

# **Tóth András „Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ homeosztázisváltozások hatásainak elemzése izolált szívpreparátumokon” c. MTA Doktori értekezésének bírálata**

A sejtfunkciót meghatározó életfontosságú ionok közül a  $\text{Ca}^{2+}$ -nak különösen a szívizomsejtek fiziológias működésében kiemelkedő kulcsszerepe van és így a különféle szívbetegségek (iszkémia, szívelégtelenség, aritmiák) kóroktana a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis valamilyen zavarára vezethető vissza. A térben és időben elkülönült, integrált, de azért több szinten differenciált  $\text{Ca}^{2+}$ -függő élettani részfolyamatok elemzése, modellezése és farmakológiai befolyásolása gyógyszer-jelölt vegyületekkel ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kicserélő, NCX gátlók) képezi a disszertáció tárgyát. Ennek alapján Tóth András téma választását rendkívül aktuálisnak tartom mind alapkutatók mind a klinikum szempontjából.

A szegedi Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetben a kardiovaszkuláris farmakológiai kutatások nagy hagyományokkal rendelkező és kimagasló nemzetközi tekintélyű iskolája működik. A Szerző ennek az iskolának tagjaként az optikai mérés technikai laboratórium vezetőjeként, az utóbbi 10 év kísérleteinek eredményeit foglalja össze a benyújtott MTA Doktori disszertációjában.

A szerző célkitűzései négy kérdéskört érintettek, nevezetesen : a  $\text{Ca}^{2+}$ -i markáns változásának van-e hatása a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő repolarizáló  $\text{K}^+$  áramokra?; a szelektív  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kicserélő (NCX) gátlásnak van-e szignifikáns befolyásoló hatása a  $\text{Ca}^{2+}$ -i háztartásra és a kontraktilitásra?; az egyes szívbetegség modellekben a  $\text{Ca}^{2+}$ -i háztartás zavara által indukált aritmiák kialakulása ellen jelenthet-e az NCX részleges gátlása terápiás perspektívát?; izolált perfundált szívben reperfüziós aritmiákkal szemben a két kicserélő (NCX+ $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kicserélő, NHE) kombinált gátlásával fokozható-e az antiaritmiás hatékonyság?

Célkitűzéseinek elérésére a Szerző a legkorszerűbb metodikák (optikai mérés technika, transzmembrán akciós potenciál és elemi ionáram mérések, immunhisztokémiai, biokémiai, iszkémia modell stb.) arzenálját alkalmazta.

A szöveg stílusát gördülékenynek tartom. Az értekezés ötvözi az átfogó gondolatvezetést az alapos, szisztematikus részletekre kiterjedő kísérleti tervezéssel. A disszertáns beavatja az olvasót abba az intellektuális folyamatba, mely az izgalmas kutatást kísérte, nem hallgatva el esetleges kétségeit, kételyeit sem.

## **Részletes megjegyzések**

Az értekezés 160 számozott oldalt és 58 ábrát tartalmaz, formailag megfelel az MTA Doktori Szabályzat követelményeinek. A szöveges rész jól érthető, a fogalmazás világos. Az ábrák jól demonstrálják és megfelelően egészítik ki a szöveges részt. Az ábrák nagy részének minősége jó, de néhány ábrán a kis méret, illetve a nem megfelelő, vagy rosszul látható szimbólumok alkalmazása zavarja az áttekinthetőséget (például a 15., 19. ábra).

A disszertáció szerkezetileg 9 részre tagolt (bevezetés, irodalmi áttekintés, célkitűzések, módszerek, eredmények, megbeszélés és következtetések, új tudományos eredmények, hivatkozások, saját közlemények). A téma hatalmas könyvtárnyi, néha ellentmondásos irodalmának az olvasó számára tanulságos feldolgozása és a legkorszerűbb metodikák részletes ismertetése után, vizsgálatait alapvetően 4 témakörben, 3 fejezetben foglalja össze, melyből kiemelendők tartom azokat az eredményeit, amelyek fizioiógias és szívbetegségeket modellező körülmények között, az NCX gátlásra vonatkoznak. Mondanivalóját 559 irodalmi hivatkozással támasztja alá. Az értekezés 9. fejezete tartalmazza a jelölt 9 db., a disszertáció alapját képező első vagy utolsó szerzős közleményét, illetve a rokon témájú, de nem a disszertáció anyagához tartozó 9 dolgozatát, továbbá 1982-ig a teljes publikációs listát. A disszertáció anyagához kapcsolódó jelentős nemzetközi folyóiratban megjelent teljes cikkekben a jelölt első vagy utolsó szerzőként szerepel. A fenti, valamint a mellékletben megadott scientometriás adatok egyértelműen jelzik Tóth András kimagasló tudományos aktivitását és munkásságát, amellyel egyben eleget tesz az MTA doktori cím odaítéléséhez szükséges követelményeknek.

### **Az értekezés érdemi részét nem érintő kérdések, észrevételek**

1. Az alacsony konduktanciájú  $\text{Ca}^{2+}$  függő  $\text{K}^+$  áram ( $I_{\text{SK}}$ ) irodalmi áttekintésében a szerző is említi, hogy az SK csatornaizozformái elsősorban pitvarban expresszálódnak, érdekelne, hogy a 61. oldalon bemutatott SK2 csatornaprotein expressziós vizsgálatát (14. ábra) miért nem pitvaron végezték?
2. A 18. és 19. ábránál a kontrol és apamin görbék jelzése nem megfelelő, nem elkülöníthető egymástól.
3. A 25. és a 26. ábrán látható a 10 M  $\text{BaCl}_2$  által indukált  $I_{\text{K1}}$  gátlás APD nyújtó hatásának  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  függése kutya, illetve egészséges humán jobb papilláris izmában. Míg a kutya preparátumon mind a normál (2 mM) mind a magas (4 mM)  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  mellett a  $\text{BaCl}_2$  okozta APD<sub>90</sub> megnyúlás szignifikánsan nagyobb volt, humán készítményen a  $\text{BaCl}_2$  indukált APD<sub>90</sub> megnyúlás csak 4 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  esetében volt szignifikáns. Ugyanakkor a szerző a 69. oldalon kimutatta, hogy a  $\text{BaCl}_2$   $\text{Ca}^{2+}$ -függő szignifikáns trianguláció növekedést is kiváltott, ami arra mutatna, hogy az  $I_{\text{K1}}$   $\text{Ca}^{2+}$ -függő növekedése erőteljesebben következne be az APD<sub>25</sub> a platót is magában foglaló fázisban, mint az AP terminális fázisában. Ez azonban elég szokatlan, figyelembe véve az  $I_{\text{K1}}$  feszültségfüggő karakterisztikáját és meghatározó szerepét elsősorban az AP terminális fázisában. Miután a szerző a legfontosabb repolarizáló áramok ( $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{Ks}}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -függő redistribúciójának vizsgálatában (27 ábra) igazolta, hogy ezek az áramok nem játszanak szerepet a magas  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  APD rövidítő hatásában, érdekelne, hogy milyen magyarázat lehetséges a fenti triangulációval kapcsolatos kérdésemre?

A megbeszélés fejezet 110 oldalán a szerző kielégítő magyarázatot ad a  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  emelés által okozott AP trianguláció fokozódásra.” Az LT Ca csatornák felgyorsult  $\text{Ca}^{2+}$ -függő inaktivációja az AP plató fázisa alatt a magas  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  AP rövidítő hatásának ismert mechanizmusa, melyet eredményeink is igazolnak”, de véleményem szerint továbbra is adós marad a  $\text{BaCl}_2$  indukálta fokozott trianguláció magyarázatával, vagyis az  $I_{\text{K1}}$  plató fázis alatti feltételezett szerepével.

4. A 78. oldalon a 35. ábránál a keretben elírás történt, mert az ATX-II helyett a SEA0400 szerepel.

5. Az irodalmi áttekintés 30. oldalán a szelektívebb NCX gátlók tárgyalásánál kitűnik, hogy az ORM10103 vegyület elég alacsony koncentrációban (ED<sub>50</sub>= 780-960 nM) gátolja a befele/kifele irányuló I<sub>NCX</sub>-t és még 10 μM sem befolyásolja a többi ionszatornát. Kérdésem, hogy ez esetben, a kísérleteikben miért 10 μM –os koncentrációt alkalmaztak?

6. Az irodalmi áttekintés 29. oldalán a KB-R7943 és a SEA0400 farmakológiájának összehasonlításakor a KB-R7943-t a legszelektívebb reverz NCX gátlóként jellemzi. Nem jelölt szívsejten a reverz/forward arányt 20:1-nek (IC<sub>50</sub>: 0,3/17μM) adja meg. A SEA0400 7.5-14 x hatékonyabb, mint a KB-R7943 tengerimalac kamrarsejten az NCX reverz transzport vonatkozásában (IC<sub>50</sub>: 32-40/265-457 nM). Ugyanakkor kutya kamrarsejten a SEA0400 és a KB-R7943 NCX befele/kifele irányú gátlása 111/108nM, illetve 3.35/74,74 μM IC<sub>50</sub>-nel jellemezhető, vagyis kutyaszíven a KB-R7943 ellenkező irányú (befele) szelektivitást mutatott. Elképzelhető-e egy ilyen nagy species közötti különbség?

7. Az I<sub>NaL</sub> aktivációja alatti INCX kinetikai vizsgálata során a 43. ábra adatai alapján kitűnik, hogy a két NCX gátló a SEA0400 és az ORM10103 között az ATX-II alkalmazásakor az érzékeny áramok amplitúdója és kinetikája esetében jelentős eltérés mutatkozott és az ORM10103 esetében még a nettó töltések közötti szignifikáns különbség is jelentkezett. Kérdésem az, hogy a két gátló vegyület közötti fenti különbségek magyarázatára elégséges-e a SEA0400 I<sub>CaL</sub> gátló hatása, vagy egyéb mechanizmusok (más ionszatornák, stb) játszhatnak szerepet?

8. A 110 oldalon hibás irodalmi hivatkozás van a” Az LT Ca csatornák felgyorsult Ca<sup>2+</sup>-függő inaktivációja az AP plató fázisa alatt a magas [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> AP rövidítő hatásának ismert mechanizmusa (92), melyet eredményeink is igazolnak (485) ” mondatban , mert a 485-ös citátum Grandi és mtsai munkája.

9. Az NCX irodalmának alapos áttekintése után, valamint a disszertáció értékes, erre vonatkozó saját vizsgálatait és az azóta esetleg megjelent új NCX gátlók ismeretében, mit gondol a szerző lesz-e olyan vegyület, amelyik a preklinikai vizsgálatok után bekerülhet a gyógyszerfejlesztés klinikai fázisaiba?

10. A különböző NCX gátlók (SEA 0400, ORM10103) és az NHE gátló cariporid izolált perfundált patkányszívek poszt-iszkémiás, reperfüzió-indukálta aritmiáival szemben megnyilvánuló kardioprotektív hatását vizsgálták (54-58. ábra) és azt találták, hogy a legtöbb aritmiatípusban a cariporid fejtette ki a leghatékonyabb védő hatást, míg az ORM10103 csak mérsékelten hatott (VF, VT) . A cariporid és a fenti NCX gátlók együttes alkalmazásánál a potencirozás helyett váratlan eredmény, a védő hatás megszűnése következett be. A kombináció és a cariporid csökkenő hatékonyságára a szerző a megbeszélés rész 129. oldalán részletes és igen bonyolult magyarázattal szolgál és feltételezi, hogy további kísérletek hozzásegítenek az ellentmondás feloldásához. Tekintve, hogy a disszertációban említett NHE gátlók antiaritmiás hatékonyságára utaló irodalmi adatok nagy része patkányra vonatkozik, érdemes lenne a posztisztkémiás/reperfüziós kísérleteket kutya szíven megismételni.

11. A Szerző két modellen (LQT3 és szimulált iszkémia) meggyőzően bizonyította különböző NCX gátlók védő hatását Ca<sup>2+</sup>i túlterhelés okozta aritmogén változásokra, amikor gyakran a reverzNCX transzport túlműködéséről van szó és ezt a legtöbb irodalmi adat megerősíti. A

krónikus szívelégtelenségben bekövetkező  $Ca^{2+}$ -i homeosztázis zavarát a  $Ca^{2+}$ -i és  $Ca^{2+}$ SR csökkenése jellemzi, mely a forward NCX transzport fokozott működésének is lehet a következménye. Kérdésem az, hogy van-e irodalmi adat arra, hogy pl. kardiomyopatiás modellen, vizsgálták volna a NCX gátlókat?

12. Az irodalmi részben néhány formai hiba, következetlenség található. Számos citátumnál hiányzik az évszám, pl. ugyanannál a folyóiratnál, a Circ Res esetében (516-os és 517-os hivatkozás) néha szerepel, néha nem.

### **Új tudományos eredményként az alábbiakat emelném ki:**

1. A repolarizáló  $K^+$  áramok vizsgálata során mind kutya mind humán kamrai szívsejteken  $Ca^{2+}$ -i emelkedés indukálta  $I_{K1}$  növekedést mutatott ki, mely hozzájárult az aritmia készséget befolyásoló repolarizációs rezerv fokozódásához. Ugyanakkor az SK2 csatornaprotein kutya és patkány kamrasejten való expressziójának igazolása ellenére, a csatorna szerepét a fenti speciestek multicelluláris AP-ján nem sikerült bizonyítani, továbbá az apamin szenzitív (SK-) áram jelenléte sem volt kimutatható izolált kamra sejteken.

2. Normoxiás szívvezítésményeken a NCX gátlás hatását vizsgálva jelentős, speciestek közötti eltérést talált. Míg patkány kamrasejteken az NCX gátlás szignifikáns CaT amplitúdó és sejtrövidülés növekedést, valamint  $I_{CaL}$  amplitúdó csökkenést váltott ki, addig kutya kamrai szívsejteken nem okozott változást a fenti paraméterekben. Sikerült viszont kimutatni, hogy az  $I_{NCX}$ -re való gátlás hatékonyságát a  $Ca^{2+}$ -i növekedése csökkentette.

3. A részleges NCX gátlás lehetséges terápiás alkalmazását vizsgálva a  $Ca^{2+}$ -i homeosztázis zavarai okozta aritmiákban, több szívbetegség modellt állított be és bizonyította az NCX gátlók védő hatását a  $Ca^{2+}$ -i túlnövekedés okozta változásokban. Az LQT3 modellben alkalmazva a vizsgált NCX gátlók kivédtek az  $I_{NaL}$  aktivációja által kiváltott CaT amplitúdó és  $revI_{NCX}$  növekedést, valamint szignifikánsan csökkentették a forskolin indukálta  $fwdI_{NCX}$  fokozódást, anélkül, hogy a magas  $Na^+$ -i által indukált más paramétereket (APD megnyúlás, AP diszperzió növekedés stb.) befolyásolták volna. A másik, szimulált iszkémia/reperfúziós modell mindkét változatában (low flow és no-flow) az NCX gátlás csökkentette, illetve kivédte az I/R okozta változásokat (CaT amplitúdó növekedés,  $Ca^{2+}$ -iD emelkedés stb.).

4. Kimutatta, hogy izolált perfundált szíven alkalmazott regionális I/R okozta különböző aritmiák esetében az NCX gátlók csak igen mérsékelt védő hatást, tudtak kifejteni, míg az NHE gátló cariporid szinte minden aritmia típusban hatékonyan bizonyult. A NHE és NCX gátlók kombinációja, azonban váratlan eredményt, potencirozás helyett antiaritmiás hatékonyság csökkenést okozott.

### **Összefoglalás**

Tóth András disszertációja egy igen értékes, komplex kísérletes munka összefoglalója. A bemutatott eredmények az olvasót is továbbgondolásra készítetik, így a fenti kritikai megjegyzéseim nem érintik az értekezés érdemi értékét. Megfigyelései újszerűek, a levont következtetések mértéktartóak. Eredményeit színvonalas nemzetközi folyóiratokban közölte,

így a benyújtott értekezése mind tartalmi mind formai szempontból megfelel az MTA doktori fokozat megszerzéséhez szükséges előfeltételeknek.

**A fentiek alapján az MTA Doktori Tanácsának javasolom Tóth András MTA doktori értekezésének nyilvános vitára bocsátását, illetve sikeres védés esetén az értekezés elfogadását és az MTA doktori cím odaítélését.**

Budapest, 2016. október 12.

Dr. Kecskeméti Valéria  
Professzor emerita, kandidátus