ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μεμβρανικές ιδιότητες των καρδιακών κυττάρων της προνύμφης *Drosophila melanogaster*. Μια ηλεκτροφυσιολογική μελέτη. »

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπων: Κόνσουλας Χ., Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΑΘΗΝΑ, 2008

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ,
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΤΙΣ
ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μεμβρανικές ιδιότητες των καρδιακών κυττάρων της προνύμφης *Drosophila melanogaster*. Μια ηλεκτροφυσιολογική μελέτη. »

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπων: Κόνσουλας Χ., Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Τριμελής επιτροπή

1. **Κόνσουλας Χ.** Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
2. **Πογιατζή-Δάβαρη Α**. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
3. **Σκουλάκης Ε**. Ερευνητής Γ΄, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, με υπεύθυνο τον Καθηγητή Κόνσουλα Χ..
Η εργασία αυτή ξεκίνησε τον Ιανουάριο του 2008 και ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο του 2008, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Νευροεπιστημών του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστήμιου της Κρήτης.

ΑΘΗΝΑ 2008

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήταν αδύνατη δίχως την συμβολή των μελών της τριμελούς επιτροπής και ιδίως του επιβλέποντος Καθηγητή Κόνσουλα Χρήστου και της Αν. Καθηγήτριας Πογιατζή-Δάβαρη Αφροδίτης, οι οποίοι έθεσαν όλες τις παραμέτρους των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, ενώ συμπαραστάθηκαν και βοήθησαν ακούραστα την όποια δική μου προσπάθεια.

Παρόλο που η εργασία αυτή δεν αντιστοιχεί επακριβώς στο θεματικό πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, μια που αφορά την καρδιακή λειτουργία της Δροσόφιλας, αποτελεί μια καινοτομία στη μελέτη της βηματοδότησης των καρδιακών κυττάρων στο μοντέλο αυτό. Εξάλλου, η ενδελεχής κατανόηση των μεμβρανικών ιδιοτήτων και των αρχών που διέπουν την ικανότητα του αυτοματισμού και της ρυθμικότητας των κυττάρων της καρδιάς είναι σημαντική για την εξαγωγή συμπερασμάτων, και την ενέπνευση μελλοντικών ερευνών και σε άλλα αυτόματα κύτταρα, όπως αυτά που εντοπίζονται στο νευρικό σύστημα. Η πειραματική τεκμηρίωση των βασικών βιολογικών μηχανισμών και των αρχών της αυτοματίας και της ρυθμικότητας, είναι πρωταρχικής ερευνητικής σπουδαιότητας, αν αναλογιστεί κανείς ότι η βηματοδότηση της καρδιάς και του εγκεφάλου αποτελεί τον θεμέλιο λίθο της ίδιας της ανθρώπινης –και όχι μόνο- ζωής.

Στα αδέρφια μου Ελένη, Σταύρο και Μάνο και στο Λάμπρο, που ήταν κοντά σε όλα τα άσχημα και ευθύνονται για τα περισσότερα από τα όμορφα…

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ **3**

Ι. ΤΟ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΩΝ **3**
1. ΓΕΝΙΚΑ 3
2. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΒΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ 7
3. ΡΕΥΜΑΤΑ ΒΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 9
4. ΜΗΧΑΝΕΣ ΡΟΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΚΑΡΔΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 15

ΙΙ. ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑΣ
1. ΓΕΝΙΚΑ 18
2. ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΌ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ 19
3. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΣΤΗ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑ 21

ΣΚΟΠΟΣ 25

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 27

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 34

ΓΕΝΙΚΑ 34

Α. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΟΝΤΩΝ 34
α. Αποτελέσματα ολικής αποστέρησης του νατρίου. 35
β. Αποτελέσματα αποστέρησης ή ελάττωσης του ασβεστίου. 37

Β. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΔΙΑΥΛΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ. 41
α. Ρόλος του νικελίου 41
β. Αποτελέσματα επίδρασης βεραπαμίλης. 42
γ. Αποτελέσματα επίδρασης νιφεδιπίνης 47

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΛΙΑΣ SERCA 49
α. Αποτελέσματα επίδρασης CPA στην άγριου τύπου προνύμφη της Δροσόφιλας. 49
β. Αποτελέσματα επίδρασης CPA στις προνύμφες με τη μετάλλαξη kum^{170} πριν την πραγματοποίηση θερμικού σοκ. 51
γ. Αποτελέσματα επίδρασης CPA στις προνύμφες με τη μετάλλαξη kum^{170} μετά την πραγματοποίηση θερμικού σοκ. 54

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 57

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 67

ABSTRACT 69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **70**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 72

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

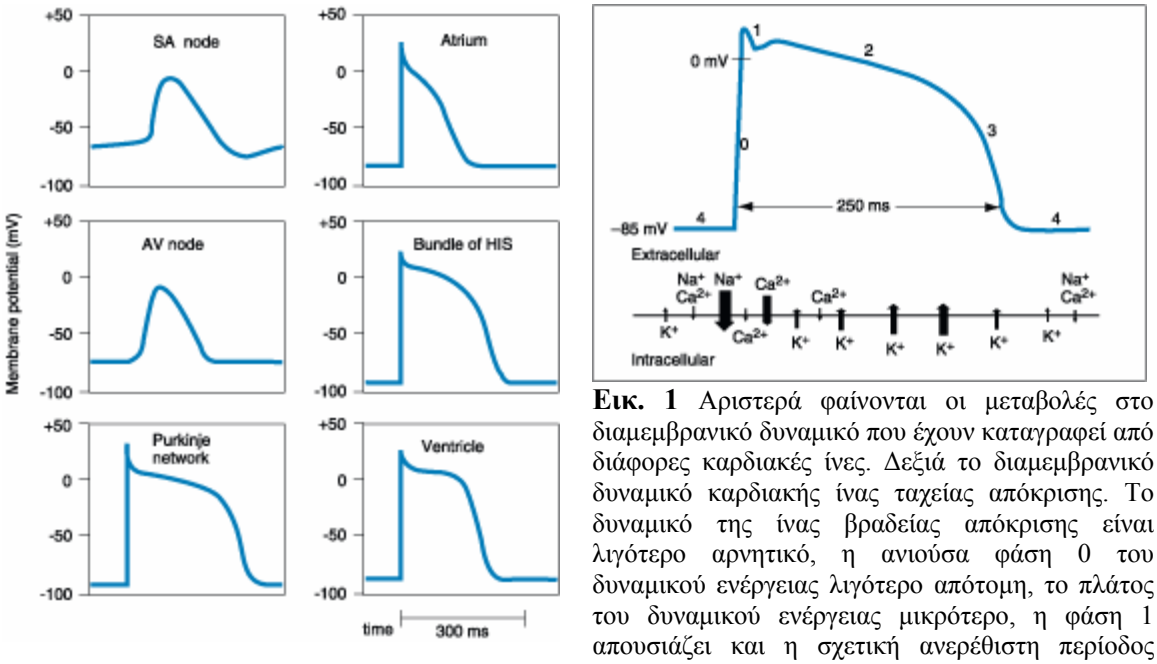
Ι. ΤΟ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΩΝ

1. **ΓΕΝΙΚΑ**

Το καρδιαγγειακό σύστημα των σπονδυλωτών, αποτελείται από μια αντλία, την καρδιά, ένα μυώδες όργανο που με επαναλαμβανόμενες ρυθμικές συσπάσεις διοχετεύει το αίμα στα αγγεία, μια σειρά από διοχευτευτικούς και συλλεκτικούς σωλήνες που καταλήγει σε ένα εκτεταμένο σύστημα αγγείων με λεπτά τοιχώματα (τριχοειδή), που επιτρέπουν την ανταλλαγή ουσιών μεταξύ των ιστών και του αίματος. Παρόλο που η καρδιακή διοχέτευση είναι διακοπτόμενη, η ροή προς την περιφέρεια είναι συνεχής. Αυτό συμβαίνει επειδή η αορτή λόγω των ελαστικών ιδιοτήτων της, όταν υποδέχεται το αίμα που εξωθείται κατά τη συστολή διατείνεται, ενώ στη συνέχεια κατά τη διαστολή, όπου παύει να δέχεται αίμα, τα τοιχώματά της επαναφέρονται σταδιακά και προωθούν το αποθηκευμένο αίμα προς τα εμπρός.
Στον άνθρωπο ειδικότερα, η καρδιά αποτελείται από δύο αντλίες σε σειρά: τη δεξιά κοιλία που προωθεί το αίμα μέσα στους πνεύμονες για ανταλλαγή αερίων και την αριστερή κοιλία που παροχετεύει το αίμα διαμέσου της αορτής σε όλους τους άλλους ιστούς του σώματος. Ένα σύστημα βαλβίδων με γλωχίνες, εξασφαλίζει τη μονόδρομη ροή του αίματος από τους κόλπους προς τις κοιλίες και την ομαλή κυκλοφορία προς όλες τις κατευθύνσεις, σε συνεργασία με ένα δίκτυο αγωγών και τριχοειδών διαταγμένων εν σειρά και εν παραλλήλω.
Τα φαινόμενα βέβαια που οδηγούν στην απρόσκοπτη αλληλουχία συστολών και διαστολών την καρδιά, βασίζονται σε ηλεκτρικά φαινόμενα όχι πολύ διαφορετικά από αυτά που συναντιούνται στα νευρικά και τα μυικά κύτταρα, τουλάχιστον ως προς τις βασικές τους αρχές και τα διάφορα ιοντικά γεγονότα που τα προκαλούν. Το εσωτερικό της μεμβράνης των καρδιακών κυττάρων των κοιλιών για παράδειγμα, είναι ηλεκτραρνητικότερο κατά 90 mV περίπου από το εξωτερικό τμήμα της. Όταν ένα τέτοιο κύτταρο διεγερθεί, η κυτταρική του μεμβράνη εκπολώνεται ταχύτατα και η διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης τείνει να εξαφανιστεί, μέχρι που αναστρέφεται και τελικά το εσωτερικό της μεμβράνης γίνεται κατά περίπου 20 mV ηλεκτροθετικότερο. Αυτή η ταχεία ανιούσα φάση του δυναμικού ενέργειας (ΔΕ), χαρακτηρίζεται ως **φάση μηδέν**. Κατόπιν εμφανίζεται μια σύντομη περίοδος μερικής επαναπόλωσης (**φάση 1**) και ακολουθείται από ένα υψίπεδο διάρκειας 0,2 sec περίπου (**φάση2**). Στη **φάση 3** το δυναμικό γίνεται ξανά αρνητικό προοδευτικά. Το διάστημα από την ολοκλήρωση της επαναπόλωσης, μέχρι την έναρξη του επόμενου ΔΕ λέγεται διαστολικό δυναμικό ηρεμίας ή **φάση 4**. Σημειωτέων ότι η φάση 0 προηγείται της ανάπτυξης δύναμης από τον καρδιακό μυ και η επαναπόλωση ολοκληρώνεται σχεδόν ταυτόχρονα με το μέγιστο της δύναμης συστολής (Vassalle M. 1977, Noble D. 1983, Irisawa H. 1987)

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, δύο τύποι δυναμικών ενέργειας μπορούν να καταγραφούν στην καρδιά. Ο ένας τύπος, η ταχεία απόκριση (δεξιά) εμφανίζεται στις κολπικές και τις κοιλιακές ίνες του μυοκαρδίου και στις ίνες Purkinje των κοιλιών. Ο άλλος τύπος , η

βραδεία απόκριση απαντά στο φλεβόκομβο (sinoatrial node) –φυσικός βηματοδότης της καρδιάς- και τον κολποκοιλιακό κόμβο (atrioventricular node) τον ιστό που άγει τον καρδιακό παλμό από τους κόλπους στις κοιλίες (Powell T, 1980, Irisawa H. 1987). Ο φλεβόκομβος, αποτελεί τμήμα του δεξιού κόλπου (επιμήκης λωρίδα πλάτους 3 mm, μήκους 15 mm και πάχους 1mm) και εντοπίζεται στο οπισθοπλάγιο τμήμα του δεξιού κόλπου, κάτω από την είσοδο της άνω κοίλης φλέβας. Ο κολποκοιλιακός κόμβος, είναι μια ομάδα κυττάρων που εντοπίζονται στο κάτω μέρος του κολποκοιλιακού διαφράγματος, πίσω και δεξιά.



Εικ. 1 Αριστερά φαίνονται οι μεταβολές στο διαμεμβρανικό δυναμικό που έχουν καταγραφεί από διάφορες καρδιακές ίνες. Δεξιά το διαμεμβρανικό δυναμικό καρδιακής ίνας ταχείας απόκρισης. Το δυναμικό της ίνας βραδείας απόκρισης είναι λιγότερο αρνητικό, η ανιούσα φάση 0 του δυναμικού ενέργειας λιγότερο απότομη, το πλάτος του δυναμικού ενέργειας μικρότερο, η φάση 1 απουσιάζει και η σχετική ανερέθιστη περίοδος εκτείνεται αρκετά μέσα στη φάση 4.
(http://rezidentiat.3x.ro/eng/tulbritmeng.htm)

Δυναμικό ηρεμίας

Το δυναμικό ηρεμίας ή φάση 4 εξαρτάται κυρίως από την σχετικά μεγάλη αγωγιμότητα της μεμβράνης στα ιόντα καλίου. Όπως και με τα άλλα κύτταρα του σώματος, η συγκέντρωση των K^+ στο εσωτερικό του καρδιακού μυικού κυττάρου $[K^+]_i$ είναι πολύ μεγαλύτερη από την εξωκυττάρια $[K^+]_o$. Η κλίση συγκέντρωσης για τα Na^+ και Ca^{2+} είναι αντίθετες από εκείνη για το K^+. Στον πίνακα ένα φαίνονται οι συγκεντρώσεις και τα δυναμικά της ισορροπίας που έχουν υπολογιστεί σύμφωνα με την εξίσωση του Nerst για τα ιόντα Na^+, K^+, Ca^{2+}.

Ιόν	Εξωκυττάρια συγκέντρωση (mM)	Ενδοκυττάρια συγκέντρωση (mM)	Δυναμικό ισορροπίας (mV)
Na^+	145	10	70
K^+	4	135	-94
Ca^{2+}	2	10^{-4}	132

Πινακάς 1, ενδοκυττάριες και εξωκυττάριες συγκεντρώσεις ιόντων και δυναμικά ισορροπίας των κύριων ιόντων του καρδιακού μυικού κυττάρου. (Robert Berne, Matthew N. Levy «Αρχές Φυσιολογίας»)

Η ικανότητα της εν ηρεμίας κυτταρικής μεμβράνης να άγει τα K^+ είναι πολύ μεγαλύτερη από την ικανότητά της να άγει το Na^+ ή το Ca^{2+}. Έτσι το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης, προσδιορίζεται κυρίως από το λόγο της ενδοκυττάριας προς την εξωκυττάρια συγκέντρωση K^+. Αυτό έχει αποδειχθεί και πειραματικά, μια που έχει βρεθεί ότι μεταβολές στις εξωκυττάριες συγκεντρώσεις Na^+ και Ca^{2+} δεν επηρεάζουν σημαντικά το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης. Απεναντίας, αν ο λόγος $[K^+]_i/[K^+]_o$ μειωθεί με πειραματική αύξηση της $[K^+]_o$, η λαμβανόμενη τιμή του Vm πλησιάζει την υπολογιζόμενη με βάση την εξίσωση του Nerst. Οι λαμβανόμενες τιμές είναι ελαφρώς λιγότερο αρνητικές σε σχέση με τις υπολογιζόμενες και στην πραγματικότητα το δυναμικό της εν ηρεμία μεμβράνης δεν είναι -94 mV όσο δηλαδή το δυναμικό ισορροπίας του καλίου αλλά περίπου -87 mV. Η απόκλιση αυτή εξηγείται λόγω της μικρής αλλά υπολογίσιμης αγωγιμότητας της εν ηρεμίας μεμβράνης στα Na^+ και λόγω της λειτουργίας ηλεκτρογόνων αντλιών μεταφοράς ιόντων και κυρίως της αντλίας Na, K. (Irisawa H. 1987, Nicholas Sperelakis, "Cell Physiology Source Book", 2001**)**

Δυναμικό ενέργειας ταχείας απόκρισης ή φάση 0.

Η φάση 0 αποτελεί τη φάση της απότομης ανόδου του ΔΕ. Τα καρδιακά κύτταρα επικοινωνούν με χασματικές συνάψεις που επιτρέπουν τη ροή ρεύματος από το ένα κύτταρο στο άλλο. Έτσι όταν μια καρδιακή ίνα εκπολώνεται, μια ποσότητα ρεύματος περνά και στις γειτονικές ίνες μέσω των χασματοσυνδέσμων (κύτταρο προς κύτταρο αγωγή) καθιστώντας το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης τους λιγότερο αρνητικό. Εάν το ρεύμα που θα περάσει είναι τόσο ώστε το δυναμικό της μεμβράνης της διπλανής ίνας φτάσει στην τιμή ενός ουδού και ειδικότερα στην τιμή -70mV, δίνεται το έναυσμα στους τασεοελεγχόμενους ταχείς διαύλους Na^+ να μεταβούν στην ενεργοποιημένη τους κατάσταση, όπου Na^+ εισέρχονται μέσα στο κύτταρο και το εσωτερικό του κυττάρου να γίνει θετικότερο με συνέπεια να ανοίγουν επιπλέον διαύλοι Na^+. Έτσι το διπλανό κύτταρο εκπολώνεται και αυτό. Με αυτό το μηχανισμό, γίνεται η αγωγή της διέγερσης από κύτταρο σε κύτταρο.
Η διαδικασία της εκπόλωσης είναι πάρα πολύ γρήγορη για τρεις τουλάχιστον λόγους. Πρώτον οι ταχείς δίαυλοι Na^+ αφθονούν στις μεμβράνες των ινών ταχείας απόκρισης και όταν ενεργοποιηθούν αυξάνεται κατακόρυφα η αγωγιμότητα της μεμβράνης προς το Na^+. Δεύτερον το εσωτερικό του κυττάρου είναι αρνητικά φορτισμένο στην κατάσταση ηρεμίας και επομένως τα Na^+ έλκονται στο εσωτερικό του κυττάρου με ηλεκτροστατική έλξη. Τρίτον η εξωκυττάρια συγκέντρωση Na^+ είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την ενδοκυττάρια (βλ. πίνακα 1) με συνέπεια οι καθαρές δυνάμεις διάχυσης να ευνοούν την προς τα μέσα κίνηση των ιόντων νατρίου. Αυτή δε η ταχεία κίνηση των Na^+ προς το εσωτερικό του κυττάρου των ταχέων ινών (πχ των ινών Purkinje) είναι και αυτή που προσδίδει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στην ανιούσα φάση, όπως φαίνεται στην εικόνα 1 (Noble D 1986, Yu, 1993).
Ωστόσο σε 1-2 msec μετά την ενεργοποίησή τους, οι ταχείς δίαυλοι Na^+ κλείνουν αλλά το δυναμικό της μεμβράνης έχει ήδη γίνει αρκετά θετικότερο, πλησιάζοντας το δυναμικό ισορροπίας Nerst για το νάτριο. Αυτά τα γεγονότα έχουν σαν συνέπεια την

ελαχιστοποίηση της αγωγιμότητας της μεμβράνης για το νάτριο. Μάλιστα, επειδή οι ταχείς δίαυλοι Na^+ δεν επανακάμπτουν σύντομα από την απενεργοποίηση, οι ίνες αυτές μένουν ανερέθιστες μέχρι την πλήρη σχεδόν επαναπόλωση της μεμβράνης (Noble D 1986).

Φάση 1

Στις καρδιακές ίνες ταχείας απόκρισης η φάση αυτή συμπίπτει με μια μικρή περίοδο μερικής επαναπόλωσης αμέσως μετά τη φάση 0, που αντανακλά την απενεργοποίηση των ταχέων διαύλων Na^+. Η φάση αυτή μπορεί να συνοδεύεται –ή όχι- από εγκοπή μεταξύ την ανιούσας φάσης και του υψίπεδου, πράγμα που εξαρτάται βασικά από τον τύπο των ταχέων ινών που μελετούνται. Έτσι για παράδειγμα στα κοιλιακά ενδοκαρδιακά κύτταρα η εγκοπή απουσιάζει ενώ είναι παρούσα στις ίνες Purkinje και τα επικαρδιακά κοιλιακά κύτταρα. Ο κύριος λόγος ύπαρξης της εγκοπής (εικ. 1, δεξιά) είναι η ενεργοποίηση ενός ειδικού ρεύματος K^+ που ονομάζεται παροδικό εξερχόμενο ρεύμα καλίου ή I_{to}. Οι υπεύθυνοι για το ρεύμα δίαυλοι, με ουδό ενεργοποίησης γύρω στα -30mV, ανοίγουν για λίγο και η παροδική εκροή K^+ δημιουργεί την εγκοπή. Το ρεύμα I_{to} στην πραγματικότητα είναι η συνισταμένη δυο διαφορετικών ρευμάτων καλίου ˙ ενός ρεύματος I_{to1} που είναι ανεξάρτητο από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} και έχει μεγαλύτερη επίδραση στη διαμόρφωση της φάσης 1 και ενός ρεύματος I_{to2} που εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} (Varró A. 1992, Dirk J. Snyders 1999).

Υψίπεδο (φάση 2).

Το υψίπεδο ή plateau ακολουθεί τη φάση 1. Κατά τη φάση αυτή το δυναμικό της μεμβράνης είναι θετικό και σταθερό για 100-300 msec –ανάλογα με τον τύπο της ίνας. Αυτή η σχετική σταθερότητα δείχνει ότι δεν έχουμε καθαρή κίνηση φορτίου εκατέρωθεν της μεμβράνης. Τα ρεύματα που μετέχουν στη φάση αυτή είναι κυρίως του K^+ και του Ca^{2+} . Τα Ca^{2+} εισέρχονται στο καρδιακό κύτταρο μέσω των L (long-lasting) διαύλων. Επιπλέον, ιδίως κατά την τελική φάση του υψίπεδου, τα K^+ εγκαταλείπουν το κύτταρο μέσω των καθυστερημένων ανορθωτικών διαύλων καλίου (slow delayed rectifier potassium channels), ενώ και το ρεύμα καλίου I_{to} έχει μια μικρή συνεισφορά, στην αρχική όμως φάση του υψίπεδου (Varró A. 1992). Τέλος να σημειωθεί ότι ένα μικρό I_{Na} που προκύπτει από καθυστερημένη απενεργοποίηση διαύλων Na^+, γνωστό και ως sodium window current, παραμένει και επηρεάζει ελαφρώς το υψίπεδο (Attwell D, 1979).
Οι διαύλοι ασβεστίου τύπου L λέγονται και υποδοχείς διυδροπυριδίνης και όπως θα αναφερθεί στη συνεχεια, μετέχουν σημαντικά σε πολλές κυτταρικές διεργασίες στα καρδιακά κύτταρα (Varró A. 1992).
Αξίζει να σημειωθεί αρχικά στο σημείο αυτό, ότι υπάρχουν διάφορα φάρμακα και νευροδιαβιβαστές που επηρεάζουν το ρεύμα ασβεστίου. Έτσι οι κατεχολαμίνες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση στο ρεύμα ασβεστίου, ενώ ανταγωνιστές των διαύλων ασβεστίου όπως η βεραπαμίλη, η νεφεδιπίνη και η διλτιαζέμη το παρεμποδίζουν (Katz AM. 1996).

Επαναπόλωση (φάση 3).

Η φάση αυτή είναι η τελευταία της επαναπόλωσης και επιτυγχάνεται με μια μεγάλη εκροή θετικού φορτίου εξαιτίας της αργής ενεργοποίησης ενός ρεύματος καλίου, του καθυστερημένου ανορθωτικού (delayed rectifying) ή I_K από το κύτταρο και μια μείωση της εισροής Ca^{2+} –κυρίως λόγω απενεργοποίησης των διαύλων ασβεστίου. Εκτός των προαναφερόμενων ρευμάτων μικρό ρόλο στην τελευταία φάση της επαναπόλωσης παίζει και το εσωστρεφές ανορθωτικό ρεύμα K^+ ή I_{K1} (inward rectifying), που είναι πρωταρχικής σημασίας για τον καθορισμό του δυναμικού ηρεμίας. Επομένως το I_K επαναπολώνει τη μεμβράνη προς το δυναμικό ηρεμίας και όσο πιο αρνητικό γίνεται το δυναμικό τόσο το ρεύμα αυτό εξασθενεί ενώ το I_{K1} αυξάνεται (Snyders 1999).

Φάση 4

Στα περισσότερα κύτταρα της καρδιάς, η φάση αυτή αντιστοιχεί στο δυναμικό ηρεμίας, δηλαδή το σταθερό αρνητικό μεμβρανικό δυναμικό που παρατηρείται μεταξύ διαδοχικών ΔΕ στα καρδιακά μυικά κύτταρα με αυτοματισμό. Όπως αναφέρθηκε ήδη, το δυναμικό στη φάση αυτή καθορίζεται από το I_{K1} (Snyders 1999).

Δυναμικό ενέργειας βραδείας απόκρισης.

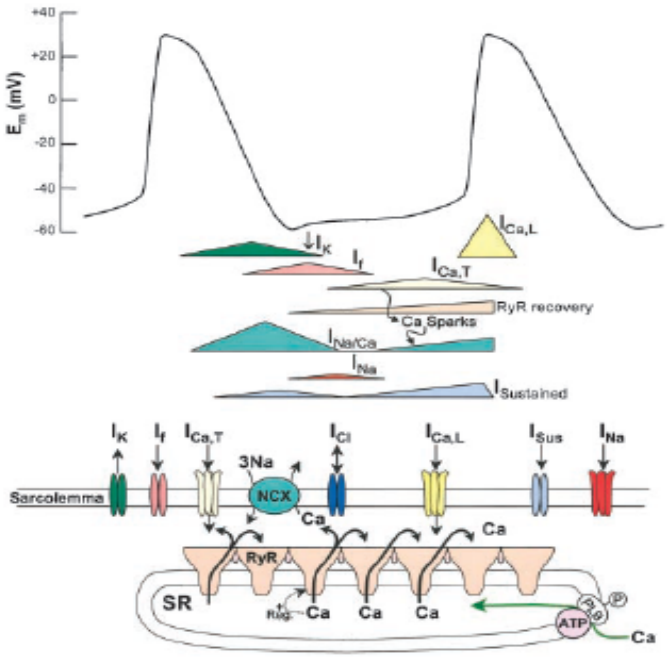
Στις ίνες βραδείας απόκρισης, όπως είναι αυτές του φλεβόκομβου και του κολποκοιλιακού κόμβο, το δυναμικό ενέργειας διαφέρει κατά τι από αυτό των ινών ταχείας απόκρισης μια που οι ίνες βραδείας και ταχείας απόκρισης παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές. Έτσι το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης των ινών βραδείας απόκρισης είναι πιο θετικό σε σχέση με των ινών ταχείας απόκρισης, η ανιούσα φάση γίνεται πιο σταδιακά, δεν εμφανίζεται εγκοπή και το ΔΕ παραμένει στη μέγιστη τιμή του για μικρότερο χρόνο. Εξάλλου στις ίνες βραδείας απόκρισης, η ανιούσα φάση και το υψίπεδο παράγονται μόνο με ενεργοποίηση των διαύλων Ca^{2+} και όχι με ενεργοποίηση ταχέων διαύλων νατρίου. Αυτό δικαιολογεί και την πιο σταδιακή ολοκλήρωση της φάσης 0 στα κύτταρα αυτά σε σχέση με την ακαριαία ολοκλήρωσή της από τις ίνες ταχείας απόκρισης (Irisawa H, 1987**)**.
Μια πολύ σημαντική ιδιότητα των κυττάρων του φλεβόκομβου, είναι η απουσία πρακτικά της σταθερής φάσης 4 μεταξύ διαδοχικών ΔΕ. Τουναντίον, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν μια αργή αυθόρμητη εκπόλωση (ή εκπόλωση της φάσης 4 ή δυναμικό βηματοδότη).
Επιπλέον, επειδή στις ίνες αυτές δεν υπάρχουν I_{K1}, το διαστολικό δυναμικό, δηλαδή το πλέον αρνητικό δυναμικό που φτάνει η μεμβράνη, είναι θετικότερο των ινών ταχείας απόκρισης (Noma A. 1996).

2. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΒΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

Λέγοντας αυτοματισμό ή αυτοματία στα καρδιακά κύτταρα, αναφερόμαστε στην ιδιότητα κάποιων κυττάρων να εκπολώνονται και να πυροδοτούν επαναλαμβανόμενα, ΔΕ. Οι ιδιότητες της αυτοματίας (η ικανότητα προς εκκίνηση του καρδιακού παλμού) και της ρυθμικότητας (της συχνότητας και της κανονικότητας της βηματοδοτικής αυτής

δραστηριότητας), είναι ενδογενείς του καρδιακού ιστού. Αυτό σημαίνει ότι η λειτουργία του νευρικού συστήματος δεν αποτελεί προϋπόθεση για τη λειτουργία της καρδιάς, ωστόσο όμως παίζει ουσιαστικό ρόλο στην τροποποίηση του ρυθμού και άλλων χαρακτηριστικών της. Επομένως η καρδιά θα εξακολουθούσε να χτυπάει για κάποιο χρόνο, ακόμα και όταν αφαιρεθεί τελείως από το σώμα και διακοπεί η όποια επίδραση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Εάν τα στεφανιαία αγγεία διαποτίζονται με το κατάλληλο διάλυμα, η καρδιά θα συστέλλεται ρυθμικά για ώρες. Αυτή η λειτουργική αυτονομία της καρδιάς οφείλεται στην παρουσία αυτοματικών κυττάρων σε κάθε καρδιακό διαμέρισμα και ιδιαίτερα στους κομβικούς και τους εξειδικευμένους ιστούς αγωγής (Noma A. 1996, Robert Berne, Matthew N. Levy «Αρχές Φυσιολογίας»).

Τα κύτταρα του φλεβόκομβου είναι οι κύριοι βηματοδότες, αλλά υπάρχουν και άλλες ομάδες (δευτερεύουσες) κυττάρων που εμφανίζουν αυτοματία όπως τα κύτταρα του κολποκοιλιακού κόμβου και τα κύτταρα Purkinje. Ωστόσο ισχύει ότι τα κύτταρα με την ταχύτερη ενδογενή αυτόματη διέγερση αναλαμβάνουν το ρόλο της βηματοδότησης. Φυσιολογικά, ο ταχύτερος βηματοδότης που υποκινεί την καρδιακή λειτουργία, είναι ο φλεβόκομβος με συχνότητα 60-80 διεγέρσεις/λεπτό. Αν η συχνότητα του για κάποιο λόγο μειωθεί ή παρεμποδιστεί η κανονική αγωγή στην καρδιά, υπάρχει δικλείδα ασφαλείας και τη βηματοδότηση αναλαμβάνουν άλλες περιοχές, με πρώτη σε σειρά προτίμησης τον κολποκοιλιακό κόμβο (40-60 διεγέρσεις/λεπτό) και δεύτερες τις ίνες Purkinje (20-30 διεγέρσεις/λεπτό). Εξάλλου και οι υποκυτταρικοί μηχανισμοί της διέγερσης, φαίνεται να διαθέτουν πολλαπλές δικλείδες ασφάλειας, ώστε να διενεργείται και να άγεται κανονικά η ώση σε όλο τον καρδιακό μυ. Έτσι για παράδειγμα αν ένας δίαυλος για κάποιο λόγο δεν δύναται να άγει κανονικά ιόντα, υπάρχουν άλλοι δίαυλοι που υποκαθιστούν τη δράση του (Donald M. Bers, 2002).



Εικόνα 2. Τα ιοντικά ρεύματα που μετέχουν στη βηματοδότηση. Τα τρίγωνα δίπλα σε κάθε ρεύμα, υποδεικνύουν την αύξηση/μείωση των αντίστοιχων ρευμάτων και το διάστημα που μετέχουν στην

εκάστοτε φάση της διέγερσης. (από Bers, 2002)

3. ΡΕΥΜΑΤΑ ΒΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα ρεύματα K^+

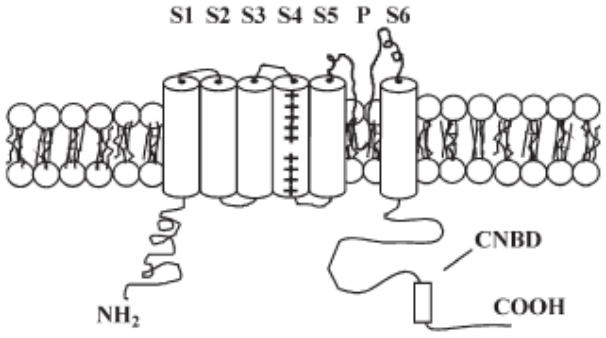
Χαρακτηριστικό των κυττάρων-βηματοδοτών, είναι τα χαμηλά επίπεδα του ανορθωτικού ρεύματος K^+ (I_{K1}) σε σχέση με τα κοιλιακά μυοκύτταρα. Το I_{K1} είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας κοντά στο δυναμικό ισορροπίας του K^+. Τα κύτταρα του φλεβόκομβου και του κολποκοιλιακού κόμβου, όπως προαναφέρθηκε, είναι βραδείας απόκρισης ίνες και ένα χαρακτηριστικό τους είναι ότι είναι λιγότερο αρνητικά στην ηρεμία σε σχέση με τις ταχείες ίνες και συγκεκριμένα τα γνήσια βηματοδοτικά κύτταρα έχουν δυναμικό ηρεμίας -55mV. Υπεύθυνα λοιπόν για την θετικότερη τιμή του E_m των βραδέων ινών, είναι τα χαμηλά επίπεδα I_{K1} και η φυσιολογική σημασία της ιδιαιτερότητας αυτής είναι μεγάλη · η θετικότερη τιμή του E_m σε ηρεμία εξασφαλίζει ότι μικρά σχετικά ρεύματα, μπορούν να φέρουν το δυναμικό της μεμβράνης ταχύτερα στον ουδό, δηλαδή τα κύτταρα αυτά είναι ευκολότερα διεγέρσιμα σε σχέση με κύτταρα των οποίων το E_m είναι πιο αρνητικό (Snyders 1999, D.M. Bers, 2002).

Το «παράδοξο» ρεύμα

Η βηματοδοτική ικανότητα των εξειδικευμένων κυττάρων, έγκειται στην ικανότητά τους να γεννούν μια διαστολική εκπόλωση. Κατά τον τερματισμό ενός ΔΕ, το δυναμικό ηρεμίας δεν παραμένει σταθερό αλλά σταδιακά πηγαίνει σε πιο θετική τιμή, μέχρι να φτάσει στον ουδό, ώστε να αρχίσει ένα νέο ΔΕ και έτσι παράγεται και επαναλαμβανόμενη δραστηριότητα. Ο ιοντικός μηχανισμός για τη βηματοδότηση είναι η ενεργοποίηση ενός «παράδοξου» ρεύματος I_f (funny current) που δημιουργείται κυρίως από Na^+ και λιγότερο από K^+. Ο λόγος που το ρεύμα αυτό λέγεται «παράδοξο», είναι οι μοναδικές του ιδιότητες, οι οποίες δεν είναι συνήθεις σε άλλου τύπου ρεύματα. Μια από αυτές είναι η σχέση του με το E_m · το I_f ενεργοποιείται από την υπερπόλωση με ένα ουδό ενεργοποίησης γύρω στα -50mV (Baruscotti M, 2005). Η ενεργοποίηση από την υπερπόλωση καθώς και η διαπερατότητα για το Na^+ και K^+ είναι οι κρίσιμες για τις βηματοδοτικές ιδιότητες του I_f. Επομένως τα κανάλια "f" ανοίγουν κατά την υπερπόλωση και έτσι δημιουργείται ένα προς τα έσω ρεύμα νατρίου, που σηματοδοτεί και την ενεργοποίηση των διαύλων ασβεστίου (ουδός -40 mV) και την εκκίνηση του ΔΕ (E.A. Accili et all, 2002). Το ρεύμα αυτό υπόκειται σε ρύθμιση από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ) · αυξάνεται από τις κατεχολαμίνες και μειώνεται από την ακετυλοχολίνη (Baruscotti M, 2005).

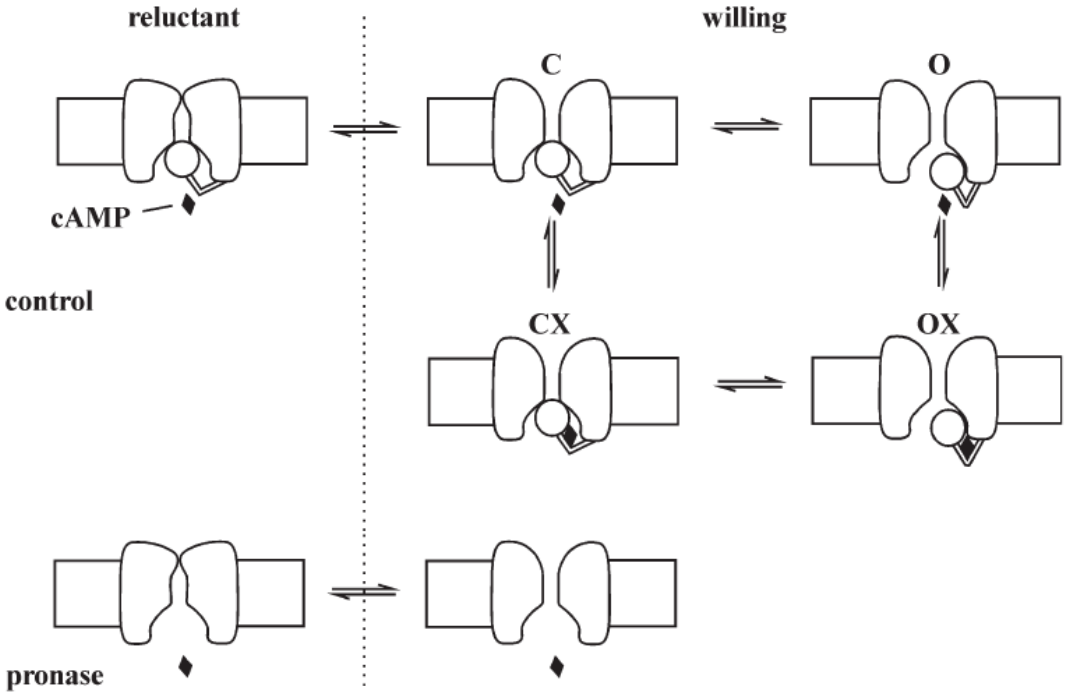
Τα γνωστά ως κανάλια f, παρά τη μεγάλη σημασία τους κλωνοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μόλις στα τέλη της δεκαετίας του '90. Πλέον είναι γνωστό ότι πρόκειται για κανάλια HCN που ανήκουν σε μια οικογένεια διαύλων που ενεργοποιούνται από την υπερπόλωση και εξαρτώνται από την παρουσία κυκλικού νουκλεοτιδίου για να λειτουργήσουν (εικόνα 4). Με τη χρήση επιμέρους τεχνικών ταυτοποίησης αναγνωρίστηκαν τέσσερις ισομορφές των διαύλων στα θηλαστικά (Ishii TM et al 1999, Ludwig A et al, 1998, Santoro B et al, 1998, Vaccari T et al, 1999). Η

λειτουργική έκφραση των διαύλων αυτών είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ρευμάτων πανομοιότυπων με το I_f και το ισοδύναμο του στο νευρικό σύστημα I_h. Παρόλο που μεταξύ τους οι ισομορφές παρουσιάζουν όπως είναι αυτονόητο διαφορές, ως μέλη της ίδιας οικογένειας έχουν θεμελιώδεις ομοιότητες. Έτσι όλα ενεργοποιούνται από την υπερπόλωση, μεταφέρουν Na^+ και K^+, παρακωλύονται από το Cs+ με τασεοεξαρτώμενο τρόπο και ρυθμίζονται άμεσα από την πρόσδεση του cAMP στην κυτταροπλασματική πλευρά του διαύλου (DiFrancesco D et al, 1999, Altomare C et al, 2001, Moroni A, Barbuti A et al, 2000). Οι δίαυλοι HCN έχουν δομή όμοια με των τασεοεξαρτώμενων διαύλων K^+ (εικόνα 3). Πρέπει να σημειωθεί ότι το όνομα της οικογένειας αυτής διαύλων είναι συντομογραφικά HCN channel που αντιστοιχεί σε "hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels" και δεν σχετίζεται με τη χημική ένωση υδροκυάνιο της οποίας ο χημικός τύπος είναι επίσης HCN.



Εικόνα 3. Η προτεινόμενη δομή των δίαυλων HCN. Η δομή περιλαμβάνει έξι ελικοειδή διαμεμβρανικά τμήματα (S1-S6), με το S4 θετικά φορτισμένο. Η θέση πρόσδεσης του κυκλικού νουκλεοτιδίου (CNBD) βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο και ο πόρος του διαύλου σχηματίζεται μεταξύ των ελίκων S5-S6.

(Altomare et al, 2001)



Εικόνα 4. Μοντέλο διαύλων HCN. Πάνω, ένας τασεοεξαρτώμενος μηχανισμός, μεταβιβάζει το δίαυλο από την αδρανή (reluctant) στην ενεργή (willing) κατάσταση. Ωστόσο για να ανοίξει ο δίαυλος (O) πρέπει να απομακρυνθεί ο ανασταλτικός μηχανισμός που σχετίζεται με το καρβοξυτελικό άκρο. Αυτή η διεργασία ευνοείται από την πρόσδεση του cAMP στην ειδική περιοχή πρόσδεσής του, στο καρβοξυτελικό άκρο, σύμφωνα με το αλλοστερικό πρότυπο ρύθμισης. Ουσιαστικά το μοντέλο προτείνει ότι η πρόσδεση του cAMP αυξάνει την πιθανότητα ο δίαυλος να βρεθεί στην ανοιχτή κατάσταση (OX). Κάτω: όταν κοπεί πρωτεολυτικά το καρβοξυτελικο άκρο απομακρύνεται και ο μηχανισμός ρύθμισης από το cAMP. Τότε ο δίαυλος μεταβαίνει μόνο μεταξύ των δύο τασεοεξαρτώμενων καταστάσεων.

(Barbuti et al, 1999)

Το επιμένον ρεύμα (sustained) I_{st}

Το επιμένον ρεύμα αφορά ρεύμα Na^+ που έχει περιγραφεί από την ερευνητική ομάδα του Akinori Noma τα τελευταία χρόνια (Guo J 1995, Guo J 1997, Mitsuiye T 1999, Mitsuiye T 2000) και φαίνεται να παίζει ρόλο στη βηματοδότηση. Τα στοιχεία που συνηγορούν στη διατύπωση αυτής της θέσης είναι ότι το ρεύμα αυτό εμφανίζεται ειδικά σε ορισμένες ίνες βραδείας απόκρισης και ποτέ σε μη αυθόρμητα δραστήρια κύτταρα ενώ ενεργοποιείται στο εύρος δυναμικού της αργής διαστολικής εκπόλωσης. Το ρεύμα αυτό ομοιάζει με τα ρεύματα ασβεστίου μέσω των L-τύπου διαύλων (πίνακας 2), μια που ενεργοποιείται σε λίγο πιο αρνητικό δυναμικό από αυτούς (-65 mV) και απενεργοποιείται ελάχιστα Τα ρεύματα αυτά όμως παρουσιάζουν και ουσιώδεις διαφορές μεταξύ τους, ιδίως φαρμακολογικά. Έτσι έχει αποκλειστεί το ενδεχόμενο να συγχέεται το ρεύμα αυτό με ρεύμα ασβεστίου μέσω των L-τύπου διαύλων. Επίσης δεν

σχετίζεται με το ρεύμα νατρίου μέσω των ταχέων διαύλων νατρίου, μια που δεν συμπίπτουν τα φαρμακολογικά τους χαρακτηριστικά. Έτσι για παράδειγμα, το ρεύμα αυτό είναι ανθεκτικό στην τετραδοτοξίνη (TTX), αλλά ανακόπτεται από την δράση της βεραπαμίλης που είναι ανταγωνιστής των διαύλων ασβεστίου (Mitsuiye et al 2000).
Σε κάθε περίπτωση, είναι προφανές ότι αν ισχύει η υπόθεση των ερευνητών αυτών, πρόκειται για ένα νέο ρεύμα και πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η συμμετοχή του στη βηματοδοτηση.

	I_{st}	$I_{Ca,L}$
Activation threshold	>−65 mV	>−40 mV
Inactivation	Weak	Marked
Carrier ion	Na^+	Ca^{2+}
Reversal potential	+10–30 mV	+50–60 mV
Localization	Spontaneous SA, AV cells	Ubiquitous
Dihydropyridine sensitivity	+	+
Enhancement by Bay-K8644	+	+
Heavy metal ion block	+	+
TTX sensitivity	−	−
β-Adrenergic enhancement	+	+

Πίνακας 2.
Σύγκριση του I_{st} με το $I_{Ca,L}$. Παρά τις όποιες ομοιότητές τους, τα δυο αυτά ρεύματα είναι εντελώς διαφορετικά.

(**Mitsuiye et al, 2000)**

Τα ρεύματα ασβεστίου.

Όπως έχει ήδη τονιστεί, το Ca^{2+}, κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη βηματοδότηση της καρδιάς. Τα ρεύματα ασβεστίου είναι αυτά των L- (long lasting) και αυτά των T - (transient) τύπου διαύλων, τα $I_{Ca,L}$ και $I_{Ca,T}$ αντίστοιχα. Οι δίαυλοι αυτοί ανήκουν σε μια οικογένεια τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου και μεταξύ τους διαφέρουν ως προς το δυναμικό ενεργοποίησης (οι T ενεργοποιούνται σε χαμηλότερο δυναμικό, γύρω στο -70mV ενώ ο ουδός των L-τύπου είναι γύρω στο -40mV), την κατανομή και διάφορα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά (Hagiwara, 1988).
Είχε γίνει από νωρίς γνωστό ότι η εκπόλωση της μεμβράνης του καρδιακού μυοκυττάρου, ενεργοποιεί ένα, εσωστρεφές ρεύμα Ca^{2+}, και αμέσως συσχετίστηκε η παρουσία του με την βηματοδότηση και τη σύζευξη διέγερσης-συστολής (Beeler GW and Reuter H, 1970, HorackovaMand Vassort G, 1976, New W and Trautwein W., 1972, Ochi R and Trautwein W., 1971). Ο ακριβής ρόλος του Ca^{2+} στην καρδιά διερευνήθηκε αναλυτικότερα από τον Fabiato, σε έρευνες που διεξήγαγε και δημοσίευσε το 1985, πάνω σε κύτταρα των οποίων το σαρκείλημμα είχε απομακρυνθεί με μηχανικό ή χημικό τρόπο (skinned myocytes). Ο Fabiato το 1985 έδειξε ότι αν εμβαπτίστούν τα κύτταρα αυτά σε ασβεστούχο διάλυμα, θα εκκινήσει μια διαδικασία απελευθέρωσης Ca^{2+} από τις ενδοκυττάριες αποθήκες. Μάλιστα, η τελευταία αυτή η διεργασία αναστέλλεται από τη ρυανοδίνη, ένα ειδικό μόριο που διακόπτει τη δράση των υποδοχέων απελευθέρωσης

Ca^{2+} του σαρκοπλασματικού δικτύου (ΣΔ) δηλαδή των υποδοχέων ρυανοδίνης όπως πλέον αναφέρονται (Bers DM., 1991, Rousseau E. et al, 1987, Sutko JL, et al, 1985). Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι η απελευθέρωση του Ca^{2+} από το ΣΔ στα μυοκύτταρα, ενεργοποιείται από αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} ή τουλάχιστον μια αύξησή του στις περιοχές που γειτνιάζουν με τους διαύλους ρυανοδίνης. Η διαδικασία αυτή κατά την οποία μία μικρή, τοπική αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} κινητοποιεί τη μαζική του έξοδο από τους ειδικούς διαύλους απελευθέρωσής του –ρυανοδίνης- προς το κυτταρόπλασμα, λέγεται ασβεστο-εξαρτώμενη απελευθέρωση Ca^{2+} (calcium-induces calcium release: CICR) (Endo M. et al, 1970).

Σήμερα είναι κοινός τόπος, ότι ρεύματα Ca^{2+} μέσω των L και μέσω των T τύπου διαύλων, παίζουν βασικό ρόλο στη βηματοδότηση. Αυτό που προτείνεται από ορισμένες ερευνητικές ομάδες είναι ότι το ρεύμα ασβεστίου με τη μεγαλύτερη βαρύτητα στον αυτοματισμό είναι το $I_{Ca,T}$ (Zhou Z, Lipsius SL., 1994). Έχει δειχθεί ότι το μεμβρανικό δυναμικό ενεργοποίησης για το $I_{Ca,T}$, είναι ακριβώς στο εύρος του δυναμικού βηματοδότησης, έτσι ώστε όσο προχωρά η εκπόλωση το ρεύμα αυτό προοδευτικά ενεργοποιείται και απενεργοποιείται. Εξάλλου, αποκλεισμός των διαύλων T τύπου από χαμηλές συγκεντρώσεις Ni^{+}, έχει ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση του ρυθμού της βηματοδότησης (εικόνα 5) (Zhou Z, Lipsius SL., 1994, Hagiwara N, 1988). Να σημειωθεί ότι το Ca^{2+} που εισέρχεται μέσω T διαύλων, αρκεί για να προκαλέσει τοπική απελευθέρωση Ca^{2+} από το ΣΔ, ιδίως στα δευτερεύουσας σημασίας αυτόματα κύτταρα, όπου το ΣΔ έχει πολλές συνδέσεις με το σαρκείλημμα (Lipsius SL et al, 2001). Το ρεύμα χαμηλού δυναμικού ενεργοποίησης $I_{Ca,T}$ φαίνεται να συνεισφέρει στην τελευταία φάση της διαστολικής εκπόλωσης στα κύτταρα-βηματοδότες και μάλιστα να επάγει τοπικές αυξήσεις στη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου (sparks Ca^{2+}) που ενεργοποιούν το ρεύμα του ανταλλάκτη νατρίου/ασβεστίου, $I_{Na/Ca}$. Ο τελευταίος, εξάγει ένα Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα και εισάγει τρία Na^{+}. Με τον τρόπο αυτό το τελευταίο βοηθάει το κύτταρο να φτάσει πιο γρήγορα στον ουδό. Τα ευρήματα που δείχνουν τη μεγάλη σημασία του $I_{Ca,T}$, είναι τα εξής:

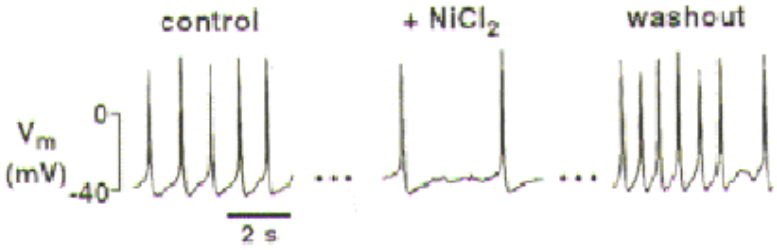
α. οι τοπικές αυξήσεις της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, παρατηρούνται σε χαμηλό E_m, συμβατό με αυτό του $I_{Ca,T}$ αλλά όχι του $I_{Ca,L}$.

β. το Ni^{+} που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αναστέλλει τους T διαύλους, αναστέλλει τη διαστολική απελευθέρωση ασβεστίου και καθυστερεί την επίτευξη του ουδού.

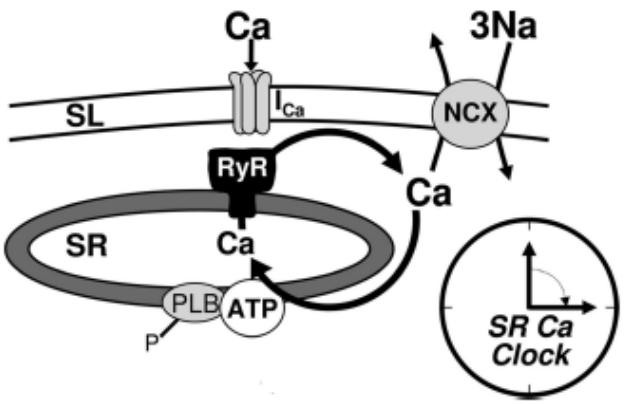
γ. Στα κύτταρα του κόλπου που δεν παρατηρείται αυτοματισμός, δεν υπάρχουν T αλλά μόνο L τύπου δίαυλοι. (Huser et al 2000)

Τα κύτταρα της καρδιάς, είναι γνωστό ότι βρίσκονται σε συστολή όταν η συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου είναι υψηλή και σε χάλαση όταν απομακρυνθεί το ενδοκυττάριο ασβέστιο. Η χάλαση και η συστολή φυσιολογικά εναλλάσσονται ρυθμικά μεταξύ τους και έτσι προκύπτει η καρδιακή σύσπαση και χάλαση. Τα γεγονότα που οδηγούν στην αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} , φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο – κλειδί, στην δημιουργία της ενδογενούς ρυθμικότητας της καρδιάς, χάρη στις ιδιότητες της Ca^{2+} -ATPασης του ΣΔ (SERCA) και των διαύλων ρυανοδίνης. Μετά από την απελευθέρωση μιας ριπής Ca^{2+} από τους διαύλους ρυανοδίνης του ΣΔ και την πραγματοποίηση συστολής των μυικών ινών, απαιτείται ένας συγκεκριμένος χρόνος ώστε το ενδοκυττάριο Ca^{2+} να μειωθεί ξανά για να επέλθει η χάλαση του μυοκαρδίου. Ο

βασικότερος μηχανισμός μείωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου είναι η επαναπρόσληψή του στο ΣΔ με τη βοήθεια της SERCA και υποβοηθητικοί μηχανισμοί είναι η λειτουργία του ανταλλάκτη και της SERCA της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίοι εξάγουν ασβέστιο στον εξωκυττάριο χώρο. Επομένως η SERCA ρυθμίζει σε ένα μεγάλο βαθμό τον ρυθμό εναλλαγής χάλασης-συστολής των καρδιομυοκυττάρων. Επιπλέον, οι δίαυλοι της ρυανοδίνης χρειάζονται κάποιο χρόνο ανάκαμψης μετά από μια ενεργοποίηση, επηρεάζοντας έτσι το ρυθμό εναλλαγής χάλασης-συστολής αφού και η νέα ενεργοποίηση ριπών ασβεστίου από το ΣΔ θα χρειάζεται χρόνο για να επανέλθει σε ικανό επίπεδο (Satoh H. et al, 1997, Cheng H. et al, 1993).
Η ρυθμικότητα της λειτουργίας της καρδιάς, υπόκειται σε τροποποίηση από το ΚΝΣ. Ήδη όπως προαναφέρθηκε η λειτουργία του ΑΝΣ επηρεάζει τα ρεύματα που μετέχουν στην βηματοδότηση. Έτσι, η συμπαθητική διέγερση ή η δράση κάποιου αδρενεργικού αγωνιστή, επισπεύδει την βηματοδότηση στο φλεβόκομβο και κατά συνέπεια τον καρδιακό ρυθμό. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει γνωστό ότι οι αδρενεργικοί αγωνιστές μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνική κινάση Α (PKA) προκαλούν φωσφορυλίωση της φωσφολαμβάνης μειώνοντας έτσι την ανασταλτική της δράση επί της SERCA. Ως τελικό αποτέλεσμα έχουμε αύξηση της λειτουργίας της SERCA και αύξηση της άντλησης του Ca^{2+} εντός του ΣΔ. Με τη σηματοδότηση αυτή, τα γεγονότα πρόσληψης και απελευθέρωσης ασβεστίου, συμβαίνουν νωρίτερα και ο χρόνος μεταξύ δυο διαδοχικών εκπολώσεων ελαττώνεται και έτσι η συχνότητα των διαστολικών εκπολώσεων και συνεπώς ο καρδιακός ρυθμός, αυξάνονται (review Donald Bers, 2006).



Εικόνα 5. Η επίδραση 50 μΜ νικέλιου σε κύτταρο-βηματοδότη του κόλπου. Το νικέλιο μπλοκάρει τους Τ διαύλους ασβεστίου και εδώ φαίνεται να μειώνει αντιστρεπτά την κλίση της τελευταίας φάσης της διαστολικής εκπόλωσης. (Huser, Lothar Blatter A. and Lipsius SL, 2000)



Εικόνα 6. Η μεταφορά του Ca μέσα και έξω από το ΣΔ φαίνεται να λειτουργεί σαν βηματοδοτικό «ρολόι». Μετά από μια κανονική απελευθέρωση, ο μηχανισμός επαναπρόσληψης Ca^{2+} γεμίζει το ΣΔ με Ca^{2+} και δεδομένης της ενεργοποίησης των διαύλων ρυανοδίνης, μπορούν να συμβούν τυχαίες εκλύσεις του ιόντος που εν συνεχεία ενεργοποιούν τον ανταλλάκτη Na^+/Ca^{2+} και ξεκινά η εκπόλωση.
(review Donald Bers, 2006)

4. ΜΗΧΑΝΕΣ ΡΟΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΚΑΡΔΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Αντλία Na,K-ATPάση

Η αντλία Na,K-ATPάση, είναι το κύριο σύστημα, που διατηρεί την ισορροπία των Na^+ και K^+ μεταξύ του ενδοκυττάριου και του εξωκυττάριου χώρου. Σε κάθε κύκλο λειτουργίας, η αντλία αυτή αποβάλει 3 Na^+ προς το εξωτερικό του κυττάρου και εισάγει 2 K^+. Λόγω της καθαρής μετακίνησης ενός θετικού φορτίου προς το εξωτερικό του κυττάρου, η αντλία αυτή είναι ηλεκτρογόνος.

Ο ανταλλάκτης Na^+/Ca^{2+}.

Μέχρι τώρα έχει αναφερθεί αρκετές φορές ο ανταλλάκτης Na^+/Ca^{2+} του σαρκειλήματος και είναι ξεκάθαρο ότι ο ρόλος του είναι «εκ των ων ουκ άνευ» για την λειτουργία της καρδιάς, τουλάχιστον των θηλαστικών.
Η σημασία του ανταλλάκτη στην καρδιακή λειτουργία εντοπίζεται στην βασική του λειτουργία η οποία όπως προαναφέρθηκε είναι να εξάγει ιόντα Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα και να εισάγει ταυτόχρονα ιόντα Na^+ · για κάθε ένα Ca^{2+} που εξάγει, εισάγει τρία Na^+, εκμεταλλευόμενος την ηλεκτροχημική διαβάθμιση του Na^+ εκατέρωθεν του σαρκειλήματος (Reeves JP, 1984). Έτσι δημιουργείται ένα προς τα έσω ρεύμα θετικού φορτίου, το $I_{Na/Ca}$. Πρωτίστως λοιπόν ο ανταλλάκτης είναι μόριο-κλειδί στη διατήρηση της ομοιόστασης του Ca^{2+} μέσα στο κύτταρο, εξασφαλίζοντας έτσι τους απρόσκοπτους κύκλους διέγερσης – χάλασης (Hannes et al, 2005). Ωστόσο ο ανταλλάκτης μπορεί να λειτουργήσει και προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή να εξάγει νάτριο και να εισάγει ασβέστιο, σε θετικό μεμβρανικό δυναμικό και ανάλογα με τις συγκεντρώσεις νατρίου και ασβεστίου μέσα και έξω από το κύτταρο · η εκπόλωση ευνοεί την είσοδο Ca^{2+} στο κύτταρο, αλλά όσο το ενδοκυττάριο Ca^{2+} αυξάνεται και η μεμβράνη επαναπολώνεται ευνοείται η έξοδος του (Weber, 2001).

Τα σύγχρονα δεδομένα όμως, προσδίδουν ακόμα μεγαλύτερη σημασία στον ανταλλάκτη, και τον κατηγοριοποιούν όχι απλά ως ομοιοστατικό μηχανισμό, αλλά ως βασικό μηχανισμό στη βηματοδότηση. Το προς τα έσω ρεύμα νατρίου που δημιουργεί, φαίνεται να συμβάλει στη βηματοδότηση (Bridge JBH., 1990). Εξάλλου ο ανταλλάκτης ελέγχει και το ποσό του ασβεστίου μέσα στο κύτταρο και όπως προαναφέρθηκε, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί και να το εισάγει. Έμμεσα επομένως επηρεάζει και τον χώρο αποθήκευσης του Ca^{2+} στο κύτταρο, το ΣΔ, ως ο βασικός μηχανισμός απομάκρυνσης του Ca^{2+} από το κύτταρο (Gregory R. Ferrier & Susan E. Howlett, 2001).

Η αντλία Ca^{2+}-ΑΤΡάση του ΣΔ (SERCA)

Έχει ήδη θιχτεί στη συζήτηση για το ρόλο του Ca^{2+} , η αντλία SERCA , ως μηχανισμός επαναπρόσληψης του Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Όπως και στην περίπτωση του ανταλλάκτη, έτσι και εδώ, η αντλία αυτή λειτουργεί με σκοπό να ελαττώσει την υψηλή συγκέντρωση του Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα -συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη χάλαση του μυοκαρδίου- με τη διαφορά ότι το αποθηκεύει στο ΣΔ, ώστε να χρησιμοποιηθεί στην επόμενη εκπόλωση.
Η SERCA είναι μια μονομερής πρωτεΐνη, 110 kDa, και βρίσκεται στη μεμβράνη του ΣΔ και του ΕΔ και ανήκει στην οικογένεια των P τύπου αντλιών εξαρτώμενων από το ATP . για ένα μόριο ATP που υδρολύεται, δυο κατιόντα Ca^{2+} εισάγονται στο ΣΔ. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρία χωριστά γονίδια που κωδικοποιούν για την αντλία αυτή και παράγουν τουλάχιστον 10 ισομορφές της με εναλλακτικό μάτισμα (Periasamy, 2007). Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να υπάρχει σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούw, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς (Periasamy & Kalyanasundaram, 2007). Έτσι για παράδειγμα, στη Δροσόφιλα η αντλία κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που με εναλλακτικό μάτισμα δίνει δυο ισομορφές (Sanyal S, 2006). Στην καρδιά των θηλαστικών εντοπίζεται κυρίως η ισομορφή SERCA2a (Zarain-Herzberg A. et al, 1990). Δεδομένου ότι είναι μάλλον ο μοναδικός μηχανισμός επαναπρόσληψης Ca^{2+} από το ΣΔ, έχει πολύ μεγάλη σημασία για την καρδιακή λειτουργία και παθολογία (μυοκαρδιοπάθειες).

Υποδοχείς ρυανοδίνης RyR

Ακόμα ένας σημαντικός και αναγκαίος μέτοχος στην καρδιακή λειτουργία όπως έχει ήδη γίνει σαφές, είναι ο υποδοχέας ρυανοδίνης που υπάρχει στη μεμβράνη του ΣΔ και άλλων διεγέρσιμων ιστών (Campbell, 1993). Ο ρόλος του στην καρδιά είναι να προάγει την απελευθέρωση ασβεστίου προς το κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια της CICR όπως έχει σημειωθεί.
Ο λειτουργικός υποδοχέας φαίνεται να είναι ένα ομοτετραμερές 560 kDa στο κέντρο του οποίου σχηματίζεται ένας πόρος από το καρβοξυτελικό άκρο, πιθανότατα ο δίαυλος Ca^{2+}.
Σχετικά με την ακριβή συμμετοχή του υποδοχέα ρυανοδίνης στη σύζευξη διέγερσης-συστολής, έχουν προταθεί δυο μοντέλα. Σύμφωνα με το ένα μοντέλο που έχει μελετηθεί κυρίως στο σκελετικό μυ, οι δίαυλοι ρυανοδίνης, συγκεντρώνονται στο τμήμα της

μεμβράνης του ΣΚ που βρίσκεται ακριβώς απέναντι από τους Τ σωληνίσκους. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η παρουσία των σωληνίσκων Τ, στα μυοκύτταρα όλων σχεδόν των ειδών, μοιάζει να είναι καθοριστικής σημασίας για την σύζευξη διέγερσης-συστολής. Οι Τ σωληνίσκοι είναι εγκολπώσεις της μεμβράνης , που γειτνιάζουν με το ΣΔ. Φαίνεται ότι οι δομές αυτές επιτελούν σημαντικό έργο στη σύζευξη διέγερσης-συστολής ˙ οι RyRs της μεμβράνης του ΣΔ εντοπίζονται σε στενή γειτνίαση με τους Τ σωληνίσκους και οι μεμβράνες των σωληνίσκων είναι πλούσιες σε διαύλους Ca^{2+} τύπου L, που συναθροίζονται κατά τετράδες και λειτουργούν ως αισθητήρες τάσης. Η εκπόλωση της μεμβράνης των Τ σωληνίσκων προάγει διαμορφωτικές αλλαγές σε καθέναν από τους L διαύλους της τετράδας (Brette & Orchard, 2003). Επομένως, είναι πολύ πιθανό, οι αλλαγές αυτές, να προκαλούν και αλλαγές στη διαμόρφωση των υπομονάδων των RyRs και την απελευθέρωση ασβεστίου.

Στο μυοκάρδιο αν και δεν έχει βρεθεί η ακριβής συσχέτιση των δυο υποδοχέων, το μοντέλο που προτείνεται είναι αυτό που ήδη έχει αναφερθεί ως CICR. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα ιόντα ασβεστίου τα οποία εισέρχονται μέσω των L τύπου διαύλων Ca^{2+} ή αλλιώς διαύλων διυδροπυριδίνης, ενεργοποιούν την απελευθέρωση ριπών Ca^{2+} μέσω των RyRs (Bers, 1991, Stem, 1992). Οι ριπές αυτές αθροίζονται χωρικά και χρονικά, προκαλώντας τη συστολή του κυττάρου (Santana et al, 1996).

ΙΙ. ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Η σύντομη επισκόπηση της λειτουργίας της καρδιάς, αναδεικνύει και τη μεγάλη συνθετότητα της και κυρίως την πολύπλοκη αλληλουχία και αλληλεπίδραση των μέχρι τώρα γνωστών συμβάντων που προϋποθέτει ο αυτοματισμός και η ρυθμικότητα. Η περαιτέρω μελέτη όμως των αρχών λειτουργίας που διέπουν το όλο σύστημα σε επίπεδο μορίων και σε επίπεδο ιόντων είναι αναγκαία για να απαντηθούν κρίσιμα ερωτήματα σχετικά με την παθολογία του και τις δυσλειτουργίες που ενέχονται σε αυτή.
Δεδομένης της ανθρωποκεντρικής θεώρησης της επιστήμης, για τη μελέτη της καρδιάς, όπως φαίνεται από τη βιβλιογραφία, τα πιο διαδεδομένα μοντέλα είναι τα θηλαστικά, μια που το καρδιαγγειακό του σύστημα ομοιάζει με αυτό του ανθρώπου. Πράγματι αυτή η προσέγγιση, έχει επιφέρει ένα τεράστιο όγκο νέας γνώσης και νέες θεραπευτικές τεχνικές έχουν προκύψει. Ωστόσο η αναζήτηση απαντήσεων σε πιο συγκεκριμένα ζητήματα και ειδικά σε επίπεδο μορίων απαιτεί περισσότερο εύχρηστα μοντέλα.

Η Δροσόφιλα υπήρξε ένα εξαιρετικό μοντέλο για την ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος . Εξάλλου, από τη στιγμή που διαπιστώθηκε η συντήρηση των ρυθμιστικών συστημάτων και των βιολογικών μηχανισμών μεταξύ της Δροσόφιλας και του ανθρώπου, σε συνδυασμό με την αποκάλυψη αναπτυξιακών ομοιοτήτων και ίδιων μηχανισμών διαφοροποίησης του καρδιαγγειακού συστήματος μεταξύ των δυο κατά τα άλλα εντελώς διαφορετικών οργανισμών, η Δροσόφιλα έχει καταλάβει υψηλή θέση ως μοντέλο για την απάντηση βασικών ερωτημάτων ή ακόμα και για την διερεύνηση διάφορων ασθενειών.
Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες και δίαυλοι με μεγάλη συνεισφορά στην καρδιακή λειτουργία εμφανίζονται να είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένοι μεταξύ των ειδών. Έτσι σημαντικοί μέτοχοι της καρδιακής λειτουργίας όπως οι RyRs, η SERCA, το ΣΔ και δίαυλοι ιόντων όπως οι HCN και οι σωληνίσκοι Τ, είναι παρόντες και στα καρδιομυοκύτταρα της Δροσόφιλας. Επιπρόσθετα, οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την ρυθμικότητα και τη φυσιολογία της συστολής, φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένοι (review Karen Ocorr, et al, 2007).
Συμπερασματικά, η καρδιά της Δροσόφιλας αποτελεί μοντέλο με πολλές προοπτικές και δυνατότητες, όχι μόνο για την κατανόηση συγγενών καρδιακών νοσημάτων, αλλά και άλλων παθολογικών γεγονότων που προκαλούν ποικίλες λειτουργικές ανωμαλίες όπως αρρυθμίες και καρδιομυοπάθειες (Bier & Bodmer, 2004).
Η παρούσα εργασία, αφορά κυρίως τη μυογενή καρδιά της προνύμφης της Δροσόφιλας. Για το λόγο αυτό θα ακολουθήσει μια επισκόπηση της ανάπτυξης της καρδιάς της προνύμφης της Δροσόφιλας, με σκοπό την ανάδειξη του μοντέλου αλλά και των ομοιοτήτων του –τουλάχιστον σε ότι αφορά την καρδιά- σε σχέση με τα διάφορα άλλα μοντέλα που χρησιμοποιούνται.

2. ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΌ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

Τα έντομα, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, διαθέτουν ανοιχτό κυκλοφορικό σύστημα το οποίο αποτελείται από ένα ραχιαίο συσταλτό αγγείο κατά μήκος του σώματος του ζώου και μία κοιλότητα το αιμόκοιλο. Υπεύθυνο για την κυκλοφορία της αιμόλεμφου είναι το αγγείο το οποίο προωθεί την αιμόλεμφο προς το αιμόκοιλο. Το τελευταίο, συνήθως χωρίζεται σε τρεις επιμέρους κοιλότητες οι οποίες είναι :
α) η περικαρδιακή ραχιαία
β) η περισπλαχνική
γ) η περινευρωνική κοιλιακή.

Η περικαρδιακή και η περινευρωνική κοιλότητα διαχωρίζοντα από την περισπλαχνική με ραχιαία και κοιλιακά διαφράγματα, αντίστοιχα.

Το ραχιαίο αγγείο, αποτελεί έναν σωληνοειδή σχηματισμό που καταλαμβάνει τη ραχιαία μέση γραμμή κατά μήκος σχεδόν του ζώου, και στηρίζεται στο σωματικό τοίχωμα. Τα τοιχώματα του αγγείου δομούνται από μυικά κύτταρα, συνήθως μία ή δυο σειρές σε σπειροειδή ή κυκλική διάταξη. Το αγγείο αυτό, συνίσταται φυσιολογικά από δύο διακριτές περιοχές ˙ την αορτή που είναι το πρόσθιο τμήμα του αγγείου και την καρδιά που βρίσκεται στο πλέον οπίσθιο τμήμα του αγγείου και παίζει ρόλο ανάλογο με αυτό της καρδιάς των σπονδυλωτών, δηλαδή λειτουργεί ως αντλία. Στην καρδιά εντοπίζονται οπές, τα όστια, όπως αναφέρεται στη συνέχεια.
Η συστολή, δηλαδή η φάση της σύσπασης της καρδιάς, προκύπτει από συσπάσεις των μυικών κυττάρων του καρδιακού τοιχώματος, ενώ η διαστολή, δηλαδή η φάση όπου η λέμφος εισέρχεται στην καρδιά, οφείλεται στη χαλάρωση των ίδιων μυών.
Ο ρυθμός της καρδιακής λειτουργίας στα έντομα, ποικίλει από είδος σε είδος και ακόμα και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, ανάλογα με την ηλικία και το περιβάλλον. Έτσι για παράδειγμα, ο ρυθμός καρδιακής λειτουργίας είναι μεγαλύτερος συνήθως στις προνύμφες και στα νυμφικά στάδια ελαττώνεται. Επίσης σε ψηλές (45^{o}-50^{o}C) και χαμηλές (1^{o}-5^{o}C) θερμοκρασίες επιβραδύνεται ο ρυθμός λειτουργίας της καρδιάς.

Μηχανισμοί ελέγχου της καρδιακής λειτουργίας

Η μελέτη των μηχανισμών ελέγχου της ηλεκτρικής δραστηριότητας στην καρδιά των εντόμων έχει εστιαστεί στα ακόλουθα σημεία α) στον εντοπισμό του κέντρου προέλευσης της καρδιακής σύσπασης β) στην κατανόηση του τρόπου παραγωγής της αυθόρμητης βηματοδοτικής δραστηριότητας, που ευθύνεται για τον καθορισμό του καρδιακού παλμού και γ) στη ρύθμιση της βηματοδοτικής δραστηριότητας από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες.

Κεντρικό θέμα στην φυσιολογία της καρδιάς των εντόμων, αποτελεί η προέλευση και ο έλεγχος της ρυθμικής καρδιακής σύσπασης. Η παρουσία του νευρικού συστήματος φαίνεται να κάνει πιο δύσκολη την απάντηση τέτοιων ερωτημάτων. Ωστόσο με φαρμακολογικό αποκλεισμό των τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου με τη χρήση τετραδοτοξίνης (TTX) σε διάφορα έντομα περιλαμβανομένης και της Δροσόφιλας (Gu &

Singh, 1995) διαπιστώθηκε ότι η απουσία της επίδρασης του νευρικού συστήματος δεν έχει σοβαρό αντίκτυπο στην καρδιακή λειτουργία.
Πλέον θεωρείται ότι ο μυογενής αυτοματισμός της καρδιάς των εντόμων είναι ο κανόνας και ότι η σύσπαση της καρδιάς προέρχεται από βηματοδοτικά δυναμικά που αναπτύσσονται στην καρδιά τους. Η περιοχή που λαμβάνει χώρα η έναρξη της καρδιακής σύσπασης χαρακτηρίζεται ως ο κυρίαρχος βηματοδότης (Tenny 1953, McCann 1966, Wigglesworth 1974, Davis et al, 2001) και συνήθως εντοπίζεται στο πίσω μέρος της καρδιάς. Στη συνέχεια το παραγόμενο μυικό δυναμικό ενέργειας, άγεται προς το εμπρόσθιο τμήμα της καρδιάς. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η ορθόδρομη ροή της αιμόλεμφου προς την κεφαλή του εντόμου.

Πέρα από τη φαρμακολογική απόδειξη της μυογενούς φύσης του καρδιακού παλμού στα έντομα, αποκαλύφθηκε με χρήση ενδοκυττάριων μικροηλεκτροδίων και η παρουσία μιας χαρακτηριστικής διαστολικής εκπόλωσης στα καρδιακά ΔΕ σε διαφορετικές τάξεις εντόμων όπως δίπτερα (Bruen & Ballard, 1970), λεπιδόπτερα (McCann 1963, 1965, 1970) και κολεόπτερα (Markou & Theophilidis 2000). Έτσι αποκαλύφθηκε ότι η διαστολική εκπόλωση του ΔΕ των καρδιακών μυικών κυττάρων των εντόμων αντιπροσωπεύει πραγματική μυογενή βηματοδοτική δραστηριότητα, αντίστοιχη με τη φάση 4 των ΔΕ στα καρδιακά βηματοδοτικά κύτταρα των σπονδυλωτών.

Τα ιόντα και οι δίαυλοι ιόντων στην καρδιακή λειτουργία των εντόμων.

Για να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί της ρυθμικής βηματοδότησης στην καρδιά των εντόμων, είναι αναγκαίο να καθοριστούν πλήρως οι μεμβρανικές ιδιότητες των καρδιακών τους κυττάρων. Για να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να απαντηθούν ερωτήματα σχετικά με τη σύσταση της μεμβράνης των καρδιακών κυττάρων -ιδίως αυτών που εκκινούν την καρδιακή δραστηριότητα- σε διαύλους και λοιπούς βιολογικούς μηχανισμούς διακίνησης ιόντων εκατέρωθεν των μεμβρανών, καθώς και να διασαφηνιστεί η συνεισφορά των επιμέρους ιόντων στην παραγωγή ΔΕ από τα εν λόγω κύτταρα.
Προκειμένου να μελετηθούν επακριβώς τα ρεύματα των ιόντων ως προς το ρόλο τους στον έλεγχο της καρδιακής δραστηριότητας, μπορεί να μετέλθει κανείς τους ακόλουθους τρόπους :
α) αλλαγή των εξωκυττάριων συγκεντρώσεων ενός τύπου ιόντος και παρατήρηση των μεταβολών στον καρδιακό ρυθμό
β) αντικατάσταση ενός ιόντος από το αντίστοιχο συγγενές χημικά,
γ) εξειδικευμένες μεταλλάξεις έναντι συγκεκριμένων τύπων διαύλων και ανάλυση του καρδιακού φαινότυπου
δ) χρήση συγκεκριμένων αναστολέων των διαφόρων τύπων διαύλων.

Δισθενή ιόντα

Στη Δροσόφιλα έχει παρατηρηθεί μεγάλη ευαισθησία του καρδιακού ρυθμού στα δισθενή ιόντα Mg^{2+} και κυρίως Ca^{2+} και συγκεκριμένα έχει βρεθεί να ελαττώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή τους (Gu & Singh, 1995). Οι δίαυλοι των ιόντων Ca^{2+}

παίζουν βασικό ρόλο στη διεγερσιμότητα των καρδιακών μυικών κυττάρων των σπονδυλωτών όπως έχει εκτενώς αναφερθεί. Επομένως είναι λογικό να υποθέσει κανένας, ότι ανάλογοι τύποι διαύλων συμμετέχουν στον έλεγχο της ηλεκτρικής δραστηριότητας στην καρδιά των εντόμων. Πράγματι χρησιμοποιώντας αναστολείς L τύπου διαύλων ασβεστίου, όπως βεραπαμίλη οι Gu & Singh έδειξαν ότι ο καρδιακός ρυθμός στην προνύμφη της Δροσόφιλας εξαρτάται από διαύλους Ca^{2+} ανάλογα των L τύπου διαύλων, πράγμα που αναίρεσε αργότερα μια άλλη ομάδα η οποία έδειξε ότι η βεραπαμίλη δεν επέδρασε στην καρδιακή λειτουργία της νύμφης της Δροσόφιλας (Johnson et al, 1998). Ωστόσο οι τελευταίοι έδειξαν ότι ένας αναστολέας των διαύλων ασβεστίου N τύπου και QPQ, η ω-κονοτοξίνη, ελάττωσε σημαντικά τον καρδιακό ρυθμό.

Δίαυλοι K^+

Όπως συμβαίνει και στα σπονδυλωτά, έτσι και στα έντομα έχει φανεί ότι οι δίαυλοι καλίου κατέχουν υψηλή θέση στην ρύθμιση της ηλεκτρικής δραστηριότητας, στην καρδιά των εντόμων. Η έξοδος των K^+ μέσω των ειδικών για τα ιόντα αυτά διαύλων, ελέγχει τον τερματισμό του ΔΕ και την επαναπόλωση της μεμβράνης. Εξάλλου η συνεισφορά τους είναι σημαντική στον καθορισμό της ανερέθιστης περιόδου και του καρδιακού ρυθμού. Το τετρααιθυλαμμώνιο και η κουινιδίνη, ως φαρμακολογικοί αποκλειστές των δίαυλων καλίου, παρεμποδίζουν την καρδιακή λειτουργία στη Δροσόφιλα, υποδεικνύοντας τη σημασία των K^+ στη διεγερσιμότητα της καρδιάς των εντόμων (Gu & Singh, 1995). Επιπρόσθετα, ανάλυση του καρδιακού φαινοτύπου στο μετάλλαγμα *slo*, με τη χρήση του παράγοντα charybdoxin (CTX), έδειξε ότι το ρεύμα του καλίου είναι κρίσιμο για την καρδιακή λειτουργία στην Δροσόφιλα (Johnson et al, 1998). Επιπλέον ελάττωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων του καλίου στη Δροσόφιλα, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του καρδιακού ρυθμού, πράγμα που υποδεικνύει την άμεση συνάφεια του δυναμικού ηρεμίας των καρδιακών μυικών κυττάρων με το κάλιο (Gu & Singh, 1995).

Δίαυλοι Na^+

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα σπονδυλωτά, στα έντομα δεν έχει δειχθεί να έχει μεγάλη σπουδαιότητα το νάτριο στην παραγωγή καρδιακών ΔΕ. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η καρδιακή λειτουργία παρέμεινε ανεπηρέαστη από την μετάλλαξη *para^{ts}*, η οποία προκαλεί την διακοπή των εξαρτώμενων από ιόντα νατρίου ΔΕ στους 35^{o}C (Dowse et al, 1995). Το γονίδιο *para^{ts}*, προκαλεί αναστρέψιμη παράλυση λόγω θερμότητας και κωδικοποιεί για μια υπομονάδα του καναλιού νατρίου (Loughney et al, 1989). Εξάλλου, αναστολείς των καναλιών νατρίου, όπως το αμιλορίδιο και η λιδοκαΐνη δεν αναστέλλουν την καρδιακή λειτουργία (Johnson et al, 1998).

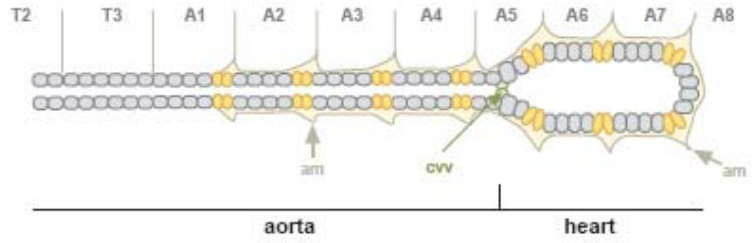
3. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΣΤΗ ΔΡΟΣΟΦΙΛΑ

Η Δροσόφιλα, όπως και τα σπονδυλωτά, ως έντομο, έχει ένα όργανο που επιτελεί την κυκλοφορία της αιμολέμφου και λέγεται νωτιαίο ή ραχιαίο αγγείο (dorsal vessel).

Πρόκειται για μια σωληνοειδή δομή που ομοιάζει με την καρδιά των σπονδυλωτών ιδίως κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (Zaffran S. & Frasch M, 2002).
Στην Δροσόφιλα η καρδιά είναι ένα παλλόμενο όργανο, που αποτελείται από ένα γραμμικό καρδιακό σωλήνα και υποδιαιρείται στην «αορτή» στο πρόσθιο μέρος και την καρδιά στο οπίσθιο (Rizki, 1978). Ο καρδιακός παλμός διασφαλίζει τη ροή της αιμολέμφου –όπως λέγεται το αίμα των εντόμων- σε ένα ανοιχτό κυκλοφορικό σύστημα. Στα ενήλικα άτομα, η αιμολέμφος εισέρχεται στην καρδιακή κοιλότητα, μέσω τεσσάρων ζεύγων δομών όμοιων με τις βαλβίδες, τα «όστια» (ostiae: μικρό σωματικό άνοιγμα ή πόρος), και ωθείται από την ουραία προς την ρυγχαία κατεύθυνση παρακινούμενη από τις συσπάσεις του καρδιακού μυ (Rizki, 1978;Curtis et al., 1999; Molina and Cripps, 2001). Στην προνύμφη, τα όστια σχηματίζονται μόνο στην καρδιά (Molina and Cripps, 2001) και επιπλέον μια καρδιαγγειακή βαλβίδα εμφανίζεται στην διακλάδωση αορτής και καρδιάς, στο μεταμερές Α5, η οποία πιθανόν παίζει ρόλο στη διασφάλιση της μονόδρομης ροής της αιμολέμφου (Rizki, 1978; Molina and Cripps, 2001).

Η γενική δομή και οργάνωση του καρδιακού σωλήνα της προνύμφης είναι πολύ όμοια με αυτή του ενήλικου με κάποιες μόνο διαφορές (Rizki, 1978;Curtis et al., 1999; Molina and Cripps, 2001). Συγκεκριμένα, στην προνύμφη τα ζεύγη των όστιων είναι τρία αντί για τέσσερα . Επίσης οι πλευρικοί μυς που στηρίζουν την καρδιά, δεν είναι τόσο ανεπτυγμένοι στο ενήλικο όσο στην προνύμφη και μια επιπλέον στοιβάδα επιμηκών μυικών κυττάρων έχει προστεθεί στον καρδιακό σωλήνα κοιλιακά (Rizki, 1978; Molina and Cripps, 2001).
Το νωτιαίο αγγείο αποτελείται από δύο είδη κυττάρων : τα καρδιακά, που προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα τους καρδιοβλάστες και τα περικαρδιακά κύτταρα. Αυτοί οι τύποι κυττάρων διαφοροποιούνται από ομάδες πρόδρομων κυττάρων, τοποθετημένες σε κάθε μεταμερές. Τα μεσεγχυματικά πρόδρομα καρδιακά κύτταρα υπόκεινται στη συνέχεια σε διαφοροποίηση και δίνουν δυο αμφίπλευρες σειρές επιθηλιακών καρδιοβλάστων, οι οποίοι περιστοιχίζονται από περικαρδιακά κύτταρα (Dunin-Borkowski et al., 1995; Frémion et al., 1999). Σε επόμενο στάδιο, οι δυο αυτές σειρές ενώνονται στη μέση γραμμή σχηματίζοντας έτσι την κοιλότητα του νωτιαίου αγγείου, το οποίο περιβάλλεται από ακανόνιστης διάταξης περικαρδιακά κύτταρα (Ruggendorff et al., 1994; Zaffran et al., 1995).
Από το στάδιο αυτό και έπειτα, ο καρδιακός σωλήνας αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες (μεταμερή) κάθε μια από τις οποίες περιέχει έξι ζεύγη καρδιομυοκυττάρων, με εξαίρεση το πλέον οπίσθιο και πρόσθιο τμήμα, που περιέχει μόνο δυο ζεύγη κυττάρων (Bodmer and Frasch, 1999). Τα μεταμερή της καρδιάς είναι σε συστοιχία με τα μεταμερή της επιδερμίδας, με τα όρια κάθε μεταμερούς να προσδιορίζονται από τους πλευρικοί μύες που προσφύονται από τη μια μεριά στην επιδερμίδα, στα όρια των μεταμερών και από την άλλη μεριά στα πιο οπίσθια καρδιομυοκυτταρα που εκφράζουν *svp (seven up)* (Gajewski et al., 2000; Lo and Frasch, 2001; Molina and Cripps, 2001).
Η έκφραση διάφορων γονιδίων επαναλαμβάνεται στους καρδιοβλάστες κάθε μεταμερούς, υποδεικνύοντας μια διεργασία εξειδίκευσης της κυτταρικής ταυτότητας και της λειτουργικής ποικιλότητας σε κάθε μεταμερές. Έτσι σε κάθε μεταμερές, τα τέσσερα πρόσθια ζεύγη καρδιοβλαστων εκφράζουν το γονίδιο *tinman (tin),* το γονίδιο για τη β_3-τουμπουλίνη, και το γονίδιο για τον υποδοχέα της D-σουλφονυλ-ουρίας (*D-sur*) (Bodmer

and Frasch, 1999; Kremser et al., 1999; Nasonkin et al., 1999) και τα δυο οπίσθια εκφράζουν το *svp* και το *Tb66F2* (Gajewski et al., 2000; Lo and Frasch, 2001). Τα δυο πλέον πρόσθια ζεύγη καρδιοβλαστών που εκφράζουν *tin* εκφράζουν επίσης και το *ladybird* (Jagla et al., 1997). Βέβαια όλοι οι καρδιοβλάστες για να αποκτήσουν τη μυική τους ιδιότητα, πρέπει να υποστούν και μυογενή διαφοροποίηση και να εκφράσουν τη βαριά αλυσίδα της μυοσίνης και το *D-Mef2*. Γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι βάση αυτών των συνδυασμών μοριακών δεικτών οι καρδιοβλάστες μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις επιμέρους πληθυσμούς ικανούς να ανταποκριθούν σε διαφορετικά αναπτυξιακά προγράμματα και κατά συνέπεια να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα με ξεχωριστές ιδιότητες. Έτσι για παράδειγμα, τα όστια προέρχονται από καρδιοβλάστες που εκφράζουν το γονίδιο *tin* (Molina and Cripps, 2001).
Βέβαια, για να διαφοροποιηθεί ο πρόδρομος μεσοδερμικός ιστός σε λειτουργική καρδιά είναι απαραίτητη η συνδρομή σηματοδοτικών μορίων ενδογενών και εξωγενών του μεσοδέρματος. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν, στο μεταμερισμένο μεσόδερμα, τα πρόδρομα μεσοδερμικά κύτταρα διαφοροποιούνται ανάλογα με τη θέση τους εντός του μεταμερούς (Azpiazu and Frasch, 1993; Riechmann et al., 1997).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των καρδιακών κυττάρων του καρδιακού αγωγού της προνύμφης. Ο αγωγός δομείται από δυο σειρές καρδιακών κυττάρων επιθηλιακών και μυικών. Σε κάθε μεταμερές φαίνονται 6 σειρές καρδιακών κυττάρων με εξαίρεση το A8 και το T2. Το όριο αορτής και καρδιάς είναι στο A5 μεταμερές. Τα κύτταρα με κίτρινο εκφράζουν *svp.*
Cvv: cardiovascular valve
Am: alary muscle
(**Romina Ponzielli et al, 2002)**

Έτσι στην πρόσθια μεριά κάθε μεταμερούς, αναπτύσσεται ο καρδιογενής ιστός, όπου οι καρδιοβλάστες θα δεχτούν σήματα από το ραχιαίο εξώδερμα για περαιτέρω διαφοροποίηση. Τα σήματα αυτά φέρονται μέσω των μορίων Dpp (decapentaplegic) και Wg (wingless) (Frasch, 1999). Ωστόσο οι καρδιοβλάστες που εκφράζουν το *svp* και περιέχονται στον καρδιακό σωλήνα , φαίνεται να προέρχονται από την οπίσθια μεριά κάθε μεταμερούς (Frémion et al., 1999; Gajewski et al., 2000). Οι πληροφορίες που παρέχονται από τα εξωγενή σήματα του εξωδέρματος, ολοκληρώνονται με πληροφορίες από ενδογενείς μεσολαβητές, περιλαμβανομένων των μεταγραφικών παραγόντων *sloppy paired, even skipped* και το ειδικό για τους μυες ομοιοτικό γονίδιο (*msh/Dr; Drop*) (d'Alessio and Frasch, 1996; Halfon et al., 2000; Lee and Frasch, 2000).
Τέλος, πιο γενικές τοποειδικές πληροφορίες κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα πρέπει να υπερτεθούν των μεταμερικών πληροφοριών, ώστε να ολοκληρωθεί το

πρότυπο οργάνωσης και η διαφοροποίηση του καρδιακού σωλήνα. Ο ώριμος καρδιακός σωλήνας στην προνύμφη, διευρύνεται πρόσθια και δίνει την καρδιά με μια μεγάλη κοιλότητα. Ο καρδιακός παλμός ξεκινά από τη βηματοδοτική δραστηριότητα στην πλέον οπίσθια περιοχή του σωλήνα και προχωράει με περισταλτικές κινήσεις πρόσθια (Rizki, 1978). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχτεί ότι διάφοροι νευροδιαβιβαστές όπως η ακετυλοχολίνη, η σεροτονίνη, η νορεπινεφρίνη και η οκτοπαμίνη μπορούν να αυξήσουν τον καρδιακό ρυθμό (Johnson et al, 1997).

ΣΚΟΠΟΣ

Αναντίρρητα, η Δροσόφιλα αποτελεί ένα πάρα πολύ καλό μοντέλο για τη μελέτη πληθώρας βιολογικών και παθολογικών θεμάτων που αφορούν τον άνθρωπο, όπως έχει φανεί τις τελευταίες δεκαετίες. Έτσι, πλέον η Δροσόφιλα αποτελεί ισχυρό όπλο στην έρευνα σχετικά με τις νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ και του Πάρκινσον (Feany 2000, Muqit 2002), τον διαβήτη (Rulifson, 2002) τον καρκίνο (Bier , 2005).
Ο κύριος χώρος συνεισφοράς του μοντέλου της Δροσόφιλας, εντοπίζεται στην μελέτη γονιδίων που σχετίζονται με τις παραπάνω ασθένειες. Μεταξύ των γονιδίων αυτών, που είναι συχνά σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα μεταξύ των διαφόρων ειδών, είναι και τα γονίδια που εμπλέκονται στον καθορισμό του σχηματισμού της καρδιάς, καθώς και της λειτουργίας της, ως μέτοχοι στον μηχανισμό της καρδιακής συστολής και ως κωδικοποίητες διαύλων ιόντων αναγκαίων για την καρδιακή λειτουργία γενικότερα.
Η απλότητα της δομής και της λειτουργίας του συσταλτού ραχιαίου αγγείου της Δροσόφιλας, το καθιστούν ένα δυναμικό μοντέλο για την μελέτη των μηχανισμών της ανάπτυξης και της φυσιολογίας της καρδιάς, που έχουν συντηρηθεί μεταξύ της Δροσόφιλας και του ανθρώπου (Bier, 2004).
Ο εντοπισμός του υποδοχέα της ρυανοδίνης, της αντλίας SERCA και άλλων συστημάτων που μετέχουν στην καρδιακή λειτουργία τόσο της Δροσόφιλας όσο και του ανθρώπου, τονίζει τη σημασία του μοντέλου. Στον πίνακα 3, φαίνονται τρεις πρωτεΐνες σημαντικές για τη λειτουργία της καρδιάς, τόσο στον άνθρωπο όσο και σε άλλους οργανισμούς που συντηρούνται μεταξύ των ειδών. Ειδικά η SERCA (Ca^{2+}-ATPase) φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό όμοια μεταξύ της Δροσόφιλας και του ανθρώπου (Martínez et al, 2003).

Ryanodine receptor		Ca^{2+} ATPase		IP_3 receptor	
Invertebrates	Identity (%)	Invertebrates	Identity (%)	Invertebrates	Identity (%)
Drosophila melanogaster	100	*Drosophila melanogaster*	100	*Drosophila melanogaster*	100
Caernohabditis elegans	45	*Schistosoma mansoni*	73	*Caernohabditis elegans*	36
		Patinopecten yessoensis	75	*Panulirus argus*	57
		Procambarus clarkii	81		
Type 1					
Makaira nigricans	41	*Makaira nigricans*	71	*Mus musculus*	56
Rana catesbaiana	43	*Oryctolagus cuniculus*	71	*Rattus norvergicus*	56
Sus scrofa	43	*Rana esculenta*	73	*Bos taurus*	56
Oryctolagus cuniculus	43	*Rattus norvergicus*	72	*Xenopus laevis*	56
Homo sapiens	43	*Gallus gallus*	73		
		Homo sapiens	71		
Type 2					
Oryctolagus cuniculus	44	*Sus scrofa*	72	*Rattus norvergicus*	53
Mus musculus	44	*Rattus norvergicus*	72	*Homo sapiens*	53
Homo sapiens	37	*Mus musculus*	72	*Bos taurus*	53
		Gallus gallus	72		
		Felis silvestris catus	72		
		Canis familiaris	72		
		Homo sapiens	72		
Type 3					
Rana catesbaiana	43	*Rattus norvergicus*	67	*Rattus norvergicus*	50
Oryctolagus cuniculus	43	*Mus musculus*	68	*Bos taurus*	50
Gallus gallus	40	*Gallus gallus*	69	*Homo sapiens*	50
Mustela vison	40	*Homo sapiens*	67		

Πίνακας 3. Ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ των υποδοχέων ρυανοδίνης, της SERKA και του υποδοχέα IP3, ,μεταξύ της Δροσόφιλας και άλλων ειδών σπονδυλωτών και ασπόνδυλων. (**Martínez et al, 2003)**

Ωστόσο η έρευνα γύρω από την καρδιακή λειτουργία της προνύμφης της Δροσόφιλας, μόλις τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει συστηματικά, με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλά πεδία που επιζητούν απαντήσεις, κυρίως σχετικά με την φυσιολογία της καρδιακής σύσπασης στη Δροσόφιλα αφού δεν έχουν προσδιοριστεί επαρκώς οι δίαυλοι, τα ιοντικά ρεύματα και οι μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται σε αυτήν.
Ωστόσο η εμβάθυνση γύρω από τα θέματα αυτά είναι αναγκαία, προκειμένου να μπορέσει το μοντέλο αυτό να δώσει οριστικές και πειστικές απαντήσεις στα ερωτήματα που ανακύπτουν σχετικά με τις συγγενείς και τις επίκτητες καρδιακές δυσλειτουργίες στον άνθρωπο και να προταθούν αποτελεσματικότερες θεραπευτικές μέθοδοι.
Στην μελέτη αυτή, γίνεται μια απόπειρα καθορισμού μερικών από τους ιοντικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη φυσιολογική λειτουργία της προνύμφης της Δροσόφιλας, αλλά και μια μελέτη της SERCA στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, μια που είναι γνωστή για την εμπλοκή της σε μυοκαρδιοπάθειες στον άνθρωπο (Periasamy, 2001) αλλά και στη διατήρηση της φυσιολογικής ομοιόστασης του ασβεστίου στα καρδιομυοκύτταρα.
Παρόλο που η πειραματική μας προσέγγιση δεν μπορεί να απαντήσει σε όλα τα ερωτήματα που προκύπτουν σχετικά με τα θέματα που επιδιώκουμε να θίξουμε, πιστεύουμε ότι η παρούσα μελέτη είναι μια δυναμική συνεισφορά στο πεδίο και δίνει αξιόπιστες απαντήσεις σε πολλά ερωτηματικά.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Α. Πειραματόζωα

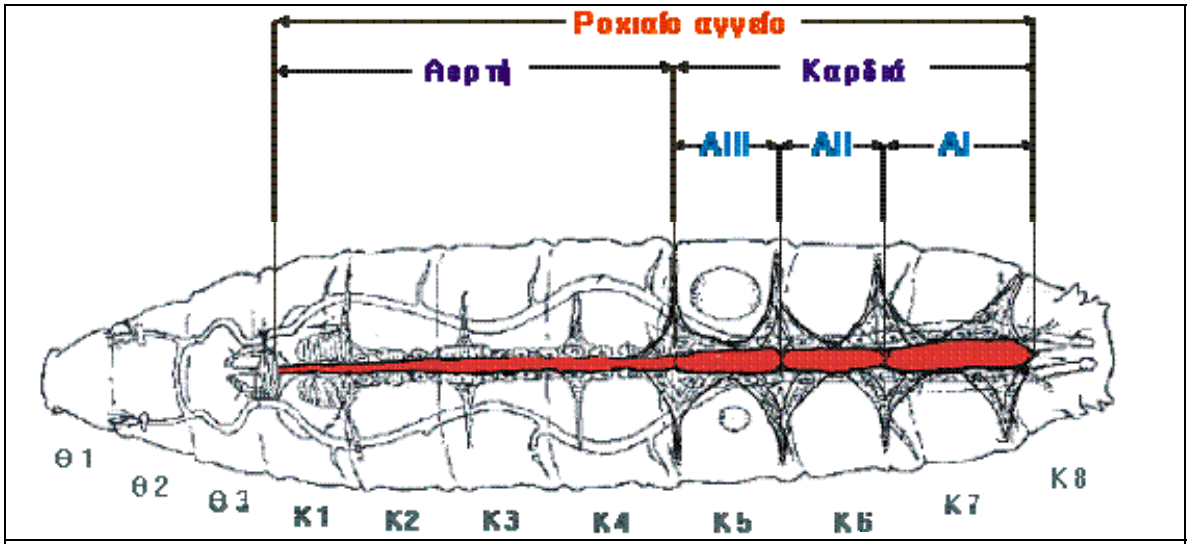
Βασίλειο: Ζώα (Animalia)
Φύλο: Αρθρόποδα (Arthropoda)
Υπόφυλο: Εξάποδα (Hexapoda)
Κλάση: Έντομα (Insecta)
Υποκλάση: Πτερυγωτά (Ptrerygota)
Τάξη: Δίπτερα (Diptera)
Υποτάξη; Βραχυκερωτά (Brachycera)
Οικογένεια: Drosophilidae
Υποοικογένεια: Drosophilinae
Γένος: *Drosophila*
Είδος: *melanogaster*

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες του είδους *Drosophila melanogaster* δύο στελεχών: ενός άγριου τύπου Oregon R (OR) και ενός μεταλλαγμένου στελέχους για την αντλία ασβεστίου του σαρκοπλασματικού δικτύου SERCA του Kum^{170}/+ (*Kumbhakarna*^{170}). Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται στο δεύτερο χρωμόσωμα και σε ομοζυγωτία είναι θνησιγόνος. Επιπλέον η έκφραση του μεταλλαγμένου φαινότυπου είναι θερμοευαίσθητη, δηλαδή η απενεργοποίηση της SERCA δε συμβαίνει, εκτός και αν γίνει επώαση των στελεχών που φέρουν τη μετάλλαξη, στους 40^{o} C για 3-5 λεπτά (S. Sanyal et al, 2004). Αυτή η δυνατότητα ελέγχου του χρόνου έκφρασης του μεταλλαγμένου φαινοτύπου είναι εξαιρετικά χρήσιμη, μια που καθιστά δυνατή την μελέτη της δυσλειτουργίας που προκαλεί η έλλειψη της φυσιολογικής πρωτεΐνης σε οποιοδήποτε αναπτυξιακό ή ενήλικο στάδιο. Επομένως αυτού του τύπου οι μεταλλάξεις πέραν των όποιων άλλων ερευνητικών πλεονεκτημάτων τους, επιτρέπουν επιπλέον την αξιολόγηση της σημασίας και της συνεισφοράς της φυσιολογικής πρωτεΐνης στην περάτωση μιας ορισμένης λειτουργίας.
Οι καλλιέργειες των σειρών αυτών των στελεχών, έγιναν σε πλαστικά κυλινδρικά μπουκαλάκια (vials), που το καθένα περιείχε τροφή ειδική για τη συντήρηση των πειραματόζωων. Τα μπουκαλάκια αυτά και συνεπώς και τα έντομα, διατηρούνταν σε επωαστήρα στους 23^{o}C και σε υγρασία 70%, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για πείραμα. Οι μύγες εναπόθεταν τα αυγά τους στην τροφή από όπου αναπτύσσονταν οι προνύμφες. Οι προνύμφες προτού περάσουν στο στάδιο της νύμφης εξέρχονται από τη τροφή και μετά από κάποιο διάστημα λίγων ωρών έντονης κινητικότητας ηρεμούν στα τοιχώματα του φιαλιδίου. Έτσι μπορούν να συλλεχθούν με ένα μικρό πινέλο για τις ανάγκες των πειραμάτων.
Οι προνύμφες τοποθετήθηκαν σε ένα μικρό πλαστικό τριβλίο χωρητικότητας 2 ml, το οποίο περιείχε στον πάτο του ειδική σιλικόνη (silica gel) ώστε να μπορούν να σταθεροποιηθούν πάνω σ' αυτό με καρφίτσες πολύ μικρού μήκους και διαμέτρου (insect pins). Στην συνέχεια ακολούθησε ανατομική προπαρασκευή της προνύμφης με τη βοήθεια μικροχειρουργικών εργαλείων.

Β. Πειραματικοί χειρισμοί

Ανατομική προπαρασκευή της καρδιάς

Η όλη διαδικασία της ανατομικής προπαρασκευής πραγματοποιήθηκε κάτω από στερεοσκόπιο. Η προνύμφη τοποθετήθηκε με την κοιλιακή περιοχή προς τα πάνω με δύο καρφίτσες τοποθετημένες με προσοχή, στα δύο άκρα (ουραίο άκρο και κεφαλή). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε με το ειδικό μικροχειρουργικό ψαλίδι μία επιφανειακή κάθετη τομή ως προς τον διαμήκη άξονα της προνύμφης στο ουραίο άκρο. Ξεκινώντας από αυτό το σημείο, πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη τομή, επιμήκης αυτή τη φορά (κατά μήκος της κοιλίας), μέχρι την περιοχή της κεφαλής, και τα δύο ήμισυ της κοιλιακής επιδερμίδας στερεώθηκαν αντιδιαμετρικά στη βάση του τριβλίου. Κατόπιν, απομακρύνθηκαν ο πεπτικός σωλήνας, το νευρικό σύστημα, ο συνδετικός ιστός και ο λιπώδης ιστός προκειμένου να αποκαλυφθεί το ραχιαίο αγγείο. Η ανατομική προπαρασκευή και η περαιτέρω



Εικόνα 8. Μορφολογία του κυκλοφορικού συστήματος της *Drosophila* στο στάδιο της προνύμφης. Θ=Θωρακικό μεταμερές, Κ=Κοιλιακό μεταμερές, AI, AII, AIII=αντλίες

πειραματική διαδικασία έγινε παρουσία οξυγονωμένου φυσιολογικού ορού, ο οποίος παρασκευαζόταν για τις ανάγκες των πειραμάτων κάθε φορά. Επίσης, για να αποφευχθεί οποιαδήποτε βλάβη στην καρδιά που θα μπορούσε να επηρεάσει τη λειτουργία της, όλες οι παραπάνω διεργασίες γίνονταν με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην τραυματιστεί η καρδιά. Πριν από κάθε πείραμα, το παρασκεύασμα έμενε για πέντε περίπου λεπτά σε ηρεμία. Πάντα τα παρασκευάσματα διατρέχονταν από οξυγονωμένο φυσιολογικό ορό, πριν και μετά από κάθε χειρισμό.

Φυσιολογικός ορός

Ο φυσιολογικός ορός που χρησιμοποιούσαμε (Jan and Jan), είναι ένα υδατικό διάλυμα που προορίζεται ειδικά για τα παρασκευάσματά μας και έχει πολύ αυστηρά καθορισμένη σύσταση. Να σημειωθεί, ότι μετά την παρασκευή του ορού, ρυθμιζόταν το pH γύρω στο 7,1-7,3 στους 25^{o}C, με τη χρήση HCl και των βάσεων NaOH ή KOH για τα πειράματα που ήταν αναγκαία η απουσία έστω και ελάχιστης ποσότητας νατρίου. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται οι συγκεντρώσεις σε molarity, κάθε χημικής ένωσης του ορού.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΟΡΟΥ JAN & JAN	**ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ (molarity)**
NaCl	0,128M
KCl	0,002M
$CaCl_2.2H_2O$	0,0018M
$MgCl_2.6H_2O$	0,004M
Σουκρόζη	0,0355M
HEPES	0,005M

Ηλεκτροφυσιολογία: Καταγραφές και παρακολούθηση της καρδιακής συχνότητας.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των εξωκυττάριων καταγραφών με ηλεκτρόδια αποτελούμενα από γυάλινες μικροπιπέτες, στο εσωτερικό των οποίων απομονωνόταν ο ένας πόλος σύρματος αργύρου. Έτσι, σε ανοιχτό παρασκεύασμα, εντοπίζόταν η οπίσθια περιοχή της καρδιάς και φερόταν πάνω σε αυτήν ένα μικρό ηλεκτρόδιο με γείωση, ειδικά κατασκευασμένο για την πραγματοποίηση εξωκυττάριων καταγραφών. Το ηλεκτρόδιο ακουμπούσε την εξωτερική επιφάνεια της καρδιάς. Η κατασκευή των ηλεκτροδίων γινόταν με οριζόντιο εξολκέα ηλεκτροδίων (P-97, Sutter Instruments Co). Το εσωτερικό των ηλεκτροδίων πληρωνόταν με φυσιολογικό ορό και η ακριβής στόχευσή τους στο παρασκεύασμα, εξασφαλιζόταν με τη βοήθεια μικροχειριστή. Η όλη διαδικασία ελεγχόταν μέσω στερεοσκόπιου και με αυτό τον τρόπο επιτυγχανόταν ακρίβεια στους λεπτούς χειρισμούς. Επίσης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ταυτόχρονα με την καταγραφή από το ηλεκτρόδιο, μπορούσαμε να παρατηρήσουμε από το στερεοσκόπιο την καρδιακή σύσπαση.
Το παραπάνω σύστημα κατέγραφε την ηλεκτρική δραστηριότητα της καρδιάς και τη συχνότητα πυροδότησης δυναμικών ενέργειας. Το σήμα ενισχυόταν 10000 φορές, με τη χρήση κατάλληλου ενισχυτή (DAMSO E,World Precision Instruments) και μετατρεπόταν σε ψηφιακό μέσω ενός μετατροπέα αναλογικών σημάτων σε ψηφιακά (DIGIDATA 1322A, Axon Instruments). Οι καταγραφές εμφανίζονταν στην οθόνη ηλεκτρονικού υπολογιστή, με τη χρήση του προγράμματος Clampex 8.1.
Παράλληλα για να διατηρηθεί ανέπαφο το παρασκεύασμα, μέσα στο τριβλίο όπου βρισκόταν, είχε προσαρμοστεί κατάλληλα ένα σύστημα κυκλοφορίας του ορού με την βοήθεια μια περισταλτικής αντλίας Gilson, minipuls 2. Η αντλία αυτή ανακύκλωνε τον φυσιολογικό ορό με ρυθμό που είχε ρυθμιστεί στα 4ml/min, σε τριβλίο χωρητικότητας 2

ml. Επομένως κάθε 30 δευτερόλεπτα περίπου, ανανεωνόταν πλήρως ο ορός που περιέλουζε το παρασκεύασμα, εξασφαλίζοντας την συνεχή οξυγόνωση του.

Θερμική επίδραση (heat shock,hs)

Για να ανασταλεί η δράση της SERCA, πραγματοποιήθηκε βραχύχρονη θερμική επίδραση σε προνύμφες Kum^{170}. Αυτό επιτεύχθηκε με τοποθέτηση των πειραματόζωων σε ένα μικρό γυάλινο σωλήνα εισαγωγή αυτού σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40^0C για πέντε λεπτά. Η ανατομική προπαρασκευή των προνυμφών έγινε τριάντα λεπτά μετά τη θερμική επίδραση. Μέσα στο χρόνο αυτό θεωρείται ότι τα πειραματόζωα έχουν επανέλθει και η αντλία έχει πάψει να λειτουργεί, στο βαθμό φυσικά που αυτό συμβαίνει σε κάθε ζώο, αφού υπάρχει περίπτωση κάποιο να μην επηρεαστεί από το σοκ. Για να διασφαλίσουμε ότι κάποιο ζώο έχει υποστεί το hs, προσέχουμε να έχει συσπειρωθεί μετά από αυτό. Η συσπείρωση αυτή συμβαίνει λόγω της σύσπασης των μυών του σώματος του ζώου λόγω αδρανοποίησης της SERCA.

Πειράματα μελέτης ιόντων νατρίου και ασβεστίου

Στα πειράματα αυτά, προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος των ιόντων ασβεστίου ή νατρίου, παραλειπόταν η προσθήκη του ενός ή του άλλου ιόντος στο διάλυμα του ορού. Ωστόσο για να διατηρηθεί η ωσμοτικότητα του διαλύματος σταθερή, ίσα moles από άλλη αδρανή ιοντική ένωση προστεθήκαν. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε ίση ποσότητα χλωριούχου χολίνης. Η ουσία αυτή είναι ένα οργανικό μόριο ($C_5H_{14}ONCl$) και δεν επηρεάζει κάποια λειτουργία από αυτές που μελετούμε (Lucas & Shimahara, 2002). Επιπλέον σχετικά με τη μελέτη του ασβεστίου, έγινε μελέτη σε δυο διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις. Στην μια αφαιρέθηκε εντελώς το ασβέστιο από το διάλυμα και ταυτόχρονα προσθέθηκε EGTA, το οποίο έχει την ιδιότητα να δεσμεύει το ελεύθερο ασβέστιο. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζετε η πλήρης δέσμευση του ιόντος. Σε μια επόμενη προσέγγιση, δε προστέθηκε καθόλου EGTA, αλλά προστέθηκε μια πολύ μικρή ποσότητα ασβεστίου –περίπου είκοσι φορές μικρότερη από αυτή που φυσιολογικά υπάρχει στον ορό.

Φαρμακολογία

Η χρήση διαφόρων χημικών μορίων με γνωστές φαρμακολογικές ιδιότητες, είναι αναγκαία ώστε διαλευκανθεί ο μηχανισμός λειτουργίας των καρδιακών μυοκύτταρων της Δροσόφιλας. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν χημικά μόρια, σε συγκεντρώσεις όπως υποδεικνύουν έγκυρες ερευνητικές εργασίες και καταγράφηκε ο φαινότυπος που προσδίδει η χορήγησή τους στην καρδιακή συχνότητα. Τα φάρμακα αυτά, διαλύθηκαν στο φυσιολογικό ορό που διαπότιζε το παρασκεύασμα σε καθορισμένες συγκεντρώσεις. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

1. *βεραπαμίλη.* Το φάρμακο ανήκει στις φαινυλαλκιλαμίνες που μαζί με τις διυδροπυριδίνες και τις βενζοθειαζεπίνες, συνιστούν τις τρεις κατηγορίες ουσιών

που αποκλείουν τους τασεοεξαρτώμενουν L-τύπου διαύλους ασβεστίου στα θηλαστικά. Επίσης, σύμφωνα με τους Gang-Guo Gu & Satpal Singh (1995), η βεραπαμίλη σε συγκέντρωση 50μM, προκαλούσε πολύ σημαντική μείωση στην καρδιακή συχνότητα στην προνύμφη της Δροσόφιλας. Ωστόσο ο λόγος που επιλέξαμε τη βεραπαμίλη για τα πειράματά είναι ότι το 1998 ο Johnson και συνεργάτες, συμπέραναν ότι η βεραπαμίλη δεν έχει καμία επίδραση στον καρδιακό ρυθμό, στη χρυσαλίδα της Δροσόφιλας. Έτσι θεωρήσαμε σκόπιμο να επιβεβαιώσουμε την ορθότητα των ευρημάτων των Gang-Guo Gu & Satpal Singh. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 30 μM βεραπαμίλης, από παρασκεύασμα για φαρμακολογική χρήση (Verapamil HCl, 5mg/2ml, ABBOT GmbH & Co, VIANEX).

2. *νιφεδιπίνη.* Πρόκειται για μια διυδροπυριδίνη και όπως είπαμε, είναι αποκλειστής των L- τύπου διαύλων ασβεστίου. Η νιφεδιπίνη δεν έχει ελεγχθεί ως προς τη δράση της στην καρδιακή λειτουργία της προνύμφης της Δροσόφιλας. Χρησιμοποιήσαμε σκεύασμα νιφεδιπίνης 5mg/50ml (Bayer Healthcare AG) το οποίο αραιώσαμε σε συγκέντρωση 5 μM.
3. *νικέλιο* Ni^{2+}. Το Ni^{2+} έχει βρεθεί στα θηλαστικά να μπλοκάρει τους χαμηλού δυναμικού Τ-τύπου διαύλους ασβεστίου σε συγκεντρώσεις 25-50 μM. Προκειμένου να διαπιστώσουμε την ισχύ της παρατήρησης αυτής στο δικό μας πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήσαμε το ιόν στην ίδια συγκέντρωση. Ωστόσο, επειδή έχει βρεθεί να αποκλείει τους L- τύπου διαύλους ασβεστίου σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0,5-1 μM), δοκιμάστηκε η επίδραση του σε συγκέντρωση 1mM. Το νικέλιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν nickel(II)-chlorid-Hexahydrat, MERCK.
4. *cyclopiazonic acid (CPA).* Η ουσία αυτή είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης του μύκητα *Penicillium cyclopium*, η οποία έχει βρεθεί να αναστέλλει την SERCA του ΣΔ. Ουσιαστικά δηλαδή η ουσία αυτή θα πρέπει αν μιμείται την επίδραση του θερμικού σοκ στα μεταλλαγμένα kum^{170}, αφού είτε η χρήση της τοξίνης είτε το θερμικό σοκ απενεργοποιούν τη SERCA του ΣΔ. Για να επαληθευτεί η υπόθεση αυτή, το CPA εφαρμόστηκε τόσο σε ζώα άγριου τύπου όσο και σε μεταλλαγμένα kum^{170}, πριν και μετά το θερμικό σοκ. Το σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι της CALBIOCHEM. Επειδή η τοξίνη αυτή διαλύεται σε DMSO πριν εισαγθεί στον πειραματικό ορό, και ποσότητα του DMSO είναι 0,04% του τελικού όγκου του ορού, δοκιμάστηκε πριν οποιαδήποτε πειραματική ενέργεια η επίδραση του απορρυπαντικού 0,05% κατ' όγκο ορού στην καρδιακή συχνότητα. Οι δοκιμές έγιναν και στα άγριου τύπου και στα μεταλλαγμένα kum^{170} και διαπιστώθηκε ότι στη συγκέντρωση αυτή το DMSO δεν επηρεάζει την καρδιακή συχνότητα.

<u>*Σημείωση:*</u> Έπειτα από κάθε πειραματικό χειρισμό που περιλάμβανε αλλαγή της σύστασης του περιβάλλοντος ορού του παρασκευάσματος και όταν πλέον είχε καταγραφεί η επίδραση του χειρισμού, γινόταν απόπειρα άρσης της δράσης του. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, με τη βοήθεια της περισταλτικής αντλίας, σταματούσε η παροχή του πειραματικού ορού και ξεκινούσε πάλι η παροχή φυσιολογικού ορού. Αυτή η διαδικασία (recovery) αποσκοπεί πρώτον στο να διαπιστώσουμε ότι το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε ήταν πραγματικό και όχι βιολογική δυσλειτουργία του οργανισμού,

εφόσον η επιστροφή σε φυσιολογικό ορό επανάφερε την καρδιακή συχνότητα και δεύτερον στο να πάρουμε μια εικόνα για τον τρόπο δράσης των ουσιών που προστέθηκαν στον ορό, αφού πολλές από αυτές μπορεί να δεσμεύονται μη αντιστρεπτά και να παρατείνεται η δράση τους ακόμα και μετά την απομάκρυνση τους από τον εξωκυττάριο χώρο.

Περιγραφή ενός τυπικού πειράματος.

Μια υγιής προνύμφη τρίτου σταδίου επιλεγόταν και γινόταν η χειρουργική αποκάλυψη της αορτής και της καρδιάς, όπως έχει περιγραφεί. Η διετμημένη προνύμφη πάνω στο τρυβλίο αποτελεί πλέον ένα ανοιχτό παρασκεύασμα. Στη συνέχεια τοποθετούνταν κάτω από το στερεοσκόπιο όπου γινόταν η πειραματική διαδικασία και προσαρμοζόταν κατάλληλα τα άκρα των δυο σωλήνων της περισταλτικής αντλίας. Το ένα σωληνάκι έφερνε πάντα ορό από ένα δοχείο και το άλλο απομάκρυνε τον ορό που είχε φτάσει στο τρυβλίο και τον αποχέτευε σε ένα δεύτερο δοχείο.
Το παρασκεύασμα αφηνόταν για πέντε λεπτά περίπου να διαποτίζεται από φυσιολογικό ορό και στη συνέχεια εντοπιζόταν το οπίσθιο τμήμα της καρδιάς και φερόταν πάνω σε αυτό ένα ηλεκτρόδιο και ξεκινούσε και η καταγραφή.
Για δυο λεπτά περίπου καταγραφόταν η καρδιακή λειτουργία παρουσία φυσιολογικού ορού. Στη συνέχεια μεταφερόταν το σωληνάκι που παροχέτευε τον ορό, σε άλλο δοχείο που περιείχε τον πειραματικό ορό. Ο πειραματικός ορός χρειαζόταν 20 δευτερόλεπτα ώστε να φτάσει στο τρυβλίο του παρασκευάσματος.
Ο πειραματικός ορός, ανάλογα με την τροποποίηση ή προσθήκη του κάθε φορά, επιδρούσε στο παρασκεύασμα για χρόνους από 5 λεπτά για χειρισμούς που είχαν άμεσο και ισχυρό αντίκτυπο στο φαινότυπο, έως και είκοσι λεπτά για χειρισμούς που είχαν πιο ασθενή ή βραδεία ή μηδαμινή δράση.
Τέλος, μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, γινόταν «ανάνηψη» (recovery). Σε αυτό το στάδιο, μετακινούνταν το σωληνάκι παροχέτευσης στο φυσιολογικό ορό και αφού αποχετευόταν όλος ο πειραματικός ορός, συνεχιζόταν το ξέπλυμα του παρασκευάσματος για 5-15 λεπτά, μέχρι να παρατηρηθεί η αναστροφή της επίδρασης του πειραματικού χειρισμού στην καρδιακή συχνότητα.
Τέλος οι αποθηκευμένες στον Η/Υ καταγραφές επεξεργάζονταν όπως περιγράφεται παρακάτω.

Γ. Επεξεργασία δεδομένων.

Οι καταγραφές των πειραμάτων γίνονταν με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και του ειδικού για ηλεκτροφυσιολογία προγράμματος Clampex 8.1.
Σε κάθε πείραμα μετρήθηκαν οι παλμοί της καρδιάς πριν και μετά τη μεταχείριση που κάναμε κάθε φορά και ανάχθηκαν τα αποτελέσματα σε καρδιακούς παλμούς ανά λεπτό. Οι τιμές που πήραμε συγκρίθηκαν μεταξύ τους με τη χρήση two-tail TTEST για την εμφάνιση των διαφορών. Να σημειωθεί ότι σε κάθε πείραμα ελεγχόταν στο τέλος αν η απομάκρυνση της εκάστοτε μεταχείρισης αντιστρέφει την επίδρασή της στην καρδιακή λειτουργία. Για να επιτευχθεί αυτό, τερματιζόταν ο εμποτισμός του παρασκευάσματος με

το διάλυμα του πειραματικού ορού και διαμέσου της αντλίας, χορηγούνταν στο παρασκεύασμα φυσιολογικός ορός, που αφενός ξέπλενε τα υπολείμματα του πειραματικού μέσου και αφετέρου παρείχε όλα τα απαραίτητα στοιχεία για να λειτουργήσει η καρδιά φυσιολογικά.
Η επεξεργασία των γραφημάτων που απεικονίζουν ποσοτικά τις διαφορές μεταξύ της καρδιακής λειτουργίας πριν και μετά την δράση του πειραματικού ορού έγινε με Microsoft Office Excel 2003. Επιπλέον οι εικόνες των καταγραφών αποτελούν δείγματα αντιπροσωπευτικά του πως επηρεάζετε από κάθε επίδραση η συχνότητα της καρδιακής λειτουργίας και δίνουν μια εικόνα για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των πειραμάτων. Ως εξωκυττάριες καταγραφές δε μας παρέχουν καμία πληροφορία για μεμβρανικά δυναμικά, αλλά εκπροσωπούν τις μεταβολές της ηλεκτρικής δραστηριότητας και το φαινότυπο της συχνότητας της καρδιακής λειτουργίας. Η επεξεργασία των καταγραφών που παρουσιάζονται έγινε με το πρόγραμμα CorelDraw Graphics 12.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΓΕΝΙΚΑ

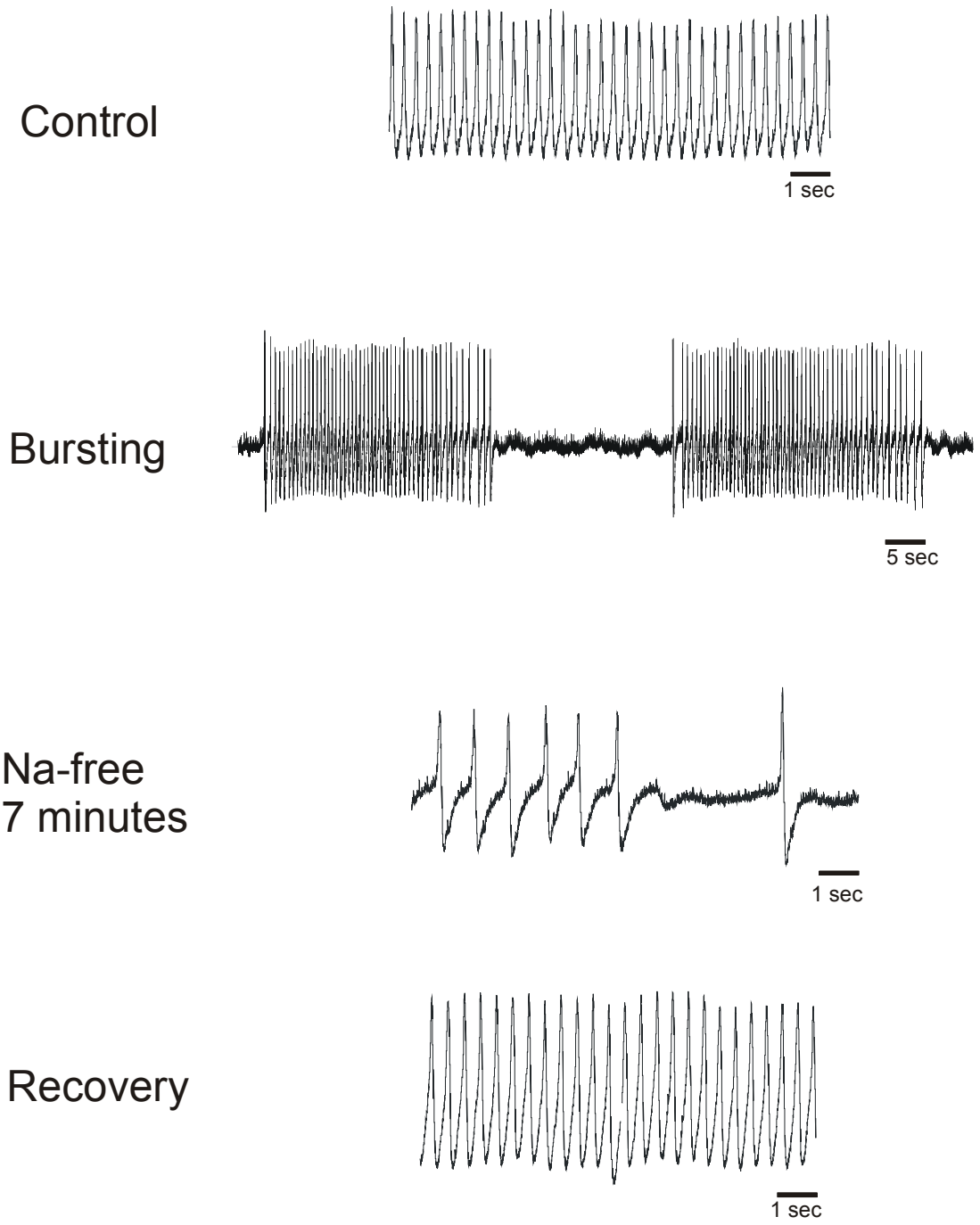
Κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, μελετήθηκε αρχικά ο ρόλος των ιόντων του ασβεστίου και του νατρίου στον καρδιακό ρυθμό, στην καρδιά της προνύμφης της Δροσόφιλας. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με εξωκυττάριες της ηλεκτρικής δραστηριότητας (ΗΔ) της καρδιάς, οι οποίες μας παρέχουν πληροφορία για τη συχνότητα της καρδιακής λειτουργίας, τη διάρκεια των ΔΕ και κάποιες ενδείξεις για την καρδιακή σύσπαση. Στη συνέχεια, οι ενδείξεις των πρώτων πειραμάτων, αναπόφευκτα οδήγησαν στην περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του ασβεστίου και των εμπλεκομένων με αυτό διαύλων.
Για να αντληθεί η μέγιστη δυνατή πληροφορία από το πειραματικό μοντέλο και την πειραματική προσέγγιση που χρησιμοποιήσαμε, απαραίτητη κρίθηκε και η αξιοποίηση των δυνατοτήτων που παρέχει η φαρμακολογία. Για το λόγο αυτό, σε στελέχη άγριου τύπου OR-R, χορηγήθηκαν φάρμακα που αποκλείουν τους διαύλους ασβεστίου της μεμβράνης και συγκεκριμένα τη βεραπαμίλη, τη νιφεδιπίνη και χαμηλές συγκεντρώσεις νικελίου, καθώς και την τοξίνη CPA που αποκλείει τη SERKA (βλ. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ). Επιπρόσθετα, εξετάστηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη *kum*^{170}, τα οποία με την επίδραση θερμικού σοκ, παρουσιάζουν υστέρηση στην καρδιακή λειτουργία, λόγω απενεργοποίησης της SERCA του ΣΔ. Στα τελευταία μάλιστα, έγιναν καταγραφές πριν την επίδραση του θερμικού σοκ –ως πειράματα ελέγχου- και μετά. Η επίδραση του CPA μελετήθηκε και στις δυο αυτές περιπτώσεις.

Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα που έγιναν.

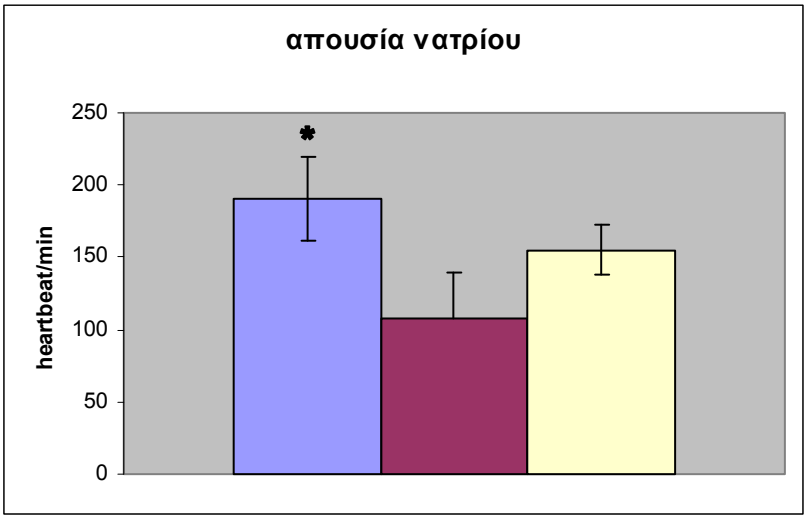
Α. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΟΝΤΩΝ

α. Αποτελέσματα ολικής αποστέρησης του νατρίου.

Το νάτριο έχει φανεί να παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην καρδιακή λειτουργία στα σπονδυλωτά. Στο παρελθόν έχουν γίνει διάφορα σχετικά πειράματα στη Δροσόφιλα, περιορίζοντας ως ένα βαθμό τη συγκέντρωση του νατρίου ή αποκλείοντας τους τασεοελεγχόμενους διαύλους του με TTX (Gu & Singh, 1995) .
Εδώ έχει εξεταστεί η ολική αφαίρεση του νατρίου, ενώ η ωσμωτική πίεση διατηρείται σταθερή με ισοδύναμη προσθήκη χλωριούχου χολίνης.
Τα πειράματα έγιναν συνολικά σε 10 παρασκευάσματα. Σε όλες τις περιπτώσεις, διαπιστώθηκε ότι η πλήρης απουσία νατρίου, επηρέαζε τον καρδιακό ρυθμό και συγκεκριμένα προκαλούσε τη μείωσή του όπως φαίνεται στο γράφημα 1 ($p< 0,001$) σε ποσοστό κατά μέσο όρο 43,5%.
Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε και ποιοτική διαφοροποίηση της ΗΔ για όσο χρόνο επιδρούσε ο πειραματικός ορός. Έτσι το πρότυπο συνεχούς ρυθμικής καρδιακής δραστηριότητας που χαρακτήριζε τα παρασκευάσματα πριν αφαιρεθεί το νάτριο χανόταν. Αντί για συνεχή ρυθμική λειτουργία, αυτό που παρατηρήθηκε ήταν μεγάλα διαστήματα παντελούς έλλειψης ΗΔ, εναλλασσόμενα με διαστήματα ρυθμικής δραστηριότητας ή/και αρρυθμίας, πους το εξής θα αναφέρεται καιως πρότυπο ριπών (καταγραφή 1).
Σε γενικές γραμμές ο φαινότυπος που προσδίδει η απουσία νατρίου στη συχνότητα της καρδιακής λειτουργίας χρειάζεται από 6 έως και 9 λεπτά να καταγραφεί, ανάλογα με το παρασκεύασμα.
Σε κάθε πείραμα όπως προαναφέρθηκε, προκειμένου να προσκομήσουμε περισσότερη πληροφορία σχετικά με το φαρμακολογικό προφίλ ή την επίδραση κάθε χειρισμού, γίνεται ανάκτηση της φυσιολογικής λειτουργίας (recovery). Στην περίπτωση του παρόντος πειράματος, για να γίνει αυτό διακόπηκε η παροχή ορού χωρίς νάτριο και ταυτόχρονα επαναφέρθηκε η παροχή φυσιολογικού ορού, μέσω της περισταλτικής αντλίας. Μέσα σε περίπου 2 λεπτά παρατηρήθηκε ότι η καρδιακή λειτουργία επανερχόταν πλήρως σε ότι αφορά τη ρυθμικότητα και σχετικά ικανοποιητικά ως προς τη συχνότητα.



Καταγραφή 1: Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν καρδιακή ΗΔ. Αρχικά (control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό χωρίς νάτριο. Στη δεύτερη καταγραφή φαίνεται το διάστημα πλήρους αδράνειας, μεταξύ των διαστημάτων έντονης καρδιακής ΗΔ (bursting) και στην τρίτη ο φαινότυπος μετά από 7 λεπτά αποστέρησης του νατρίου. Τέλος φαίνεται η επαναφορά της κανονικής λειτουργίας (recovery).



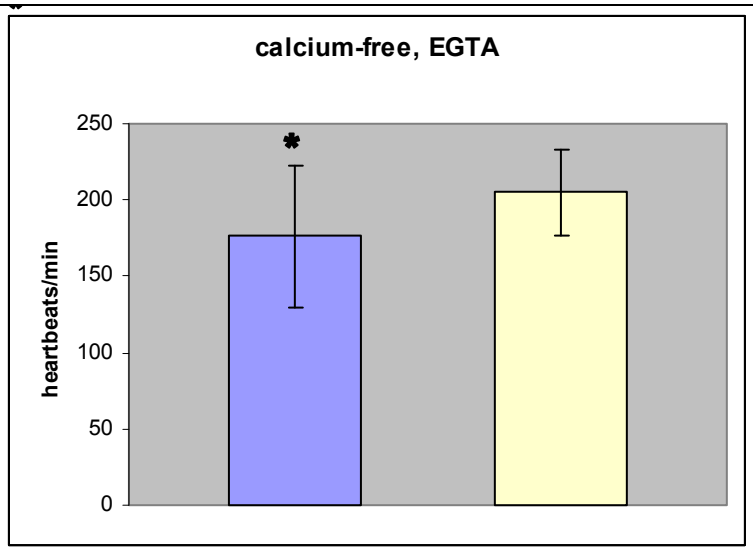
Γράφημα 1. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού χωρίς νάτριο ($p<0,001$). Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός.

β. Αποτελέσματα αποστέρησης ή ελάττωσης του ασβεστίου.

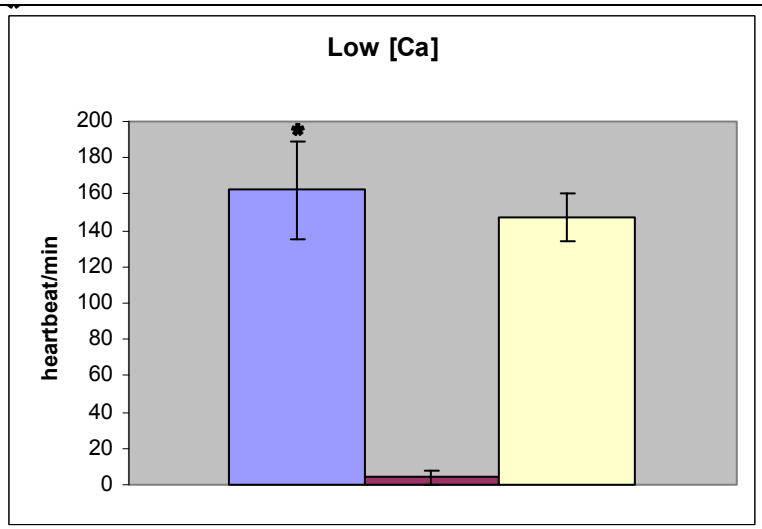
Το ασβέστιο ως πρωταρχικής σημασίας ιόν για την καρδιακή λειτουργία –και όχι μόνο- στα σπονδυλωτά κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί στη μελέτη αυτή. Προκειμένου να προσδιοριστεί η σημασία του στην προνύμφη τρίτου σταδίου της Δροσόφιλας εξετάστηκε η επίδραση της ολικής απουσίας ασβεστίου από τον ορό που διαποτίζει το παρασκεύασμα και η παρουσία του σε πολύ μικρή συγκέντρωση.

Απουσία ασβεστίου και προσθήκη EGTA.

Σε οχτώ πειραματόζωα συνολικά, ερευνήθηκε η επίδραση της παντελούς απουσίας του ασβεστίου από τον ορό, παρουσία μάλιστα ενός χημικού μορίου με ιδιότητες να δεσμεύει το ελεύθερο ασβέστιο. Έτσι αποκλείστηκε η παρουσία έστω και μικρής ποσότητας ασβεστίου στο διάλυμα που διέτρεχε τα παρασκευάσματα κατά τον πειραματικό χειρισμό.
Το αποτέλεσμα από το χειρισμό αυτό, ήταν η πλήρης αδρανοποίηση της καρδιάς του πειραματόζωου. Συγκεκριμένα μέσα σε 1,5-2 λεπτά μετά την έναρξη της εμβάπτισης του παρασκευάσματος με απαλλαγμένο από ασβέστιο ορό παρουσία EGTA, διακόπηκε παντελώς η καρδιακή λειτουργία. Εντυπωσιακό είναι ότι δεν παρατηρήθηκε απολύτως καμία ένδειξη καρδιακής ΗΔ για όσο χρόνο το παρασκεύασμα εμποτιζόταν με τον πειραματικό ορό, σε κανένα παρασκεύασμα (γράφημα 2).
Ποιοτικά, αυτό που μπορεί να σημειωθεί και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με διαφορετικά πειραματικά μέσα, είναι η αλλαγή που παρατηρείται στη διάρκεια των εξωκυττάριων δυναμικών, λίγο πριν τον οριστικό τερματισμό της καρδιακής λειτουργίας (καταγραφή 2Β) και η σταδιακή έναρξη της επανάκαμψης που παρατηρείται μετά την επαναχορήγηση του φυσιολογικού ορού (καταγραφή 2C).
Τέλος να σημειωθεί η μικρή αύξηση στην καρδιακή συχνότητα που διαπιστώθηκε μετά το χειρισμό αποκατάστασης του φυσιολογικού περιβάλλοντος του παρασκευάσματος σε σχέση με τη φυσιολογικά μετρούμενη, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,187$).



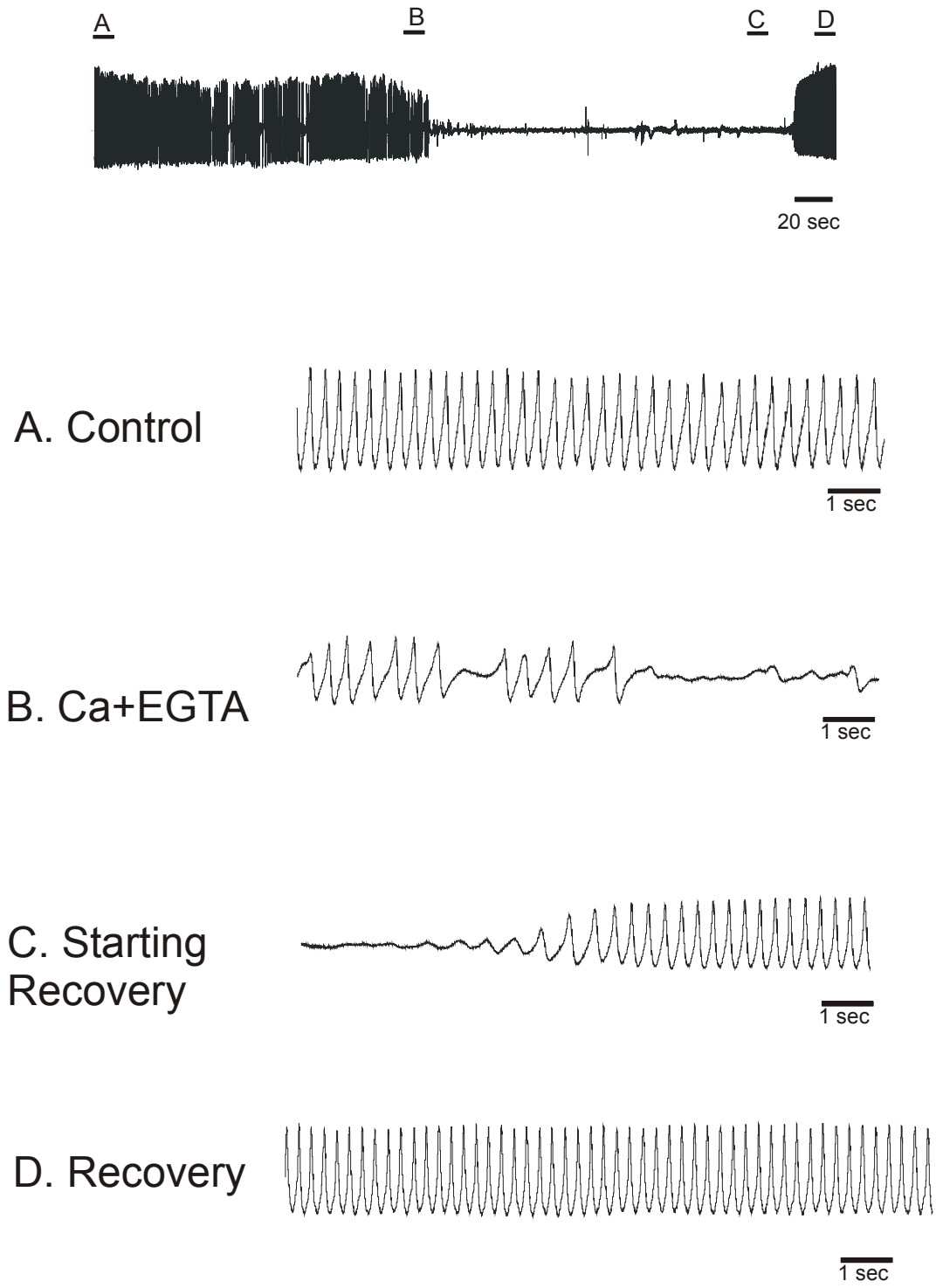
Γράφημα 2. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) σε φυσιολογικές συνθήκες (μπλε) και απουσία ασβεστίου (μηδενική τιμή). Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός



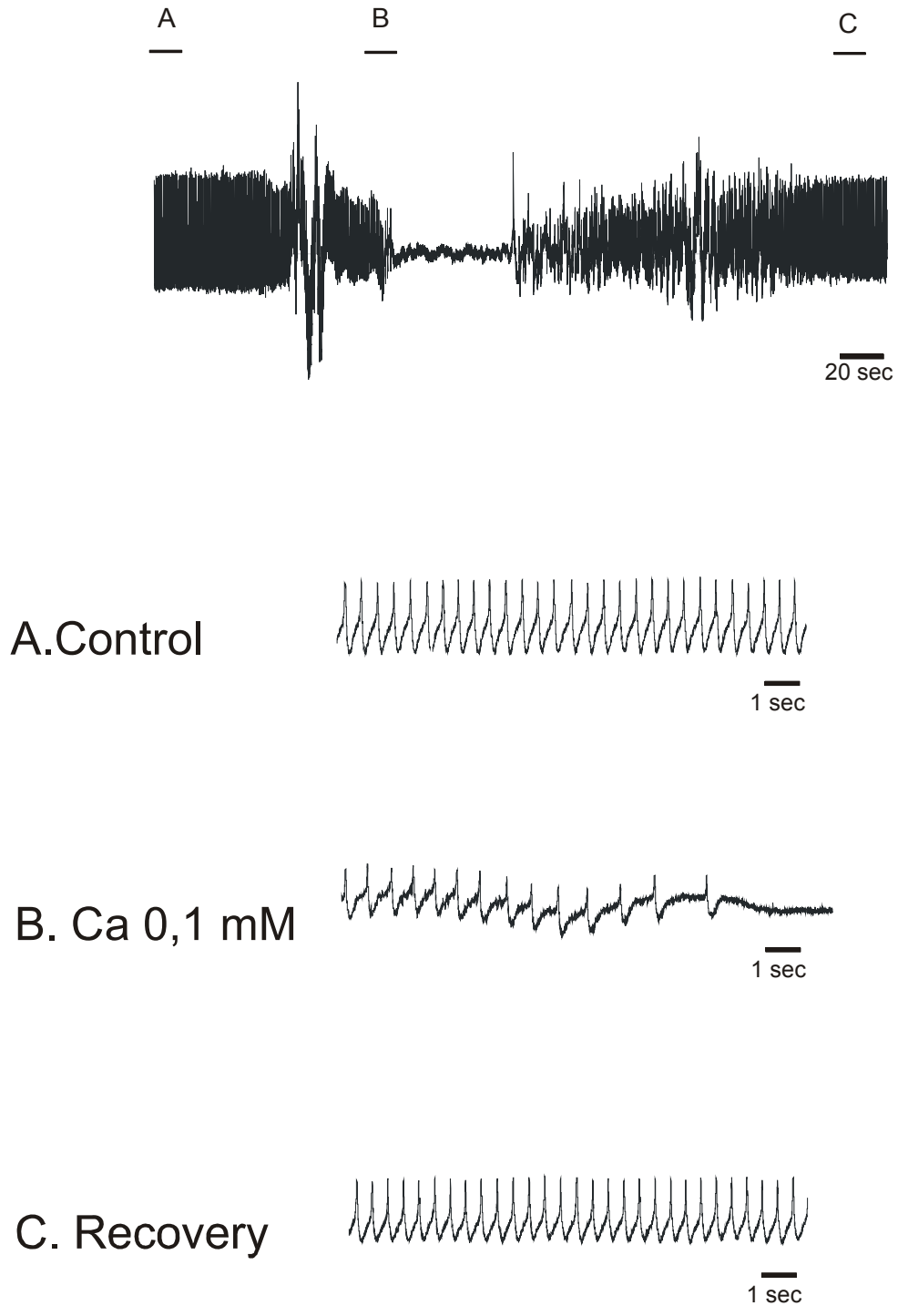
Γράφημα 3. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού συγκέντρωσης 0,1 mM σε ασβέστιο ($p<0,001$). Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός

Προσθήκη μικρής ποσότητας ασβεστίου.

Για να διαπιστωθεί ότι το παραπάνω αποτέλεσμα δεν οφείλεται με κάποιο τρόπο στην παρουσία του EGTA ή ενδεχομένως σε μη λειτουργία υποκυτταρικών μηχανισμών που απαιτούν σηματοδότηση από το ασβέστιο, ελέγχθηκε σε τέσσερα παρασκευάσματα η επίδραση ορού με πολύ χαμηλή ποσότητα ασβεστίου και χωρίς EGTA.
Ωστόσο και στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης εκμηδένιση της ΗΔ της καρδιάς για όσο χρόνο δρούσε ο πειραματικός ορός (γράφημα 3). Συγκεκριμένα η συχνότητα των ΔΕ μειώθηκε κατά 97,5%.
Επίσης παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης επαναφορά της καρδιακής συχνότητας 2 λεπτά περίπου μετά το ξέπλυμα του πειραματικού ορού.



Καταγραφή 2. Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα. Στην πάνω μεριά παρατίθεται ολόκληρη η καταγραφή διάρκειας 8 λεπτών. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν ΗΔ. Αρχικά (A: control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό με ελάχιστο ασβέστιο. Στο B φαίνεται το σημείο όπου ξεκινά η διακοπή της καρδιακής ΗΔ. Τέλος φαίνεται η φάση επαναφοράς της κανονικής λειτουργίας (C) και η στην D η πλήρης ανάνηψη (recovery).



Καταγραφή 3. Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα. Στην πάνω μεριά παρατίθεται ολόκληρη η καταγραφή διάρκειας 8 λεπτών. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν καρδιακή ΗΔ. Αρχικά (A: control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό με ελάχιστο ασβέστιο. Στο Β ξεκινά η διακοπή της καρδιακής ΗΔ. Τέλος φαίνεται η πλήρης επαναφορά της κανονικής λειτουργίας (C). Η καταγραφή είναι σχεδόν όμοια με την παρατηρούμενη στην περίπτωση της πλήρης απουσίας ασβεστίου και παρουσίας EGTA.

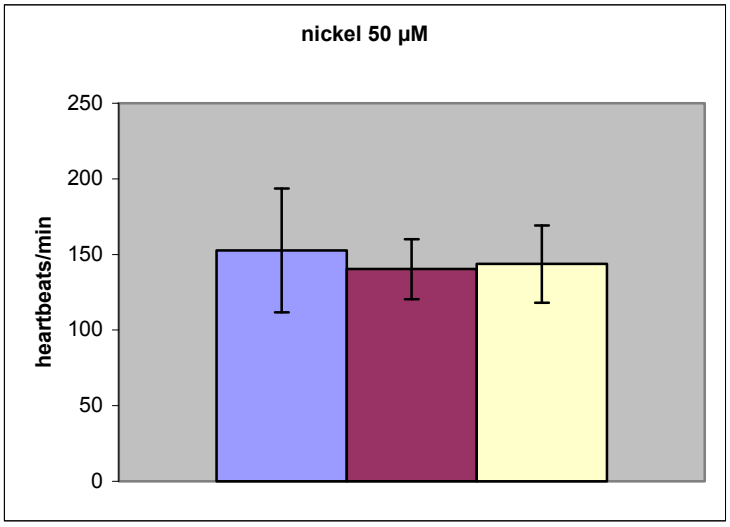
Β. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΔΙΑΥΛΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.

α. Ρόλος του νικελίου.

Το νικέλιο έχει φανεί στα σπονδυλωτά να αποκλείει τους Τ τύπου διαύλους ασβεστίου σε μικρή συγκέντρωση (25-50 μΜ) (Huser et al, 2000) και τους L τύπου διαύλους σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (0,5-5 mM) (Hobai et al, 2000) . Αν η παρουσία τέτοιων διαύλων ή παρόμοιων είναι γεγονός και στην τρίτου σταδίου προνύμφη της Δροσόφιλας, αναμένουμε σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις το νικέλιο να έχει ανάλογο φαινότυπο, δηλαδή ελάττωση του καρδιακού ρυθμού.

Αποτελέσματα επίδρασης 50 μM νικελίου

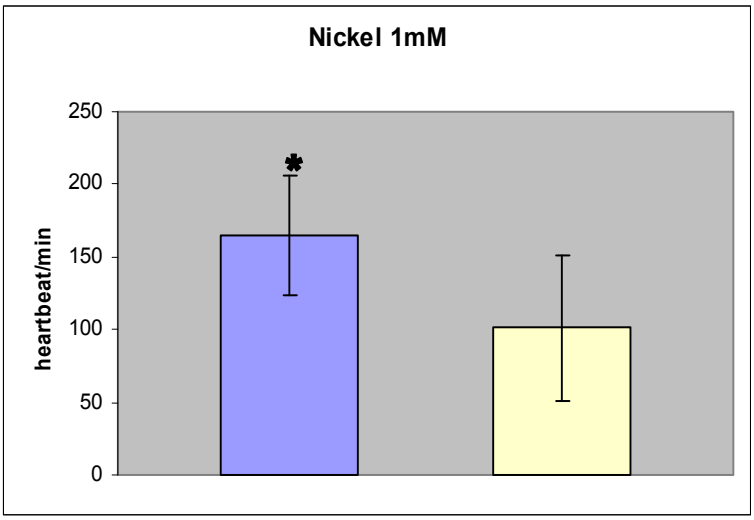
Για να διαπιστωθεί αν αυτή η συγκέντρωση νικελίου είχε κάποια επίδραση στον καρδιακό ρυθμό στο μελετώμενο παρασκεύασμα, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία όπως έχει περιγραφεί, και στον πειραματικό ορό προστέθηκαν 50 μΜ νικέλιο. Το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 4 παρασκευάσματα, χωρίς όμως να διαπιστωθεί στατιστικά σημαντική αλλαγή στην συχνότητα της καρδιακής ΗΔ (γράφημα 4α).



Γράφημα 4α. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού με 50 μΜ νικέλιο. Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός. Το νικέλιο σε αυτή τη συγκέντρωση δεν φαίνεται να προκαλεί στατιστικά σημαντική αλλαγή στη συχνότητα της καρδιακής λειτουργίας.

Αποτελέσματα επίδρασης 1 mM νικελίου.

Αντίθετα με την παραπάνω περίπτωση, όπου η μικρή συγκέντρωση του νικελίου δεν είχε σοβαρό αντίκτυπο στην ΗΔ της καρδιάς, η επίδραση 1mM νικελίου σε πέντε παρασκευάσματα έδειξε ότι μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (1-2 λεπτά μετά την χορήγησή του), το νικέλιο έχει πολύ μεγάλο αντίκτυπο στην καρδιακή λειτουργία. Έτσι παρατηρήθηκε σε όλα τα παρασκευάσματα η πλήρης διακοπή της ΗΔ της καρδιάς, για όσο χρόνο πειραματικός ορός με νικέλιο διάπότιζε το παρασκεύασμα.

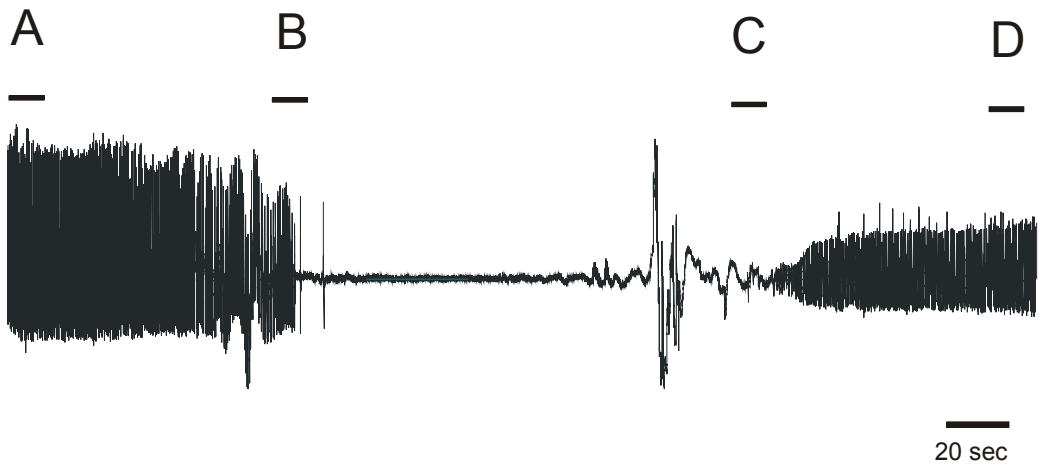


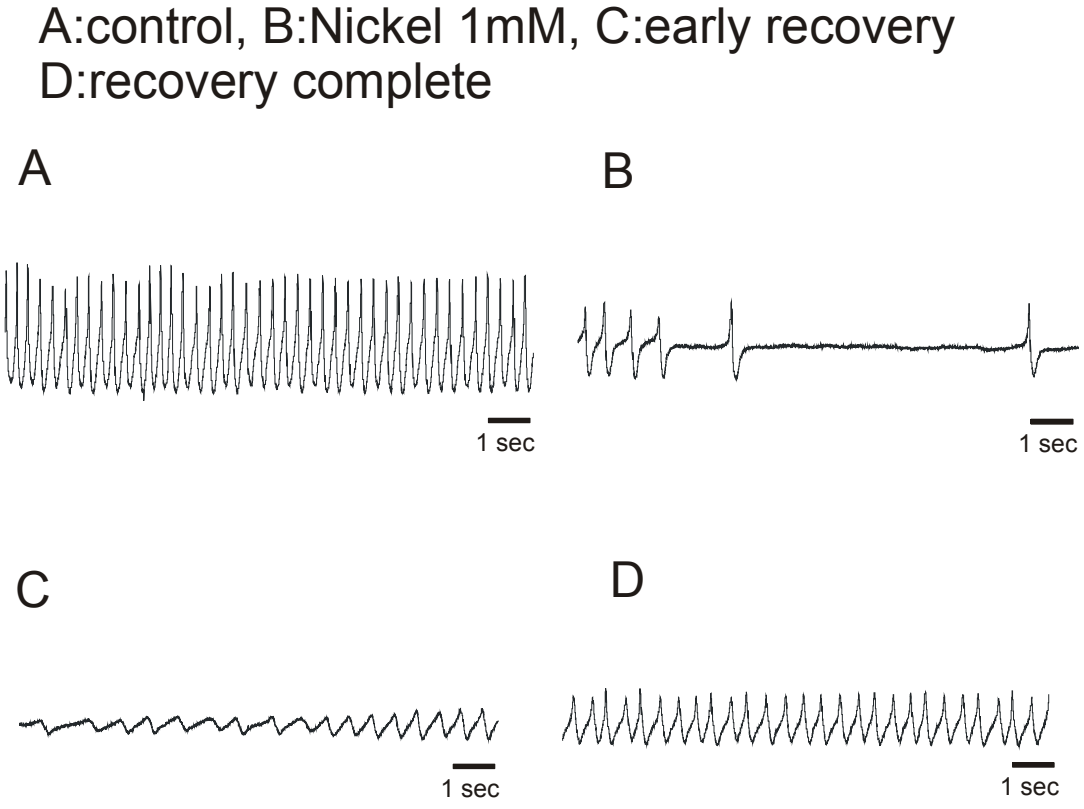
Γράφημα 4β. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού με 50 μM νικέλιο. Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός.

Οι καταγραφές δείχνουν φαινότυπο πολύ όμοιο με αυτόν που παρατηρείται στην περίπτωση που αφαιρείται εντελώς το ασβέστιο, με μόνη διαφορά ότι η επανάκαμψη της καρδιακής συχνότητας δεν είναι πλήρης, όπως στην περίπτωση του ασβεστίου (γράφημα 4β, καταγραφή 4).
Στην καταγραφή 4 αυτό που μπορεί να παρατηρήσει κανένας είναι ότι μέσα σε 1 λεπτό από την έναρξη της παροχής ορού με 1mM νικέλιο και μετά από ένα σύντομο διάστημα όπου τα ΔΕ διαρκούν περισσότερο χρόνο (επιβραδύνονται) σε σχέση με την καταγραφή ελέγχου, σταματά εντελώς η όποια ΗΔ της καρδιάς. Η διακοπή αυτή συνεχίζεται για όσο διάστημα δρα το Ni^{2+} (βλ. συνολική καταγραφή) και αντιστρέφεται σε ένα λεπτό μετά την επαναχορήγηση φυσιολογικού ορού (καταγραφή 4C, 4D). Δηλαδή σε ένα λεπτό περίπου από τη στιγμή που η αντλία ξεκινά να παρέχει φυσιολογικό ορό και απομακρύνει τον πειραματικό ορό (ξέπλυμα), τα επίπεδα νικέλιου στο παρασκεύασμα μειώνονται τόσο ώστε να επανέλθει η καρδιακή λειτουργία. Αυτό φαίνεται να γίνεται σταδιακά (καταγραφή 4C), από τη στιγμή που η συγκέντρωση του ιόντος έχει μειωθεί επαρκώς. Μέσα στο χρόνο που διάρκεσε το ξέπλυμα , περίπου 2 λεπτά, δεν παρατηρήθηκε πλήρης επαναφορά στην κανονική καρδιακή λειτουργία.

β. Αποτελέσματα επίδρασης βεραπαμίλης.

Η βεραπαμίλη ανήκει σε μια από τις τρεις κατηγορίες ουσιών γνωστών για την ανασταλτική τους δράση τους L-τύπου διαύλους ασβεστίου στα σπονδυλωτά, τις φαινυλαλκυλαμίνες. Όπως έχει προαναφερθεί, τα αποτελέσματα της επίδρασης της βεραπαμίλης στην καρδιακή λειτουργία στη Δροσόφιλα είναι αντικρουόμενα. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητο να διερευνήσουμε την επίδραση του φαρμάκου στα

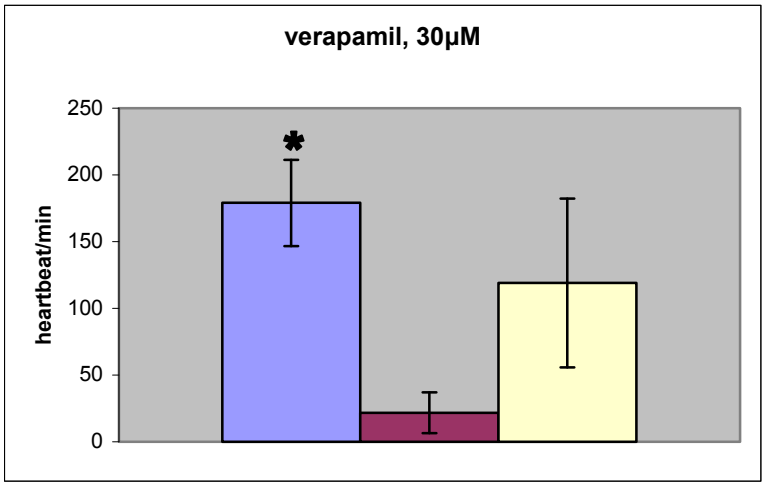




Καταγραφή 4. Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα. Στην πάνω μεριά παρατίθεται ολόκληρη η καταγραφή διάρκειας 6 λεπτών. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν καρδιακή ΗΔ. Αρχικά (A: control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό με 1 mM Ni^{2+}. Στο B φαίνεται το σημείο όπου ξεκινά η διακοπή της καρδιακής ΗΔ ενώ στο C η έναρξη της επαναδραστηριοποίησης μετά την απομάκρυνση του νικέλιου. Τέλος

φαίνεται μερική επαναφορά της κανονικής λειτουργίας (D). Η καταγραφή είναι σχεδόν όμοια με την παρατηρούμενη στην περίπτωση της πλήρης απουσίας ασβεστίου και παρουσίας EGTA.

παρασκευάσματά μας. Αυτή η ανάγκη γίνεται επιτακτικότερη δεδομένων των αποτελεσμάτων που αντλήθηκαν από τα πειράματα της αφαίρεσης του ασβεστίου από τον ορό που διέτρεχε το παρασκεύασμα.
Η συγκέντρωση του φαρμάκου στον ορό ήταν 30 μM. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις έτσι και εδώ, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε άγριου τύπου OR R, προνύμφες τρίτου σταδίου. Τα παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 7.
Έπειτα από διεξοδική ανάλυση και επεξεργασία των καταγραφών, διαπιστώθηκε ότι η βεραπαμίλη μέσα σε χρόνο που κυμαίνεται από 1-3 λεπτά δημιουργούσε ιδιαίτερα σημαντική μείωση στη συχνότητα της καρδιακής λειτουργίας, περίπου 87,8% σε σχέση με τη φυσιολογική, όπως φαίνεται στο γράφημα 5 ($p<0,001$).

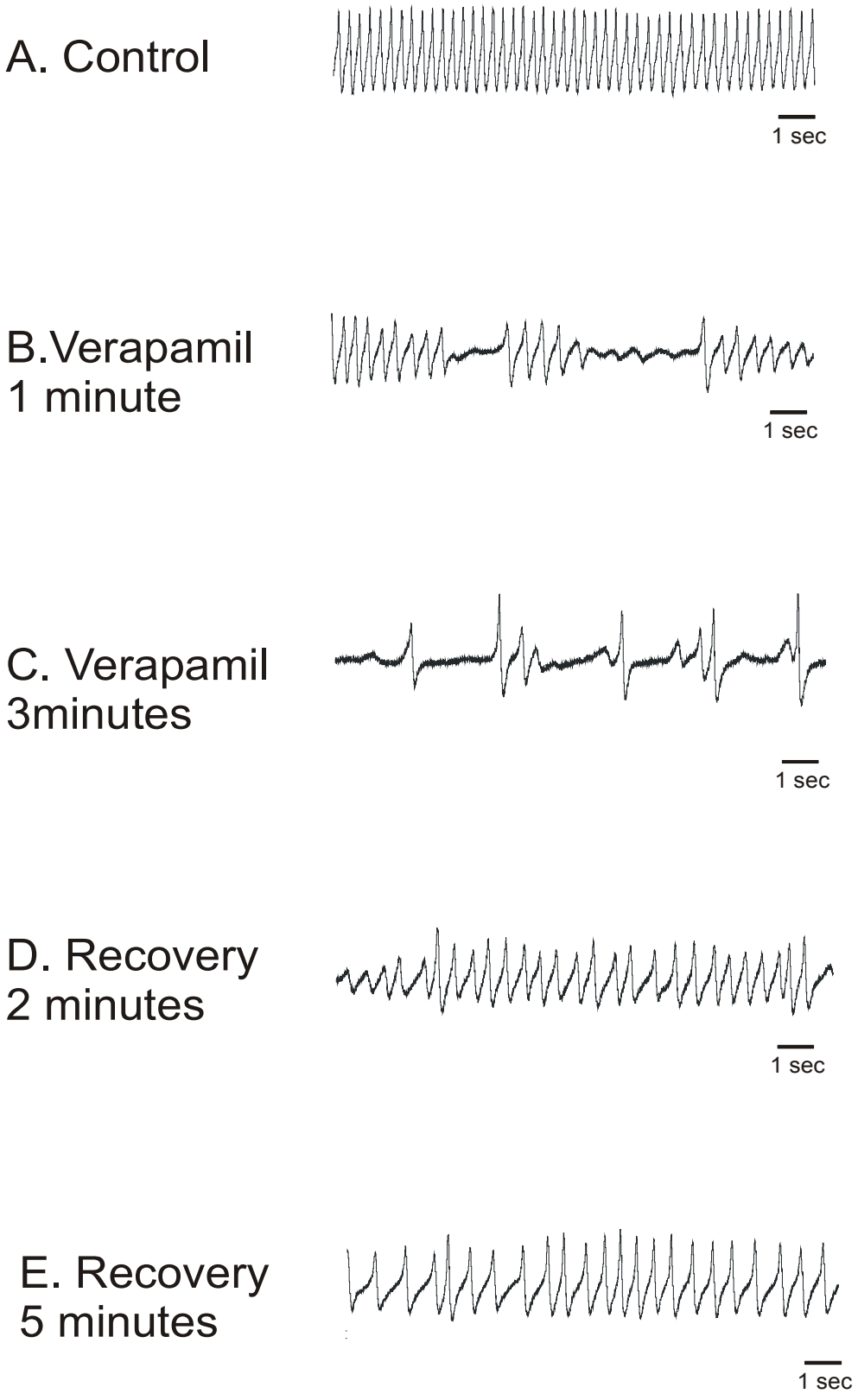


Γράφημα 5. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού με 30 μM βεραπαμίλη ($p<0,001$). Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός.

Πέρα όμως από την προφανή ελάττωση της καρδιακής συχνότητας, η βεραπαμίλη επέφερε και ποιοτική αλλαγή στην καρδιακή ΗΔ. Συγκεκριμένα, η επίδραση του φάρμακου είχε σαν συνέπεια να διακοπεί η φυσιολογική ρυθμικότητα της καρδιάς και αντίθετα η τελευταία να πραγματοποιείται σε ριπές μεταξύ διαστημάτων πλήρους αδράνειας όπως δείχνεται στις καταγραφές 5B, 5C, όπως και στην περίπτωση της απουσίας νατρίου. Βέβαια ακόμα και το μέγεθος των ριπών (δηλαδή ο αριθμός των εξωκυττάριων δυναμικών ανά ριπή), μειωνόταν με την πάροδο του χρόνου που δρούσε το φάρμακο (καταγραφή 5C).
Να σημειωθεί επίσης ότι δεν διαπιστώθηκε πλήρης επαναφορά της καρδιακής λειτουργίας μετά την κατάργηση της ανασταλτικής δράσης της βεραπαμίλης, για όσο χρόνο πραγματοποιήθηκε το ξέπλυμα του φαρμάκου (από πέντε έως και 10 λεπτά). Αντίθετα, αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι μέσα σε λίγο χρόνο μετά την έναρξη της παροχής φυσιολογικού ορού, περίπου δυο λεπτά, επανερχόταν πλήρως η ρυθμικότητα, όπως φαίνεται από τις καταγραφές που πάρθηκαν, και σε ένα μεγάλο βαθμό μέσα σε 5-10 λεπτά επανερχόταν και η συχνότητα.

Γενικά αυτό που παρατηρήθηκε είναι η μεγάλες χρονικές διακυμάνσεις στη δράση και την απομάκρυνση του φάρμακου ανάλογα με το παρασκεύασμα, σε αντίθεση με το τι συμβαίνει στα προηγούμενα πειράματα που παρατέθηκαν. Έτσι για παράδειγμα, η επίδραση του φάρμακου μπορούσε να αρχίσει από 1,5 έως και 5 λεπτά μετά την παροχέτευσή του στο παρασκεύασμα και να διακοπεί σε ανάλογους χρόνους μετά το ξέπλυμα του.

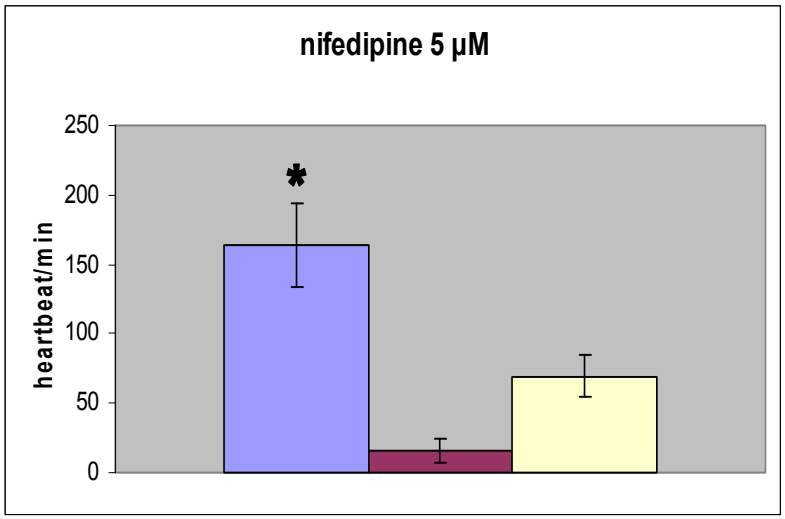
Καταγραφή 4. Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν καρδιακή ΗΔ. Αρχικά (A: control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό με 30 μM βεραπαμίλη. Στο B φαίνεται το σημείο όπου ξεκινά η μείωση της καρδιακής λειτουργίας ενώ στο C η αλλαγή στη συχνότητα μετά από τρία λεπτά επίδρασης της βεραπαμίλης. Τέλος φαίνεται μερική επαναφορά της κανονικής λειτουργίας (D). Ακόμα και με μεγαλύτερης διάρκειας ξέπλυμα (E), δε διαπιστώνεται πλήρης επαναφορά της φυσιολογικής συχνότητας.



Καταγραφή 4 (Λεζάντα στην προηγούμενη σελίδα).

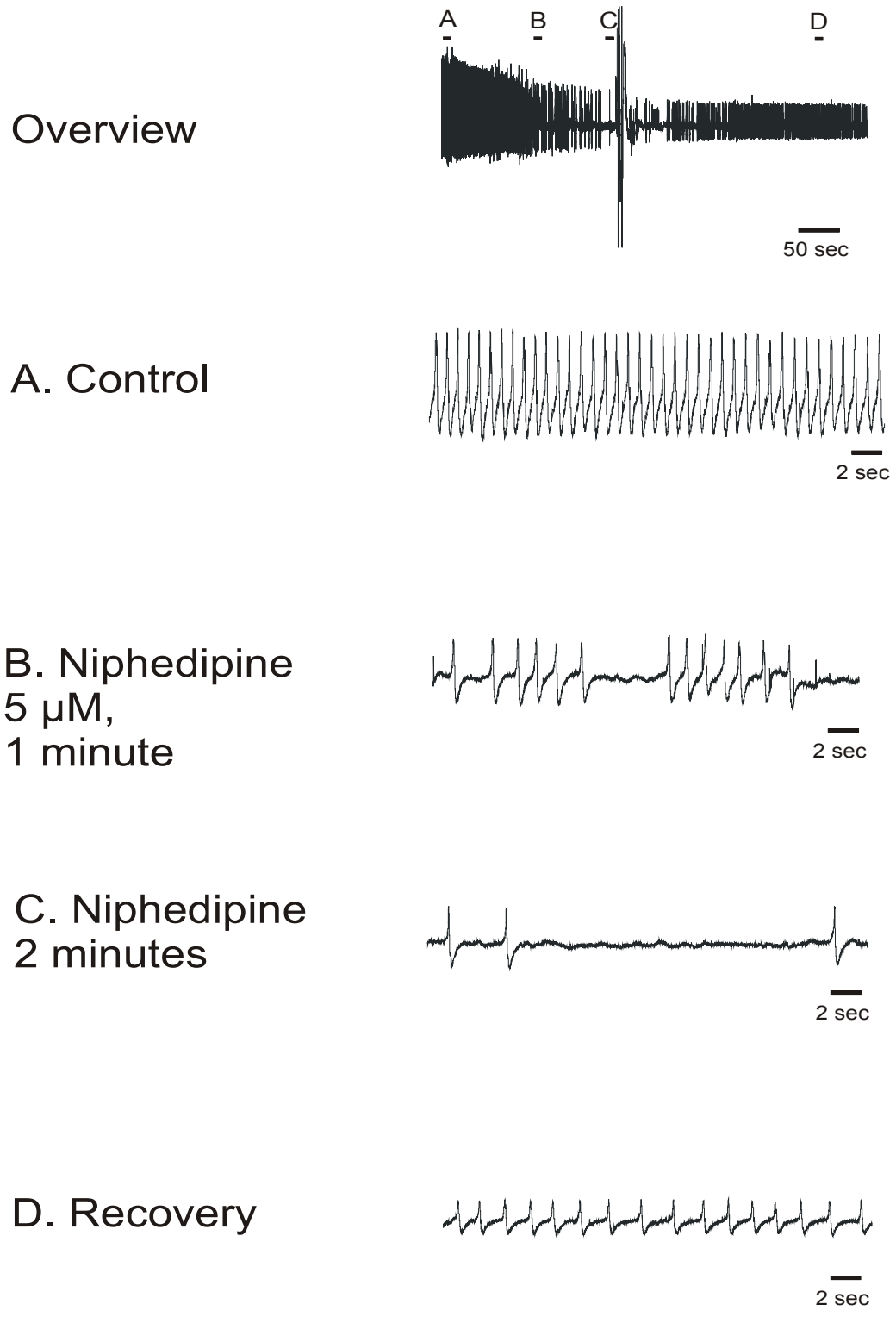
γ. Αποτελέσματα επίδρασης νιφεδιπίνης.

Η νιφεδιπίνη ανήκει στις διυδροπυριδίνες και όπως και η βεραπαμίλη, αποκλείει τους τασεοεξαρτώμενους L-τύπου διαύλου ασβεστίου. Η επίδραση της νιφεδιπίνης, δηλαδή ενός ακόμα αναστολέα των διαύλων αυτών, ενισχύει την υπόθεση της παρουσίας διαύλων ασβεστίου παρόμοιους με τους L-τύπου και της συνεισφοράς τους στην καρδιακή λειτουργία στην προνύμφη της Δροσόφιλας.
Η συγκέντρωση του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση αυτής της κατηγορίας των πειραμάτων ήταν 5μM. Σε αυτή τη συγκέντρωση παρατηρούσαμε μέσα σε 1-1,5 λεπτό μια θεαματική τροποποίηση στην καρδιακή ΗΔ. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερα παρασκευάσματα.



Γράφημα 5. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού με 5 μM νιφεδιπίνη ($p<0,001$). Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός

Η παρατηρούμενη τροποποίηση, συνίσταται σε δραματική μείωση της συχνότητας της καρδιακής λειτουργίας κατά 90,2% σε σχέση με την φυσιολογική, αλλά και σε απαλοιφή της ρυθμικότητας και αντικατάστασή της με αρρυθμικά διαστήματα αδράνειας εναλλασσόμενα με διαστήματα έντονης ΗΔ. Επιπλέον όπως φαίνεται από την καταγραφή 5Β, τα εξωκυττάρια δυναμικά χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να ολοκληρωθούν, σε σχέση με τα ζώα ελέγχου. Ωστόσο, μετά από τρία περίπου λεπτά από την επίδραση της νιφεδιπίνης, αυτό που παρατηρείται είναι αρρυθμία, μεγαλύτερη μείωση της συχνότητας και ακόμα λιγότερα μονήρη εξωκυττάρια δυναμικά (καταγραφή 3C).
Μια ακόμα διαπίστωση, είναι ότι η επαναφορά της ροής φυσιολογικού ορού, είχε σαν συνέπεια να εξαφανιστεί η αρρυθμία και το πρότυπο των εναλλασσόμενων διαστημάτων αδράνειας-δραστηριοποιήσης και αν επανακτηθεί η ρυθμικότητα. Ωστόσο η συχνότητα των εκπολώσεων δεν επανέρχεται πλήρως.



Καταγραφή 5. Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν καρδιακή ΗΔ. Αρχικά (A: control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό με 5 μM νιφεδιπίνη. Στο B φαίνεται η έναρξη μείωσης της καρδιακής ΗΔ και αρρυθμία, ενώ στο C η αλλαγή στη συχνότητα μετά από τρία λεπτά επίδρασης

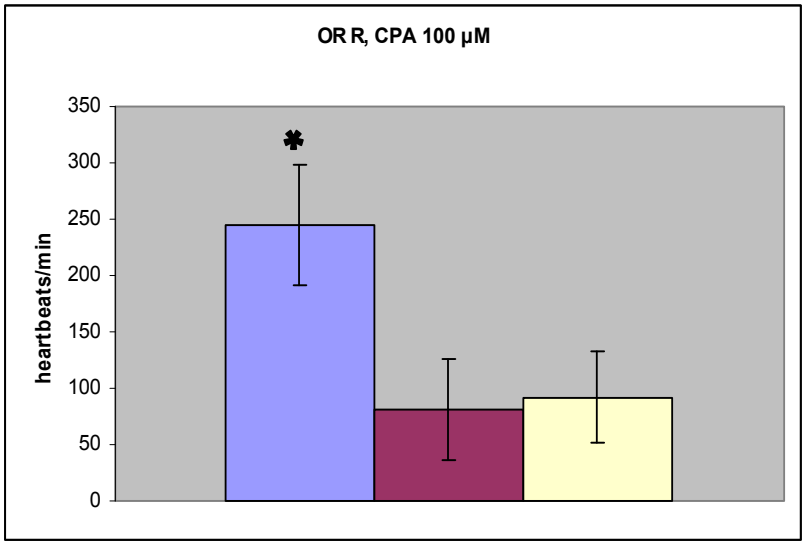
της νιφεδιπίνης. Τέλος μετά το ξέπλυμα (Ε), δε διαπιστώνεται πλήρης επαναφορά της φυσιολογικής συχνότητας.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΛΙΑΣ SERCA

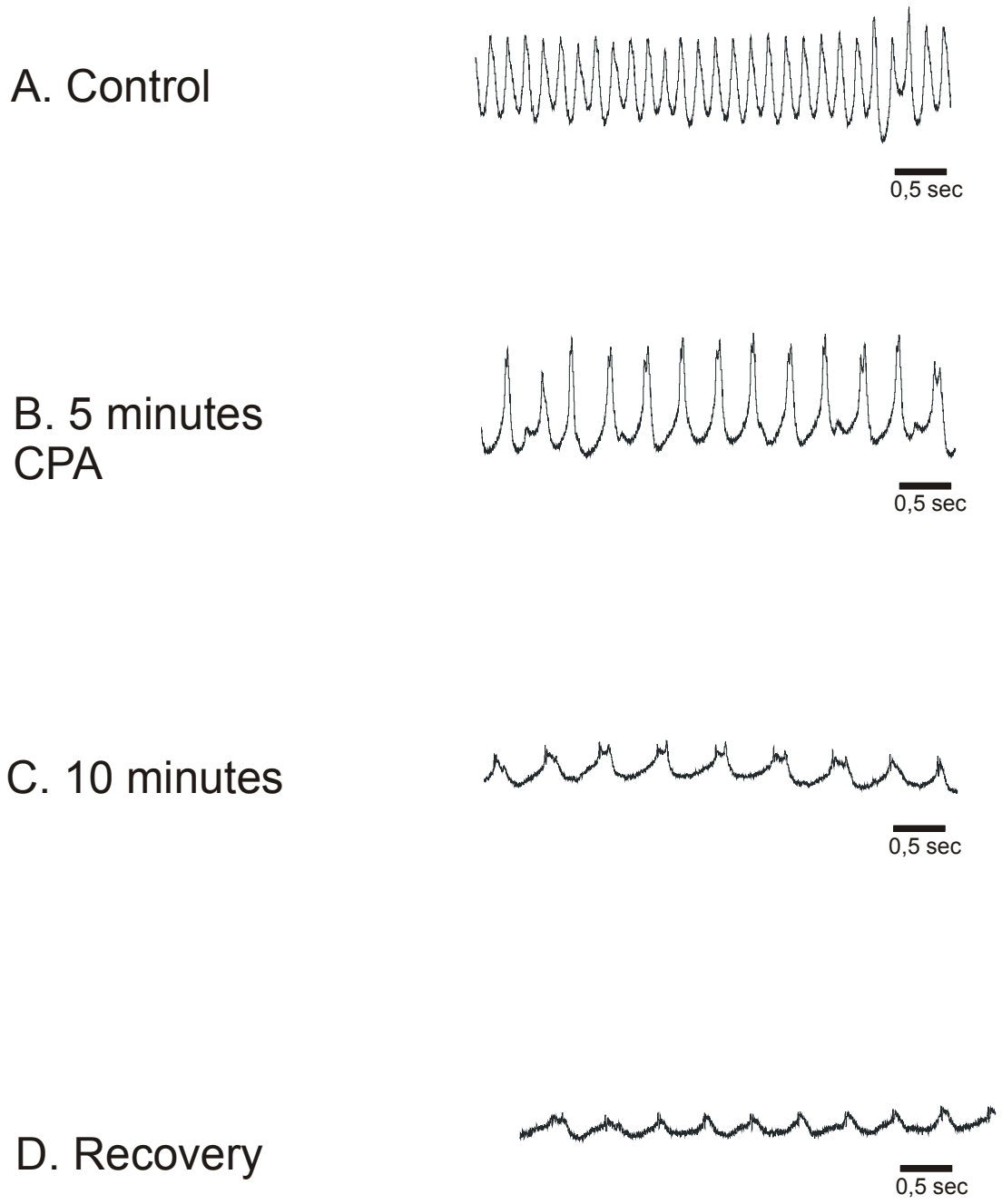
Τα προηγούμενα πειράματα, μας έδειξαν τον εντυπωσιακό αντίκτυπο που μπορεί να έχει στην καρδιακή ΗΔ η διαταραχή της εισόδου του ασβεστίου στα καρδιομυοκύτταρα και η αναγκαιότητα ύπαρξης ιόντων κυρίως ασβεστίου αλλά και νατρίου για την ομαλή ρυθμική λειτουργία της καρδιάς.
Στη συνέχεια, μια που καταδείχτηκε η σημασία της εισόδου του ασβεστίου στο κύτταρα, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί και η σημαντικότητα της απομάκρυνσης του συγκεκριμένου ιόντος από το κυτταρόπλασμα, έπειτα από μία σύσπαση, δεδομένου ότι η SERCA εντοπίζεται και στα καρδιακά κύτταρα του μοντέλου μας (Sanyal et al, 2005).

α. Αποτελέσματα επίδρασης CPA στην άγριου τύπου προνύμφη της Δροσόφιλας.

Καταρχήν κρίθηκε σκόπιμο να δοκιμαστεί η επίδραση της τοξίνης CPA σε άγριου τύπου προνύμφες. Είχε διαπιστωθεί ότι η ουσία αυτή αποκλείει εκλεκτικά την SERCA του ΣΔ των αρουραίων (Seidler, 1989) και άλλων σπονδυλωτών όπως των ινδικών χοιριδίων (guinea pigs) (Uyama, 1992). Δεδομένου του υψηλού βαθμού συντήρησης που παρουσιάζει η αντλία αυτή μεταξύ των ειδών, αναμένεται ανάλογη επίδραση του CPA, δηλαδή απενεργοποίηση της SERCA και στο παρασκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.



Γράφημα 6. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού με 100 μM cyclopiazonic acid (CPA) ($p<0,001$). Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός



Καταγραφή 6. Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν καρδιακή ΗΔ. Αρχικά (A: control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό με 100 μM cyclopiazonic acid (CPA). Στο B φαίνεται η έναρξη μείωσης της καρδιακής ΗΔ και της εμφάνισης πρώιμων μετεκπολώσεων (διφασικές κορυφές), ενώ στο C η αλλαγή στη συχνότητα και τη μορφολογία μετά από 10 λεπτά επίδρασης της τοξίνης. Τέλος μετά το ξέπλυμα (D), δε διαπιστώνεται πλήρης επαναφορά της φυσιολογικής συχνότητας, ωστόσο μειώνεται η διφασικότητα.

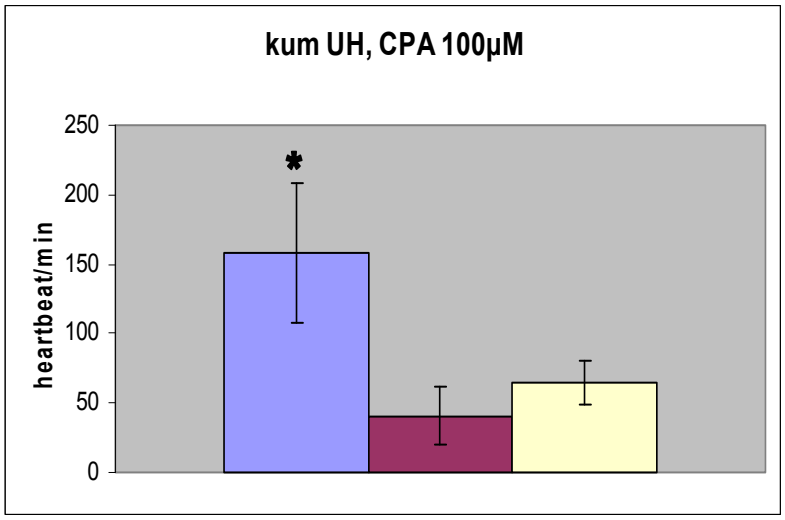
Για να μελετηθεί επαρκώς η όποια επίδραση του CPA χρησιμοποιήθηκαν συνολικά έξι παρασκευάσματα από προνύμφες άγριου τύπου.
Πράγματι η προσθήκη στον ορό που διέτρεχε το παρασκεύασμα 100 μM της τοξίνης, είχε σαν συνέπεια την μη αναστρέψιμη ελάττωση του καρδιακού ρυθμού σε ποσοστό 67% σε σχέση με τον φυσιολογικό (γράφημα 6) σε λιγότερο από 2 λεπτά από την στιγμή που έγινε η προσθήκη. Ακόμα και ξέπλυμα για 15-20 λεπτά δεν αντέστρεφε το αποτέλεσμα της τοξίνης στην καρδιακή συχνότητα (καταγραφή 6 D).
Ένα άλλο πολύ σοβαρό εύρημα, είναι η εμφάνιση διφασικών κορυφών στις καταγραφές (καταγραφή 6B, 6C), μέσα σε πολύ λίγο χρόνο μετά την επίδραση της ουσίας. Αυτές οι διπλές κορυφές αντιστοιχούν σε πρώιμες μετεκπολώσεις των καδιομυοκυττάρων. Αυτή η διπλή φάση των εξωκυττάριων δυναμικών, φαίνεται σε ένα βαθμό να εξαλοίφεται μετά την απομάκρυνση της τοξίνης, αλλά σε καμία περίπτωση δεν εξαφανίζεται, τουλάχιστον μέσα στο χρόνο που πραγματοποιήθηκε το ξέπλυμα (15-20 λεπτά) (καταγραφή 6 D).

β. Αποτελέσματα επίδρασης CPA στις προνύμφες με τη μετάλλαξη *kum*^{170} πριν την πραγματοποίηση θερμικού σοκ.

Η μετάλλαξη *kum*^{170} είναι μια τροποποίηση του γενετικού υλικού της Δροσόφιλας που αφορά το γονίδιο της πρωτεΐνης SERCA. Η μετάλλαξη αυτή όπως έχει περιγραφεί επάγει την απενεργοποίηση της SERCA κυρίως μετά την επίδραση θερμικού σοκ (conditional). Άρα, στους 25^{o} C ο φαινότυπος των ζώων πρέπει να είναι σχεδόν φυσιολογικός. Βέβαια είναι πιθανόν, ακόμα και χωρίς την επίδραση του θερμικού σοκ να παρατηρηθεί μικρή απόκλιση από το φυσιολογικό φαινότυπο, αφού ενδέχεται πιθανή απενεργοποίηση λίγων αντλιών.
Στην εργασία αυτή είναι απαραίτητο να μελετηθούν τα μεταλλαγμένα άτομα τόσο πριν όσο και μετά την κινητοποίηση της διαμόρφωσης της μη λειτουργικής μορφής της SERCA. Θεωρητικά, η τροποποιημένη SERCA μετά το θερμικό σοκ, θα δίνει ένα φαινότυπο όμοιο με αυτόν που δίνει η επίδραση του CPA, δεδομένου ότι και στις δυο περιπτώσεις διακόπτεται η επαναπρόσληψη του ασβεστίου από το ΣΔ, μέσω της συγκεκριμένης αντλίας.

Σε πρώτη φάση αυτό που προείχε ήταν να μελετηθούν οι προνύμφες με τη μετάλλαξη πριν την επίδραση του θερμικού σοκ. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν έξι προνύμφες τρίτου σταδίου και αφού καταγράφηκε ο φαινότυπος της καρδιακής τους ΗΔ, επέδρασε σε αυτές CPA προκειμένου να διαπιστωθεί αν είχε όμοια επίδραση με αυτή που παρατηρήθηκε στα άγριου τύπου άτομα.
Αρχικά παρατηρήθηκε ότι η καρδιακή συχνότητα του ζώου ήταν πολύ όμοια σε σχέση με τα άγριου τύπου άτομα. Κατά μέσο όρο, τα ζώα με τη μετάλλαξη πριν το θερμικό σοκ, είχαν 158 παλμούς το λεπτό, ενώ τα αγρίου τύπου έχουν κατά μέσο όρο 168 παλμούς το λεπτό. Αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική (p= 0,552361) και μας δείχνει ότι τα παρασκευάσματα πριν το θερμικό σοκ ομοιάζουν πολύ με τα φυσιολογικά.
Στη συνέχεια, όπως και στην περίπτωση των παρασκευασμάτων άγριου τύπου, ο φυσιολογικός ορός αντικαταστάθηκε από πειραματικό ορό με 100 μM CPA.

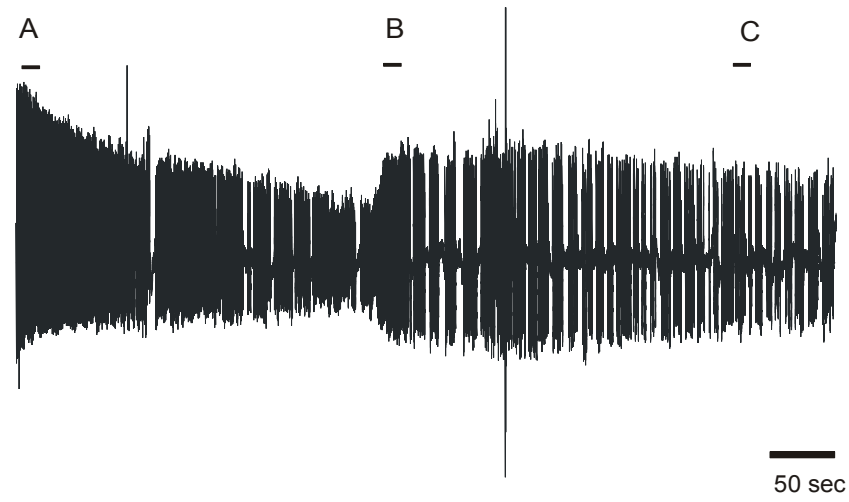
Τα αποτελέσματα της επίδρασης της ουσίας ήταν ανάλογα με τα παρατηρούμενα στα ζώα άγριου τύπου.

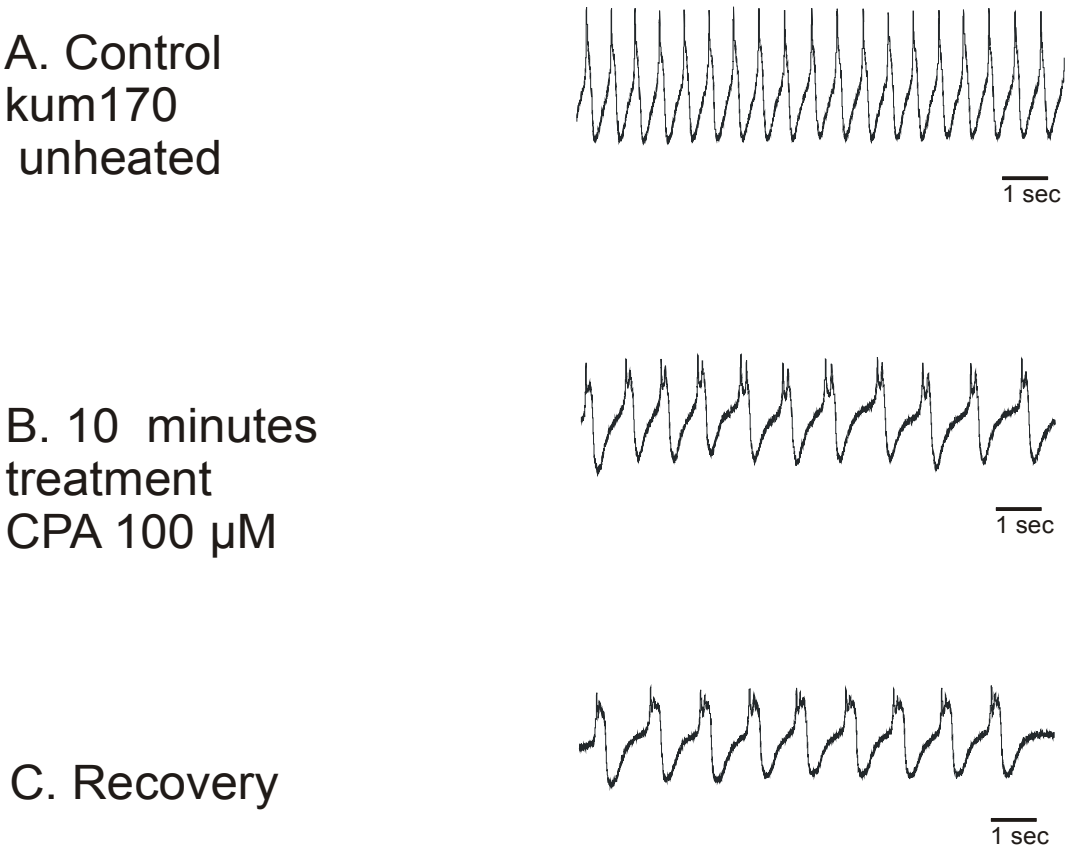


Γράφημα 7. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού με 100 μM cyclopiazonic acid (CPA) (p=0,001) στα μεταλλαγμένα *kum*^{170}. Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός

Έτσι διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της συχνότητας της καρδιακής λειτουργίας μέσα σε 2 λεπτά από την επίδραση του CPA η οποία δεν αντιστράφηκε ιδιαίτερα μετά τη διαδικασία αλλαγής του πειραματικού ορού με φυσιολογικό. Συγκεκριμένα η συχνότητα μειώθηκε κατά 74,3% σε σχέση με την παρατηρούμενη συχνότητα πριν την παροχή του φαρμάκου

Επιπλέον, όμοια με την περίπτωση της επίδρασης της τοξίνης στα OR R παρασκευάσματα, παρατηρήθηκε ποιοτική αλλαγή στα καταγραφόμενα εξωκυττάρια δυναμικά, που συνίσταται στην εμφάνιση διπλών κορυφών. Η αλλαγή αυτή δυστυχώς δεν είναι ορατή, ως διαφοροποίηση στην παρατηρούμενη οπτικά καρδιακή σύσπαση και έτσι όπως και στην προηγούμενη περίπτωση δεν είναι ξεκάθαρο τι ακριβώς σημαίνει λειτουργικά η ανάπτυξη διπλών (διφασικών) κορυφών.

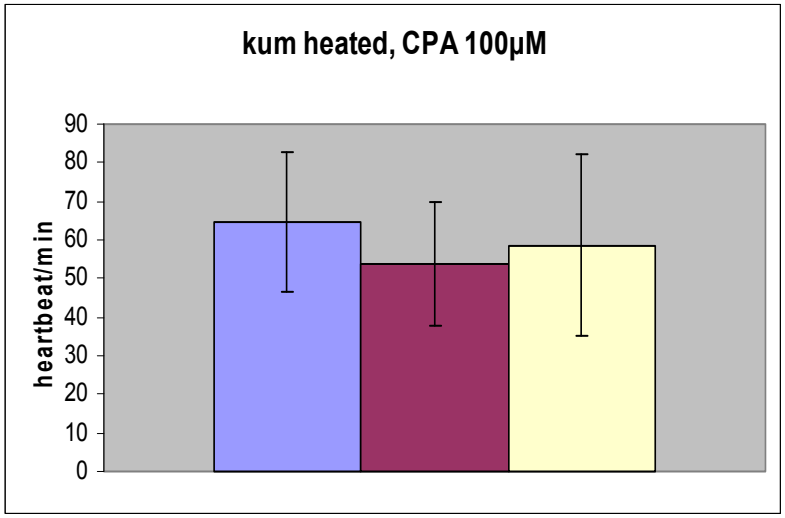




Καταγραφή 7. Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν καρδιακή ΗΔ. Αρχικά (A: control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό με 100 μM cyclopiazonic acid (CPA). Στο B φαίνεται η έναρξη μείωσης της καρδιακής λειτουργίας και εμφάνισης πρώιμων μετεκπολώσεων, 10 λεπτά μετά την έναρξη της παροχής ορού με CPA. Τέλος μετά το ξέπλυμα (C), δε διαπιστώνεται πλήρης επαναφορά της φυσιολογικής συχνότητας, ωστόσο μειώνεται η διφασικότητα.

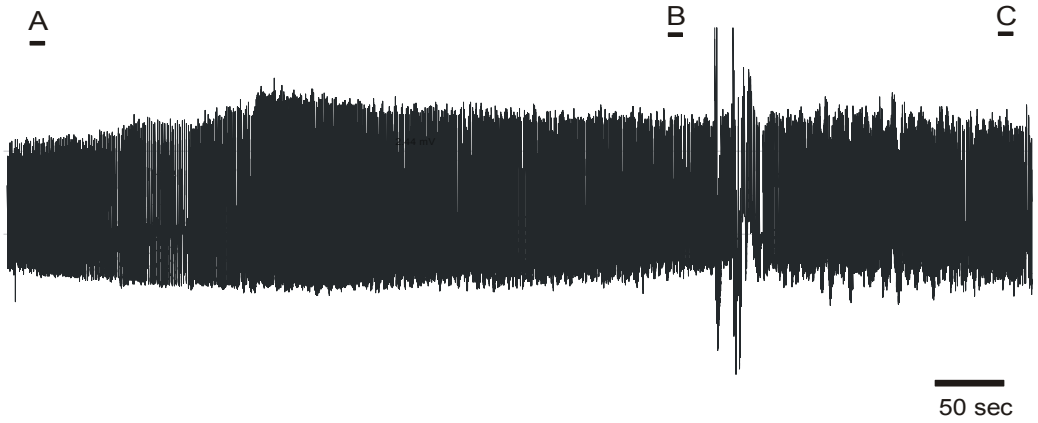
γ. Αποτελέσματα επίδρασης CPA στις προνύμφες με τη μετάλλαξη *kum*^{170} μετά την πραγματοποίηση θερμικού σοκ.

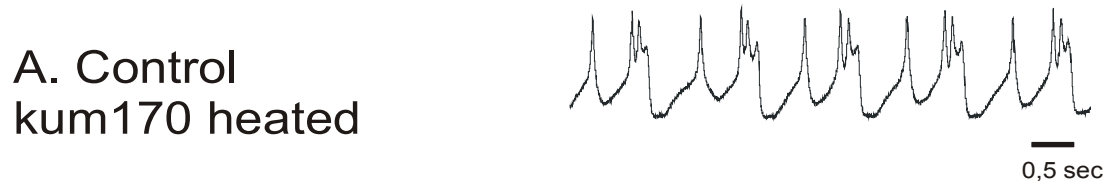
Όπως αναφέρθηκε ήδη, η επώαση των πειραματόζωων πριν την προπαρασκευή τους, σε θερμοκρασία 40^{o} C για 5 λεπτά, ενεργοποιεί σε μεγάλο βαθμό την έκφραση της δυσλειτουργικής SERCA. Κατά συνέπεια γίνονται εμφανείς αλλαγές στο φαινότυπο με πιο καταφανή την παράλυση και συστολή του σώματος των προνυμφών, λόγω συστολής των μυών. Τα πειράματα έγιναν συνολικά σε 5 παρασκευάσματα, τα οποία είχαν επωαστεί στους 40^{o} C κάτω από τις ίδιες συνθήκες.
Αρχικά αυτό που καταγράψαμε είναι η αξιοσημείωτη μείωση του ρυθμού καρδιακής δραστηριότητας κατά 51,9% στα παρασκευάσματά που είχαν υποστεί θερμικό σοκ, σε σχέση με τα παρασκευάσματα που δεν είχαν υποστεί το θερμικό σοκ (p=0,01).
Ακόμα εντυπωσιακή ήταν και η καταγραφή διπλών κορυφών, όπως συνέβαινε και στην περίπτωση των OR R υπό τη δράση του CPA (καταγραφή 8 A).
Στη συνέχεια, με σκοπό να ελέγξουμε την ορθότητα των υποθέσεων που καθοδήγησαν τη μελέτη αυτή –ότι δηλαδή η απενεργοποίηση της SERCA με το θερμικό σοκ θα έχει όμοιο αποτέλεσμα με την δράση του CPA, δοκιμάστηκε η επίδραση του CPA και σε αυτά τα παρασκευάσματα. Έτσι όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, τους παροχετεύτηκε μέσω της περισταλτικής αντλίας πειραματικός ορός που περιείχε 100 μM CPA και καταγράφηκε η επίδρασή του στη συχνότητα και τη μορφολογία των εξωκυττάριων δυναμικών.

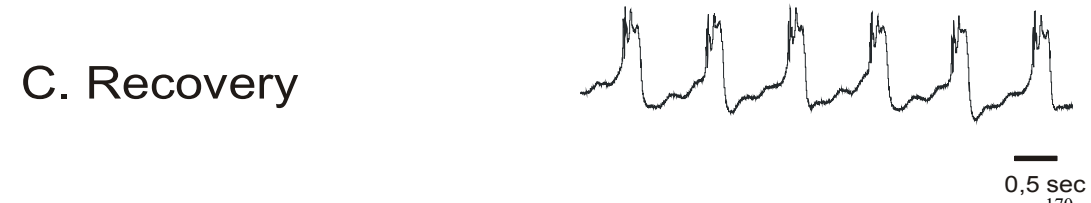


Γράφημα 7. Απεικόνιση των ποσοτικών σχέσεων των καρδιακών παλμών/λεπτό (heartbeat/min) πριν (μπλε) και μετά (μωβ) την επίδραση ορού με 100 μM cyclopiazonic acid (CPA) στα μεταλλαγμένα *kum*^{170} μετά το θερμικό σοκ. Από ότι φαίνεται δεν μετρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της συχνότητας (p=0,4). Η κίτρινη μπάρα δείχνει την αποκατάσταση μετά τον πειραματικό χειρισμό. Στο χειρισμό ελέγχου και στο χειρισμό αποκατάστασης το παρασκεύασμα διαποτίζει φυσιολογικός ορός

Οι αλλαγές που προκάλεσε η τοξίνη δεν είναι τόσο θεαματικές όσο στις προηγούμενες περιπτώσεις. Έτσι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της συχνότητας της καρδιακής ΗΔ αλλά μια μικρή πτώση 16,7% . Αυτό βέβαια ήταν αναμενόμενο μια που το θερμικό σοκ και το CPA δρουν με όμοιο τρόπο, δηλαδή απενεργοποιώντας την SERCA. Επομένως μετά το θερμικό σοκ, η επίδραση της ουσίας αυτής μπορούσε να είναι μόνο συμπληρωματική της ήδη δημιουργουμένης από την ενεργοποίηση του δυσλειτουργικού φαινοτύπου.







Καταγραφή 8. Αντιπροσωπευτικά τμήματα καταγραφών από ένα παρασκεύασμα kum^{170} μετά από θερμικό σοκ. Οι κορυφές αντιπροσωπεύουν καρδιακή ΗΔ. Αρχικά (A: control) το παρασκεύασμα διατρέχεται από φυσιολογικό ορό και έπειτα από ορό με 100 μM cyclopiazonic acid (CPA). Στο B φαίνεται η διαφοροποίηση της καρδιακής λειτουργίας, 10 λεπτά μετά την έναρξη της παροχής ορού με CPA. Τέλος μετά το ξέπλυμα (C), δε διαπιστώνεται επαναφορά της φυσιολογικής συχνότητας, ούτε μειώνεται η διφασικότητα.

Σε ότι αφορά άλλωστε την καταγραφόμενη καρδιακή ΗΔ, φαίνεται μια μικρή αλλαγή εξαιτίας του CPA. Συγκεκριμένα, αυξάνεται το πλήθος των διπλών κορυφών σε σχέση με αυτές που εμφανίζονταν πριν την ροή ορού με την τοξίνη (καταγραφές 8 Α, 8 Β).
Πάντως παρατηρώντας το φαινότυπο σύσπασης της 8 Α, συμπεραίνεται ότι μεταξύ διαδοχικών συσπάσεων δεν συμβαίνει πάντα πλήρης επαναπόλωση. Στη συγκεκριμένη μάλιστα καταγραφή οι περιπτώσεις ολοκληρωμένης επαναπόλωσης εναλλάσσονται κανονικά με περιπτώσεις μερικής επαναπόλωσης. Μετά την επίδραση της ουσίας αυτό παύει να συμβαίνει, δηλαδή δεν παρατηρείται αυτή η μερική επαναπόλωση και πλέον οι περισσότερες κορυφές γίνονται διχαλωτές.
Τέλος να σημειωθεί ότι και στην προκειμένη περίπτωση, η όποια επίδραση του CPA δεν αναστρεφόταν μετά την παροχέτευση φυσιολογικού ορού και ξέπλυμα της τοξίνης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι σαφές πλέον ότι η Δροσόφιλα είναι εξαιρετικό μοντέλο για την μελέτη της καρδιακής λειτουργίας και των μοριακών και ιοντικών μηχανισμών που ενέχονται σε αυτήν. Η δυνατότητα μεταλλαξιγένεσης και διάθεσης στελεχών που φέρουν εντοπισμένες μεταλλάξεις σε γονίδια που επηρεάζουν ιοντικά ρεύματα και συστήματα σηματοδότησης και μάλιστα η υπό συνθήκες, ελεγχόμενη, χρονικά (heat shock σύστημα) ή και τοπικά (GAL4 σύστημα) έκφρασή τους, καθιστούν ανεκτίμητη τη συνεισφορά του μοντέλου αυτού και στην μελέτη της καρδιακής λειτουργίας. Συγκεκριμένα η χρήση στελεχών με γνωστές μεταλλάξεις, επιτρέπει την ανάλυση καθενός από τους συμμετέχοντες στην ολοκλήρωση της καρδιακής λειτουργίας καθώς και των μονοπατιών που επηρεάζουν καθένα από αυτούς.
Εξάλλου είναι γνωστό ότι οι δίαυλοι ιόντων και τα συστήματα δεύτερου αγγελιοφόρου είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό συντηρημένα μεταξύ των ειδών. Έτσι για παράδειγμα, οι τασεοευαίσθητοι δίαυλοι K^+ που απαντώνται στο κεντρικό νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών και των ασπόνδυλων, είναι πάρα πολύ συντηρημένοι. Ειδικότερα οι Baumann και συνεργάτες (1988) , βρήκαν ότι η πρωτεϊνική αλληλουχία του διαύλου αυτού είναι συντηρημένη σε ποσοστό 82% μεταξύ αρουραίου και Δροσόφιλας. Επίσης η αντλία SERCA, φαίνεται να έχει μεγάλου βαθμού συντήρηση (βλ. Εισαγωγή) λειτουργικά και δομικά μεταξύ Δροσόφιλας και σπονδυλωτών παρόλο που στη Δροσόφιλα κωδικοποιείται από ένα, ενώ στα σπονδυλωτά από περισσότερα γονίδια (Muthu Periasamy, 2007). Εξάλλου σε πληθώρα ασθενειών αλλά και βασικών λειτουργιών έχει φανεί ότι η Δροσόφιλα αποτελεί ιδανικό ερευνητικό μοντέλο.
Αναμένεται επομένως, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διεγερσιμότητα της καρδιάς της Δροσόφιλας, όπως αναλύονται με τη χρήση μεταλλάξεων και ουσιών με γνωστές ιδιότητες και δράσεις στα σπονδυλωτά, να είναι σε μεγάλο βαθμό όμοιοι με τους μηχανισμούς καρδιακής λειτουργίας άλλων ειδών, περιλαμβανομένου και του ανθρώπου. Στην εργασία αυτή, έγινε καταρχήν απόπειρα να διασαφηνιστεί η σημασία των Ca^{2+} και Na^+, στην φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς, στην τρίτου σταδίου προνύμφη της Δροσόφιλας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα σπονδυλωτά και τα δυο αυτά ιόντα είναι καθοριστικής σημασίας στην καρδιακή λειτουργία. Για την προσέγγιση του ερωτήματος αυτού, μελετήθηκε χωριστά καθένα από τα κατιόντα. Συγκεκριμένα αυτό που μετρήθηκε ήταν ο φαινότυπος της συχνότητας της καρδιακής λειτουργίας, όταν καθένα από τα ιόντα αυτά έκλειπε ή ελαττωνόταν σημαντικά από τον περιβάλλοντα του παρασκευάσματος ορό.

Πρωταρχικής σημασίας κρίθηκε η μελέτη του ασβεστίου στο μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε, αφού έχει βρεθεί ότι η εισροή του μετέχει τόσο στη βηματοδότηση στα σπονδυλωτά (Berne & Levy, 1996), όσο και στα ρυθμικά βηματοδοτικά δυναμικά στις καρδιές των εντόμων (McCann, 1963, McCann, 1971, Miller, 1985, Markou & Theophilidis 2000). Ακόμα, το ασβέστιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρδιακή σύσπαση των σπονδυλωτών, αφού η ποσότητα του ασβεστίου που εισέρχεται στα κύτταρα από τον εξωκυττάριο χώρο, λειτουργεί ως έναυσμα για την απελευθέρωση ασβεστίου από τις ενδοκυττάριες αποθήκες και την μετέπειτα καρδιακή σύσπαση. Επίσης στη διδακτορική διατριβή του Χ. Παπαευθυμίου (2005) αναφέρεται η

καθοριστική σημασία του ασβεστίου για την παραγωγή ΔΕ από τα καρδιομυοκύτταρα της μέλισσας, χωρίς όμως να φαίνεται εμπλοκή των L-τύπου διαύλων ασβεστίου.
Στην προκείμενη εργασία μελετήθηκε ο ρόλος των εξωκυττάριων ιόντων ασβεστίου στην καρδιακή δραστηριότητα της προνύμφης τρίτου σταδίου της Δροσόφιλας, με χρήση ορού με πολύ μικρή συγκέντρωση ασβεστίου (0,1 mM) και με τη χρήση ορού χωρίς ιόντα ασβεστίου αλλά με προσθήκη του χειλικού δεσμευτικού παράγοντα EGTA σε συγκέντρωση 0,2 mM. Παρόμοιες συγκεντρώσεις EGTA έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες εργασίες στην καρδιά εντόμων (Markou & Theophilidis 2000).
Και στις δυο περιπτώσεις παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης διακοπή της καρδιακής ΗΔ, μέσα σε πολύ λίγο χρόνο. Επίσης και στις δυο περιπτώσεις, η μετέπειτα παροχή φυσιολογικού ορού (ξέπλυμα) είχε ως συνέπεια την πλήρη, σχετικά, επαναφορά της καρδιακής λειτουργίας. Αυτή η παρατήρηση καθιστά σαφές ότι το ασβέστιο σε επαρκείς συγκεντρώσεις είναι καθοριστικής σημασίας στην παραγωγή ΔΕ ή/και την παραγωγή της καρδιακής σύσπασης. Ωστόσο μένει να διευκρινιστούν επακριβώς όλες οι συνιστώσες της συμμετοχής του ασβεστίου στην καρδιακή λειτουργία της Δροσόφιλας.
Μια ακόμα διαπίστωση που χρήζει μεγαλύτερης διερεύνησης είναι η εμφάνιση εξωκυττάριων δυναμικών μειούμενου ύψους λίγο πριν τη διακοπή της καρδιακής λειτουργίας σε συνθήκες έλλειψης ασβεστίου. Τέτοια δυναμικά, αλλά αυξανόμενου ύψους, καταγράφονται συστηματικά και κατά την επαναφορά της καρδιακής λειτουργίας μετά την αποστέρηση του ασβεστίου. Προφανώς για να καταγραφεί ένα εξωκυττάριο δυναμικό, είναι απαραίτητο να εκπολωθούν τα καρδιομυοκύτταρα. Απουσία ασβεστίου, το δυναμικό των κυττάρων της καρδιάς, θα πρέπει να λαμβάνει συνεχώς μικρότερες τιμές, οι οποίες καταγράφονται ως εξωκυττάρια δυναμικά μειούμενου ύψους. Εξάλλου, όταν επανέλθει το ασβέστιο, τα δυναμικά της μεμβράνης θα λαμβάνουν όλο και μεγαλύτερες τιμές, με αποτέλεσμα να καταγράφονται αυξανόμενου ύψους εξωκυττάρια δυναμικά. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα ιόντα ασβεστίου παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των δυναμικών των καρδιακών κυττάρων, με άμεσο τρόπο –μέσω ρευμάτων ασβεστίου- ή έμμεσο τρόπο –μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών-.
Για παράδειγμα ο δίαυλος slowpoke BK (dSlo) της Δροσόφιλας, που εμπλέκεται άμεσα στην διεγερσιμότητα των νευρώνων και των μυϊκών κυττάρων (Warbington et al., 1996, Atkinson, 2000) ενεργοποιείται από ιόντα ασβεστίου. Επομένως η απουσία του ασβεστίου ενδέχεται να επηρεάζει και τη λειτουργία άλλων ρευμάτων καθοριστικών για την καρδιακή λειτουργία (Johnson et al., 1998, Ocorr et al., 2007a, Ocorr et al., 2007b).

Στην πλειονότητα των εντόμων που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, ο ρόλος των τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου στην παραγωγή και τον έλεγχο των καρδιακών ΔΕ, έχει αποκλειστεί (Hertel & Pass, 2002). Αυτό διαπιστώθηκε καταρχήν από τους Smith (1969) και McKann (1971), αφού δεν είδαν να επηρεάζεται η καρδιακή λειτουργία στις χρυσαλλίδες και τις κατσαρίδες όταν απομακρυνόταν το νάτριο ή εισαγόταν TTX. Μια εργασία που αποκλείει τη συμμετοχή του νατρίου στην καρδιακή λειτουργία στην προνύμφη Δροσόφιλας, είναι των Gu & Singh (1995). Οι τελευταίοι, όταν μείωναν τις ποσότητες του νατρίου του ορού που διαπότιζε τα παρασκευάσματα τους, δεν παρατήρησαν μείωση της συχνότητας καρδιακής σύσπασης. Επίσης η αδυναμία του TTX να αναστείλει τον καρδιακό ρυθμό, δείχνει ότι η καρδιακή λειτουργία στην προνύμφη μάλλον είναι ανεξάρτητη από το νευρικό σύστημα και ότι δεν μετέχουν ταχείς δίαυλοι Na^+. Στα σπονδυλωτά πάντως, το ρεύμα νατρίου διαμέσου των τασεοεξαρτώμενων

διαύλων, είναι πρωταρχικής σημασίας, μια που αποτελεί τη βάση του παράδοξου ρεύματος I_f που μετέχει στη διαστολική εκπόλωση στα αυτόματα κύτταρα του φλεβόκομβου του κολποκοιλιακού κόμβου και των ινών Purkinje των θηλαστικών (Berne & Levy, 1996). Επίσης, το ΙΝα μέσω των ταχέων διαύλων Να+ είναι αυτό που διαμορφώνει σε μεγάλο βαθμό τα χαρακτηριστικά της ανιούσας φάσης του ΔΕ στις καρδιακές ίνες ταχείας απόκρισης (Berne & Levy, 1996). Επίσης είναι αξιοσημείωτη και η αποκάλυψη ενός νέου ρεύματος νατρίου, του επιμένοντος ρεύματος (sustained current) I_{st}, από την ομάδα του Akinori Noma το 2000, που φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στη βηματοδότηση. Το ρεύμα αυτό αν και προέρχεται από Na^+, δε σχετίζεται με τους τασεοεξαρτώμενουν διαύλους Na^+, δεν αποκλείεται από ΤΤΧ και διακόπτεται από τη βεραπαμίλη (Mitsuiye T, 1999, Mitsuiye T, 2000).

Στην παρούσα μελέτη, όταν επωαζόταν ένα παρασκεύασμα με ορό χωρίς νάτριο, διαπιστώθηκε μείωση της συχνότητας των καρδιακών λειτουργίας, κατά 43,5%. Πέρα από αυτό όμως, παρατηρήθηκε και σημαντική αλλαγή στην κανονικότητα και ρυθμικότητα των εξωκυττάριων δυναμικών. Ήταν ιδιαίτερα εντυπωσιακό το γεγονός ότι μέσα στα πρώτα 6-9 λεπτά του πειράματος εμφανιζόταν το πρότυπο ριπών καρδιακής ΗΔ, που διακόπτονταν από εκτεταμένα διαστήματα πλήρους ηρεμίας. Επιπλέον η επαναφορά του φυσιολογικού ορού, μέσα σε σύντομο χρόνο αποκαθιστούσε τη ρυθμικότητα και σε ένα μεγάλο βαθμό και την συχνότητα των δυναμικών. Το γεγονός ότι δεν έγινε πλήρης επαναφορά της συχνότητας, ενδεχομένως μπορεί να αποδοθεί στον ανεπαρκή χρόνο ξεπλύματος του παρασκευάσματος αλλά και στο στρες που υπόκειται το παρασκεύασμα, δεδομένου ότι στο πείραμα αυτό, για τουλάχιστον 20 λεπτά δεν υπήρχε καθόλου νάτριο στον ορό, που αποτελεί βασικό ιόν για τη ζωτικότητα του οργανισμού.

Ένα στοιχείο που σε ένα βαθμό σχετίζεται με τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι η συσχέτιση του νατρίου με τη βηματοδότηση στη μέλισσα από τον Χ. Παπαευθυμίου κατά την εκπόνηση της διδακτορικής του διατριβής το 2005. Με συστήματα ενδοκυττάριων καταγραφών διαπίστωσε ότι απουσία νατρίου, ολοένα και μειώνεται το ύψος των ΔΕ στην καρδιά της μέλισσας, ώσπου σε 50 λεπτά περίπου έπαυε σχεδόν η καρδιακή λειτουργία. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η δύναμη σύσπασης δεν μειωνόταν παρά μόνο όταν το ΔΕ γινόταν υποουδικό. Επίσης όταν επώαζε με ξυλοκαΐνη, δεν παρατηρούσε καμία αλλαγή στο δυναμικό ηρεμίας, πράγμα που δείχνει ότι δε μετέχουν σε αυτό τασεοεξαρτώμενοι δίαυλοι νατρίου. Επιπλέον στην ίδια μελέτη προτείνεται ότι η ανιούσα φάση του ΔΕ διαμορφώνεται αποκλειστικά από τασεοεξαρτώμενους διαύλους νατρίου και επηρεαζόταν από την ξυλοκαΐνη. Βέβαια μάλλον κάτι τέτοιο δεν ισχύει στην προνύμφη της Δροσόφιλας, μια που ο Gu & Singh βρήκαν ότι η ΤΤΧ δεν αναστέλλει την καρδιακή λειτουργία.

Στη Δροσόφιλα δεν έχει διευκρινιστεί εάν τα ιόντα νατρίου παίζουν ρόλο στη βηματοδότηση αλλά τα ευρήματα του Χ. Παπαευθυμίου στη μέλισσα δείχνουν ότι δεν αποκλείεται ένα τέτοιο σενάριο να ισχύει. Βάση των παραπάνω είναι πολύ πιθανό στην προκειμένη περίπτωση, η ελάττωση του νατρίου να προκαλούσε διακυμάνσεις στα ΔΕ των καρδιομυοκυττάρων και να παρεμποδίζει τον ουδό.

Εξάλλου αν το νάτριο παίζει ρόλο στο δυναμικό ηρεμίας μέσω διαύλων διαφορετικών των τασεοελεγχόμενων, η έλλειψη του ενδέχεται να υπερπολώνει τα καρδιομυοκύτταρα και να καθίσταται έτσι δυσχερέστερη η παραγωγή ΔΕ. Ωστόσο η εμφάνιση ριπών σημαίνει ότι πρέπει να υπάρχει κάποιος μηχανισμός που έχει ρόλο συμπληρωματικό με αυτόν που υπολείπεται εξαιτίας της απουσίας νατρίου και έτσι διεκπεραιώνεται η ανά

διαστήματα αύξηση του μεμβρανικού δυναμικού πάνω από τον ουδό και η δημιουργία ριπών.
Αν και δεν έχει αναφερθεί η παρουσία ανταλλάκτη νατρίου/ασβεστίου στην καρδιά της Δροσόφιλας, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι υπάρχει και να διερευνήσει αυτή την υπόθεση. Αν πράγματι υπάρχει τότε σε ένα βαθμό εξηγεί το φαινότυπο στην ΗΔ της καρδιάς που προκύπτει όταν απομακρύνονται τα ιόντα νατρίου από τον εξωκυττάριο χώρο. Απουσία νατρίου ο ανταλλάκτης δε λειτουργεί (Hannes Reuter, 2005) και έτσι μετά από μια σειρά εκπολώσεων δεν απομακρύνεται το ασβέστιο από το κυτταρόπλασμα. Βέβαια σίγουρα υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί μείωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου στην προνύμφη της Δροσόφιλας, όπως μέσω της SERCA του σαρκοπλασματικού δικτύου (Sanyal et al., 2004). Ωστόσο, μετά από μερικές εκπολώσεις το σαρκοπλασματικό δίκτυο κορεννύεται με Ca2+. Τα επιπλέον ιόντα ασβεστίου που εισέρχονται στο κύτταρο με κάθε νέα εκπόλωση δεν μπορούν πλέον να εξαχθούν. Η ενδοκυτταρική αύξηση της [Ca2+] απενεργοποιεί τους διαύλους Ca2+ με αποτέλεσμα το κύτταρο να παύει να εκπολώνεται και να παράγει ΔΕ. Στις περιόδους σιωπής ανάμεσα στις ριπές ΗΔ το αυξημένο Ca2+ απομακρύνεται πιθανόν λόγω της SERCA της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, γεγονός που επιτρέπει την παραγωγή μιας νέας ριπής ΗΔ. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα όμως, είναι απαραίτητη η απόδειξη της παρουσίας του ανταλλάκτη αλλά και η μελέτη με ενδοκυττάριες καταγραφές, της επίδρασης που έχει η έλλειψη του νατρίου στο δυναμικό των καρδιακών κυττάρων.
Στην Εισαγωγή είχε αναφερθεί η ανακάλυψη ενός νέου ρεύματος νατρίου βασικού στη βηματοδότηση, που άγεται μέσω κάποιον διαύλων που ενεργοποιούνται σε χαμηλό δυναμικό και δεν αναστέλλονται από ΤΤΧ αλλά ομοιάζουν ως ένα βαθμό φαρμακολογικά με διαύλους ασβεστίου τύπου L. Το ρεύμα αυτό ονομάστηκε επιμένον ή I_{st} (Mitsuiye et al., 2000). Αν ισχύει η παρουσία του I_{st} ή ενός ανάλογου ρεύματος στην προνύμφη της Δροσόφιλας και διαδραματίζει ρόλο στη βηματοδότηση, θα μπορούσε να εξηγηθεί και γιατί η ΤΤΧ δεν προκαλεί αλλαγή στην καρδιακή λειτουργία και γιατί παρατηρήσαμε μείωση της συχνότητας όσο απουσίαζε το νάτριο. Αυτή μάλιστα είναι δελεαστική υπόθεση αν συνυπολογιστεί ότι η βεραπαμίλη, που μπλοκάρει το επιμένον ρεύμα (Noma, 2000), δίνει ένα πολύ παρόμοιο πρότυπο με αυτό που προκύπτει λόγω απουσίας νατρίου. Βέβαια η μείωση της καρδιακής συχνότητας που προκαλείται από τη βεραπαμίλη είναι μεγαλύτερη από αυτή που προκαλεί η απουσία νατρίου. Ωστόσο, όταν προστεθούν 30 μΜ βεραπαμίλης στον ορό καταγράφεται το πρότυπο ασυνεχούς καρδιακής λειτουργίας με την παρουσία ριπών ΗΔ εναλλασσόμενων με μεσοδιαστήματα ηρεμίας. Αυτό μάλιστα αναστρέφεται γρήγορα μετά το ξέπλυμα της βεραπαμίλης και αποκαθίσταται η ρυθμικότητα ενώ δεν αποκαθίσταται πλήρως η συχνότητα της καρδιακής λειτουργίας.

Η βεραπαμίλη κυρίως όμως είναι γνωστή επειδή αποκλείει τους L-τύπου διαύλους ασβεστίου. Παρόλο που στη Δροσόφιλα είναι γνωστή η ύπαρξη διαύλων ασβεστίου στο μυϊκό σύστημά της (Suzuki & Kano, 1977, Wu & Haugland, 1985, Gielow et al., 1995), δεν έχει χαρακτηριστεί το φαρμακολογικό προφίλ αυτών που μετέχουν στην καρδιακή λειτουργία. Μια απόπειρα χαρακτηρισμού τους από τους Gu & Singh (1995) έδειξε ότι η βεραπαμίλη ελαττώνει την καρδιακή λειτουργία στην προνύμφη της Δροσόφιλας, ενώ αργότερα το 1998 οι Johnson και συνεργάτες διέψευσαν αυτό το εύρημα.. Στη μελέτη μας όχι μόνο δεν επιβεβαιώθηκαν οι τελευταίοι αλλά αντίθετα, η μείωση στην καρδιακή

συχνότητας ήταν δραματική με την επίδραση της βεραπαμίλης. Σε συνδυασμό με το τι συμβαίνει όταν απουσιάζει το ασβέστιο, μπορεί να συμπεράνει κανένας ότι οι διαύλου ασβεστίου παίζουν καθοριστικό ρόλο στην καρδιακή λειτουργία. Επίσης η επιβράδυνση του ρυθμού καρδιακής λειτουργίας από τη βεραπαμίλη, δείχνει ότι πιθανότατα δίαυλοι ασβεστίου ανάλογης δομής με τους L τύπου των σπονδυλωτών, εμπλέκονται στην καρδιακή λειτουργία, στην προνύμφη της Δροσόφιλα. Αυτή η υπόθεση φαίνεται να ενισχύεται από την διαπίστωση του Gielow και συνεργάτες (1995) ότι το μυϊκό σύστημα της προνύμφης της Δροσόφιλας έχει διαύλους ασβεστίου πολύ όμοιους, ως προς τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά, με τους L-τύπου διαύλους. Πάντως το γεγονός ότι η δράση της βεραπαμίλης δεν προσομοιάζει εντελώς τις συνθήκες απουσίας ασβεστίου, όπου σχεδόν ακαριαία διακόπηκε η καρδιακή λειτουργία, δείχνει ότι πέρα από τους διαύλους που μπλοκάρει το φάρμακο, θα πρέπει να υπάρχουν και άλλου τύπου δίαυλοι ασβεστίου που αναπληρώνουν σε ένα βαθμό την λειτουργία των πρώτων.
Αν ισχύει η προηγούμενη παρατήρηση και οι δίαυλοι ασβεστίου τύπου L παίζουν ρόλο ανάλογο με αυτό που παίζουν στα θηλαστικά, ο αποκλεισμός τους από την βεραπαμίλη εξηγεί την μείωση της συχνότητας της καρδιακής λειτουργίας. Ωστόσο δεν μπορεί να εξηγηθεί επαρκώς η εμφάνιση του προτύπου ριπών, αλλά μια δελεαστική πρόταση είναι η εξής: πιθανότατα, πέρα από τους διαύλους αυτούς, θα υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί –δίαυλοι- εισόδου ασβεστίου στο κύτταρο, οι οποίοι όμως δρουν συμπληρωματικά με τους L- τύπου δίαυλους. Επομένως, παρακωλύοντας την είσοδο ασβεστίου μέσω των L-τύπου διαύλων, το δυναμικό του καρδιομυοκυττάρου αργεί να φτάσει σε επίπεδα ουδού, αφού πλέον δρουν προς αυτό το σκοπό μόνο οι συμπληρωματικοί μηχανισμοί. Κάποτε όμως εξαιτίας της δράσης των άλλων πρωτεϊνών εισαγωγής εξωκυττάριου ασβεστίου, αυξάνεται αρκετά το δυναμικό του κυττάρου και εγείρεται έτσι η παραγωγή ΔΕ, διακοπτόμενων από διαστήματα ηρεμίας. Αυτή η εναλλαγή ΗΔ και ηρεμίας αντιστοιχεί σε αυτές τις διακοπτόμενες ριπές που καταγράφηκαν.
Στη διδακτορική διατριβή του Χ. Παπαευθυμίου (2005) αναφέρεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η στέρηση των ιόντων του ασβεστίου είχε σαν συνέπεια την εμφάνιση χαρακτηριστικών ριπών ΔΕ σε πλήρη αντιστοιχία με ριπές καρδιακής σύσπασης στο καρδιακό μυϊκό κύτταρο της μέλισσας. Αυτό φάνηκε να οφείλεται σε υπερπόλωση του μεμβρανικού δυναμικού που σήμανε μείωση της κλίσης της βηματοδοτικής φάσης και καθυστέρηση εμφάνισης του επόμενου ΔΕ. Αυτή η εμφάνιση μεσοδιαστήματος ηρεμίας διαχώρισε τα ΔΕ μεταξύ τους με τη μορφή ριπών.
Αν κάτι ανάλογο ισχύει και στην δική μας περίπτωση, τότε είναι πιθανό το ασβέστιο να έχει ένα ρόλο στην διαμόρφωση του δυναμικού ηρεμίας, οπότε η παρακώλυση της διακίνησης του εκατέρωθεν του σαρκειλήματος, να επάγει την υπερπόλωση του κυττάρου. Πιθανότατα το ασβέστιο μέσω των L-τύπου διαύλων είτε παίζει ρόλο στο δυναμικό ηρεμίας είτε στην παραγωγή του δυναμικού ενέργειας. Πάντως φαίνεται ότι οι δίαυλοι που αποκλείει η βεραπαμίλη παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο, δεδομένου ότι όσο περνά ο χρόνο που αυτή επιδρά, τόσο μειώνεται ολοένα και περισσότερο η καρδιακή συχνότητα.

Πάντως η πρόταση της παρουσίας διαύλων όμοιων με L-τύπου διαύλους ασβεστίου τείνει προς βεβαιότητα αν ληφθεί υπόψη και η δράση της νιφεδιπίνης και γενικά των διυδροπυριδίνων. Όπως έχει προαναφερθεί, η νιφεδιπίνη είναι μια διυδροπυριδίνη και ως τέτοια έχει την ιδιότητα να αποκλείει εκλεκτικά τους τασεοελεγχόμενους διαύλους

ασβεστίου τύπου L. Οι Gu & Singh (1995), χρησιμοποιώντας μια άλλη διυδροπυριδίνη, την PN200-110, διαπίστωσαν μια ακόμα σημαντικότερη μείωση σε σχέση με αυτή που προκάλεσε η βεραπαμίλη, στην συχνότητα της καρδιακής σύσπασης στην τρίτου σταδίου προνύμφη της Δροσόφιλας. Επιπλέον διαπίστωσαν ότι η επίδραση της διυδροπυριδίνης δεν αναστρέφεται ιδιαίτερα μετά την απομάκρυνσή της με ξέπλυμα, πράγμα που απέδωσαν στο γεγονός ότι οι διυδροπυριδίνες ενσωματώνονται στις λιπιδικές μεμβράνες και επομένως με δυσκολία θα απομακρύνονται από ένα παρασκεύασμα στο οποίο μάλιστα έχουν επιδράσει για αρκετά λεπτά.
Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, έρχονται σε συμφωνία με την παραπάνω, δεδομένου ότι η επίδραση 5 μM νιφεδιπίνης μέσα σε λίγο χρόνο προκάλεσε μείωση της συχνότητας καρδιακής λειτουργίας κατά 90,2% σε σύγκριση με τη φυσιολογική. Επιπρόσθετα η συχνότητα δεν επανάκαμψε πλήρως με το ξέπλυμα ούτε καν μετά από 15 λεπτά. Ωστόσο η νιφεδιπίνη δεν προκαλούσε το πρότυπο ριπών εξωκυττάριων δυναμικών στον ίδιο βαθμό με τη βεραπαμίλη, μια που πολύ γρήγορα οι ριπές έφθιναν και μετατρέπονταν σε μονήρη αρρυθμικά εξωκυττάρια δυναμικά. Βέβαια, με τα δεδομένα που διατίθενται από τις φαρμακολογικές μελέτες στη Δροσόφιλα, δε μπορεί να αξιολογηθεί εάν οι συγκεντρώσεις βεραπαμίλης και νιφεδιπίνης είναι ισοδύναμες ως προς τη δράση τους. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις (10^{-8}-10^{-7}) που δοκιμάστηκε η νιφεδιπίνη, προκειμένου να προσδιοριστεί μια ικανοποιητική συγκέντρωση για τα πειράματα (δεδομένου ότι είναι η πρώτη φορά που γίνονται πειράματα στο μοντέλο αυτό με νιφεδιπίνη) δεν παρατηρήθηκε μεγαλύτερου βαθμού προσομοίωση του πρότυπου καρδιακής ΗΔ με τη βεραπαμίλη, απλά επιμηκύνθηκε ο χρόνος και μειώθηκε το μέγεθος δράσης της. Επιπρόσθετα, μια που οι ουσίες αυτές είναι διαφορετικές, είναι μάλλον πολύ πιθανό αν όχι αναμενόμενο, στην προνύμφη της Δροσόφιλας, να έχουν και ελαφρώς διαφορετικό τρόπο δράσης, πέρα από τη δεδομένη τους δράση να αναστέλλουν τους διαύλους ασβεστίου L-τύπου. Αυτό για να διευκρινιστεί όμως είναι απαραίτητο να γίνει επισταμένη μελέτη των φαρμακολογικών χαρακτηριστικών των διαύλων που αποκλείει η βεραπαμίλη και η νιφεδιπίνη και να βρεθεί με ποιο ακριβώς τρόπο διεκπεραιώνει την ανασταλτική του δράση καθένα από τα δυο. Για παράδειγμα, η βεραπαμίλη είναι γνωστό ότι αποκλείει το επιμένον ρεύμα στα θηλαστικά (Mitsuiye et al, 2000), ενώ το ίδιο δεν έχει διατυπωθεί και για τη νιφεδιπίνη. Ωστόσο είναι ξεκάθαρο ότι υπάρχει και ένα κοινό υπόβαθρο δράσης των δυο αυτών φαρμάκων, σύμφωνα με τις γνώσεις που υπάρχουν στα σπονδυλωτά, που πρέπει να εξεταστεί και στη Δροσόφιλα. Αν ληφθεί υπόψη η μεγάλου βαθμού συντήρηση πολλών πρωτεϊνών και διαύλων μπορεί κανείς να στραφεί στην περαιτέρω διερεύνηση της ύπαρξης διαύλων ασβεστίου όμοιων με τους L-τύπου.

Τα αποτελέσματα που μέχρι τώρα είδαμε με τη φαρμακολογία και με την αποστέρηση του ασβεστίου με χρήση EGTA ή μειώνοντας το ασβέστιο σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, μας έχουν δώσει μια πολύ καλή εικόνα καταρχήν της σημασίας του ασβεστίου και σε συνδυασμό με την εργασία των Gu & Singh, του είδους κάποιων από των διαύλων που εμπλέκονται στη διακίνηση του ασβεστίου. Έτσι έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι μάλλον δίαυλοι, ανάλογοι των L-τύπου διαύλων ασβεστίου, διαδραματίζουν σημαίνοντα ρόλο στην καρδιακή λειτουργία, στο μοντέλο που μελετούμε, χωρίς όμως να είναι οι μοναδικοί δρόμοι εισόδου του ασβεστίου στο κύτταρο. Η τελευταία πρόταση, προκύπτει από το γεγονός ότι επιλεκτικοί ανταγωνιστές

των L-τύπου διαύλων ασβεστίου, όπως αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν εδώ, δεν σταματούν εντελώς την καρδιακή σύσπαση. Εξάλλου έχει δειχθεί και η πιθανή παρουσία όμοιων διαύλων ασβεστίου όμοιων με τους N-τύπου και μάλιστα φαίνεται να διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στην καρδιακή λειτουργία στην νύμφη της Δροσόφιλας (Johnson et al, 1998).

Για να επιβεβαιωθεί το παραπάνω συμπέρασμα και να διασαφηνιστεί περισσότερο το είδος των δίαυλων ασβεστίου που μετέχουν στην καρδιακή λειτουργία, χρησιμοποιήθηκαν κατιόντα νικελίου, σε διάφορες συγκεντρώσεις στον ορό. Σε αυτόματα κύτταρα στα θηλαστικά έχει χρησιμοποιηθεί το νικέλιο σε ποικίλες συγκεντρώσεις και έχει βρεθεί ότι σε μικρότερες 25-50 μM, αναστέλλει του διαύλους ασβεστίου τύπου T, ενώ σε μεγαλύτερες γύρω στο 1 mM αναστέλλει και τους τύπου L (Huser et al., 2000, Hobai et al., 2000). Οι Sanyal και συνεργάτες (2005), προτείνουν, ότι πρέπει να υπάρχουν δυο είδη διαύλων ασβεστίου που μετέχουν στην καρδιακή λειτουργία, εκ των οποίων το ένα είδος πρέπει να ομοιάζει με τους T-τύπου διαύλους και το άλλο μένει να διερευνηθεί. Βέβαια ο τελευταίος έθεσε ως ακρογωνιαίο λίθο των συμπερασμάτων του την εργασία των Johnson και των συνεργατών του (1998) για να εξηγήσει τα ευρήματά του σχετικά με τη λειτουργία της SERCA. Οι τελευταίοι, έχουν βρει με οπτική παρατήρηση του καρδιακού παλμού, ότι η βεραπαμίλη δεν προκαλεί αλλαγή στην καρδιακή λειτουργία στη Δροσόφιλα, πράγμα που αποκλείει την όποια εμπλοκή των L-τύπου διαύλων και έρχεται και σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Gu & Singh αλλά και τα δικά μας. Ωστόσο για να ελεγχθεί η ορθότητα της υπόθεσης ύπαρξης T διαύλων που προτείνουν οι Sanyal και συνεργάτες, στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε μικρή συγκέντρωση ιόντων νικελίου 50 μM και καταγράφηκε η καρδιακή ΗΔ. Αυτό που βρέθηκε ήταν μια μικρή και όχι στατιστικά σημαντική αλλαγή στην συχνότητα της καρδιακής λειτουργίας. Αυτό βέβαια δεν οδηγεί αβίαστα στο συμπέρασμα της απουσίας των διαύλων ασβεστίου τύπου T, αλλά δείχνει ότι αν ανάλογοι δίαυλοι υπάρχουν στο μοντέλο μας, ενδέχεται να αναστέλλονται σε άλλες συγκεντρώσεις νικελίου ή ακόμα ενδέχεται να υπάρχει κάποιος μηχανισμός που αναπληρώνει τη λειτουργία τους όταν αυτοί παρεμποδιστούν. Εξάλλου το σύστημα καταγραφών που χρησιμοποιήθηκε εδώ, επιτρέπει την παρατήρηση μόνο καρδιακής ΗΔ και δεν παρέχει αναλυτικές πληροφορίες για τα μεμβρανικά δυναμικά των καρδιακών κυττάρων και τις πιθανές διακυμάνσεις τους. Επομένως δε μπορούμε να γνωρίζουμε τον αντίκτυπο στα ΔΕ που μπορεί να έχει η επώαση με 50 μM νικέλιο. Ωστόσο αυτό που με βεβαιότητα μπορεί να λεχθεί, είναι ότι η συγκέντρωση των 50 μM νικελίου, δεν επηρεάζει την καρδιακή συχνότητα.

Στον αντίποδα, χρησιμοποιώντας 1 mM νικελίου διαπιστώθηκε πλήρης κατάργηση της καρδιακής λειτουργίας, μέσα σε σύντομο χρόνο. Μάλιστα όπως και στην περίπτωση του ασβεστίου, λίγο πριν διακοπεί η καρδιακή συχνότητα, καταγράφηκε μια σειρά εξωκυττάριων δυναμικών μειούμενου ύψους και όταν γινόταν επαναφορά, καταγράφηκε μια σειρά εξωκυττάριων δυναμικών αυξανόμενου ύψους, έως το σημείο του υπό κανονικές συνθήκες καταγραφόμενου ύψους των δυναμικών.

Το νικέλιο σε αυτή τη συγκέντρωση θα πρέπει να αποκλείει και τους δίαυλους ασβεστίου τύπου L, ωστόσο το παρατηρούμενο αποτέλεσμα δεν έμοιαζε σε καμία περίπτωση με αυτό που παρατηρήθηκε στην περίπτωση που οι τελευταίοι αναστέλλονταν με βεραπαμίλη ή νιφεδιπίνη. Αντίθετα βρέθηκε να διακόπτει εντελώς την καρδιακή λειτουργία για όσο δρούσε. Οι υποθέσεις που μπορεί να κάνει κανένας είναι αρκετές, μια

που δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τους δίαυλους-στόχους που παρεμποδίζει αυτό το ιόν στο μοντέλο μας. Καταρχήν αν υποθέσει κανείς ότι πράγματι μπλοκάρει διαύλους ασβεστίου L-τύπου, τότε θα πρέπει να παρεμποδίζει και κάποιους άλλους διαύλους όπως για παράδειγμα τους T ή τους N-τύπου ταυτόχρονα, , μια που φαίνεται το νικέλιο να έχει τον ίδιο αντίκτυπο στην καρδιακή λειτουργία με την έλλειψη ασβεστίου και οι δίαυλοι που λειτουργούν και δίνουν την έστω και μικρή αυτή καρδιακή λειτουργία στην περίπτωση της βεραπαμίλης και της νιφεδιπίνης, εδώ είναι ανενεργοί.
Εξάλλου το νικέλιο, μπορεί να αναστέλλει και άλλους υποκυτταρικούς μηχανισμούς, κρίσιμους για την καρδιακή λειτουργία. Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβαίνει και στην προκειμένη περίπτωση. Για παράδειγμα, το νικέλιο μπορεί να αποκλείει πέρα από τους όποιους δίαυλους και τον υποθετικό ανταλλάκτη νατρίου/ασβεστίου της μεμβράνης των καρδιομυοκυττάρων της Δροσόφιλας, όπως συμβαίνει σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις νικελίου στα θηλαστικά (Hinde 1999). Αν πράγματι ισχύει αυτό, τότε δεν θα είναι η έλλειψη του ασβεστίου αλλά η ενδοκυττάρια υπερφόρτωσή του που παρακωλύει την καρδιακή λειτουργία. Έτσι, αναστέλλοντας τον ανταλλάκτη, ή κάποιο άλλο ομόλογο του μηχανισμό στην προνύμφη της Δροσόφιλας, το ασβέστιο δεν εξέρχεται από τα καρδιομυοκύτταρα, με συνέπεια η καρδιά να είναι σε διαρκή συστολή (εκπόλωση) και να μην μπορεί να επαναπόλωση και παραγωγή νέας εκπόλωσης. Επίσης στα θηλαστικά, ο ανταλλάκτης δρα μετακινώντας θετικό φορτίο στο εσωτερικό του κυττάρου (ρεύμα ανταλλάκτη), συμβάλλοντας έτσι στην εκπόλωση. Αν ισχύει αυτό και στο παρόν μοντέλο, τότε ενδεχομένως να αδυνατούν τα καρδιομυοκύτταρα, απουσία του ρεύματος του ανταλλάκτη, να εκπολωθούν. Επιπρόσθετα, στον κολποκοιλιακό κόμβο στο κουνέλι, έχει βρεθεί το νικέλιο να αποκλείει το καθυστερημένο ανορθωτικό ρεύμα K^+ (Song DK, 1999) και αν λάβουμε υπόψη τη μεγάλη σημασία του καλίου στην καρδιακή λειτουργία της Δροσόφιλας (Gu & Singh, 1995, Ocorr et al., 2007) δεν αποκλείεται η επιτέλεση μιας παρόμοιας ανασταλτικής δράσης του νικελίου και εδώ. Από την άλλη, υπάρχουν και ενδείξεις ότι το νικέλιο, αναστέλλει την Na^+, K^+-ATPase στο κοτόπουλο (Sperelakis, 1971) και στο καρδιαγγειακό σύστημα του αρουραίου (Rubányi G et al 1982). Γενικά πάντως, ανατρέχοντας κανένας στη βιβλιογραφία, θα συναντήσει πληθώρα εργασιών στις οποίες εμπλέκεται το νικέλιο και άλλα δισθενή μέταλλά στην αναστολή διαφόρων διαύλων. Αυτή η μη ειδική δράση του δισθενούς αυτού μετάλλου επομένως, δε επιτρέπει να υπεισέλθουμε σε περισσότερα συμπεράσματα σχετικά με τη φύση όσων παρατηρήθηκαν υπό την επίδραση νικελίου στα παρασκευάσματά μας.

Πέρα από τη σημασία της εισόδου ιόντων ασβεστίου στα καρδιομυοκύτταρα της προνύμφης της Δροσόφιλας και τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η μεταφορά αυτή διεκπεραιώνεται, είναι απαραίτητη η μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του ασβεστίου στο κύτταρο. Σημαντικότατη συνεισφορά στην απομάκρυνση του ασβεστίου από τον ενδοκυττάριο χώρο και την απομόνωσή του, διαδραματίζουν αντλίες του ΣΔ και του σαρκειλήματος που δεσμεύουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο και είτε το απομονώνουν στο ΣΔ για εκ νέου χρησιμοποίηση, είτε το αντλούν στον εξωκυττάριο χώρο αντίστοιχα (Berridge et al, 2000). Η σημασία των ATPασών της μεμβράνης του ΣΔ στη ρύθμιση της διεγερσιμότητας των καρδιακών κυττάρων, έγινε σαφέστερη όταν τυχαία παρατηρήθηκε ότι το knock-out για το γονίδιο της

φωσφολαμβάνης που είναι αναστολέας της SERCA, ήταν θεραπευτικό σε διάφορα μοντέλα καρδιοπαθειών στα ποντίκια (Minamisawa S. 1999).
Στη Δροσόφιλα η SERCA έχει χαρακτηριστεί (Martínez et al, 2003) και μάλιστα έχουν φτιαχτεί στελέχη με μεταλλάξεις για την αντλία αυτή, με την δυνατότητα η τελευταία να απενεργοποιείται, μετά την παρέλευση ενός πέντε λεπτών θερμικού σοκ (Sanyal et al 2004, Sanyal et al 2005). Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι η τοξίνη CPA δρα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, αναστέλλοντας ακριβώς την SERCA (Seidler et al 1989). Στην μελέτη αυτή μάλιστα δείχθηκε ότι η επίδραση του CPA σε αγρίου τύπου παρασκευάσματα, αλλά και σε μεταλλαγμένα για την SERCA, πριν την απενεργοποίησή της από το θερμικό σοκ, προκαλεί ένα πρότυπο καρδιακής ΗΔ και συχνότητας πολύ όμοιο με αυτό που παρατηρείται μετά την απενεργοποίηση της SERCA. Επομένως τόσο η μετάλλαξη για την απενεργοποίηση της SERCA όσο και ο φαρμακολογικός αποκλεισμός της, αναμένεται να έχουν όμοια επίδραση στην καρδιακή λειτουργία.
Η χρησιμοποίηση της ελεγχόμενης απενεργοποίησης της SERCA στην Δροσόφιλα, έχει αποκαλύψει μια δραματική μείωση του ρυθμού καρδιακής λειτουργίας μετά από θερμικό σοκ (Sanyal et al., 2005), υποδεικνύοντας τη βασική σημασία της φυσιολογικής μείωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου και της αποθήκευσής του για επαναχρησιμοποίηση από το ΣΔ. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η απενεργοποίηση της αντλίας, προκαλούσε διεύρυνση τόσο του διαστήματος μεταξύ διαδοχικών συστολών όσο και του χρόνου διάρκειας μιας συστολής.
Επιπλέον η ίδια ομάδα διαπίστωσε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη για τη SERCA, πριν το θερμικό σοκ εμφανίζουν μια μικρή αδυναμία πραγματοποίησης ορισμένων ΔΕ , πράγμα που γίνεται συστηματικό και ιδιαίτερα έντονο με το θερμικό σοκ.
Στην παρούσα μελέτη ελεγχθήκαν άτομα της σειράς kum^{170} πριν από το θερμικό σοκ και μετά και τα αποτελέσματά βρέθηκαν να είναι εντελώς όμοια με τα παραπάνω. Έτσι παρατηρήθηκε θεαματική πτώση της καρδιακής συχνότητας μετά το θερμικό σοκ, αλλά και μια ελαφρά μείωση της συχνότητας των παρασκευασμάτων πριν το θερμικό σοκ. Δεδομένου ότι στην προνύμφη της Δροσόφιλας ο καρδιακός παλμός είναι μυογενής εφόσον δεν αναστέλλεται από TTX (Gu & Singh, 1995), είναι βέβαιο ότι ο παρατηρούμενος φαινότυπος αποδίδεται αποκλειστικά στην SERCA που υπάρχει στα καρδιομυοκύτταρα.
Στις καταγραφές που πραγματοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή παρατηρήθηκε κάτι πολύ σημαντικό, πέρα από την μείωση στη συχνότητα μετά το θερμικό σοκ . Αυτό είναι ότι στα άτομα που είχαν υποστεί θερμικό σοκ, καθώς και στα αγρίου τύπου άτομα OR-R στα οποία είχε επιδράσει CPA, το πρότυπο της καρδιακής ΗΔ αφενός ήταν όμοιο μεταξύ τους και αφετέρου αποτελούνταν από εξωκυττάρια δυναμικά με δυο ή περισσότερες κορυφές Αυτό δείχνει μάλλον ότι η καρδιακή σύσπαση, δεν γινόταν ολοκληρωμένα, δηλαδή τα καρδιομυοκύτταρα έμεναν σε κατάσταση μερικής συστολής. Δηλαδή αυτές οι πρώιμες μετεκπολώσεις των καρδιακών κυττάρων που παρατηρήθηκαν, δείχνουν ότι τα καρδιακά κύτταρα δεν έφταναν πάντοτε στην επαναπόλωση. Μάλιστα ήταν εντυπωσιακό ότι οι πρώιμες μετεκπολώσεις εναλλάσσονταν σχεδόν κανονικά με κανονικές επαναπολώσεις Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί βάση των γνώσεων μας για την καρδιακή σύσπαση ως εξής: αν το ενδοκυττάριο ασβέστιο παίζει τον κυρίαρχο ρόλο στην σύσπαση στην καρδιά της Δροσόφιλας, πράγμα που φαίνεται να ισχύει από τις παρατηρήσεις μας, ενδεχομένως να πρέπει να μειωθεί αρκετά στον ενδοκυττάριο χώρο ώστε να επέλθει επαναπόλωση, όπως ακριβώς συμβαίνει στα θηλαστικά και κατά συνέπεια χάλαση της

καρδιάς. Όταν η SERCA δε λειτουργεί, χάνεται ένας πολύ βασικός μηχανισμός μείωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου και αυτό παραμένει για περισσότερο χρόνο σε υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα. Με μια τέτοια λογική μπορεί να εξηγηθεί και η παρατεταμένη διάρκεια της συστολής που παρατήρησε ο Sanyal και οι συνεργάτες του, αλλά και τα δικά μας ευρήματα, δηλαδή την μη ολοκληρωμένη επαναπόλωση της καρδιάς μεταξύ διαδοχικών εξωκυττάριων δυναμικών, που ενδεχομένως αντιστοιχεί σε μη ολοκληρωμένη επαναπόλωση των καρδιομυοκυττάρων μεταξύ διαδοχικών ΔΕ. Ωστόσο η εξασφάλιση της λειτουργίας έστω και μειωμένης απουσία της SERCA και η παρουσία ολοκληρωμένων επαναπολώσεων, αποτελεί αδιάσειστη απόδειξη ότι και άλλοι μηχανισμοί, πέραν της SERCA, συντελούν στην ελάττωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου.

Ένας ακόμα πειραματικός χειρισμός που έγινε στην εργασία αυτή είναι η επίδραση του CPA σε προνύμφες *kum*^{170} που είχαν υποστεί θερμικό σοκ για να διαπιστωθεί κάποια επιπρόσθετη επίδραση. Στην πραγματικότητα δυο πράγματα αναμενόταν να επαληθευτούν με αυτή την ενέργεια ˙ πρώτον να διαπιστωθεί αν πέτυχε το θερμικό σοκ και αν προκάλεσε σχετικά ευρεία απενεργοποίηση της SERCA, μια που δεν είναι δεδομένο ότι το θερμικό σοκ πάντοτε πραγματοποιείται με επιτυχία και δεύτερον να δούμε αν πράγματι η επίδραση του CPA στη Δροσόφυλλα, όπως την παρατηρήσαμε σε παρασκευάσματα των οποίων η αντλία ήταν άθικτη, οφείλεται σε απενεργοποίηση της SERCA και όχι σε κάποια άλλη δράση της τοξίνης στο μοντέλο μας.
Τα παραπάνω πειράματα, έδειξαν ότι η τοξίνη σε ζώα των οποίων η αντλία είχε απενεργοποιηθεί με θερμικό σοκ, προκαλούσε μια πολύ μικρή περαιτέρω μείωση της καρδιακής συχνότητας, όχι στατιστικά σημαντική και μια μικρή αλλαγή στο πρότυπο καρδιακής ΗΔ. Ουσιαστικά το CPA έδρασε προσθετικά με το θερμικό σοκ μια που απλώς ενέτεινε τον φαινότυπο των καρδιακών ενδοκυττάριων δυναμικών που ήδη είχε καταγραφεί και δεν προκάλεσε κανένα επιπρόσθετο αποτέλεσμα, τουλάχιστον όχι ορατό με την πειραματική προσέγγιση που μετήλθαμε.
Αυτή η μικρή επιπλέον ελάττωση της συχνότητας, μπορεί να εξηγηθεί αν υποθέσουμε ότι με το θερμικό σοκ δεν απενεργοποιήθηκαν εντελώς οι SERCA σε όλα τα κύτταρα που μετέχουν στην καρδιακή σύσπαση. Έτσι, η δράση της τοξίνης απενεργοποίησε περισσότερες αντλίες και ενισχύθηκε ο φαινότυπος που προκάλεσε το θερμικό σοκ.
Μια άλλη παρατήρηση είναι ότι πράγματι πρέπει να υπάρχει μεγάλη συντήρηση της αντλίας μεταξύ των οργανισμών και ως προς το λειτουργικό κομμάτι της αντλίας, που αδρανοποιείται με το CPA και συντελεί στην απενεργοποίηση τηςSERCA.
Τέλος τα πειράματα μελέτης της αντλίας αυτής δείχνουν ξεκάθαρα όχι μόνο ότι είναι σημαντική η τελευταία, αλλά –δεδομένου ότι δεν μείωνε τη συχνότητα κάτω από κάποια όρια- ότι υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ίσως που ελέγχουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο. Όσο χρόνο και αν επιδρούσε η CPA, η καρδιακή συχνότητα δε μειωνόταν ποτέ κάτω από κάποιο σημείο. Αυτό δείχνει ότι ένας άλλος μηχανισμός, πιθανότατα ο ανταλλάκτης νατρίου/ασβεστίου που εντοπίζεται στα σπονδυλωτά, είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην ομοιόσταση του ασβεστίου στο μοντέλο μας. Στο νευρικό σύστημα της Δροσόφιλας, ένας εξαρτώμενος από το κάλιο ανταλλάκτης νατρίου/ασβεστίου, έχει ήδη χαρακτηριστεί (Haug-Collet, 1999). Κρίνεται απαραίτητο λοιπόν, να στραφεί ένα μέρος των ερευνητικών εργασιών στην ταυτοποίηση της παρουσίας ή μη, του ανταλλάκτη και στην καρδιά της Δροσόφιλας. Η πιστοποίηση της παρουσίας ενός ανταλλάκτη ανάλογου

αυτού που βρίσκεται στην καρδιά των σπονδυλωτών στο προκείμενο μοντέλο, είναι σίγουρο ότι θα εξηγήσει πολλές από τις παρατηρήσεις που έγιναν στην μελέτη αυτή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Δροσόφιλα θα μπορούσε να αποτελέσει ανεκτίμητο μοντέλο μελέτης της καρδιακής λειτουργίας και παθολογίας, βοηθώντας έτσι στη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου των ατόμων που αντιμετωπίζουν συγγενείς και επίκτητες καρδιολογικές παθήσεις. Η πλήρης εξιχνίαση των μηχανισμών που μετέχουν στην καρδιακή λειτουργία της Δροσόφιλας, απαιτεί ακόμα περισσότερες και διεξοδικότερες μελέτες.

Στην εργασία αυτή έγινε μια απόπειρα να απαντηθούν μερικά κρίσιμα ερωτήματα σχετικά με τα ιοντικά ρεύματα και τους διαύλους που καθορίζουν την καρδιακή λειτουργία της Δροσόφιλας και τη βηματοδότηση.

Καταρχήν μια πολύ σημαντική παρατήρηση, ανατρεπτική για τα μέχρι τώρα δεδομένα, είναι η μείωση της ΗΔ της καρδιάς, απουσία νατρίου. Οι μέχρι τώρα μελέτες, είχαν δείξει ότι στη Δροσόφιλα, μείωση του νατρίου -όχι πλήρης αποστέρηση- και αναστολή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων νατρίου δεν είχαν σοβαρό αντίκτυπο στην καρδιακή λειτουργία (Gu & Singh, 1995). Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, δείχνουν ότι το νάτριο παίζει ρόλο στην καρδιακή λειτουργία, προφανώς όμως όχι διαμέσου των τασεοεξαρτώμενων διαύλων νατρίου, αλλά ενός άλλου συστήματος μεταφοράς του, εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης.

Επίσης, δόθηκε μεγάλη βαρύτητα στο ρόλο του ασβεστίου και των μηχανισμών διακίνησής του, εφόσον τα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν τις δραματικές συνέπειες που έχει η απουσία του ασβεστίου στην καρδιακή λειτουργία. Αυτό δείχνει και πόσο σημαντικό είναι αυτό το ιόν, πράγμα αναμενόμενο δεδομένων των πολλών και διαφορετικών δράσεων του ασβεστίου. Ωστόσο η περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών εισόδου του στα κύτταρα, με τη χρήση των φαρμάκων που αποκλείουν το ρεύμα ασβεστίου μέσω των L-τύπου διαύλων, καθιστά σχεδόν βέβαιη την παρουσία διαύλων όμοιων με τους L-τύπου, στην καρδιά της Δροσόφιλας και την κρίσιμη συμμετοχή τους στην καρδιακή λειτουργία. Η συνδρομή της Μοριακής Βιολογίας όμως είναι απαραίτητη, ώστε να εξακριβωθεί η ακριβής δομή των διαύλων αυτών και να φανούν πιθανές διαφορές και ομοιότητες, δομικές και λειτουργικές, με τους ομόλογους διαύλους στα σπονδυλωτά.

Ακόμα θα μπορούσε να ισχυριστεί κανένας, βάση των δεδομένων της εργασίας αυτής και άλλων σχετικών (Gu & Singh, 1995, Johnson et al., 1998, Sanyal et al., 2005), ότι πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον ένας ακόμα δίαυλος εισόδου του ασβεστίου στα καρδιομυοκύτταρα της Δροσόφιλα, μια που η αναστολή των L- τύπου διαύλων δε σήμανε τη διακοπή της καρδιακής λειτουργίας, όπως συνέβη με αναστολή των διαύλων αυτών με νικέλιο. Βέβαια για να ισχύει το τελευταίο πρέπει να υποτεθεί ότι η μόνη δράση του νικελίου στο μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε είναι η αναστολή διαύλων ασβεστίου, που όμως είναι πιθανό, μια που δεν υπάρχουν ενδείξεις για άλλες δράσεις του μετάλλου στην καρδιά της Δροσόφιλας.

Επιπλέον, πολύ σημαντική φαίνεται να είναι η SERCA στην ομαλή καρδιακή λειτουργία της Δροσόφιλας, εφόσον ο φαινότυπος που προκαλεί η απενεργοποίησή της, είναι τόσο από άποψη καρδιακής συχνότητας, όσο και από ηλεκτρικών φαινόμενων, πολύ ιδιαίτερος. Η σημασία μάλιστα της SERCA, έμμεσα τονίζει για άλλη μια φορά τον καθοριστικό ρόλο του ενδοκυττάριου ασβεστίου στην καρδιακή λειτουργία της Δροσόφιλας. Επίσης δείχνει ότι οι μηχανισμοί που συντελούν στην καρδιακή σύσπαση στα σπονδυλωτά, δεν πρέπει να αποκλίνουν σε μεγάλο βαθμό από αυτούς που μετέχουν στο μοντέλο της Δροσόφιλας. Επομένως δεν θα ήταν έκπληξη η συμμετοχή του ασβεστίου στην βηματοδότηση της καρδιάς, στη Δροσόφιλα.
Τέλος να σημειωθεί, ότι η παρουσία ενός ομοιοστατικού μηχανισμού του ασβεστίου – πιθανότατα του ανταλλάκτη νατρίου/ασβεστίου- στη μεμβράνη των καρδιακών κυττάρων της Δροσόφιλας είναι πάρα πολύ πιθανή, δεδομένου μάλιστα ότι ήδη έχει χαρακτηριστεί ένας όμοιος ανταλλάκτης στο νευρικό σύστημα της Δροσόφιλας. Ωστόσο για να δοθεί οριστική απάντηση στο ερώτημα αυτό, η συνδρομή και άλλων ερευνητικών μεθόδων και κυρίως αυτών της Μοριακής Βιολογίας είναι επιτακτική.

ABSTRACT

The cellular mechanisms governing cardiac pacemaker activity are not clear. The discovery of common genes such as *tinman* in all organisms with a heart, has provided new prospects in the study of cardiac function, development and pathology. In this concept, *Drosophila* heart has proven itself to be an excellent model for human cardiac development and function.

In this study, we measured the heart rate in *Drosophila* third instar larvae of OR-R line in certain conditions, using an extracellular recording electrode attached on the posterior cardiac region. The use of a peristaltic pump allowed us to change the ionic and pharmacological environment of the experiment, while the constant recycling of saline retained the proper oxygenation of our preparations at 25^{o}C, keeping them in normal cardiac functioning for over an hour. In order to investigate the possible roles of several ions and ionic channels we used three approaches and in each of them we measured the heart rate. Firstly, we conducted a series of experiments in which calcium or sodium were ablated from the saline immersing our preparations. Secondly, we used pharmacological blockers of calcium channels and specifically several concentrations of Ni^{+} that block T-type and L-type calcium channels in vertebrates, the L-type calcium channel blockers, verapamil and niphedipine in concentrations 30 and 5 μM respectively, and finally cyclopiazonic acid, an inhibitor of SR Ca^{2+}-ATPase at a concentration of 100 μM. Thirdly, to further analyze the role of cytosolic calcium in regulating heart beat frequency and rhythm, we studied the conditional mutation in *Drosophila* SERCA (Sarco-endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase), *kum*, in which SERCA deactivates after five minutes of heat-shock at 40^{o}C.

We observed in wild type larvae, that calcium-free saline containing 0,2mM EGTA, abrupts cardiac activity, in about 1-2 minutes, while very low concentration (0,1mM) significantly reduces the heart rate until it totally quits, at about 6-7 minutes. Additionally, sodium-free saline treatment for 5 minutes, reduces heart rate and transduces continues cardiac pumping into a discontinuous bursting activity. Moreover, treatment with 1mM nickel-containing saline, ceases cardiac activity in contrast to low concentration of 50-100 μM, that had no apparent effect in cardiac function. The specific blockers of L-type calcium channels verapamil and niphedipin had quite similar inhibitory effects, namely the significant reduction of cardiac contraction rate, notable bradycardia and arrhythmia in wild type animals. Besides treatment with cyclopiazonic acid, reduces heart rate and creates a characteristic pattern of cardiac activity in both wild type and unheated kum^{170} animals, but had a minor effect in heat-shocked kum^{170} animals. These data indicate that calcium plays a major role in the electrical properties of cardiac cells in *Drosophila* third instar larvae, and that there must be calcium channels, similar to the L-type and/or T-type calcium channels found in vertebrates, controlling cardiac contraction. In addition, SERCA malfunction or inhibition is responsible for a dramatic distortion of normal heart beating phenotype, that could be similar to pathological conditions observed in humans.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κυτταρικοί μηχανισμοί ελέγχου της βηματοδότησης της καρδιάς δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Συγχρόνως, η ύπαρξη γονιδίων όπως το *tinman*, σε όλους τους οργανισμούς που έχουν καρδιά, ανοίγει νέους ορίζοντες στη μελέτη της λειτουργίας της. Σε αυτό το πλαίσιο, η Δροσόφιλα αποτελεί ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της ανάπτυξης και της φυσιολογίας της καρδιάς.
Στην παρούσα μελέτη, μετρήθηκε η καρδιακή συχνότητα στις προνύμφες τρίτου σταδίου OR R στελεχών Δροσόφιλας κάτω από ορισμένους πειραματικούς χειρισμούς, με τη χρήση εξωκυττάριου ηλεκτροδίου στην οπίσθια περιοχή της καρδιάς. Με τη βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας, υπήρχε η δυνατότητα συνεχούς αλλαγής του περιβάλλοντος του παρασκευάσματος, τόσο ως προς τις ιοντικές όσο και ως προς τις φαρμακολογικές του ιδιότητες, ενώ η συνεχής ανακύκλωση του ορού εξασφάλιζε την κατάλληλη οξυγόνωση του, διατηρώντας την φυσιολογική καρδιακή λειτουργία τους 25^{o} C για πάνω από μια ώρα. Προκειμένου να διερευνηθούν οι πιθανοί ρόλοι ιόντων και ιοντικών διαύλων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις πειραματικές προσεγγίσεις σε κάθε μια από τις οποίες μετρήθηκε η καρδιακή συχνότητα. Πρώτον, διεξήχθησαν πειράματα, στα οποία είχαν αφαιρεθεί τα ιόντα ασβεστίου ή τα ιόντα νατρίου από τον ορό που διαπότιζε τα παρασκευάσματα. Δεύτερον, χρησιμοποιήθηκαν οι εκλεκτικοί αναστολείς των διαύλων ασβεστίου τύπου L, νιφεδιπίνη και βεραπαμίλη σε συγκεντρώσεις 5 και 50 μM αντίστοιχα και νικέλιο σε συγκέντρωσεις 50 μM και 1 mM, για αναστολή των T και L-τύπου διαύλων ασβεστίου αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η τοξίνη cyclopiazonic acid (CPA) σε συγκέντρωση 100 μM, που αποκλείει ειδικά την αντλία SERCA. Τρίτον, μελετήθηκε η μετάλλαξη *kum*^{170}, η οποία προκαλεί την απενεργοποίηση της SERCA έπειτα από την επίδραση θερμικού σοκ στους 40^{o} C.
Στις άγριου τύπου προνύμφες, ο ορός χωρίς ασβέστιο που περιείχε και 0,2mM EGTA, προκαλεί ταχύτατη διακοπή της καρδιακής λειτουργίας σε 1-2 λεπτά, ενώ ο ορός με πολύ μικρή συγκέντρωση ασβεστίου, 0,1 mM, ελαττώνει και στη συνέχεια, μέσα σε 5-6 λεπτά, διακόπτει εντελώς την καρδιακή λειτουργία. Επιπρόσθετα, επώαση με ορό χωρίς νάτριο, μετατρέπει μέσα σε 5 λεπτά την συνεχόμενη φυσιολογικά καρδιακή λειτουργία, σε ασυνεχή, δημιουργώντας ένα πρότυπο ριπών καρδιακής δραστηριότητας. Η επώαση με 1 mM νικέλιο, προκαλεί ταχύτατα, παύση της καρδιακής λειτουργίας, ενώ επώαση με 50 μM, δεν έχει εμφανή αντίκτυπο. Οι ειδικοί αναστολείς των L-τύπου διαύλων ασβεστίου, βεραπαμίλη και νιφεδιπίνη, επιφέρουν σημαντική μείωση της συχνότητας καρδιακής λειτουργίας, χαρακτηριστική βραδυκαρδία και αρρυθμία, στα άγριου τύπου παρασκευάσματα. Εξάλλου, επώαση αγρίου τύπου παρασκευασμάτων με CPA, επάγει ελάττωση του ρυθμού καρδιακής λειτουργίας, δημιουργώντας ταυτόχρονα ένα χαρακτηριστικό πρότυπο ηλεκτρικής δραστηριότητας, τόσο στα άγριου τύπου όσο και στα *kum*^{170} που δεν είχαν υποστεί θερμικό σοκ. Η παραπάνω δράση του CPA ήταν όμοια με την επίδραση του θερμικού σοκ στα *kum*^{170} , και μάλιστα στα τελευταία η επώαση με CPA δεν προκαλούσε σημαντική αλλαγή του φαινοτύπου της καρδιακής ηλεκτρικής δραστηριότητας.
Αυτά τα ευρήματα, δείχνουν ότι το ασβέστιο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στις ηλεκτρικές ιδιότητες των καρδιακών κυττάρων της προνύμφης της Δροσόφιλας. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχουν δίαυλοι ασβεστίου όμοιοι με τους L-τύπου διαύλους που απαντώνται στα σπονδυλωτά και να ελέγχουν την καρδιακή λειτουργία στη

Δροσόφιλα, Τέλος, είναι σαφές, ότι η δυσλειτουργία ή αναστολή της SERCA, είναι υπεύθυνη για μια δραματική διαταραχή του φαινοτύπου καρδιακής λειτουργίας, που ενδεχομένως να προσομοιάζει με παθολογικές καταστάσεις που παρατηρούνται στον άνθρωπο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Accili E. A., Proenza C., Baruscotti M., and DiFrancesco D. From Funny Current to HCN Channels: 20 Years of Excitation. *News Physiol Sci* 17: 32-37, 2002
Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A, and DiFrancesco D. Integrated allosteric model of voltage gating in HCN channels. *J Gen Physiol* 17: 519-532, 2001.
Atkinson, N.S., R. Brenner, W. Chang, J. Wilbur, J.L. Larimer, and J. Yu. Molecular separation of two behavioral phenotypes by a mutation affecting the promoters of a Ca-activated K channel. *J. Neurosci.* 20:2988–2993, 2000.
Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M, Ojeda C. The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch.* 379(2):137-42, 1979.
Azpiazu, N. and Frasch, M. *tinman* and *bagpipe*: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev* 7, 1325-1340, 1993.

Baruscotti M, Bucchi A, Difrancesco D Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther.* 107(1):59-79, 2005.
Baumann A, Grupe A, Ackermann A, and Pongs O. Structure of the voltage-dependent potassium channel is highly conserved from Drosophila to vertebrate central nervous systems. *EMBO J*. 7(8): 2457–2463, 1988.
Beeler GW and Reuter H. The relation between membrane potential, membrane currents, and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. *J Physiol (Lond)* 207: 211–229,1970.
Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1(1):11-21, 2000.
Berne RM and Levy MN. Principles of Physiology. C.V. Mosby, St Louis, 2nd edition, 1996.
Bers Donald M., The Beat Goes On Diastolic Noise That Just Won't Quit. *Circ Res*. 99:921-923, 2006.
Bers DM. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. *Dordrecht: Kluwer Academic*, 1991.
Bier & Bodmer. Drosophila, an emerging modelfor cardiac disease. *Gene* 342:1-11, 2004.
Bier E. Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* 6, 9–23, 2005.
Bodmer, R. and Frasch, M. Genetic determination of *Drosophila* heart development. In *Heart development* 65-90, 1999.
Bridge JBH, Smolley JR, and Spitzer KW. The relationship between charge movements associated with ICa and INa-Ca in cardiac myocytes. *Science* 248: 376–378, 1990.
Brette Fabien and Orchard Clive, T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes *Circ. Res.* 92;1182-1192, 2003.

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 262:740–744, 1993.
Reeves JP, Hale CC. The stoichiometry of the cardiac sodium– calcium exchange system. J Biol Chem 259:7733– 9, 1984
Curtis, N. J., Ringo, J. M. and Dowse, H. B. Morphology of the pupal heart, adult heart and associated tissues in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 240, 225-235, 1999.

d'Alessio, M. and Frasch, M. Msh may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech. Dev.* 58, 217-231, 1996
Dirk J. Snyders. Structure and function of cardiac potassium channels. Cardiovascular Research 42:377–390, 1999.
Dunin-Borkowski, O., Brown, N. and Bate, M. Anteroposterior subdivision and the diversification of the mesoderm in *Drosophila*. *Development* 121, 4183-4193, 1995.

Endo M, Tanaka M, and Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228: 34–36, 1970.

Fabiato A. Rapid ionic modifications during the aequorin-detected calcium transient in a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85: 189–246, 1985.
Fabiato A. Simulated calcium current can both cause calcium loading and in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85: 291–320, 1985.
Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85: 247–290, 1985.
Feany, M. B. & Bender, W. W. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398, 2000.
Ferrier GR, Howlett Susan E . Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: 1928–1944, 2001
Frémion, F., Astier, M., Zaffran, S., Guillén, A., Homburger, V. and Sémériva, M. The heterotrimeric protein Go is required for the formation of heart epithelium in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 145, 1063-1076, 1999.
.

Gajewski, K., Choi, C. Y., Kim, Y. and Schulz, R. A. Genetically distinct cardiac cells within the *Drosophila* heart. *Genesis* 28, 36-43, 2000.
Guo J, Ono K, Noma A. A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 15;483 (Pt 1):1-13, 1995.
Guo J, Mitsuiye T, Noma A. The sustained inward current in sino-atrial node cells of guinea-pig heart. *Pflugers Arch*. 433(4):390-6, 1997.

Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 359:233–253, 1988.

Halfon, M., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Sackerson, C., Jimenez, F., Baylies, M. and Michelson, A. Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissuerestricted transcription factors. *Cell* 103, 63-74, 2000
Haug-Collet, B. Pearson,R. Webel, R.T. Szerencsei, R.J. Winkfein, P.P.M. Schnetkamp, and N.J. Colley. Cloning and Characterization of a Potassium-dependent Sodium/Calcium Exchanger in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, Volume 147, Number 3, 659–669, 1999
Hertel W, **Pass G**. An evolutionary treatment of the morphology and physiology of circulatory organs in insects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 133(3):555-75, 2002.
Hinde AK, Perchenet L, Hobai IA, Levi AJ, Hancox JC. Inhibition of Na/Ca exchange by external Ni in guinea-pig ventricular myocytes at 37 degrees C, dialysed internally with cAMP-free and cAMP-containing solutions. ***Cell Calcium.*** **25(4):321-31, 1999.**
Hobai IA, **Hancox JC**, **Levi AJ**. Inhibition by nickel of the L-type Ca channel in guinea pig ventricular myocytes and effect of internal cAMP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279(2):692-701, 2000.
Hobai IA, **Hancox JC**, **Levi AJ**. Inhibition by nickel of the L-type Ca channel in guinea pig ventricular myocytes and effect of internal cAMP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279(2):692-701, 2000.
HorackovaMand Vassort G. Calcium conductance in relation to contractility in frog myocardium. *J Physiol (Lond)* 259: 597–616, 1976.

Irisawa H. Membrane currents in cardiac pacemaker tissue Experientia. 43(11-12):1131-5, 1987
Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, and Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274: 12835_12839, 1999.

Jagla, K., Frasch, M., Jagla, T., Dretzen, G., Bellard, F. and Bellard, M. *Ladybird*, a new component of the cardiogenic pathway in *Drosophila* required for diversification of heart progenitors. *Development* 124, 3471-3479, 1997.
Johnson E, Ringo J, Dowse H. Modulation of Drosophila heartbeat by neurotransmitters. *J. Comp. Physiology* 167:89-97, 1997.Johnson E, Ringo J, Bray N, Dowse H**.Genetic and pharmacological identification of ion channels central to the Drosophila cardiac pacemaker.** ***J Neurogenet.*** **12(1):1-24, 1998.**

Katz AM. Calcium channel diversity in the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol.* (2):522-9, 1996.
Kremser, T., Gajewski, K., Schulz, R. and Renkawitz-Pohl, R. Tinman regulates the transcription of the *beta3 tubulin* gene (*betaTub60D*) in the dorsal vessel of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 216, 327-339, 1999.

Lee, H. and Frasch, M. Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target *sloppy paired. Development* 127, 5497-5508, 2000.

Lipsius SL, Hüser J, Blatter LA. Intracellular Ca release sparks atrial pacemaker activity. *News Physiol Sci*. 16:101–106, 2001.
Lo, P. C. H. and Frasch, M. A role for the COUP-TF-related gene *seven-up* in the diversification of cardioblast identities in the dorsal vessel of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 104, 49-60, 2001.
Lucas P. and Shimahara T.Voltage- and Calcium-activated currents in cultured olfactory receptor neurons of male Mamestra brassicae (Lepidoptera*). Chem. Senses*. 27, 599-610, 2002.
Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, and Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591, 1998.

Markou T and Theophilidis G. The pacemaker activity generating the intrinsic myogenic contraction of the dorsal vessel of *Tenebrio molitor* (Coleoptera). *J. Exp. Biol*. 203, 3471-3483, 2000.
McPherson PS. and Kevin P. Campbell The Ryanodine Receptor/Ca2+ Release Channel, *The Journal of Biological Chemistry* 268(26):19785-90, 1993.
McKann FV. Electrophysiology of an insect heart. J. Gen Physiol. 46, 803-821, 1963
McCann FV. Calcium action potentials in insect myocardial fibers. Comp. Biochem. Physiol. 40A, 353-357, 1971.
Miller TA. Structure and physiology of the circulatory system. In G A Kerkut and LI Gilbert (eds): *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford: PErgamon Press* pp 289-353.

Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J Jr, Kranias EG, Giles WR, Chien KR. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy**.** *Cell.* 29;99(3):313-22, 1999.

Mitsuiye T, Guo J, Noma A. Nicardipine-sensitive Na+-mediated single channel currents in guinea-pig sinoatrial node pacemaker cells. *J Physiol*. 15;521 Pt 1:69-79, 1999.

Mitsuiye T, Shinagawea Y, Noma A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ Res*. 87:88–91, 2000.
Molina, M. R. and Cripps, R. Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila* heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells. *Mech. Dev.* 109, 51-59, 2001.
Moroni A, Barbuti A, Altomare C, Viscomi C, Morgan J, Baruscotti M, and DiFrancesco D. Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. *Pflügers Arch* 439: 618-626, 2000.
Muqit, M. M. & Feany, M. B. Modelling neurodegenerative diseases in Drosophila: a fruitful approach? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 237–243, 2002

Nasonkin, I., Alikasifoglu, A., Ambrose, C., Cahill, P., Cheng, M., Sarniak, A., Egan, M. and Thomas, P. M. A novel sulfonylurea receptor family member expressed in the embryonic *Drosophila* dorsal vessel and tracheal system. *J. Biol. Chem.* 274, 29420-29425, 1999

New W and Trautwein W. The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction. *Pflu¨gers Arch* 334: 24–38, 1972.
Noble D. Ionic mechanisms of rhythmic firing. *Symp Soc Exp Biol.* 37:1-28, 1983.
Noble D. Ionic mechanisms controlling the action potential duration and the timing of repolarization. *Jpn Heart J. Suppl* 1:3-19, 1986.
Noma A. Ionic mechanisms of the cardiac pacemaker potential. Jpn Heart J. 37(5):673-82, 1996.

Ochi R and Trautwein W. The dependence of cardiac contraction on depolarization and slow inward current. *Pflu¨gers Arch* 323: 187–203, 1971
Ocorr K, Perrin L, Lim Hui-Ying, Li Qian, Wu X, Rolf Bodmer. Genetic control of heart function and aging in Drosophila. *Trends Cardiovasc Med; 17:177-182*, 2007 a.
Ocorr K, Reeves NL, Wessells RJ, Fink M, Chen HS, Akasaka T, Yasuda S, Metzger JM, Giles W, Posakony JW, Bodmer. KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in Drosophila that mimic the effects of aging. *Proc Natl Acad Sci* 6;104(10):3943-8, 2007 b.

Παπαευθυμίου Χ., Μηχανισμοί ελέγχου της ηλεκτρικής δραστηριότητας στην καρδιά της μέλισσας Apis mellifera macedonica. Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη, 2005.
Periasamy M & Kalyanasundaram A., SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease, *Muscle & Nerve 35: 430-442*, 2007.
Ponzielli R, Astier M, Chartier A., Gallet A, Thérond P. and Sémériva M. Heart tube patterning in Drosophila requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling, *Development* 129, 4509-4521 2002 .
Powell T, Terrar DA, Twist VW. Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. J Physiol. 302:131-53, 1980.

RIOS, E., KARHANEK, M., MA, J., AND GONZALEZ, A. An allosteric model of the molecular interactions of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol*. 102: 449-481, 1993.
RIOS, E., AND PIZARRO, G. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol. Rev*. 71: 849-908, 1991.
Rousseau E, Smith JS, and Meissner G. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca21 release channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 253: C364–C368, 1987.
Rizki, T. M. The circulatory system and associated cells and tissues.
In *The Genetics and Biology of Drosophila*. 397-452, 1978.
Ruggendorff, A., Younossi-Hartenstein, A. and Hartenstein, V. Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 203, 266-280, 1994.
Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, A. and Leptin, M.
Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* 124, 2915-2922, 1997.

Rubányi G, Bakos M, Hajdu K, Pataki T.. Dependence of nickel-induced coronary vasoconstriction on the activity of the electrogenic Na+, K+-pump. Acta Physiol Acad Sci Hung. 59(2):169-74, 1982.

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, and Tibbs GR. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 29: 717_729, 1998.

Sano T, Suzuki F. Mode of action of catecholamines on contraction mechanism in relation to action potential. *Jpn Circ J.* 35(8):949-54, 1971.

Satoh H, Blatter LA, Bers DM. Effects of [Ca2+]i, SR Ca2+ load, and rest on Ca2+ spark frequency in ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 272:657–668, 1997.

Seidler NW, JonazM I, Veghg, and Martonosill A., Cyclopiazonic Acid Is a Specific Inhibitor of the Ca2+-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 264, No. 30, 17816-17823, 1989.

Song DK, Earm YE, Ho WK. Blockade of the delayed rectifier K+ currents, IKr, in rabbit sinoatrial node cells by external divalent cations. *Pflugers Arch.* 438(2):147-53, 1999.

Sperelakis Nicholas, Cell Physiology Source Book, , Academic Press Inc.,U.S. 2nd edition, 1995

Sperelakis N, Lee EC. Characterization of (Na + ,K +)-ATPase isolated from embryonic chick hearts and cultured chick heart cells**.** Biochim Biophys Acta. 233(3):562-79, 1971.

Sutko JL, Ito K, and Kenyon JL. Ryanodine: a modifier of sarcoplasmic reticulum calcium release. Biochemical and functional consequences of its actions on striated muscle. *Fed Proc* 44: 2984–2988, 1985.

Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J*. 1992;63:497–517.

Santana LF, Cheng H, Gomez AM, Cannell MB, Lederer WJ. Relation between the sarcolemmal Ca21 current and Ca21 sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ Res*. 78:166–171, 1996.

Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M, and DiFrancesco D. The human gene coding for HCN2, the pacemaker channel of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1446: 419-425, 1999.

Varró A, Papp JG. The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. Cardioscience. (3):131-44, 1992.

Vassalle M. Generation and conduction of impulses in the heart under physiological and pathological conditions. Pharmacol Ther. 3(1):1-39, 1977.

Warbington, L., T. Hillman, C. Adams, and M. Stern. Reduced transmitter release conferred by mutations in the slowpoke-encoded Ca2+-activated K+ channel gene of *Drosophila*. *Invert. Neurosci.* 2:51–60, 1999.

Weber CR, Piacentino V III, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM. Na+-Ca2+ exchange current and submembrane [Ca2+] during the cardiac action potential. *Circ Res* 90(2):182-9, 2002.

Yamaoka K, Kameyama M.. Regulation of L-type Ca2+ channels in the heart: overview of recent advances. *Mol Cell Biochem*. 253(1-2):3-13, 2003.
Yoshiaki Uyama, 'Yuji Imaizumi & Minoru Watanabe. Effects of cyclopiazonic acid, a novel Ca2+-ATPase inhibitor, on contractile responses in skinned ileal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol*. 106, 208 -214, 1992.
Zaffran S., Frasch M, Early signals in cardiac development. *Circ. Res*, 91:457-69, 2002
Zaffran, S., Astier, M., Gratecos, D., Guillén, A. and Sémériva, M. Cellular interactions during heart morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Biol. Cell.* 84, 13-24, 1995.
Zarain-Herzberg A., MacLennan DH, Periasamy M. Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca-ATPase gene. *J. Biol.Chem*. 265:4670-4677, 1990.
Zhou Z, Lipsius SL. T-type calcium current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *J Mol Cell Cardiol*. 26:1211–1219, 1994.