

Beszámoló

A humán szívizom ioncsatornáinak ontogenezise
OTKA nyilvántartási szám: T 048132

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

A project célja az volt, hogy egészséges adult humán és embrionális kamrai preparátumokon immunbiokémiai ill. immunhisztokémiai módszerekkel, voltage-clamp, akciós potenciál clamp technikákkal feltérképezzük a felszíni membrán legfontosabb ioncsatornáit és azok regionális eltéréseit. A kísérleteket kutya szívizomsejteken is elvégeztük, mert a humán szívizomminták korlátozott hozzáférése miatt egy, a humán szívizom elektrofiziológiai tulajdonságaihoz leginkább hasonlító állapotmodellt is kerestünk.

1. A humán embrionális szívizommintákkal végzett kísérletek során először minták gyűjtöttünk a későbbi molekuláris biológiai vizsgálatokhoz. Korábban hasonló méréseket senki nem végzett még, így magunknak kellett a molekuláris biológiai módszereket humán embrionális szívizomra applikálnunk. Elektrofiziológiai méréseink során megállapítottuk, hogy a humán embrionális szívizomsejtek spontán aktivitással rendelkeznek. A spontán akciós potenciálok időtartama szignifikánsan hosszabb, az akciós potenciál felszálló szárának meredeksége pedig szignifikánsan kisebb mint az adult szívizomé. Spontán aktivitással a nodális szövetek rendelkeznek adult szíven. Nodális sejteken a spontán diasztolés depolarizációért a hiperpolarizációra aktiválódó u.n. "funny current" (I_f) míg az akciós potenciál felszálló szárának kialakításáért a kalcium ionok felelősek. Eredményeink azt mutatják, hogy humán embrionális szívizomsejteken az akciós potenciálok felszálló száráért a tetrodotoxin-szenzitív, feszültség-függő nátrium csatornák felelősek (I_{Na}). A humán embrionális szívizomsejtek spontán aktivitásáért az I_f mellett elengedhetetlen I_{Na} működése.
2. Minthogy az ontogenetikai vizsgálatokban referenciaként felnőttből származó szívizomszövetet használtunk, elvégeztük a felnőtt szívizom ioncsatornáinak molekuláris biológiai karakterizálását egészséges humán és kutya szívizomban. Ezen vizsgálatok keretében a humán és kutya szívizom eltérő régióiból származó ioncsatorna megoszlásait hasonlítottuk össze. Az enzimatis sejtizolálás során ezért elkülönítve kezeltük a balkamra régióit.
Első lépésként Western blot technikával sikeresen kimutattuk humán és kutya szívizomban az alábbi csatornaproteineket: Kv4.3, KChip2, MiRP1, KvLQT1, MinK, $\alpha 1C$, Kir2.1, Kv1.4, HERG.
a; A humán és kutya mid- és epi-kardiális sejtek vizsgálata során az alábbiakat állapítottuk meg: Western blot technikával kimutattuk, hogy a humán és a kutya epikardiális sejteken több KChip2, KvLQT1, MinK, Kv1.4 és Kv4.3 protein expresszálódik mint midmiokardiális sejteken, ugyanakkor a Nav1.5 és MinK expressziója a midmiokardiális sejteken volt szignifikánsan magasabb. Nem találtunk eltérést MiRP1, $\alpha 1C$, Kir2.1, HERG proteinek expressziójában a szívizom rétegei között. Hasonló eredményt kaptunk humán szívizom esetén is, kivéve, hogy a humán mintákban a HERG proteinek expressziója szignifikánsan nagyobb volt az epikardiális sejteken. Az elektrofiziológiai

mérések során megállapítottuk, hogy midmiokardiális sejteken az akciós potenciál időtartama szignifikánsan hosszabb, a felszálló szár szignifikánsan meredekebb mint epikardiális sejteken, ugyanakkor a phase-1 repolarizáció kifejezettebb az epikardiális sejteken. Az ionáram denzitások jól magyarázzák a tapasztalt akciós potenciál eltéréseket, nevezetesen, a phase-1 repolarizációért felelős tranziens kifelé irányuló kálium áram (I_{to}) amplitúdója és a késői repolarizációért felelős késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének amplitúdója (I_{Ks}) epikardiális sejteken szignifikánsan nagyobb volt, mint midmiokardiális sejteken.

Az epi- és mid-miokardiális sejteken mért ionáram denzitásokat a csatornafehérje mennyiség függvényében ábrázolva a pontok egy egyenes mentén helyezkednek el. Ez azt jelenti, hogy a két paraméter szoros korrelációt mutat mind humán, mind kutya szívmiokardiális sejteken.

- b); A fenti eredményeinket figyelembe véve az apiko-bazális ioncsatorna inhomogenitás vizsgálata során a sejtek kamrafal középső rétegéből izoláltuk. Western blot technikával kimutattuk, hogy a humán és a kutya apikális sejteken több Kv1.4, Kv4.3, KChip2, KvLQT1, MinK, protein expresszálódik mint a bazális sejteken. A többi ioncsatornafehérje expressziójában nem találtunk szignifikáns eltérést. Az ionárammérések során megállapítottuk, hogy az apikális sejteken szignifikánsan nagyobb a tranziens kifelé irányuló kálium áram (I_{to}) és a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének (I_{Ks}) amplitúdója. A késői egyenirányító kálium áram gyors komponensének (I_{Kr}), az L-típusú kalcium áram ($I_{Ca,L}$) és a befelé egyenirányító kálium áram (I_{K1}) amplitúdójában nem találtunk szignifikáns eltérést az apikális és bazális sejtek között. Az ionárammérésekkel összhangban, az apikális sejtekről elvezetett akciós potenciálok időtartama szignifikánsan rövidebbnek bizonyult, ugyanakkor a phase-1 repolarizáció mértéke nagyobb volt mint bazális sejteken. Az apikális és a bazális szívmiokardiális sejteken az elektrofiziológiai paraméterek jól korrelálnak a fehérjemeghatározások eredményeivel.

Egymással összevetve a humán és a kutya szívmiokardiális sejteken kapott eredményeket megállapítottuk, hogy a HERG proteint kivéve, az epi- és mid-miokardiális sejtek és a bazális és apikális sejtek közötti ioncsatorna inhomogenitás megegyezik a humán és kutya szívmiokardiális sejteken. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a kutya szívmiokardiális sejtek elektrofiziológiai sajátosságok tekintetében jó modellje a humán szívmiokardiális sejteknek.

3. A továbbiakban vizsgáltuk a gyors feszültség-függő nátrium csatorna (I_{Na}) késői áramkomponense és az akciós potenciál morfológiája közötti összefüggést, valamint a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének (I_{Ks}) szerepét az akciós potenciál repolarizációjában fiziológias és patológias körülmények között.

- a); Megállapítottuk, hogy mind a vad típusú hH1a mind az N1325S és deltaKPQ mutáns nátrium csatornák esetében megfigyelhető volt a késői nátrium áram jelenléte az akciós potenciál plató fázisa alatt. A késői áramkomponens amplitúdója jól korrelál az akciós potenciál felszálló szárának kialakításában résztvevő nátriumáram (korai áram) amplitúdójával. U.n. rámpa parancsjelek alkalmazásával igazoltuk, hogy az akciós potenciál terjedése során létezik egy optimális depolarizációs sebesség az egyes csatornák esetében, amely meredekség esetén mind a korai mind a késői áram amplitúdók a legnagyobbak.

- b); A késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének (I_{Ks}) az akciós potenciál repolarizációjában betöltött szerepéről sorra ellentmondásos

közlemények jelentek meg az irodalomban. Kísérleteinkkel sikerült kideríteni ezen ellentmondások okát. Olyan kísérleti körülményeket alakítottunk ki, amelyben megváltoztattuk szívizomsejteken az akciós potenciál platójának amplitúdóját úgy, hogy közben nem változott szignifikánsan az akciós potenciál időtartama (APD-95). Ezt 2 nM izoproterenollal, vagy depolarizáló áramimpulzusok injektálásával érték el. Ilyen körülmények között az I_{KS} gátló chromanol 293B (10 μM) szignifikánsan nyújtotta az akciós potenciál időtartamát. A chromanol 293B nyújtó hatása egyenesen arányosnak bizonyult a plató amplitúdójával. Bizonyítottuk, hogy az irodalomban közölt ellentmondásos adatoknak az az oka, hogy a szerzők nem egyforma plató amplitúdóval rendelkező akciós potenciálokot tanulmányozták az I_{KS} szerepét.

4. Tanulmányoztuk a miokardiális ionszatórnák drogérzékenységét. Ennek keretén belül vizsgáltuk az I_{KS} aktivátor mefénsav és L-364,373 molekula hatásait, valamint egy, a központi idegrendszerben ismert hatású készítmény, a norfluoxetin hatásait az $I_{Ca,L}$ és I_{to} csatornákra.
 - a; A norfluoxetin vizsgálata során megállapítottuk, hogy a szer szignifikánsan csökkentette a $I_{Ca,L}$ és az I_{to} amplitúdóját. Megváltoztatta mindkét áram steady state aktivációjának a feszültségfüggését. A norfluoxetin szignifikánsan rövidítette az akciós potenciál időtartamát amit jól magyaráznak az ionszatórnákon feltárt tulajdonságai.
 - b; Miután egyértelműen bizonyítottuk az I_{KS} szerepét az akciós potenciál repolarizációjában, tanulmányoztuk az I_{KS} aktivátor mefénsav és L-364,373 molekula hatásait. Az I_{KS} aktivátorok alkalmazásának elsősorban a QT intervallum megnyúlásával járó kórképekben lehet terápiás szerepe. Megállapítottuk, hogy a non-steroid gyulladásgátló mefénsav (100 μM) szignifikánsan növelte az I_{KS} amplitúdóját. Az L-364,373 egy napjainkban kifejlesztett I_{KS} aktivátor. Ez a molekula tengerimalac szívizmon 0,1-1,0 μM koncentrációkban mintegy 5-10 szeresére növelte az I_{KS} -t. A humán szívizom elektrofiziológiai sajátosságaihoz leginkább hasonlító kutya szívizmon, 1-3 μM koncentrációban, az L-364,373 molekula nem volt hatással az I_{KS} amplitúdójára. Eredményeink jól példázzák, hogy az egyes szerek kardiális hatásai speciesz-függőek lehetnek, ezért elengedhetetlen azok tesztelése humán mintákon, illetve humán szívizom megfelelő modelljén.