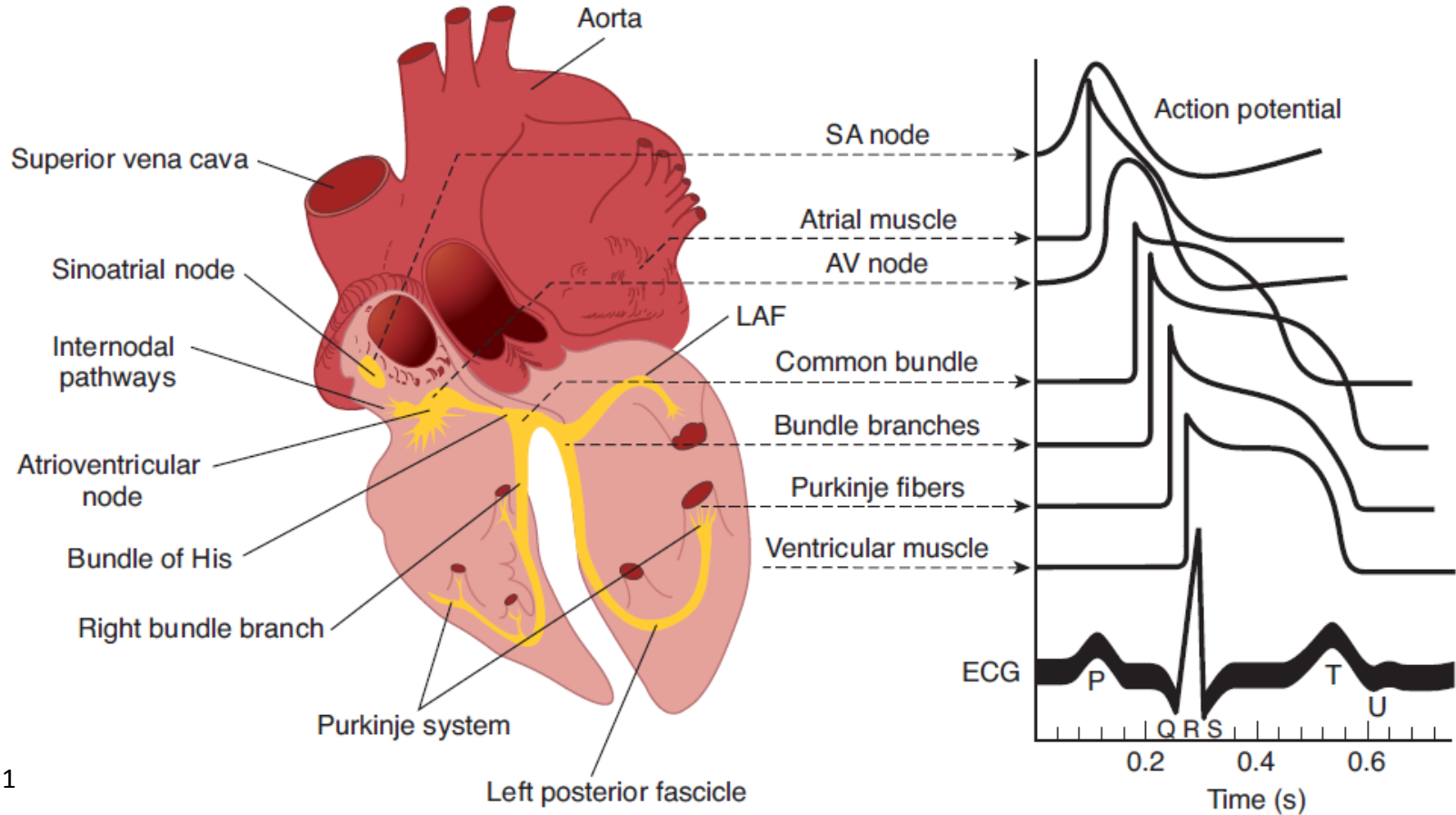


Iontový podklad akčního napětí srdečních buněk

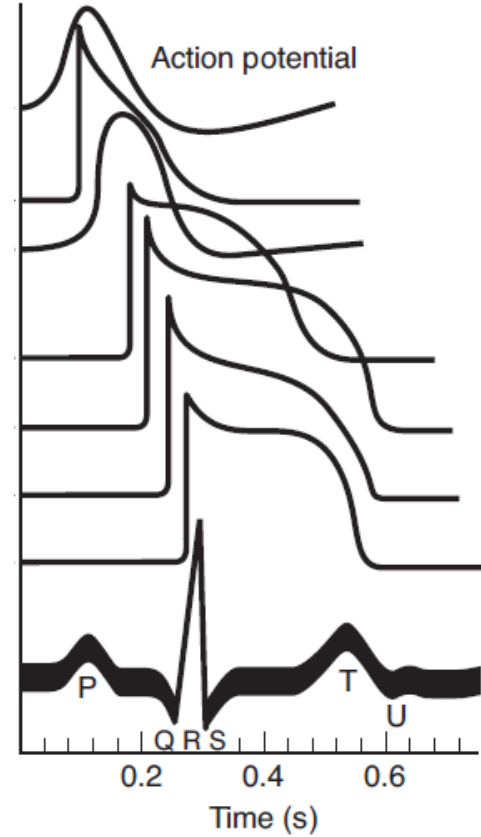
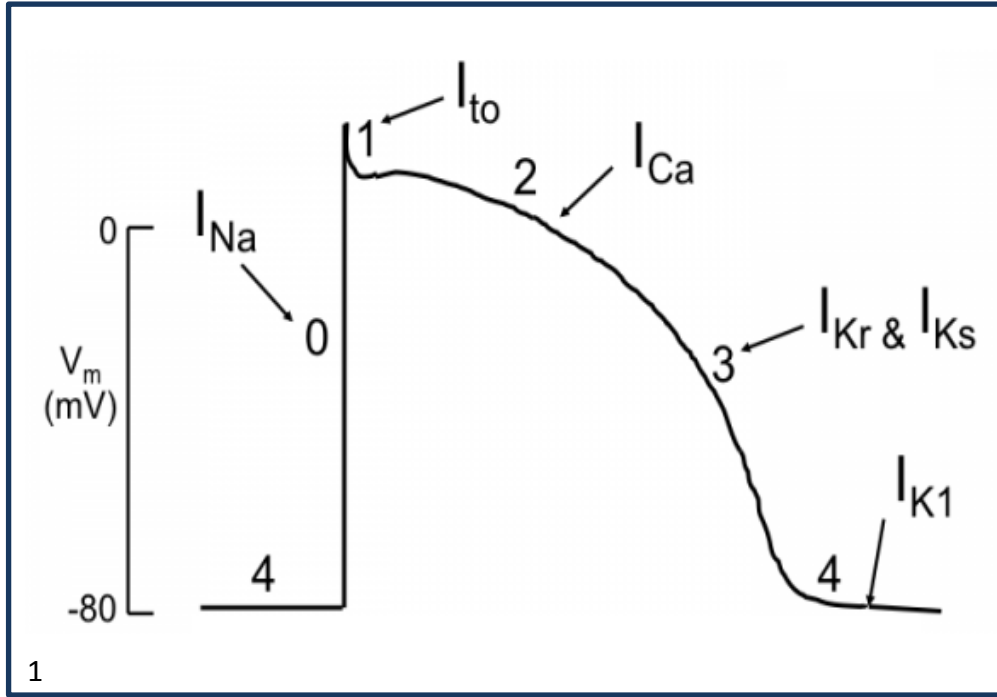
Metodiky, fyziologie a vybrané patologie

Doc. MUDr. Markéta Bébarová, Ph.D.

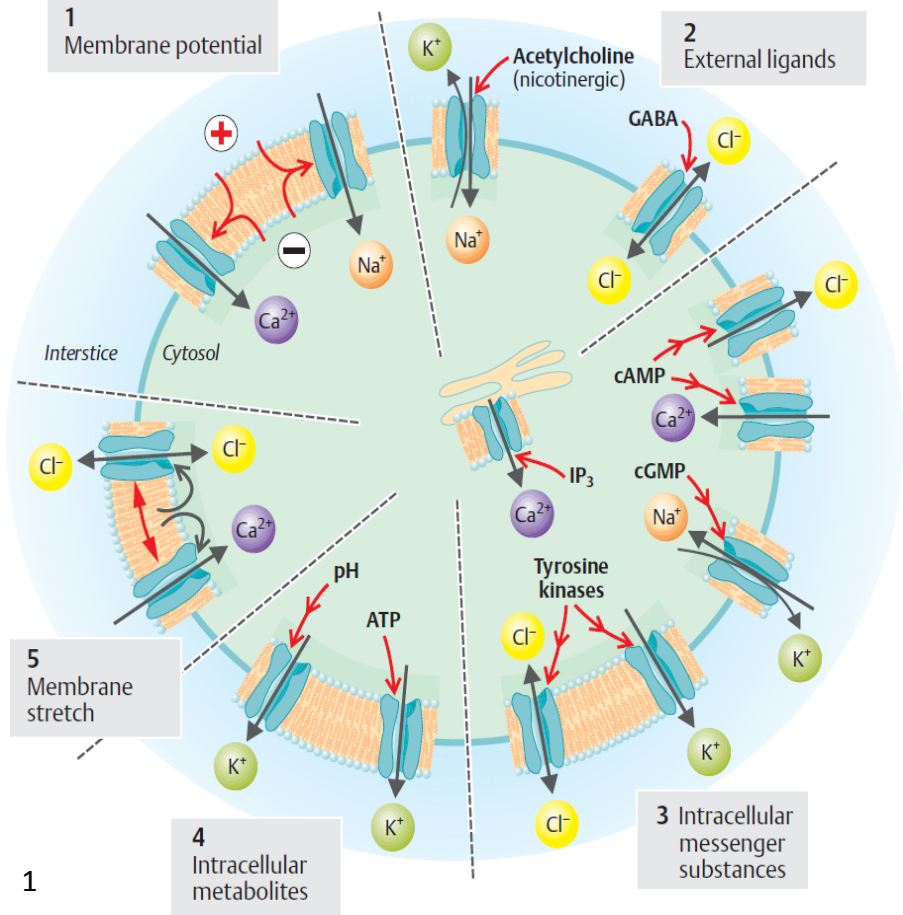
Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita



1



Iontové kanály



Význam znalostí elektrických vlastností srdečních buněk pro klinickou medicínu

- **Dědičné arytmogenní syndromy**
- **Získané arytmogenní syndromy**
 - Na podkladě jiných základních onemocnění srdce
 - Vedlejší účinky farmak
 - Účinky jiných látek, včetně látek návykových
- **Náhlá srdeční smrt**
- **Mechanismy účinku antiarytmik**

Elektrofyzilogické metody v kardiologii

Měření může probíhat:

1. Na úrovni celého organismu
Příklad: *EKG*
2. Na úrovni srdce
Příklad: *Intrakardiální EKG*
3. Na izolovaném srdci
Příklad: *Perfuze srdce dle Langendorffa*
4. Na částech srdeční tkáně
Příklad: *Měření na multiceulárních preparátech*
5. Na izolovaných srdečních buňkách
Příklad: *Technika patch clamp při měření z celé buňky (whole cell patch clamp)*
6. Na jednotlivých membránových kanálech
Příklad: *Technika patch clamp při měření z jediného kanálu (single channel patch clamp)*

Elektrofyzilogické metody v kardiologii

Měření může probíhat:

1. Na úrovni celého organismu
Příklad: *EKG*
2. Na úrovni srdce
Příklad: *Intrakardiální EKG*
3. Na izolovaném srdci
Příklad: *Perfuze srdce dle Langendorffa*

Princip:

- Měříme rozdíl potenciálu mezi dvěma body objemového vodiče.
- Měřenou veličinou je **napětí**.
- Registrované signály představují součet příspěvků elektrické aktivity jednotlivých buněk sledovaného orgánu při šíření elektrického vzruchu

Elektrofyzilogické metody v kardiologii

Měření může probíhat:

4. Na částech srdeční tkáně

Příklad: *Měření na multicelulárních preparátech*

5. Na izolovaných srdečních buňkách

Příklad: *Technika patch clamp při měření z celé buňky (whole cell patch clamp)*

6. Na jednotlivých membránových kanálech

Příklad: *Technika patch clamp při měření z jediného kanálu (single channel patch clamp)*

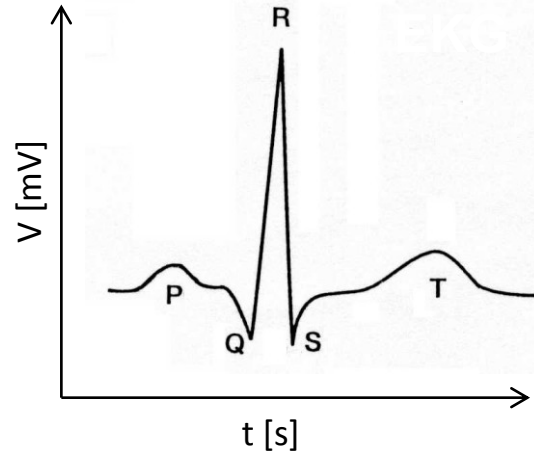
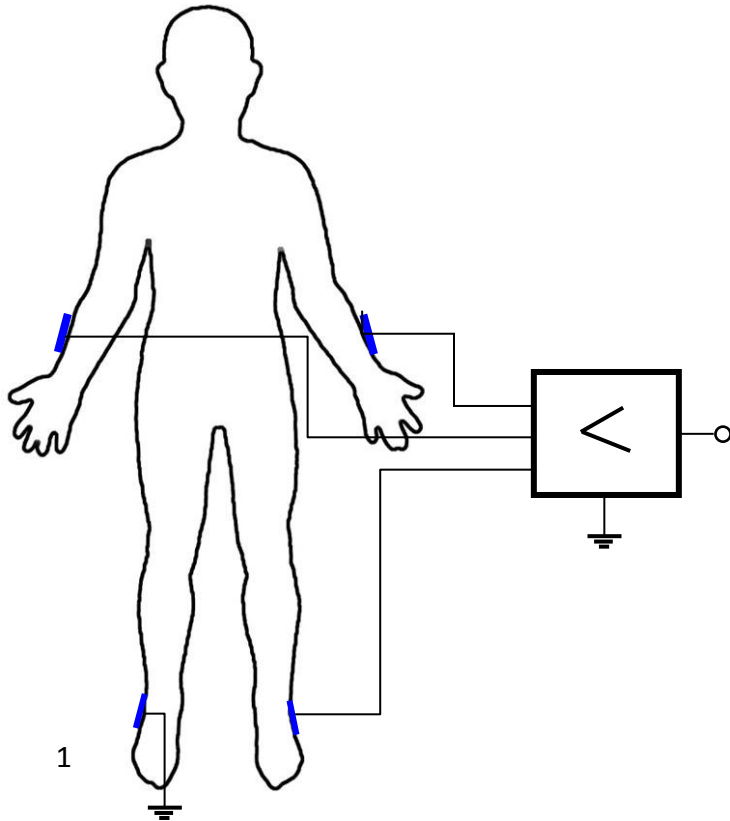
Princip:

→ Měříme **membránové napětí**, což je rozdíl mezi extra- a intracelulárním prostředím, nebo **membránový proud**.

Základní principy měření na jednotlivých úrovních

Elektrokardiografie

Registrujeme rozdíl potenciálů,
tedy **napětí**, a jeho změny v **čase**



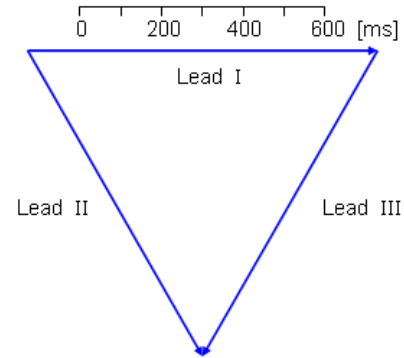
Elektrokardiografie

Přesný mechanismus vzniku

Elektrokardiografie

Přesný mechanismus vzniku

SINUS NODE
0 ms



Intrakardiální elektrokardiografie

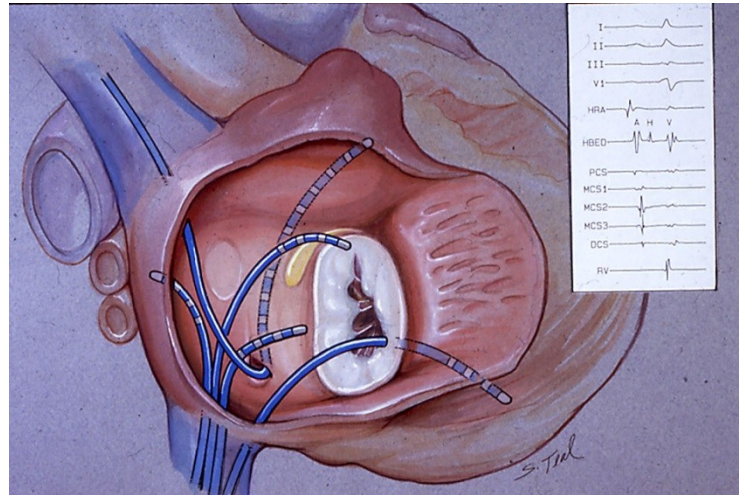
→ Invazivní metoda, která je používaná v klinice

→ **Princip:**

Zavedení katetru intrakardiálně, do těsné blízkosti převodního systému.
Ze zakončení katetru je snímán signál.



1. Multipolární katetr



2. Umístění katetru v srdci včetně ukázky záznamu

Intrakardiální elektrokardiografie

Lze měřit:

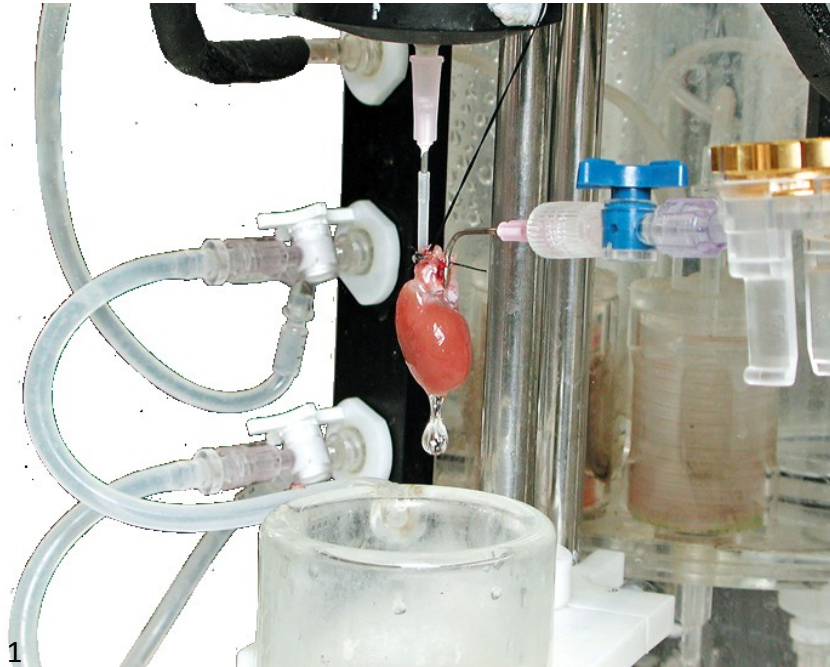
- Funkci sinusového uzlu
- Vedení v síních
- Vedení AV uzlem
- Vedení Hissovým svazkem
- Vedení Purkyňovými vlákny



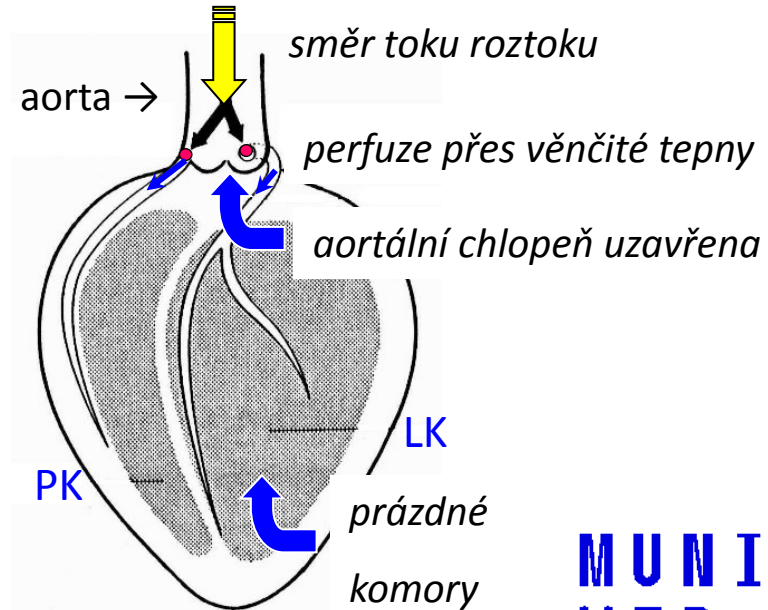
Ukázka elektrogramu
Hissova svazku

Měření na izolovaném srdci

- Experimentální metoda
- Srdce je umístěno do Langendorffova perfuzního zařízení:



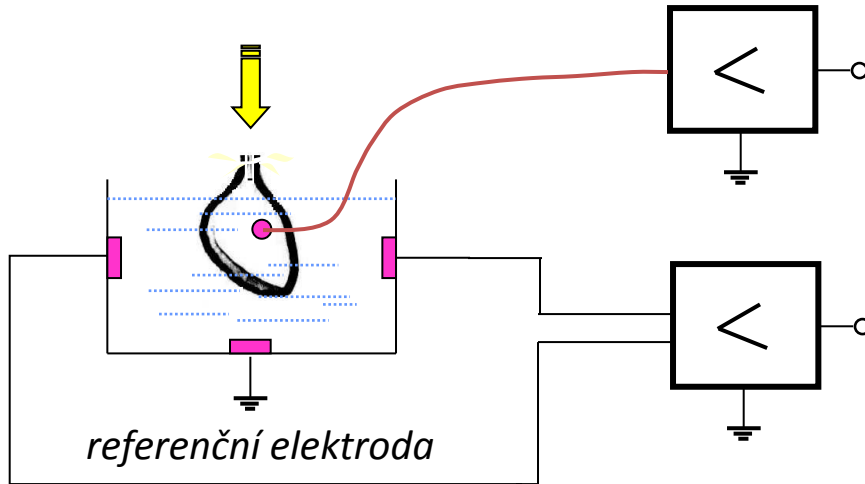
Princip retrográdní perfuze



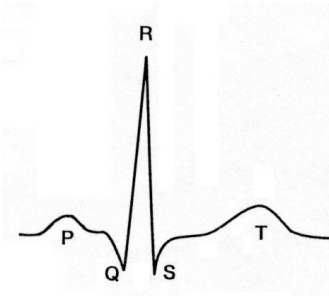
Měření na izolovaném srdci

Měření se provádí pomocí:

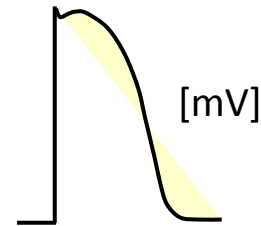
1. Elektrod zabudovaných v lázniče



2. Epikardiální přísavné elektrody



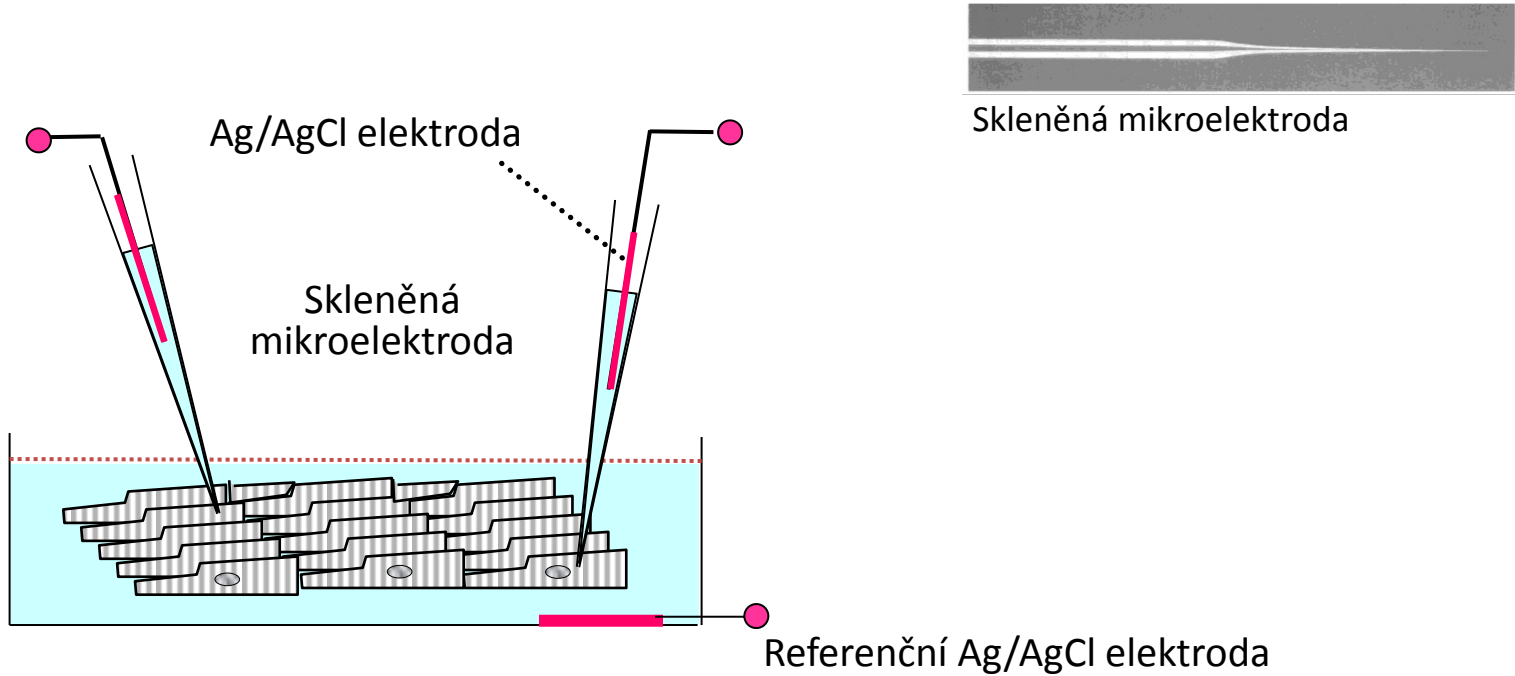
Elektrogram



Monofazický akční
potenciál

Měření na multiceulárních preparátech

Uspořádání aparatury



Měření na multiceulárních preparátech

- Pro měření je nutná **stimulace preparátu**
- Může probíhat ve dvou režimech:

metoda vnuceného proudu
current clamp

metoda vnuceného napětí
voltage clamp

Stimulace

Registrovaná odpověď

Patch-clamp

- Technika **patch-clamp** při měření z celé buňky (*whole cell*) i z jediného kanálu (*single channel*) vyžadují k měření izolované srdeční buňky.
- Izolaci získáme tak frakci živých, funkčně nepoškozených buněk, které odpovídají na elektrickou stimulaci:
 - **Kontrakcí**
 - **Elektrickou aktivitou** (akčním napětím a membránovými proudy)

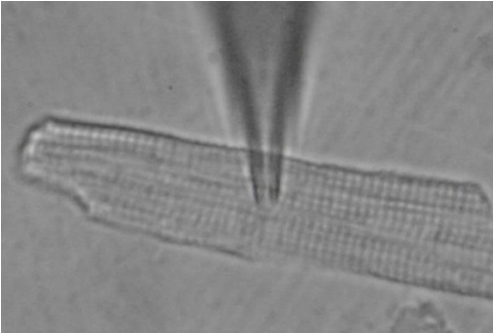
Patch-clamp

Enzymatická izolace srdečních buněk:

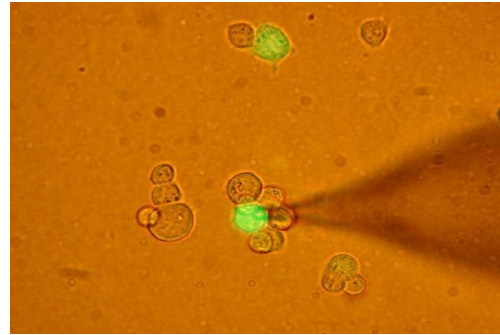
Možnosti využití *patch-clampu*

Měření lze provádět na:

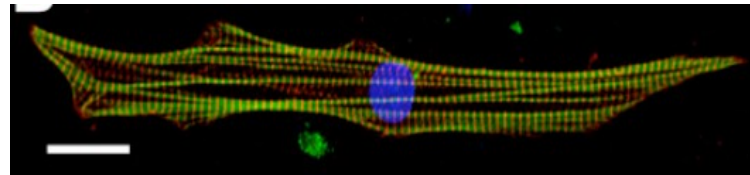
1. Izolovaných srdečních buňkách



2. Buněčné linii, která přechodně exprimuje lidské iontové kanály



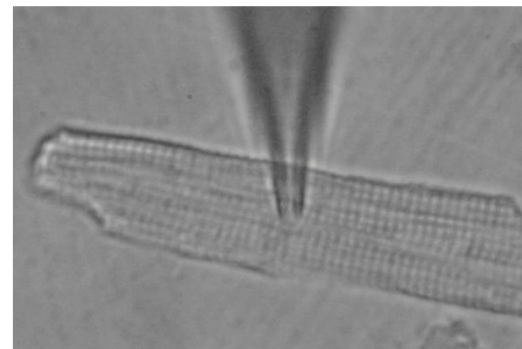
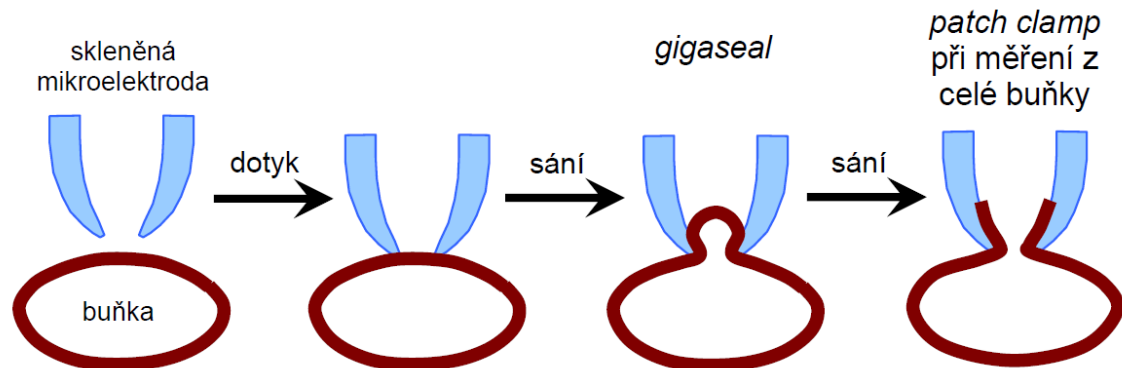
3. Lidských odvozených srdečních buňkách (*iPSC-CM*)



Patch-clamp

Technika *patch-clamp* při měření z celé buňky (*whole cell patch-clamp*)

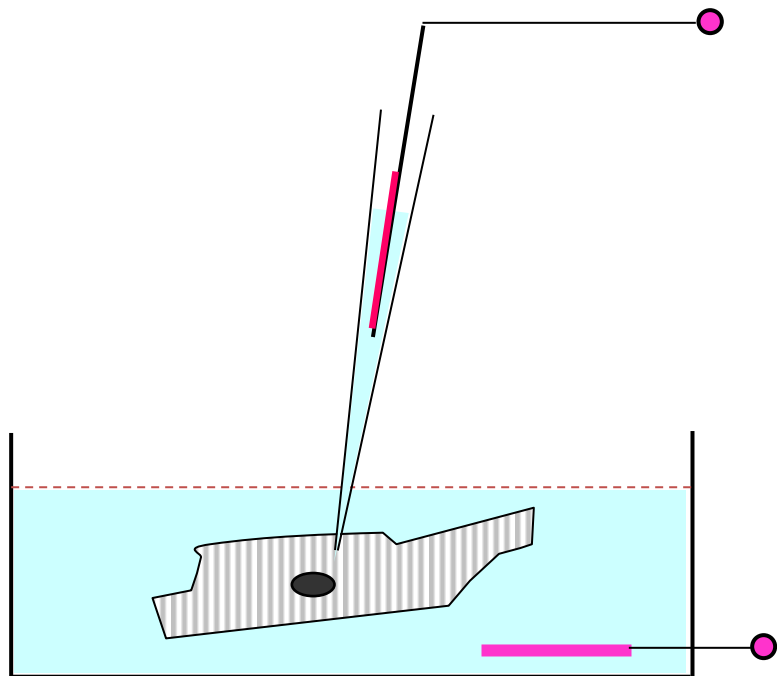
1. Navázání kontaktu s buňkou



Patch-clamp

Technika *patch-clamp* při měření z celé buňky (*whole cell patch-clamp*)

2. Průběh měření

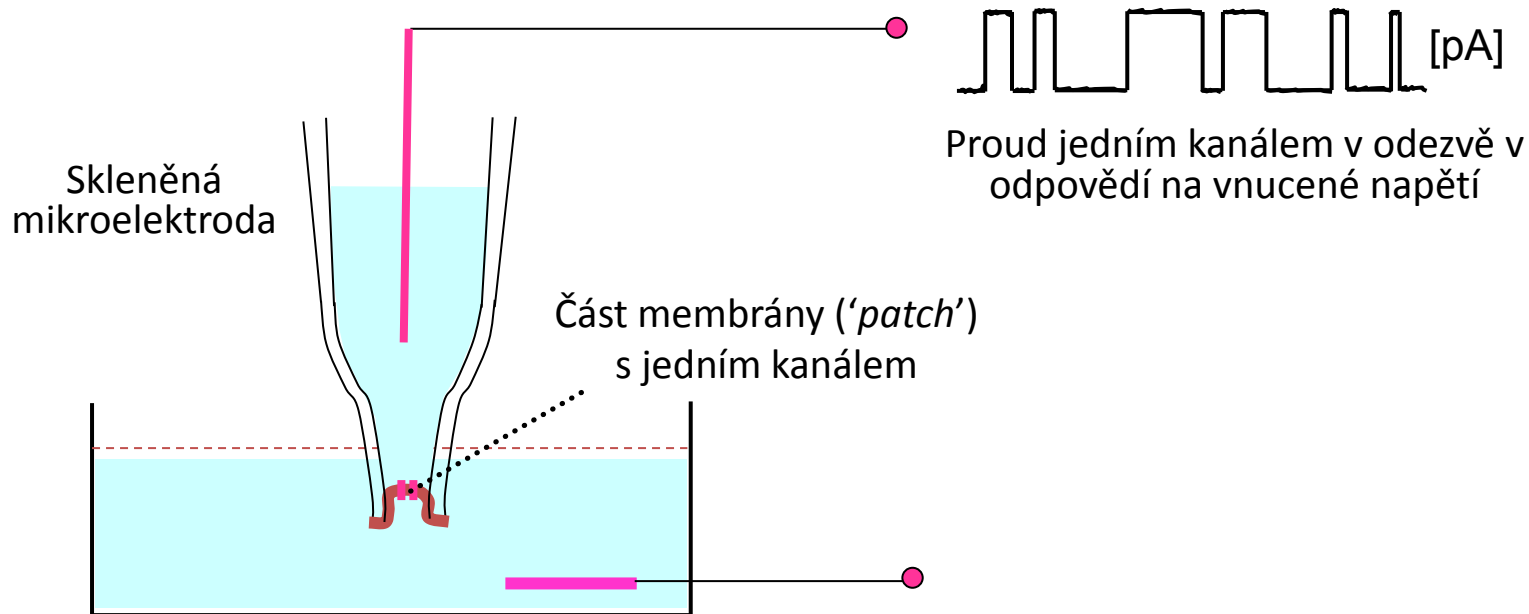


Měření může probíhat v režimu

- **Vnuceného napětí** (*voltage clamp*)
- **Vnuceného proudu** (*current clamp*)

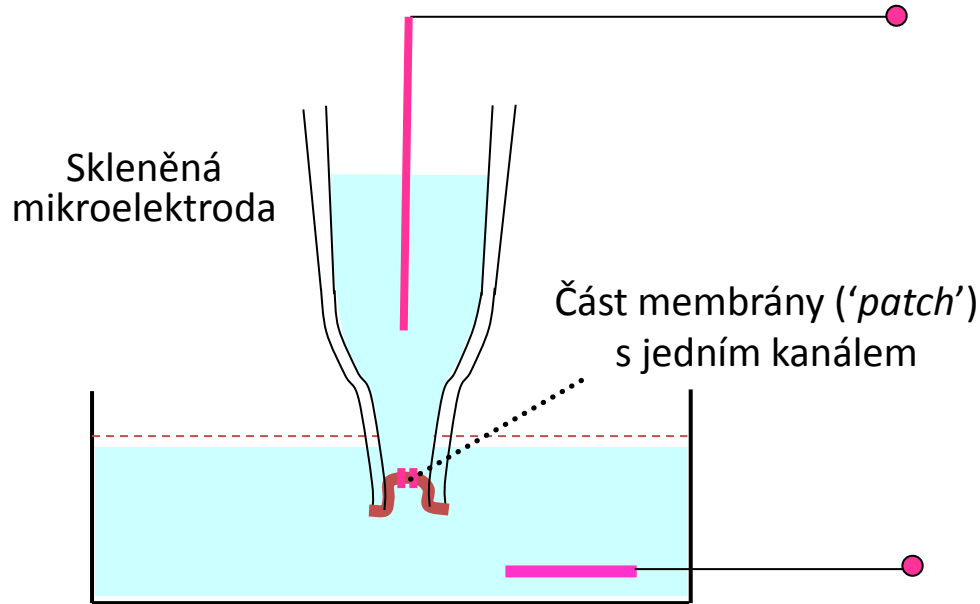
Patch-clamp

Technika *patch-clamp* při měření z jediného kanálu (*single cell patch-clamp*)



Patch-clamp

Technika *patch-clamp* při měření z jediného kanálu (*single cell patch-clamp*)



single channel current at -110 mV induced by acetylcholine at rat neuromuscular junction (nicotinic receptors; Mulrine and Ogden)

Možnosti využití *patch-clampu*

Lze studovat:

1. Vrátkování srdečních kanálů za fyziologických i patologických podmínek

Praktický příklad: *Změny iontových kanálů při srdečním selhání*

2. Farmakologické ovlivnění srdečních kanálů

Praktický příklad: *Objasnění proarytmogenních vlastností některých látek, např.:*

- *Vliv antiarytmika ajmalinu na akční napětí a na $I_{K(ATP)}$*
- *Vliv antipsychotika perfenazinu na I_{Na} a I_{to}*
- *Vliv ethanolu na I_{K1}*
- *Vliv antidepresiva nefazodonu na I_{Kr}*

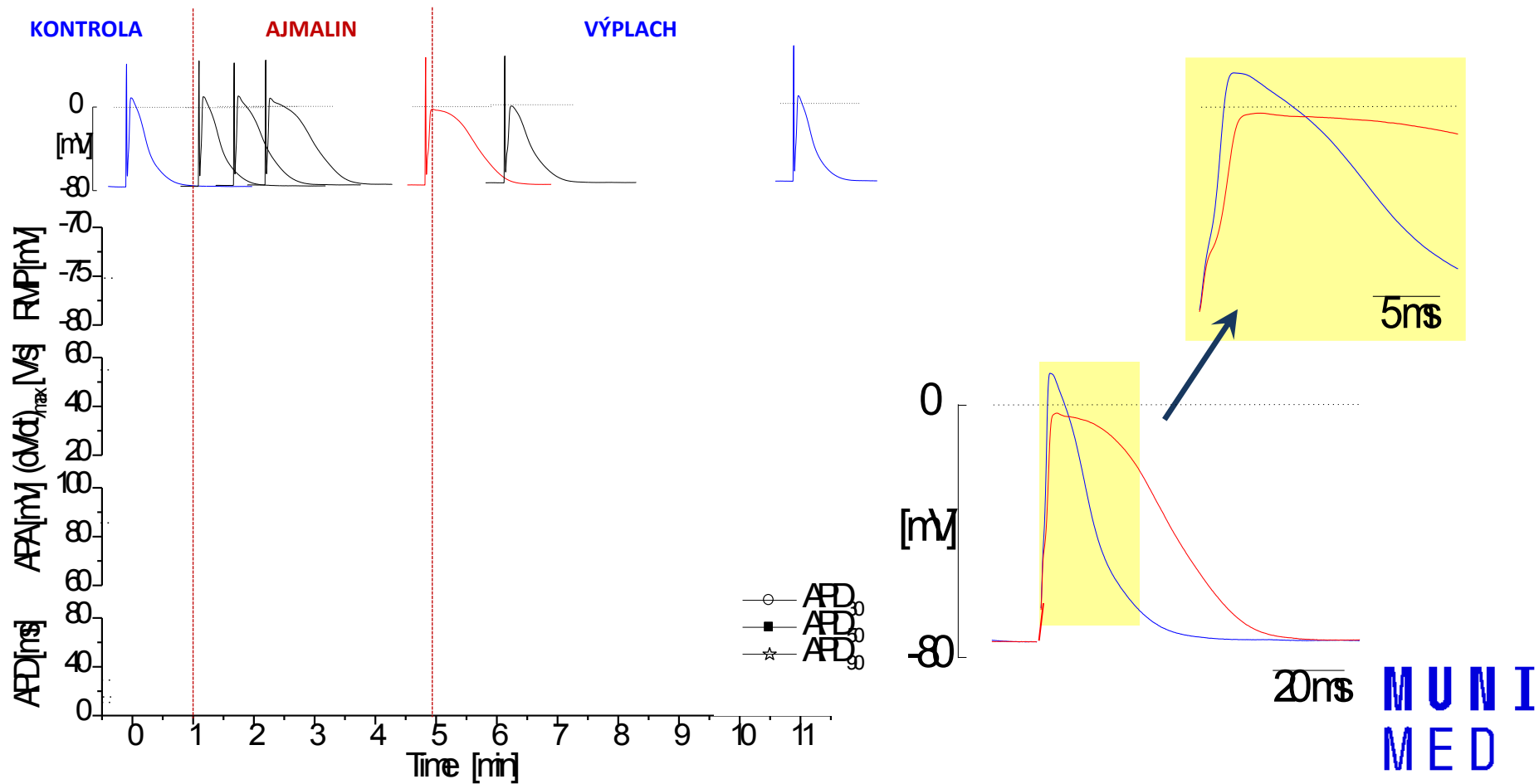
3. Studium vlivu přítomnosti mutace na farmakologické účinky látek

4. Studium funkčních důsledků mutací iontových kanálů

Praktický příklad: *Studium arytmogenních syndromů*

- *Syndrom dlouhého intervalu QT*
- *Brugadův syndrom*

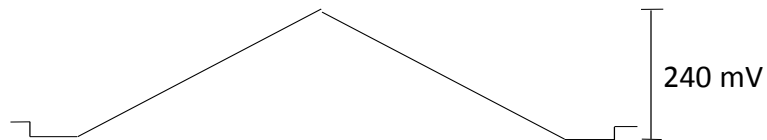
Příklad: Vliv antiarytmika ajmalinu na akční napětí



Příklad: Vliv antiarytmika ajmalinu na $I_{K(ATP)}$

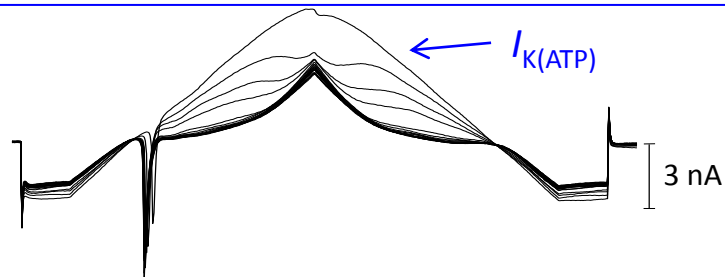
Měření $I_{K(ATP)}$

Vnucený
napěťový
impulz



Kontrola

Po aplikaci DNP



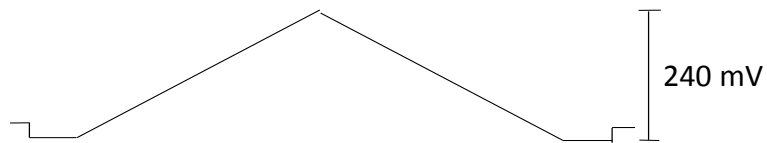
50 ms

Proudová odpověď

Příklad: Vliv antiarytmika ajmalinu na $I_{K(ATP)}$

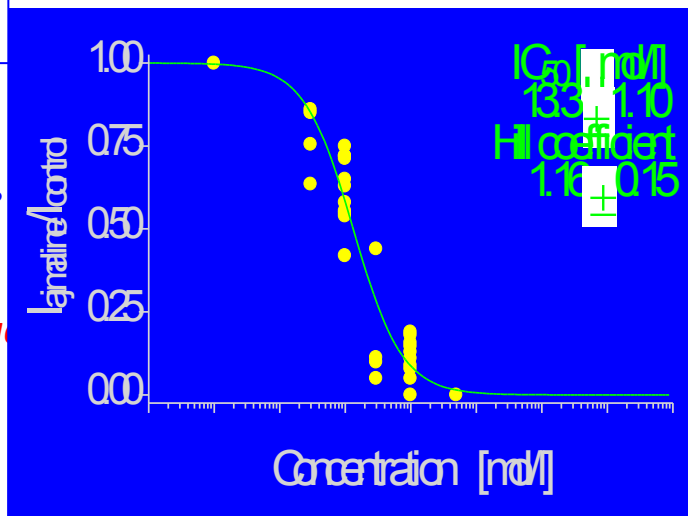
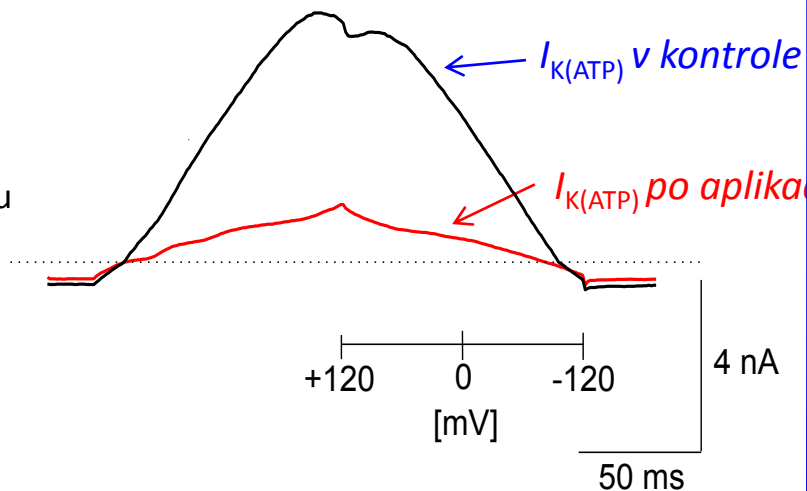
Měření $I_{K(ATP)}$

Vnucený
napěťový
impulz

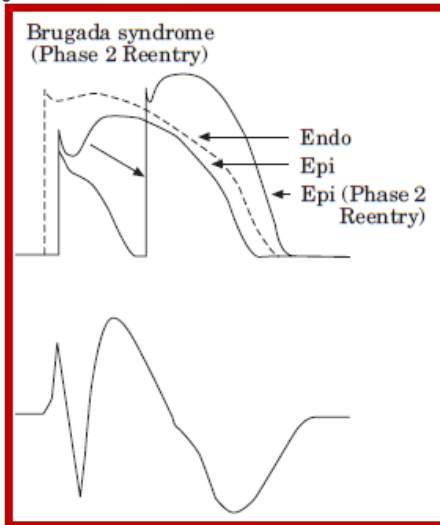
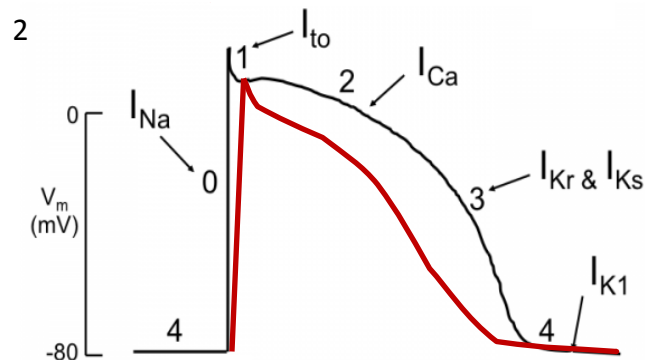
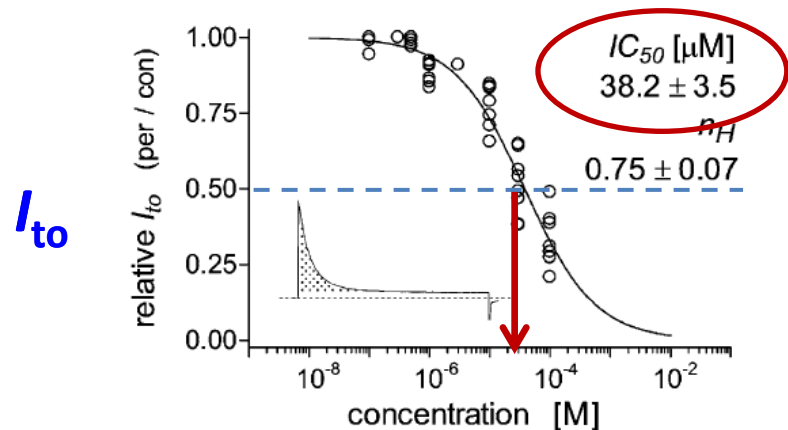
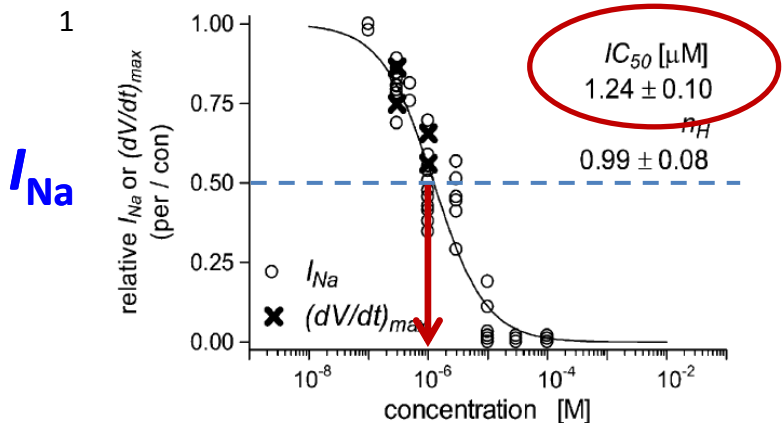


Proudová odpověď

Změny po
aplikaci ajmalinu

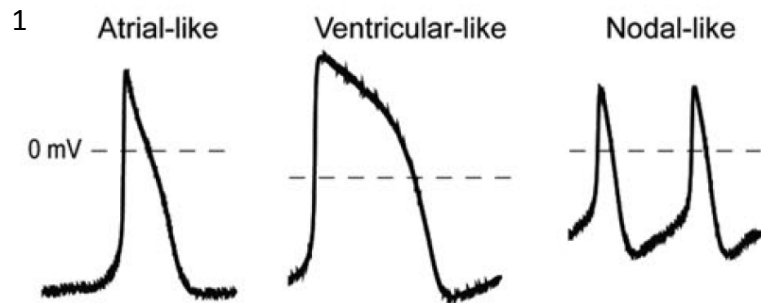
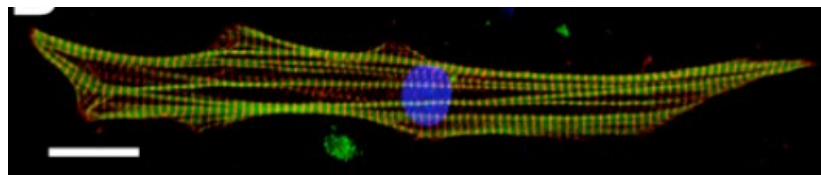


Příklad: Vliv antipsychotika perfenazinu na I_{Na} a I_{to}

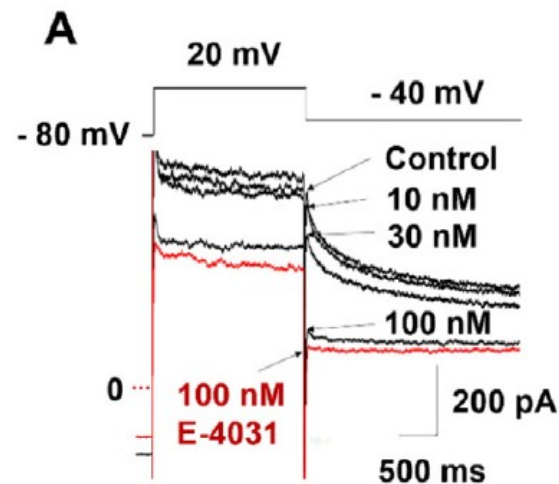


Příklad: Vliv antidepresiva nefazodonu na I_{Kr}

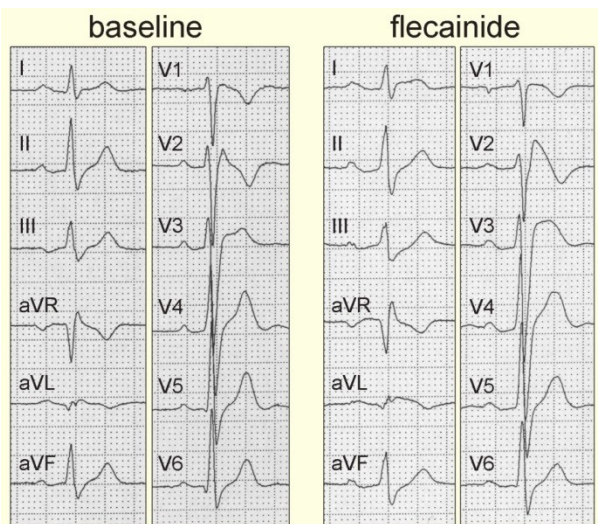
1. Měření v tomto případě provedeno na **lidských odvozených srdečních buňkách**



2. Inhibice I_{Kr} nefazodonem



Příklad: Studium Brugadaova syndromu



klinické symptomy: synkopa

EKG: vyklenutá elevace úseku ST

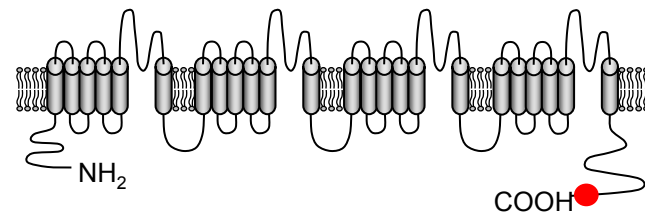
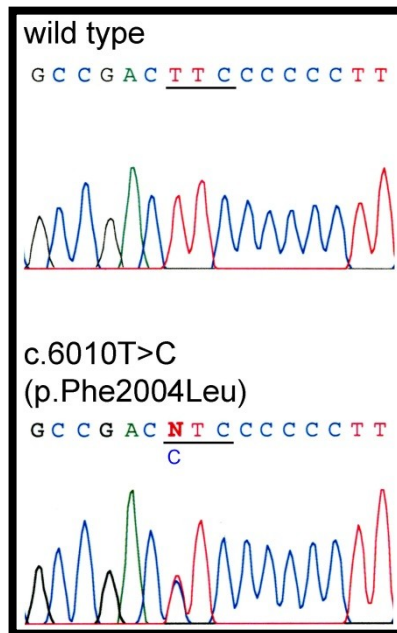
P vlna = 80 ms (120 ms)

QRS komplex = 135 ms (100 ms)

QTc interval = 382 ms (440 ms)

AH = 109 ms (160 ms)

HV interval = 56 ms (50 ms)

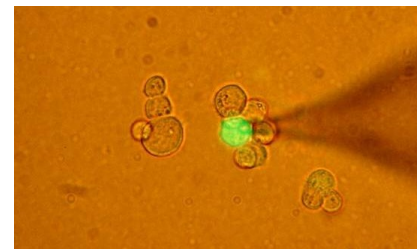


F2004L

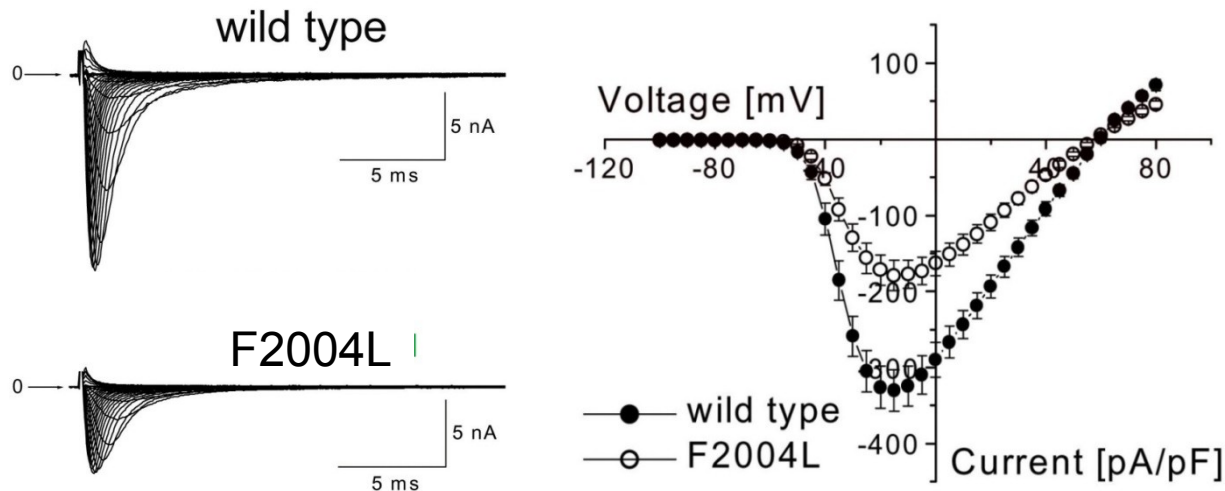
bodová mutace v C-konci I_{Na} -kanálu
(část Na^+ kanálu podílející se na inaktivaci)

Příklad: Studium Brugadaova syndromu

1. Měření bylo provedeno na buněčné linii, která přechodně exprimovala **zdravý (WT)** a **mutovaný (F2004L)** lidský kanál pro I_{Na}

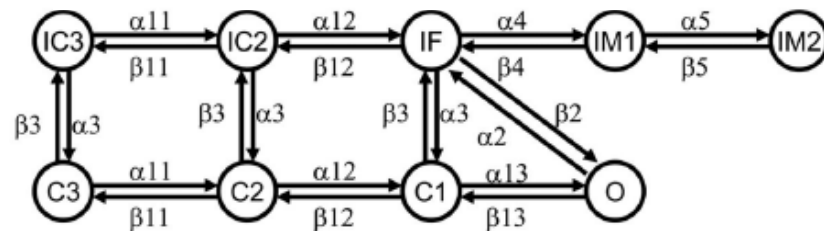


2. Patrná **inhibice** I_{Na} v mutovaném kanálu



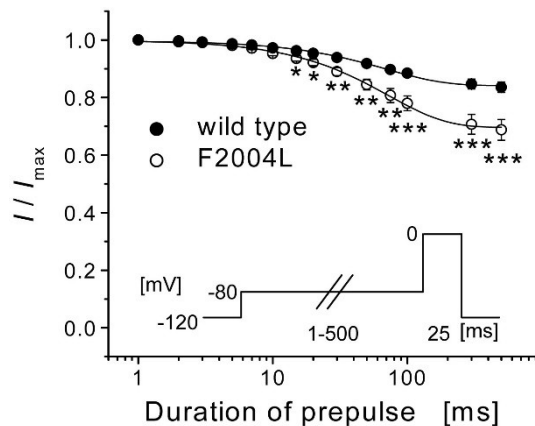
Příklad: Studium Brugadaova syndromu

1. Kinetické schéma I_{Na} kanálu

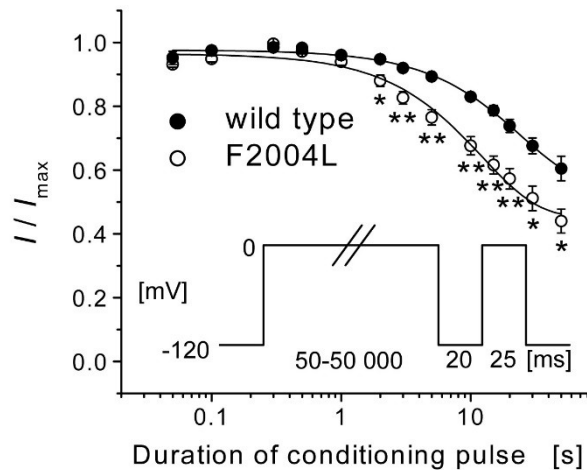


2.

Rozvoj inaktivace ze zavřených stavů

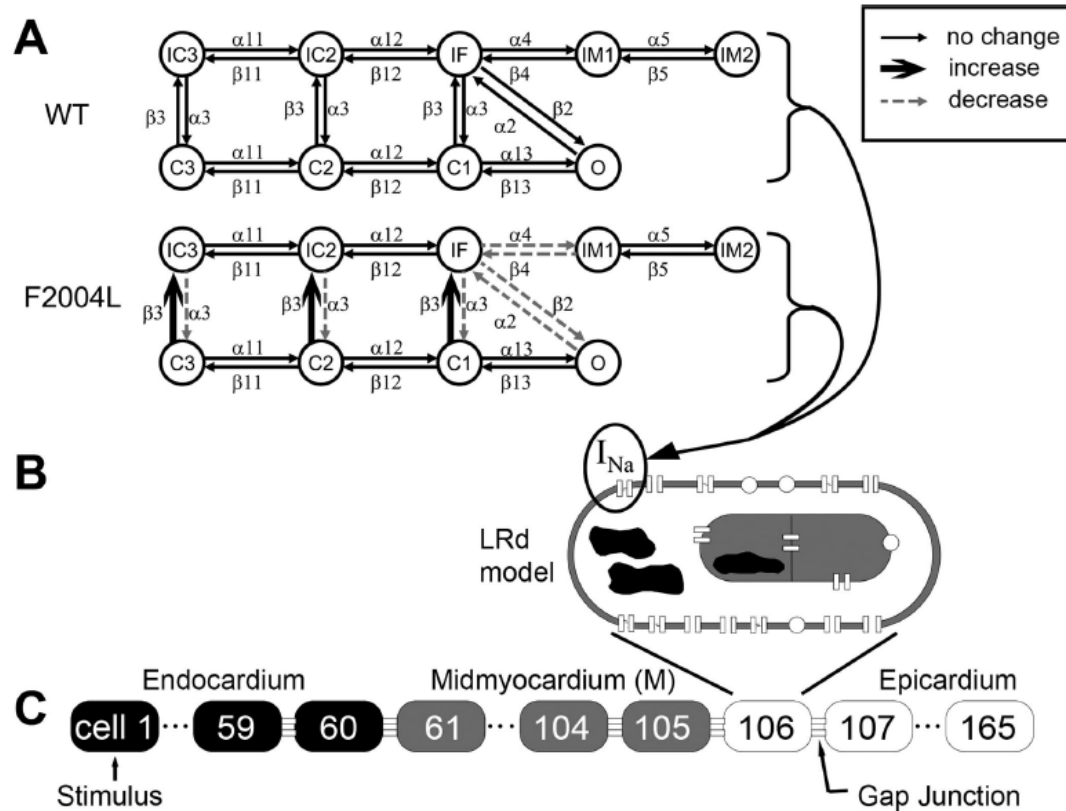


Rozvoj pomalé inaktivace



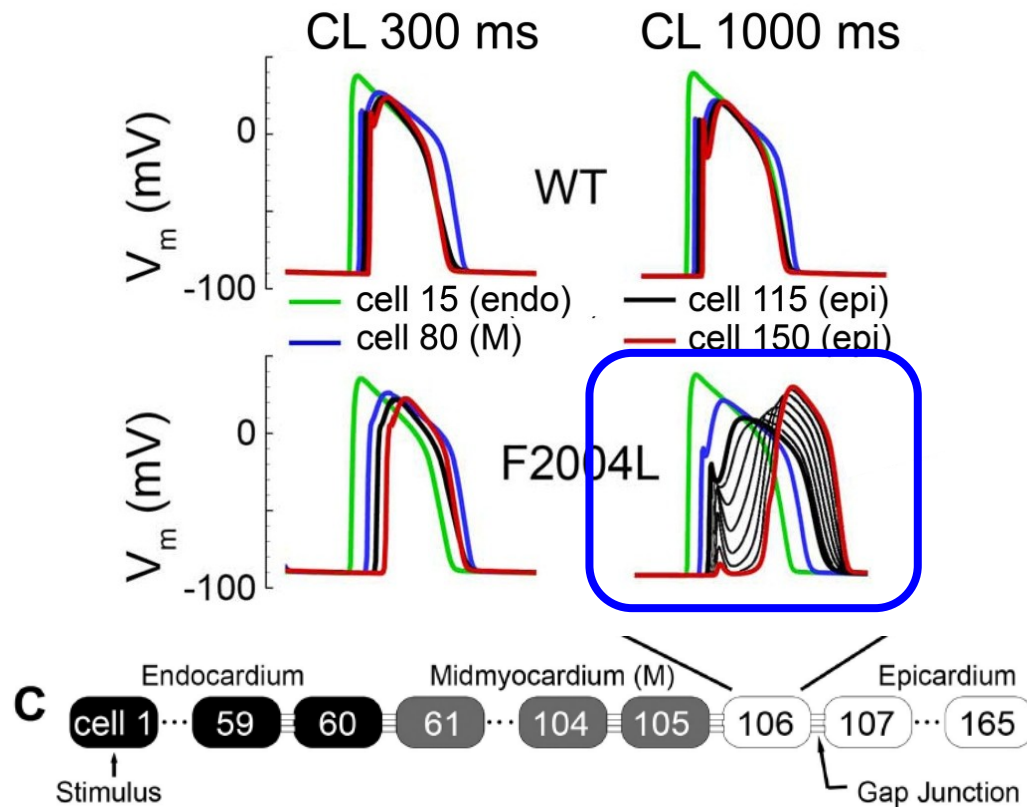
Příklad: Studium Brugadaova syndromu

Schematický model



Příklad: Studium Brugadaova syndromu

Schematický model



Prezentace vznikla za podpory projektu FRMU „Modernizace výuky buněčné srdeční elektrofyzologie“, MUNI/FR/1490/2018.