

Válasz Dr Nyitrai Miklós MTA Doktora

„Ionáramok dinamikája és koordinációja az emlős kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja alatt”
című MTA doktori értekezésemre készített

bírálatára

Mindenekelőtt szeretném megköszönni, hogy elvállalta disszertációm bírálatát és időt szakított annak részletes áttanulmányozására és kiértékelésére. A disszertáció formai sajátásaival kapcsolatos kritikai megjegyzéseket, az általános tartalmi javaslatokat, kezdve a metodikai rész kifogásolt szakaszaiban csakúgy, mint a bírálat végén található „Apró megjegyzések” szakaszban foglaltakat természetesen maradéktalanul elfogadom. Utólag újraolvasva a szöveget ma már én is bizonyára sok dolgot másképpen szövegeznék, szerkesztenék.

Kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

1. A sejtek a preparálást követően idővel jelentős változáson mennek keresztül. Ezeket a változásokat a pályázó gondosan meg is vizsgálta, leírta. Nem találtam ugyanakkor olyan adatokat, amelyek arra vonatkoznának, hogy a tárolási körülmények módosulásával hogyan változik a sejtek zsugorodása...

A disszertáció ezen, metodikai kérdésekkel foglalkozó részében a közvetlen cél az volt, hogy az általunk (és más munkacsoportok által is) már évek óta alkalmazott tárolási eljárás megbízhatóságát, illetve megbízhatóságának határait teszteljük. Nem végeztünk szisztematikus összehasonlító vizsgálatokat más tárolási módszerek egybevetésével, illetve nem teszteltünk módosított eljárásokat annak érdekében, hogy az időhatárokat kiterjesszük. Mivel feltételezhető volt, hogy a frissen izolált szívizomsejtek a tárolás során a megváltozott környezet hatására megváltoztatják tulajdonságaikat, kezdetben csupán a magunk számára szerettük volna megismerni a tárolás alatt bekövetkező változások időviszonyait. Amikor már elegendő tapasztalat birtokában voltunk, ezeket az ismereteket meg akartuk osztani a tudományos közösséggel, így került sor a publikálásra is. Szeretném itt megjegyezni, hogy az izolált szívizomsejteket sok munkacsoport expressziós modellként használja, mely esetben a mérések végrehajtására az izolálást követő 24-48 órát követően kerül leghamarabb sor. A tárolás időviszonyai tehát több szempontból is fontosak. A bíráló által említett paraméterek - puffer, hőmérséklet – biztosan nagy jelentőséggel bírnak ebben a kérdésben. Korábbi, nem publikált megfigyelésünk szerint például a sejtek túlélését jelentősen javítja, ha a tároló oldatban bikarbonát ion található. Tapasztalataink szerint az optimális tárolási hőmérséklet 14-15 °C. Hangsúlyoznom kell azonban, hogy ezek munkacsoportunkban a hosszú évek alatt szerzett tapasztalatok és nem publikált, tehát szakszerű bírálaton átesett eredmények.

2. A sejtek kísérletes vizsgálata során gondot jelentett a megvilágító fény által kiváltott fototoxicitás...

A fototoxicitás oka igazából az indikátorok alacsony kvantumhatásfoka, ugyanis emiatt kell nagy megvilágítási intenzitással dolgozni. Az indikátor sejten belüli koncentrációjának emelésével ezen valamelyest lehet segíteni, de ekkor a puffer hatás erősödik, ami ugyancsak nemkívánatos jelenség. Az általunk gyakran alkalmazott Fura-2 például kiválóan alkalmas két-foton technikára, ennek kapcsán utalnék Parades és mtsai 2008-as publikációjára a Methods-ban. Véleményem szerint azonban a valódi előrelépést a nagyobb kvantumhatásfokú festékek jelenthetik, mint például a Calcium Green-1, vagy az Oregon Green. Ezen új generációs festékek további előnye, hogy a gerjesztésük nem az UV tartományban

történik, hanem a látható sávban, ami szintén komoly előny. Természetesen semmi sincs ingyen, ezeknél a festékeknel ugyanis az excitációs-emissziós sávok átfedése jóval nagyobb, mert a csúcsok közelebb vannak egymáshoz ami további technikai nehézségeket okoz.

3. A 8. és 9. ábrán az áram feszültségfüggése esetenként hurkot ír le (C panelek). Mit jelent ez a függés, hogyan kell értelmezni a hurok megjelenését?

Az Akciós Potenciál Clamp technikával rögzített áramok feszültség-áram karakterisztikáján jelentkező hurok minden esetben arra vezethető vissza, ha az akciós potenciál lefutása nem monoton, hanem a feszültségváltozás a csúcsot követően legalább egyszer irányt vált. Ilyen történik például az epikardiális sejtek incisurája során, vagy korai-, illetve késői utódepolarizáció miatt. A disszertációmban tárgyalt mérési adatok esetében a feszültség-áram karakterisztikákon megjelenő hurkok minden esetben epikardiális sejtek incisurájának a következményei.

4. A szerző megállapította, hogy az ioncsatornák aktiválásában az akciós potenciál amplitúdójának van fontos szerepe, annak hossza sokkal kevésbé számít. Mit jelent ez, milyen molekuláris szabályozási folyamatok állhatnak a megfigyelés hátterében?

Bár a kérdésben szereplő megállapítást konkrétan a késői egyenirányító kálium áramok kapcsán tettem, úgy vélem, hogy a következtetés a többi általunk vizsgált ionáram esetében is indokolt. Ennek a megfigyelésünknek szerteágazó következményei vannak:

1. A kardiológiában használt gyógyszerek egy része az ioncsatornákra hatva megváltoztatja az akciós potenciál alakját, melynek következményeként megváltozik a többi, közvetlenül nem érintett ionáram aktivációja/inaktivációja is. Ezeket a változásokat a gyógyszerek hatásának értelmezésekor figyelembe kell vennünk. Fenti következtetésünk értelmében egy szer valamely ioncsatornán elsődlegesen hatva annál erősebb másodlagos ioncsatorna hatásokkal rendelkezik, minél inkább megváltoztatja az akciós potenciál amplitúdó paramétereit. Az akciós potenciál nyújtása, rövidítése kevesebb tovaterjedő hatást vált ki.
2. A kísérletes elektrofiziológia egyik legellentmondásosabb területe az egyes farmakonok hatásának jellemzése. A disszertációmban többször is megjelenő I_{Ks} gátló Chromanol 293B nevezetű drog alkalmazása esetén például egyes szerzők akciós potenciál nyújtó hatásról számoltak be, míg mások ilyen hatást nem láttak. Ez egy nagyon komoly ellentmondás, amelynek feloldására a kutatók elsődlegesen a kísérleti feltételek különbségét szokták felhozni. Véleményünk szerint az eltérő kísérleti körülmények fontossága vitathatatlan, de ezek egyetlen közös ponton, az akciós potenciál plato magasságán keresztül fejtik ki hatásukat. Ha ugyanis a plato magas, akkor az I_{Ks} erőteljesen aktiválódik, ezért gátlása az AP jelentős nyúlását fogja okozni. Alacsony platojú AP esetén az áram aktivációja minimális, így kikapcsolása nem változtatja meg jelentősen az AP hosszát.

5. A 23. ábra ismerteti azokat az eredményeket, amelyeket a szerző a különböző szív régiókból származó sejtekkel kapott. Ezek az én szemem számára legfeljebb csak minimális különbségeket mutatnak...

Maximálisan egyetértek a bírálóval a kérdésben megfogalmazott megállapítását illetően, vagyis abban, hogy az egyes vizsgált sejttypusokban (ENDO, MID EPI) az AP hossza az áram aktivációjában hasonló jellegű változásokat okozott. Azon, hogy az AP nyújtásakor a MID miokardiális sejtek esetében megfigyelt másfélszeres növekedéssel szemben az ENDO sejteken megfigyelt 2.2-szeres növekedés minimális

különbség-e, ahogy a bíráló azt megítélte, avagy jelentős, nyilván hosszasan lehetne vitatkozni. Ami azonban szerintem itt igazán fontos az az, hogy mind az 1.5, mind a 2.2 elmarad plato magasság megváltoztatásakor kapott nagyjából négyszeres növekedéstől. Ez pedig az előző pontban megbeszélt következtetésünket erősíti meg, vagyis azt, hogy az I_{Ks} aktivációját elsősorban az akciós potenciál amplitúdó értékei és nem a hossza határozza meg. Magam is úgy gondolom, hogy az egyes sejtípusok közötti eltérést az eltérő akciós potenciál profilok okozzák. Válaszolva a kérdésben szereplő második felvetésre, „Milyen eredmények születnének egy ilyen mérés során akkor, ha az alkalmazott parancsjelek nem egy-egy sejtípus saját reprezentatív akciós potenciáljai lennének, hanem mind a három szívterület esetében ugyanaz a parancsjel kerülne alkalmazásra?”, utalni szeretnék a 6.3.1.1 pontban, illetve a 7. ábrán bemutatott eredményeinkre, amely szerint az $I_{Ca,L}$ profilját nem a sejt szívizmon belüli helye, hanem az akciós potenciál alakja határozza meg. Bár ez a következtetésünk a disszertációban kizárólag az $I_{Ca,L}$ kapcsán kerül megfogalmazásra, úgy vélem, a többi ionáramra is kiterjeszthető.

6. A „spark”-ok kialakulásának vizsgálata során a szerző megmutatta, hogy egy „spark” 2µm-es környezetében egy másik „spark” kialakulásának a valószínűsége megnő, azaz kapcsolás van a kialakuló „spark”-ok között. Vannak olyan környezeti feltételek, amelyek mellett ez a kapcsolás odáig erősödhet, hogy kalcium hullámok alakulnak ki?

Röviden: igen. Azok a hatások például, amelyek a szívizomsejtben akár a kalcium belépés fokozását (calcium overload), vagy a sarcomere hossz csökkenését eredményezik, megnövelik a kalcium hullámok kialakulásának valószínűségét. Ezzel a problémával több publikációnkban is foglalkoztunk, minthogy azonban nem kapcsolódik a koordináció problémaköréhez, ezek az eredmények a disszertációmban nem szerepelnek.

7. A kalcium hullámok kialakulásának a lehetősége a dolgozatban a 12. oldalon felvetődik olyan összefüggésben, ahol a kialakulásuk károsnak mutatkozott és ritmuszavarhoz vezetett.

Ennek a kérdésnek a felelős megválaszolásához szükségünk lenne annak biztonságos ismeretére, hogy pontosan mi is jó a szívnek? Első megközelítésben vélmezhetjük, hogy a szívizomzat koordinált kontrakciójához a szívizomsejtben a kalcium felszabadulást minél pontosabban szinkronizálni kell, tehát a sejten belül tovaterjedő kalcium hullám vélhetőleg „rossz”, a kontrakció szabályozása szempontjából előnytelen. Ami a szívizomsejtnek „jó”, az egy akciós potenciál által szinkronizált módon, az egész sejt térfogatában homogén módon levezényelt kalcium tranzienst. Nem szabad azonban megelégednünk arról, hogy a kalcium hullámok kiváltó oka, az esetek egy részében legalábbis, a sarcoplasmaticus reticulum kalcium túltöltődése. Amennyiben egy ilyen túltöltött SR-ből spontán felszabaduló kalcium csomag indítja el a kalcium hullámot, akkor ez lehetőséget ad a nátrium/kalcium cseremechanizmus számára, hogy ebből a spontán felszabadult kalcium mennyiségből valamennyit eltávolítson a sejtből. Igaz, hogy ezalatt a membránt depolarizálja, ami utódepolarizációt, esetleg triggerelt akciós potenciált válthat ki, de a spontán kalcium felszabadulás egyfajta biztonsági szelephez hasonlóan csökkenteni fogja a „calcium overload”-ot.

8. A leírásból (85. oldal) nem világos, miért volt fontos azt a feltételt alkalmazni a „spark”-ok tanulmányozása során, hogy a $\Delta F/F_0$ értéke legyen nagyobb, mint 0,2...

Ezt a kritériumot a sparkok alakjának becslése során alkalmaztuk. Erre azért volt szükség, hogy az alakot nagyobb biztonsággal határozhassuk meg. Alacsonyabb spark amplitúdó esetén a mindig jelenlévő zaj megnövelte volna a spark határának detektálási bizonytalanságát. Az úgynevezett szupermikroszkóppal kollaborációs partnereink két éve kezdtek méréseket végezni a UC Davis-en. Egyelőre eredményekről

nem tudok beszámolni, de a technikai problémák között sajnos ott van a korábbiakban már érintett fototoxicitás.

9. Az ionáramok szerepét az akciós potenciál lefutása során számos paraméter függvényében vizsgálja és leírja a dolgozat. Hogyan függenek ezek az ionáramok attól, hogy milyen állapotban van a sejtmembrán...

A sejtmembrán mindenkori állapota ismert módon jelentős szereppel bír az ioncsatornák funkciójának meghatározásában. Az állapotváltozók között kiemelt jelentősége van a hőmérsékletnek, vagy a membrán lipidösszetételének, amelyek többek között a fluiditást is befolyásolják. Az elektrofiziológusok között jól ismert, hogy az ionáramok paraméterei már egyetlen Celsius fok hőmérsékletváltozásra is mérhető módon megváltoznak. Saját vizsgálataink erre a területre nem terjedtek ki, de a probléma súlyát mutatja, hogy standard metodikai kritériumként a méréseink során az elvárt hőmérséklet stabilitást fél fokban szoktuk meghatározni.

10. És végezetül; megjelennek-e a szarkomerek geometriai tulajdonságai azokban az eredményekben, ahol a „spark”-ok gyakoriságát vizsgálta a pályázó...

A sarcomerek geometriai sajátságainak a sparkok tulajdonságaira gyakorolt hatását a disszertációban nem bontottam ki. Ezekben a vizsgálatainkban azt tapasztaltuk hogy a sarcomer hossz csökkenésével fokozódik a sparkoknak hullámokká történő összeolvadásának a valószínűsége. Ez a hatás különösen 1.6-1.8 μm távolságok között jelentős. Mi a konkrét szerkezeti elemek jelentőségét, szerepét nem vizsgáltuk, erre metodikailag nem is vagyunk felkészülve. Valószínűnek tartom azonban, hogy a kalcium diffúzióját a Ryanodine receptor környezete jelentősen befolyásolja, így a geometria megváltozása következtében fellépő átrendeződések alighanem funkcionális következményekkel is járnak.

Ismételten megköszönöm Opponensemnek a technikai részletek mélységéig átfogó bírálói munkáját és előremutató kérdéseit, melyek eredményeim új szempontból történő megvizsgálására készítettek. Köszönöm elismerő szavait és hogy értekezésem nyilvános vitára bocsájtását javasolta. Végezetül pedig kérem válaszaim elfogadását!

Debrecen, 2016. december 08.



Dr Bányász Tamás
Egyetemi Docens
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet