

**DEBRECENI EGYETEM**  
**Általános Orvostudományi Kar**  
**Kardiológiai Intézet**  
Igazgató: Prof. Dr. Édes István egyetemi tanár  
Tel. / Fax: 52-255-928



**UNIVERSITY OF DEBRECEN**  
**Faculty of Medicine**  
**Institute of Cardiology**  
Director: Prof. Dr. István Édes M.D., Ph.D., D.Sc.  
Phone / Fax: 36-52-255-928

**Klinikai Fiziológiai Tanszék**  
Tanszékvezető: Prof. Dr. Papp Zoltán egyetemi tanár  
[pappz@med.unideb.hu](mailto:pappz@med.unideb.hu)  
Tel. / Fax: 52-255-978

**Division of Clinical Physiology**  
Head of division: Prof. Dr. Zoltán Papp M.D., Ph.D., D.Sc.  
[pappz@med.unideb.hu](mailto:pappz@med.unideb.hu)  
Phone / Fax: 36-52-255-978

Hungary, 4032 Debrecen, Móricz Zsigmond krt. 22., e-mail: [klinfiz@med.unideb.hu](mailto:klinfiz@med.unideb.hu)

Bírálat Dr. Tóth András „Intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis-változások hatásainak elemzése izolált szívpreparátumokon” című MTA Doktori értekezéséről.

Tóth András értekezése egy nagyon átgondoltan megírt alapos munka, igazi monográfia. A szerző az értekezéshez már a második sorban megadja az alaphangot, amikor rögzíti, hogy az általa művelt szűkebb tudományterületnek könyvtárnyi irodalma van. Ehhez méltóan erőfeszítést is tett annak érdekében, hogy ezt a könyvtárnyi adatot jól szerkesztett, célszerű formában bemutassa. Ennek megvalósítása során 559 hivatkozást idézett. Ekkora áttekintést ritkán lát az ember. Ennek egyik oka, hogy Tóth András mindent megtett annak érdekében, hogy ne korábbi áttekintő dolgozatokra, hanem az eredeti tudományos eredményt közlő publikációk kerüljenek hivatkozásra.

A disszertáció tartalmában ehhez méltó. A tudományos eredményeket - függetlenül attól, hogy az hivatkozott, vagy saját eredmény - nagyon szoros logikai hálóban közelíti meg. Mindezt teszi a jelöltre jellemző eleganciával és stílusossággal, kezdve a szóhasználatától a kiemelésekig a szóhasználaton át. A disszertáció több rétegben szerkesztett. A fontosabb címek vastag betűvel szedése megszokott, de ebben a műben a szövegben található dőlt betűs információ különös jelentőséget hordoz. Egyrészt a fejezetek előtt gyakran ilyen módon foglalja össze a legfontosabb mondanivalót, míg más esetekben a szövegben megjelenve elgondolkodtatásra sarkalló rövid megjegyzések formájában ölt testet.

A szerkesztés dicsérete mellett még két formai megjegyzésem van. Az egyik a mondanivaló tállalására vonatkozik, melyre a legjobb kifejezés talán a precíz. A mondatok sokszor összetettek, de amikor a tagadás tagadása is történik, akkor is érthető, hogy ez nem egy szándékosan bonyolult megfogalmazás, hanem a dolgok logikáját, az időbeli vagy a logikai sorrendet precízen bemutató folyamat eredménye. Az értekezés egy terjedelmes mű, érdemi része 130 oldal, mégis, minden bekezdésnek van célja, értelme és mondanivalója. Ez a precizitás nagyon nehezen elérhető, tiszteletreméltó teljesítmény- és persze adottság. A másik formai megjegyzésem már inkább kritikai jellegű. Az általam kapott nyomtatott példányban sajnos előfordulnak formázásból és angolból történő fordításnak betudható típushibák. Ilyenek az ábraszövegekben a hosszú ékezetes betűk hiánya (a konverzió során szóköz betűvel helyettesítődöttek), a számok egy részében a magyaros tizedes vessző helyett sokszor fordul elő az angolos tizedes pont, továbbá az érték és a mértékegység között gyakran hiányzik a szóköz. Ezen elírásoktól eltekintve azonban a mű nyelvtanilag példaértékű, talán két tucatnyi helyesírási hibát tartalmaz, melyeknek felsorolása méltatlan lenne mind a műhöz, mind az alkalomhoz.

Az értekezés alapvetően 9 első-, vagy utolsó szerzős közleményre alapul. Ezek között összekötő kapocs a címben is megfogalmazott intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ . A kísérletek végpontja valamilyen élettani, leggyakrabban elektrofiziológiai jelenség, melynek precíz leírása és a mechanizmusok feltárása közös vonás. A disszertációnak sikerül azt is érzékeltetni, hogy ezek a kísérletek valamire irányulnak. Ennek megfelelően a kísérletek eredménye mindig a kardiovaszkuláris betegségek és halálozás keretében nyernek végső értékelést. Ebben a tekintetben is nagyon tetszik a jelölt saját maga által adott értékelés: "Mennyit ér? ... talán egy csavarral hozzájárultam a gépezethez." Jómagam úgy hiszem, hogy talán nem is egyetlen csavarral járult hozzá a gépezethez.

Ezzel együtt egy jó monográfia nem csak információt nyújt, de kérdéseket is felvet. Tóth András disszertációja teljesítette ezt a feltételt is. A pályamunka és a bemutatott eredmények

részleteit tekintve az alábbi kérdések fogalmazódtak meg bennem:

1. Az SK2 csatorna szívbeli expresszióját tekintve a human protein atlas a jelölt eredményeivel egybehangzóan jelentős (jóllehet a mellékvesétől, májtól, agytól és prosztatától elmaradó) expresszióra utal mind fehérje, mind mRNS szinten a KCNN2 fehérje vonatkozásában. Ugyanakkor a 14. ábra kapcsán felmerül az alkalmazott antitest specifitásának kérdése, tekintettel arra, hogy gyakorlatilag egyetlen csíkot mutatnak a képen. Ez a kérdés azért fontos, mert a jelölt funkcionális eredményei nagyon limitált szerepet sugallanak ezen csatornáknak, ami az expresszióra vonatkozó irodalmi adatokkal összevetve is nehezen érthető.

2. Az SK csatorna által vezetett áram szerepét a kísérletekben az apamin általi gátolhatóság alapján határozták meg. Az apamin specifitását és hatékonyságát a diszkusszió fejezetben részletesen elemezi a jelölt. Az ott felvetett érvek mellett is kérdés marad, hogy a multicelluláris preparátumok esetében az apamin kellő penetranciával rendelkezik-e, továbbá, hogy a sejttizolálás során nem sérül-e az SK csatorna funkcionálisan nagyobb mértékben, mint a többi  $K^+$  csatorna? Számomra érdekes kérdés, hogy lehet-e ezen folyamatokat valamilyen módon megbecsülni?

3. Általános megjegyzés, hogy az izolált sejteken történő elektrofiziológiai méréseket a fiziológiástól jelentősen eltérő körülmények között végzik. Az alkalmazott ionkoncentráció, a ramp protokollok nem a fiziológiás állapotot tükrözik, sokkal inkább egy adott csatorna által vezetett ionáram meghatározásának specifikus körülményeit teremtik meg. Ilyen arteficiális rendszerekben a csatorna (optimális körülmények közötti) vezetőképessége meglehetősen pontossággal mérhető, sőt az ionáramok iránya, mértéke több-kevesebb bizonytalansággal jósolható. Ugyanakkor ez megnehezíti az élettani helyzetben betöltött szerep megítélését. Ezt tovább bonyolítja az a jelenség (amit egyébként a disszertáció is felvet), hogy a mérési eredmények a túlélő sejteken kapott eredményekre alapul. Ezzel szemben feltételezhető, hogy a kardiovaszkuláris betegségek fatális komplikációiért azok a sejtek felelősek, amelyek a leggyengébb láncszemet jelentik a szív-szövetben és az izolálás, illetve a kísérletek során elhalnak. Van-e a jelölt szerint kiút ebből a zsákutcából?

4. A befelé egyenirányító  $K^+$  áram ( $I_{K1}$ )  $Ca^{2+}$  függése során a pipetta oldattal modellezték az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció változást, 150 nM és 900 nM-os  $Ca^{2+}$  pufferek felhasználásával. Ilyen körülmények között a 20. ábra tanúsága szerint a -70 és a -30 mV membránpotenciál tartományban kismértékű, de szignifikáns különbség mutatkozott az  $I_{K1}$  áramban. Mennyire tekinthető jelentősnek ez a megfigyelt hatás? Ezzel kapcsolatban bizonyos szerzők (Li és munkatársai: *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **1998**, 274(3 Pt 1), C577-585. és *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2000**, 279(1), H130-138, továbbá Zhang és munkatársai *Pflugers. Arch.*, **2009**, 457(6), 1275-1285.) felvetették, hogy az  $I_{K1}$  csatorna az akciós potenciál kezdeti szakaszában a szívizomsejtekben is egy kifelé irányuló rövid idő alatt inaktíválódó tranziens áramot is vezethet, mely az extracelluláris  $K^+$  koncentrációtól függ és  $Ba^+$  által blokkolható - hasonlóan a késői befelé irányuló komponenshez. Ezen kifelé irányuló  $K^+$  áramnak komoly jelentősége van a simaizomsejt funkcióban, különös tekintettel az agyi erekre. Ezekben az esetekben ez a kifelé irányuló áram a nyugalmi extracelluláris  $K^+$  koncentráció mérsékelt (1-20 mM) emelkedésére jelenik meg és hiperpolarizációt (simaizom relaxációt) vált ki. Mi több, a szívizomban feltételezett kifelé irányuló  $I_{K1}$  áram nagymértékű intracelluláris  $Mg^{2+}$  függést mutathat, ami felveti, hogy jelenléte nagymértékben függhet az alkalmazott pipetta ( $Mg^{2+}$ ) és extracelluláris ( $K^+$ ) oldatok összetételétől. A jelölt hogyan látja ezt a kérdést a szívizomsejtek tekintetében a kísérletei és elméleti tudása alapján?

5. Az AP extracelluláris  $Ca^{2+}$  függését tanulmányozó részben meglepő eredményre vezetett a kutya (25. ábra) és a humán (26. ábra) szívizomsejtek összehasonlítása. A kutya esetében ugyanis a magas extracelluláris  $Ca^{2+}$  növelte a CaT-t (24. ábra), amivel párhuzamosan rövidült az AP, amely rövidülés  $IK1$  ( $Ba^+$ ) függőnek bizonyult (26. ábra). A humán sejtek esetében a rövidülés ugyan szintén megfigyelhető volt, de erre a  $Ba^+$  semmiféle hatással nem volt (26. ábra). Ennek alapján felmerül a kérdés, hogy humán szívizomsejtekben a megemelkedő

intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  milyen mechanizmussal rövidítheti meg az AP-t?

6. Az NCX szerepét feltárni hivatott kísérletekben jelentős fajfüggő különbségeket találunk: patkány szívműködő sejtek esetében részleges gátlása emeli a CaT amplitúdóját (28 és 29. ábrák), míg kutyából izolált szívműködő sejtek esetében a SEA0400 némileg magasabb koncentrációja nem okozott mérhető változást. Megítélésem szerint fontos információ a válaszok SEA0400 függése, amelyhez szükséges lenne a koncentráció-hatás függvény felvétele. Ennek hiányában nehéz annak a megítélése, hogy az NCX modulációnak milyen élettani hatásai lehetnek.

7. Érdekes, hogy 2 nM ATX-II jelenlétében az NCX CaT amplitúdó emelő hatása felszínre került (35. ábra, SEA0400, 38. ábra, ORM vegyület) annak ellenére, hogy kontroll körülmények között ugyanaz a SEA0400 és ORM10103 koncentrációk hatástalanok voltak (30. és 37. ábrák).

8. További érdekesség, hogy az NCX gátlók (SEA0400 és ORM10103) a késői  $\text{Na}^+$  áram serkentése során normalizálták a CaT-t (38. ábra), mely az alkalmazott kezelések sorrendjétől függött: az NCX gátlók előkezelésként alkalmazva gátolták az ATX-II hatást, és a már kifejlődött ATX-II hatást is felfüggesztették, az ATX-II kezelést követő alkalmazásuk során. Ezzel szemben az ATX-II APD nyújtó hatását a már kifejlődött ATX-II hatás esetében nem voltak képesek felfüggeszteni (az ATX-II után történő NCX gátló alkalmazás nem volt képes normalizálni (rövidíteni) az ATX-II hatására megnyúlt APD-t, mi több, a másik alkalmazott  $\text{Na}^+$  csatorna aktivátor, veratridin esetében az NCX előkezelés is hatástalannak bizonyult az APD nyújtó hatásra (42. ábra). Ezzel kapcsolatban több kérdés is felmerül. Az első, hogy miért nincs egyforma hatása az NCX gátlásnak a két különböző  $\text{Na}^+$  csatorna aktivátor által kiváltott APD növekedésre? A második kérdés az, hogy a  $\text{Na}^+$  csatorna aktivátorok és a NCX gátlók között nem lehet-e valami közvetlen molekuláris interakció? A harmadik kérdés az, hogy miért lehet szerepe az NCX alkalmazás sorrendjének ( $\text{Na}^+$  csatorna aktiváció előtt, vagy során) a bekövetkező APD időtartam változásokra? Végül, az NCX gátlástól független, de a hivatkozott ábrák kapcsán felmerülő kérdés, hogy mi lehet a magyarázata annak, hogy a veratridin hatására ( $I_{\text{Na,L}}$  aktiváció) bekövetkező APD nyúlás ilyen jelentősen eltér a kamrai és a Purkinje sejtekben (42. ábra).

9. Az NCX élettani szerepével kapcsolatos kísérleteknek komoly gátja lehet, hogy a farmakológiai modulátorok hatásai nagyon rövid idő alatt szelektált (magas életképességű) sejteken jelentkeznek. A kezeléseket tolerálni nem képes sejtek adatai (miután ezekkel nem sikerül befejezni a protokollt) nem kerülnek értékelésre. Volt-e olyan irányú megfigyelés, hogy valamely kezelési csoportban több sejt vált funkcióképtelenné a mérések során? Egyáltalán, milyen volt az élő és elhalt sejtek kvalitatív aránya a kísérletek kezdetén és a kísérletek során?

10. A 45. ábra jobb oldali grafikonja valószínűleg az elhalt sejtek számát mutatja. Néhány további ábrán pedig angol nyelvű felirat maradt (35/A, 35/C, 48/D, 49/B-E). A 48/B-D ábrákon hiányzik a vízszintes tengelyről az idő beosztás és jelölés.

11. Az iszkémiának kitett sejteken történő mérések során az NCX gátlás (ORM10103, 47. ábra) önmagában (a korábbi eredményeknek megfelelően) nem volt hatással a CaT szisztolés (maximális) és diasztolés (minimális) értékére, addig iszkémia során a CaT-t jelentősen csökkentette mindkét értéket (48. ábra), mely hatás a reperfüzió során is megfigyelhető volt. Ugyanez az NCX hatás a Na-K-ATPase (NKA) gátlás (strofantidin jelenlétében) csak a diasztolés (minimális) értékre nézve volt megfigyelhető (49. ábra). Mindezek az adatok azért meglepőek, mert míg az iszkémia hatására az NCX várhatóan közvetlenül járul hozzá a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis zavarához, addig az NKA gátlás során a megemelkedő intracelluláris  $\text{Na}^+$  révén közvetlenül. Mindennek ellenére a közvetett hatás jelentősebbnek bizonyult a maximális CaT értékeket tekintve. Mi lehet ennek a magyarázata, különösen figyelembe véve, hogy a megemelkedő intracelluláris  $\text{Na}^+$  a revNCX működést segítené elő, ami az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  további emelkedéséhez kellene vezessen?

12. Elméleti jellegű kérdés, hogy az iszkémia-reperfúzió során miért figyelhető meg az ütésről-ütésre történő CaT amplitúdó változás növekedése? Ismert-e ez a jelenség más fajok, illetve egész szervezet érintő iszkémiás hatások esetében? Mennyire járulhat ez hozzá a APD diszperzióhoz és az AF kialakulásához? Milyen körülmények között fordul elő a T-hullám alternáció és ennek milyen pumpafunkcióra és aritmia kialakulásra gyakorolt hatásai lehetnek?

Ezen kérdések és megjegyzések semmit sem vonnak le a disszertáció értékéből, inkább csak a jelölt számára biztosítják a sikeres és eredményes védéshez szükséges vitakészség lehetőségét.

A jelölt önálló tudományos eredményeinek ismerem el az alábbiakat:

1. Az SK2 csatorna expresszálódik mind kutya, mind patkány szívizomban, de ennek az SK2 csatornának az apamin gátlás tükrében nincs funkcionális jelentősége az akciós potenciál kialakításában.
2. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedése CaMKII mediált módon növeli az  $\text{I}_{\text{K1}}$ -et, ami befolyásolja az akciós potenciált (nyújtja és növeli a triangulációt). Ezen hatások terén jelentős fajfüggő különbségek vannak, ez a hatás kutyában jelentős, emberben kevésbé kifejezett.
3. Kutya kamrai szívizomsejtekben kontroll (normoxiás) körülmények között az NCX gátlás funkcionális hatásai csekélyek.
4. Patkány kamrai szívizomsejtjeiben kontroll (normoxiás) körülmények között az NCX gátlás mérsékelt, de szignifikáns hatással van a CaT amplitúdójára (növeli) és a sejtrövidülésre (fokozza).
5. A nagyobb szelektivitású és hatékonyságú NCX antagonistá ORM-1013 hatásai megegyeznek az általánosan használt, farmakológiaiag kevésbé kedvező profilú SEA0400 vegyület hatásaival.
6. Kutya kamrai szívizomsejtekben az  $\text{I}_{\text{Na,L}}$  aktivációja egyaránt fokozza a NCX forward és reverz módú vezetőképességét, mégpedig oly módon, hogy a hatások az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázist tekintve kiegyenlítik egymást.
7. A strophantidin hatására megjelenő diasztolés  $\text{Ca}^{2+}$  sparkok megjelenése kivédhető NCX gátlószerekkel.
8. Szimulált iszkémia/reperfúzió reperfúziós szakaszában az NCX gátlás protektív szereppel rendelkezik, amennyiben csökkenti a diasztolés  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt. Ez a hatás strophantidin kezelés során is megmarad. Ugyanakkor az NCX gátlás mérsékelt hatással van az APD értékekre ezen körülmények között. Más szavakkal: az NCX gátlás ebben a kísérleti modellben sikeresen alkalmazható az iszkémia-reperfúziót követő kontraktilitás csökkenés kezelésére, de az aritmiák megelőzésére kevésbé alkalmas.
9. NCX gátlás növeli a szívizomsejtek túlélését iszkémia/reperfúziót modellező körülmények között sejtkultúrában, ez a hatás azonban nem figyelhető meg patkányszívek kísérletes iszkémia/reperfúziója során.
10. Az NCX hatás a korábban említett izolált sejtes eredményekkel összhangban mérsékelt hatással van az iszkémia/reperfúzió során megfigyelt aritmiák kialakulására.

11. A NHE gátlása ezzel szemben hatásosan csökkenti az aritmiás epizódokat, azonban ezt a NHE gátlásból adódó védelmet az NCX egyidejű gátlása csökkenti.

A doktori disszertáció alapján javaslom a doktori értekezés nyilvános vitára bocsátását.

Debrecen, 2016. november 2.

Tisztelettel:

Tóth Attila, PhD, MTA doktora