

Szeretném megköszönni Koller Ákos Professzor Úrnak, hogy doktori értekezésem bírálatát elvállalta, köszönöm az alapos kritikát és az értékes kérdéseit, valamint, hogy pozitívan nyilatkozott eddigi munkámról.

A részletes bírálat során feltett formai és szerkezeti kérdésekre a válaszaim a következők:

A Bírálat több kritikai megjegyzése a dolgozat szerkezetére és a bevezető, célkitűzés és eredmények arányára és az egyes átfedő részekre vonatkozik. Az értekezés problémájának tekinti, hogy a szerkezet nem követi a megszokott formát. Míg a cím és a bevezetés rész (túl) szélesre nyitott a szívelégtelenséggel kapcsolatban, ezekből az elemekből az értekezés azonban nem mindent válaszol meg kísérletes formában vagy használ fel célkitűzésként, az eredeti sorrendet is követve (22. kérdés). Megfordítva, szintén problémaként veti fel a bírálat, hogy több olyan kísérlet is szerepel az Eredmények részben, amelyek nem szerepelnek a Bevezetőben vagy tételesen a Célkitűzések részben. Ennek megoldása az lehetett volna, ha a Bevezetőt követően a hipotézisek külön feltüntetésre kerülnek. Ez segíthette volna a kutatás logikai igazolását, mennyiben különül el a jelenlegi munka a korábbi kutatásoktól és mik lennének a következő akár klinikai lépések (11. és 12. kérdések). Végül a Bírálat az Eredmények és Megbeszélés (21. kérdés) részek összevonását nem tartja jónak, mivel nem derül ki melyek az új saját eredmény (25. kérdés), a korábbi kutatások (27. kérdés) és az ezekből levont vélemény.

Köszönöm a formai részre vonatkozó részletes bírálatot. Az értekezés szerkezete valóban nem követi az eredeti cikkeink és kutatási pályázatok klasszikus formáját. Az Eredmények és Megbeszélés összekapcsolásának természetesen megvannak a hátrányai. Azért e mellett döntöttem mégis, mert nagy előnyének tartom, hogy az eredményekhez kapcsolt magyarázat megkönnyítheti a sok információ befogadását és nem kényszeríti az olvasót állandó lapozgatásra. Ugyanez magyarázza, hogy a kapott eredményeket igyekeztem elhelyezni a szakmai irodalomban és jelezni mindenhol, ahol újdonságot jelentenek az eredmények. A bemutatott eredmények az én és munkatársaim munkája – más munkacsoportok munkájára csak ritkán hivatkozom, akkor, amikor ez nem áthidalható máshogy, ezeket minden esetben a hivatkozások feltüntetésével jeleztem. Egyetérték a Bírálatóval, hogy egy kibővített célkitűzés / hipotézis oldal további segítséget jelenthetett volna, az értekezésben ezek a pontok részletesen az egyes bekezdések első bekezdésében szerepelnek csak.

A Bírálat első kérdései az Értekezés címében, bevezetésben szereplő néhány kifejezés pontosítására vonatkoznak. Ezek a (1. és 10. kérdések) „szívszöveti” szó, amely szívizomra vagy minden más szövetre is vonatkozhat. (2. kérdés) A címben az „átépülés” szó jelentése szintén bizonytalan. A bevezetőben sok a túl általános fogalom használata: pl. funkcióváltás, vagy romlás pontosan mit jelent, mitől van (4. kérdés)?

Az Értekezésben bemutatott munkánk elsősorban a szívizomsejtekre és 3D struktúrák morfológiai és funkcionális változásaira fókuszált, a szív más sejtjei csak érintőlegesen kerültek megemlítésre. Ezt egészíti ki a sejt-magtranszportozhoz kapcsolódó vizsgálatsorozatunk, amelyben in vitro és ex vivo kísérletek is szerepelnek, valamint az in vivo és in vitro elemekből álló hepatoma kísérleteink. Bár a szív sejtjeinek több mint 50 %-át kitevő (Pinto és mtsai., 2016), a szívizomsejtek mellett fontos szerepet játszó endothelsejtek az elmúlt években munkánk központi sejtjei, ezek funkciója, ko-kultúrában betöltött szerepük és a más sejt-sejt, illetve sejt-mátrix kapcsolatok vizsgálata nem szerepel az Értekezésben. Egyetérték a Bírálatóval, hogy alapvető jelentőségű az egyéb sejtek értékelése a szív elektromos, kontraktilis és humorális funkciójának meghatározásakor, ez a kitétel most nem vonatkozott ez esetben a perfúzió, érzékelés, fibrózis és további nem a szívizomsejtekhez kapcsolódó válaszokra. Az idei évben jelent meg ugyanakkor egy a multicellularitással foglalkozó könyvünk a Frontiers in Cardiovascular Medicine sorozatban, amelyet szerkesztettem és részben írtam is. Ez a sejt-sejt interakciók és sejt-mátrix kapcsolatát is részletesen vizsgálja a szív- és érrendszerben (Földes és Madeddu, 2019).

A bírálat 9. kérdése is ide tér vissza, hogy képesek vagyunk-e a szív jelentős részét kitevő vérereket (endotélium, simaizom), extracelluláris mátrixot vagy idegszövetet is növeszteni? Ennek jelentősége a szívelégtelenség kialakulásában, és annak őssejtekkel való gyógyításában.

Munkacsoportunk az elmúlt években a szívizomsejtek mellett más sejteket is differenciáltatni tudott őssejtekből. Mára rutinszerűen tudunk jól jellemzett endothelsejteket nagy mennyiségben létrehozni, amelyek azután a betegségmodellben és preklinikai sejtterápiás vizsgálatokban jól használhatóak. Emellett simaizomsejtek, fibroblasztok és idegsejtek differenciáltatása is megoldott, ezekből komplex sejt-kultúrák hozhatóak létre, akár extracelluláris mátrixon is. A sejtek kardiális altípusainak célzott differenciáltatása azonban egyelőre jövőbeli terv számunkra és más munkacsoportok számára is.

A bírálóat következő kérdése arra vonatkozik, hogy mennyiben összevonhatóak a különböző sejtkultúrákban, állatmodellben vagy emberi szövetmintákon mért jelútvonalak (3. kérdés).

A dolgozat egyik fontos következtetése, hogy ezek nem összevonhatóak. Az összehasonlító kísérleteink (így a 4.1.1. rész) arra hívják fel a figyelmet, hogy az egyes modellek között jelentős különbségek lehetnek. A látványosan különböző válaszok magyarázhatják azt, hogy sok esetben a rágcsló sejteken mért válaszok nem feleltethetők meg a humán sejtek válaszkészségével. Ezért sok, a gyógyszerfejlesztésben vizsgált molekula esetében félrevezető eredményeket kapunk, amely a például a fejlesztések sikertelenségével társul a vizsgálatok későbbi fázisaiban. Ezek a megfigyelt különbségek voltak azok, amelyek arra ösztönztek minket (és más munkacsoportokat is), hogy a humán őssejtszármazékokat alkalmazzuk toxikológiai vagy kardiovaszkuláris assay-k fejlesztésénél. A területen az elmúlt hónapokban látható jelentős beruházások (így a Bayer-Bluerock Therapeutics együttműködés) és fejlesztések ezt támasztják alá.

A bírálóat megemlíti, hogy hiányzik annak a leírása, hogy a szívizomsejt hipertrófiájának milyen formái vannak, annak különböző megjelenési – pl. egészséges, kóros - formái, és azok pontos okainak elkülönítése. ... Ez az elkülönítés azért fontos mert a szerző a kutatásaiban inkább a szívizomsejtek (kóros) hipertróphiáját, semmint a „szívelégtelenség” komplexitását kutatja (5. kérdés).

Az élettani és pathológias hypertrophia formáit egy külön könyvfejezetben foglaltam össze szerzőtársaimmal, erre csak egy rövid bekezdés (1.2.1) utal. Ebben az értekezésben is megvizsgáltuk az eltérő formákat: a genetikailag kódolt hypertrophias sejtek és a G protein kapcsolt receptor ligandok mellett olyan kísérletekben is vizsgáltuk a sejteket, amelyekben mechanikus stimulust alkalmaztunk (4.4. fejezet, 22.-26. ábrák). A szívizomsejtek morfológiai és génexpressziós változásai ugyan összevethetőek voltak a mechanikus nyújtásra, adrenerg és más ligandok által kiváltott hypertrophiaiban, azonban azt gondolom, hogy egy komplexebb 3D modell pontosabb választ adhat a teljes hypertrophias válaszra. Ezek az új technológiák ma már rendelkezésünkre állnak: ilyenek az „engineered heart tissue”, a tartós kultúrában tenyészthető humán és állati-eredetű myocardialis szeletek, a multicelluláris humán organoidok és a 3D nyomtatóval létrehozható más struktúrák.

A Bírálóat következő kérdése arra vonatkozott, hogy mi volt az zsírsav-szénhidrát szubsztrátum váltás fontossága és oki szerepe a vizsgálatokban (6. kérdés)?

A felhasznált energiaforrások megváltozása alapvető a szív perinatális alkalmazkodásához. Ennek során a glikolízis helyett a zsírsav-alapú anyagcsere kerül előtérbe (Hu és mtsai., 2018), aminek a jelentősége abban van, hogy ez a felnőtt szívizomsejtek a megnövekedett energiaigényét jobban ki tudja elégíteni. A sejtkultúrában tartott őssejt-eredetű szívizomsejtek metabolikus érése is megfigyelhető ez a folyamat és ezért alapját képezheti azoknak a sejtkultúrák eljárásoknak, amelyekkel ez a szívizomsejtek érése fokozható. A saját munkánk során metabolikus váltást indirekt módszerekkel tudtuk fokozni. Ehhez a médiumot T3 pajzsmirigyhormon, dexamethason vagy IGF1 növekedési hormonnal egészítettük ki. Egy most publikálás alatt lévő, de az Értekezésben még nem szereplő munkánk eredményei az mutatták, hogy 3nM és 30 nM T3 hormon hatására az őssejt-eredetű szívizomsejtekben eltolódik ez az arány. A proteomikai mérések szerint ez majdnem 100 mitokondriális vagy oxidatív foszforilációban szerepet játszó fehérje fokozott expresszióját eredményezi. A sejteknél gyorsabb és fokozott kontraktilitást, megváltozó kalcium háztartást és átépülő szarkomer hálózatot találtunk ezzel egyidejűleg.

A Bírálóat három kérdése (7., 8., 16.) is az oxigénellátás és hypoxia kérdésével foglalkozik. A bírálóat jogosan említi meg, hogy a szívelégtelenség egyik fő oka a szív nem megfelelő oxigén ellátása és a koronária keringés elégtelensége lehet (7. kérdés). Ide kapcsolódik az a kérdés is, hogy mi a szerepe a mitokondriumok szerepét hypoxiában ill. szívelégtelenségben? Mi az oxigénellátottság szerepe a hypertrophia kialakulásában (8. kérdés). Végül arra kérdez rá a Bíráló, hogy a sejtkultúrában használt 5% CO<sub>2</sub> és 21% O<sub>2</sub> feltételek mennyiben feleltethetők meg a szívszövetben mérhető szinteknek (16. kérdés)?

A kérdések fontosságát és időszerűségét jelzi a tény, hogy a válaszom gépelése közben érkezett a hír, hogy az idei orvosi Nobel-díjat a hypoxia szerepének tisztázásáért kapták brit és amerikai kutatók. A dolgozatban bemutatott kísérleteinket a sejtkultúráknál leggyakrabban alkalmazott 21% O<sub>2</sub> (21 kPa/160 mmHg) mellett végeztük (Shooter és mtsai., 1952). A hypoxias előkísérleteink azt mutatták, hogy alacsony oxigénszint (<2%) hatására a hypoxia indukálta faktor, HIF1 $\alpha$  szintek az őssejt-eredetű szívizomsejtekben megnövekedtek. Ez jól jelezte, hogy a hypoxia modellünk működött - mégis, az oxigén szintek befolyásolásának nem volt kimutatható közvetlen hatása a sejt méretre és a szívizomsejtek életképessége és kontraktilitása is megtartott maradt. Emlősökben a születéskor megnövekedő energiaigény és megnövekedett oxigénszint hatására a glikolízis helyett a zsírsav-alapú anyagcsere kerül előtérbe, ez a szívizomsejtekben a szabadgyökök felszabadulásával és DNS károsodással társul (Puente és mtsai., 2014). Ez az

szívizomsejtek proliferációs kapacitásának csökkenéséhez vezet (Nakada és mtsai., 2017). Bár eddig ezt nem vizsgáltuk, az őssejt-eredetű szívizomsejtek proliferációs aktivitása fontos további kísérlet lehet ezek értelmében - a hypoxiás kísérletek elvégzéséhez a laboratóriumi feltételeink adottak. Kiindulásképpen, egyetértve a Bírálóval, a felnőtt szívizomzatban mérhető 2–6% szöveti O<sub>2</sub> szintek (Mas-Bargues és mtsai, 2019) jöhetnek szóba. Más munkacsoportok igazolták, hogy a HIF1 $\alpha$  célzott gátlása, kombinálva az előbbi válaszban részletezett T3, dexamethason és IGF1 faktorokkal, megnövelik a sejtek metabolikus érettségét és mitokondriális kapacitását (Gentillon és mtsai., 2019). Ennek tisztázása segítséget jelenthet a továbbiakban. Nem csak a már létrehozott sejtekben merül fel a hypoxia jelentősége, hanem az őssejtek differenciálódását is befolyásolhatja az oxigénellátottság. A HIF1 $\alpha$  közvetlenül befolyásolja a wnt jelátviteli utakat és így a szívizomsejt differenciálódás folyamatát, amely ennek a rendszernek a modulálására épül (Mazumdar és mtsai., 2010).

[A Bíráló 13. kérdése arra vonatkozott, hogy mit jelent a célkitűzésben szereplő a humán pluripotens őssejt eredetű szívizomsejtek hypertrophiás válaszában felnőtt sejtekkel való összevetése.](#)

A bemutatott munkánk egyik fontos célja az volt, hogy megértsük, az őssejt-eredetű szívizomsejtek mennyiben hasonlítanak a felnőtt kamrai szívizomsejtekre, milyen génexpressziós mintázatot mutatnak, és a klasszikus ligandokra adott válaszai mennyiben hasonlítanak az eddigi megismert adatokra. Ezeket az információkat több kísérletsorozatból gyűjtöttük össze: így fontos volt a sejtmag transzport kísérletekhez felhasznált számos sejtípus, többek között a szívtranszplantációs programból nyert szívek és azokból izolált felnőtt szívizomsejtek felhasználása is.

[A Bíráló arra kérdez rá \(14. és 19. kérdés\), hogy mi volt az irodalmi háttere az ADRA1A receptor overexpressziójára és hiPSC-CM sejthalálózásra vonatkozó céloknak és kísérleteknek.](#)

A felnőtt és őssejt-eredetű szívizomsejtek eltérő adrenerg mintázatát részletesen vizsgáltuk (28. ábra). Az ADRA1A receptor overexpressziója az első kísérleteinkből logikusan következő kísérlet volt. Abban bízva végeztük ezt el, hogy a receptor sejtbeli „pótlása” az adrenerg válaszkésztséget növelheti vagy normalizálhatja. Azonban a tény, hogy ez a beavatkozás és a receptor megemelt expressziója mégsem növelte a phenylephrine hatását, arra utalt, hogy a jelátvitel későbbi lépcsőinek defektusa, illetve valamely sejtszintű elem aktív gátló beavatkozása is közrejátszhat a phenylephrine hatás elmaradásában. Ez a célkitűzéseinkben külön pontként ugyan nem szerepelt, de a „2. *Adrenerg jelátvitel jellemzése és szabályozása humán pluripotens őssejt eredetű szívizomsejtekben*” cél megválaszolásához fontos kísérletnek bizonyult. A bevezetőben két alfejezet is foglalkozik az adrenerg receptorok kardiális és hPSC-CM jelátvitelével, ezek 1.2.2.3. és 1.2.3.1. részeken találhatóak. A sejthalálózás irodalmi hátterét a „1.1.3. Csökkent életképesség és fokozott sejthalálózás” fejezetben foglaltam össze, ezekre az információkra többször visszautalok a dolgozat későbbi részeiben.

[A Bíráló következőben a felhasznált őssejtvonalak kiválasztására kérdez rá \(15. kérdés\).](#)

Az őssejtek kiválasztásánál arra törekedtünk, hogy olyan sejt vonalakat használjunk, amelyeket képesek vagyunk nagy hatékonysággal és megbízhatóan szívizomsejteké alakítani. Bár a pluripotens őssejtek a szervezet sejtjeinek létrehozására képesek, azonban a napi gyakorlatban tett megfigyelésünk az, hogy egyes vonalak alkalmasabbak, mint mások az egyes célsejtek, például szívizomsejtek vagy endothelsejtek létrehozására. A H7 hESC vonal számos munkacsoport rutinszerűen használt sejtje és az első klinikai vizsgálatnál (gerinc sérülés-terápia, Geron, Manley és mtsai., 2017) is ezzel készült. Ugyanebből a biobanki forrásból származik az IMR90-4 hiPSC vonal is, amely majd 100 sejt vonal vizsgálata után is a legjobban differenciálható sejtnek bizonyult. A ReproCell sejteket a Yamanaka munkacsoporttól kaptuk, a differenciáltság hatékonysága és a sejt kultúra stabilitása azonban elmaradt a másik két vonaltól, ma már ezt nem használjuk.

[A Bíráló felveti a továbbiakban, hogy az Ang II-vel végzett stimulálás szükségességét \(17. kérdés\).](#)

Az angiotenzin II hatását több modellben is megvizsgáltuk és ezeket részletesen is elemeztük. Ezeket az őssejtekre vonatkozó eredményeket a 3.3 és 4.4 részek ismertetik (23b. ábra, 37. ábra), a sejtmagtranszport és neonatális patkány szívizomsejtek hypertrophiáját a 4.2 fejezet. Vizsgálataink egyik fontos következtetése az volt, hogy az angiotenzin II az embrionális őssejt-eredetű szívizomsejteken 48 órás kezelést követően növeli a sejt méretet és fokozza a nátriuretikus peptidok expresszióját. A sejtípusok közötti különbségeknél magyarázatként fontos kiemelni, hogy az angiotenzin II az egyes sejtípusokban csak minimális sejt méret növekedést okoz, de az ANF és a BNP expresszióját növeli a hESC-CM sejtekben is. Ez arra utal, hogy a G-protein kapcsolt receptor jelátvitel nem teljesen inaktív ezekben a sejtekben. Az in vivo kísérletekben ACE inhibitor hatásait vizsgáltuk. A bevezetőben az angiotenzin II jelátviteli utakat „1.2.2.2. Angiotenzin receptorok” fejezet foglalja össze.

A Bíráló az immunzsuppresszáns kísérletek kapcsán hiányolja a magyarázatot a Bevezetőből, hogy miért volt szükséges a kísérletek elvégzése (18. kérdés).

Köszönöm a kérdést. Az erre vonatkozó háttér a „1.1.4 sejthalál transzplantált sejtekben” alfejezetben szerepel. Valóban igaz, hogy a kérdéses jelátvitel pontosabb leírására, annak esetleges átfedésére a hypertrophiás útvonallal, csak a „4.1.3. Immunzsuppresszív szerek a szívizomsejtek halálózásában” fejezetben térek ki. A két rész összevonása szerencsésebb lett volna.

A következő kérdés az volt, hogy az in vivo vizsgálataink hogyan kapcsolódnak az őssejtek szerepének kutatásával a szívizomhipertrófia és/vagy a szívelégtelenség tekintetében (20. kérdés)?

Az in vivo kísérletek bemutatását fontosnak gondoltam ebben az Értekezésben. Számos elemében kapcsolódik az őssejt-eredetű és primer szívizomsejteken végzett in vitro vizsgálatainkhoz. A bemutatott tumor-által indukált szívelégtelenség modellben az in vitro bemutatott jelátviteli útvonalak jelentősége igazolható volt. Ez igaz volt a szívszöveti sejthalálózási jelátviteli útvonalaira, és az adrenerg és renin-angiotenzin rendszer hatásaira egyaránt. A jelátviteli utak konzervatív működése aláhúzza azok fontosságát és azt is igazolva látom ezáltal, hogy ezek befolyásolása új terápiás lehetőségeket jelenthet a jövőben. A kardiális őssejtszármazékok hypertrophiás és más adaptív válaszában in vivo vizsgálata, például transzplantációt követően valóban logikus következő lépés lehet, amely egyelőre túlmutat a jelen dolgozatom keretein.

A Bíráló a következőkben arra kérdez rá (23.kérdés), hogy a chelerythrine (keleritin) molekulát hogyan választottuk ki és voltak-ezzel korábbi kísérletek? Mennyiben kapcsolódik ez a kísérletsorozat a szívizom hipertrófiához és/vagy szívelégtelenséghez.

A chelerythrine molekula két évtizede használt szer, amellyel a szívizomsejtek sejthalálózási profilja értékelhető és a hypertrophia moduláló hatása is igazolt patkány szívizomsejtekben. A módszerek ezzel a molekulával a 3.6. részben foglalkozik. Itt mutatom be azokat a chelerythrine-nel végzett előzetes kísérleteinket, amelyekre azután sejthalálózás modellünk épült. Az volt a megfigyelésünk, hogy az oxidatív stressz vizsgálatára ez a molekula kiválóan alkalmas és használata technikailag is könnyebb, mint a nagyon szűk dózistartományú hidrogén peroxidé.

A Bíráló megjegyzi, hogy a „4.1.2. Kardiotoxikus szerek vizsgálata hPSC eredetű szívizomsejteken” rész nem követi a Célok sorrendjét (24. kérdés). Nem derül ki miért végeztük el a kísérleteket és hogyan kapcsolódik a szívelégtelenséghez és az őssejt tenyésztéshez és esetleges terápiához.

A sejthalálózás szívelégtelenségben betöltött szerepét sokat vizsgáltuk és a Bevezető erre részletesen kitér. A célunk az volt, ahogy ezt a Célkitűzések 6. pontjában feltüntettem, hogy a humán őssejtszármazékok és a pluripotens technológia automatizált felhasználásával új toxicitási vizsgálatokat tudjunk elvégezni. Ezeket a kísérleteink megvalósították, a kidolgozott új assay-k a gyógyszerfejlesztés sejtes fázisában és akár a kardiovaszkuláris betegségmodellezésben jól alkalmazhatóak. A közvetlen sejterápiás hasznosítása ennek az eljárásnak azonban egyelőre nem tisztázott, de felmerülhet a transzplantált sejtek in vivo közvetlen vizsgálata. Ehhez a metodika eljárások még nem teljesen állnak rendelkezésünkre.

A Bíráló a sejtmag importfolyamatáról szóló részre kérdez rá (26. kérdés) és felveti, hogy ez a bekezdés nem Eredményekhez tartozik.

A kérdéses bekezdés egy általunk elvégzett kísérletsorozat összefoglalása, az ehhez kapcsolódó oszlopdiagrammok - szerkesztési okokból - csak a következő oldalon, a teljes, komplex jelátvitelt bemutató, de teljesen ezen eredményeken alapuló sematikus ábra pedig néhány sorral lejjebb került bemutatásra. A többi fejezethez hasonlóan, a megbeszélés néhány mondatával értékelem el a kísérleteket.

A kutatási eredmények gyakorlati jelentősége részre vonatkozik a következő kérdés (28. kérdés), hogy a klinikai gyakorlatban vagy terápiásan használhatók lesznek-e a megtanult mechanizmusok.

A talán visszafogott összefoglalóm ellenére azt gondolom, hogy ezek a sejtek és mechanizmusok komoly potenciált jelentenek. Az értekezés benyújtása óta eltelt időszakban mind a gyógyszeriparban, mint a fejlett terápiákkal foglalkozó kezdeményezésekben az őssejt-eredetű sejtek teret nyertek. Az hiPSC-eredetű szívizomsejtek az amerikai Food and Drug Administration gyógyszerfejlesztési protokolljába bekerültek és az új molekulák biztonságosságának ellenőrzésére javasolják a sejtek használatát (Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay, Blinova és mtsai., 2018). Az értekezésben arra is kitértem, hogy a sejtek betegségmodellezésben való alkalmazása szintén nagy jelentőségű. Nem csak a monogénes betegségek jobb megismerése érhető el így, hanem komplex genetikai hátterű vagy szerzett betegségek mechanizmusa vált megismerhetővé ezáltal lehetővé.

A Bíráló a következőben arra kérdez rá, hogy milyen humán és állatkísérletes próbálkozások volt összejtterápiával a szívizombetegségekben (29. kérdés).

A kardiovaszkuláris összejtterápia több mint 20 éves múltra tekint vissza. Mára több mint 50000 cikk foglalkozik ezzel, a clinicaltrials.gov oldalon eddig 3000 ide kapcsolódó vizsgálatot regisztráltak, ezekből 800 aktív. A pluripotens összejtek azonban még csak most kerülnek a klinikai kipróbálásra, a szívelégtelenség egyik indikációja ezeknek az első vizsgálatoknak. Ebből az összejttípusból valódi, a felnőtt sejtekhez sokban hasonlító sejteket tudunk létrehozni és a regenerációs folyamatok mechanizmusa is jobban érthető mára, ez a klinikai hatékonyságnál előnyt jelent. Az értekezés csak érinti ezt a kérdést, de az elmúlt években számos publikációban vitattuk meg a klinikai translációhoz szükséges következő lépéseket, amelyekkel a késői preklinikai vizsgálatoktól a klinikai alkalmazásig lehet a sejteket „elvinni”. Ezeknél többek között az tűnik fontos elemnek, hogy az alkalmazott eljárásokkal meghaladjuk a sejtek egyszerű beinjektálását és komplexebb szöveti rendszereket hozzunk létre transzplantációs célra.

Végül arra kérdez rá a Bíráló, hogy az új összejtszármazékok hogyan épülnek be a szív elektromos szintiumába? Képesek e más szövetek termelésére, amik szintén szükségesek a szív működéséhez (30. kérdés)?

A transzplantált szívizomsejtek integrációja sok tekintetben eddig megoldatlan problémát jelentett. Saját és más munkacsoportok vizsgálatai azt mutatják, hogy a szívbe juttatott összejt-eredetű szívizomsejtek csak kis százalékban képesek a szívizomzatban megmaradni a transzplantációt követően. A megtapadó sejtek extracelluláris mátrixot hoznak létre és a graftok vaszkularizációja is megfigyelhető, ez utóbbi elsősorban a recipiens szív endotheliumából indul ki. A sejtek megtapadásának javítására több eljárás is dolgozunk: a beadandó sejtszám növelése, új szövetépítéssel kombinált transzplantációs és sebészi eljárások alkalmazása és immunitás modulálása a legsikeresebbek ezek közül, ezek a graft megtapadását és a kamrai funkciót is javítják. Az elektromechanikus integráció nem minden esetben sikeres, hESC-eredetű szívizomsejtek implantációja kamrai ritmuszavarokat eredményezhet (Shiba és mtsai., 2012; Chong és mtsai., 2014), ez nagyállatmodellben még egyértelműbben megfigyelhető. Sertés infarktust modellben a  $1 \times 10^9$  hESC-eredetű szívizomsejt beültetése a szívszövet mennyiségét ugyan érdemben növeli, ez azonban minden esetben tachyarrhythmiával jár együtt (Romagnuolo R és mtsai., 2019). Megoldásként felmerülhet, hogy a differenciációs protokollok további finomításával kamra-specifikus MLC2v markerre pozitív sejteket hozzunk létre és juttassunk be a jelenlegi heterogén populáció helyett.

Végezetül még egyszer köszönöm Koller Professzor Úr bírálatát és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását!

Tisztelettel és köszönettel:



Dr. Földes Gábor doktorjelölt

Budapest, 2019.10.04.

#### Hivatkozások

1. Blinova K, Dang Q, Millard D, Smith G, Pierson J, Guo L, Brock M, Lu HR, Kraushaar U, Zeng H, Shi H, Zhang X, Sawada K, Osada T, Kanda Y, Sekino Y, Pang L, Feaster TK, Kettenhofen R, Stockbridge N, Strauss DG, Gintant G. international multisite study of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug proarrhythmic potential assessment. Cell Rep. 2018;24:3582.
2. Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Cook SM, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. Nature. 2014;510:273.
3. Földes G, Madeddu P. (szerk.). Multicellularity In the cardiovascular system. Frontiers Cardiovasc Med. 2019; doi: 10.3389/fcvm.2019.00002



4. Gentillon C, Li D, Duan M, Yu WM, Preininger MK, Jha R, Rampoldi A, Saraf A, Gibson GC, Qu CK, Brown LA, Xu C. Targeting HIF-1 $\alpha$  in combination with PPAR $\alpha$  activation and postnatal factors promotes the metabolic maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;132:120.
5. Hu D, Linders A, Yamak A, Correia C, Kijlstra JD, Garakani A, Xiao L, Milan DJ, van der Meer P, Serra M, Alves PM, Domian IJ. Metabolic maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by inhibition of HIF1 $\alpha$  and LDHA. *Circ Res.* 2018;123:1066.
6. Manley NC, Priest CA, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cells: preclinical efficacy and safety in cervical spinal cord injury. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6:1917.
7. Mas-Bargues C, Sanz-Ros J, Román-Domínguez A, Inglés M, Gimeno-Mallench L, El Alami M, Viña-Almunia J, Gambini J, Viña J, Borrás C. Relevance of oxygen concentration in stem cell culture for regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2019;20:E1195.
8. Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, LaManna JC, Chavez JC, Klein PS, Simon MC. O<sub>2</sub> regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nat Cell Biol.* 2010;12:1007.
9. Nakada Y, Canseco DC, Thet S, Abdisalaam S, Asaithamby A, Santos CX, Shah AM, Zhang H, Faber JE, Kinter MT, Szweda LI, Xing C, Hu Z, Deberardinis RJ, Schiattarella G, Hill JA, Oz O, Lu Z, Zhang CC, Kimura W, Sadek HA. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature.* 2017;541:222.
10. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, Tallquist MD. Revisiting cardiac cellular composition. *Circ Res.* 2016;118:400.
11. Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, Grinsfelder D, Rothermel BA, Chen R, Garcia JA, Santos CX, Thet S, Mori E, Kinter MT, Rindler PM, Zacchigna S, Mukherjee S, Chen DJ, Mahmoud AI, Giacca M, Rabinovitch PS, Aroumougame A, Shah AM, Szweda LI, Sadek HA. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell.* 2014;157:565.
12. Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sánchez A, Qiang B, Barry J, Laskary A, Qi X, Massé S, Magtibay K, Kawajiri H, Wu J, Valdman Sadikov T, Rothberg J, Panchalingam KM, Titus E, Li RK, Zandstra PW, Wright GA, Nanthakumar K, Ghugre NR, Keller G, Laflamme MA. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate the infarcted pig heart but induce ventricular tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports.* 2019;12:967.
13. Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, Van Biber B, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA. ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature.* 2012;489:322.
14. Shooter RA, Gey GO. Studies of the mineral requirements of mammalian cells. *Br J Exp Pathol.* 1952;33:98.