

Jost Norbert László – MTA doktori értekezés

„Az antiaritmiás és proaritmiás hatások mechanizmusának celluláris szintű vizsgálata emlősszívekben”

Válasz Dr. Csernoch László Professzor Úr opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Csernoch László Professzor Úrnak, hogy MTA doktori értekezésem bírálatát elvállalta és időt szakított annak értékelésére. Köszönöm kritikai megjegyzéseit és hogy felhívta figyelmemet a disszertáció megírásakor elkövetett hibákra. A formai kifogásokat, elírásokat bíráló megjegyzéseit természetesen elfogadom. Feltett kérdésre az alábbiakat válaszolom:

1. A disszertáció szerkezetére (vonatkozó kritikai megjegyzés):

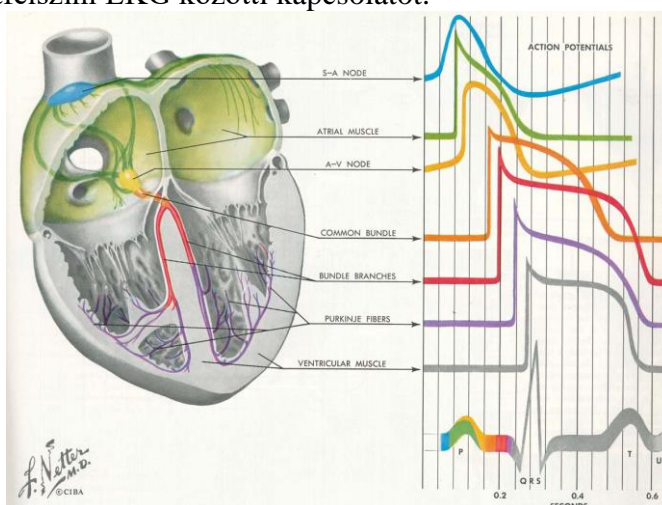
Értem és részben egyet is értek a Bírálónak az értekezésben szereplő redundanciák és ismétlések hossza miatt megfogalmazott kritikai megjegyzéssel. Az értekezés megírásakor magam is szembesültem azzal, hogy nehéz lesz megtalálnom az egyensúlyt az értekezés hossza és az érthetősége között. A helyzetet az is bonyolította, hogy nehezen találtam megoldást, hogy miképpen taglaljam a 4 eltérő témakört, hogyan tudjam a kétségkívül terjedelmes anyagot úgy bemutatni, hogy annak szövege már csak a bírálót is kímélve, ne legyen lehetetlenül hosszú. Szintén a bírálót is kímélve kellett mégis úgy döntenem, hogy az irodalmi háttérrel kellő alaposággal bemutatom a témaválasztást indokló Bevezetés fejezetben, mert anélkül nem világos a 4 témakörre bontott célkitűzés. Később, hogy bírálónak majdan ne kelljen mindig visszalapozni az elejére egyes jelenségeket, akár a redundancia vádját is vállalva, mégis helyenként meg kellett, hogy ismétljem a szöveget az Eredmények fejezet egyes alfejezetei elején, hogy a Bíráló megérthesse, mikor, miért és milyen vizsgálatokat mutatok majd be. Ez a választás magában hordozta, hogy valóban helyenként már többszörösen is redundánssá váltak az egyes témakörökhöz kapcsolódó ismétlődések, különösen az első témakör (különböző antiaritmiás szerek) vagy a negyedik témakör (NCX gátló szerek) esetében. Enyedi Péter professzor bírálatában például megfogalmazta, hogy az értekezés olvasása közben még így is többször kellett visszalapoznia, hogy újra áttekintse az előzményeket a jobb megértés céljából. Mindezt azért úgy értékelem, hogy helyes volt az általam választott megközelítés, de ekkora terjedelmű munka ismertetése mindenképpen magában hordozza annak a kritikának a veszélyét, hogy lesz, aki az értekezést túl hosszúnak vagy redundánsnak tarja, de olyan is, aki szerint még így sem koherens a szöveg, és többször vissza kell lapoznia az amúgy is túl terjedelmes disszertációban.

2. Pontatlan megfogalmazások, helyesírási hibák listája.

A Bíráló legtöbb jelzett/idézett hibája jogos, egyetértek vele, ezért nem kívánok (pl. a jelzett vessző, egyeztetési, vagy névelőhasználati hibák, stb.) mindegyikre reagálni. A következő kettő észrevételhez szeretnék csak választ adni:

Értelemszerű, hogy hibás volt a testfelszíni elektrokardiogramot (EKG-t) úgy definiálnom, hogy az a szívét alkotó szívműködés akciós potenciáljainak (AP) algebrai összege. A pontatlan/hibás megfogalmazás háttérében az van, hogy az intézet által másodéves orvostan-hallgatóknak meghirdetett szívelektrofiziológiai előadásokon, a fenti megfogalmazást szoktam az egyszerűsítés kedvéért használni, amikor az ismert Frank

Netter által szerkesztett ábra (1. ábra) segítségével ismertetem a szívizomsejtek akciós potenciálja és a testfelszíni EKG közötti kapcsolatot.



1. ábra. Az EKG és az akciós potenciál kapcsolata (forrás <https://www.netterimages.com/images/vpv/000/000/021/21375-0550x0475.jpg>).

Értelemszerűen a testfelszíni elektrokardiogram a szívizomrostok eredő (difázisos) akciós potenciálja a testfelszínen regisztrálva, és természetesen függ attól, hogy melyik két pont (elvezetés) között regisztráljuk, így különböztetve meg az ismert I, II és III elvezetéseket.

A 11. oldalon zárójelben szereplő MJ 1999 kifejezés, nem téves irodalmi adat, hanem a széleskörűen ismert és alkalmazott racém *d,l*-sotalol III-as osztályú antiaritmiás gyógyszer korábbi, még kísérletes vegyületként ismert kódneve (MJ 1999) (lásd Lish, 1967). A Bíráló által látszólag helyesen kifogásolt szövegrészlet így csak egy „szerencsétlen” megtévesztő jelölés volt, mert az értekezésben mindenütt a zárójelben írt szerző családneve és a megjelenés éve írásmódot használtam a szövegközi idézetek jelölésére. Így az (MJ 1999) kifejezés zárójelben akár egy téves idézetnek is tűnhetett.

Lish PM, Shelanski MV, LaBudde JA, Williams WR 1967). Inhibition of cardiac chronotropic action of isoproterenol by Sotalol (MJ 1999) in rat, dog and man. *Curr Ther Res Clin Exp* 9(6):311-312.

3. Az 1. ábrára vonatkozó észrevétel.

Az első ábrán szereplő pitvari és kamrai akciós potenciálokra természetesen lehetett volna idő és feszültség tengelyeket (vagy mértékegységeket tenni). Jelen esetben ez azért maradt el, mert az 1. ábrán valójában az akciós potenciálok fázisait, és a jelenlegi elektrofiziológiai ismereteink alapján szerkesztett pitvari és kamrai transzmembrán ionáramok kinetikai lefolyását ábrázoló vázlatos piktogramokat szerepeltettem. Az 1. ábra felirata külön ki is emeli, hogy a megadott piktogramok csak vázlatosan szemléltetik az adott ionáram méretét és kinetikai lefolyását. Ha az ábrára felkerültek volna a méretarányos idő és feszültség tengelyek is az akciós potenciálok kiegészítéseként, akkor a jelenleg szereplő vázlatos piktogramok mindenképpen megtévesztőek lettek volna. Jelenlegi ismereteink viszont nem elégségesek ahhoz, hogy egy ilyen ábrán precíz, méretarányos piktogramokkal szemléltessük az ismert transzmembrán ionáramok akciós potenciál alatti kinetikai lefutásukat.

4. A 6. ábrára vonatkozó észrevétel.

A nátrium-kalcium cseremechanizmus (NCX) áram mérésére sajnos még mindig nincsen „arany standardnak” is tekinthető, relatíve egyszerű, könnyen végrehajtható és reprodukálható mérési protokoll. Az értekezésben a Hobai és *mtsai* 1996-ban publikált módszerét alkalmazzuk, amelynek a lényege az, hogy az NCX áramot „10 mM NiCl₂ szenzitív áramként” definiáljuk.

Bírálónak természetesen igaza van abban, hogy a tesztvegyület hatását akkor is megkapjuk, ha a „B” panel alatti áramgörbéből közvetlenül a „C” panel alatti áramgörbét kivonjuk, mert akkor a reziduális (nem NCX) áram („D” panel alatti) is kivonódik. Ha csak annyi lett volna célunk, hogy megállapítsuk az ORM-10103 vagy GYKB-6635 vegyületek hatékonyságát (EC₅₀ értékek), akkor gyakorlatilag elég lett volna a jelzett B-C különbségeket figyelembe venni. Természetesen itt meg kell jegyezni, hogy ebben az esetben sem lehet feltétlenül pontosan meghatározni a két véglet értéket (0 illetve 100% gátlóhatást), annak precízebb meghatározása csak a reziduális áram kivonásával megállapított kontroll illetve tesztvegyület áramgörbék segítségével lehetséges. Ugyanakkor a reziduális áram kivonása szükséges volt a 39A. és 40A. ábrákon szereplő koncentráció-függő „kvázi eredeti” regisztrátumok, illetve a 39B. és 40B. ábrákon látható áram-feszültség karakterisztikák bemutatásakor is.

5. A 9. ábrára vonatkozó észrevétel.

A Bírálónak teljesen igaza volt, hogy rákérdezett, hogy mi lehet az oka a dronedaron és az amiodaron alkalmazása előtti korai utódepolarizációs potenciálok (EAD-okat) bemutató kontrol felvételeken (9A. ábra bal oldali felső és alsó panelek) jól látható és nehezen interpretálható jelentős akciós potenciál időtartam (APD) különbségeknek. Meg kell vallanom magam is meglepődve észleltem mindezt, amikor olvastam a Bíráló kérdését. Teljesen nyilvánvalónak tűnt számomra is, hogy bár ismert jelenség, hogy az egyedi szívizomsejteken regisztrált akciós potenciálok jelformái vagy kinetikai paraméterei között akár jelentős különbségek is lehetnek, a jelen esetben, ez azért mégis teljesen kizártnak tűnt, ugyanis szinte lehetetlen, hogy 5000 ms-os ciklushossznál (vagyis extrém bradycardiában) egy Purkinje rost EAD esetében az APD mintegy 300 ms legyen, mint a felső panelen látható dronedaron kísérletben. Ez a megállapítást, azt is megerősítette, hogy a párhuzamos kísérletben, a dofetilid csak mintegy 2500-3000 ms hosszú akciós potenciáloknál okozott EAD-okat. Utóbbi teljesen egybevág a saját és az irodalmi adatokkal. Ellenőriztem a nevezett ábrát bemutató eredeti dolgozatunk (Varró és *mtsai*, Br. J Pharmacol, 2001) megfelelő ábráját (5. ábra), és ott is pontosan így szerepelt, ahogy külön az értekezésben történő szerepeltetéskor magyarosítva átszerkesztettem (2. ábra, bal oldali panel). Mindez legalább megerősítette, hogy nem egy a szerkesztéskor bekövetkezett „gépelési hiba” eredménye. Előkerestük az eredeti 1999-2000-es mérési adatokat, és megállapítottuk, hogy akkori Lotus – Freelance szoftveres export alatt követtünk el egy banális hibát, és akkor került fel a dolgozat 5. ábrájának felső dronedaron hatást bemutató panelre a téves „200 ms” hosszú markerjel, amíg az alsó panelen meg helyesen szerepeltettük a „1000 ms” hosszú markerjelet.

Összegezve, teljesen nyilvánvaló, hogy a 200 ms markerjel egy gépelési hiba, ugyanis a két panel teljesen méretarányos, vagyis a felső panelen esetében is a helyes méret az 1000 ms hosszú markerjel. Különösen érdekes, hogy 2000-2001-ben a hosszú, kétkörös British Journal revízió alatt sem tűnt fel egyetlen bírálónak vagy szerkesztőnek ez a hiba. Így nem tehetek mást, minthogy elismerem és megköszönöm a Bírálónak a jelzett hibát. Az 9A. ábra felső panelje helyesen így néz ki (2. ábra, jobb oldali panel).

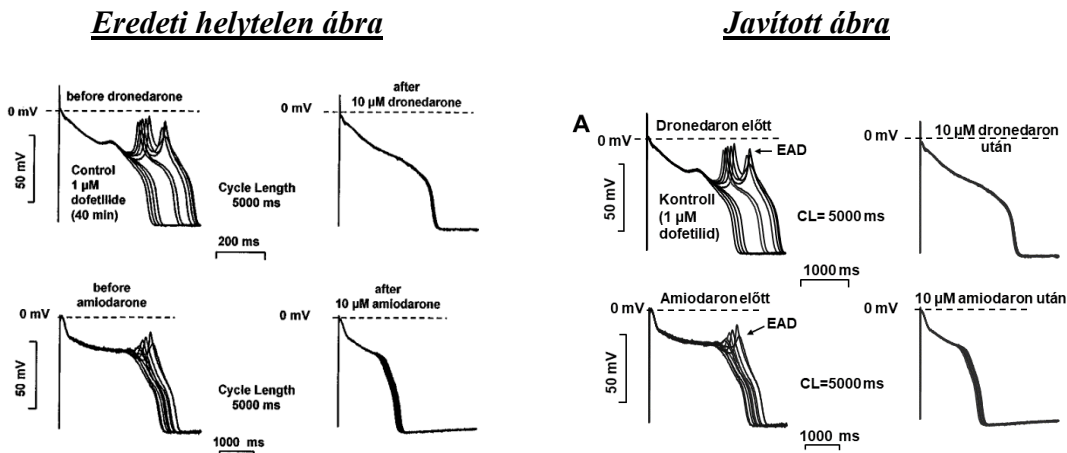
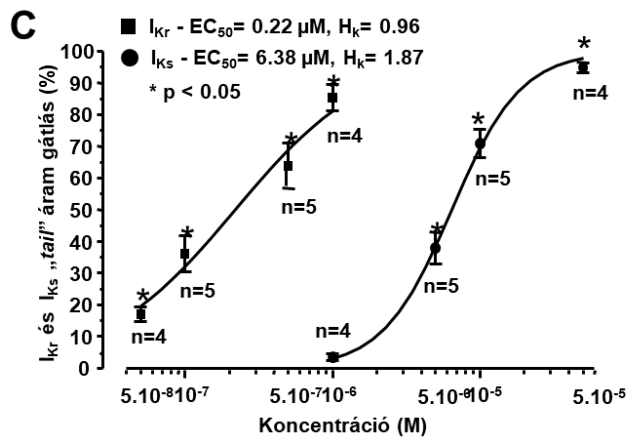


Figure 5 The effect of acute dronedarone and amiodarone superfusion on the early afterdepolarization (EAD) in dog cardiac left ventricular Purkinje fibres. EADs were evoked by 1 μM dofetilide at stimulation cycle length of 5000 ms. After superfusion with either 10 μM dronedarone or 10 μM amiodarone in the continuous presence of dofetilide, EADs were abolished.

2. **ábra.** Az értekezésben szereplő és az eredeti dolgozatban szereplő helytelen ábra (Varró, Br. J Pharmacol, 2001) ábra (bal oldali panel) és javítás után (jobb oldali panel).

6. A 13. ábrán bemutatott I_{Kr} és I_{Ks} áramok dózis-hatás görbékre illesztett egyenletek Hill koefficiensekre vonatkozó kérdés.

Bíráló jogosan jelezte, hogy a 13. ábrán (I_{Kr} és I_{Ks} áramok dózis-hatás görbékre illesztett Hill egyenletek) nem szerepeltettem az illesztések Hill koefficienseit, sem a szövegben, sem az ábraszövegben. Előkerestem az eredeti illesztések jegyzőkönyveit, és sikerült megtalálnom az illesztések adatait. A hiányzó értékekkel kiegészítettem az ábrát, amely így néz ki (3. ábra):



3. **ábra.** Az értekezésben szereplő 13. ábra az illesztések Hill koefficienseivel kiegészítve.

Bírálónak igaza volt, amikor kiemelte, hogy számára nyilvánvaló, hogy a görbék lefutása alapján feltételezhető, hogy a két Hill-koefficiens eltérő. Valóban a számok igazolták, hogy az I_{Kr} áram esetében ahol a görbe laposabb volt (bal oldali görbe), ott a Hill-koefficiens megközelítőleg egy volt ($H_k=0.96$), míg az I_{Ks} esetében, ahol az illesztett görbe sokkal meredekebb volt (jobb oldali görbe) ott a Hill-koefficiens megközelítőleg kettőnek bizonyult ($H_k=1.87$). Bíráló helyesen sejteti, hogy az I_{Ks} esetében a 2-höz közeli Hill-koefficiens a kötőhelyek közötti maximálisan pozitív kooperativitást feltételezi, ami úgy történhet meg, hogy a ligand az egyik kötőhelyre belépve oly módon módosíthatja a többi

kötőhelyet, hogy elősegíti a soron következő ligand molekula kötését. Az I_{Kr} áram esetében az 1-hez közeli Hill-koefficiens azt jelenti, hogy ott hiányzik az előző esetben említett kooperativitás.

7. 15. ábra Tedisamil „onset kinetikára” vonatkozó kérdés.

A Bíráló észrevétele teljesen helytálló, ugyanis az említett ábrán látható, hogy a kontroll V_{max} értékek nagy frekvenciájú (CL=400 ms) „train” alatt fokozatosan csökkennek és mintegy 30 ütés után érik el a kvázi *steady-state* szintet. Ennek a csökkenésnek az amplitúdója hozzávetőleg 2.5-3.0 V/s volt. A csökkenés oka a magas frekvencia következtében fellépő lokális extracelluláris K^+ -akkumuláció volt, amely a Nernst egyenlet szerint csökkenti a nyugalmi membránpotenciál értékét, és ennek következtében a Na-csatornák részleges inaktivációjához vezet, amely okozza a V_{max} csökkenését is. A tedisamil esetében ugyanezt tapasztaltuk, azonban, amint a 15. ábrán is látható, ezúttal az első nyolc-tíz ütés sokkal jelentősebb V_{max} csökkenést mutatott (kb. 50 V/s), amely a gyógyszer frekvenciafüggő Na-csatorna gátló hatásának az eredménye. Mivel a kontroll mérések esetében az „onset kinetikára” időállandót nem adtuk meg, a gyógyszerhatást csak és kizárólag ennek a gyors komponensnek a kinetikája alapján számoltuk, és figyelmen kívül hagytuk a kontroll állapotban bár alacsony amplitúdójú, de azért mindenképpen észlelhető lassú komponens. Mindazon által meg kell jegyezünk, hogy ez egyszerűsítés némi pontatlanságot okozhatott mind az idézett eredeti közleményben (Jost és mtsai, Curr Med Chem, 2004), mind a jelen értekezésben. Így utólag is egyetértve a Bíráló megjegyzésével helyesebb lett volna a folyamatot a kontroll esetében egy, a szerhatás esetében kettő exponenciális függvényekkel illeszteni még akkor is, ha ez a közleményben hosszadalmasabb vagy bonyodalmasabb taglalást okozott volna.

8. 17. ábrára vonatkozó kérdés „a kontroll humán akciós potenciálok között eltérések magyarázata”

Egyértelműen kijelenthető, hogy a 17A. ábrán látható három különböző humán szívizomsejten regisztrált akciós potenciál jelformában látható eltérések az egyedi variabilitást tükrözik. Különösen figyelembe kell vennünk, hogy a három szívizomsejt három különböző korú és nemű donorszívekből származik. Természetesen nem zárható ki, hogy szerepet játszhat egy regionális eltérés is. Jegyzőkönyveink alapján nem tudtam megállapítani, hogy az adott regisztrátum pontosan melyik régióból származik, de mint a Módszerek fejezeteknél is kiemelttem, jellemzően mindig arra törekedtünk, hogy a regisztrált nyusedékek a jobb kamrai endokardiális trabekulából vagy papilláris izomból származzanak. Utóbbi jól látható különösen a sotalol, vagy a mexiletin kísérleteket bemutató regisztrátumok esetében, ahol mindkét esetben tipikus endokardiális „notch” nélküli akciós potenciált mutattunk be. A GYKI-16638 mérés esetében bemutatott kontroll akciós potenciál esetében (ahol látszik egy *notch* is) akár lehetséges, hogy a kísérlethez használt endokardiális nyusedékben volt egy kis endokardiális Purkinje érintettség, ami gyakori jelenség ezen preparátumok esetében.

9. A 27. ábrára vonatkozó kérdés „immunfluoreszcencia kísérletek ko-lokalizációja”

A 27. ábra a SAP97 és Kir2.2 immunhisztokémiai vizsgálatokat, konkrétan a két fehérje ko-lokalizációját mutatja be az interkaláris diszkuszban donor és DCM humán szívekből származó izolált miocitákban. A szívizomsejtek között található interkaláris diszkusz funkcionális egységet alkot, amelyben a réskapcsolat (gap junction), adherens junkció és

dezmoszómák mellett az ioncsatorna fehérjék, elsősorban Na⁺- és K⁺-csatorna fehérjék is rendeződnek (Vermij, 2017). A szövet strukturális integritásának megadásán túl az interkaláris diszkusznak alapvető szerepe van a normál szív működés fenntartásában, az ingerületvezetésben (elsősorban a konnexinek és a konduktanciáért felelős Na⁺-csatornák játszanak szerepet) és a kontraktilitásban is (Ca²⁺-háztartás/hipertrófiás válasz szabályozásában). Az interkaláris diszkuszban rendeződő Na-csatornák és a SAP97 kapcsolata már ismert volt régebről is (Petitprez, 2011), ahogy a Na-csatorna és a Kir2.x csatornák rendeződése és kölcsönös funkcionális kapcsolata a t-tubulusok és az interkaláris diszkusz mentén is (Milstein, 2012).

Emiatt a Kir2.x és a SAP97 lokalizációja az interkaláris diszkuszban nem meglepő, ez az eredmény megfelel az irodalomban fellelhető korábbi adatoknak is. A 27. ábrán azt láthatjuk, hogy a Kir2.1 és SAP97 ko-lokalizációja az intakt szívizom sejtekben a diszkusz interkalárisokban alacsonyabb intenzitással jelenik meg, amit a dilatatív kardiomiopátia (DCM) láthatóan eltüntetett. Ugyanakkor a szívizom sejtek citoplazmájában igen valószínű, hogy az endoplazmatikus retikulum felszínén mindkét fehérje utántermelése zajlik, így ehhez az organelumhoz köthetően látható az erős ko-lokalizálódó jelölés (DCM-ben szemmel láthatóan ezúttal is csökkent). Utóbbi megfigyelést egy megfelelő endoplazmatikus retikulumhoz kötődő, az itt alkalmazott zöld és vörös festődéstől eltérő színű fluoreszcens marker alkalmazása tudná alátámasztani (pl. ER-Tracker™ Blue-White DPX Dye).

A SAP97 és Kir2.2 párhuzamos expressziós mintázata nem szolgáltat elegendő bizonyítékot az olyan ok-okozati kapcsolat feltárására, mint például az, hogy a SAP97 downreguláció miatt csökkent a Kir2.1 vagy fordítva, vagy esetleg egymástól függetlenül. A SAP97 knock-out egér modellből nyert adatok alapján ugyanakkor úgy tűnik, hogy a SAP97-nek alapvető szerepe van a Kir2.1/Kir2.2 (I_{K1}-áram), Kv4.2/Kv4.3 (I_{to}-áram) illetve Kv1.5 (I_{Kur}-áram) funkció szabályozásában az interkaláris diszkuszban (Gillet, 2015).

Gillet L, Rougier JS, Shy D, et al (2015). Cardiac-specific ablation of synapse-associated protein SAP97 in mice decreases potassium currents but not sodium current. *Heart Rhythm* 12:181-192.

Milstein ML, Musa H, Balbuena DP, et al (2012). Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(31):E2134-E2143.

Petitprez S, Zmoos AF, Ogrodnik J, et al (2011). SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res* 108(3):294-230.

Vermij SH, Abriel H, van Veen TA (2017). Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc Res* 113(3):259-275.

10. 29. ábrára vonatkozó kérdés „hogyan viszonyul a bemutatott I_{net} a szintén bemutatott I_{K1} és I_{Kr} áramokhoz”

Az I_{net} az AP-ből és a sejt kapacitásából számított nettó áram, amely felelős a membránpotenciál értékének pillanatnyi változásáért. Biofizikai értelemben az I_{net} mindazon membránáramok összege, amelyek az adott pillanatban a membránon keresztül folynak (mindkét irányban). Az I_{K1} és az I_{Kr} ezen áramok közül kettő, amely vizsgálataink fókuszában volt. Egyrészt látható, hogy a két áram közül egyrészt az I_{K1} áram jóval nagyobb, mint az I_{Kr}, vagyis az I_{K1} hozzájárulása az I_{net}-hez nagyobb mint az I_{Kr}-áramé. Másrészt az is látható az ábrán, hogy az I_{K1} nagysága az I_{net} nagyságának kb 80%-a, vagyis az AP harmadik fázisában a repolarizáló erők jelentős részéért az I_{K1} a felelős.

Fel kell hívni a figyelmet arra, hogy az I_{K1} és az I_{Kr} összege valószínűleg nem adja ki matematikailag az I_{net} értékét. Bizonyított például, hogy az AP harmadik fázisa alatt jelentős I_{NCX} folyik a membránon keresztül, amely egy jelentős inward, azaz depolarizáló árammal járul hozzá az I_{net} értékéhez (Bányász, 2012). Mivel esetünkben az I_{K1} és az I_{Kr} összege (vizuálisan megítélve) megközelítőleg azonos nagyságú az I_{net} -el, ez arra enged következtetni, hogy a membránon átfolyó egyéb ionáramok, például a biztosan jelen lévő I_{NCX} és I_{Ks} , továbbá a valószínűleg jelenlévő klorid és nátrium áramok matematikai összege elhanyagolható, vagyis körülbelül egy nulla körüli értéket ad ki. A cikkben bemutatott ábrán pontosan azért nem tüntettük fel az I_{K1} és az I_{Kr} összegét, mert az összegnek az I_{net} -el történő nagyfokú egybeesése (szándékainkkal ellentétben) esetleg azt sugallta volna, hogy az I_{net} létrehozásában más áramok nem vesznek részt.

Bányász T, Horváth B, Jian Z, et al (2012). Profile of L-type Ca^{2+} current and Na^+/Ca^{2+} exchange current during cardiac action potential in ventricular myocytes, Heart Rhythm 9(1): 134-142.

11. 33. ábrára vonatkozó kérdés „a single channel aktivitások értékelése”

Bírálnak elméletben igaza van, hogy hiányolja a 33. ábra A paneljében az egyedi áramgörbék mellett a nyitott csatornának megfelelő egyedi áram (*unitary current*) amplitúdó szinteket jelző jelöléseket. A jelzett 33A. ábrán csak a zárt csatorna „C=closed” jelet jelöltem be, mert az általános gyakorlat is csak ezt szokta tudományos dolgozatokban megjelölni a regisztrátumokon. A nyitott csatornának megfelelő amplitúdószinteket azért nem jelölik be, mert annak meghatározása nem úgy történik, hogy a regisztrátumokról leolvassuk a legmagasabb értéket, hanem a matematika, illetve statisztikus fizika eszköztárát alkalmazva valószínűség-számítási módszerekkel határozzuk meg az áramok nagyságát, illetve a nyitási és záródási valószínűségeket (*open and closed probability*), illetve időállandókat. Ehhez statisztikai hisztogramokat készítettünk, és a hisztogram csúcsa felelt meg a *single-channel* áram amplitúdójának. Ezeket a számolt értékeket szerepeltettük a 33C. ábrán bemutatott áram-feszültség (I-V) karakterisztikákon. Az eredeti (33A. ábra) regisztrátumon zavaró és megtévesztő lett volna az előbb részletezett módon kiszámolt értéknél meghatározott amplitúdó értékeknél a nyitott állapot pozíciót megjelölni.

A gyakoriságokat a 33D. ábra részletezi, ahol bemutatjuk a két csatorna (I_{K1} és $I_{K,ACh}$) nyitási valószínűségét az SR és a cAF-es betegek szíveiből származó pitvari szívizomsejtekben. A kísérletek során a sejt-érintett (un. *cell-attached*) módszerrel mértük az egyedi csatornák áramait. A mérésekhez azt javasolják, hogy minél hegyesebb (vagyis minél kisebb átmérőjű hegygel) rendelkező pipettákat alkalmazzunk, azért, hogy lehetőleg csak egy csatornát „fogjunk” meg a „patch” alatt. Ez természetesen komoly korlátozó tényező, ugyanis a különböző áramok eltérő sűrűségű vagy akár méretű csatornákkal rendelkeznek, így előfordulhat, hogy egy pipettahegy méret alkalmas egyik áram regisztrálására, de egy másik típusra nem alkalmas, mert vagy túl nagy a pipetta (és akkor rendszeresen két vagy három csatornát is „megfogunk”) vagy az is, hogy túl szűk az átmérő és egyetlen csatornát sem sikerül regisztrálnunk, mert annak az áramnak alacsonyabb a felületi denzitása. Ez az észrevétel jelen kísérletsorozatra is igaz volt, ahol különösen a krónikusan pitvarfibrilláló paciensekből (cAF) sejtekben jellemzően kevert áramot (I_{K1} és $I_{K,ACh}$) kellett regisztrálnom. Az acetilkolin áramnak ($I_{K,ACh}$) jellemzően nagyobb volt a sejtmembrán sűrűsége, mint a befelé irányító káliumáramnak (I_{K1}). A Bíráló kérdését megválaszolva, igen sokszor láthattunk ezért dupla áramkonfigurációt (vagyis a patch pipetta kettő csatornát fogott be), ilyenkor az „áramburst” magassága dupla magas volt, és a származó áramhisztogramok is dupla áramnak „regisztráltak” azokat a tüskéket.

Ezért kiértékeléskor ezeket a regisztrátumokat nem vettük figyelembe. *Cell-attached* konfigurációban mérve igen nehéz meghatározni, sőt akár csak következtetést levonni arra vonatkozóan, hogy hány ilyen csatorna található a patch pipetta alatti sejtfelszínen. Erre csak egy hozzávetőleges megközelítő számolást lehet végezni, úgy, hogy összehasonlítjuk a *whole-cell* módban meghatározott sejtkapacitás méretet (amelyik mint tudjuk arányos a sejt felszínével) a *cell-attached* módban alkalmazott pipettánk hegyének a méretével. Ez természetesen csak egy nagyon durva és nem precíz módszer, különösen ha figyelembe vesszük azt a közismert tényt is, hogy a *whole-cell* módszer segítségével meghatározott sejtméret-normalizált áram értékek a tökéletlen diffúzió miatt pontatlanok lehetnek, különösen az olyan nagy méretű sejtekben mint amilyen a szívizomsejt.

Köszönöm még egyszer Csernoch László Professzor Úrnak a MTA doktori értekezésem formai és tartalmi értékelését. Köszönöm, hogy tudományos eredményeimet, következtetéseimet elfogadta és, hogy javasolta a nyilvános védés kitűzését, illetve sikeres védés esetén a doktori cím odaítélését támogatja. Végezetül pedig kérem válaszom elfogadását!

Szeged, 2020. május 7.

Dr. Jost Norbert László