

Válasz Dr Szokodi István MTA Doktora

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

bírálatára

Köszönöm Dr. Szokodi István MTA doktornak, hogy értekezésem bírálatát elvállalta és elvégezte. Köszönöm részletes és szisztematikus értékelését és kritikai megjegyzéseit, melyekre az alábbiakban a kérdések sorszámának megfelelően reagálok.

1. Kamrai szívizomsejtek ionáramait vizsgálva igen jelentős sejt-sejt közötti eltéréseket tapasztaltak, ugyanakkor az akciós potenciálok jellemzői kis szórást mutattak....

Az ionáramok amplitúdóinak nagy varianciája és az akciós potenciál paraméterei közötti viszonyt kizárólag tengerimalacon tanulmányoztuk. Csak ezen a fajon végeztünk szisztematikus statisztikai módszerekkel történő összehasonlításokat, tehát válaszat kísérleti adatokkal csakis tengerimalacra vonatkozóan tudom alátámasztani. Egyszerű matematikai levezetéssel megmutatható, hogy egy adott akciós potenciál igen sokféle nagyságú ionáram kombinációval létrehozható. Ismert az is, hogy ha összevetjük az egyes kutatócsoportok közleményeiben látható ionáramok nagyságát, akkor azonos fajon belül is jelentős különbségeket fogunk látni az egyes ionáramok nagyságában. Tengerimalacon végzett vizsgálataink során mi azt találtuk, hogy egyes ionáramok nagyságát összehasonlítva a sejtek közötti variabilitás akár egy teljes nagyságrendnyi is lehet. Természetesen mindez úgy, hogy az akciós potenciálok paraméterei jóval kisebb különbséget mutattak. A szekvenciális akciós potenciál clamp technikánk segítségével meghatározhattuk és összevethettük az ionáramok nagyságának egyetlen sejten belüli arányait. Azt tapasztaltuk, hogy bár a depolarizáló és a repolarizáló áramok összege viszonylag jól korrelál egymással, ezen belül már jelentős varianciák figyelhetők meg. Az egyes sejtekben például, ahogy erre a bíráló a hatodik kérdésében rá is kérdez, jelentősen eltérhet a késői egyenirányító áram gyors és lassú komponense nagyságának viszonya, természetesen alig, vagy nem különböző akciós potenciál paraméterek mellett. A jelenség hátterében álló mechanizmusokat illetően jelenleg csak találgatni tudunk. A legvalószínűbbnek az látszik, hogy az eltérő ionáram amplitúdókat eltérő csatorna sűrűségek okozzák. Ezzel a fajta sejt-sejt variabilitással napjaink szív elektrofiziológiája még egyáltalán nem számol, a matematikai modellek például szigorúan homogén áramsűrűség viszonyokra alapulnak. De ugyanígy, a klinikai farmakológiában sem kapott még helyet ez a koncepció, a klinikai gyakorlat is annak megállapítására szorítkozik csupán, hogy az egyes betegek a különböző gyógyszerekre eltérő mértékben reagálnak. Az eddigiektől eltérően a regionális különbségek, mint a transmuralis, vagy csúcs-bázis irányban megfigyelhető áramdenzitás különbségek jól ismertek, azok hátterében eltérő csatorna expresszió áll.

2. Az értekezésben a Jelölt összefoglalóan írt az antracén-9-karboxilsavval (ANTRA) gátolható klorid áramokról

Minthogy az áram lefutásának meghatározására ANTRA-t használtunk, ANTRA érzékeny klorid áram alatt a kalcium érzékeny klorid áramot értjük. A névhasználatunk oka az akciós potenciál clamp technikában elterjedt hagyomány, miszerint az áramokat a használt gátlószer szerint nevesítjük. Ebben egyfajta

önkritika van, arra az esetre, ha a gátlószer nem lenne eléggé szelektív és nemcsak a kívánt ionáramot metszené ki, hanem valami egyébét is. Így L-típusú kalcium áram helyett használjuk a Nifedipine érzékeny áram elnevezést, vagy mint esetünkben, kalcium érzékeny klorid áram helyett az ANTRA érzékeny áramét. A kézirat elkészültekor ezen két elnevezés mögött álló áram azonosságát még nem igazoltuk egyértelműen, de azóta munkacsoportunk folytatta ez irányú vizsgálódásait, s ma már kijelenthetjük, hogy több független bizonyíték is van a kezünkben. Ugyancsak tanulmányoztuk a bíráló által kért L-típusú kalcium áram és Na/Ca cseremechanizmus moduláló hatását is. Ez a kérdéskör kívül van disszertációm fókuszán, de azt tudom mondani, hogy a sejt kalcium dinamikájára, illetve annak változására a klorid áram igen érzékenyen reagál, mindig hűségesen követve a sejt plazma pillanatnyi kalcium koncentrációját.

3. Izoproterenol előkezelés után az ANTRA fokozta a késői utódepolarizációk kialakulásának esélyét. Ugyanakkor, ouabain előkezelést követően az ANTRA jelenlétében mind a késői, mind a korai utódepolarizációk kialakulása megfigyelhető volt....

Hasonlóan az előző problémához, ennek a kérdésnek a megválaszolása is a disszertáció benyújtása óta tett megfigyeléseink révén lehetséges. Mindenekelőtt szeretném leszögezni, hogy az utódepolarizációk problémája a szív elektrofiziológiájának egyik legbonyolultabb, legellentmondásosabb területe. Először is, a korai és késői utódepolarizációk elválasztása egy erősen szubjektív, fenomenológiai osztályozáson alapul. Konkrétan, a határt annak alapján vonjuk meg, hogy az utódepolarizáció kialakulását megelőzően a membránpotenciál elérte-e a nyugalmi potenciál értékét. Ez az első hallásra igen egyszerű kritérium egyértelmű elkülönítést tesz lehetővé egy plato közeli korai utódepolarizáció és egy késői utódepolarizáció között, azonban jóval kevésbé lesz egyértelmű, ha egy harmadik fázis végén jelentkező utódepolarizációval van dolgunk. Az ma már általánosan elfogadottnak tekinthető, hogy mindkét utódepolarizáció típusban jelen van a kalcium homeosztázis zavara. Ha az utódepolarizációt ouabainnal váltjuk ki, esetleg ANTRA-val kombinálva, akkor úgy tűnik, hogy ez a homeosztázis zavar a szív ciklus bármely pontján képes spontán kalcium felszabadulást, s ennek révén depolarizációt kiváltani. A kalcium homeosztázis szempontjából az izoproterenol valószínűleg ezzel sok hasonlóságot mutat. Nagy különbség azonban, hogy az izoproterenol emellett jelentősen fokozza a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensének, az I_{Ks} -nek az amplitúdóját. Ahogy ezt egy közleményünkben megmutattuk, az amplitúdó akár a kontroll érték 20-szorosára is nőhet. Valószínűnek tartom, hogy ez az erős repolarizáló áram tartja féken a korai utódepolarizációkat a plato feszültségértékein izoproterenol kezelést követően, ellenben hatástalan a késői utódepolarizációkra a nyugalmi membránpotenciál értékénél, ahol a kálium elektrokémiai gradiense közel nulla.

4. Az ANTRA-érzékeny Cl^- csatornák kifejeződése illetve a I_{Cl} miként változik kóros körülmények között a szívben?

A klorid csatornák, illetve áramok kapcsán ismereteink jóval elmaradnak a kation csatornákétól. Ennek részben technikai okai vannak, ugyanis nagyon kevés nagy szelektivitású klorid csatorna blokkoló ismert, ezek nélkül pedig az elektrofiziológus lehetőségei igencsak korlátozottak. Az valószínű, hogy a klorid csatornák működésének megváltozása kisebb-nagyobb mértékben kihat a szív működésére is, de ennek mértéke eléggé vitatott. Legyen szabad itt például egy nemrég megjelent review-t említenem, ahol a szerzők (Adkins és Curtis) megkérdőjelezték, hogy a kalcium aktivált klorid csatornáknak bármi patológiás szerepe lehet. Máshol, mint például egy Duan által jelzett összefoglalóban olvasható, hogy a kalcium aktivált klorid áram patológiás szerepét kizárólag a kalcium zavarok mediátoraként vetik fel. Ugyanakkor, meglehetősen régi az a megfigyelés, mely szerint a klorid áram hozzájárul az utódepolarizációk és ritmuszavarok kialakulásában fontos szerepet játszó I_{T1} -hoz. A szívelégtelenségben jelentkező kalcium homeosztázis zavarok okán is várható, hogy megváltozik a klorid áram dinamikája például kamrai

hipertrófiában, de ennek bizonyítása tudomásom szerint eddig még csak expressziós rendszerekben sikerült, in situ kamrai sejteken nem. A legérdekesebb azonban talán az a Kozłowski által felvetett lehetőség, mely szerint patológiás állapotokban (ischemia, fokozott fali terhelés) a klorid csatornák expressziója a kamrafalon belül inhomogénné válna és ezzel hozzájárulna az elektromos inhomogenitás, az elektromos diszperzió fokozódásához, amely a ritmuszavarok egyik előhírnöke szokott lenni. A kalcium érzékeny klorid áram patológiai megítélését meglehetősen megnehezíti, hogy a csatornafehérje, illetve a gén beazonosítása még nem tekinthető véglegesen lezártnak. Talán elég, ha itt megemlítem a bestrophinok különböző típusait, vagy a TMEM16 fehérjét. A többi klorid áram, mint a CFTR, vagy a cAMP és duzzadás aktiválta klorid csatornák kapcsán ismereteink valamelyest bővebbek.

5. A 28. ábra szerint, bikarbonát ion hiányában (Tyrode oldat) az akciós potenciál megnyúlása volt megfigyelhető. Izolált sejtekkel összevetve, multicelluláris preparátumokon ez a hatás markánsabb volt. Mi lehet a magyarázata ezen jelenségnek?

Az izolált sejteken és a szöveteken mért akciós potenciál paraméterek között több különbség is megfigyelhető, de a legszembetűnőbb mégis a dinamikus válaszok eltérése, például az izolált sejteken megfigyelhető jóval nagyobb beat-to-beat variabilitás, vagy a multicelluláris preparátumok eltérő válaszüze frekvencia váltás esetén. A különbségek valószínű oka az extracelluláris tér eltérő nagyságában lehet. Multicelluláris preparátum esetén a sejtek közötti tér, amit első közelítésben extracelluláris térnek nevezhetünk, a sejtek térfogatának töredéke csupán. Mi sem utal jobban ennek a térnek a kicsiny voltaára mint az, hogy a szakzsargon a szívizomsejtek közötti teret gyakran hasadéknak, angol szóval cleft-nek nevezi. A kis térfogat egyrészt diffúziós szempontból limitáló tényező, másrészt valószínűsíthető, hogy az ionösszetétele is jelentősen változhat eltérő működési viszonyok között. Azt például több matematikai modell is számításba veszi, hogy emelkedő frekvencia esetén a kálium akkumulálódhat az extracelluláris térben. Ezzel szemben az izolált szívizomsejt extracelluláris tere, ami megfelel a kísérleti kád teljes térfogatának, a szívizomsejt saját térfogatához képest végtelenül nagy, diffúziós és puffer kapacitása kimeríthetetlen bármilyen működési feltétel esetén.

6. A 32. ábra szerint, az $I_{Ca,L}$ által az AP alatt szállított töltésmennyiség egyértelműen korrelált az I_{Ks} által közvetített töltésmennyiséggel, míg az I_{K1} illetve az I_{Kr} esetében hasonló összefüggés nem állt fenn.

A problémával több, a disszertáció lezárását követő publikációnkban foglalkoztunk. Tapasztalataink szerint a β -stimuláció igen jelentősen átrendezi a kálium áramok egymáshoz viszonyított, avagy relatív nagyságát. β -stimuláció hiányában például a késői egyenirányító kálium áram lassú komponense, az I_{Ks} egy, a mérés határt alig két-háromszorosan meghaladó áram, melynél a gyors komponens, az I_{Kr} majd egy nagyságrenddel nagyobb. Míg azonban az I_{Kr} β -stimulációra nem reagál, az I_{Ks} amplitúdója, illetve az általa szállított töltésmennyiség több mint hússzorosára is növekedhet. A két áram nagyságának viszonya tehát megfordul. Ez akut hatás, amennyiben a β -stimuláció kezdetétől számított 1-2 percen belül kialakul és tetőzik is. Hosszútávú hatást vizsgáló munkáról nem tudok, de ismerve a catekolamin receptorok stimulációt követő jelentős deszenzibilizációját, valószínűleg izgalmas és klinikai szempontból is érdekes ez a kérdés.

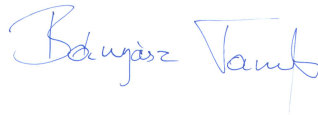
7. A Jelölt mely felismerését tartja biológiai tekintetben a legjelentősebbnek, illetve a potenciális terápiás hasznosíthatóság szempontjából a legígéretesebbnek?

Ha egy és csakis egy eredményt nevezhetek meg, és a potenciális terápiás hasznosíthatóság kiemelt szempont, akkor a disszertáció új megállapítások fejezetének 13-as pontjában taglalt megfigyelésünket emelném ki, mely szerint a késői egyenirányító áram lassú komponense kicsiny volta ellenére az akciós

potenciál repolarizációjában igen jelentős szerepet játszik. Úgy gondolom, hogy azon megfigyelésünk, mely szerint az áram amplitúdóját elsősorban az akciós potenciál plató magassága és nem a hossza szabályozza, egy jelenleg még nem kellő súllyal kezelt tulajdonsága ennek az áramnak. Ezt annál is inkább fontosnak érzem, mert amint azt azóta publikált eredményeink megmutatták, az áram amplitúdója megfelelő körülmények között igen jelentősen megnövekedhet.

Ismételten megköszönöm Opponensem részletes és kritikus bírálói munkáját és az izgalmas kérdéseket, melyek eredményeim újragondolására készítették. Köszönöm pozitív állásfoglalását 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