

Tóth András – MTA doktori értekezés

„Intracelluláris Ca<sup>2+</sup> homeosztázis-változások hatásainak elemzése izolált szívpreparátumokon”

### Válasz Tóth Attila, PhD, MTA doktora opponensi véleményére

Először szeretnék köszönetet mondani Tóth Attila PhD, az MTA doktorának, hogy értekezésem bírálatát elvállalta és azzal behatóan foglalkozott. Köszönöm kritikus tartalmi és formai megjegyzéseit. Köszönetet mondok értékes és segítő észrevételeiért, elgondolkodtató kérdéseit és elismerő szavaiért a témaválasztás fontosságát, illetve a dolgozat szerkezetét, tartalmát, nyelvét és szerkesztési stílusát illetően. Köszönöm, hogy az elvégzett vizsgálatokat gondosan megtervezettnek, koherensnek, az alkalmazott módszereket korszerűnek értékelte.

#### A formai megjegyzésekre adott válaszaim.

A hosszú ékezetes betűk hiánya az ábrafeliratokban: ezt a bosszantó hibát sem az eredeti DOC file-ban, sem az általam használt „freeware” PDF-be konvertáló programmal létrehozott és feltöltött PDF file-ok ábrafelirataiban nem találtam meg, így valószínűleg a hibás nyomdai konverzió, vagy nyomtatás következménye; a korrekt nyomdai konverziót a dolgozat bekötött példányának átolvasásával külön is ellenőriznem kellett volna – ez sajnos elmaradt.

Tizedes pontok használata tizedes vesszők helyett: a kritika jogos – a tizedes vessző helyett szinte mindenhol az angol nyelvű publikációkban megszokott tizedes pontot használtam, amiért ezúton is elnézést kérek.

Szóközők: a kézirat többszöri átnézése és helyesírás-ellenőrzése ellenére mégis előfordul, hogy kimaradt a szám és mértékegység közötti szóköz.

Csak remélni tudom, hogy mindezek a pontatlanságok, bár kétségtelenül zavaróak lehetnek, nem nehezítik lényegesen az olvasó számára a szöveg megértését.

#### A továbbiakban részletezem a feltett kérdésekre azok sorrendjében adott válaszaimat:

1. *Az SK2 csatorna kimutatására használt antitest specificitása; a csatornák aktivitásának hiánya..*

Fontos leszögezni, hogy az irodalom mindmáig megosztott a szívizomsejtek SK csatornáival kapcsolatban. A KCNN2 csatornafehérjék jelenléte a pitvarokban, és a kamrákban általánosan elfogadott, funkcióképességük és aktivitásuk feltételei/körülményei vitatottak. A működésük ellentmondásaira vonatkozó fontosabb hipotéziseket a disszertációban ismerttettem – külön, és hangsúlyosan tárgyalva a cikkünk megjelenése *után* publikált irodalmi adatokat.

Az immunfluoreszcens és elektrofiziológiai mérések markánsan ellentmondó eredményeinek egyik lehetséges magyarázata, hogy az antitestekkel történő jelölés nem kellően specifikus – a mérésekhez a kereskedelmi forgalomban elérhető legjobb, specifikusnak mondott antitesteket használtuk – ugyanakkor nem állt módunkban bármilyen szinten vizsgálni, hogy az antitestek milyen további sejtstruktúrákhoz kapcsolódhatnak. Vizsgálatainkkal, a Xu és mts. (*J Biol Chem.* 2003) által közölt eredményekkel egybehangzóan, mi is kimutattuk az SK2-szerű csatornafehérje számottevő, valószínűleg celluláris membránokba lokalizált jelenlétét

mind kutya, mind humán kamrai szívizomsejtekben. Természetesen minden további nélkül elképzelhető, hogy az általunk használt antitest nem kötődött teljesen specifikusan. A kérdés végleges tisztázásához újabb kísérletek szükségesek, lehetőleg specifikus ellenanyagokkal.

AP méréseinkben elvileg hibát okozhatott az SK2 gátlószer nem kielégítő szelektivitása (bár az apamin máig az egyik legspecifikusabb SK gátlószernek számít), a más szervekben expresszált SK2 csatornáktól kissé, vagy nagyobb mértékben eltérő molekulaszervezet (erre vannak irodalmi spekulációk, de az egyértelmű bizonyítékok hiányoznak), a csatornafehérje szarkolemmába irányuló migrációjának esetleges defektusa, heteromer csatornák, stb.

További, nem elhanyagolható elvi lehetőség, hogy az SK2 csatornák – a  $K_{ATP}$  csatornákkal analóg módon – fiziológiás körülmények között nagyrészt inaktívak és csak meghatározott kóros körülmények között aktiválódnak. Ez a hipotézis egyre elfogadottabb; pitvarfibrilláció során a pitvari SK csatornák aktiválódása igazoltnak tekinthető. Krónikus szívelégtelenségben szintén valószínűsíthető a kamrai SK csatornák aktivációja. Magas frekvenciával stimulált kutya szívelégtelenség modellben, perforált patch clamp mérésekkel, kontroll szívben nem, csak elégtelen szívekben lehetett az APD apamin-indukált megnyúlását igazolni, amit inkább az SK3 és kevésbé az SK2 csatornák szívelégtelenség által indukált fokozott expressziója és aktivitása magyarázhat (Bonilla és mts., 2014). Az APD megnyúlás értéke korrelál a kezelés időtartamával. Az SK3 csatorna gátlás APD nyújtó és fokozottan aritmogén hatását elégtelen humán szívben is igazolták.

Patológias körülmények által indukált SK2 aktiváció lehetőségét mi is vizsgáltuk, csökkentett repolarizációs rezerv, illetve a patch pipetta segítségével megemelt  $Ca^{2+}_i$  szintek mellett, de az alkalmazott protokollokkal nem tudtuk az SK2 csatornák detektálható aktiválódását igazolni. Ezzel szemben az SR-ből felszabaduló  $Ca^{2+}$  elégségesnek bizonyult a kamrai SK csatornák aktiválásához (Terentyev és mts., 2013).

A bíráló utolsó állításával tökéletesen egyetértek, az elektrofiziológiai és immunhisztokémiai mérési adatok ellentmondásait jelenleg nem tudjuk egyértelműen feloldani (bár háttérükre nézve vannak hipotéziseink – lásd előbbieken). Mindazonáltal hangsúlyozni szeretném, hogy izolált (egészséges) szívizomsejteken, illetve multicelluláris szövetmintákon végzett méréseinket nagyon sokszor megismételve, SOHA nem kaptunk detektálható különbséget az apamin alkalmazása előtt és azt követően regisztrált AP-k morfológiáját és/vagy kinetikáját illetően. Ezzel szemben, érfalsimaizmon végzett szatellit méréseinkben hasonló dózisban alkalmazva, az apamin egyértelmű, jól mérhető változást indukált.

## *2. Lehetséges-e az SK és más ioncsatornák izolálás-okozta sérüléseinek becslése? Az apamin megfelelően penetrál-e a multicelluláris preparátumokba?*

Mivel az apaminos kísérleteket multicelluláris mintákon megismételve mérési eredményeink – az SK2 csatornák látszólagos működésképtelenségét igazolva - teljesen megegyeztek az izolált sejteken kapott eredményekkel, valószínűtlennek tűnik, hogy izolált kamrasejtekben az aktív SK2 csatornák hiánya visszavezethető lenne azok fokozott sérülékenységére a sejtizolálás során. Ami pedig az apamin penetrációjára vonatkozó nagyon fontos kérdést illeti, egyrészt multicelluláris mintákban – a konvencionális mikroelektród technika sajátosságaiból kifolyólag – a mérések szinte minden esetben a legfelső 1-3 sejtrétegben történnek, így a hatóanyag penetrációjával elméletileg sem lehet gond, a megszárt sejtekre az apamin valóban az alkalmazott koncentrációban hat. A feltételezést számos más hatóanyaggal ugyancsak multicelluláris szívizom-preparátumokon végzett vizsgálataink eredményei megerősítik. Másrészt az állítást az a megfigyelés is támogatja, hogy a kontrollként vizsgált,

hasonló falvastagságú erekben apamin hatására a vártnak megfelelő mértékű válasz jön létre. Ami az SK2 és más ioncsatornák enzimes izolálás során létrejövő sérüléseinek becslését illeti, ezzel a nagyon fontos elméleti és egyúttal gyakorlati problémával kapcsolatban, irodalmi adatok hiányában, spekulációkra vagyunk utalva. Különösen rosszul megválasztott izolálási protokoll, pl. túl magas enzimkoncentráció, nem megfelelő enzimösszetétel vagy túl hosszú emésztési időtartam alkalmazása esetén elvileg előfordulhat, hogy egyes csatornafehérjék fokozottan, mások kevésbé sérülnek. Ugyanakkor az is igaz, hogy a membránban található működőképes csatornák száma szinte minden csatornatípus esetén többszörösen meghaladja a fiziológias körülmények között ténylegesen aktiválódó csatornák számát, ezért legalábbis csökkent mértékű válaszra ilyenkor is számítani lehetne. Közel optimális emésztési protokoll alkalmazása esetén pedig valószínűtlennek tűnik, hogy egyes csatornafehérjék irreverzibilis károsodása lényegesen meghamisíthatná következtetéseinket. Mindazonáltal multicelluláris preparátumokon kapott eredményeink megerősítik izolált sejteken kapott eredményeinket.

*3. A mérések a legegészségesebb, túlélő sejteken történnek, és nem a fatális komplikációkért felelős „leggyengébb láncszem” sejteken. Van-e kiút ebből a zsákutcából?*

Ez a kérdés a kísérletes szívelektrofiziológia egyik kardinális kérdése, amire jelen ismereteink alapján nem tudunk megbízható választ adni. Az általánosan elterjedt, viszonylag egyszerű kísérleti módszerekkel azt az egyetlen sejtet (vagy sejtcsoportot) megtalálni, amely a fatális történés morfológiai alapját jelenti, szinte lehetetlen. A választ – ha mégis lesz valamikor – nem izolált sejt vagy egyszerű multicelluláris technikák alkalmazásával végzett vizsgálatok, hanem komplex, in situ mérések eredményei adhatják. Ezekben a nagyon nagy idő- és térbeli felbontással végzett, „3D mapping” mérésekben elvileg lehetőség van egyetlen, a többtől valamilyen szempontból eltérően viselkedő sejt lokalizációjára és ezen a sejten célzott elektrofiziológiai mérések elvégzésére. Bár ennyire komplex vizsgálatokat a ma elérhető mapping módszerek nem tesznek lehetővé, a metodikai fejlődés töretlen – és mi optimisták vagyunk. Ezen kívül a felvetett kérdés megválaszolásához segítséget nyújthatnak a gyorsan fejlődő in silico modellekből származtatott adatok is.

*4. Az  $I_{K1}$   $Ca^{2+}$ -függése, korai tranziens kifelé irányuló komponense,  $Mg^{2+}$  függésének jelentősége*

Az  $I_{K1}$  megfigyelt  $Ca^{2+}$ -függésének fiziológias jelentőségét meglehetősen nehéz megbecsülni. A kérdésre inkább egy általánosított véleménnyel válaszolnék. A  $Ca^{2+}$  eloszlására jellemző rendkívül nagymértékű térbeli és időbeli heterogenitások következtében az integratív módon meghatározott áram-, vagy feszültségváltozások információtartalma mindig limitált, hiszen a lokálisan kialakuló változások ennek sokszorosára tehetők. Ez az érvelés különösen érvényes az eleve jóval magasabb szubmembrán ionkoncentrációkra és azok változásaira. Igen jó példa erre az AP, hiszen az egyetlen AP alatt kialakuló  $[Na^+]_i$  változás elhanyagolható, praktikusan nem regisztrálható. Teljesen hasonló logikát alkalmazva valószínű, hogy a szarkolemma egyes kitüntetett területein – azokban a mikrodoméneknél, amelyek  $Ca^{2+}$  tartalma magas és gyorsan változik (pl. diádok) – a mérsékelt globális  $I_{K1}$  növekedéssel szemben a lokális  $I_{K1}$  változás viszonylag nagy lehet és fontos következményekkel járhat; a megnőtt lokális  $I_{K1}$  ugyanis kulcsszerepet játszhat a  $revNCX$  aktivitás lokális diasztolés fokozódása következtében kialakuló szarkolemma depolarizáció kompenzálásában.

A 21. ábrán bemutatott  $Ba^{2+}$ -szenzitív áramok tanúsága szerint ezekben a kísérletekben kifelé

haladó áram az akciós potenciál kezdeti szakaszán nem volt megfigyelhető. Az I-V görbékben ugyancsak leolvasható (20B, 22C ábrák), hogy 0 mV felé haladva az áram zérus felé tendál, vagyis az akciós potenciál kezdeti szakaszán, amikor a  $V_m$  pozitív érték, nem volt  $Ba^{2+}$ -szenzitív áram. Hasonló eredményre jutott munkacsoportunk egy korábbi munkájában is (Jost és mts., 2013) (lásd. 3/B ábra, jobb panel). A görbe kezdeti szakaszán látható rapid áramváltozás vélhetően sokkal inkább az áram gyors inaktiválódásának következménye, hiszen -80 mV-ról +40 mV értékre ugunk (-80 mV-on még van áram, +40 mV-on már nincs). A depolarizációs szakaszon esetenként rövid ideig mérhető áram szerintünk műtermék, nem valódi áram, de az állítás igazolására további vizsgálatokra lenne szükség. Az említett cikk 3/B ábrájának bal paneljén látható áram csak 500  $\mu M$   $Ba^{2+}$  alkalmazását követően jelenik meg, ami az általunk alkalmazottnál képest 50-szeres dózis és nagy valószínűleg gátol további áram(ka)t is. Az általunk alkalmazott 10  $\mu M$  [ $Ba^{2+}$ ] még szelektívnek tekinthető.

Az  $I_{K1}$   $Mg^{2+}$ -függésére vonatkozó felvetés jogos. Ezt a függést nem vizsgáltuk, sem a pipetta, sem a külső oldat  $Mg^{2+}$  koncentrációját a mérések során nem változtattuk. Az irodalmi adatok szerint a kifelé irányuló  $I_{K1}$  izolált tengerimalac szívizomsejtekben 15 °C-on, a belső  $Mg^{2+}$  szint maximális redukcióját követően vált kimutathatóvá (Martin és mts., 1995). Méréseik szerint a lecsökkent [ $Mg^{2+}$ ]<sub>i</sub> az  $I_{K1}$  aktivációjának feszültségfüggését depolarizáció irányába tolta el és az  $I_{K1}$  konduktanciáját is linearizálta. A hőmérséklet 30 °C-ra emelését követően az outward  $I_{K1}$  nem volt mérhető. Ugyanakkor macska és nyúl szívizomsejtekben kifelé irányuló  $I_{K1}$ -et a tengerimalachoz hasonló feltételek mellett sem sikerült kimutatni, mivel ezekben a sejtekben az  $I_{K1}$  aktivációs görbéi sem a hőmérséklet, sem a [ $Mg^{2+}$ ]<sub>i</sub> hasonló változásaira nem mutattak a tengerimalac sejtekhez hasonló markáns feszültségfüggést.

#### 5. Az AP külső $Ca^{2+}$ függésének látszólagos eltérése kutya és humán szívizomsejtekben.

Korábbi, már idézett kísérleti adataink (Jost és mts., 2013) alapján tudható, hogy a Kir2.1 csatornák denzitása jóval nagyobb kutya, mint humán kamrai szívizomsejtekben, ebből következően az  $I_{K1}$  hozzájárulása a repolarizációs rezervhez szignifikánsan kisebb humán, mint kutya szívben. A Kir2.1 csatornák jóval alacsonyabb expressziója miatt a repolarizációs rezerv összességében is gyengébb humán szívizomban. A humán mintákon tapasztalt, a kutyától eltérő  $Ba^{2+}$ -hatás leglogikusabban a jóval alacsonyabb Kir2.1 csatorna denzitással, illetve ennek következtében szignifikánsan kisebb  $I_{K1}$  árammal, magyarázható. Logikusnak tűnik, hogy a megemelt [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> APD rövidítő hatása alapvetően hasonló mechanizmussal történik humán és kutya szívben, de a kérdés megnyugtató tisztázásához újabb kísérletek szükségesek.

#### 6. Az NCX gátlás species-függése.

A felvetés jogos; az NCX gátlás species-függésére vonatkozó adatok egyrészt az irodalomban is találhatóak, másrészt ilyen vizsgálatokat munkacsoportunk is végzett. Az elérhető adatok alapján meglehetősen biztonságosan állítható, hogy az általunk kapott species-függő különbségek elsődleges oka nem a kismértékben valóban eltérő gátlási hatékonyság.

Mindazonáltal, megbízhatóan még nem tisztázott, hogy az NCX szignifikáns mértékű gátlása ellenére miért nem fokozódik nagy emlősök (kutya, nyúl, ember), illetve tengerimalac kamrai szívizomsejtjeinek kontraktilitása. A várt és hipotetizált  $Ca^{2+}$ / $CaT$  emelkedés, illetve markáns pozitív inotróp válasz hiányának okára *több, elvileg eltérő*, de racionális magyarázat adható.

1) A használt inhibitorok gátlási hatékonyságának nagymértékű, [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub>-függő csökkenése; 2)

a gátlás közel zéró nettó hatása az SL  $Ca^{2+}$  fluxusaira (ennek lehetséges oka: a) az  $I_{Ca,L}$  NCX-függő modulációja és a gátlás  $[Ca^{2+}]_i$  függése; b) a rev/fwd  $I_{NCX}$  egyensúly gátlást követő módosulása; c) magas NCX denzitás, esetleg más NCX- és/vagy SR-től független transzportmechanizmusok; d) a „load” LTC csatornák „trigger” LTC csatornáknál kisebb aktivitása, vagy nagyobb gátlása, illetve e) az SL  $Ca^{2+}$  fluxusainak viszonylag korlátozott szerepe az EC-csatolásban); (3) mindezen faktorok komplex, sokváltozós kombinációja; (4) más, jelenleg még nem tisztázott mechanizmus(ok) (pl. egyes TRP csatornák aktivációja).

Az NCX gátlás inotróp hatásának species-függését a felsorolt intracelluláris mechanizmusok bármelyikének kismértékű, kompenzálatlan eltolódása magyarázhatja. A kérdés részletesebb analízise céljából a közelmúltban végzett vizsgálatainkban (publikációra előkészítve) a külső és/vagy belső ionösszetétel megfelelő módosításával igazolni tudtuk, hogy az NCX gátlást követően pozitív és negatív inotróp válasz egyaránt létrejöhet.

#### *7. NCX gátlás hatására a CaT amplitúdója kontroll körülmények között nem változik, ATX-II alkalmazása esetén viszont változik.*

A 35-ös ábra feliratába sajnálatos módon hiba csúszott; az ábrafeliratban a SEA0400 helyett ATX-II-nek kellene szerepelnie; bár az ábramagyarázat korrekt, a hibás ábrafelirat az olvasót könnyen megzavarhatja. Az ábra helyes interpretációja alapján érthetővé válik, hogy nincsen ellentmondás: a 35/C ábrán látható CaT növekedés egyértelműen az ATX-II kezelés (azaz az  $I_{NaL}$  emelkedés) következménye. A 38/A, C paneleken mutatott CaT emelkedés ugyancsak az ATX-II előkezelés következménye. Méréseink szerint kontroll körülmények között mindkét NCX gátlószer hatástalan; ezzel szemben ATX-II előkezelést követően helyreállították, a velük történt előkezelést követően pedig megakadályozták a CaT ATX-indukált növekedését.

#### *8. Az NCX gátlás eltérő hatása a két $I_{NaL}$ aktivátor által indukált APD megnyúlásra. Van-e molekuláris interakció? Kamrai sejtek és Purkinje rostok eltérő veratrin érzékenysége.*

Amint a 38. ábrán is látható az NCX gátlása valóban csökkentette az ATX-II által indukált CaT növekedést. A 40. ábra szerint ennek legfőbb oka, hogy az NCX gátlás hatására a fokozott  $Na^+$  beáramlás által aktivált  $I_{rev}NCX$  áram csökken, ezáltal csökken a  $[Ca^{2+}]_i$  és a CaT amplitúdója is. Az ATX-II előkezelés hatására az  $I_{NaL}$  inaktivációja szignifikánsan (kb. kétszeresére) lassul (35/A); egyidejűleg a  $[Ca^{2+}]_i$  is emelkedik (35/C). Míg az előbbi változás APD nyújtó, utóbbi APD rövidítő hatású. Az eredő változás a 35/B ábra szerint mérsékelt APD megnyúlás. Az NCX gátlás APD-re gyakorolt hatása az NCX reverz potenciáljának értékétől, illetve a  $[Ca^{2+}]_i$  változás  $Ca^{2+}$ -áramra gyakorolt hatásától függ. Az ATX-II hatását részben a repolarizációs rezerv aktiválódása is kompenzálhatja.

A két aktivátor eltérő APD nyújtó hatásának magyarázata vélhetőleg eltérő szelektivitásukban rejlik, amit a hatásos dózisok közötti közel 3 nagyságrendnyi eltérés igazol (2 nM vs. 1  $\mu$ M). Az ATX-II specifikus aktivátorként ismert, hatékonysága valamennyi  $Na_v1.x$  csatornára közel azonos. Ezzel szemben a veratridin kevésbé specifikus és kis mennyiségben más alkaloidokat is tartalmaz, csökkenti a single-channel konduktanciát, továbbá aktivátor hatása eltérő a TTX-érzékeny, illetve TTX-re érzéketlen (a szívben leginkább expresszálandó  $Na_v1.5$  is ilyen)  $Na_v$  csatornák áramaira. Ezek az eltérések nagyrészt magyarázhatják a látott, de (a Purkinje rostoktól eltekintve) nem túl jelentős eltéréseket a két aktivátor hatásai között. A  $Na^+$  csatorna aktivátorok és NCX gátlók közötti közvetlen molekuláris interakcióra vonatkozóan nem találtam irodalmi adatokat. Ezzel szemben több, különösen a korábbi vizsgálatokban

alkalmazott NCX gátlószer (pl. KB-R7943)  $\text{Na}_v$  gátló hatását igazolták.

Végül, mind irodalmi, mind saját adatok szerint Purkinje rostokban a repolarizációs rezerv szignifikánsan gyengébb, mint kamrai szívizomsejtekben, ennek következtében a Purkinje rostok APD modulátor farmakológiai behatásokra vagy a frekvenciaváltozásra érzékenyebben reagálnak, mint a kamrai sejtek. Ez indokolja a megfigyelést, hogy az  $\text{I}_{\text{NaL}}$  aktivációt követően kapott APD megnyúlás szignifikánsan nagyobb Purkinje rostokban. A jelentős kvantitatív eltérés magyarázhatja az AP diszperzió ATX-II kezelést követő szignifikáns fokozódását. Mivel az ATX-II APD nyújtó hatása ismereteink szerint közvetlenül jön létre, az NCX gátlás – amint a 42. ábrán is látható – nem befolyásolhatja lényegesen.

### *9. Magas életképességű és életképtelen sejtek viszonya.*

Az izolált sejteken történő mérések egyik fontos elvi problémáját és szisztematikus hibáját jelenti, hogy a vizsgálatok mindig „preszelektált”, minél jobb állapotú sejteken történnek. Az előszelekció eleve nemkívánatos hatását tovább fokozza, hogy a protokollok során a kevésbé ellenálló sejtek sokszor elpusztulnak, a belőlük nyert eredmények általában nem jelennek meg a feldolgozott adatok között. Többé-kevésbé jogosan feltételezhető, hogy az elpusztult sejtek egyes intracelluláris folyamataikban eltérnek a túlélő sejtektől.

Az elpusztult sejtek számát általában nem szokás számon tartani, mivel pusztulásuknak eltérő okai lehetnek: a sejtek izolálás során elszenvedett mechanikus sérülései mellett, az emésztés során kialakuló irreverzibilis membránkárosodások, illetve az eltérő mértékű festékfelvételből eredő, nehezen karakterizálható különbségek miatt az elpusztult sejtek száma nem feltétlenül reprezentálja a sejtek biológiai intoleranciáját a protokollal szemben. Az természetesen igaz, hogy a jelentősen megnőtt transzmembrán ionáramok és a metabolikus túlterhelés nagyobb gyakorisággal okozza a sejtek idő előtti pusztulását.

Részben az említett probléma megkerülése céljából végeztük a túlélési vizsgálatokat, amelyek során nyomon követtük a protokoll teljes időtartama alatt elpusztult sejtek számát is. Mivel a méréseket – a patch clamp, illetve fluoreszcens tracer módszerekkel végzett mérésekhez viszonyítva szignifikánsan nagyobb (kb. tízszeres) számú, nem preszelektált szívizomsejten végeztük, a nagy számok törvénye értelmében az adatok jóval megbízhatóbban jellemezték a sejtek protokoll iránti érzékenységet. A túlélési vizsgálatok során megállapított átlagos élő/elhalt sejtarányokat a 45. ábra C panelje összegzi. A preiszkémias periódusban a vizsgált sejtpopulációban ez az arány közelítőleg 75/25% az élő sejtek javára; az arány az iszkémias periódus végéig nem változik lényegesen, a reperfúziós periódus végére viszont a kontrol csoportban gyakorlatilag megfordul (25/75%), míg az NCX gátlóval előkezelt csoportban közelítőleg 50/50%.

### *10. A 45/C ábra értelmezése, angol nyelvű feliratok, hiányzó időskála.*

A 45/C ábra bal és jobb oldali grafikonja tulajdonképpen komplementer információkat mutat – a túlélő és elpusztult sejtek számát az iszkémias ciklust megelőzően (3. perc), annak végén (15. perc), valamint a reperfúzió végén (26. perc).

Ami a hiányzó, illetve angol nyelvű ábrafeliratokat illeti, a dolgozat elkészítésének nem túl izgalmas, de annál időigényesebb részének bizonyult az eredetileg angol nyelvű ábrák átírása magyar nyelvűre. Sajnos az idézett ábrákban egyes feliratok átírása elmaradt, ezért elnézést kérek. Az összevont 48/B-D (és 49/B-D) ábrákon valóban hiányzik a vízszintes tengelyről az időbeosztás, de a leolvasási időpontokat az ábramagyarázatok korrekt módon tartalmazzák.

### 11. NCX gátlás hatásainak eltérése iszkémiás sejtekben strofantin nélkül és strofantinnal.

Irodalmi adatok szerint a mérsékelt (low-flow) iszkémia kezdeti fázisában a szisztolés  $[Ca^{2+}]_i$  csökken, a diasztolés  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedik, ennek következtében a CaT amplitúdója graduálisan csökken. Reperfúzió során a szisztolés és diasztolés értékek, s ezáltal a CaT amplitúdója is normalizálódnak. Ezek a változások megfigyelhetők a 48. ábra A, B és E paneljein. Az NCX gátlás jelentősen csökkenti a szisztolés  $[Ca^{2+}]_i$ -t, normalizálja a diasztolés  $[Ca^{2+}]_i$ -t, ezáltal a CaT nagysága is jelentősen csökken (48./A, B, E). A strofantinnal előkezelt sejtekben kialakuló súlyos (no-flow jellegű) iszkémia során a szisztolés és diasztolés  $[Ca^{2+}]_i$  is nagymértékben emelkedik, ezért a CaT amplitúdója kevéssé változik. Ez az állítás igaz a reperfúziós fázis alatti változásokra is, viszont a CaT relaxációs ideje markánsan nő. (49/A, B, E). A gátlás hatására a CaT amplitúdója iszkémia alatt alig változik, reperfúzió során jelentősen emelkedik (49./E). A szokatlanul tűnő CaT amplitúdó-változások elsődleges magyarázata vélhetőleg a diasztolés  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés pozitív inotróp hatásában rejlik – mérsékelt diasztolés  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedés nem hoz létre pozitív inotróp választ, nagymértékű viszont igen.

A bíráló felvetése, mely szerint az iszkémia/reperfúzió indukált  $Ca^{2+}$  homeosztázis zavarok egyik fontos komponense az NCX közvetlen hozzájárulása, jogos, mivel alacsony pH<sub>i</sub> esetén az NCX működése gátolt, ami lehetővé teszi a lassú diasztolés  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést. Amennyiben az iszkémiát súlyosbítandó az NKA transzportaktivitása is gátolt, tehát az iszkémia alatt kialakuló intracelluláris változások is nagyobbak, az iszkémia-indukált  $[Ca^{2+}]_i$  növekedéshez *hozzájárul* az NKA gátlás következtében létrejövő szignifikáns  $Na^+$  szintemelkedés is, ami az amúgy is lelassult NCX transzportaktivitást eltolja reverz irányba. A fokozott  $Ca^{2+}$  akkumuláció következtében mind iszkémia, mind reperfúzió alatt a diasztolés  $[Ca^{2+}]_i$  nő; a magas diasztolés  $[Ca^{2+}]_i$  pozitív inotróp hatással rendelkezik; ez egyrészt kompenzálja a CaT tranziens low-flow iszkémiában látott csökkenését, másrészt fokozza a sejtek metabolikus túlterhelését.

### 12. Beat-to-beat CaT változás iszkémia/reperfúzió során. APD diszperzió, T-hullám alternáció.

Az irodalmi adatok szerint a CaT amplitúdó beat-to-beat variabilitásának reperfúzió-indukált növekedését nagyrészt az SR  $Ca^{2+}$ -spark aktivitásának fokozódása okozza, amit saját kísérleti adataink is megerősítenek (50. ábra). Mivel a spark felszabadulás sztochasztikus folyamat és az egyetlen sparkban átlagosan felszabaduló  $Ca^{2+}$  mennyisége is nő, az SR-ből a normál ECC során (trigger  $Ca^{2+}$  hatására) felszabaduló  $Ca^{2+}$  mennyisége és a CaT amplitúdója is fokozott variabilitást mutat. Újabb irodalmi adatok szerint a CaT variabilitás-növekedése az AP variabilitás-növekedésének is egyik fontos háttérmechanizmusa. Saját eredményeink szintén támogatják ezt a feltételezést – a  $a_{rev}NCX$  transzportaktivitásának gátlása miatt csökkenő spark felszabadulás következtében a reperfúzió-indukált AP variabilitás is jelentősen csökkent (53. ábra). A  $Ca^{2+}$  transzportfolyamatok beat-to-beat variabilitásának jelentősége igazolt a sinus csomó pacemaker sejtjeiben is. A variabilitás species-függésére vonatkozóan viszont nem állnak rendelkezésre megbízható, összehasonlítható irodalmi adatok.

A mikrovolt szintű T-hullám alternánsok a kamrai repolarizáció beat-to-beat variabilitásához köthetők (Faisal és mts. 2013). Izolált perfundált szíveken végzett optikai mapping mérések és izolált szívizomsejteken végzett vizsgálatok igazolták, hogy ezek az alternánsok sejt szinten generálódnak, hatásukat pedig fokozza a vezetési sebesség restitúciója és az ektópiás ütések hatása. Az APD restitúciós hipotézis szerint az alternáló membránpotenciál, AP morfológia és transzmembrán áramok vezetnek a  $[Ca^{2+}]_i$  beat-to-beat fluktuációihoz. A ma már nagyobb támogatást élvező  $Ca^{2+}$  restitúciós hipotézis szerint viszont elsődlegesek a  $[Ca^{2+}]_i$  fluktuációi

és ezek generálják az AP morfológia és a membránpotenciál változásait. Ez utóbbi esetben az  $[Ca^{2+}]_i$  alternánsok kialakulása egy vagy több  $Ca^{2+}$  transzport mechanizmus ( $Ca^{2+}$  beáramlás, a RyR-ok inaktivációt követő helyreállása, az SR  $Ca^{2+}$  felszabadítása,  $Ca^{2+}$  felvétele és  $Ca^{2+}$  tartalmának redisztribúciója, a  $Ca^{2+}$  homeosztázis és a membránpotenciál kölcsönhatása, stb.) stressz-indukált perturbációjának (pl.  $\beta$ -adrenerg stimuláció) következménye. A szívben kialakuló (pl. T-hullám) alternánsok egyértelműen jelzik a szívizom elektromos instabilitását, rontják a szív pumpafunkcióját és aritmogén (reentry) szubsztrátot képezhetnek; ezáltal nagy gyakorisággal kötődnek a kamrai aritmiák (VT, VF) kialakulásához.

Végezetül ismét köszönetet mondok Tóth Attila, PhD, az MTA doktorának értekezésem gondos és alapos áttekintéséért, igényes és részletes bírálatáért. Köszönöm építő kritikáit, fontos, elgondolkodtató megjegyzéseit, pozitív véleményét, és eredményeink elismerését. Köszönöm, hogy értekezésemet nyilvános vitára alkalmasnak találja és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2016. november 5.

Dr. Tóth András