

Nyugat-magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központ
Természettudományi Kar
Biológia Intézet
Állattani Tanszék

Ioncsatornákra ható vegyületek farmakológiai vizsgálatának lehetőségei csirke szívizomsejteken



Konzulens:
Dr. Molnár Péter
Egyetemi docens
Nyugat-magyarországi Egyetem
Természettudományi Kar
Biológia Intézet

Készítette:
Erdély Tünde Orsolya
Biológia Bsc

Szombathely
2013.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	1
2	Célkitűzés.....	3
3	Irodalmi áttekintés	4
3.1	Szívelégtelenség, mint vezető halálok.....	4
3.2	Szív felépítése.....	5
3.3	Szív fiziológiája.....	7
3.3.1	Szívizomsejtek tulajdonságai	7
3.3.2	A szív pumpafunkciója	7
3.3.3	A szív ingerületvezetési rendszere	8
3.4	Szív ioncsatornái	9
3.5	Szív farmakológiája.....	12
3.6	Sejt- és szövettenyésztés jelentése	14
3.7	Sejttenyésztés története	15
3.8	Sejttenyésztés típusai	16
3.9	Tenyészetek növekedése	17
3.10	Passzálás.....	18
3.11	Médiumok alapvető összetevői	18
3.12	Szérum.....	19
3.13	Current-clamp módszer (áramzár módszer)	19
3.14	Voltage-clamp módszer (feszültségzár módszer).....	20
3.15	Patch-clamp módszer (folt-feszültségzár módszer).....	22
4	Módszerek.....	24
4.1	Anyagok és eszközök	24
4.1.1	Tenyésztéshez szükséges eszközök.....	24

4.2	Protokoll	26
4.2.1	1. nap	26
4.2.2	2. nap	27
4.2.3	Patch-clamp mérések	29
5	Eredmények	32
5.1	Tenyészetek	32
5.2	Patch-clamp	33
6	Megvitatás	37
6.1	Csirke szívizom tenyészet	37
6.2	Szívizomsejtek patch-clamp vizsgálata	37
7	Köszönetnyilvánítás	39
8	Irodalomjegyzék	40

1 Bevezetés

Napjainkban a szív és érrendszeri betegségek a leggyakoribbak a daganatos megbetegedések mellett, éppen ezért ma a világ legjelentősebb egészségügyi problémái. A szív és érrendszeri megbetegedések és az általuk okozott halálozás legfontosabb kockázati tényezői a magasvérnyomás-betegség, a cukorbetegség, a zsíryanycsere- betegség, az elhízás, a dohányzás és az alkoholizmus, továbbá az egészségtelen táplálkozás, és a mozgásszegény életmód. Emellett még több tényező is szerepet játszhat a kialakulásukban, pl. a genetikai faktorok. A kardiovaszkuláris betegségek elsősorban a szívben (koszorúér-betegség, szívinfarktus, szívelégtelenség), az agyban (átmeneti agyi keringési zavar, szélütés, stroke), a perifériás érrendszerben (érszűkületek) és a vesében (krónikus vesebetegség, veseelégtelenség) okoznak károsodást.

A szívelégtelenség kezelésében az elmúlt évtizedben bekövetkezett jelentős előrelépés ellenére a betegség mortalitása ma is igen magas, eléri vagy meg is haladja egyes rosszindulatú daganatos betegségekét. A gyógyszeres terápiában az elmúlt évtizedekben elért fejlődés ellenére (ACE-gátlók, angiotenzin receptor blokkolók, béta-blokkolók, aldoszteron-antagonisták) a szívelégtelenség még mindig rossz prognózisú betegség. Ennek megfelelően a szív és érrendszerre ható vegyületek kutatása, toxikológiai jellemzése elsődleges célpont a gyógyszergyárak számára.

A farmakológiai vizsgálatokon túl minden fejlesztésre kerülő vegyületet meg kell vizsgálni kardiovaszkuláris mellékhatások szempontjából. Erre azért van szükség, mert számos gyógyszert kardiotoxikus mellékhatása miatt vonták ki a piacról, mivel kiderült, hogy szívritmus zavarhoz, vagy szívelégtelenséghez vezet a fogyasztásuk.

A szívizomsejtek viselkedését (akciós potenciál, ritmus generáció, összehúzódás) ioncsatornák határozzák meg. Ezek az ioncsatornák vesznek részt a szív működés szabályozásában, a szívritmus generálásában, az ingerület vezetésében, a szívizom összehúzódásában. Ennek következtében a szívizomsejteken található ioncsatornák farmakológiai és toxikológiai vizsgálata kiemelt jelentőséggel bír.

Szakdolgozatomhoz egy ehhez kapcsolódó témát választottam, egy olyan *in vitro* módszerbeállítását, mely viszonylag nagy áteresztőképességű és magas információtartalmú, mint a tenyésztett csirke szívizomsejteken végzett patch-clamp vizsgálat.

2 Célkitűzés

- 1) A szív farmakológiájának és toxikológiájának áttekintése az irodalom alapján.
- 2) Szívizomsejt-ioncsatornák vizsgálati lehetőségeinek áttekintése az irodalom alapján, különös tekintettel a teljes sejt patch-clamp módszerre.
- 3) Csirke szívizomsejt tenyésztés készítése.
- 4) Patch-clamp mérés beállítása tenyésztett szívizomsejteken.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Szívelégtelenség, mint vezető halálok

Szívelégtelenség akkor lép fel, ha a szív teljesítőképessége (perctérfogata) nem kielégítő a szövetek kiegyensúlyozott vérellátásához. Ez az állapot több érzékelhető tünettel jár, mint például fáradtsággal, légszomjjal, oedemával. Bal- és jobb szívfél működésképtelenné válásakor pangásos szívelégtelenségről beszélünk, mely egyidejűleg foglal magában perifériás oedemát és tüdőpangást is. A szívelégtelenség legfőbb kiváltó oka a koszorúér-betegség és a hypertonia (Neal 2000).

A szívelégtelenség az elsőszámú halálok a világon, mely igen nagy egészségügyi problémát okoz az iparilag fejlett országokban. Ugyan a stroke és a koszorúér betegség miatti elhalálozások az utóbbi évtizedekben visszaszorultak, a krónikus szívelégtelenség mégis egyre több áldozatot szed.

Európában átlagosan 0,4%-ban fordul elő ez a betegség. Ez persze erősen összefügg az életkorral, így a 85 évnél idősebb emberek 10%-ánál is jelen lehet a betegség. A szívelégtelen betegek átlagos életkora 74 év. A prevalencia növekedése, vagyis a betegségben szenvedők arányának megugrása, többé-kevésbé az elöregedő populációkkal is igazolható (Soós 2011).

Csak Európában kb. 10 millió beteg és még minimum ennyi egyelőre tünetmentes érintett személy él, akiknél a betegség a következő pár évben biztosan kialakul.

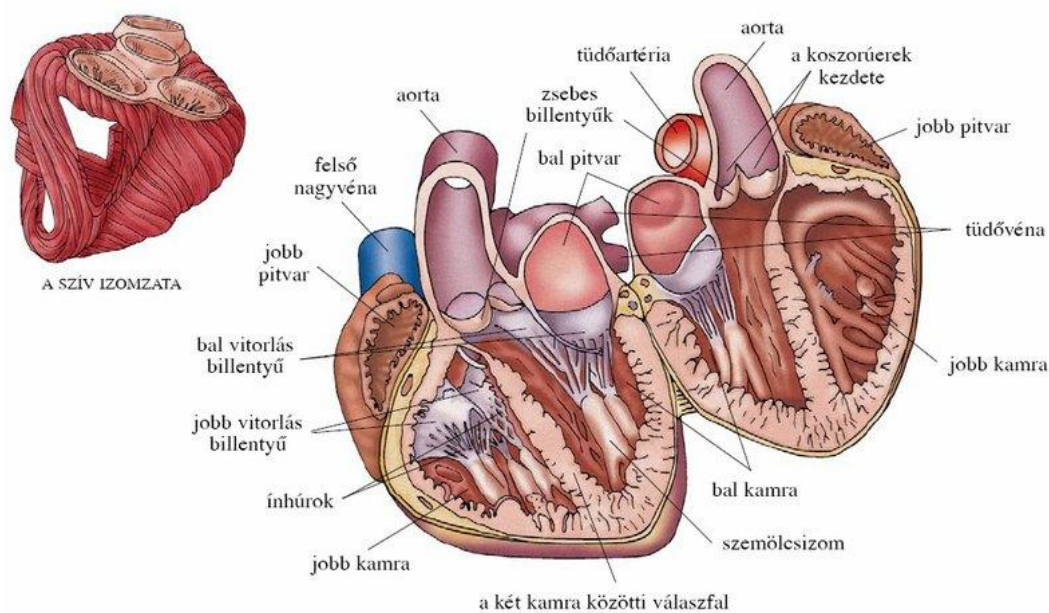
A szívelégtelenség kezelésében voltak már nagy áttörések, mégis a betegség okozta halálesetek száma túlmutat jó néhány daganatos megbetegedésén.

A szívritmuszavarok okozta hirtelen szívhalál és a progresszív szívelégtelenség teszi ki a halálozások zömét. Magyarországon az iszkémiás szívbetegség az európai átlaghoz képest is nagyon magas (Soós 2011).

3.2 Szív felépítése

A szívet kívülről az ún. szívburok (*pericardium*) veszi körül, mely egy kettős hártya. Ez alatt helyezkedik el a három rétegű szívfal. A szívfal három rétegét az *endothel* réteg, az izomréteg (*myocardium*) és a szívbelhártya (*endocardium*) képezi (Első Láncszem).

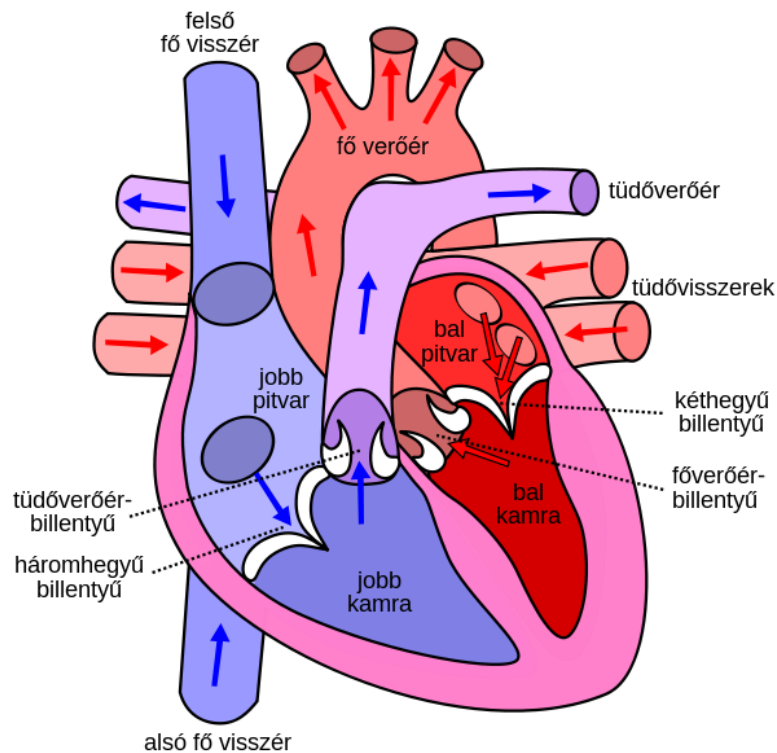
A hosszanti sötvény (*septumcordis*) által két szívfélre tagolt szívet a szívbillentyűk osztják még két részre, így jön létre a négyüregű szív. A felső két üreget jobb és bal pitvarnak (*atrium*), az alsó kettőt pedig ily módon kamráknak (*ventriculus*) nevezzük (Lásd 1. ábra). A pitvarok feladata a szívbe bejutó vér fogadása, a kamráké pedig a vér szívből való továbbítása (Első Láncszem).



1. ábra: A szív üregei, főbb erei és izomzata (Mozaikweb)

A négy üregnek köszönhetően a két vérkör tökéletesen elkülönül egymástól (Lásd 2. ábra).

A bal kamra vastag, izmos falából indul ki a főverőér (*aorta*), mely a testbe szállítja a vért. Ez a nagy vérkör a fővénával kapcsolódik vissza a szív jobb pitvarába (Első Láncszem).



2. ábra: Az emberi szív felépítése a fő verő- és visszerekkel. A nyilak a véráram irányát jelzik (Wikipedia3 2013)

A jobb kamra kissé vékonyabb falú, mint a bal, hiszen nem kell olyan messzire szállítania a vért. A jobb kamrából tehát a tüdőartérián keresztül a tüdőbe, onnan a tüdővénába, majd a jobb pitvarba jut vissza a vér. Ez a kis vérkör (Első Láncszem).

A billentyűk és az aorta között található a két (jobb és bal) Valsava-öböl (*sinus Valsavae*), melyből a szív koszorúartériái (*arteria coronaria*) indulnak ki. Ezek a koszorúartériák adják a szív saját vérellátását, elzáródásuk azonban szívinfarktussal jár (Első Láncszem).

A madarak és az emlősök szíve látszólag egészen egyforma, mely hasonlóság a parallel fejlődés eredménye, de ha a részletesebb anatómiai elemzést nézzük kiderül, hogy a madarak esetében jelentős mennyiségű hullóbélyeg figyelhető meg (ELTE2).

3.3 Szív fiziológiája

A szív a keringési rendszer központjaként biztosítja a vérkeringést és a véráramláshoz szükséges vérnyomást (Wikipedia1 2013).

3.3.1 Szívizomsejtek tulajdonságai

- vastagsága: 10-20 μm
- hossza: 100-150 μm
- sejtmag: 1 db központi mag, nincsenek perifériás sejtmagok
- rostok szerveződése: szarkomerekben, párhuzamosan fordulnak elő
- autonóm beidegződésűek
- ingerületvezetés: hosszanti, gyors (gapjunction) (SZTE3)

3.3.2 A szív pumpafunkciója

A vér a verőerekbe a szív ritmikus összehúzódásaival pumpálódik. Ebben nagyon fontos szerepe van a szívbillentyűk tökéletes működésének, mivel azok irányítják a véráramlást.

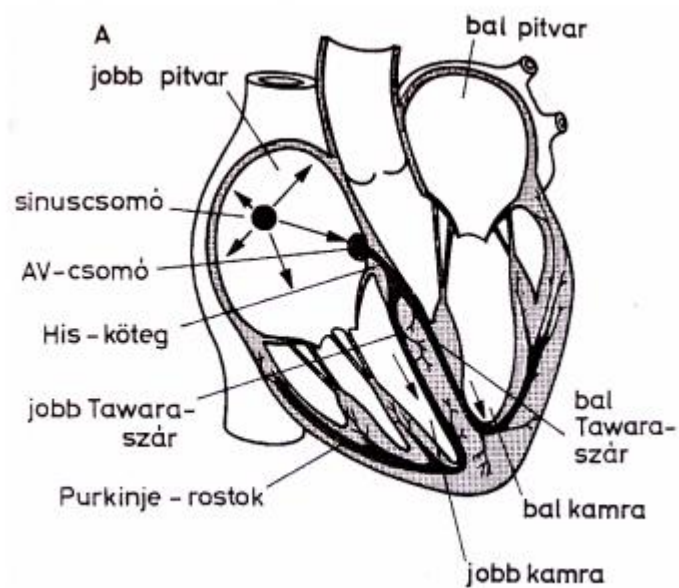
A pulzustérfogat az egy összehúzódás (*systole*) alatt kipumpált vér mennyisége. A szív egy perc alatt történő összehúzódásainak száma adja a szívritmust. A pulzustérfogat és a szívritmus szorzata határozza meg a percenként továbbított vér mennyiségét, vagyis a perctérfogatot. Ez nyugalmi állapotban általában 4,5-5 liter/perc. Egy összehúzódás után a szívizomzat elernyed (*diastole*). A két folyamat együtt teszi ki a szív ciklust (Wikipedia1 2013).

Egy szívdobbanásnak öt fő szakasza van. Az első szakaszban a félhold alakú billentyűk bezáródása után az atrioventrikuláris billentyűk kinyílnak, amit a teljes szív elernyedése követ. A következő periódusban a pitvari összehúzódásnak köszönhetően az AV-billentyűk kinyílnak és a vér átáramlik a kamrába. A harmadik fázisban a kamrák összehúzódása következik, majd az AV és a félhold alakú billentyűk bezáródása miatt a nyomás változatlan marad.

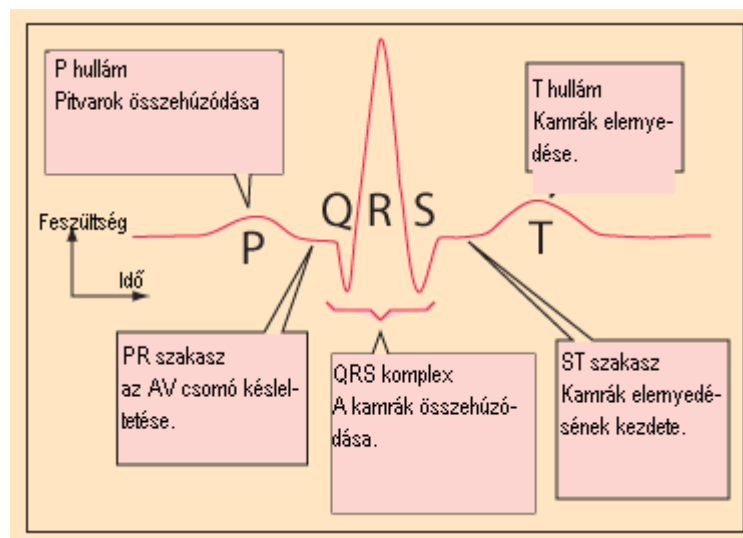
A negyedik szakaszban a kamrák összehúzódnak és kiürülnek, a félhold alakú billentyűk kinyílnak. Az utolsó szakasz során a nyomás csökken, a véráramlás és a kamrák összehúzódása leáll, majd a kamrák elernyednek és a félhold alakú billentyűk bezárulnak. 1 ilyen teljes szív ciklus általában 1 másodpercig tart (nyugalmi állapotban) (Wikipedia2 2013).

3.3.3 A szív ingerületvezetési rendszere

Három féle ingerlékeny szövet található a szívben (Lásd 3. ábra): a munkaizomzat (kamrai, pitvari), a nodalis szövetek (SA és AV csomó) és a Purkinje sejtekből álló szövetek (His köteg, Tawara szárak, subendocardialis Purkinje rost hálózat, terminális Purkinje rostok) (Bárándi).



3. ábra: A szív ingerlékeny szövetei (Bárándi)



4. ábra: Az EKG-n a különböző hullámok a szív ciklus egy-egy részének felelnek meg (Babosi 2010)

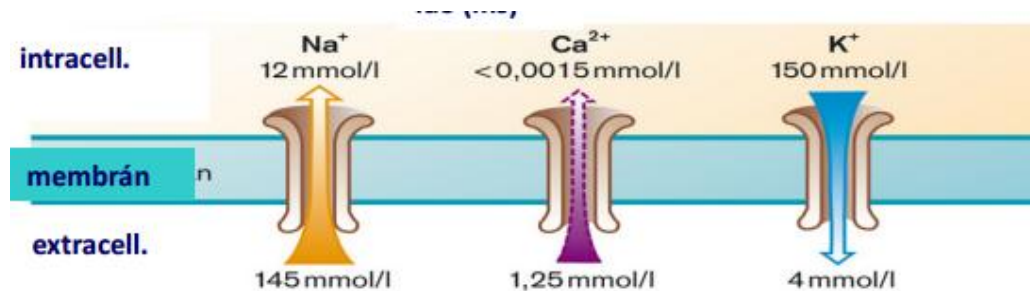
Az izomzat összehúzódása folyamán elektromos áram keletkezik. Mivel a test szövetei jól vezetnek az elektromosságot, a szívben kialakult feszültségváltozás a bőrfelületről is elvezethető. Ennek grafikus megjelenítésére egy specifikus görbét, az EKG-t (elektrokardiogramot) használják (Lásd 4. ábra) (Mozaikweb).

Az EKG vizsgálat során általában 12 elektródat helyeznek el meghatározott, ruhátlan, esetleg szőrtelen testrészekre (karokon, lábakon, mellkason). Az elektródák felfogják az elektromos jeleket, melyeket az EKG gép összegyűjt és megrajzolja a speciális hullámokat tartalmazó elektrokardiogramot (Lásd 4. ábra) (Ehardt 2013).

3.4 Szív ioncsatornái

Az idegsejtek és izomsejtek ingerlésére membránpotenciáljuk gyors, ideiglenes megváltozásával, akciós potenciállal reagálnak. Ezeket a sejteket nevezzük excitábilis sejteknek.

A membránpotenciál gyors megváltozásait a membránba ágyazott (transzmembrán), az egyes ionokat többé-kevésbé szelektíven és időben változó mértékben átteresztő fehérjék (ioncsatornák) közvetítik (Lásd 5. ábra) (EKTF).



5. ábra: Ionok áramlása az intra- és extracelluláris tér között (SZTE3)

Az ioncsatornák transzmembrán fehérjék. A pórus formáló vagy fő szubunit határozza meg a csatorna felépítését (Szentesi 2009), valamint a lipid-fehérje kölcsönhatások befolyásolják a működését (Székely 2007).

Több csatorna (K^+ , Na^+ és Ca^{2+} csatorna) is rendelkezik kiegészítő fehérjékkel, amelyek megváltoztathatják a csatornák tulajdonságait (Szentesi 2009).

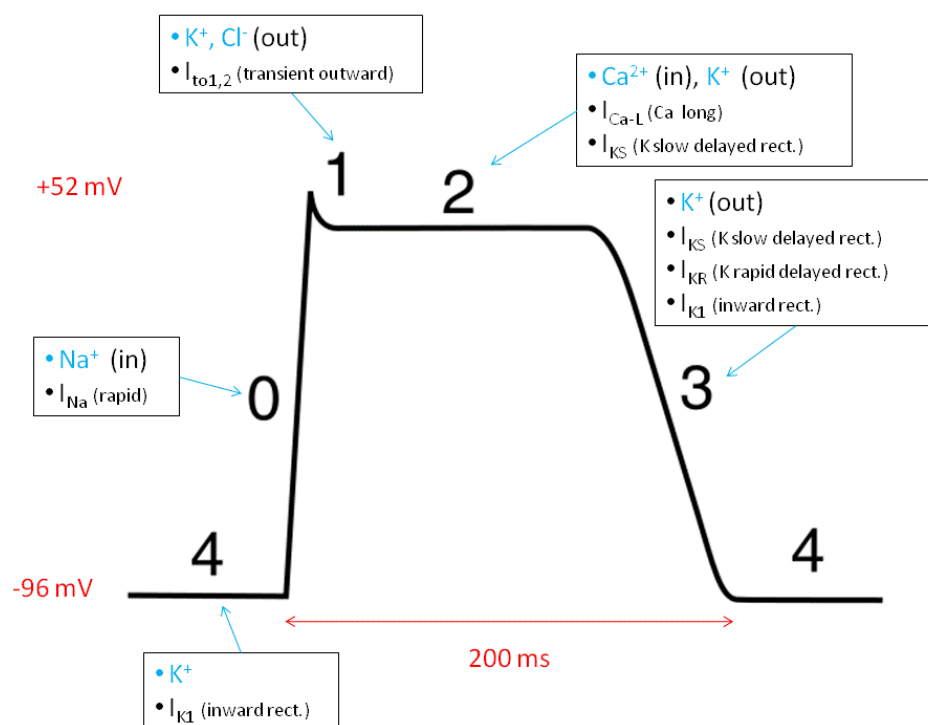
Hodgkin és Huxley (1940) szerint a csatornák más-más konformációjú állapotok között változnak. A csatornák depolarizáció fellépése esetén aktiválódnak (kinyílnak), ha azonban hosszabb ideig fennáll a depolarizáció, akkor a csatornák inaktiválódnak (kapuzódnak)(Szentesi 2009). A Kapuzás fehérjekonformáció-változást jelent, ezért ha a lipidkörnyezet megváltozik, akkor módosul az aktivációs és inaktivációs mechanizmus is (Székely 2007).

A K^+ csatornák majdnem minden sejtben fellelhetők. Funkciójukat és morfológiájukat nézve is igen eltérhetnek egymástól. Többek között szerepük van a nyugalmi- és az akciós potenciál kialakításában is (Székely 2007).

Minden ioncsatornának vannak gátlószerei, melyek gátolják a sejtválaszt és lehetővé teszik a csatornaszerkezet-funkció kapcsolatának elemzését is. Ezek az inhibitorok kémiai tulajdonságaik alapján lehetnek peptid és nem-peptid típusúak. Például a skorpiók mérgéből származó peptid típusú gátlószerek kis molekulájuk révén az ioncsatorna extracelluláris nyílásához kötődnek, ezzel elzárva a K^+ ionok útját.

A nem-peptid típusú inhibitorok szerkezetileg és működésileg is igen változatosak. Az egyik legsűrűbben használt ilyen gátlószer a TEA⁺, mely a csatorna nyitott pórusánál zárja el a K⁺ ionok áthaladását (Székely 2007).

A szívben számos ioncsatornát írtak le. Ilyen ioncsatornák pl. a K⁺, Na⁺, Cl⁻, és a Ca²⁺ csatornák. Ezek mind fontos szerepet játszanak a szív akciós potenciáljának kialakításában (Lásd 6. és 7. ábra) (Wikipedia4 2013).



6. ábra: Szívizomsejtek akciós potenciáljának standard modellje (Wikipedia4 2013)

Ion	Current (I)	α subunit protein	α subunit gene	Phase / role
Na ⁺	I_{Na}	Na _v 1.5	SCN5A	0
Ca ²⁺	$I_{Ca(L)}$	Ca _v 1.2	CACNA1C	0-2
K ⁺	I_{to1}	K _v 4.2/4.3	KCND2/KCND3	1, notch
K ⁺	I_{Ks}	K _v 7.1	KCNQ1	2,3
K ⁺	I_{Kr}	K _v 11.1 (hERG)	KCNH2	3
K ⁺	I_{K1}	K _{ir} 2.1/2.2/2.3	KCNJ2/KCNJ12/KCNJ4	3,4
Na ⁺ , Ca ²⁺	I_{NaCa}	3Na ⁺ -1Ca ²⁺ -exchanger	<i>NCX1</i> (SLC8A1)	ion homeostasis
Na ⁺ , K ⁺	I_{NaK}	3Na ⁺ -2K ⁺ -ATPase	<i>ATP1A</i>	ion homeostasis
Ca ²⁺	I_{pCa}	Ca ²⁺ -transporting ATPase	<i>ATP1B</i>	ion homeostasis

7. ábra: Kamrai akciós potenciál jelentősebb ionáramai (Wikipedia4 2013)

3.5 Szív farmakológiája

A leggyakrabban előforduló szívelégtelenség, az alacsony perctérfogattal járó típus, mely érintheti a jobb és a bal kamrát külön-külön, de akár egyszerre is. Fontos megkülönböztetni a primer szisztolés elégtelenséget, e közben a kamra nem képes kellő erőt biztosítani a vér megfelelő kilökéséhez és ez valójában a perctérfogat csökkenéséhez vezet, valamint a primer diasztolés kamrai elégtelenséget, amely a kamrafal elégtelen tágulékenységén alapszik (Brassai 2008).

A kezelés szempontjából a szív kontraktilitásának növelése mellett nem kevésbé lényeges a szív tehermentesítése (a szívfrekvencia csökkentése, az értágítás, a keringő volumen csökkentése és a remodeling gátlása). A szívelégtelenség kezelésében alkalmazott gyógyszereket két nagy csoportra bontjuk.

A pozitív inotrop hatású ún. kardiotonikumok (szívglükozidok [Lásd 8. ábra], β_1 - agonisták, foszfodieszteráz gátlók, kalcium érzékenyítők=sensitizerek) a szívizom kontraktilitását növelik, tehát fokozzák az összehúzódások erejét és csökkentik a szívfrekvenciát. A másik nagy csoport, melyet egyre többen használnak, a nem-pozitív inotrop hatású szerek (ACE-gátlók, angiotenzin II-receptor blokkolók, diuretikumok, vazodilatátorok, β - blokkolók) (Brassai 2008).

C01A SZÍVGLYCOSIDOK
C01AA Digitalisglycosidok
C01AA01 Acetyldigoxin
C01AA02 Acetyldigoxin
C01AA03 Digitalisfolium
C01AA04 Digitoxin
C01AA05 Digoxin
C01AA06 Lanatoside c
C01AA07 Deslanoside
C01AA08 Metildigoxin
C01AA09 Gitoformate
C01AA52 Acetyldigoxin, kombinációk
C01AB Scillaglycosidok
C01AB01 Proscillaridin
C01AB51 Proscillaridin, kombinációk
C01AC Strophantusglycosidok
C01AC01 G-strophanthin
C01AC03 Cymarin
C01AX Egyéb szívglükosidok
C01AX02 Peruvoside

8. ábra: C kardiovaszkuláris rendszer: C01 szívre ható szerek: C01A szívglükosidok csoportjának listája (Pharmindex)

A szívelégtelenség kezelését általában diuretikummal kezdik, amely fokozza a nátrium- és folyadék-kiválasztást és a keringési térfogat mérséklésével csökkenti az előterhelést és az oedema kialakulását. Enyhe szívelégtelenségben tiazid (pl. bendrofluazid) beadása is elég lehet, de a súlyosabb esetekben kacsdiuretikumokat alkalmaznak.

Ha a diuretikumokra adott válasz nem elfogadható, akkor vasodilatatót is felhasználnak, leggyakrabban angiotenzin-konvertáló enzim- (ACE-) gátlót. Az ACE-gátlók (pl. captopril) csökkentik a szív terhelését, így mérséklik a tüneteket és meghosszabbítják a pangásos szívelégtelenségben szenvedők életét. Ha a szívelégtelenség súlyossága miatt a diuretikum és az ACE-gátlók kombinációja nem hat, akkor inotrop szer adható (Neal 2000).

Az inotrop szerek a kalcium citoplazmába jutásának fokozásával növelik a szívizom kontraktilitását, amely minden egyes akciós potenciálnál bekövetkezik. A digoxin a leggyakrabban használt inotrop szer, de az akut súlyos szívelégtelenségben, ahol az agyi és vese-keringés életveszélyesen alacsony (cardiogen shock), dobutamint adnak gyakran dopaminnal együtt, intravénás infúzióban (Neal 2000).

3.6 Sejt- és szövettenyésztés jelentése

Sejttenyésztés diszpergált sejtek fenntartását jelenti *in vitro* körülmények között. Tehát a folyamat során mesterséges körülmények között (*in vitro*) valamilyen üvegedényben végzik a kísérleteket, nem pedig magában az élőlényben (*in vivo*).

Szövettenyésztés folyamán nem különálló sejteket, hanem szövetként funkcionáló sejtcsoportot sokszorosítanak úgy, hogy az megtartsa eredeti szerkezetét és szerepét (Pécs 2010).

3.7 Sejtenyésztés története

Schwann (Lásd 9. ábra) és Schleiden (Lásd 10. ábra) nevéhez fűződik az 1830-ban megalkotott sejtelmélet, melyben leírták, hogy minden élőlény sejtekből áll, és aminek nincsen sejtje, az nem is élőlény. Az elmélet alapján a vírusokat tekintve nehéz lenne megállapítani élőlények-e vagy sem, mivel ők az egyetlen szervezetek, melyeket nem sejtek alkotnak. 1855-ben új aspektusa jelent meg a fenti elméletnek, melyet Virchow dolgozott ki. Ezek alapján minden sejt sejtből lesz (*omniscellula e cellula*).

Ez bizonyos szempontból ellentétben áll a korábbi feltételezésekkel, melyek szerint élőlény keletkezhet élettelen anyagból is (ez az elgondolás onnan származott, hogy rovarlárvák jelentek meg a bomló szerves anyagokban) (Pécs 2010).



9. ábra: Schwann (NNDB)



10. ábra: Schleiden (Merke)

Nagy áttörést jelentett Roux csirkeembriókkal való munkája, melynek eredményeként 1885-ben elsőként sikerült *in vitro* módon madársejteket fenntartani. Újabb fontos lépése volt ennek a tudományterületnek a mikrokarrieres sejtenyésztés kidolgozása, mellyel Van Wezel foglalkozott. 1967-ben egy eddig ismeretlen technikával apró hordozó szemcsék felületén történő sejtek tenyésztésében járt sikerrel.

A terület fejlődése szempontjából mérföldkőnek számított az 1970-es év. Nem csak a mikroorganizmusokon, hanem az állati sejteken használt rekombináns DNS technika is alkalmazhatóvá vált. A művelet során egy vektorral sikerült bevinni, továbbá expresszálni DNS-t állati sejtbe. Köhler és Milstein Nobel díjas munkája nagy lépésnek számított, mely során egér sejtek egyesítésével hibridómát hoztak létre. A fúzió kidolgozása után 1975-ben megkezdődhetett az immunfehérjék gyártása (Pécs 2010).

3.8 Sejttenyésztés típusai

Sejttenyésztés során az egészséges vagy tumoros szövetből elkülönített sejteket fenntartják és szaporítják. Ennek három típusa lehet, a primer tenyésztés, a sejtörzs és a sejtvonat.

A primer tenyésztés valójában a tenyésztés kiinduló pontja. Az eredeti szervből, szövetből eltávolított sejteket izoláljuk egymástól és az extracelluláris mátrixtól, törekedve arra, hogy ugyanolyan típusú sejtek legyenek a tenyésztésben. Abban az esetben, ha minden feltétel adott a sejtek számára, akkor életképesek maradnak, sokszorozódnak, miközben élettani jellemzőiket is fenntartják (Sotepedia1).

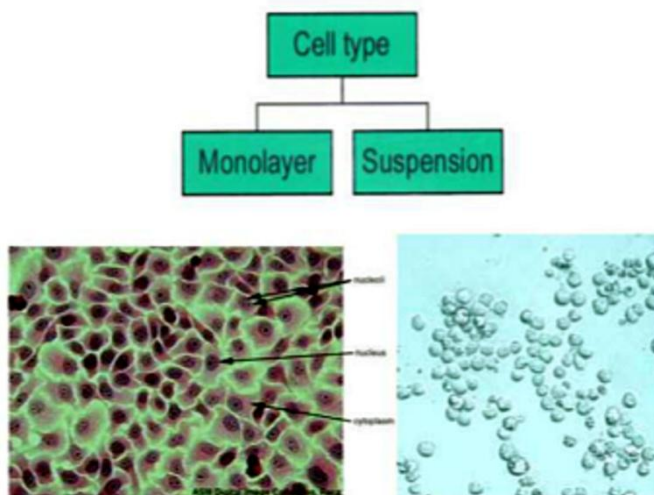
Hogyha mindez megvalósult sejtörzs keletkezik, mely véges élettartamú ugyan (maximum 1-2 hónapig tartható fenn), de ez idő alatt is megőrzi minden, a fajra jellemző fiziológiás tulajdonságot.

Sejtörzs helyett kialakulhat sejtvonat is. Ez, ha megfelelő körülmények között tartják, korlátlan életidejű lehet, de nem minden élettani és szöveti tulajdonságát őrzi meg (Sotepedia1).

A legelső *in vitro* körülmények között fenntartott emberi sejtvonat Henrietta Lacks nevéhez kapcsolódik. Ez a HeLa sejtvonat, melyet a hölgy méhnyak karcinómájából tenyésztettek ki 1951-ben (ELTE1).

3.9 Tenyészetek növekedése

Az in vitro sejttenyészetek az eredeti mintától függően lehetnek monolayer (egy sejt soros) vagy szuszpenziós tenyészetek (Lásd 11. ábra).



11. ábra: Monolayer és Szuszpenziós sejtek mikroszkópos képe (Sotepedia1)

A monolayer tenyészetek esetében a sejtek szoros sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatot igényelnek, vagyis valamilyen aljzatot és mátrixot kell biztosítanunk ezeknek a letapadásfüggő sejteknek.

A szuszpenziós tenyészet mindenek előtt a hemopoetikus sejtekre jellemző, amelyek sem mátrixot nem igényelnek, sem pedig szoros sejt-sejt kapcsolat nem jellemzi őket (Sotepedia1).

Ritkább esetben a nagy mértékben transzformált sejtek is fenntarthatók szuszpenzióban, mivel az ilyen sejt vonalak sejtjei már elvesztették a normális sejteket jellemző ún. kontaktgátlást is.

A kontaktgátlás azt jelenti, hogy a normális, letapadásfüggő sejtek szaporodva előbb-utóbb eléri egymást, tehát egy sejt számos másik sejtrel fog érintkezni, ekkor ezen sejtek további szaporodása gátolva lesz, de egyéb funkcióik nem sérülnek.

Ezzel szemben a transzformált sejteknél nincs kontaktgátlás, vagyis más sejteket elérve tovább osztódnak, így egymás tetejére növe több sejtsoros tenyészetet hozhatnak létre. Ezen felül a legextrémebb esetben szuszpenzióba jutva is tovább szaporodnak (Sotepedia1).

3.10 Passzálás

Bizonyos sejtszám elérése után a sejtosztódás leáll. Ilyenkor új felületet/teret kell adni a sejteknek. A tenyészet egy részét új tenyésztőedénybe visszük át és friss médiumot adunk hozzá, ez a passzálás, melynek két módja is lehet (ELTE1).

Szuszpenzióban növvő sejtek esetén többnyire elég, ha a sejtuszuszpenziót a friss médiummal egyszerűen a kívánt arányban meghígítjuk. A másik mód, ha a szuszpenzió lecentrifugálása és a felülúszó (régi médium) eltávolítása után a ideális mennyiségű friss tápoldatba vesszük fel a sejteket (Műszeroldal).

Letapadó sejtek passzálása általában akkor történik, ha a sejtek már minden rendelkezésükre álló területet benőttek. A kitapadó sejteket a passzálást megelőzően szuszpenzióba kell vinni, ehhez legtöbbször enzimekre (pl. tripszin) vagy kelátképző anyagokra (pl. EDTA: etilén-diamin-tetraacetát) van szükség. Gyakran együtt használják a kettőt. Tripszinezés során tripszinoldatot öntenek a letapadt médiummentes sejtekre, majd pár percig 37°C-on inkubálják őket, kevés médiummal leállítják a tripszin hatását, végül centrifugálás után friss médium mellett újra kihelyezik szaporodni őket (Műszeroldal).

3.11 Médiumok alapvető összetevői

A tápfolyadék (médium) szolgáltatja a sejteknek a természeteshez hasonló környezetet, éppen ezért sejttípusonként eltérő összetételű lehet, azok egyéni tulajdonságai alapján. Normál esetben a sejtek körül vér vagy sejtközi folyadék található. A mikrobáktól eltérően, az állati sejtek esetében többféle anyagnak kell alkotnia a médiumot.

Ilyen elengedhetetlen összetevők a glükóz, sóoldat, vitaminok, koenzimek, aminosavak, pH egyensúly fenntartásához szükséges pufferoldat és fenolvörös, lipidek, szérum és a befertőződés ellen védő antibiotikumok (Pécs 2010).

3.12 Szérum

A szérum a sejtmentesített vér.

Mivel az állati sejtek vérhez hasonló koncentrációt igényelnek, így nem csak a kis molekulájú anyagok kellene, de nélkülözhetetlen a vérfehérjék részvétele is, ezért valódi vérszérum alkalmazására van szükség. Ehhez újszülött állatok (pl. borjú) vérének steril körülmények között leveszik, és az ebből izolált szérumot a médiumba juttatják (Pécs 2010).

Azért használják az újszülött állatok vérének erre a célra, mert azoknak sokkal tisztább a vérszéruma, mint a kifejlett egyedeké. Utóbbiban már benne van minden védőoltás és fertőzés által kialakított immunfehérje, esetleg lappangó vírus és vírusfehérje (Pécs 2010).

Sajnos a médiumnak ez az alkotórésze elég drága, így az ezzel való kísérletek is. Révén, hogy az állatok nem egyformák, jobb lenne szérummentes tápoldattal dolgozni, technológiailag azonban még nem elég előrehaladott ez az ágazat (Pécs 2010).

3.13 Current-clamp módszer (áramzár módszer)

A sejt membránjának ellenállását az $R = U/I$ összefüggés szerint becsülhetjük: ehhez meg kell mérnünk hogy az adott nagyságú, a sejtbe injektált áram mekkora membránpotenciál-változást okoz. Ez véghezvihető úgy, hogy két mikroelektrodát használunk: egyet az áram injektálásához és egy másikat a membránpotenciál méréséhez. Ez a kísérleti felosztás a kételektrodás áramzár módszer.

Az áram injektálása és a membránpotenciál szimultán mérése egyetlen elektródán át is megvalósítható (egyelektrodás áramzár módszer).

A membránpotenciál méréséhez itt szem előtt kell tartanunk, hogy az elektródán át folyó áram és az elektróda ellenállása miatt az elektróda két vége között kimagasló potenciálkülönbség lép fel (például 1 nA áram és 50MΩ ellenállás esetén 50 mV). Erre két különböző megoldást alkalmaznak (EKTF).

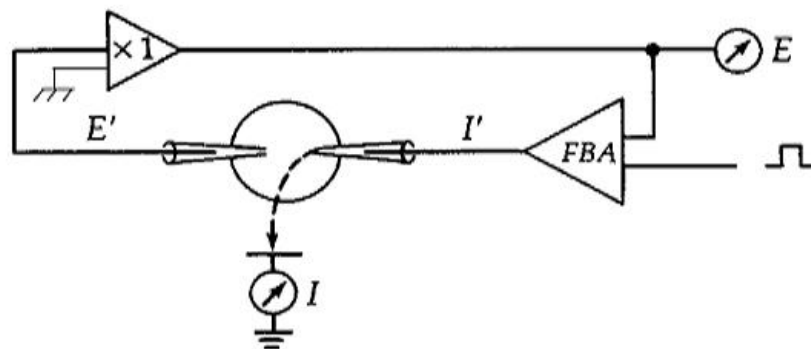
Az elsónél a mérendő potenciálkülönbségből egy áramkörrel folyamatosan levonják az elektródán eső feszültséget: ehhez eleinte a Wheatstone-híd elrendezésen alapuló áramkört használtak, így az erre a célra alkalmazott áramköröket bridgebalance (híd-egyensúly) áramköröknek nevezik. A másik megoldás a szaggatott (discontinuous) áraminjektálási módszer: az áram injektálásai nem folyamatosan történnek, hanem rövid impulzusokban.

Ha két egymást követő impulzus közti szünet elég hosszú ahhoz, hogy az elektróda kapacitásán összegyűlt töltés a sejt felé kiegyenlítődjön, akkor a szünetek végein az elektródán át folyó áram és az elektródát érő feszültség elhanyagolható: az ekkor mért potenciál azonos a membránpotenciállal. A szaggatott áraminjektálás előnye: a bridgebalance áramkörökkel ellentétben az elektróda ellenállásának változása itt nem eredményez mérési hibát (EKTF).

Hátránya: az impulzusok között eltelt időnek olyannyira minimálisnak kell lennie, hogy a sejt membránpotenciáljában ne okozzon jelentős hullámzást. A frekvencia növelésekor azonban csökkentjük az impulzusok és/vagy a közöttük hagyott szünetek hosszát, ezért az elektróda kapacitásának nem kitűnő kompenzációja miatt léphetnek fel mérési hibák (EKTF).

3.14 Voltage-clamp módszer (feszültségzár módszer)

Mivel a membránon fellépő feszültségváltozások önmagukban nem adnak elég információt az ingerület alatt bekövetkező ionáramok kinetikájáról, olyan módszert kellett kifejleszteni, amely az ionáramok direkt vizsgálatát teszi lehetővé. Ezért Marmont és Cole (1949) kifejlesztették, majd Hodgkin, Huxley és Katz továbbfejlesztették a Voltage-clamp módszert, melynek magyar elnevezése a feszültségzár (SZTE1).



12. ábra: A feszültségzár módszer működési elve (SZTE1)

A módszer abból áll (Lásd 12. ábra), hogy a feszültségregisztráló mikroelektrodát (E') egy erősítővel (X1) kötik össze, mely a feszültségregisztráléhoz (E) (oszilloszkóp) csatlakozik. Az erősítő kimenetét azonban egy visszacsatoló erősítőbe (FBA) is bevezetik, mely a másik mikroelektrodon (I') keresztül olyan erősségű áramot vezet a sejtbe, ami a membrán feszültségváltozását pontosan ellensúlyozza, így módon a membránpotenciál zár alá kerül (clamp). Innen a módszer neve (SZTE3).

A két erősítőnek értelemszerűen közös indifferens elektródja van a sejten kívül. A visszacsatoló erősítő áramát azonban nem csupán a feszültségelektrod szabhatja meg, hanem a kommand generátoron keresztül egy szabadon választott erősségű és irányú áramot küldhetnek a sejtmembránon keresztül, így annak potenciálját tetszőleges értéken fixálhatják (Holding potenciál).

Alaphelyzetben a sejt természetes nyugalmi membránpotenciálja az uralkodó. Depolarizáció hatására a sejt ingerületbe jön, végbemennek az ingerülettel kapcsolatos permeabilitási módosulások, de a membránpotenciál nem változik, mivel az áraminjektáló elektrod a membránpotenciál nyugalmi értékét visszaállítja és így transzmembrán-feszültségváltozás nem alakul ki. A membránpotenciált rögzítő áram erőssége viszont mérhető és a jelenleg folyó áramok algebrai összegével fog megegyezni (SZTE1).

A membránáram a bizonyos ionok áramaiból valamint a kapacitív áramból tevődik össze: $I_M = I_{Na} + I_K + I_C$. Csakhogy mivel a membránpotenciál-változás nulla, így a kapacitív árammal nem kell számolni csupán az egyes ionok áramaival: $I_M = I_{Na} + I_K$. Az összáramból más-más módszerekkel (pl. szelektív csatornablokkolókkal) el lehet különíteni az egyes ionok által vitt áramokat, s így a membrán ioncsatornáinak működését direkt tanulmányozhatjuk (SZTE1).

A módszer hatékonyságát fokozza az a tény, hogy a kommand generátoron át a membránpotenciál szabadon választható értékre konfigurálható és ily módon a feszültségfüggő ioncsatornák tetszőlegesen nyithatók illetve zárhatóak és az (I) árammérő műszeren közvetlenül mérhetők. Az egyes áramok nagyságát az állandó konduktancia és az őket megalkotó feszültségkülönbség (membránpotenciálból levonva az adott ion fordulási potenciálját) szorzata adja meg:

$$I_{Na} = g_{Na} m^3 h (E_M - E_{Na}) \quad I_K = g_K n^4 (E_M - E_K)$$

$$I_M = g_{Na} m^3 h (E_M - E_{Na}) + g_K n^4 (E_M - E_K) + g_L (E_M - E_L) = C \times dv/dt$$

A g_{Na} és a g_K a Na^+ és a K^+ konduktanciájának maximális értékét fejezik ki, amiket idő- és feszültségfüggő tényezőkkel összeszorozva megkaphatjuk az jelenlegi konduktanciát illetve az aktuális ionáramot. Az m , h és n a valószínűségi változók, amelyeknek értéke 0 és 1 között lehet, a membránpotenciál és az idő függvényében (SZTE1).

3.15 Patch-clamp módszer (folt-feszültségzár módszer)

A feszültségzár módszer továbbfejlesztett, lekicsinyített változata. Egy árammérő és injektáló erősítőt foglal magában, amely a hozzá kapcsolt mikroelektrod hegyét bármilyen szabadon választott potenciálon képes fenntartani a földhöz viszonyítva. A mikroelektrodot szívással rátapasztják a tanulmányozni kívánt sejt membránjára és annak négyzetmikronos felületéről lehet regisztrálni. Ilyen parányi területen többnyire csak 1-2 ioncsatorna található, ezért ha kinyílnak, akkor a regisztrátumon ezek ionáramai jelennek meg (SZTE2).

A regisztráláshoz szükséges követelmény az, hogy a mikroelektród rendkívül nagymértékben tapadjon a membránhoz, az oldalirányú ellenállásnak gigaohm nagyságrendűnek kell lennie. A bizonyos ioncsatornák áramai pA nagyságrendűek, konduktanciájuk a nS tartományba esik (SZTE2).

E módszerrel látott napvilágot az a felfedezés, hogy az ioncsatornák a nyitó feszültség körüli értéken egy pillanat alatt kinyílnak, egy darabig meghatározott erősségű áramot engednek át, majd pillanatszerűen záródnak. A jelenség hasonló a négyszögimpulzushoz, mely esetén pA nagyságrendű és 10-100 ms ideig tartó "mindent vagy semmit" jelenségről van szó. A csatornák egyszerű ohmikus szerkezetűek, melyekre nézve érvényes a következő képlet:

$$I = VG = V/R$$

I = áramerősség; V = feszültség; G = konduktancia; R = ellenállás

A csatorna-nyitó vagy -nyitva tartó feszültség hatása a nyitvatartási idő hosszában, a csatornanyitás valószínűségének növekedésében és az egycsatorna áram nagyságának a változásában rajzolódik ki (SZTE2).

4 Módszerek

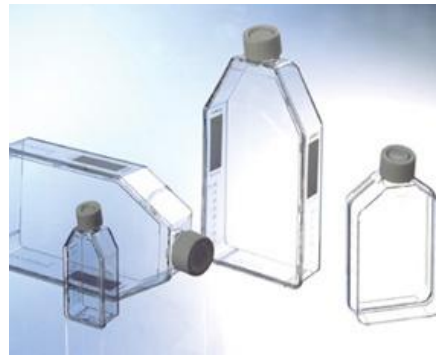
4.1 Anyagok és eszközök

4.1.1 Tenyésztéshez szükséges eszközök

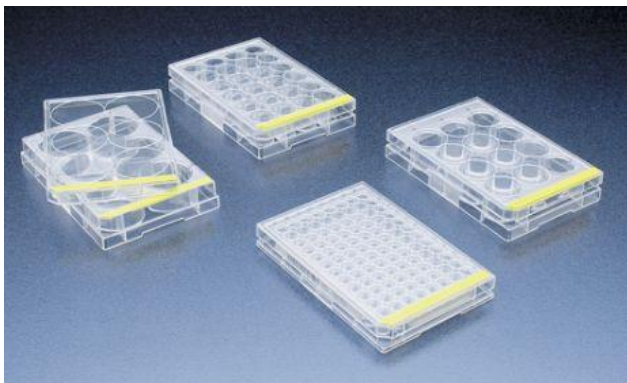
- 1) Tenyésztőedények: Petri-csésze (Lásd 13. ábra), Flaska (Lásd 14. ábra), Plate (Lásd 15. ábra) és Lombik (Lásd 16. ábra) (Czirók 2012).



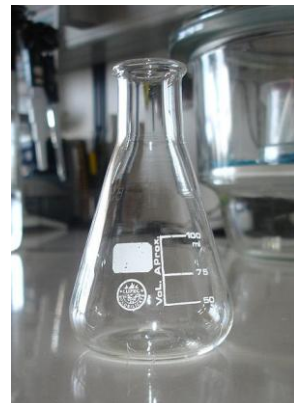
13. ábra: Petri-csésze (dnsafazekben.blog 2011)



14. ábra: Flaska (dnsafazekben.blog 2011)



15. ábra: Plate (dnsafazekben.blog 2011)



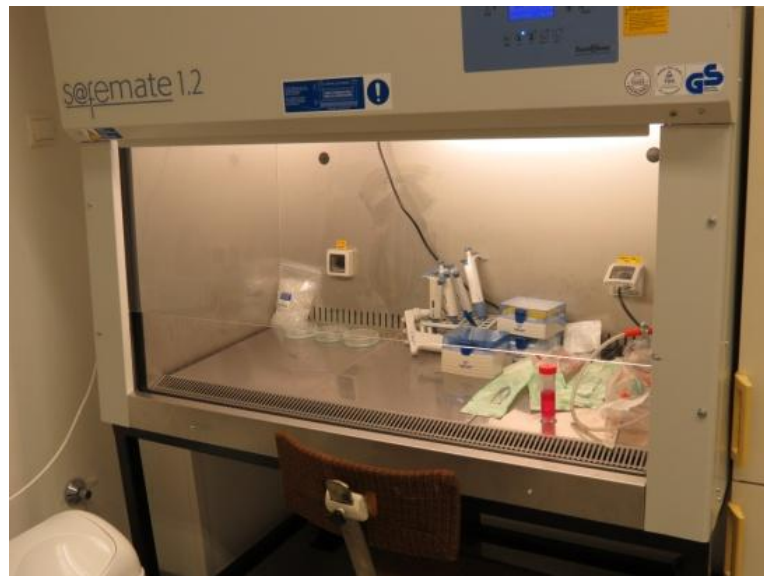
16. ábra: Lombik (Junglekey)

2) CO₂ inkubátor (Lásd 17. ábra)



17. ábra: CO₂ inkubátor (MedicalExpo)

3) Steril fülke (Lásd 18. ábra)



18. ábra: Steril fülke

4) Mikroszkóp

5) Centrifuga (Lásd 19. ábra)



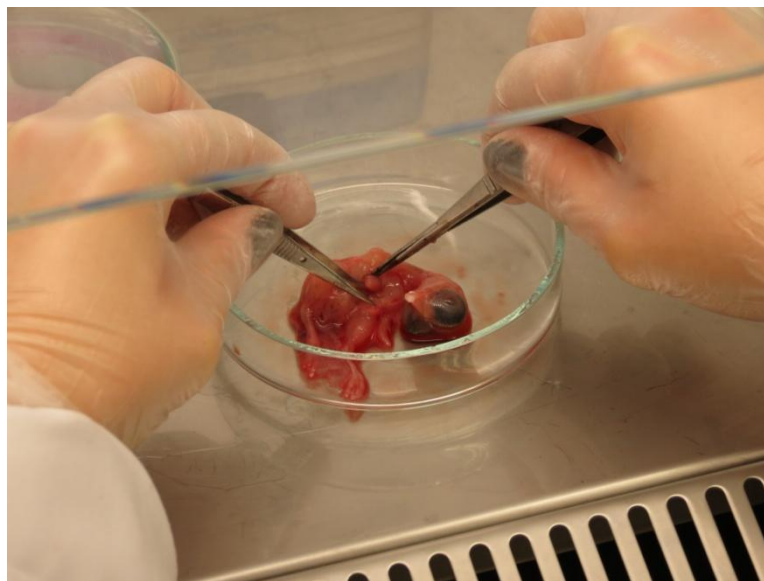
19. ábra: Centrifuga

4.2 Protokoll

4.2.1 1. nap

4.2.1.1 Csirke szív kipreparálása és tripszinbe helyezése

Kísérletünkhöz csirke embrió szívizomszövetét használtuk. A csirke embriót 13 napig keltettük, majd a tojásból kivéve steril Petri-csészébe helyeztük és kipreparáltuk a szívét (Lásd 20. ábra). Ezt követően a szívet izoláltuk, egy kevés médiumot öntve hozzá, zselet pengékkel feldaraboltuk és 0,05%-os tripszinbe (Sigma) helyeztük egy napig (Lásd 21. ábra).



20. ábra: Csirke szívizom kipreparálása



21. ábra: Feldarabolt szövet tripszinben

4.2.2 2. nap

4.2.2.1 Médium készítés

Gentamicin nevű antibiotikumot DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) médiummal (Lásd 22. ábra) 1000-szeresre hígítottuk. A DMEM piros színét a fenolftalein adja, mely pH indikátor, így a tenyészet befertőződése esetén sárgás színűvé válna, mivel a baktériumok savat termelnek.



22. ábra: DMEM médium (dnsafazekben.blog 2011)

A kapott médiumot kettőöntöttük így 2x500ml-t kaptunk. Az egyikbe nem tettünk semmit, ez lett a szérumentes médium. A másikhoz azonban 10%, azaz 50ml szérumot (fetalbovineserum) adtunk. Ezt a szérum tartalmú médiumot szintén kétfelé öntöttük (2x275ml), majd ezek egyikéből dolgoztunk a továbbiakban.

4.2.2.2 Sejtek disszociálása és kihelyezése fedőlemezre

Miután a tripszin jól meglazította a sejt-sejt közötti kapcsolatokat, először egy nagyobb, majd egy kisebb pipettával disszociáltuk a sejteket (Lásd 23. ábra). Centrifugáláshoz adtunk még a sejtekhez 5 ml szérum tartalmú médiumot, mely leállította a tripszin működését. Így a kapott 10-10,5ml oldatot, ugyanennyi vízzel ellensúlyozva a centrifuga ellentétes oldalába helyeztük. 5 percnyi lassú centrifugálással (500-1000-es fordulaton) leüleptítettük a sejteket.



23. ábra: Sejtek disszociálása

A centrifugálást követően a folyadékot vákuummal leszívattuk a sejtekről és 2 ml médiumot adtunk a leülepedett sejtekhez. Kissé összeráztuk az oldatot, majd kis Petri-csészékbe helyezett kerek fedőlemezekre pipettával elosztottuk (Lásd 24. ábra). A fedőlemezeket előzőleg alkohollal lefertőtlenítettük. A Petri-csészéket lefedtük és CO₂ inkubátorba helyeztük.

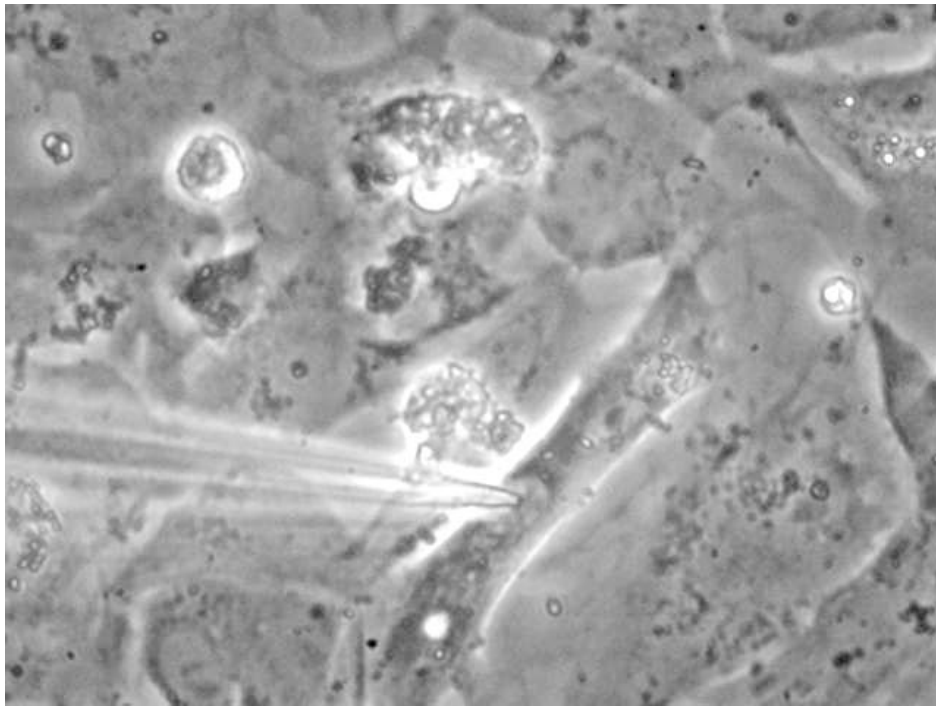


24. ábra: Disszociált sejtek kihelyezése Petri-csészékbe

4.2.3 Patch-clamp mérések

Az egész sejt patch-clamp méréseket egy hetes tenyészeteken végeztük. Erre az időpontra a tenyészetek megbízható spontán aktivitást mutattak és a disszociáció folyamán keletkezett sejttörmelék is többségében eltűnt a két médiumcsere folyamán. A letapadt sejteket tartalmazó 35 mm-es műanyag Petri-csészéket egy invertált fázis kontraszt mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük. A méréseket L15 médiumban végeztük, mivel ez a médium nem igényel CO₂-t a pH fenntartásához.

A mikroszkóp segítségével kiválasztottuk a mérni kívánt sejteket és egy 3 dimenziós mikromanipulátor (Burleigh, PCS5200) segítségével egy üveg elektródát helyeztünk a közelükbe (Lásd 25. ábra).

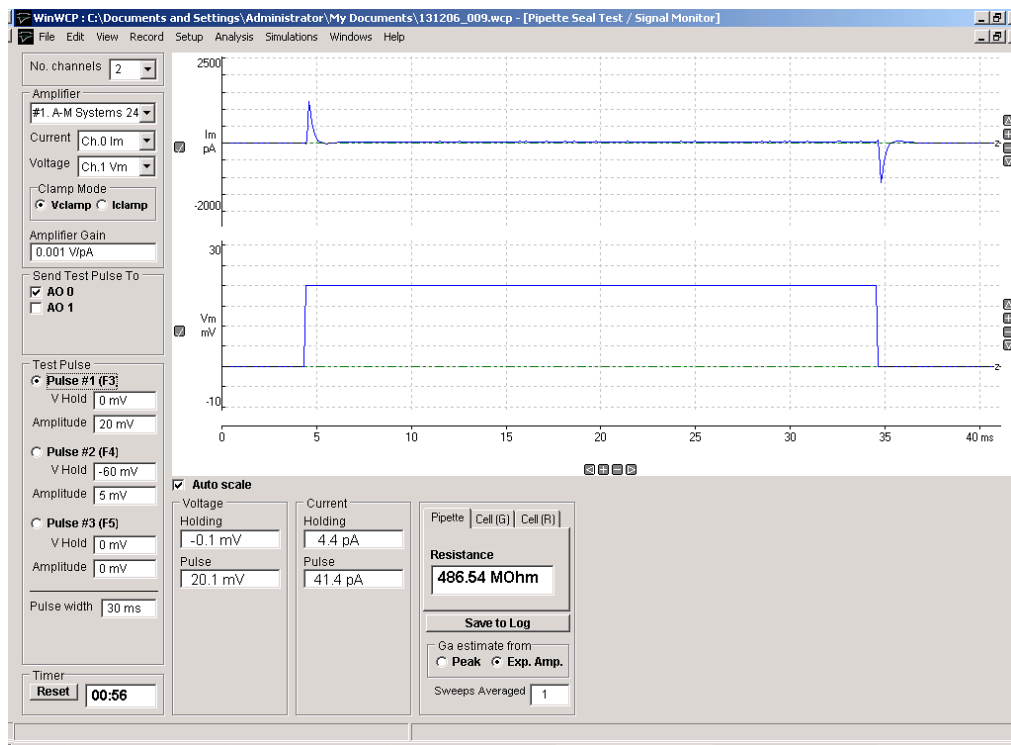


25. ábra: Az üveg elektróda érinti egy szívizomsejt felszínét a patch-clamp mérés folyamán

Az üveg elektródákat egy Shutter P97-es elektróda húzóval készítettük, a csúcs mérete 1-2 μm volt. Az elektródákat intracelluláris oldattal töltöttük fel, melynek összetétele a következő volt (mM-ban): 140 K-gluconate, 1 EGTA, 2 MgCl_2 , 5 ATP, 10 HEPES. Ez az oldat a fiziológias intracelluláris környezetet utánozta.

Az elektróda ellenállása 10-15 Megaohm volt, melyet a nullponti feszültség beállítása után hozzáérintettük a sejtmembránhoz, megvártuk, amíg a gigaseal kialakul (a membrán leszigeteli az elektróda nyílását, vagyis az elektróda ellenállása Gigaohm lesz) majd szívással kilyukasztottuk a sejtmembránt.

Az elektróda és a sejtmembrán ellenállását 20 mV feszültséglépcső rákapcsolásával monitoroztuk (sealtest) (Lásd 26. ábra). Ezután a WinWCP program segítségével feszültségzár vagy áramzár mérést végeztünk.



26. ábra: Seal test illusztráció. 20 mV feszültség lépcsőt alkalmaztunk egy modellsejtre, amely a valós sejtet modellezi. Alsó görbe: az alkalmazott feszültség. Felső görbe: a kiváltott áram. Megfigyelhetők a kapacitív tranziens tüskék, amelyek a sejtmembrán kapacitása miatt jelentkeznek. Ezek a görbék az intracelluláris állapotot tükrözik (a sejtmembrán már kilyukadt, vagyis az elektróda a sejten belüli állapotokat méri)

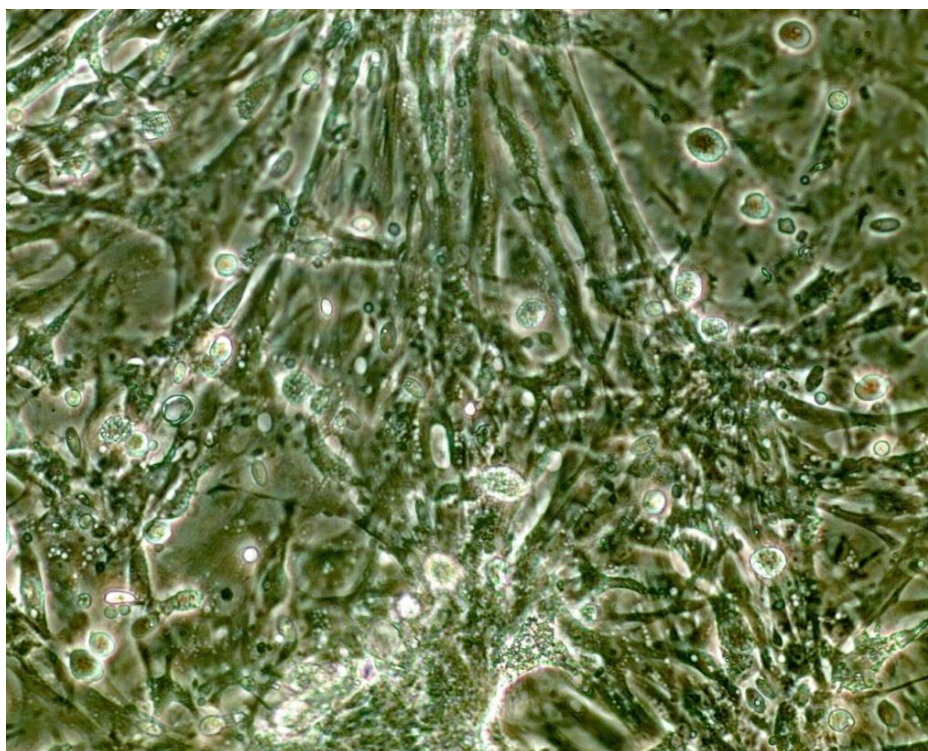
5 Eredmények

5.1 Tenyészetek

Csirke embrióból származó szívizom sejtek, miután minden szükséges feltétel adott volt számukra, sikeresen letapadtak, primer tenyészetek alakultak ki.

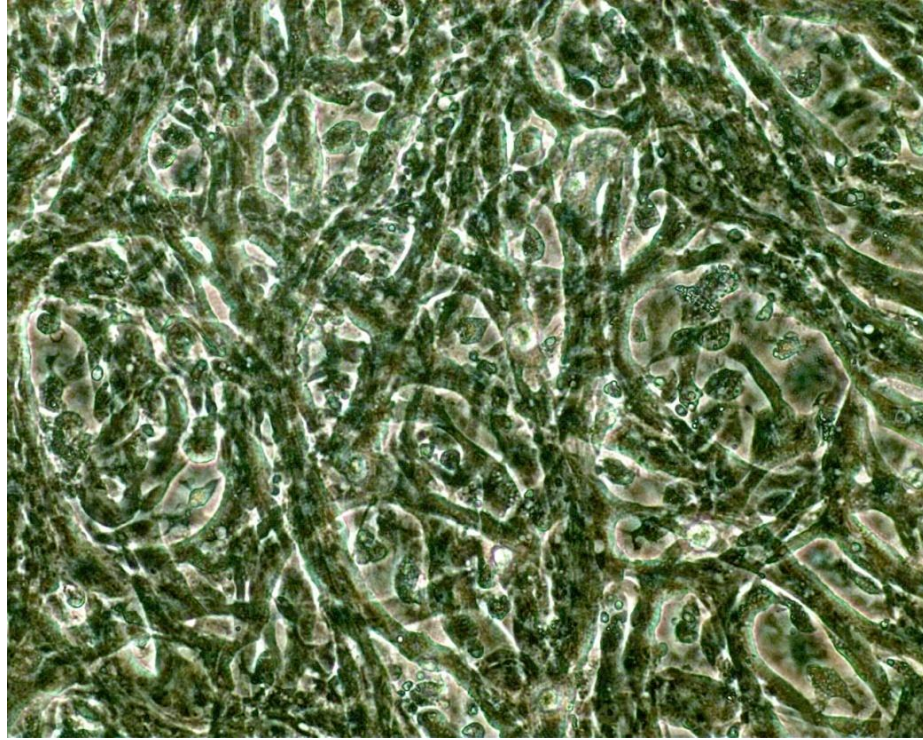
Fiziológiás tulajdonságaik meglétét bizonyítva két-három nap után már spontán aktivitást is meg lehetett a sejteken figyelni.

Az alábbi fényképen egy 1 hetes tenyészet látható (Lásd 27. ábra). Felvétel közben igazán látványos szívizomsejt összehúzódásokat észleltem.



27. ábra: 1 hetes csirke szívizom tenyészet mikroszkópos képe

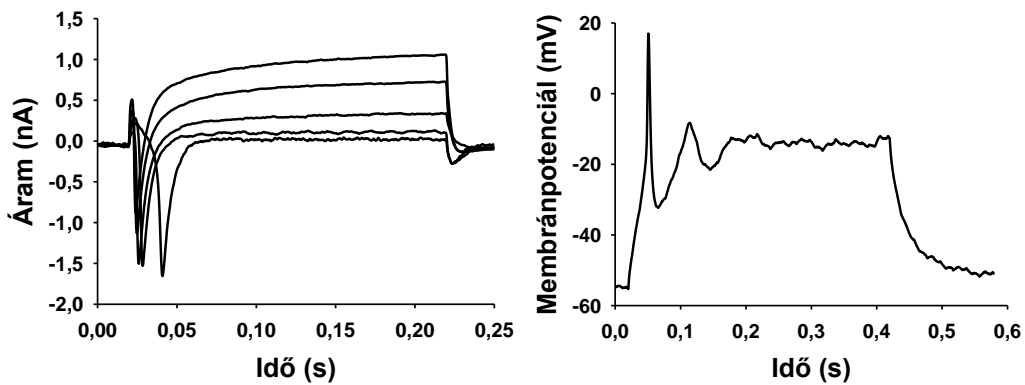
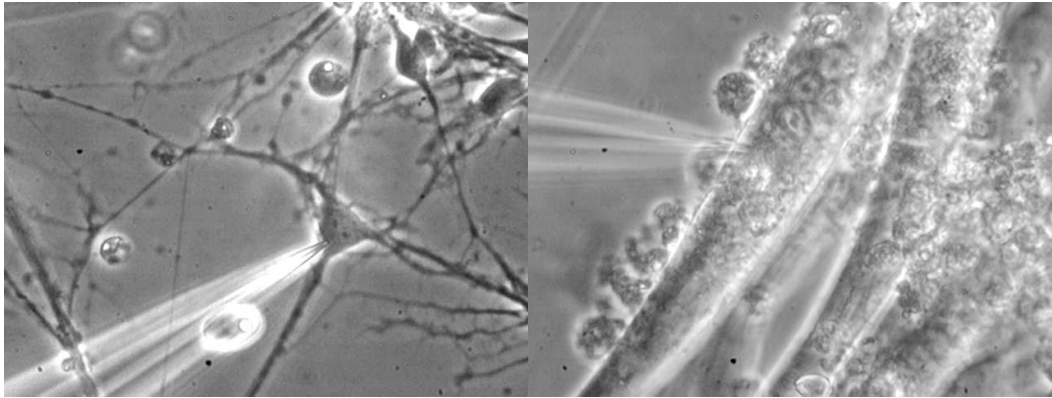
Néhány esetben 1 hónapig is életképesek voltak a sejtek (Lásd 28. ábra). Révén, hogy jóval idősebb sejtörzsekről van szó, ezeken a tenyészeteken jelentősen több sejt keletkezett, mint a fiatalabbakon.



28. ábra: 1 hónapos csirke szívizom tenyészet mikroszkópos képe

5.2 Patch-clamp

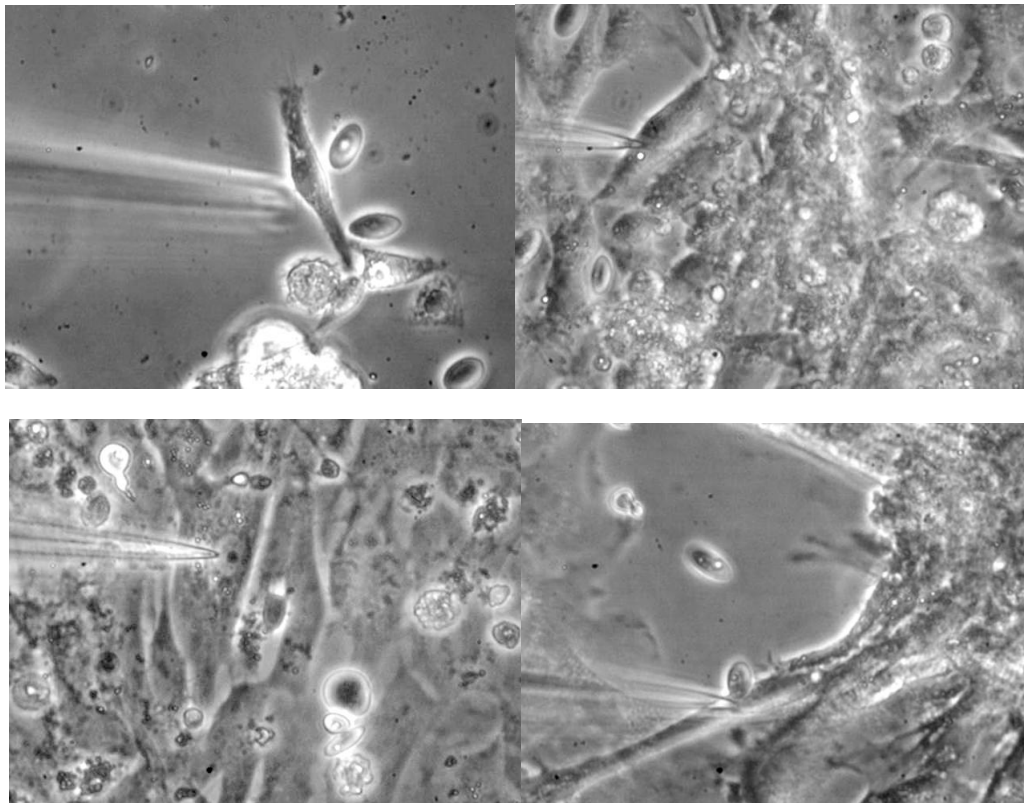
Csirke szívizomsejteken kb. 30 kísérletből egyetlen sikeresnek mondható teljes sejt patch-clamp mérést sem sikerült végrehajtanunk, annak ellenére, hogy korábban mind neuronokon, mind C2C12 vázizomrostokon sikeresen beállítottuk ezt a mérési módszert (Lásd 29. ábra).



29. ábra: Korábbi patch-clamp mérések idegsejteken (bal felső kép) és C2C12 vázizom sejteken (jobb felső kép és az alsó panelok). Balalsó panel: ioncsatorna áramok feszültség zár módszerrel mérve, a membránpotenciál -60 és +30 mV között változott. Jobb alsó panel: akciós potenciál áramzár módszerrel mérve.

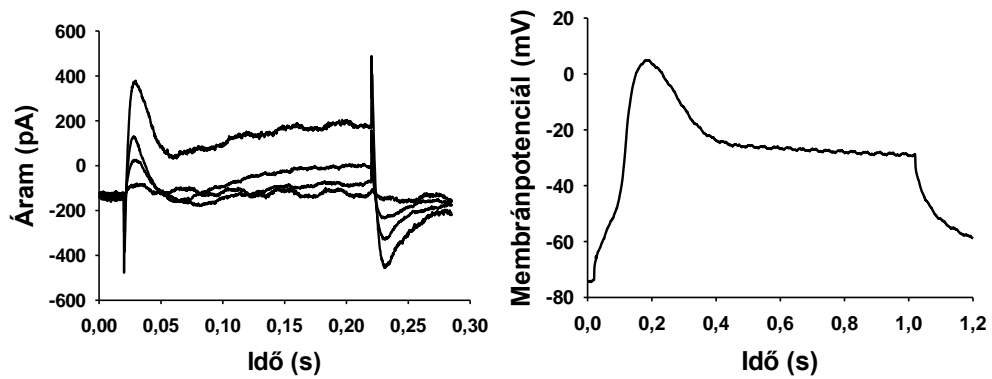
Megfigyelhető volt, hogy nagyon nehezen tapadt hozzá az elektróda a sejtekhez (formálódott a gigaseal), a kísérleteknek legalább a felében nem sikerült létrehozni ezt a konformációt. Azokban az esetekben, amikor a gigaseal létrejött, nagyon nehéz volt átlyukasztani a membránt, ezen alkalmak kb. 70%-ában nem a membrán lyukadt át, hanem valahol oldalt, vagyis elveszett a gigaseal. Ezt a kapacitív tranziens hiánya (Lásd 26. ábra, a módszereknél) jelezte. A néhány sikeresnek tűnő mérésnél sem sikerült szignifikáns ionáramokat mérnünk, még akkor sem, amikor a sejt láthatóan összehúzódott, amikor megközelítettük az elektródával, tehát minden bizonyosan szívizomsejt volt.

A tenyészetekben rendkívül változatos sejt-morfológiákat figyelhettünk meg (Lásd 30. ábra). Az elektrofiziológiai eredmény nélkül csak az összehúzódások alapján tudhattuk biztosra, melyik a szívizomsejt. Sajnos szobahőmérsékleten, ahol a méréseket végeztük, a szívizomsejtek spontán aktivitása leállt, úgyhogy csak az elektródából szivárgó magas koncentrációjú K^+ -ionok készítettek néhány sejtet összehúzódásra.



30. ábra: Különböző morfológiát mutató sejtek csirke szívizom tenyészetben

Abban az egy-két sejtben, amelyekből sikerült ionáramokat és akciós potenciált mérni, jellemzően az áramok amplitúdója alacsony volt, az áramok lassan fejlődtek ki és lassan inaktiválódtak (Lásd 31. ábra). Elképzelhető, hogy ezek az áramok nem nátrium, hanem kalcium áramok voltak. Ennek megfelelően az akciós potenciál is sokkal lassabb (szélesebb) volt, mint amit vázizomrostokon korábban mértünk.



**31. ábra: Teljes sejt patch-clamp mérések tenyésztett csirke szívizomsejteken.
 Bal panel: feszültségzár mérés, a membránpotenciál -70 és +30 mV között
 változott. Jobb panel: Akciós potenciál.**

6 Megvitatás

6.1 Csirke szívizom tenyészet

Két hetes csirkeembriókat használtunk, melyekből kivett szívizomsejtek túléltek a viszonylag bonyolult (kétnapos) disszociációs eljárást és kb.2óra alatt letapadtak a kezeletlen műanyag tenyészfelszínre.CO₂ inkubátorban tartva 2-3 napon belül a sejtekenspontán aktivitás is megfigyelhető volt és az ilyen állapotban fennmaradt tenyészetek fiziológiai tulajdonságokat mutatva több mint 1 hónapig is túléltek.

A csirke elsődleges sejtenyészet gyakran használt farmakológiai módszer, mivel jól reprodukálható, ráadásul a tojások könnyen beszerezhetők, a tenyészetek pedig viszonylag egyszerűen elkészíthetők és fenntarthatók.

Vannak, akik az emlős tenyészeteketpreferálják, mivel a madarakon végzett kísérletek nem adnak biztoseredményt az emlősökre vonatkoztatva.A mi tenyésztő-körülményeink közöttstabilan lehetett fiziológiailag aktív sejteket készíteni, a steril fülkének és eszközöknek köszönhetően alacsony volt a befertőződés veszélye, a sejtek gyors szaporodása pedig lehetővé tettea mielőbbi tanulmányozásukat.

Jövőbeli terveink között szerepel, hogy további vizsgálatokat folytassunk ebben a témában, mivel az általunk használt módszer kiemelt jelentőséggel bír a gyógyszeripar számára, mind toxikológiai, mind pedig farmakológiai eredmények szempontjából.

6.2 Szívizomsejtek patch-clamp vizsgálata

Sajnos a patch-clamp mérések végrehajtása a tenyésztett szívizom sejteken sokkal több nehézséget okozott, mint ahogyan azt az előzetes tapasztalataink alapján vártuk. Kontrakció híján nehéz volt egyértelműen kiválasztani a szívizomsejteket a tenyészetből. Az elsődleges tenyészetben, mint a szívből, legalább 50%-ban fibroblasztok is voltak, ráadásul a fibroblasztok gyorsan osztódnak, míg a szívizomsejtek sokkal lassabban, ha osztódtak egyáltalán.

Nagyon nehéz volt a patch-clamp mérések végrehajtása, gyakran nem sikerült a seal formálás, és nagyon sokszor elvesztettük a sejtet, mielőtt mérhettünk volna rajta. Ennek oka valószínűleg a szívizomsejtek eltérő membránjában keresendő. Elképzelhető, hogy másképp húzott elektródákat kellett volna használnunk ezekhez a kísérletekhez, azonban ennek a kikísérletezésére (próba-szerencse alapon) nem volt már időnk.

A részlegesen sikeres mérésekből látható volt, hogy a mi tenyészetekben a szívizomsejtek sokkal lassabb akciós potenciálokat generáltak, mint a vázizomsejtek és a neuronok, ez meg is felelt az előzetes várakozásainknak.

Az is nyilvánvaló, hogy a módszer farmakológiai felhasználása még sok előkísérletet igényel. Mind a tenyészet, mind a patch-clamp mérés paramétereit optimalizálni kell.

7 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Nyugat-magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központ Állattani Tanszékének a kutatási lehetőséget és konzulensemnek Dr. Molnár Péter, egyetemi docensnek a sok segítséget mind a kísérletekben, mind pedig a szakirodalmi feldolgozásban.

Szeretném még megköszönni Szüleimnek, Páromnak és Barátaimnak, hogy támogattak.

8 Irodalomjegyzék

- 1.) Babosi (2010). "Így működik az EKG készülék":
http://babosi.blog.hu/2010/10/31/igy_mukodik_az_ekg_keszulek
- 2.) Bárándi László Viktor "Ingerképzés és Ingerületvezetés, EKG":
http://phys.dote.hu/files/oktatas/molbiol_MSc/kardioresp/eloadasanyagok/Ingerkepzes_es_ingeruletvezetes_EKG.pdf
- 3.) Brassai Attila, Bán Erika-Gyöngyi, Dóczi K. Zoltán (2008). "Orvosi gyógyszerstan" jegyzet:
<http://sugi.messwith.me/download.php?fname=./farmakologia/vizsga/farmakologia%20jegyzet.pdf>
- 4.) Czirók András, Hegedűs Balázs, Haiman Ottó, Cseh Zoltán, Vicsek Tamás (2012). "Sejttenyészetek in vitro számítógépes videomikrográfiaja és fizikai elemzése": <http://virag.elte.hu/kurti/mikrosz2.html>
- 5.) dnsafazekben.blog (2011). "Sejttenyésztés":
<http://dnsafazekben.blog.hu/2011/03/15/sejttenyesztes>
- 6.) Ehardt Andrea (2013). "Betegvizsgálat: Mit mutat az EKG?":
<http://www.egeszsegkalauz.hu/diagnosztika/betegvizsgalat-mit-mutat-az-ekg-107404.html>
- 7.) EKTF. "Intracelluláris elektrofiziológia":
<http://www.ektf.hu/~emri/elettan2gyak/intracell.pdf>
- 8.) ELTE1. "Emlős sejtek tenyésztése.":
http://physiology.elte.hu/gyakorlat/BSc_30h/Cell_cultivation.pdf
- 9.) ELTE2. "Madarak.":
http://anatomia.elte.hu/Okt/Anatpharm/08_Madarak/Madarak.doc
- 10.) Junglekey. "Lombik.":
<http://www.junglekey.fr/search.php?query=Erlenmeyer&type=image&lang=fr®ion=fr&img=1&adv=1>
- 11.) Első Láncszem Kft. "A szív felépítése és működése.":
<http://elsosegely.csutibuli.hu/temakorok/oktatas/a-sziv-felepitese-es-mukodese>

- 12.) MedicalExpo: <http://www.medicalexpo.de/prod/nuaire/co2-labor-inkubatoren-wassermantel-80404-516486.html>
- 13.) Merke. "Matthias Schleiden.":
http://www.merke.ch/biografien/biologen_en/schleiden.php
- 14.) Mozaikweb. "A szív szerkezete és működése.":
http://www.mozaweb.hu/Lecke-Biologia-Biologia_11-A_sziv_szerkezete_es_mukodese-102546
- 15.) Műszeroldal. "Sejttenyésztési alapismeretek.":
<http://www.muszeroldal.hu/measurenotes/sejttenyesztes.pdf>
- 16.) Neal M. J. (2000). "Rövid farmakológia", B+V Lap- és Könyvkiadó kft., ISBN: 963 7746 32 3
- 17.) NNDB. "Theodor Schwann.":
<http://www.nndb.com/people/357/000096069/>
- 18.) Pécs, D. M. (2010). "A Biotechnológia természettudományi alapjai":
<http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/BiotechManager/1%20Genetikai%20alapotok.pdf>
- 19.) Pharmindex: <http://www.pharmindex-online.hu/gyogyszerkereso/atc-lista/szivre-hato-szerek-C01>
- 20.) Soós Pál, Szelid Zsolt, Bagyura Zsolt, Merkely Béla (2011). "A szív és érrendszeri megbetegedések magyarországi epidemiológiája" Semmelweis Egyetem, Budapest: http://semmelweis-kutatoegyetem.hu/wp-content/uploads/2012/10/Kardiovaszkularis_strategiai_terv-logokkal.pdf
- 21.) Sotepedia1. "Sejttenyésztés.":
http://sotepedia.hu/_media/aok/targyak/immun_5hetsejttenyesztesdoc_1_.doc
- 22.) Székely Andrea (2007). "Feszültségfüggő ioncsatornák elektrofiziológiai vizsgálata" Ph.D. Értekezés, Debreceni Egyetem
- 23.) Szentesi Péter (2009). "A szívizomsejtek ionáramai." DE OEC Élettani Intézet:
http://phys.dote.hu/files/oktatas/molbiol/modellezes/eloadasanyagok/Sziv_i oncsatornak.pdf

- 24.) SZTE1. "A feszültségzár módszer (Voltage-clamp).": <http://phys.bio.u-szeged.hu/DT/elettan/ch03s02.html>
- 25.) SZTE2. "A folt-feszültségzár (Patch-clamp) módszer.": <http://phys.bio.u-szeged.hu/DT/elettan/ch03s03.html>
- 26.) SZTE3. "A szív élettana.": <http://www.phys.szote.u-szeged.hu/edu/hungara/jegyzet/sziv1c.pdf>
- 27.) Wikipedia1 (2013). "A szív élettana":
http://hu.wikipedia.org/wiki/A_sz%C3%ADv_%C3%A9lettana
- 28.) Wikipedia2 (2013). "Szívciklus":
<http://hu.wikipedia.org/wiki/Sz%C3%ADvciklus>
- 29.) Wikipedia3 (2013). "Emberi szív diagramja":
http://hu.wikipedia.org/wiki/F%C3%A1jl:Diagram_of_the_human_heart_hu.svg
- 30.) Wikipedia4 (2013). "Cardiac action potential.":
http://en.wikipedia.org/wiki/Cardiac_action_potential