

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Vliv léčiva aminofylinu na *inward rectifier* draslíkový proud u lidských srdečních buněk

**Natálie Carbolová
Moravskoslezský kraj**

Frýdek-Místek 2020

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Lékařství

Vliv léčiva aminofylinu na *inward rectifier* draslíkový proud u lidských srdečních buněk

Effect of therapeutic drug aminophylline on *inward rectifier* potassium current in human cardiac cells

Autor: Natálie Carbolová

Škola: Gymnázium Petra Bezruče, Frýdek-Místek, příspěvková organizace, Československé armády 517, Místek, 738 01 Frýdek-Místek

Kraj: Moravskoslezský kraj

Konzultant: doc. MUDr. Markéta Bébarová, Ph.D.

Frýdek-Místek 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Frýdku-Místku dne

Natálie Carbolová

Poděkování

Tímto bych chtěla vyjádřit své velké díky paní doc. MUDr. Markétě Bébarové, Ph.D., mé konzultantce, za možnost spolupráce a možnost vypracování mé Středoškolské odborné činnosti pod jejím vedením, za seznámení s problematikou, za vynaložené úsilí a především za trpělivost, vstřícnost a ochotu, se kterou se mi vždy věnovala.

Dále mé velké díky patří Ing. Olze Švecové, Ph.D., jenž mne také zasvětila do problematiky. Velkou pomocí mi byla také při zpracování výsledků a statistiky.

Děkuji vedení Gymnázia Petra Bezruče Frýdek-Místek a třídnímu učiteli Mgr. Liboru Magdoňovi za omlouvání mé absence.

Anotace

Léčivo aminofylin je díky svým bronchodilatačním účinkům užíváno zejména k léčbě závažných astmatických stavů. Jeho aplikace zvyšuje riziko vzniku tachyarytmií, hlavně fibrilace síní. Jelikož změny srdečních *inward rectifier* draslíkových (Kir) proudů mohou přispívat ke vzniku fibrilace síní, cílem této práce bylo prostudovat vliv aminofylinu na jeden z podtypů srdečních Kir proudů, proud I_{K1} , u lidských srdečních buněk. V teoretické části se zabývám akčním napětím pracovního myokardu, draslíkovými kanály a také technikou *patch clamp*, jejíž modifikaci *whole cell patch clamp* jsem využila k měření změn I_{K1} pod vlivem aminofylinu v této studii. Měření probíhala při teplotě 37°C na lidských srdečních buňkách enzymaticky izolovaných ze srdcí pacientů v konečném stádiu srdečního selhání podstupujících transplantaci srdce. Jak jsem zjistila, aminofylin působí na zkoumaný I_{K1} inhibičně, a to i v klinicky relevantních koncentracích. Pozorovala jsem průměrnou inhibici o 14,7, 15,9 a 24,7 % při aplikaci aminofylinu v koncentracích 10, 30, resp. 100 μM . V úvodu práce shrnuji problematiku arytmogenních poruch, které by mohly vznikat, mimo jiné, i následkem účinku aminofylinu.

Klíčová slova

Aminofylin; *inward rectifier*; I_{K1} ; *patch clamp*

Annotation

The therapeutic drug aminophylline is used especially for treatment of serious asthma attacks due to its bronchodilator effects. Its application increases risk of tachyarrhythmias, particularly of the atrial fibrillation. Since changes of *inward rectifier* potassium (I_{K1}) currents can contribute to formation of the atrial fibrillation, this work was focused on analysis of the effect of aminophylline on a subtype of the cardiac I_{K1} currents, in human cardiac cells. In the theoretical part, I deal with the action potential of working myocardium, potassium channels and also with the *patch clamp* technique, which was used, namely its *whole cell patch clamp* modification, for measurements of I_{K1} changes under the effect of aminophylline in this study. The experiments were performed at 37 °C on human cardiac cells enzymatically isolated from hearts of patients in the final stage of the heart failure who were undergoing the heart transplantation. I found out that aminophylline showed an inhibitory effect on I_{K1} , even in clinically relevant concentrations. I observed an average inhibition of 14.7, 15.9 and 24.7 % during application of aminophylline of concentrations of 10, 30 and 100 μM , respectively. In the first chapter of this work, I summarize problematics of arrhythmogenic disorders, which could result, among others, also from the action of aminophylline.

Keywords

Aminophylline; *inward rectifier*; I_{K1} ; *patch clamp*

Obsah:

Obsah:	6
1. Úvod.....	7
1.1 Aminofylin.....	7
1.2 Poruchy srdečního rytmu – arytmie	7
1.2.1 Diagnóza	8
1.2.2 Možnosti léčby.....	9
1.2.3 Přehled arytmogenních onemocnění.....	10
2. Elektrická činnost srdce	12
2.1 Převodní systém srdeční	12
2.2 Elektrické vlastnosti srdečních buněk pracovního myokardu	13
2.3 Draslíkové kanály	15
3. Metodické přístupy při studiu elektrických vlastností srdečních buněk.....	16
3.1 Izolace srdečních buněk.....	16
3.2 Metoda <i>patch clamp</i>	16
3.2.1 Konfigurace <i>patch clamp</i> techniky	17
3.3 Analýza dat	19
4. Praktická část	20
4.1 Měření technikou <i>whole-cell patch clamp</i>	20
4.2 Výsledky: Vliv aminofylinu na I_{K1} u lidských srdečních buněk.....	21
4.2.1 Změny I_{K1} po aplikaci aminofylinu	23
4.2.2 Čas nástupu a ústupu účinku aminofylinu na I_{K1}	24
4.2.3 Blokáda I_{K1} aminofylinem	25
5. Diskuse: Možné důsledky vlivu aminofylinu na I_{K1}	25
6. Závěr	26
Seznam literatury	27
Seznam obrázků.....	29

Úvod

V této práci se věnuji vlivu účinné látky aminofylinu na *inward rectifier* draslíkový proud u lidských srdečních buněk. Látka aminofylin je léčivem, které se pro svůj bronchodilatační účinek primárně využívá pro léčbu problémů s obstrukcí (zúžením) dýchacích cest (typicky u astmatu). Jeho aplikace významně zvyšuje riziko vzniku tachyarytmií, zejména fibrilace síní. Hlavní otázkou, kterou měla zodpovědět tato práce je, zda má tato účinná látka vliv na srdeční draslíkové kanály typu *inward rectifier*, jejichž změny jsou jedním z faktorů potenciálně přispívajících ke vzniku fibrilace síní.

1.1 Aminofylin

Aminofylin se řadí do skupiny léčiv, která pro svůj bronchodilatační účinek napomáhají při léčbě problémů s obstrukcí (zúžením) dýchacích cest (astma). Jeho sumární vzorec je $C_{16}H_{24}N_{10}O_4$. Aminofylin se jako účinná látka v lécích skládá z *theofylinu* a *ethyldiaminu*. Léčivé přípravky obsahující aminofylin se podávají pacientům od dětství až po dospělost, a to nejčastěji ve formě injekčního roztoku, typicky během astmatického záchvatu.^{[1], [2]} V České republice je aminofylin přítomen jako účinná látka například v léku s názvem *Syntophyllin 24mg/ml*. Tento lék je vydán na předpis lékaře lidem, u kterých byly diagnostikovány problémy s dýchacími cestami. Jedná se tedy převážně o astmatiky, pacienty trpící chronickou obstrukční plicní nemocí, onkologické pacienty, kteří mají problém s dušností, a také novorozence s idiopatickou spánkovou apnoe. Tento lék má ale také řadu nežádoucích účinků jako například: nauzea, zvracení, bolesti hlavy, nespavost, palpitace nebo závratě. Předávkování doprovázejí hlavně gastrointestinální (nauzea, průjem, zvracení) a kardiovaskulárními příznaky (tachykardie, vznik arytmií, hypotenze).^{[1], [2]}

Jak vyplývá z předchozího odstavce, bylo prokázáno, že lidé, kteří byli léčeni aminofylinem měli větší předpoklad pro vznik srdečních arytmií, a to například fibrilace síní.^[3] Patogeneze fibrilace síní je komplexní. Mimo jiné se na ní mohou účastnit i změny dále zmíněných Kir kanálů (viz kapitola 1.3 Draslíkové kanály). Aminofylin tvoří substrát pro vznik arytmií i při terapeutických koncentracích (10-20 mg/L, tj. 24 - 48 μ M).^[3] Proto jsme se rozhodli zkoumat, zda aminofylin v klinicky relevantních koncentracích ovlivňuje Kir kanály v srdečních buňkách člověka. Konkrétně jsme se zaměřili na proud I_{K1} , který je hlavním Kir kanálem aktivním za klidového fyziologického stavu organismu.

1.2 Poruchy srdečního rytmu – arytmie

Poruchy srdečního rytmu neboli arytmie jsou poruchy tvorby elektrických vzruchů nebo jejich šíření, případně může dojít ke kombinaci obojího. Někdy se i za fyziologických okolností zrychlí anebo zpomalí srdeční rytmus, a to například při cvičení, resp. ve spánku. Pokud je však rytmus abnormálně pomalý nebo naopak rychlý, jedná se s velkou pravděpodobností o srdeční arytmii. Dle srdeční frekvence rozlišujeme dva základní typy arytmií:

- a) **Bradykardie (bradyarytmie)** – jedná se o výrazné zpomalení srdečního rytmu, konkrétně pod 60 impulzů za minutu. Podkladem je obvykle to, že se vzruch v sinusovém uzlu tvoří pomalu, a proto srdce pracuje pomalu a není schopno při zátěži zvýšit svoji činnost. Rovněž může jít o důsledek přerušení vedení vzruchu ze síní na komory přes síňokomorový uzel.^[4]
- b) **Tachykardie (tachyarytmie)** – jedná se o výrazné zrychlení srdečního rytmu, konkrétně nad 100 impulzů za minutu. V tomto případě je elektrický impuls tvořen patologicky s velkou frekvencí v pracovní svalovině srdce (kdekoli ve svalovině síní nebo komor), krouží v různě velké oblasti srdce kolem dokola (tzv. *reentry*) a aktivuje tak okolní svalovinu. Příliš rychle vytvářené vzruchy neumožní srdci se dostatečně naplnit (k tomu dochází pouze ve stavu relaxace svalů), navíc je svalovina drážděna nesynchronně. Obojí vede k výraznému poklesu výdeje krve ze srdce do tepen, a tedy k projevům akutního srdečního selhání.^[4]

Vznik arytmií může být podmíněn různými podněty. Mezi nejčastější příčiny poruch srdečního rytmu patří například ischemická choroba srdeční, poruchy acidobazické rovnováhy, poruchy myokardu (kardiomyopatie, myokarditida), narušení rovnováhy vegetativního nervového systému a samozřejmě různé arytmogenní látky, mezi které se řadí i mnou zkoumaný aminofylin.

1.2.1 Diagnóza

U léčby arytmií je důležitá včasná diagnóza. K procesu stanovení diagnózy arytmie patří:

1. **Důkladná anamnéza**, tím chápeme přesné údaje o tzv. předchorobí pacienta, to znamená informace o předešlém i aktuálním zdravotním stavu (obtíže a problémy, prodělané operace, vážnější nemoci nebo také informace o zdravotním stavu členů rodiny).
2. **Fyzikální vyšetření** – vyšetření pacienta pomocí jednoduchých pomůcek nebo vlastních smyslů. Do fyzikálního vyšetření spadá také poslech pacienta fonendoskopem.
3. **Vyšetření pomocí elektrokardiografie (zkráceně EKG)**. Jedná se o nejvyužívanější metodu diagnostiky v rámci poruch srdečního rytmu. Základním principem EKG je zaznamenávání elektrické aktivity lidského srdce z povrchu těla (neinvazivně) ve formě elektrokardiogramu. Díky akčnímu napětí, který se šíří srdečními buňkami, vznikají v srdci místní elektrické proudy mezi již depolarizovanými (aktivovanými) srdečními buňkami a srdečními buňkami, které jsou v klidovém stavu. Ty zapříčiňují vznik elektromagnetického pole. Protože jsou tělesné tekutiny velmi vodivé, lze snímat změny srdeční činnosti i z povrchu těla. Při elektrokardiografickém vyšetření leží pacient v klidové poloze na lůžku. Pacientu jsou na tělo umístěny svody, které mají za úkol snímat srdeční činnost. Při tomto vyšetření musí být pacient absolutně v klidu, aby nedošlo k chybnému a nepřesnému snímání. Po rychlém vyšetření dostává lékař vytištěný záznam elektrokardiogramu na papír a může tedy hned stanovit výsledek vyšetření.^[5]

4. Holterovská elektrokardiografie. Principem Holterovského EKG je nejčastěji 24-hodinové (může být také 48-hodinové) snímání elektrické aktivity srdce pacienta pomocí tzv. Holterova monitoru. Tuto analýzu není potřeba provádět u všech pacientů s podezřením na výskyt arytmii. Používá se převážně u pacientů s podezřením na nárazové formy arytmiogenní poruchy. Na hrudník pacienta jsou připojeny elektrody propojené se snímacím a záznamovým zařízením. Pacient odchází domů. Po uplynutí stanovené doby se dostaví opět k lékaři a ten může vyhodnotit získaný záznam.^[6]
5. Elektrofyzilogické vyšetření je možné provést v indikovaných případech. Jedná se o zavedení elektrodových katétrů přímo do různých srdečních oddílů, pomocí katetrizace srdce. Jde tedy o invazivní vyšetření. Cílem tohoto vyšetření je primárně potvrdit či vyloučit přítomnost srdeční arytmie a sekundárně určit typ srdeční arytmie. Dále také můžeme pomocí zavedení katétrů objasnit mechanismus vzniku arytmiogenního onemocnění. Při tomto vyšetření je totiž možné ve zvoleném režimu myokard dráždit a zjišťovat tendenci k rozvoji arytmii při různém typu či lokalizaci dráždění.^[7]

1.2.2 Možnosti léčby

Nejčastější formou léčby arytmii je farmakologická léčba. Tato léčba je nasazena po potvrzení přítomnosti a po diagnostikování konkrétního typu poruchy srdečního rytmu. Pro léčbu jsou používána léčiva zvaná antiarytmika. Antiarytmika mohou být v některých případech předepisována pacientům i preventivně. Jako každá farmaka i antiarytmika mohou doprovázet různé komplikace a vedlejší účinky. Vedlejšími účinky bývají často bolesti hlavy, nevolnost a průjem. Méně častými pak křeče (i zhoršení parkinsonismu) a například problémy s potencí. Antiarytmika mnohdy ovlivňují také činnost štítné žlázy, ledvin, plic, jater a dalších orgánů. Poněkud paradoxně se jako nežádoucí účinek léčby antiarytmikem může vyskytnout i arytmie, typicky v důsledku ovlivnění více proudů, z nichž některé jsou ovlivněny léčebně a jejichž změna je tedy žádoucí, ale jiné jsou ovlivněny nechtěně.^[8]

Další možností léčby je implantace, a to buď kardiostimulátoru nebo implantabilního kardioverteru-defibrilátoru. Implantace může být dočasná, ale také trvalá (definitivní řešení vážných případů). Podstatou funkce kardiostimulátoru je elektrická stimulace srdce, které není schopno samostatné činnosti. Podstatou kardioverteru-defibrilátoru je schopnost detekce arytmiogenní poruchy a zahájení terapie elektrickým výbojem, kterou je možné předejít náhlé srdeční příhodě z důvodu srdeční zástavy.^[9]

Mezi často využívané metody léčby arytmiogenních onemocnění patří také radiofrekvenční katérová ablace. Podstatou této léčby je průchod elektrického proudu o frekvenci 500–1000 kHz (vysílaného z katetru zavedeného do srdce) srdeční svalovinou, což zapříčiňuje vznik tepla. Léčba je cílena na oblast myokardu, v němž např. vznikají nežádoucí vzruchy. Teplotou nad 46°C začíná nekróza (odumření) postižených buněk. Nekrotická část myokardu se následně hojí formou jizvy, tedy nevodivé tkáně, v níž již nedochází k nežádoucímu vedení ani tvorbě vzruchu.^[10]

1.2.3 Přehled arytmogenních onemocnění

Mezi základní druhy arytmogenních onemocnění patří:

1. Arytmie se zachovaným sinusovým rytmem. Sem patří sinusová tachykardie a sinusová bradykardie. Při sinusové tachykardii vychází srdeční impuls normálně ze sinoatriálního uzlu, ale klidová srdeční frekvence stoupá nad hodnoty 100 tepů za minutu. Sinusová bradykardie je charakteristická sinusovou frekvencí pod 60 tepů za minutu.^[11]
2. Extrasystoly jsou jedny z nejčastějších arytmogenních onemocnění. Jedná se o předčasně vzniklý vzruch, který vznikl jinde než v sinoatriálním uzlu, který je jediným fyziologicky se uplatňujícím centrem elektrické stimulace srdce. Podle toho, kde vzruch vznikl, se extrasystoly dělí na síňové, junkční (vznikají na v oblasti atrioventrikulární junkce) a komorové. Tím, že se extrasystolou předběhne normální vzruch, dochází k předčasné depolarizaci srdečního myokardu a jeho stahu. Na vzniku extrasystol se často podílí kouření, přejídání, alkohol, kolísání krevního tlaku, emoční výkyvy a drogy. Léčbu zahajuje zpravidla doporučení úpravy životosprávy nebo psychoterapie. Dále se ordinují antiarytmika.^[11]
3. Fibrilace síní se taktéž řadí mezi jedny z nejčastějších arytmogenních onemocnění. Riziko tohoto onemocnění se zvyšuje u lidí nad padesát let. Tento typ arytmie je také nejčastěji spojen s aplikací aminofylinu, kde se pak fibrilace síní může vyskytnout i u pacienta výrazně mladšího. Jedná se částečně i o dědičné onemocnění. Principem je vznik velkého množství vzruchů ve svalovině síní, z nichž většinu ale síňokomorový uzel nepustí dál do komor (z důvodu zpoždění vedení vzruchu v síňokomorovém uzlu). Chrání tak komory před přetížením. Síně i komory se tudíž kontrahují nepravidelně a nesynchronně. Fibrilace síní je příčinou palpitace, snížení minutového výdeje, může zapříčinit selhání a má také podíl na vzniku cévní mozkové příhody (prostřednictvím ucpání některé z mozkových cév embolem uvolněným z trombů vznikajících v nesynchronně a slabě se kontrahujících síních). Léčba probíhá pomocí antiarytmik a také pomocí katérové ablace.^[11]
4. Arytmie s pomalým rytmem:
 - a) Sinusová zástava – její podstatou je špatná činnost sinusového uzlu. Vzruchy vznikající v sinoatriálním uzlu v tomto případě zcela chybí. Při delším trvání může způsobit závratě a slabost.^[11]
 - b) *Sick sinus* syndrom neboli česky syndrom chorého uzlu je taktéž arytmogenní onemocnění související s poruchou tvorby vzruchů sinoatriálním uzlem. Podstatou je záchvatová nebo trvalá sinusová bradykardie až výše zmíněná sinusová zástava. Bradykardie bývá střídána tachykardií. Nejčastějšími příznaky jsou závratě a slabost. Tyto příznaky jsou často doprovázeny pády a zranění, což nemocnému snižuje kvalitu života. *Sick sinus* syndrom neohrožuje život pacienta, ale jak jsem již zmínila, snižuje kvalitu jeho života. Nejčastější léčbou je zde trvalá implantace kardiostimulátoru.^[11]
 - c) Atrioventrikulární blokády vznikají zpomalením nebo přerušením převodu vzruchu ze síní na komory. Příčinou mohou být léčba antiarytmiky či digoxinem, ischemie v oblasti síňokomorového uzlu, trauma a šok. Léčba probíhá pomocí antiarytmik, úpravou dávkování léku nebo případně implantací kardiostimulátoru.^[11]

- d) Elektroaktivita bez hmatného tepu představuje terminální stav (stav kdy pacient umírá). EKG signál je na obrazovce viditelný, ale mechanická aktivita srdce (kontrakce) není patrná, nelze slyšet srdeční ozvy, ani nahmatat tep. Příčinou jsou obvykle buď organické poškození srdce (opakované defibrilace, akutní infarkt myokardu nebo plicní embolie) nebo jeho toxické poškození (hyperkalemie - zvýšení obsahu draslíku v krvi; hypokalcemie - snížení obsahu vápníku v krvi; negativně inotropní látky).^[11]
5. Náhlá srdeční smrt se významně podílí na celkovém počtu úmrtí.^[11] Tvoří asi 50 % úmrtí z kardiovaskulárních příčin. Nejčastějším mechanismem náhlé srdeční smrti je vznik komorové tachykardie degenerující do fibrilace komor s následnou asystolií.^[11] Tento mechanismus stojí za vznikem asi 95 % všech případů. Náhlá srdeční smrt také často vzniká jako důsledek ischemické choroby srdeční. Možností redukce náhlé srdeční smrti je hlavně eliminace rizikových faktorů, jako jsou hypertenze, kouření, diabetes a nadváha. V neposlední řadě pak časná diagnostika ischemické choroby srdeční.^[11]

2. Elektrická činnost srdce

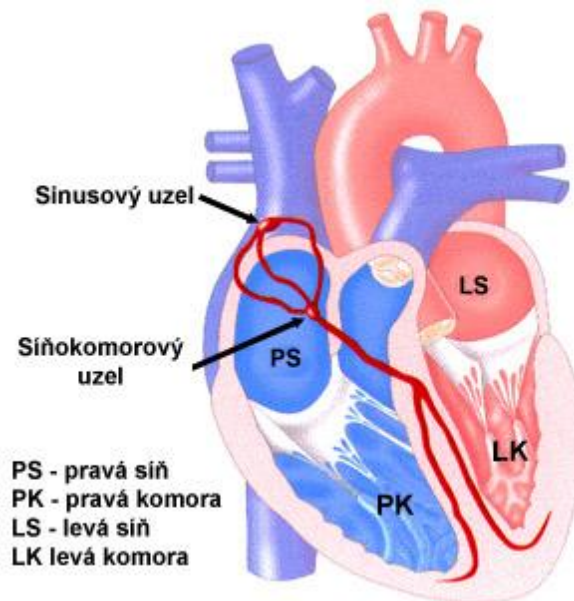
2.1 Převodní systém srdeční

Aby srdce mohlo vykonávat svou hlavní funkci, tj. pumpovat krev do plicního i systémového krevního oběhu, je poháněno elektrickými impulsy. Tyto elektrické impulsy způsobují, že se síně a komory stahují (kontrahují), čímž vzniká srdeční rytmus, tj. pravidelné střídání kontrakce a relaxace srdečního svalu.

Elektrické impulsy vznikají ve specializovaném převodním systému srdečním (PSS). PSS má tři základní vlastnosti. Jsou to autonomie, automacie a rytmicita. Autonomie neboli nezávislost znamená, že je srdce v tvorbě impulsů nezávislé na dalších prvcích, například na centrální nervové soustavě. Automacie neboli samočinnost znamená, že srdce je schopné samočinně vytvářet pravidelně se opakující podněty k vlastní kontrakci. Rytmicita znamená, že podněty ke kontrakci (impulsy) srdce vytváří pravidelně tj. s určitou frekvencí. ^{[12], [13]}

PSS se skládá z několika částí (Obr. 1). Samotný impuls ve formě akčního napětí vzniká v sinoatriálním (SA) uzlu. Je to shluk buněk nacházející se ve stěně v horní části pravé síně srdeční. SA uzel je tzv. *pacemaker*, tedy udavač rytmu. Konkrétně jde o primární *pacemaker*, protože za fyziologického stavu je hlavním *pacemakerem*, udává rytmus celému srdci. Rytmus, který pochází z SA uzlu, označujeme jako sinusový rytmus. Z SA uzlu se šíří impulsy na pracovní myokard síní. Dále se přemísťují pomocí preferenčních drah, kterými jsou například Jamesův svazek, Thorelův svazek, Wenckebachův svazek nebo Bachmanova dráha až do síňokomorového (neboli atrioventrikulárního, AV) uzlu. Preferenčními drahami se vzruch šíří daleko rychleji než pracovním myokardem síní. AV uzel se nachází v dolní části přepážky mezi síněmi. Tento uzel vede impuls velmi pomalu. Pokud je SA uzel poškozen, AV uzel nahrazuje jeho funkci vytváření impulsu (sekundární *pacemaker*), analogickým mechanismem jako SA uzel, avšak v nižší frekvenci (tzv. nodální rytmus). Za fyziologických okolností se činnost AV uzlu zřetelně neprojevuje a jeho funkcí je regulovaný převod impulsů na svalovinu komor (umožněný fyziologicky přítomným zpomalením vedení vzruchu tímto uzlem). Na AV uzel navazuje Hisův svazek, který se dále dělí na pravé a levé Tawarovo raménko. Pravé Tawarovo raménko vede vzruch ke svalovině pravé komory a naopak levé Tawarovo raménko vede impuls ke svalovině levé komory. Impuls je dále rozveden na pracovní myokard obou komor pomocí Purkyňových vláken. ^{[12], [13]} Ty jsou v případě absence vytváření vzruchu v SA či AV uzlu schopny rovněž spontánní tvorby vzruchu (terciární *pacemaker*), avšak ve velmi nízké frekvenci, která již nestačí pro udržení dostatečného prokrvení tkání.

Pracovní myokard nemá funkci vytváření impulsů (tuto schopnost získává pouze za patologických podmínek), jeho hlavní funkcí je kontrakce (síla potřebná k udržení průtoku krve cévním systémem, a tedy i tkáněmi).^[12]



Obrázek 1: Převodní systém srdeční a jeho části. Převzato z ref. [12].

2.2 Elektrické vlastnosti srdečních buněk pracovního myokardu

Buňky pracovního myokardu mezi impulsy přicházejícími z PSS udržují na své membráně tzv. klidové membránové napětí, které se typicky pohybuje kolem -80 mV. Po podráždění buňky pracovního myokardu impulsem vzniklým a šířícím se PSS, dojde k vychýlení membránového napětí do pozitivních hodnot, tj. vznikne akční napětí, a srdeční buňka se stáhne (kontrahuje).^[14]

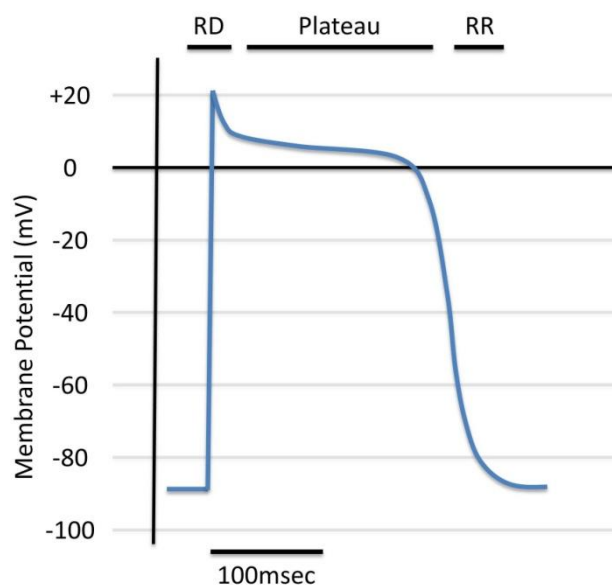
Akční napětí srdeční buňky má tři hlavní fáze, depolarizaci, fázi plató a repolarizaci (Obr. 2). Depolarizace je velmi rychlá, trvá asi 2 ms a je zahájena při napětí -60 až -70 mV (tzv. prahové napětí). Při tomto napětí dojde k aktivaci napětím řízených Na^+ kanálů, jejichž prostřednictvím vstupují Na^+ ionty do buňky - teče tzv. sodíkový proud I_{Na} , který buňku depolarizuje až transpolarizuje (obvykle k $+30$ až k $+40$ mV; fáze 0 akčního napětí). Propustnost pro Na^+ rychle vzroste, protože hustota Na^+ kanálů v buněčné membráně srdeční buňky je vysoká. Na^+ ionty proudí do buňky jak ve směru svého koncentračního gradientu (extracelulární koncentrace Na^+ je vyšší než ta intracelulární), tak ve směru elektrického gradientu (vnitřní strana membrány je negativní oproti vnější straně). Na^+ kanály se spontánně a velmi rychle inaktivují a zůstávají inaktivovány až do fáze konečné repolarizace. Proto je v tomto období membrána srdeční buňky refrakterní k jakýmkoliv stimulům (prevence tetanického stahu – viz dále).^[14]

Následuje fáze počáteční rychlé repolarizace (fáze 1 akčního napětí), způsobená jednak inaktivací Na^+ kanálů a také aktivací jednoho z draslíkových kanálů, který je ale aktivní pouze přechodně. Draslíkové kanály se výrazně podílejí hlavně na repolarizaci akčního napětí, protože s sebou cestou z buňky odnášejí kladný náboj. Díky tomu se membránové napětí posune na napětí kolem 0 až $+15$ mV, které je ideální pro vtok Ca^{2+} do

srdeční buňky, nezbytného pro zahájení kontrakce srdečních buněk, přes napětím řízené Ca^{2+} kanály během tzv. fáze plató (tyto kanály se začínají pomalu aktivovat při napětí -30 až -40 mV).^[14]

Fáze plató (fáze 2 akčního napětí) je v rámci excitabilních tkání typická zejména pro srdeční buňky. Je charakteristická udržováním poměrně stabilního membránového napětím po dobu stovek milisekund díky vyrovnanému vtoku Ca^{2+} do buňky a výtoku K^{+} z buňky. Hodnota tohoto stabilního membránového napětí se udržuje v pozitivních hodnotách a to přibližně +15 mV. Díky tomu proběhne kontrakce srdeční buňky z většiny ještě během tzv. refrakterní fáze, kdy není možno srdeční buňku znovu podráždit. Jde o prevenci tetanického stahu, který je typickou variantou zvětšování síly stahu kosterního svalu. U srdeční buňky by však byl podobný typ stahu kontraproduktivní, ba přímo škodlivý, jelikož srdce se musí střídavě stahovat a relaxovat, aby mohlo být naplněno krví před následující kontrakcí.^[15]

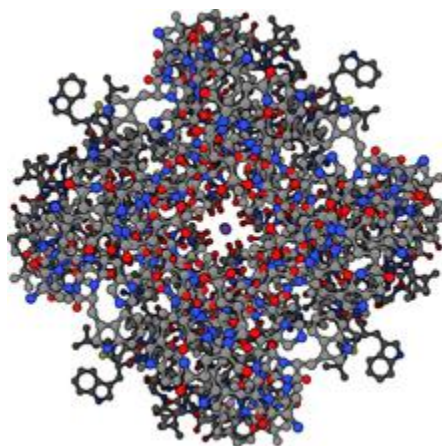
Postupná inaktivace Ca^{2+} kanálů a zvyšující se úroveň aktivace K^{+} kanálů vede ke konečné repolarizaci srdeční buňky (fáze 3 akčního napětí). Membránové napětí začne klesat zpět do záporných hodnot díky inaktivaci Ca^{2+} kanálů. Touto změnou dojde i k navýšení propustnosti draslíkových kanálů. Následně dojde k obnově klidové hodnoty membránového napětí. Plató fáze a repolarizace trvají u srdeční buňky pracovního myokardu komor dohromady asi 200-250 ms.^[14]



Obrázek 2: Průběh akčního napětí srdečních buněk v základních třech fázích (RD = fáze depolarizace, Plateau = fáze plató, RR = fáze repolarizace). Převzato z ref. [16].

2.3 Draslíkové kanály

Draslíkové kanály, jak již bylo zmíněno výše, hrají velmi důležitou a významnou roli. Zprostředkují pasivní transport iontů K^+ přes cytoplazmatickou membránu srdečních (i jiných) buněk během klidového i akčního napětí. Jejich průměr je asi 0,3 nm (Obr. 3).^[17]



Obrázek 3: Řez draslíkovým kanálem. Fialová částice ve středu znázorňuje procházející K^+ . Převzato z ref. [18].

Existuje mnoho podtypů draslíkových kanálů. Dělí se primárně podle toho, čím jsou řízeny. Mohou být řízeny Ca^{2+} , ATP, excitačními aminokyselinami nebo klasicky napětově. Napětově řízené draslíkové kanály lze velmi hrubě rozdělit na neinaktivující se a inaktivující se. Neinaktivující se jsou během akčního napětí v podstatě permanentně otevřeny. Naopak během klidového napětí buňky zůstávají nitrobuněčná vrátka těchto kanálů uzavřena a ionty přes kanál neprocházejí. Tyto kanály mohou být blokovány tetraetylamoniem (TEA). Inaktivující se draslíkové kanál vedoucí přechodný proud z buňky (I_{to}) je během akčního napětí otevřený pouze krátce, na jeho počátku, a je zodpovědný za fázi počáteční rychlé repolarizace (fáze 1 akčního napětí). Blokátorem těchto kanálů je například 4-aminopyridin.^[17]

V této práci se dále věnuji proudu procházejícímu přes jeden z podtypů napětím řízených draslíkových kanálů. Jde o kanál, který se řadí do rodiny tzv. *inward rectifier* draslíkových (zkráceně Kir) kanálů. Podílí se významně jak na udržování klidového membránového napětí, tak na konečné fázi repolarizace akčního napětí.^[6] Jejich změny mohou přispívat ke vzniku fibrilace síní i komor.^[19]

3. Metodické přístupy při studiu elektrických vlastností srdečních buněk

3.1 Izolace srdečních buněk

Abychom mohli zkoumat draslíkové kanály, měřit proudy, které jimi protékají, musíme nejdříve získat vhodný materiál, např. izolovat srdeční buňky. V našem případě byly komorové buňky izolovány z lidského srdce. Jedná se o srdce pacienta v konečném stádiu srdečního selhání, kterému bylo transplantováno srdce zdravého dárce a který před transplantací podepsal informovaný souhlas s využitím svého srdce pro experimentální účely. Po explantaci je nemocné srdce transportováno co nejrychleji do laboratoře (během 15-20 min po vyjmutí z hrudníku pacienta), naložené v ledu, aby se zmírnil dopad ischemie. V jiných případech se izolace srdečních buněk pro experimentální účely provádí nejčastěji ze srdcí malých laboratorních zvířat, např. potkana. Všechny pokusy na laboratorních zvířatech jsou samozřejmě prováděny s respektováním doporučení *European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* a schválení projektu pokusů podléhá jak lokální etické komisi, tak Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy.

Hned po převozu byla do explantovaného lidského srdce zavedena kanyla přes aortu do větve levé koronární cévy a upevněna pomocí chirurgické niti. Kanyla se srdcem byla napojena na Langendorffovo perfuzní zařízení. Část myokardu kolem kanyly byla promývána Tyrodovým roztokem s velmi nízkým obsahem CaCl_2 ($0,06 \mu\text{M}$; cca 10 min). Tyrodův roztok měl následující složení (v mM): NaCl 135, KCl 5,4, MgCl_2 0,9, HEPES 10, NaH_2PO_4 0,33, glukóza 10; pH bylo korigováno na 7,4 přidáním NaOH.

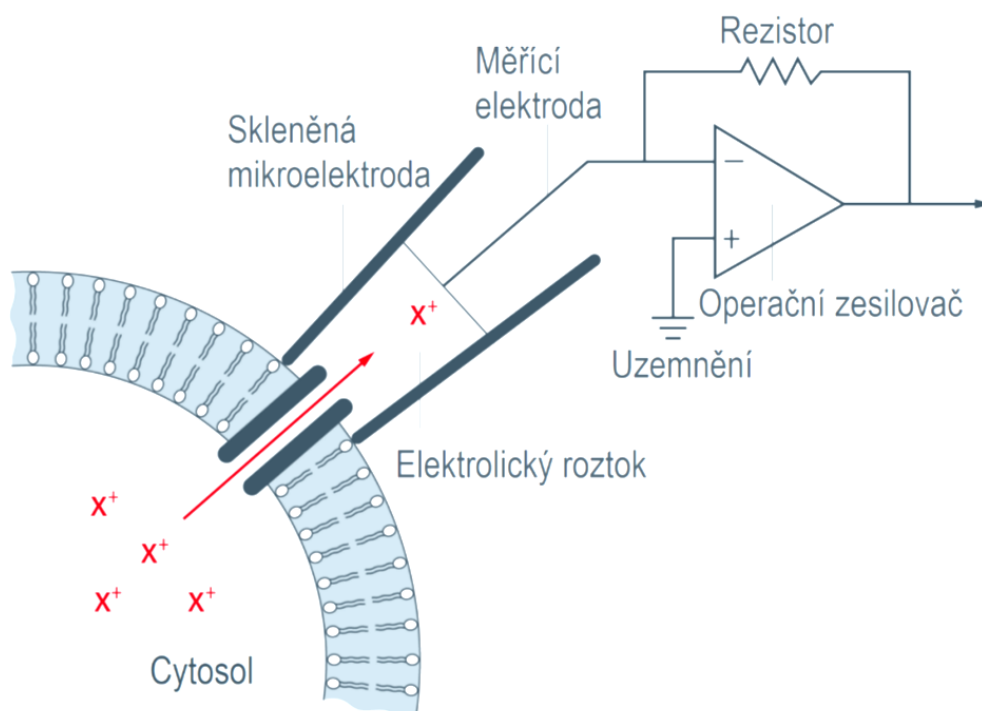
Následovala aplikace trávicího enzymu (kolagenáza A, 1 mg/ml, Roche Diagnostics GmbH) po dobu cca 35 min - čas se volí podle stáří pacienta a stavu srdce (lze se orientovat pohmatem natravované tkáně, která postupně měkne). Dále následovala opět aplikace Tyrodového roztoku s $0,06 \mu\text{M}$ CaCl_2 po dobu cca 10 min. Všechny roztoky byly syčené 100 % O_2 a zahřívány na teplotu 37°C , aby správně fungovaly trávicí enzymy.

Natravená tkáň byla odebrána do kádinek a pomocí nůžek nastříhaná na menší kousky. Směs byla přefiltrována přes jemná sítká. Získaná buněčná suspenze byla dále čištěna jak gravitačně (opakovaná sedimentace buněk v roztoku a odsátí supernatantu s doplněním čistého roztoku; provedeno dvakrát), tak za pomoci centrifugace (v posledním třetím kroku).

3.2 Metoda *patch clamp*

Metoda *patch clamp* neboli česky metoda terčíkového zámku (český termín se příliš neujal) je využívána k měření membránových proudů a napětí izolované buňky pomocí mikroelektrody. Je to jedna ze základních metod v buněčné fyziologii. Tato metoda má své kořeny již v letech 1976-1981, kdy ji představili světu Erwin Neher a Bert Sakmann. Za svůj objev získali v roce 1991 Nobelovu cenu. Podstatou této metody je to, že se skleněná mikroelektroda (někdy označovaná jako mikropipeta) s hrotem o průměru $0,5 - 1 \mu\text{m}$ přiblíží

k buněčné membráně, ke které zcela přilne a vytvoří se tak spojení s odporem v řádu $G\Omega$ (tzv. *gigaseal*).^[20]



Obrázek 4: Názorné zobrazení základní metody patch clamp. Převzato z ref. [20].

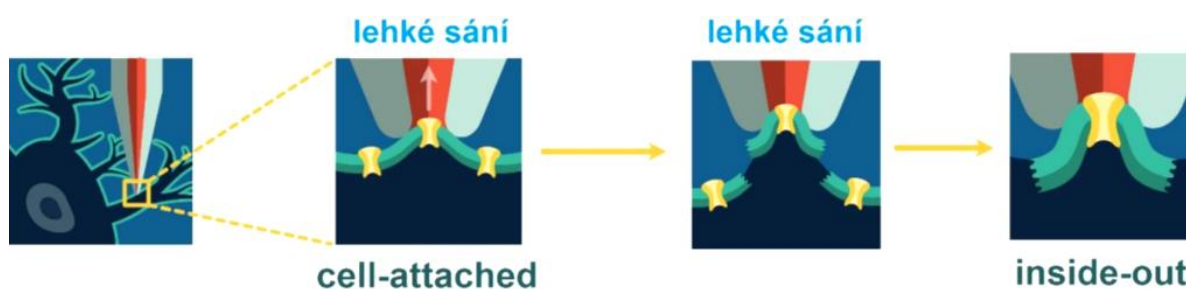
Na Obrázku 4 je schematicky zobrazeno uspořádání základní varianty metody *patch clamp*. Princip spočívá v elektrické izolaci malého kousku buněčné membrány od okolního prostředí a následné registraci proudů nebo napětí z měřeného úseku, případně i z celé buněčné membrány.^[20] To se provádí skleněnou mikrokapilárou, která se vyrábí pomocí tahače elektrod. Mikroelektroda, která je naplněná elektrolytem se pomocí mikromanipulátoru přiblíží k buněčné membráně. Díky vytvořenému podtlaku mezi buněčnou membránou a mikroelektrodou se membrána pevně přichytí. Toto přilnutí vyvolá prudký nárůst ohmického odporu (výše zmíněný *gigaseal*) a vymizení proudu mezi měřicí a referenční elektrodou. Proud kanály je zaznamenáván Ag/AgCl měřicí elektrodou (stříbrná elektroda pokrytá vrstvou chloridu stříbrného), která se nachází uvnitř skleněné mikroelektrody a je připojena k inventujícímu vstupu operačního zesilovače. Membránový proud o velikosti v řádu jednotek pA se uzavírá přes rezistor ve zpětné vazbě, takže napětí na výstupu operačního zesilovače sleduje jeho průběh.^[20] Vysoký odpor měřeného objektu je důležitý pro dokonalejší elektrickou izolaci buněčné membrány a také pro snížení šumu, který by mohl narušit dobré časové rozlišení registrovaných průběhů.^[20]

3.2.1 Konfigurace *patch clamp* techniky

Technika *patch clamp* byla od svého zavedení Neherem a Sakmannem vylepšena a modifikována pro různé aplikace v závislosti na cíli výzkumu. Je možno zkoumat iontové proudy procházející celou buňkou nebo i jednotlivými iontovými kanály. U každé

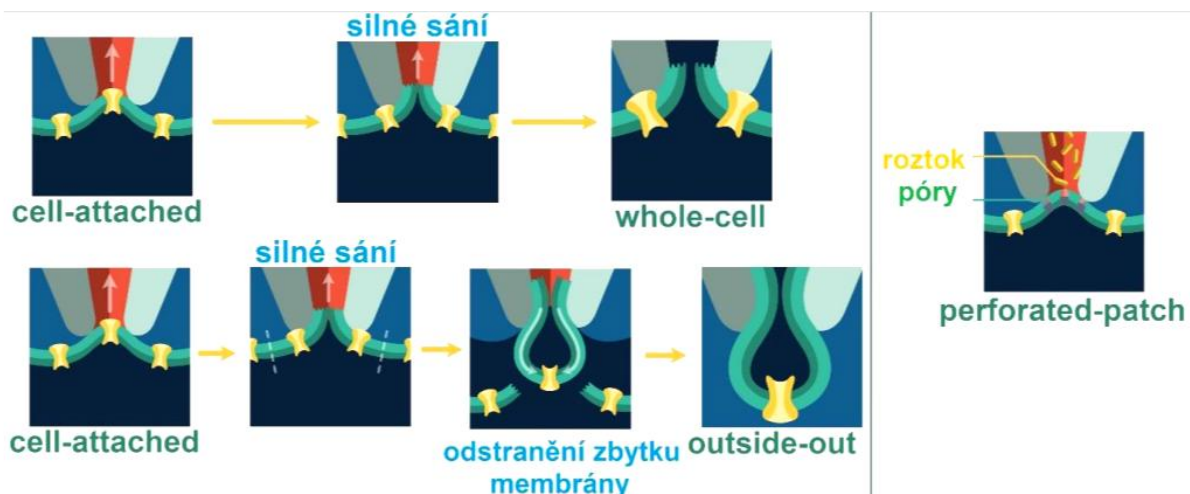
z modifikovaných technik je důležité nastolení stavu nazývaného *gigaseal* (viz výše). Jedná se o gigaohmové spojení buňky a elektrody. Během tohoto gigaohmového spojení jsou od sebe mikrokapilára a buněčná membrána vzdáleny pouze jeden nm. Běžně se používá pět modifikací metody *patch clamp* (Obr. 5 a 6: [20])

1. technika *cell-attached* - výhodou této techniky je jednoduchá realizace v porovnání s ostatními technikami; během této techniky zůstává buněčná membrána neporušena a zkoumá se pouze záznam proudů z jednoho jediného kanálu, který se nachází v okrsku buněčné membrány izolovaném měřicí mikroelektrodou;
2. technika *inside-out* – v tomto případě je hned po dosažení *gigaseal* elektroda od buněčné membrány prudce odtržena, útržek porušené membrány zůstává na špičce elektrody; touto metodou je možno zkoumat kanály ovládané vnitrobuněčným ligandem a je taktéž možno regulovat koncentraci tohoto ligandu pomocí změny externího roztoku;
3. technika *outside-patch* - vychází z metody *perforated-patch* (viz dále); u této metody je buněčná membrána zničena sáním; plusem je opět možnost ovlivnění koncentrace látek, tentokrát však z vnější strany buněčné membrány;



Obrázek 5: Technika *cell-attached* a z ní vycházející technika *inside-out*. Převzato z ref. [20].

4. technika *perforated-patch* - je zároveň modifikací techniky *whole-cell*; do mikrokapiláry je přidáno antibiotikum, tím je způsobeno narušení buněčné membrány a získání elektrického kontaktu a vnitřním prostředím buňky; nevýhodou této metody je ale sériový odpor, který zapříčiňuje šum, který ruší pozorování;
5. technika *whole-cell patch clamp* - lze ji provádět ve dvou režimech, a to buď v režimu vnuceného proudu (*current clamp*), kdy jsou membráně vnucovány proudové impulsy a je možné zaznamenat napěťovou odpověď membrány (akční napětí), nebo v režimu vnuceného napětí (*voltage clamp*), kdy jsou membráně naopak vnuceny napěťové impulsy a zkoumáme její proudové odezvy; tuto metodu jsem využila ve své práci jako techniku k měření, a proto se jí budu ještě podrobněji věnovat dále v kapitole 4.1.



Obrázek 6: Technika cell-attached, whole-cell, outside-out a perforated-patch. Převzato z ref. [20].

3.3 Analýza dat

Naměřené hodnoty byly zpracovány a ze záznamů proudů byly analyzovány velikosti proudu (nA) na konci aplikovaného stimulačního impulzu na -110 mV v ustáleném stavu v daném roztoku. Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr \pm střední chyba průměru ze tří naměřených buněk s pomocí programů Clampfit (*Molecular Devices*, San José, CA, USA) a OriginPro (verze 8.5.1; *OriginLab Corporation*). Pomocí programu OriginPro byla následně provedena i statistická analýza získaných výsledků (párový Studentův t-test).

4. Praktická část

Cílem této studie bylo zjistit vliv účinné látky aminofylinu ve vybraných klinicky relevantních koncentracích na Kir proud I_{K1} lidských srdečních buněk. K tomu bylo potřeba nejdříve buňky izolovat. Izolace byla provedena z volné stěny levé komory srdce pacienta v konečném stádiu srdečního selhání, kterému bylo transplantováno srdce zdravého dárce, a proběhla tak, jak je popsáno v kapitole 3.1. Následně byly pro měření technikou *patch-clamp* použity srdeční buňky tyčinkovitého tvaru s dobře patrným příčným pruhováním. V našem případě se jednalo o modifikaci *whole-cell patch clamp*, přesněji o *voltage clamp* tedy metodu vnuceného napětí.

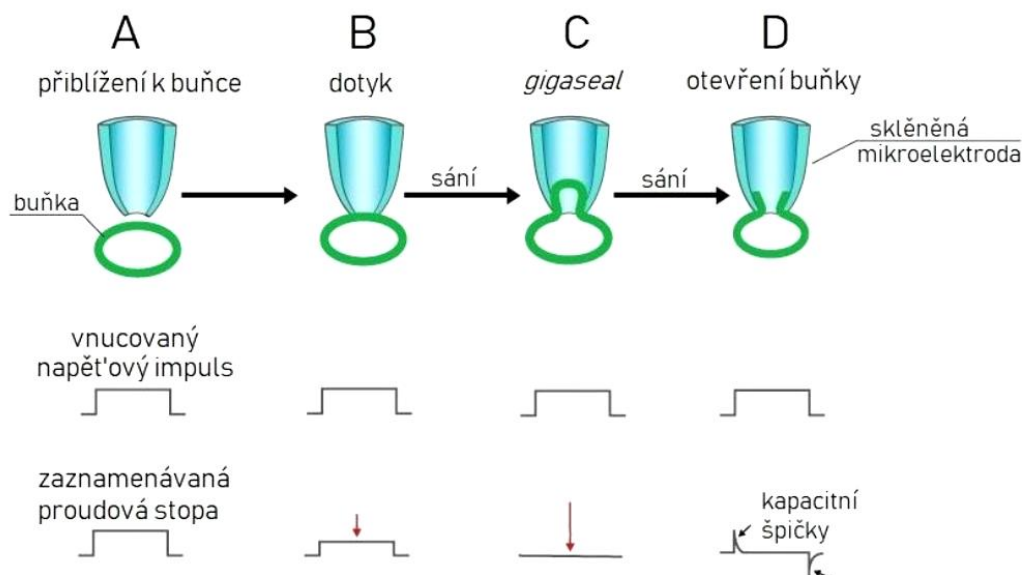
4.1 Měření technikou *whole-cell patch clamp*

Celé měření bylo prováděno na elektrofyziologickém pracovišti. Jeho základem je Faradayova klec, která chrání měřicí zařízení před elektromagnetickým polem z okolí. Měřicí aparatura se skládá z invertovaného mikroskopu, pomocí kterého jsou vybírány buňky k měření, a kontroluje se, zda je mikroelektroda ve správné pozici. Nachází se zde také makromanipulátor a mikromanipulátor potřebné pro ovládání pozice mikroelektrody. K omývání buněk roztoky slouží perfuzní systém složený ze stříkaček, ventilů a silikonových hadiček a rovněž z úzké koncovky, kterou je možné umístit do těsné blízkosti měřené buňky, což umožňuje rychlou výměnu roztoku v okolí měřené buňky (do 2 s). Složení základního Tyrodova roztoku bylo již popsáno v kapitole 3.1. Během měření tento roztok navíc obsahuje 0,9 mM CaCl_2 , případně další složky dle požadavků konkrétního pokusu. Aplikované roztoky jsou z měřicí komůrky odsávány pomocí peristaltické pumpy. Měřicí komůrka se nachází na pracovním stolku mikroskopu. Do ní byla před měřením umístěna suspenze izolovaných lidských buněk (izolace - viz kapitola 3.1). V komůrce se rovněž nachází kovová referenční elektroda. Metoda *patch clamp* vyžaduje stabilní pracoviště, aby mohlo dojít k pevnému kontaktu mezi buňkou a mikroelektrodou. Proto se celá aparatura nachází na antivibračním stole. Měření touto technikou by také nemohlo být realizováno bez počítače s monitorem, který je přes zesilovač a převodník dat propojen s měřicí elektrodou (Axopatch 200B equipment and pCLAMP 9.2 software; *Molecular Devices*, San José, CA, USA).

Kontakt s intracelulárním prostředím buňky zajišťují mikroelektrody z borosilikátového skla vytvořené programovatelným horizontálním tahačem z mikrokapilár přímo v laboratoři. Programovatelný tahač mikrokapilár (*Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH*, Martinsried, Germany) funguje tak, že se střed vložené kapiláry nahřeje a následně se řízenou silou kapilára natáhne až k přetržení. Vzniknou tak dvě identické mikroelektrody. S vyrobenými mikroelektrodami je následně důležité manipulovat velmi opatrně, aby nedošlo k poškození jejich tenkého hrotu nebo k jejich znečištění.

Pokus byl zahájen tím, že se do roztoku v měřicí komůrce pomocí mikromanipulátoru ponořila předem naplněná mikroelektroda (složení roztoku pro plnění měřicí mikroelektrody v mM: L-aspartát 120, KCl 15, MgCl_2 1, K_2ATP 5, EGTA 1, HEPES 5, GTP 0,1, Na_2 -kreatinfosfát 3; pH bylo korigováno na 7,25 přidáním KOH) a pomalu se za mikroskopické kontroly přiblížila ke zvolené buňce. Jakmile došlo k dotyku mikroelektrody a buněčné

membrány, došlo ke zvýšení ohmického odporu a zároveň klesla proudová odezva na aplikovaný napěťový impuls. Následně se pomocí injekční stříkačky sáním vytvořil lehký podtlak, díky kterému se k sobě buněčná membrána a vnitřní stěna mikroelektrody přichytily. Během *gigaseal* došlo k vymizení veškerého proudu (Obr. 7). Protržení buněčné membrány uvnitř měřicí mikroelektrody se uskutečnilo opět v důsledku sání a podtlaku. Nastal tak moment, kdy bylo dosaženo přímého kontaktu s intracelulárním prostředím buňky. [20]



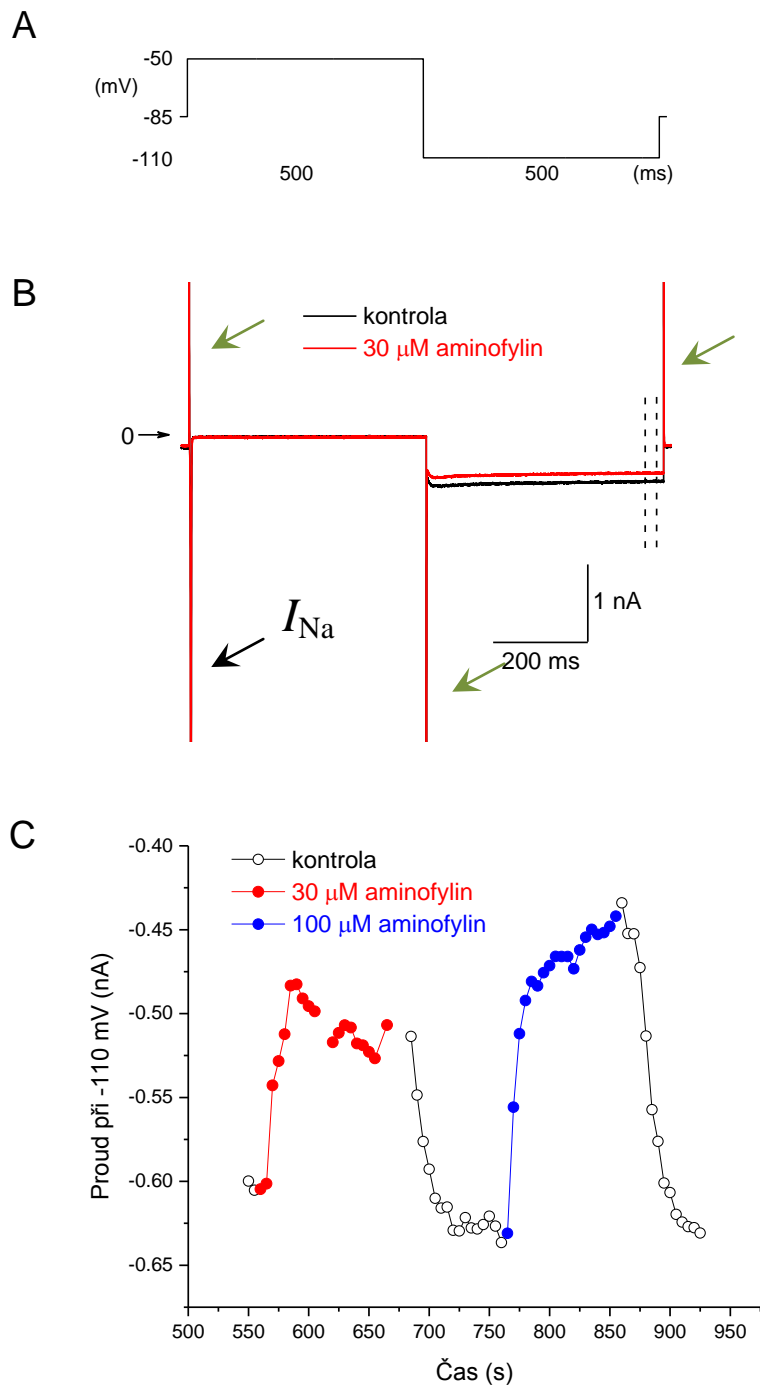
Obrázek 7: Jednotlivé kroky techniky whole-cell patch clamp. Převzato z ref. [20].

Buňce byly následně vnučovány předem zvolené napěťové impulzy, což umožnilo měření iontového membránového proudu přes zvolený iontový kanál (*voltage-clamp*). Měření byla provedena při teplotě 37°C.

4.2 Výsledky: Vliv aminofylinu na I_{K1} u lidských srdečních buněk

V rámci této studie byly do blízkosti měřených lidských srdečních buněk jednotlivě aplikovány tři různé koncentrace účinné látky aminofylinu, konkrétně 10, 30 a 100 μM . Velikost kontrolního proudu I_{K1} byla zjišťována během oplachu měřené buňky základním Tyrodovým roztokem, jak před, tak po aplikaci dané koncentrace aminofylinu. Stimulační protokol byl tvořen dvěma napěťovými impulzy trvajících 500 ms, prvním na -50 mV a druhým na -110 mV, které byly měřené buňce vnučeny z klidového napětí -85 mV každých 5 s (Obr. 8A). I_{K1} byl odečítán jako průměrný proud na konci impulsu na -110 mV, jak je naznačeno svislými čárkovanými čarami na Obr. 8B.

Kromě I_{K1} je na Obr. 8B možné vidět i tzv. kapacitní proud, vždy na začátku a na konci napěťového impulsu (na obrázku vyznačeno zelenými šipkami), který je dán vybíjením kapacity buněčné membrány, která se chová jako kondenzátor. Dále je na začátku prvního impulsu zobrazen i sodíkový depolarizační proud I_{Na} . Vápníkový proud I_{Ca} byl během prováděných měření blokován specifickým blokátorem, konkrétně ionty kobaltu (Co^{2+} , 2 mM).



Obrázek 8:

A: Napěťový impuls aplikovaný během měření.

B: Originální záznam proudu přes Na^+ kanál (I_{Na}) a přes zkoumaný I_{K1} kanál (proud během druhého impulzu mezi svislými čárkovanými čarami). Zelené šipky vyznačují tzv. kapacitní proud (více viz text).

C: Graf ukazuje změny velikosti I_{K1} v čase závisící na přidání účinné látky (aminofylinu) a výplachu (kontrola) u reprezentativní buňky. Působením aminofylinu se velikost I_{K1} snižovala (negativní proud, takže pokles

směrem nahoru, k 0). Během výplachu se velikost I_{K1} zvyšovala zhruba zpět na původní úroveň, takže blokáda byla vratná.

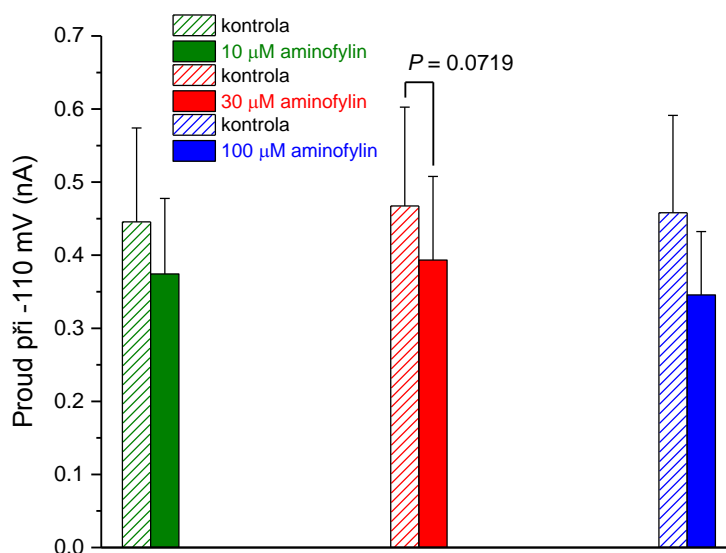
Obrázek 8C ilustruje změny velikosti I_{K1} u reprezentativní měřené buňky v čase, po aplikaci účinné látky (aminofylin) a při jejím výplachu kontrolním roztokem (kontrola).

Aminofylin v koncentracích 30 a 100 μM I_{K1} částečně blokoval (při -110 mV jde o negativní proud, takže křivka směřuje nahoru, směrem k 0). Blokáda I_{K1} způsobená aminofylinem byla reverzibilní, tj. během výplachu docházelo k navrácení proudu zhruba zpět na původní velikost.

4.2.1 Změny I_{K1} po aplikaci aminofylinu

Obrázek 9 znázorňuje průměrné hodnoty velikosti I_{K1} při -110 mV (v absolutních hodnotách; při -110 mV je I_{K1} negativním proudem směřujícím do buňky – Obr. 8), jak v odpovídající kontrole, tak v ustáleném stavu po aplikaci aminofylinu ve všech třech zkoumaných koncentracích. Výsledná data pro vytvoření tohoto grafu byla sestavena z průměrů jednotlivých hodnot všech tří zkoumaných buněk. Výsledky vztahující se k jednotlivým koncentracím jsou odlišeny barvou panelů.

Ve všech koncentracích aminofylinu došlo k poklesu velikosti I_{K1} oproti odpovídající kontrole. Vzhledem k malému počtu dat (3 buňky) nebyly změny signifikantní ($P < 0.05$ ve všech případech). Změna velikosti I_{K1} v přítomnosti 30 μM aminofylinu se k hranici statistické významnosti blíží ($P = 0,0719$; prostřední panel). Proto předpokládám, že navýšení počtu dat by prokázalo signifikantní změny I_{K1} , minimálně v přítomnosti 30 μM aminofylinu.



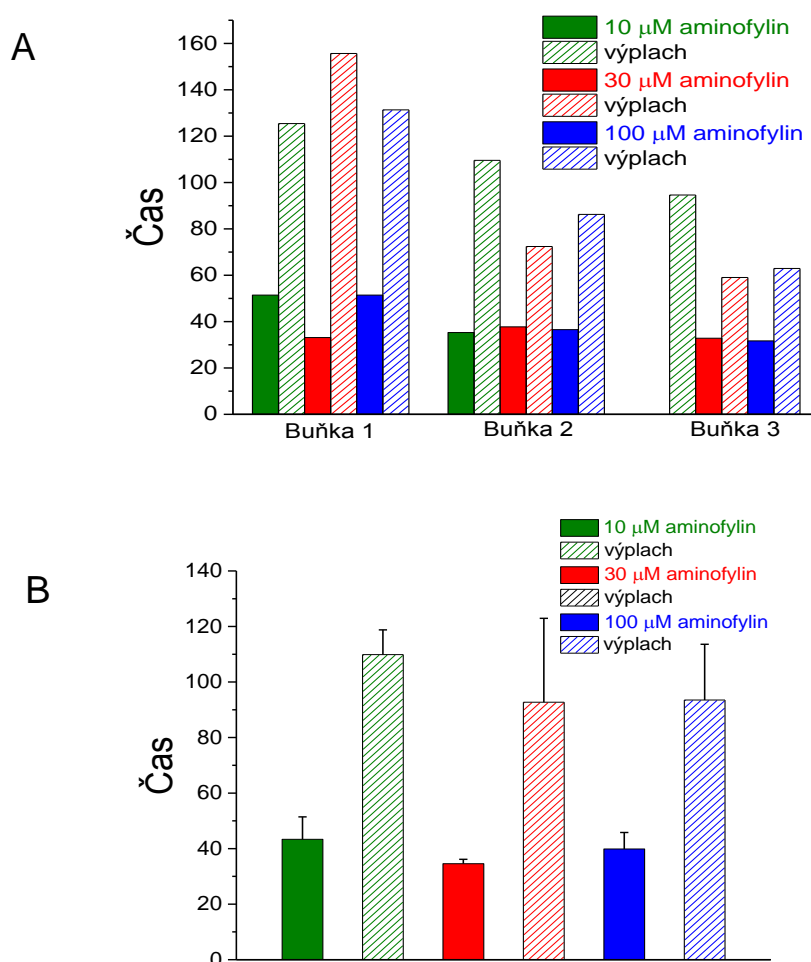
Obrázek 9: Graf změn velikosti I_{K1} (v absolutních hodnotách) v závislosti na koncentraci aplikované účinné látky.

4.2.2 Čas nástupu a ústupu účinku aminofylinu na I_{K1}

Nástup účinku aminofylinu a jeho ústup při výplachu byli rychlé (Obr. 8C). Během aplikace tří koncentrací aminofylinu do tří buněk jsme pozorovali určité rozdíly mezi jednotlivými časy nástupu a ústupu účinků aminofylinu (Obr. 10A). Když jednotlivé hodnoty vážící se ke koncentracím zprůměrujeme, dostaneme výsledné průměrné hodnoty nástupů a ústupů účinků aminofylinu (Obr. 10B).

Průměrná hodnota časového intervalu nástupu účinku 10 μM aminofylinu (do dosažení ustáleného stavu) byla 43,4 s, 30 μM aminofylinu 34,6 s a 100 μM aminofylinu 39,8 s. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi časy nástupu jednotlivých koncentrací aminofylinu (*repeated measures ANOVA test*). Čas nástupu účinku se tedy nezdá být na aplikované koncentraci aminofylinu závislý.

Hodnota doby ústupu účinku během následného výplachu 10 μM aminofylinu byla 109,8 s, 30 μM aminofylinu 92,7 s a 100 μM aminofylinu 93,5 s. I zde nebyly průměrné hodnoty signifikantně různé, takže rychlost výplachu nezávisí na aplikované koncentraci aminofylinu.



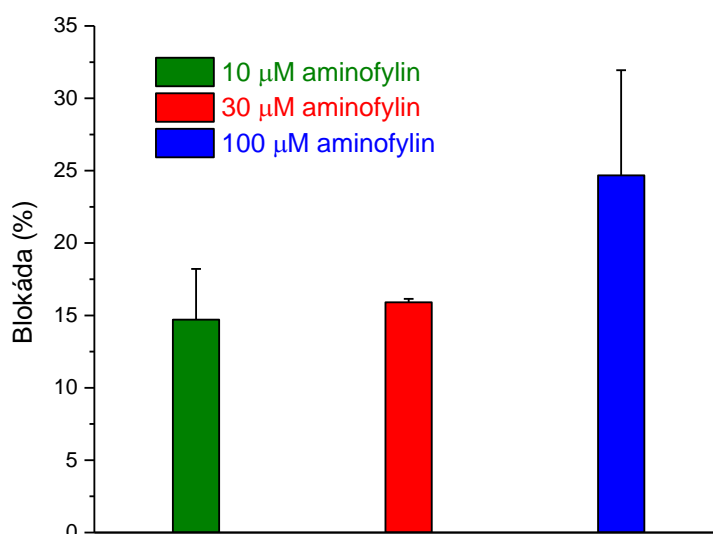
Obrázek 10: Časy nástupů a ústupů účinků aminofylinu

A: Graf znázorňuje časové intervaly nástupů účinků různých koncentrací látky (aminofylinu) a časové intervaly ústupů účinků během výplachu této látky v jednotlivých měřených buňkách.

B: Zprůměrované hodnoty času nástupu účinku účinné látky (aminofylinu) a výplachu všech tří buněk.

4.2.3 Blokáda I_{K1} aminofylinem

Průměrná blokáda I_{K1} u všech 3 měřených buněk byla 14,7, 15,9 a 24,7 % při aplikaci aminofylinu v koncentracích 10, 30, resp. 100 μM .



Obrázek 11: Průměrná blokáda I_{K1} účinkem 10, 30 a 100 μM aminofylinu u lidských srdečních buněk.

5. Diskuse: Možné důsledky vlivu aminofylinu na I_{K1}

Jak je obecně známo, draslíkové Kir kanály se významně podílejí na průběhu akčního napětí, konkrétně zejména na udržování klidového membránového napětí a na konečné repolarizaci srdeční buňky. Lze proto předpokládat, že jejich narušením dochází k pozměnění elektrofyziologie buňky. Tímto narušením chápou například ve výsledcích zmíněnou blokádu I_{K1} , kterou jsme pozorovali po aplikaci 10 – 100 μM aminofylinu u lidských srdečních buněk (terapeutická plazmatická koncentrace se pohybuje mezi 24 - 48 μM [3]). Výsledné narušení elektrické činnosti srdeční buňky by mohlo případně vyvolat až poruchu srdečního rytmu (arytmii). Pozorovaná blokáda I_{K1} by konkrétně mohla vést k depolarizaci klidového membránového napětí a k prodloužení akčního napětí, což by mohlo přispívat k rozvoji arytmií. Skutečný vliv aminofylinu na klidové a akční napětí srdečních buněk bude potřeba prověřit v dalších pokusech.

6. Závěr

Předložená práce je zaměřená na analýzu vlivu léčiva aminofylinu na proud I_{K1} u lidských srdečních buněk. Cílem první kapitoly práce je seznámit čtenáře s problematikou akčního napětí srdečních buněk, elektrickými vlastnostmi pracovního myokardu a zkoumanými K^+ kanály. V druhé části práce se již přistupuje k objasnění metodiky práce (izolace srdečních buněk a metoda *patch clamp*) a k charakteristice účinné látky aminofylinu. Následuje praktická část, která je zaměřená a práci s lidskými buňkami a měření metodou *whole-cell patch clamp*, přesněji o měření modifikací *voltage clamp* tedy metodou vnuceného napětí. Naměřená data byla analyzována a zpracována do grafů. Výsledkem práce a odpovědí na otázku, zdali a jak ovlivňuje aminofylin I_{K1} je fakt, že všechny tři aplikované koncentrace aminofylinu v rozmezí 10 až 100 μM I_{K1} blokovaly. Z toho můžeme usoudit, že účinná látka aminofylin může v klinicky relevantních koncentracích ovlivnit elektrofyzilogii buňky, a tak narušit procesy, které v ní probíhají. I_{K1} kanály se podílejí na repolarizaci srdeční buňky během průběhu akčního napětí a rovněž na udržování jejího stabilního klidového membránového napětí ve výrazně negativních hodnotách (kolem -80 až -90 mV). Aminofylin může tedy svým vlivem na I_{K1} tyto procesy velmi pravděpodobně narušit. Tím se může stát zodpovědným za vznik arytmogenních poruch, kterým jsem se věnovala v úvodu práce.

Seznam literatury

1. Aminofylin. In: *Linkos (Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně)* [online]. Praha: Ambit media [cit. 2020-02-07]. ISSN 2570-8791. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/aminofyllin-ucinna-latka/>
2. Příbalový leták léku Syntophyllin, BB Pharma a.s., Durychova 101/66, 142 00 Praha 4, Česká republika, 2018
3. Nuno Jorge Dourado Ramalho, Markéta BÉBAROVÁ a Olga ŠVECOVÁ. *DUAL EFFECT OF AMINOPHYLLINE ON INWARD RECTIFIER POTASSIUM CURRENT*. Brno, Czech Republic, 2019. Konferenční abstrakt. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University.
4. Poruchy srdečního rytmu. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: 1. lékařská fakulta a Univerzity Karlovy, 2018 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Poruchy_srde%C4%8Dn%C3%ADho_rytmu
5. Elektrokardiografie. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: 1. lékařská fakulta a Univerzita Karlova, 2018 [cit. 2019-02-14]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrokardiografie>
6. Holterovské monitorování. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: 1. lékařská fakulta a Univerzita Karlova, 2018 [cit. 2019-02-14]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Holterovsk%C3%A9_monitorov%C3%A1n%C3%AD
7. Elektrofyzilogické vyšetření. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: 1. lékařská fakulta a Karlova Univerzita, 2017 [cit. 2019-02-14]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Elektrofyzilogick%C3%A9_vy%C5%A1et%C5%99en%C3%AD
8. Antiarytmika. ŠTEJFA, DRSC., FESC, Prof. MUDR. Miloš a kol. *Kardiologie*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007, s. 292-303. ISBN 9788024713854.
9. Kardiovaskulární terapie. ŠTEJFA, DRSC., FESC, Prof. MUDR. Miloš a kol. *Kardiologie*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007, s. 333-352. ISBN 9788024713854.
10. Radiofrekvenční katérová ablace. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: 1. lékařská fakulta a Karlova Univerzita, 2014, s. - [cit. 2019-02-19]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Radiofrekven%C4%8Dn%C3%AD_kat%C3%A9rov%C3%A1_ablace
11. ŠTEJFA, DRSC., FESC, Prof. MUDR. Miloš a kol. Vedoucí příznak: arytmie, palpitace. *Kardiologie*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007, s. 566-603. ISBN 9788024713854.

12. KAUTZNER, prof. MUDr Josef. Poruchy srdečního rytmu- Arytmie. *IKEM (Institut klinické a experimentální medicíny)* [online]. Praha: IKEM, - [cit. 2019-12-22]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/poruchy-srdecniho-rytmu-arytmie/a-398/>
13. Převodní systém srdeční. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, 2008 [cit. 2019-12-25]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/P%C5%99evodn%C3%AD_syst%C3%A9m_srde%C4%8Dn%C3%AD
14. Srdeční sval. GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vydání. Praha: Galén, c2005, s. 79-83. ISBN 80-7262-311-7.
15. TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
16. Akční potenciál srdce. In: *Pathway Medicine* [online]. USA: Pathway Medicine, - [cit. 2020-01-28]. Dostupné z: <http://www.pathwaymedicine.org/cardiac-action-potential-cellular-basis>
17. ROKYTA, Richard. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.
18. Řez K⁺ kanálem. In: *Wikipedia* [online]. San Francisco, 2018 [cit. 2020-01-28]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Drasl%C3%ADkov%C3%BD_kan%C3%A1l
19. Jalife J. Dynamics and Molecular Mechanisms of Ventricular Fibrillation in Structurally Normal Hearts. *Card Electrophysiol Clin* 2016;8:601-612.
20. KACHAN, Ksenia. *Závislost velikosti proudu IKs kanálu srdce na stimulaci*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/118366>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce doc. MUDr. Markéta Bébarová, Ph.D.

Seznam obrázků

Obr. 1: Převodní systém srdeční a jeho části.....	13
Obr. 2: Průběh akčního napětí srdečních buněk v základních třech fázích.....	14
Obr. 3: Řez draslíkovým kanálem.....	15
Obr. 4: Názorné zobrazení základní metody <i>patch clamp</i>	17
Obr. 5: Technika <i>cell-attached</i> a z ní vycházející technika <i>inside-out</i>	18
Obr. 6: Technika <i>cell-attached</i> , <i>whole-cell</i> , <i>outside-out</i> a <i>perforated-patch</i>	19
Obr. 7: Jednotlivé kroky techniky <i>whole-cell patch clamp</i>	21
Obr. 8: Aplikovaný napěťový impuls, originální záznam proudu a graf ukazující změny velikosti I_{K1}	22
Obr. 9: Graf změn velikosti I_{K1} v závislosti na koncentraci aplikované účinné látky.....	23
Obr. 10: Časy nástupů a ústupů účinků aminofylinu.....	24
Obr. 11: Průměrná blokáda I_{K1} účinkem 10, 30 a 100 μM aminofylinu u lidských srdečních buněk.....	25