

Tudományos Diákköri dolgozat

XXXI. OTDK

Biológia szekció

**$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger inhibitorok Na^+ -függő hatásainak
vizsgálata izolált szívmusclesejteken**

Oravecz Kinga

Biológus MSc 2. éves hallgató

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Témavezető: Dr. Acsai Károly

Belső konzulens: Dr. Farkas Tamás

Tartalomjegyzék

2. Bevezetés	4
2.1 A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ioncserélő funkciója a szívműködésben	4
2.2 A szívműködésben lévő NCX farmakológiai jellemzése	6
2.2 Az NCX gátlók terápiás lehetőségei	7
3. Céltűzések	8
4. Anyagok és módszerek	9
4.1 Kutya kamrai szívműködés izolálása	9
4.2 Kutya pitvari szívműködés izolálása Chunk módszerrel.	10
4.3 Patch clamp mérések	10
5. Eredmények	11
5.1 A SEA0400 NCX-gátló hatásának függése a pipettaoldat Na^+ -koncentrációjától	11
5.2 Az NCX-gátlás következményei intakt Ca-háztartás esetén	14
6. Megbeszélés	18
6.1 Az NCX-gátlás mértéke nem függ az intracelluláris Na^+ koncentrációtól	18
6.2 Az NCX-gátlás következményeinek függése az intracelluláris Na koncentrációtól	21
7. Következtetések	25
8. Köszönetnyilvánítás	26
9. Irodalomjegyzék	27
10. Nyilatkozat	31
11. Rövidítések jegyzéke	33

1. Tartalmi összefoglaló

Háttér: A szívizomsejtek Ca^{2+} -háztartásában a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger (NCX) az egyik legfontosabb Ca^{2+} eltávolító mechanizmus (forward NCX). Kisebb mértékben a sejtek Ca^{2+} -mal való feltöltésében is szerepe van (reverz NCX). A szelektív NCX-inhibítorok fontos farmakológiai eszközök az NCX (pato-)fiziológiai szerepének kutatásában, és a terápiás lehetőségek felderítésében. Kísérleteinkben az NCX-inhibítorok feltételezett Na^+ -függő hatásait vizsgáltuk.

Módszerek: Kísérleteinket kutyaszívből izolált kamrai és pitvari szívizomsejteken végeztük. Az NCX-áramot a patch clamp metodika whole cell konfigurációjában mértük. Az NCX áram-feszültség karakterisztikáját EGTA-val puffertelt intracelluláris oldat jelenlétében +50 mV-tól -100 mV-ig terjedő feszültség-ramp protokoll alkalmazásával regisztráltuk. A sejtek kontraktilitását és az intakt Ca^{2+} -háztartás esetén mérhető NCX-áramot 1Hz-es frekvenciájú feszültségimpulzusok alkalmazásával mértük. A kontrakciókat a kísérlet során rögzített video-fájlok szoftveres analízisével értékeltük. Az NCX gátlására SEA0400-at és ORM10103-at használtunk.

Eredmények: Kutya kamrai és pitvari sejteken a SEA0400 1 μM koncentrációban jelentősen gátolta az NCX reverz (+40mV) és forward (-95mV) irányú működését. A gátlás mértékét a $[\text{Na}^+]_i$ 20 mM-ról 50 mM-ra történő növelése nem befolyásolta sem kamrai sem pitvari sejtek esetén. Intakt Ca^{2+} -háztartás mellett 5 mM $[\text{Na}^+]_i$ és negatív feszültség impulzus (-10mV) esetén 1 μM ORM10103 a teljes protokoll alatt az inward irányú áramot csökkentette, amit a sejtkontrakció erősödése, azaz pozitív inotróp hatás kísért. Ezzel szemben 20 mM $[\text{Na}^+]_i$ és pozitív feszültség impulzus (+30mV) esetén az ORM10103 az impulzus alatti áramot inward irányban növelte, ami outward áram gátlására utal. A sejtkontrakció ezzel párhuzamosan jelentősen gyengült.

Megbeszélés: Az NCX-gátlás Na^+ -függését nem tudtuk bizonyítani, még extrém magas $[\text{Na}^+]_i$ esetén sem. A gátlás Na^+ -tól való függetlensége arra utal, hogy a látszólagos Na^+ -függő hatások valójában a Ca^{2+} -háztartás aktuális egyensúlyának eltéréseit tükrözik. Fokozott forward NCX működés esetén a Ca^{2+} -efflux gátlása pozitív inotróp hatású, míg fokozott reverz NCX működés mellett a Ca^{2+} -influx gátlása negatív inotróp hatást eredményez. Ennek nagy jelentősége lehet a terápiás alkalmazhatóság szempontjából, mert szívelégtelenségben a Ca^{2+} - és Na^+ -háztartás egyensúlya eltér a normálistól, ezért szívelégtelenségben az NCX-gátlás következményei is eltérőek lehetnek.

2. Bevezetés

2.1 A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ioncserélő funkciója a szívizomsejtekbe

A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (továbbiakban NCX) ioncserélő és az általa bonyolított ioncserélő mechanizmus, jellemző az emlősök majd minden sejtjére. A fent említett ionpumpát és funkcióját szívizomsejtekben, körülbelül negyven éve azonosították, (Reuter and Seitz, 1968) egyik mérésük során, mikor a kiáramló Ca^{2+} ionok koncentráció függését vizsgálták, meghatározott belső ion összetétellel rendelkező szívizomszöveten.

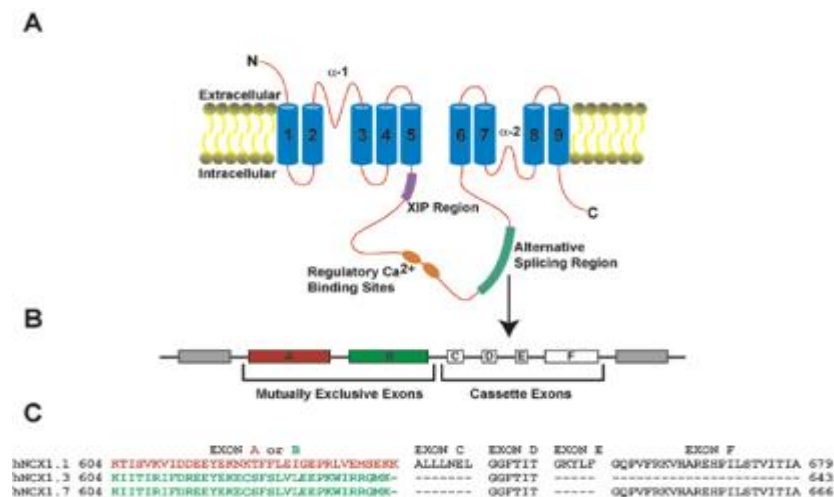
Később kiderült, hogy az exchanger három Na^+ iont cserél ki egy Ca^{2+} ionra, (Reeves and Hale 1984) hozzájárulva a membrán depolarizálizációjához, melynek hatására az elektromos ingerület képes tova terjedni a szívizomszöveten (Kimura et. Al, 1986). További kutatások eredményeiből, arra lehetett következtetni, hogy az ion pumpa működése kétirányú: Ca^{2+} efflux esetén (forward működés), befelé irányuló depolarizáló ion áram (inward áram) lép be a sejtbe, míg a pumpa fordított irányú működése esetén Ca^{2+} influx történik (reverz működés), az ionok kifelé áramlanak a szívizomsejtekből. Ezen eredmények ismeretében kijelenthetjük, hogy az NCX feszültség függő tulajdonságokkal is rendelkezik, melyek szoros kapcsolatban állnak a sejtmembrán pillanatnyi elektromos potenciál értékével, továbbá az ionpumpa aktivitását erősen befolyásolja a transzportált ionok elektrokémiai gradiense is, (DiFrancesco and Noble 1985) ebből következik, hogy bonyolult időzítő szerepe van a szív ciklus lezajlásában (Luo and Rudy 1991). Az exchanger szabályozásában részt vesznek az általa transzportált nátrium és kalcium ionok is, alloszterikus módon serkentik vagy csökkentik az aktivitását (Miura and Kimura 1989; Hilgemann et al., 1992; Weber et al., 2001).

A NCX exchanger protein felépítése magyarázatot ad a sokrétű ionszabályozó mechanizmusra. A fehérje kilenc transzmembrán domainből áll, melyek a transzporter régió kialakításáért felelősek, a Na és Ca^{2+} ionok által történő intrinsic szabályozást, pedig a nagy intracelluláris hurok teszi lehetővé (Nicolli et al., 1999; Matsouka et al., 1997).

Szívizomsejtekben a legfontosabb funkciója, a Ca^{2+} homeosztázis és a sejteken belüli Ca^{2+} szint szabályozása, a szívizomzat ritmikus összehúzódása és elernyedése során. A membrán depolarizáció esetén (Na^+ -áram), először a T-típusú kalcium csatornák nyílnak meg, és a befelé áramló kalcium ionok gyorsítják a depolarizáció folyamatát.

Depolarizációs küszöb esetén az L típusú Ca^{2+} csatornák nyílnak ki, az utóbbi sejtbe jutó Ca^{2+} áram váltja ki a Ca^{2+} -indukálta Ca^{2+} -felszabadulást a szarkoplazmatikus retikulumból. Az akcióspotenciál kezdetekor a NCX exchanger közreműködik a Ca^{2+} influx kialakításában (NCX reverz irányú működés), míg a membránpotenciál pozitív, és az intracelluláris Ca^{2+} szint alacsony. Az Ca^{2+} ion koncentráció növekedésével a szarcoplazmatikus retikulumból is Ca^{2+} ionok szabadulnak fel, majd a NCX exchanger a Ca^{2+} ionokat kifelé pumpálja a sejtől (forward működés). A Ca^{2+} tranziens megszűnése, három egymással azonos időben lezajló folyamat eredménye. (Bers, 2001). Az ionok megközelítőleg 70-90%-át a Ca^{2+} -ATP-áz visszapumpálja a sarcoplasmaticus reticulumba, 7-30%-át az NCX szállítja ki a szívizomsejtől és a maradékot a lassú Ca^{2+} iontranszport rendszer juttatja ki, a mitokondriális Ca^{2+} transzport vagy a sarcolemmális Ca^{2+} -ATP-áz segítségével. Az állandó Ca^{2+} egyensúly steady state állapothoz közeli fenntartása a sejten belül megköveteli, hogy a Ca^{2+} influx és efflux mértéke megegyezzen eltérő fiziológias körülmények közt is, elkerülve a sejt Ca^{2+} -hiányos, illetve túltöltött állapotát.

A NCX ionpumpa sokrétű funkciójának vázlatos ismertetése után, meg kell jegyezni, hogy a fentebb említett funkciók nagyban függenek a kísérleti körülményektől és a kísérletek során használt állatfajoktól, melyeken az adott méréseket végezték. Például vitatott az ionpumpa szerepe a Ca^{2+} által kiváltott Ca^{2+} kibocsátásban (CICR) és ezáltal a systolés Ca^{2+} tranziens kialakításában és szívizom kontrakcióban. (Weisser-Thomas et al., 2003). Általánosan elfogadott, hogy az ion puma forward működés esetén kalciumot távolít el a sejtől, mégis a tudományos eredmények ismeretében, a mechanizmus és az eltávolított ion mennyiség eltérő volt patológias és fiziológias körülmények esetén, illetve a kísérleti állat fajától is függött (Bassani et. Al., 1994; Bers, 2000). Továbbá gyakran merülnek fel olyan hipotézisek, melyek eddig még ismeretlen funkcióit taglalják az NCX-nek, mint például a sokak által javasolt Ca^{2+} pufferelest a citoplazmatikus Ca^{2+} háztartásban (Hilgemann, 2004). A Ca^{2+} háztartás szabályozásában és a szív ciklusban, mind fiziológiásan, mind patológiásan betöltött szerepe és az emiatt felmerülő újabb megválaszolatlan kérdések miatt a NCX-szel sok tanulmány és kutatás foglalkozik napjainkban (Reuter et al., 2005; Dipolo and Beague, 2006).

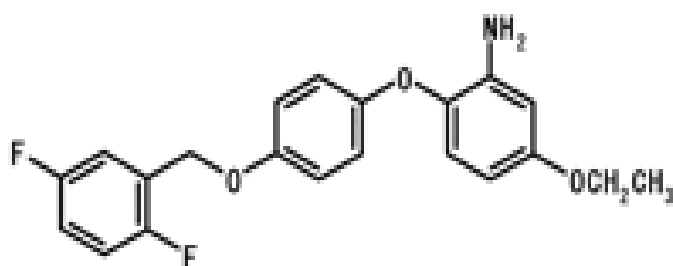


1. ábra. Az NCX mint fehérje és elhelyezkedése a membránban. (Forrás: Bers 2000)

2.2 A szívizomsejtekben lévő NCX farmakológiai jellemzése

Az iontranszport mechanizmusának szabályozásának megismerésében, mind fiziológiás, mind pathológiás kísérletes körülmények közt a legkézenfekvőbb mód, az iontranszporter szelektív blokkolása. Azonban, ez egészen mostanáig lehetetlen volt hatásos és a csatornára specifikus inhibitorok hiányában, habár számos farmakológiai hatóanyag képes gátolni az NCX-et, de ezek használata nehézkes, mivel más transzport rendszerekre, illetve ioncsatornákra is hatást fejtenek ki. Például szívizom preparátumokon használnak a Ca^{2+} homeosztázis tanulmányozására amilorid analógokat, (Brown et al.1991) de, ezen származékok gátolják a feszültség függő Ca^{2+} csatornákat is, ezért az NCX esetében alkalmazva, ez a tény nehezíti az ionpumpa tényleges szerepének leírását a kalcium homeosztázisban. Más hatóanyagok, mint a bepidril és az amiodarone (antiarrhythmias szerek), vagy a tetracaine (lokális fájdalomcsillapító szer), szintén képesek blokkolni az NCX-et, de ismételten ezek a molekulák nem szelektívek és magasabb koncentrációban fejtik ki blokkoló hatásukat, mint azt az elsődleges hatás érdekében használják (Watanabe et al., 2006). Számos két és háromértékű kation szintén képes gátolni az NCX-et, leginkább az Ni^{2+} iont használják az NCX-áramok azonosítására elektrofiziológiai kísérletekben. Általában csak ezek a nem-szelektív ionok és molekulák használatosak szubcelluláris rendszerekben és kísérletekben, ahol az NCX nagyjából elkülöníthető a többi ioncsatornától.

Ennek ellenére az újonnan felfedezett hatásos és szelektív NCX gátlók nagy előre lépést jelenthetnek a NCX kutatás területén, eme molekulák alkalmazásával az ion pumpa szerepe megvizsgálható intakt sejteken, szöveteken fizioiógias körülmények között (Watanabe et al., 2006; Bouwman et al., 2006, Iwamoto et al., 2004). Széles körben kezdik alkalmazni az egyik legszelektívebb NCX gátlót, mely egy anilin származék: (2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline), a SEA0400 kóddal jelzett vegyület (Tanaka et al., 2002, Matsuda et al., 2004, Watanabe et al. 2006). A közelmúltban a Farmakológiai Intézetnek sikerült megszerezni az ORM10103-mal történő kísérletezés jogát is, mely vegyület eddig látszólag a legszelektívebb NCX gátló.



2. ábra. A SEA 0400 molekula szerkezete. (Forrás: Tanaka et al, 2002)

2.2 Az NCX gátlók terápiás lehetőségei

Az elmúlt években számos tanulmány kimutatta, hogy az NCX gátlása hatásos lehet, természetesen kísérletes körülmények közt, a szívproblémák kezelésére, megelőzésére. A tanulmányok szerint az NCX-nek szerepe van a szívizomszövet ischémiás károsodásában. Az intracelluláris Na^+ felhalmozódás ischémiás szövetben kedvez az ionpumpa reverz működésének, mely intracellularis Ca^{2+} ion felhalmozódáshoz vezet, mely a sejtek károsodását, később pusztulását okozza (Imahashi et al., 1999, Murphy et al., 1999). Ennek fényében feltételezhetjük, hogy az NCX gátlása különböző hatóanyagokkal, kardioprotektív hatásokkal bírhat. Ezt az elméletet bizonyítani látszik, hogy a SEA0400 csökkentette az ischémia következtében elhalt terület méretét patkány és nyúl szíven, ezt a hatást nagyobb méretű kísérleti állatokon, kutyán és sertésen is megfigyelték (Takahashi et al., 2004, Inserte et al., 2002). Ezeket a megfigyeléseket számos tanulmány támasztja alá (Higihara et al., 2005, Namekata et al., 2005, Feng et al., 2006), igazolva, hogy a megelőzésben szerepet játszik az NCX reverz módjának gátlása, így kiküszöbölve a sejten illetve szövetben a Ca^{2+} felhalmozódást, mely terápiás felhasználását is lehetővé tenné a szelektív NCX gátlóknak (Lee et al., 2005).

Az NCX forward működési módja szintén okozhat pathológiás eseményeket a szívizomszövetben, például ún. korai vagy késői utódepolarizációt okozva a szívben, mialatt az intracellularis Ca^{2+} szint emelkedik. Az indukált utódepolarizáció szintén arrhythmia okozhat. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy a SEA0400 képes elnyomni a digitális által kiváltott arrhythmia (Nagasawa et al., 2005), és hatásosan csökkentette a korai utódepolarizációt kutya szív izomsejtjein (Nagy et al., 2004).

A legtöbb pathológiás eseményt a myocardiális szövet Ca^{2+} túltöltődése okozza, például az elhalásos területeket (nekrózis szívinfarktus esetén), nem megfelelő mértékű szívizomösszehúzódást (kontraktilis-relaxációs zavarok) és arrhythmia. Ezen tények fényében, hatásos terápiás eljárás lehet ezen megbetegedésekre a szelektív NCX gátlók alkalmazása és ezáltal a kalcium homeosztázis szabályozása.

3. Célkitűzések

A bevezetésben taglalt, *Xenopus Laevis* oocytaiban expresszált NCX esetén, két különböző Na^+ koncentrációval végzett kísérletekben, a SEA0400 hatásossága az outward NCX- áramokra jelentősen csökkent alacsony 25 mM intracellularis Na^+ koncentráció esetén (Lee et al., 2004). Ezen eredmények alapján az NCX kutatói általánosan elfogadják, hogy a SEA0400 hatása függ az intracelluláris Na koncentrációtól. Tudomásunk szerint, azonban intakt szívizomsejteken ezt még nem bizonyították.

Ezen eredmények ismeretében kísérletes körülmények között szeretnénk volna az NCX-inhibitorok, leginkább a SEA0400 és ORM10103 feltételezett Na^+ -függő hatásait is megvizsgálni, különböző intracelluláris Na^+ koncentrációk esetén. Feszültség-ramp protokollal kiváltott NCX-áramon mérjük a SEA0400 NCX-gátló hatását, 20 és 50 mM $[\text{Na}^+]_i$ mellett, annak eldöntésére, hogy a gátlás mértékét befolyásolja-e a Na szint.

Dolgozatom második célja annak elemzése, hogy az intakt Ca^{2+} háztartással rendelkező sejtek esetén az NCX gátlás következményeit, elsősorban a sejtek kontrakcióját, hogyan befolyásolja az aktuális feszültség protokoll és az intracelluláris Na^+ -szint.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Kutya kamrai szívműködés izolálása

A szívműködést szegmens perfúziós módszerrel izoláltuk (Magyar et. al. 2000). 10-20 kg körüli állatokat altattunk el. Az állatok altatása intravénásan történik, 10mg/kg SBH-Ketamin és 1mg/kg Primazin keverékével. A mellkas felnyitása után a szívet gyorsan el kell távolítani.

A túlaltatott kutya szívet jégen előkészítve kapjuk. Az egész szív helyett, csak egy meghatározott szöveti területen izolálunk sejteket. A módszer szempontjából előnyös, ha a kiválasztott kamrai terület sűrűn erezett, a jobb perfúziós paraméterek miatt. Legcélszerűbb az aorta circumflex körüli területet használni a sejtek izolálásához. A kivágott szívműködési szövetet Langendorf perfúziós készülékre helyezük. Megkeressük az aorta circumflex szájadékát, majd egy perifériás vénakanült helyezünk bele. A szövet darab elmozdulását, illetve esetleges leesését meggátolandó, a kanült sebész csipesz és pean érfogó segítségével hozzáöltjük az érhez és a szövethez. Az izolálás során a szövetet 37°C-on tartjuk, az izolációs oldatokat pedig oxigenizáljuk. Az enzimes emésztés után, a pericardiumot olló segítségével levágjuk, alatta találhatóak az izolált sejtek. A megfelelően emésztődött részeket szűrő-pihentető oldatba helyezük, majd állni hagyjuk. A Langendorf perfúziós protokoll részletei: 1.) Mosás: 250 ml izolációs Tyrode + 250 µL 1M Ca^{2+} Hepes 10 perc. 2.) Mosás: 250 ml izolációs Tyrode + Hepes műanyag edényben 10 perc. 3.) Izolálás: izolációs Tyrode + 50 µL 1M Ca^{2+} + pár csepp BSA + enzimek (Oldva 81,2 mg whortington kollagenáz és 5 mg proteáz.) 20 percig. A proteázt a 15. percben kell hozzáadni. 5.) Szűrés: 200 ml izolációs Tyrode + 200 mikroliter 1M Ca^{2+} 2x mosás. 6.) Pihentetés: 50 ml izolációs Tyrode + 50 µL 1M Ca^{2+} + BSA, 15-20 perc.

Eszközök: Ollók, Csipeszek, Pean érfogó, Vénázó kanül, Sebészti és fonal, Pasteur pipetta, Automata pipetta, Langendorf perfúziós készülék, Üveg és műanyag főző poharak különböző űrtartalommal.

Anyagok és oldatok: 1 l Izolációs Tyrode Ca^{2+} mentes, 1 M CaCl_2 oldat, BSA, 5 mg Proteáz, 81,2 mg Kollagenáz.

4.2 *Kutya pitvari szívizomsejtek izolálása Chunk módszerrel.*

Az állat előkészítése az előzőekben ismertetett módon zajlik. Csipesz és olló segítségével levágjuk a pitvarokat, majd gyorsan Ca^{2+} mentes izolációs tyrodába helyezzük. A szövet darabokat oxigenizáljuk, 37 °C-on, folyamatos rázatás során, izolációs tyrodával mossuk. Az enzimes emésztés során, 0-5-10-15 percenként 10 ml mintát veszünk a felülúszóból és lecentrifugáljuk. A mintákat hűtőszekrényben 4°C-on pihentjük. Az izolációs protokoll következő: 1. Mosás: izolációs Tyrode-val 3x 10 perc. 2. Izolálás: 50 ml Ca^{2+} mentes izolációs Tyrode + 5 mg proteáz és 20 mg kollagenáz Össz. 35 perc. A 20. és 25. percnél az oldatba mérünk 5-5 mikroliter 90mM Ca^{2+} -t. 4. Sejt ellenőrzés mikroszkóppal. 5. Másodlagos emésztés során centrifuga csövekbe 10 ml bepipettázunk a felülúszóból, 0-5-10-15. percenként. 6. Centrifugázás: A levett sejteket 500 fordulat/perc-en 3 percig centrifugázzuk. 7. A lecentrifugázott oldatok felülúszóját átpipettázuk a pihentető oldatba. (50 ml izolációs Tyrode és 25 mikroliter Ca^{2+}). 8. Pihentetés hűtőszekrényben 4°C-on 10 perc.

Eszközök: Fecskendő, Tűk, Csipeszek, Ollók, Bonctál, Főzőpoharak különböző űrtartalommal, Pasteur pipetták, Automata pipetta, Centrifuga csövek, Mikroszkóp Zeiss Axiovert 100, Mágneses keverő, Centrifuga Hermle Z 300, Hűtőszekrény.

Anyagok és oldatok: Tiopentál, Heparin, CaCl_2 90 mM, Izolációs Tyrode 500 ml, Proteáz 5 mg, Kollagenáz 20 mg.

Tyrode oldat összetétele: (2 Literhez grammokban mérve) NaCl 7.6, HEPES 1.43, KCl 0.4, KH_2PO_4 0.16, MgSO_2 0.3, Glükóz 4, NaOH pH 7.2.

Cs-Aspartát pipettaoldat NCX áram mérésére (20 ml-hez mg-okban): Asp-acid 319.5 és EGTA, CsOH 167.9, TEACI 33.1, HEPES 47.7, MgATP 50.7, MgCl 22, CsOH pH 7.2 beállítására, NaCl 5-50 mM, kívánt mennyiségben a kész pipettaoldathoz adni.

4.3 *Patch clamp mérések*

Az izolált sejteken történő méréseket patch clamp technikával végeztük. A sejteket a készülékhez tartozó, Ca^{2+} tartalmú oxigenizált Tyrodával feltöltött csiszolt üveg tálkába pipettázzuk. A Tyrodot folyamatosan áramoltatjuk, a sejteket. A szívizom sejtek számára fiziológiás maghőmérsékletet 40-42 °C, a készülékhez tartozó termosztáttal biztosítjuk. A pipettákat bórszilikát üvegkapillárisokból húzzuk, Sutter Instrument co. Model p97 63-as program, automata pipettahúzóval. A húzás után, az elkészült pipettákat a jobb seal-

ellenállás érdekében Micro ForgeMF 830 készülékkel polírozzuk. A pipetták ellenállása a pipetta oldattal történő feltöltés után átlagosan 2,5 Ohm. A megszűrt sejtnél megvárjuk, míg az ellenállás 1-2 Ohm-ot növekszik, majd egy óvatos szippantással gigaohm-seal-t kapunk. A sejtet 1,5 V-os ingerléssel (zap) és ismételt szippantásokkal nyitjuk ki. A sejt stabilizálódása után a méréseket WinWCP v.4.0.9. (*John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow*) patch clamp programmal rögzítjük. Az intakt Ca^{2+} -háztartás kísérleteiben a sejtek kontrakcióit kamerával és digitalizáló kártyával video-fileként rögzítjük, amit utólag CellContract mozgás analizáló programmal értékelünk (*Szépe Tamás, SZTE Műszaki Informatika Tanszék*).

A mérési protokollok részletezését lásd az eredmények fejezetben. A kapott mérési eredmények kiértékeléséhez Excel 2003 táblázatkezelő programot használtunk. A kísérleti állatok kezelése mindenben megfelelt a hatályos törvényeknek és az SZTE Állatetikai Bizottsága jóváhagyásának. Engedélyszám: XIII./1211/2012.

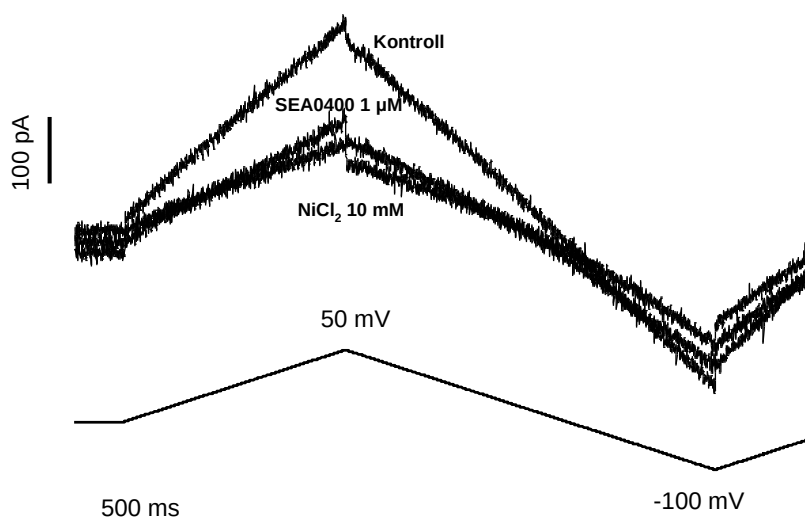
5. Eredmények

5.1 A SEA0400 NCX-gátló hatásának függése a pipettaoldat Na^+ -koncentrációjától

Dolgozatom első kísérletsorozatában a SEA0400 NCX-gátló hatását vizsgáltam. A sejtek egyik csoportjában a pipettaoldat Na^+ -koncentrációját 20, másik csoportjában pedig 50 mM-ra állítottuk, hogy teszteljük azt a hipotézist, amely szerint magasabb intracelluláris Na^+ koncentráció esetén a SEA0400 gátló hatása nagyobb mértékű lehet. Az NCX-áramot folyamatos áram-feszültség karakterisztika formájában regisztráltuk.

A 3. ábrán egy eredeti regisztrátumot ábrázoltunk, amelyen az alkalmazott feszültség-ramp és annak hatására létrejövő teljes membrán-áram látható. A teljes membrán-áramból 10 mM NiCl_2 által kigátolt áram-komponensként definiáljuk az NCX-áramot, melyet röviden Ni-szenzitív áramként említünk. Megjegyzendő, hogy a K^+ -áramokat és a Ca^{2+} - és Na^+ -áramot már a kontroll alapoldatban levő Cs, nisoldipin illetve lidokain eleve gátolja, ezért biztosak lehetünk abban, hogy a Ni^+ -szenzitív áram gyakorlatilag a valódi NCX-áramnak felel meg. Az ábrán látható, hogy az áram-feszültség görbét a SEA0400 jelentősen csökkenti, majd a Ni^+ hozzáadása után maradó áram jelenti az egyéb, nem specifikus áramokat. A SEA0400 gátló hatását a Ni^+ szenzitív áram %-ában adtuk meg, az áram-feszültség karakterisztika két pontján elemezve a különbségeket: a reverz NCX működést (nettó pozitív, outward áram) +40 mV-on értékeltük, a forward

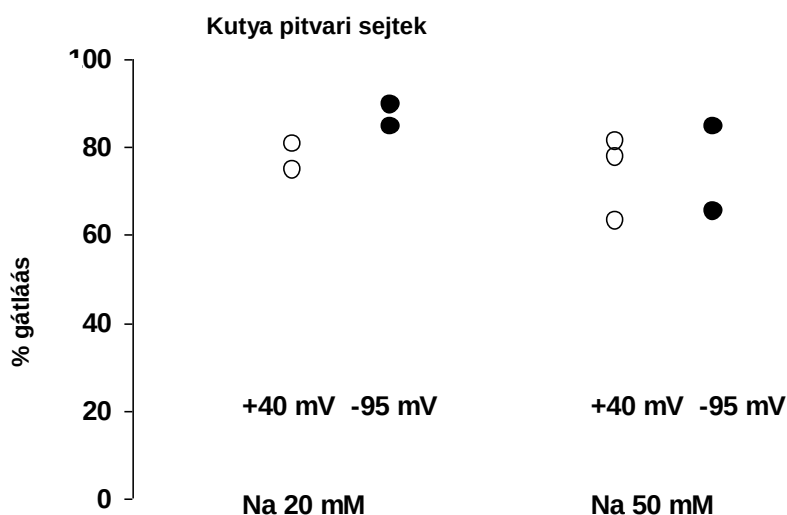
NCX működést (nettó pozitív, outward áram) pedig -95 mV-on. Fontos megjegyezni, hogy a kísérleteket randomizálva végeztük, az esetleges szisztematikus hibák kiküszöbölésére.



3. ábra. Egy eredeti patch clamp felvétel az NCX-áram méréséről. A felső ábra mutatja az NCX áramot, melyet Ni-szenzitív áramként határozzunk meg. A NiCl_2 alkalmazása után az NCX-áram eltűnik, ehhez a 100 %-os gátláshoz viszonyítjuk a SEA hatását. Az alsó ábra mutatja az alkalmazott feszültség protokollt.

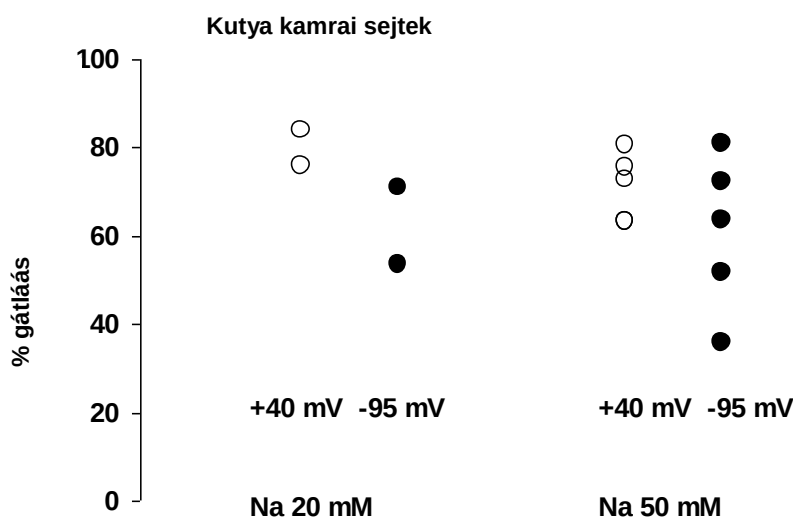
Az intézet MTA-SZTE, Keringésfarmakológiai Kutatócsoport korábbi közleményeiből tudjuk (Birinyi et al, 2005), hogy 20 mM intracelluláris Na^+ esetén mekkora mértékű NCX gátlást látunk 1 mikrom SEA hatására, ezért ebben a csoportban csak néhány mérést végeztünk, a korábban kapott átlagos gátlás ellenőrzésére. Mivel a jelenleg kapott értékek a korábbi méréseknek megfeleltek, ezért az 50 mM-os csoportban próbáltam inkább több kísérletet elvégezni. A 4. ábrán láthatjuk a pitvari sejteken történt értékelhető mérések eredményeit. A 4. ábrán 1 μM SEA0400 kutya pitvari sejteken mért gátló hatását ábrázoltuk. A reverz és forward NCX-működésre kifejtett gátló hatást külön értékeltük, +40 mV-on illetve -95 mV-on. Az ábrán látható, hogy nem volt különbség az elért gátlások tekintetében a két különböző Na^+ koncentráció esetén, sem a reverz, sem a forward NCX működés tekintetében.

Az 5. ábra mutatja a kutya kamrai sejteken történt sikeres kísérletek eredményeit. A kutya kamrai sejteken nagyon hasonló eredményeket kaptunk. Mind a gátlás nagyságát tekintve, illetve abban a tekintetben is, hogy nincs különbség a 20 mM és az 50 mM-os csoportban, sem a reverz, sem pedig a forward irányban mérhető gátlás tekintetében.



4. ábra. A pitvari sejteken kapott NCX-gátlás eredményei, 20 és 50 mM intracelluláris Na^+ koncentráció mellett. Látható, hogy 50 mM Na^+ mellett a gátlás mértéke sem a reverz, sem a forward NCX működés esetén sem nagyobb, mint a 20 mM Na^+ esetén mért értékek.

A pitvari és kamrai sejteken mért NCX-áramok denzitásának (áram-denzitás: a sejtben mért áram nagysága osztva a sejt kapacitív membrán felületével, tehát mértékegysége pA/pF) összehasonlítását nem végeztük el, mert önkontrollos kísérleteket végeztünk, tehát ugyanazon a sejten mértük az NCX áramot, kontroll oldat esetén, majd pedig a SEA0400-at tartalmazó oldattal, és az így kapott %-os gátlásra voltunk kíváncsiak. A pitvari és kamrai sejtek NCX-áram denzitásának összehasonlításához jóval nagyobb kísérleti elemszámokkal kellett volna dolgoznunk, de jelen kísérleteinkben ezt az összehasonlítást nem céloztuk meg.



5. ábra. A kamrai sejteken kapott NCX-gátlás eredményei, 20 és 50 mM intracelluláris Na⁺ koncentráció mellett. Látható, hogy 50 mM Na⁺ mellett a gátlás mértéke sem a reverz, sem a forward NCX működés esetén sem nagyobb, mint a 20 mM Na⁺ esetén mért értékek.

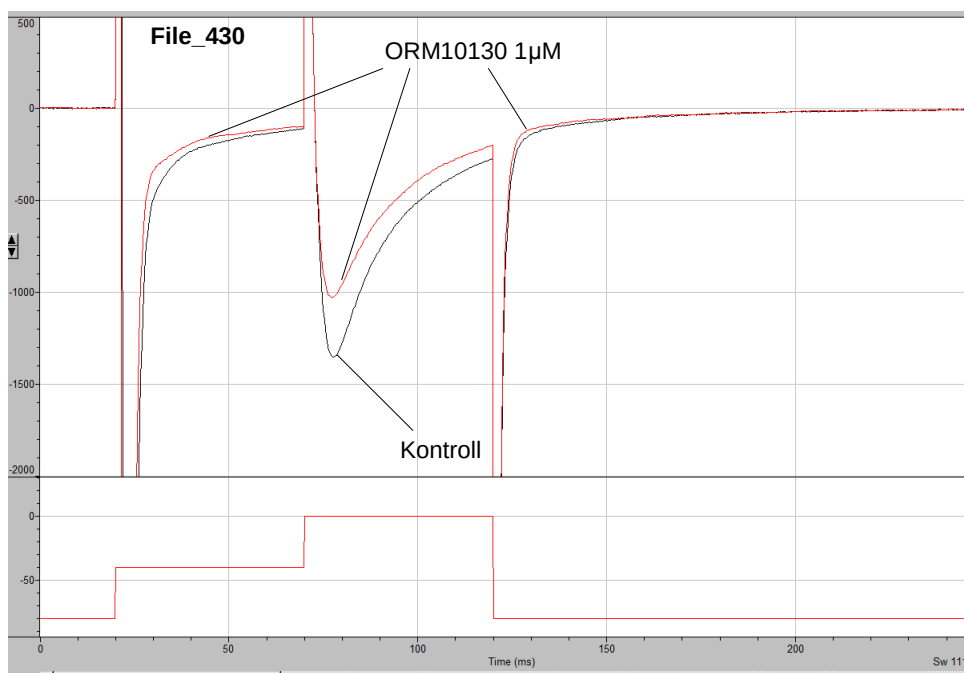
5.2 Az NCX-gátlás következményei intakt Ca-háztartás esetén

Dolgozatom következő részében ismertetem az intakt Ca²⁺-homeosztázis mellett végzett kísérleteket. Elöljáróban megjegyzendő, hogy az egyes kísérletekben mért áramokat nem átlagoltuk össze, mert minden egyes sikeres kísérletben más és más az áramok denzitása. Főleg a Ca²⁺-áram és az NCX-áram aránya az, ami fontos az aktuális Ca²⁺-egyensúly szempontjából. Ezért ezen áramok átlagolása helyett megpróbáljuk minden esetben az adott áram-denitások mellett értékelni a látott változásokat.

A 6. ábrán látható áram felvétel esetén a Na⁺-áramot -40 mV-os impulzussal aktiváljuk. Ezután az áram gyorsan inaktiválódik, így a protokoll további részén már nem kell számítani arra, hogy a Na⁺-áram megjelenik. Közvetlenül ezután a Ca²⁺-áramot aktiváljuk 0 mV-os feszültséggel. Látható, hogy a Ca²⁺-áram gyorsan aktiválódik, majd inaktiválódik, de egy fenntartott része megmarad az impulzus ideje alatt. Végül a feszültség visszatér -80 mV-ra, ezt holding potenciálnak nevezzük. Ezen a negatív

potenciálon jelenik meg az NCX farokáram, amely azt jelzi, hogy az NCX Ca^{2+} -ot távolít el a sejtéből.

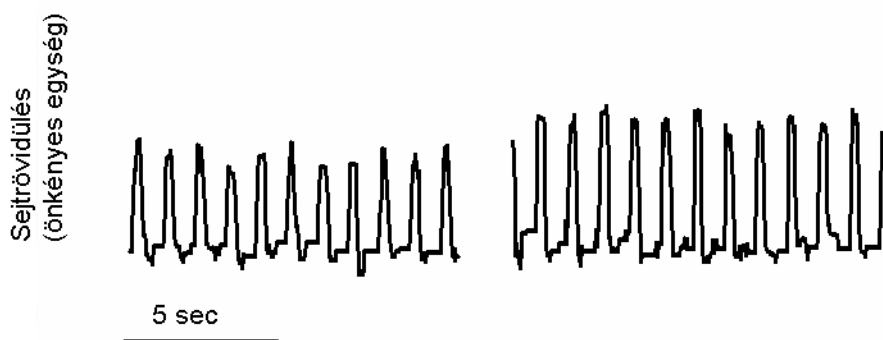
Fontos kihangsúlyozni, hogy amikor látszólag jelentős csökkenést látunk a Ca^{2+} -áramban az ORM10103 hozzáadása után, akkor valójában biztosak lehetünk abban, hogy nem a Ca^{2+} -áram csökkent (részletes magyarázat alább). Pufferelt Ca^{2+} -háztartás esetében ugyanis, amikor a Ca^{2+} -áramot nem követi Ca^{2+} -tranziens és így NCX-áram aktiváció nem történik, tehát amikor tisztán a Ca^{2+} -áramot mérjük, akkor az ORM10103 nem csökkenti a Ca^{2+} -áramot (Farmakológiai Intézet bírálat alatt levő közleményéből).



6. ábra. 5 mM belső Na^+ mellett történő, Ca^{2+} -áramot és NCX-áramot kiváltó patch clamp protokoll (az ábra alsó részén). Jól látható a -40 mV-on aktiválódó Na-áram, a 0 mV-on aktiválódó Ca^{2+} -áram, majd a protokoll végén az NCX farokáram. Az ORM10103 hatását a jelölt trace mutatja.

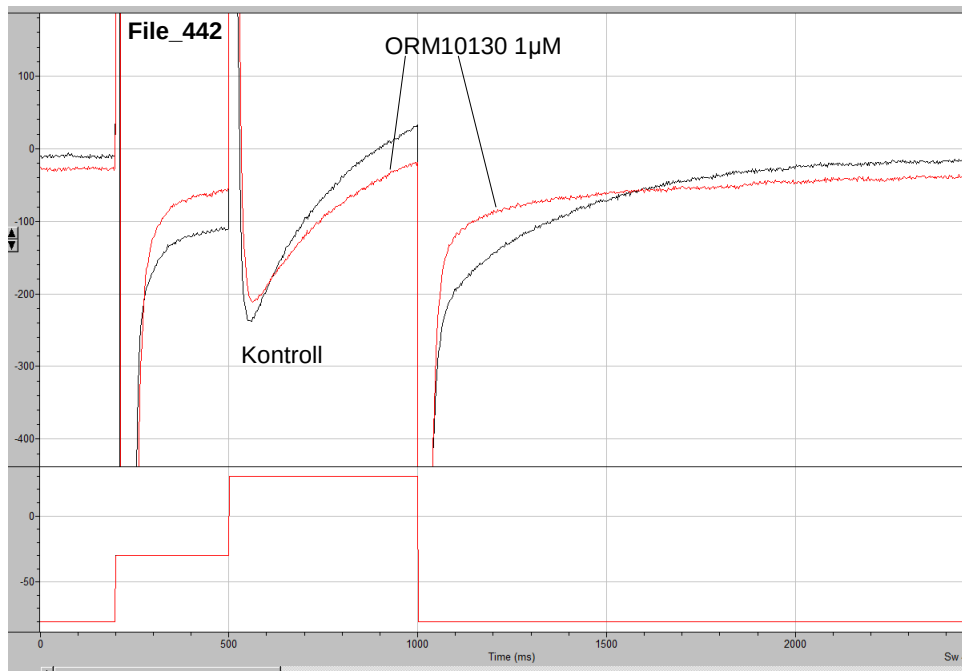
Az első kísérletben (6. ábra) 5 mM volt a pipettaoldat Na^+ koncentrációja, az alkalmazott feszültség protokoll pedig -40 mV, 0 mV majd -80 mV holding potenciál volt, melyet a regisztrátum alsó részén láthatunk, a felvett áramokkal megegyező időskálán. A kísérlet kezdetén néhány perc stabilizálódási időt hagyunk, ezért a sejt Ca^{2+} -háztartása egyensúlyban van, ami az egyenletes kontrakciókból is látható. A kontrakciókat videófileba rögzítettük a kísérlet ideje alatt, a file-t utólag értékeltük a CellContract programmal. Az egyenletes kontrakciók és áramok beállása után a sejthez 1 μM ORM10103-at adtunk,

és 3-4 percet vártunk a hatás beállásáig. A 6. ábrán látható, hogy a 0 mV-os potenciálon a teljes inward áram jelentősen csökkent, és kismértékű csökkenést látunk az NCX farokáramban is. Ezzel egyidejűleg a sejt kontrakciói viszont megnövekedtek, vagyis pozitív inotróp hatást tapasztaltunk.

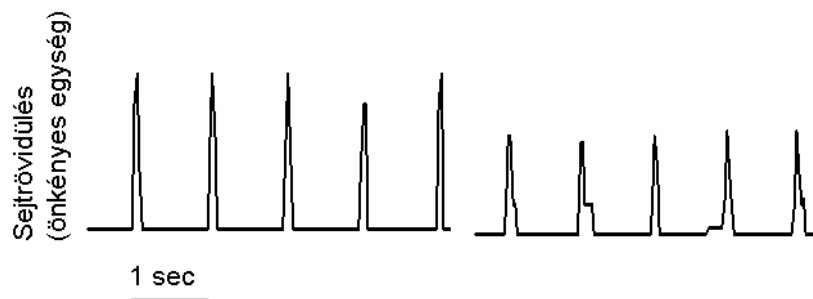


7. ábra. Az ORM10103 pozitív inotróp hatása (a 6. ábrán szereplő sejtről egyidejűleg készült kontrakciók, ORM10103 előtt és után).

A 8. ábrán látható kísérletben eltérő feszültségprotokollt alkalmaztunk (+30 mV), és a pipettaoldat Na^+ koncentrációját 20 mM-ra állítottuk, ezzel elősegítettük az NCX reverz irányú működését. Néhány perc stabilizálódás után az 1 μM ORM10103-at a sejthez adtunk, és 3-4 percet vártunk a hatás beállásáig. Az első kísérlethez képest a legszembetűnőbb eltérés a kontrakció jelentős csökkenése volt az NCX gátlásának hatására, tehát negatív inotróp hatást tapasztaltunk (9. ábra). Mivel ez egy nem várt eredmény volt, ezt több, hasonló kísérletben is megerősítettük, hogy biztosak lehessünk abban, hogy nem valamilyen kísérleti műtermék miatt látunk negatív inotróp hatást. A Ca^{2+} -áram ideje alatt a Ca^{2+} -áram csúcscsértéke (peak current) kicsit csökkent, de ennél jellemzőbb hatás a Ca^{2+} -áram végén megfigyelhető inward áram növekedés (vagyis az áram negatív irányban történő növekedése), ami arra utal, hogy egy outward áramot gátoltunk (reverz irányú NCX). A negatív potenciálokon továbbra is megfigyelhető az NCX farokáram csökkenése, amely arra utal, hogy ezen a szakaszon (negatív potenciál) az NCX forward irányú, és Ca^{2+} -ot távolít el a sejtől.



8. ábra. 20 mM belső Na mellett történő, Ca^{2+} -áramot és NCX-áramot kiváltó patch clamp protokoll (az ábra alsó részén). A Na^{+} -áramot -30, a Ca^{2+} -áramot +30 mV-on aktiváltuk, majd a protokoll végén az NCX farokáram látható. Az ORM10103 hatását a jelölt trace mutatja.



9. ábra. Az ORM10103 negatív inotróp hatása (a 8. ábrán szereplő sejtről egyidejűleg készült kontrakciók, ORM10103 előtt és után).

6. Megbeszélés

6.1 *Az NCX-gátlás mértéke nem függ az intracelluláris Na^+ koncentrációtól*

Az NCX-inhibítorok kísérleti fejlesztésére többféle terápiás lehetőség kutatása miatt került sor (Antoons et al, 2011). Elsősorban azonban a szívelégtelenség kezelésében használható pozitív inotróp gyógyszerek után kutattak és ennek elméleti hátterében az áll, hogy ha az NCX-et gátoljuk, akkor ezzel a legfőbb Ca^{2+} eltávolító mechanizmust gátoljuk. Ennek következtében, a Ca^{2+} szívmusclejtekben felhalmozódik, és nagyobb mennyiségben kerül a szarkoplazmatikus retikulumba. Amikor a szarkoplazmatikus retikulumból több Ca^{2+} szabadul fel, akkor a kontrakciók is erősebbek lesznek. Ez előnyös lehet a szívelégtelenség kezelésében, mikor a szívmuscle gyengén kontrahál, és gyógyszeres kezeléssel kell javítani a kontraktilitást. Az SZTE Farmakológiai Intézet és a DOTE Élettani Intézet munkatársainak eredményei szerint, azonban a SEA0400 kutya szívmusclejteken nem növeli a kontrakciókat (Birinyi et al. 2008). Ezzel ellentétben, patkány szívmusclejteken a kontrakciók növekedését találták (Acsai et al. 2007). Más kutatók a SEA0400 vizsgálatakor megállapították, hogy növeli a kontrakciókat, tehát pozitív inotrop hatású sertés szívmusclejteken (Ozdemir et al. 2008). Az eltérő eredményeket gyakran úgy értelmezik, hogy az NCX gátlás hatásának ún. fajspecifikus hatása van. A fajspecifikus hatást elsősorban a különböző fiziológiás intracelluláris Na koncentrációnak tulajdonítják. Lee és mtsai-nak cikke alapján ugyanis elterjedt az a nézet, hogy a SEA0400 gátló hatása függ az intracelluláris Na koncentrációtól (Lee et al. 2004).

Ezeket a kísérleteket Lee és munkatársai azonban a fiziológiás intracelluláris Na^+ koncentrációt jelentősen meghaladó nátrium ion értékekkel végezték. Kísérleteikben az ún. Hillgemann -protokollal mérték az NCX-áramot, és a SEA gátló hatását. A Hillgemann protokoll lényege, hogy nem a membránpotenciál változtatásával (ramp protokoll), egy meghatározott ionális összetétel mellett mérik az NCX-áramot, hanem a membrán potenciált egy meghatározott értéken tartják patch clamp segítségével, majd a membrán külső vagy belső oldalán hirtelen megváltoztatják az oldat ionális összetételét, és ezáltal aktiválják az NCX-áramot. Az outward NCX-áramot (reverz irányú NCX működés, Ca^{2+} -beáramlás) úgy aktiválják, hogy a membrán belső oldalán a Na koncentrációt 0 mM-ról hirtelen 100 mM-ra növelik, gyors oldatcserélő rendszer alkalmazásával. Megjegyzendő,

hogy ezekben a kísérletekben ún. inside - out patch clamp konfigurációt alkalmaztak, melynek lényege, hogy a gigaohm seal létrehozása után a pipettát felemelik a sejtről, és ekkor a membrán patch a pipetta hegyén marad, és a membrán eredetileg intracelluláris oldala kerül kapcsolatba a sejt-kád oldatával, vagyis ez eredetileg külső oldat belső oldat lesz, a pipetta oldat pedig a sejtmembrán külső oldata lesz. Ily módon a sejt-kád oldatának összetételét változtatva a sejtmembrán belső oldalának ionösszetételét lehet változtatni. Ekkor a Na^+ koncentráció megemelése tehát a reverz NCX működésnek fog kedvezni. Zérusról 100 mM-ra emelve a Na^+ koncentrációt, hatalmas outward NCX-áram fog aktiválódni, majd hamarosan inaktiválódik, és beáll egy steady - state érték. Az inaktiváció mechanizmusa az NCX Na^+ -függő inaktivációja. Lee és mtsai-nak eredményei szerint a SEA0400 meggyorsítja az NCX Na -függő inaktivációját, és ennek tulajdonítható a SEA NCX gátló hatása.

Az SZTE ÁOK Farmakológiai Intézet munkatársainak mérései alapján azonban az derült ki, hogy ha az intracelluláris Na^+ 7 vagy 15 mM, akkor nem lehet különbséget kimutatni a gátló hatás nagyságában. Ez a koncentráció tartomány felel meg körülbelül a fiziológias szintnek, a különböző kísérleti állatokban. Lee és mtsai közleményében azonban a membrán intracelluláris oldalán 25- 100 mM volt a Na^+ koncentráció. Ezek a nagyon magas Na^+ szintek, nem valószínű, hogy előfordulnak normális esetben a szívizomsejtekben.

Tovább bonyolítja a kérdést, hogy a Hilgemann protokoll forward módú verziójában a SEA0400-zal gyakorlatilag nem találtak jelentős gátló hatást, ezért alakult ki az a nézet egyes NCX-kutatók között, hogy a SEA0400 ún. irány szelektív gátlószer, vagyis csak az NCX egyik irányú működését gátolja. Ez azonban szöges ellentétben van egyéb publikációk eredményeivel, valamint témavezetőm korábbi és dolgozatom jelenlegi eredményeivel is. Megállapíthatjuk tehát, hogy Lee és mtsai-nak eredményeit, amelyeket NCX-et expresszáló sejteken kaptak, nem lehet automatikusan elfogadni az intakt szívizomsejtek esetében. Ezért tűztük ki célul, hogy szívizomsejtek esetén megvizsgáljuk, hogy valóban függ-e a SEA gátló hatása a citoplazmatikus Na^+ koncentrációtól. Hogy biztosak lehessünk a kérdés eldöntésében, ezért a lehető legnagyobb intracelluláris Na^+ koncentrációt alkalmaztuk (50 mM), amit a szívizomsejtek még biztonsággal elviselnek a kísérlet időtartama alatt. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy 50 mM Na esetén sem kaptunk nagyobb mértékű gátlást.

Valószínű, hogy a SEA gátló hatásának a Na^+ függő inaktiváció gyorsítása mellett más egyéb mechanizmusa is létezik. Ez azért is valószínű, mert maga a Na^+ -függő inaktiváció megjelenése is kérdéses a normális állapotú szívműködő sejtekben (Reeves et al.).

Nem zárható ki azonban az a lehetőség, hogy a szubsarkolemmális térben („diadic cleft”) intakt szívműködő sejtek esetén is jelentősen nagyobb a Na^+ koncentráció, mint a citoplazmában. Ez azonban csak intakt Na^+ -és Ca^{2+} -homeosztázis esetén várható. EGTA-val puffertelt esetben, tehát a feszültség-ramp protokoll esetén biztosan nincs szubsarkolemmális Na^+ felhalmozódás, mert ilyenkor a Na^+ -áram is gátolva van lidokainnal. A ramp protokoll alacsony, 5 mM-os Na^+ esetén is működik, illetve a SEA0400 gátló hatása akkor is megfigyelhető. Megállapíthatjuk tehát, hogy a SEA gátló hatásához nem szükséges magas, 50 vagy 100 mM-os belső Na^+ koncentráció.

Elképzelhető azonban, és Lee és munkatársainak eredményei is valójában ezt sugallják inkább, hogy a SEA0400 által koncentráció függő módon vizsgált NCX-gátlás görbéje eltolódik a különböző belső Na^+ koncentrációknak megfelelően. Ez azt jelenti, hogy magasabb Na^+ mellett felvett dózis-hatás görbe esetén a maximális gátlás kisebb SEA0400 koncentrációnál jelenik meg.

Azt azonban kijelenthetjük, hogy 1 μM SEA0400 alkalmazása esetén a feltételezett Na^+ -függő hatás már nem jelenhet meg. A legtöbb tudományos cikk ezt a koncentrációt használja, mert ez szükséges ahhoz, hogy értékelhető mértékű NCX gátlást hozzunk létre. Kisebb SEA0400 koncentráció esetén (pl. 0.3 μM) elképzelhető, hogy a Na^+ koncentráció befolyásolja a SEA0400 tényleges gátló hatását, és ezt a lehetőséget még meg fogjuk vizsgálni a következő időszakban. Ez azonban már csak elméleti kérdés tulajdonképpen, hiszen a publikációkban mindig a maximális 1 μM -os koncentrációt alkalmazzák. Sőt, bizonyos esetekben 10 μM -t alkalmaztak (pl. a drezdai Farmakológiai Intézet még nem közölt eredménye), és ebben az esetben viszont már közrejátszik a SEA0400 Ca^{2+} -áramot gátló hatása is, ami már magyarázhatja a különböző kísérletekben kapott eltérő inotrop hatásokat.

Pitvari sejteken is végeztünk néhány kísérletet, mert az intézet egy folyamatban levő projektében felmerült annak lehetősége, hogy patkány pitvari preparátumokon azért látható kifejezettebb SEA hatás, mert esetleg a patkányra jellemző fiziológiásan is magasabb intracelluláris Na^+ koncentráció mellett a SEA nagyobb mértékű NCX-gátlást tud eredményezni. Mivel a patkány pitvari sejteken azonban egyelőre nem tudtuk megbízhatóan megmérni az NCX-áramot a feszültség-ramp módszerrel, ezért dolgozatomban kutya pitvari sejteken végeztem el az NCX-áram mérését. Továbbá pitvari

sejteken is nagy jelentőségű lenne az NCX gátlása bizonyos patológiás körülmények között, például pitvarfibrilláció gyógyszeres kezelésére sok tudományos cikk keres új lehetőségeket, és köztük jelentős helyet foglal el az NCX-gátlás vizsgálata. Eredményeink szerint a pitvari sejtek esetén sem függ az NCX gátlás mértéke az intracelluláris Na^+ koncentrációtól.

6.2 Az NCX-gátlás következményeinek függése az intracelluláris Na koncentrációtól

Mint említettük sok tudományos közlemény az eltérő eredményeket azzal magyarázza többek között, hogy melyik fajnak a szívműködősejtjeiben mekkora a belső Na^+ koncentráció, melynek következtében a kialakuló gátlás mértéke különböző lehet. Témavezetőm hipotézise szerint azonban sokkal valószínűbb, hogy a különböző cikkek eredményei azért változatosak, mert a szívműködősejtek aktuális Ca^{2+} - és Na^+ homeosztázisa eltérő volt az adott kísérletekben, és ezért a különbségek nem a gátlás mértékét tükrözik, hanem a gátlás eltérő következményeit. Ezért teszteltük ezt a hipotézist azzal, hogy intakt Ca^{2+} homeosztázis esetén különböző Na^+ koncentrációk mellett beálló Ca^{2+} -egyensúlyok esetén alkalmaztuk az NCX gátlást. Ha ugyanazon a fajon (kutya) sikerül kimutatni, hogy az aktuális Na^+ koncentrációk miatt eltérő eredményeket kapunk, akkor ez nyilván érvényes a fajok közötti eltérések magyarázatára is.

Az eredmények konkrét diszkussziója előtt fontos felhíni a figyelmet néhány körülményre. Az intakt Ca^{2+} -háztartás kísérleteiben az ORM10103-at használtuk az NCX gátlására, amely egy újabb, még a SEA0400-nál is szelektívebb NCX-gátló. Ezért biztosak lehetünk abban, hogy az inward áram csökkenése nem a Ca^{2+} -áram gátlása miatt következik be. A SEA0400-zal végzett hasonló kísérletek interpretációját megnehezíti, hogy a SEA0400 1 μM koncentrációban már kismértékben a Ca^{2+} -áramot is gátolja (kb. 5-10 %-ban, lsd. Birinyi et al. 2005). Dolgozatomban ezért is esett a választás az ORM10103-ra, mert egyrészt ezzel a molekulával intakt Ca^{2+} -háztartás mellett végzett kísérletek még nem történtek, másrészt pedig tudjuk, hogy ezek értelmezését nem fogja zavarni egy esetleges Ca^{2+} -áram gátló hatás, ami a SEA0400 esetében bizonytalan eredményeket hozna, amit csak nagyon óvatosan lehetne interpretálni.

Fontos megemlíteni azt is, hogy az intakt Ca^{2+} -háztartás mellett történő mérések nagyon érzékenyek minden kísérleti körülményre (pl. a pipetta soros ellenállás változásaira, vagy a gigaohm seal változása miatt a szívárgó áram nagyságára), amelyek befolyásolni képesek a kontraháló sejtek Ca^{2+} -háztartásának egyensúlyát, ezért ezekből a

kísérletekből az átlagos eredmények helyett egy-egy nagyon stabil sejten mért eredményeket mutatom be. Ezekben a kísérletekben kizárhatjuk a soros ellenállás változásait. A soros ellenállás attól függ, hogy a pipetta-oldat és a sejt belseje között mennyire jó a kapcsolat, ezért access resistance-nak is nevezik, és ez határozza meg, hogy a sejtmembránra a patch clamp erősítő által küldött parancs-feszültségnek a valóságban mekkora hányada esik ténylegesen a sejtmembránra, és mekkora feszültség esik a soros ellenálláson az Ohm-törvény értelmében. Ha a soros ellenállás változik, akkor megváltozik a feszültség parancs tényleges nagysága, emiatt pedig a kalcium-áram (általában -20 - +30 mV-os feszültség impulzussal mérjük) nagysága is változik. Ennek következtében azonban megváltozik a sejtbe áramló Ca^{2+} ionok mennyisége, és ezért az NCX működése is változást szenved, végül beáll egy új egyensúly a megváltozott befele és kifele irányuló Ca^{2+} -fluxus értékekkel. Ha ez a változás az NCX gátló molekula hozzáadása után történik, akkor nem tudhatjuk pontosan, hogy a tapasztalt változás mennyiben köszönhető az NCX gátlásának, és mennyiben ez egyébként is megváltozó ionáramoknak. Ezért az intakt Ca^{2+} -homeosztázis kísérletekben nagyon kritikus szemmel kell elemezni kísérleteket, és a spontán kísérleti változások esetén a kísérletet ki kell zárni az értékelésből. Intakt Ca^{2+} -homeosztázis esetén a sejtek kontrahálnak a patch pipetta hegyén, a folyamatos mozgás miatt pedig sajnos a soros ellenállás gyakran megváltozik, ezért ezekből a kísérleteimből nagyon kevés van, ami biztosan értékelhető, és nem félrevezető eredményekre utal. Ezúton is köszönöm témavezetőm részletes útmutatását, és magyarázatait, ezen kísérletek értékelése során.

Fontos kihangsúlyozni továbbá, hogy az intakt Ca^{2+} -háztartás esetén az alkalmazott feszültség protokollok aktuális értékeitől függetlenül mindig kevert áramokat látunk a patch clamp felvételeken. Például az -20 - +30 mV-os feszültség impulzus hatására Ca^{2+} -áram (L-típusú Ca^{2+} -áram, ICaL) aktiválódik, és a pipettaoldatban EGTA-val pufferelt Ca^{2+} -háztartás esetén a Ca^{2+} -árammal párhuzamosan más áram nem aktiválódik. Ha azonban a Ca^{2+} -háztartást nem gátoljuk, akkor a Ca^{2+} -áram hatására nagy mennyiségű Ca^{2+} szabadul fel a szarkoplazmatikus retikulumból (ez a Ca^{2+} -indukálta Ca^{2+} -release, CICR), és így az intracelluláris Ca^{2+} megemelkedik. Ezt nevezzük Ca^{2+} -tranziensnek, ami létrehozza a szívizomsejt kontrakcióját is. A Ca^{2+} -tranziens aktiválódása rögtön megtörténik a Ca^{2+} -áram hatására, és (Acsai et al. 2011) emiatt a Ca^{2+} eltávolítását végző mechanizmusok is azonnal aktiválódnak, melyek közül a legfontosabb a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -pumpája (SERCA, amely visszapumpálja a Ca^{2+} egy részét a szarkoplazmatikus retikulumba). Szintén nagyon fontos az NCX forward irányú működésének aktiválódása,

melynek révén az NCX kipumpálja a Ca^{2+} -ot a sejtéből. Ez utóbbi folyamat inward (negatív előjelű) áram generálódásával jár, ami így egyező irányú a Ca^{2+} -áram irányával, és ezt mérjük a patch clamp regisztrátumokon. Tehát ha a Ca^{2+} -áramot kb. -20 -+30 mV-os feszültség impulzussal aktiváljuk (ebben a tartományban aktiválódik a legnagyobb mértékben, maximuma 0 és +10 mV körül van), akkor az egyidejűleg aktiválódó inward NCX-áram hozzáadódik a Ca^{2+} -áramhoz, tehát a feszültség impulzus ideje alatt a Ca^{2+} -áram és az NCX-áram összegét látjuk. A regisztrált áram alakját döntően a Ca^{2+} -áram alakja határozza meg, melyre jellemző a gyors aktiváció, majd a gyors inaktiváció. Ennek ellenére nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy ebben az esetben nem tiszta Ca^{2+} -áramot látunk, hanem kevert inward áramot. Dolgozatomban ezt a jelenséget demonstrálják tulajdonképpen az ORM10103-mal kapott eredményeim (és a patch clamp labor SEA0400-zal kapott korábbi, illetve folyamatban lévő kutatások eredményei).

Az első kísérletben csak forward irányú NCX működésre adtunk lehetőséget, tehát csak az NCX Ca^{2+} -eltávolító módját engedjük működni. Ezt oly módon tudjuk elérni, hogy az intracelluláris oldat (pipetta oldat) Na^+ koncentrációját alacsonyra állítjuk (5 mM, ennél magasabb koncentráció már kedvezne a reverz irányú NCX működésnek). Továbbá arra is ügyelni kell, hogy a feszültség protokoll legmagasabb feszültsége se haladja meg a 0 mV-ot, mert a pozitív potenciálok már szintén a reverz módú NCX-nek kedveznének. Ekkor tehát feltételezhetően az NCX a kísérlet során végig csak Ca^{2+} -ot eltávolító módban működik, a Ca^{2+} -ot pedig a Ca^{2+} -áram viszi be a sejtbe. Mivel a kísérlet kezdetén néhány perc stabilizálódási időt hagyunk, ezért a sejt Ca^{2+} -háztartása egyensúlyban van, ami az egyenletes kontrakciókból is látható. Ha ekkor hozzáadjuk a sejthez az ORM10103-at, akkor a szelektivitás miatt biztosak lehetünk abban, hogy a Ca^{2+} -áramot nem gátoljuk, hanem csak a forward NCX által generált inward áramot. Ez az inward áram természetesen már a Ca -áram ideje alatt is működik, hiszen a Ca^{2+} -felszabadulás rögtön a Ca^{2+} -áramot követően megtörténik, és így az NCX elkezd kihozni a Ca^{2+} -ot, már a Ca^{2+} -áram lefutásával egyidőben. Jól megfigyelhető ugyanakkor, hogy az NCX farokáram (szintén inward áram, a -80 mV-os holding potenciálra visszatérve) eleve nagyon kicsi, ami szintén arra utal, hogy a Ca^{2+} eltávolításának nagy része már előzőleg megtörtént. Ha ekkor az NCX-áramot gátoljuk, akkor a Ca^{2+} -áram pozitív irányba tolódik el, jelezve, hogy a teljes inward áramból egy részt gátoltunk. Ekkor tehát az NCX kevesebb Ca^{2+} -ot tud kivinni a sejtéből, ezért a Ca^{2+} felhalmozódik, illetve több Ca^{2+} tud a szarkoplazmatikus retikulumba kerülni. Majd onnan felszabadulva a több Ca^{2+} a kontrakciót is erősíteni fogja, és valóban

ezt láttuk a sejtről egyidejűleg készült videó-felvételen. Ebben az esetben, az NCX gátlása pozitív inotróp hatásban nyilvánult meg.

Ezzel ellentétben, ha a kísérletet úgy végezzük, hogy a Ca^{2+} -áramot pozitív, +30 mV-os feszültség impulzussal váltjuk ki, és a pipettaoldatban az intracelluláris Na^+ koncentrációt magasra állítjuk (20 mM), akkor ezzel elősegítjük a reverzirányú NCX működést. Ebben az esetben az NCX a protokoll ideje alatt Ca^{2+} -ot tud bevinni a sejtbe, tehát a sejtbe irányuló Ca^{2+} beáramlást nem csak a Ca^{2+} -áram hozza létre, hanem a reverz NCX is hozzájárul ehhez. Jól látszik, hogy ebben az esetben a Ca^{2+} -áram nagyságához képest az NCX farokáram jóval nagyobb, mint az előző kísérletben (a feszültség impulzus utáni inward áram, mely az NCX forward módját jelzi, tehát a Ca^{2+} eltávolítást). Ez is azt jelzi, hogy ebben az esetben nem a Ca^{2+} -áram az egyedüli Ca^{2+} beáramlási útvonal a sejtbe, hanem a reverz NCX is részt vesz a Ca^{2+} beáramlásban, és ezért a forward NCX-nek több Ca^{2+} -ot kell kivinnie a sejtéből.

Ha ilyen körülmények között az NCX-et gátoljuk, akkor a helyzet sokkal bonyolultabb, mint az első kísérletben. Itt amikor az NCX-et gátoljuk, már nem csak a Ca^{2+} kiviteli módot gátoljuk, hanem a Ca^{2+} bevitel egy részét is. Ezért nehéz megjósolni, hogy mi fog történni, mi lesz az eredő hatás a Ca^{2+} -háztartás szempontjából. Kísérleteim szerint ilyenkor a kontrakció csökkenni fog, és valóban ez történt az itt bemutatott sejt esetében is. Ez az eredmény az, ami valójában a legkevésbé volt várható. A szakirodalomban beszámolnak pozitív inotróp hatásról, vagy semleges hatásról, de negatív inotróp hatásról nem találtunk információt. Valószínű, hogy ezekben a kísérletekben a reverz NCX már túlzottan aktiválódott. Fontos tudni, hogy a reverz NCX önmagában is képes aktiválni a Ca^{2+} felszabadulást (Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} release, CICR) a szarkoplazmatikus retikulumból (például szívelégtelenség esetén), sőt potenciózni is képes a Ca^{2+} -áram Ca^{2+} felszabadító hatását. Emiatt nagyon valószínű, hogy az ORM10103 hatására a reverz NCX-nek ez a hatása csökkent. Az itt alkalmazott +30 mV-os potenciálon a Ca^{2+} -áram nem olyan nagy, mint 0 mV-on, ezért a kisebb Ca^{2+} -áram önmagában a reverz NCX nélkül nem tudta fenntartani az eredeti nagyságú Ca^{2+} release-t és a kontrakciókat.

A reverz NCX gátlásakor csökkent egyúttal a Ca^{2+} beáramlás is, és ezért valószínű, hogy a Ca^{2+} beáramlás csökkenése és a CICR hatékonyságának csökkenése együttesen vezethetett a kontrakciók gyengüléséhez, amit nem tudott elensúlyozni a Ca^{2+} eltávolítás (forward NCX) gátlása. A forward NCX gátlása jól látható abból, hogy az NCX farokáram nagymértékben csökkent az ORM10103 hatására.

A csökkenő kontrakciók teljes magyarázatához új kísérleteket is kell végeznünk a jövőben. Szükséges megvizsgálni, hogyan alakul a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} tartalma. Ezt úgy lehetne vizsgálni, hogy a sejtre hirtelen 10 mM koffeint bocsátunk a gyors perfúziós oldatcserélővel. Ekkor a szarkoplazmatikus retikulumból hirtelen az összes Ca^{2+} felszabadul, és az inward NCX áram nagysága fogja megmutatni, hogy mennyi Ca^{2+} volt a retikulumban. Ha ez a Ca^{2+} mennyiség csökken az ORM10103 hatására, akkor megállapíthatjuk, hogy a reverz NCX gátlásának hatására depletálódik a retikulum Ca^{2+} tartalma, ami negatív inotróp következményekkel jár.

7. Következtetések

Dolgozatom eredményeit összefoglalva ki kell hangsúlyozni, hogy az intracelluláris Na^+ -koncentráció extrém növelése nem vezet nagyobb mértékű NCX-gátlás megjelenéséhez. Nem valószínű, hogy a szakirodalom által emlegetett különböző, fajspecifikus eltérések a különböző mértékű NCX-gátlás miatt jönnének létre.

Dolgozatom második része viszont arra utal, hogy a különböző Na^+ koncentrációk minőségileg eltérő következményekhez vezethetnek az NCX-gátlás eredményeként. A Na^+ -és Ca^{2+} -homeosztázis aktuális állapotának megfelelően ugyanabban a fajban is akár ellentétes (pozitív és negatív inotróp) hatások is létrejöhetnek.

Eredményimet nagyon röviden úgy lehetne összefoglalni, hogy az NCX-gátlásnak a mértéke nem, de következményeinek minősége viszont kifejezetten függ az intracelluláris Na^+ -tól. Ezeknek az eredményeknek nagy jeletősége lehet van abban a tekintetben, hogy szívelégtelenség esetén a beteg szív izomsejtjeiben a Ca^{2+} - és Na^+ -homeosztázis megváltozik, ezért várhatóan az NCX gátlás következményei a Ca^{2+} -háztartásban eltérőek lesznek a normális szívben megfigyeltékhez képest. Mivel az NCX-inhibitorok fejlesztésének egyik végső célja a terápiás alkalmazhatóság felderítése, ezért nagyon fontos, hogy a NCX-inhibitorok hatásait a megfelelő betegségek kísérleti modelljeiben teszteljük, mert csak így kaphatunk választ arra a kérdésre, hogy a beteg szív hogyan fog reagálni az NCX gátlására, és hogy ez a válasz kedvező vagy kedvezőtlen a betegség szempontjából.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti témavezetőm, Dr. Acsai Károly segítségét, melyet a patch clamp módszer tanulása, a kísérletek kiértékelése és a TDK dolgozatom elkészítése során nyújtott. Szintén köszönet illeti, Dr. Márton Zoltán munkáját, aki szintén a patch clamp gyakorlása során nyújtott segítséget, továbbá megtanította a patch clamp módszerhez kapcsolódó egyéb laboratóriumi munkákat.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Varró Andrásnak, az SZTE ÁOK Farmakológia és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, aki lehetővé tette számomra az intézet munkájába történő bekapcsolódást.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Papp Gyulának a patch clamp laboratórium folyamatos támogatásáért és akinek munkássága lehetővé tette az intézet számára az NCX-inhibitorokkal történő kutatási tevékenységet.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani Dr. Farkas Tamásnak, a Szegedi Tudományegyetem Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék docensének.

9. Irodalomjegyzék

- Acsai K, Antoons G, Livshitz L, Rudy Y, Sipido R. K (2011): Microdomain Ca^{2+} near ryanodine receptor is reported by L-type Ca^{2+} and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange currents. *J Physiol.* 589.10: 2569-2583.
- Acsai K, Kun A, Farkas S A, Fülöp F, Nagy N, Balázs M, Szentandrassy N, Nánási P, Papp Gy LJ, Varró A, Tóth A (2007): Effect of partial blockade of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger on Ca^{2+} handling in isolated rat ventricular myocytes. *Eur. Journal of Pharmacol.* 576:1-6.
- Antoons G, Willems R, Sipido R. K (2012): Alternative strategies in arrhythmia therapy: Evaluation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers as an anti-arrhythmic target. *Pharmacology and Therapeutics* 134:26-42.
- Bers DM (2000): Calcium fluxes involved in control of cardiac myocytes contraction. *Circ. Res.* 87:275-281.
- Birinyi P, Tóth A, Jóna I, Acsai K, Almássy J, Nagy N, Prorok J, Gherasim J, Papp Z, Hertelendi Z, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp F, Papp Gy. J, Varró A, Nánási P.P, Magyar J (2008): The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca^{2+} transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 78:476-484.
- Birinyi P, Acsai K, Bányász T, Tóth A, Horváth B, Virág L, Szentandrassy N, Magyar J, Varró A, Fülöp F, Nánási P (2005): Effects of SEA0400 and KB-R7943 on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current and L-type Ca^{2+} current in canine ventricular cardiomyocytes. *Naunyn-Schroederberg's Arch Pharmacol* 372:63-70.
- Bose R, Matsuda T, Roberts E D (2011): Molecular and functional characterization of the human platelet $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers, *British J. of Pharmacology* 165:922-936.
- DiFrancesco D, Noble D (1985): A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 307:3583-398

Enyedi A, Penniston JT (1993): Autoinhibitory of various Ca^{2+} Transporters cross-react. J Biol. Chem. 268:171020-17125.

Fujiwara K, Tanaka H, Mani H, Nakagami T, Takamatsu T (2008): Burst Emergence of Intracellular Ca^{2+} Waves Evokes Arrhythmogenic Oscillatory Depolarization via the Na^{+} - Ca^{2+} Exchanger : Simultaneous Confocal Recording of Membrane Potential and Intracellular Ca^{2+} in the Heart. Circ Res.103:509-518.

Hilgemann DW (2004): New insights into the molecular and cellular workings of the cardiac $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 287:C1167-C1172.

Kimura J, Naoma A, Iriasawa H (1986): Na^{+} - Ca^{2+} exchange current in mammalian heart cells. Nature 319:596-597.

Lee C, Dhalla NS, Hrysko LV (2005): Therapeutic potential of novel NCX inhibitor in attenuating ischemia-reperfusion injury. Can. J Cardiol. 21: 509-516.

Lee C, Neeraj S, Visen, Naranjan S, Dhalla (2004): Inhibitory Profile of SEA0400 [2-[4-[(2,5-Difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline] Assessed on the Cardiac Na^{+} - Ca^{2+} Exchanger, NCX1.1. J PET 311:748-757.

Lou CH, Rudy Y (1991): A model of ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization and their interaction. Circ. Res.68:1501-1526.

Matsouka S, Nicolli DA, Reilly RF, Hilgemann DW, Philipson KD (1993). Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 3870-3874.

Matsuoka S, Noma A, Takeuchi A, Tatsumi S (2006): Ionic Mechanisms of Cardiac Cell Swelling Induced by Blocking $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ Pump As Revealed by Experiments and Simulation, J. Gen. Physiol. 128:495-507.

Mollemann A.: Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology. 2003 John Wiley and Sons Ltd.

Nagy ZA, Virág L, Tóth A, Bilicki P, Acsai K, Varró A (2004): Selective inhibition of NCX by SEA0400 decreases early and delayed afterdepolarization in canine heart. *Br. J. Pharmacol.* 143:827-831.

Ozdemir S, Bito V, Holeman P, Mercadier J.J, Varro A, Sipido KR. (2008): Pharmacological Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange Results in Increased Cellular Ca^{2+} Load Attributable to the Predominance of Forward Mode Block. *Circ Res.* 102:1398-1405.

Reeves JP, Hale CC (1984): The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J Biol. Chem.* 259:7733-7739.

Reeves P. J, Condrescu M (2008): Ionic regulation of the cardiac sodium-calcium exchanger. *Channels* 2:5, 322-328.

Reuter H, Seitz N (1968): The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol.* 195:451-470.

Takahashi T, Takahashi K, Onishi M, Suzuki T (2004). Effects of SEA0400, a novel inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, on myocardial stunning in anesthetized dogs. *EUR. J. Pharm.* 505:163-168.

Reuter H, Pott C, Goldhaber JJ, Henderson SA (2005): $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Cardiovasc. Res.* 67:198-207.

Tanaka H, Shimada H, Nemekata I, Kawanishi T, Shigebonu K (2007): Involvement of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger in Ouabain-Induced Inotropy and Arrhythmogenesis in Guinea-Pig Myocardium as Revealed by SEA0400. *J Pharmacol Sci* 103:241 – 246.

Tanaka H, Shimada H, Nemekata I, Kawanishi T, Shigebonu K (2006): Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} overload. *European Journal of Pharmacology* 543:108–115.

Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K (2002):Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. British Journal of Pharmacology135:1096-1100.

Yaradanakul A, Feng S, Shen C, Lariccia V, Lin M.J, Yang J,Kang T.M, Dong P, Yin H. L, AlbanesiP.J, Hilgemann D.W (2007): Dual control of cardiac Na^+ - Ca^{2+} exchange by PIP2 electrophysiological analisis of direct and indirect mechanisms. J Phisiol 582.3:991-1010.

Watanabe Y, Koide Y, Kimura J (2006): Topics on the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger: Pharmacological Characterization of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchangers inhibitors. J Pharmacol Sci 102:7-16.

Weber CR, Ginsburg KS, Philipson KD, Shannon TR, Bers DM (2001): Allosteric regulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current by cytosolic Ca in intact cardiac myocytes. J Gen. Phisiol. 117:119-131.

Weisser-Thomas J, Piacentino V, Gaughan JP, Margulies K, Hauser SR (2003). Calcium entry via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. Cardiovasc. Res.57:974-985.

10. Nyilatkozat

Aluírott Oravecz Kinga 2. éves Msc hallgató kijelentem, hogy dolgozatomban a saját kísérleteimet mutatom be, melyeket témavezetőm, Dr. Acsai Károly felügyelete alatt készítettem. Az eredmények értékelésénél, kizárólag témavezetőm nyújtott segítséget, melyet ezúton is köszönök. Az ábrákat, szintén témavezetőm útmutatásai alapján készítettem. Részt vettem ezen kívül a sejtek izolálásában és a kísérletek előkészítésében, az oldatok elkészítésében is.

Szeged, 2012. november 5.



.....

Oravecz Kinga

11. Rövidítések jegyzéke

BSA: bovin serum albumin

CICR: Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} release

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

ICaL: L-típusú Ca^{2+} -áram

NCX: $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger

SEA0400: 2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline

SEA: SEA0400 avagy 2-[4-[(2,5-difluorophenyl)methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline

SERCA: szarkoplazmatikus reticulum Ca^{2+} pumpája