai I, Horkay F, Dudas G, Kadar A
Chlamydia pneumoniae in coronary bypass grafts of redo patients. The concept of the "adventitial baseline infection"
PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE 200:(9) pp. 609-618. (2004)

32. Nagy Zs, Virág L, **Tóth A**, Biliczki P, Acsai K, Bányász T, Nánási P, Papp JGy, Varró A
Selective Inhibition of Sodium-calcium Exchanger by Sea-0400 Decreases Early and Delayed Afterdepolarization Canine Heart
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 143:(7) pp. 827-831. (2004)

33. Miklos Z, Ivanics T, Roemen THM, van der Vusse GJ, Dezsi L, Szekeres M, Kemecsei P, **Toth A**, Kollai M, Ligeti L
Time related changes in calcium handling in the isolated ischemic and reperfused rat heart
MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY 250:(1-2) pp. 115-124. (2003)

34. Saltzman DJ, **Toth A**, Tsai AG, Intaglietta M, Johnson PC
Oxygen tension distribution in postcapillary venules in resting skeletal muscle
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 285:(5) pp. H1980-H1985. (2003)

35. Ruttner Z, Ivanics T, Slaaf DW, Reneman RS, **Toth A**, Ligeti L
In vivo monitoring of intracellular free calcium changes during uterine activation by prostaglandin f-2 alpha and oxytocin
JOURNAL OF THE SOCIETY FOR GYNECOLOGIC INVESTIGATION 9:(5) pp. 294-298. (2002)

36. Ivanics T, Miklos Z, Dezsi L, Ikrenyi K, **Toth A**, Roemen THM, Van der Vusse GJ, Ligeti L
Concomitant accumulation of intracellular free calcium and arachidonic acid in the ischemic-reperfused rat heart
MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY 226:(1-2) pp. 119-128. (2001)

37. Ivanics T, Miklos Z, Ruttner Z, Batkai S, Slaaf DW, Reneman RS, **Toth A**, Ligeti L
Ischemia/reperfusion-induced changes in intracellular free Ca^{2+} levels in rat skeletal muscle fibers - an in vivo study
PFLÜGERS ARCHIV - EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY 440:(2) pp. 302-308. (2000)

38. Batkai S, Racz IB, Ivanics T, **Toth A**, Hamar J, Slaaf DW, Reneman RS, Ligeti L
An in vivo model for studying the dynamics of intracellular free calcium changes in slow- and fast-twitch muscle fibres
PFLÜGERS ARCHIV - EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY 438:(5) pp. 665-670. (1999)

39. Pal M, **Toth A**, Ping P, Johnson PC
Capillary blood flow and tissue metabolism in skeletal muscle during sympathetic trunk stimulation
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 274:(2) pp. H430-H440. (1998)

40. Johnson PC, Richmond KN, Shonat RD, **Toth A**, Pal M, Tischler ME, Lynch RM
Oxygen delivery regulation: Implications for blood substitutes
In: Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M (szerk.) Blood Substitutes: Physiological Basis of Efficacy. 205 p. Boston: Birkhäuser Verlag, 1995. pp. 175-186. (Advances in blood substitutes; vol. 1.)

41. Pal M, **Toth A**, Wu CH, Tucker RA, Johnson PC
A computer-controlled system for multiple site microcirculatory measurements
MICROVASCULAR RESEARCH 45:(1) pp. 95-105. (1993)

42. Rubányi G, **Toth A**, Kovach AGB
Distinct effect of contraction and ion-transport on NADH fluorescence and lactate production in uterine smooth-muscle
ACTA PHYSIOLOGICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE 59:(1) pp. 45-58. (1982)

dc_1149_15

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom gimnáziumi tanáraimnak, akik szakmai tudása és emberi hozzáállása indított el ezen a pályán. Különösen osztályfőnökömnek és magyar tanáromnak Gartner Évának, illetve matematika és fizika tanáraimnak, Herczeg Jánosnak és Hubert Györgynének, kiktől nemcsak a tantárgyukkal kapcsolatos átfogó tudást, de életszemléletet, problémamegoldó gondolkodást és munkámmal szembeni igényességet is tanultam. Köszönöm kívülük valamennyi kiváló egyetemi tanáromnak, hogy a magas szintű ismeretek átadásán kívül hozzásegítettek az igényes tudományos gondolkodás és kísérletes munka alapjainak elsajátításához.

Hálás köszönettel tartozom Prof. Kovách Arisztidnek, első munkahelyi vezetőmnek, hogy fizikus létemre lehetővé tette bekapcsolódásomat az orvostudományi kutatások sűrűjébe, megszerettette velem az élettant és folyamatosan segített tudományos előrehaladásomban. Köszönettel tartozom Dóra Eörs, Ligeti László és Koller Ákos professzoroknak, Dr. Nádasy Györgynek, Dr. Gilányi Magdolnának, Dr. Ikrényi Kornéliának, Dr. Ivanics Tamásnak, Dr. Ruttner Zoltánnak, Dr. Bátkai Sándornak, Németh Gyulának, és minden budapesti kollegámnak, akik segítették tudományos vagy oktatói tevékenységemet.

Őszintén hálás vagyok Paul C. Johnson professzor úrnak, aki arizonai tanulmányutam alatt volt vezetőm és mentorom, aki ismeretlenül szavazott bizalmat nekem, és akitől talán a legtöbbet tanultam a tudományos kísérletes munka, publikációs tevékenység és kooperációs kapcsolatok minden vonatkozásában. Hálásan köszönöm maastrichti kooperációs partnereim, Robert S. Reneman, Dick Slaaf és Ger van der Vusse professzorok rendkívül hasznos és előremutató tanácsait, illetve külföldi utazásaim és kongresszusi részvételeim támogatását.

Különösen hálás vagyok Prof. Varró Andrásnak, kutatásvezetőmnek és jelenlegi munkahelyem igazgatójának mindazért, amit értem tett. A lehetőségért, hogy egy nehéz pillanatban maximálisan mellém állt és támogatott tudományos pályám újraindításában, hogy lehetővé tette önálló laboratórium kialakítását, munkacsoport szervezését, és minden lehetséges módon segítette tudományos tevékenységemet. Őszintén hálás vagyok Papp Gyula akadémikus úrnak sokoldalú támogatásáért és bíztatásáért. Köszönettel tartozom Dr. Jost Norbertnek, Dr. Virág Lászlónak, Leprán István, Végh Ágnes, Hegyi Péter professzoroknak, Sebők Zsuzsannának, Molnárné Zsuzsának, Girst Gábornak és valamennyi szegedi munkatársamnak támogatásukért, ami nagymértékben hozzájárult itt végzett kutatómunkám kiemelkedő eredményességéhez. Köszönöm Prof. Bari Ferenc dékán úrnak, hogy bevont Intézetének oktatási tevékenységébe.

Hálásan köszönöm Dr. Kékesi Violetta docens asszonynak folyamatos támogatását és felbecsülhetetlen segítségét a disszertáció összeállításában és véglegesítésében. Köszönöm Gábor Tímea biológus munkatársamnak az értekezés befejezéséhez nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom volt PhD hallgatóimnak, Dr. Nagy Norbertnek, Dr. Acsai Károlynak, Dr. Prorok Jánosnak, Dr. Kormos Anitának, Szepesi Juditnak, továbbá minden előző és jelenlegi TDK hallgatómnak, akik szakmai elkötelezettsége és szorgalma nélkülözhetetlen volt a dolgozatba foglalt eredmények eléréséhez.

Köszönetet mondok Prof. Nánási Péternek, Dr. Bányász Tamásnak, Dr. Szentandrássy Norbertnek és valamennyi debreceni partneremnek a sikeres kooperációkért és gyakorlati segítségükért.

Hálás vagyok feleségemnek Mártának, türelméért, lemondásáért és feltétlen támogatásáért, amivel sokat segített tudományos pályafutásom nehéz időszakaiban. Köszönettel tartozom szüleimnek, akiktől emberi tisztességet és őszinte szeretetet tanultam, testvéremnek és lányomnak, akik mindig, minden körülmények között támogattak és akik folyamatos bíztatása nélkül még rögösebb lett volna számomra a kutatói pálya.