

Válasz Prof. Bari Ferenc bírálataira

Tisztelt Professor Úr!

Először is szeretném megköszönni Professor Úr baráti hangvételi bírálatát és a méltató szavakat. Összefoglaló kérdésére, miszerint miért nem mélyültünk el egyes kórfolyamatok részletes feltárásában és foglalkoztunk inkább sokféle biológiai jelenséggel, válaszom egyszerű, de nem lesz kielégítő. A munkacsoport, amelyben hosszú ideje dolgozom nagyrészt nem orvos végzettségűekből áll és nem volt meg az az elméleti háttér, ami az egyes kórképek részletes tanulmányozásához szükséges lenne. E helyett választottuk azt az utat, hogy hasonló patológiás folyamatokban tanulmányoztuk az elemi kalciumfelszabadulási jelenségeket és próbáltunk levonni általánosságban érvényes következtetéseket. Még egy magyarázatot tudok adni kérdésre: számos esetben a kórképnek csak az állatmodellje állt rendelkezésünkre és humán minták hiányában nem tudtunk továbblépni az állításaink klinikai megerősítése felé.

A további kérdésekre a számozásuk sorrendjében adom meg a válaszaimat.

1. A fototoxicitás mikroszkópos mérések során az intenzív megvilágítás (különösen a rövid hullámhosszú lézertény) élő sejtekre gyakorolt káros hatása. Ez főképpen a reaktív oxigénfajtákon (ROS) keresztül okoz károsodást és megváltoztatja a sejtek viselkedését, morfológiáját vagy életképességét. Ez pontatlan kísérleti eredményekhez vezethet és nagy kihívást jelent az élő sejt képzésben, mivel olyan stratégiákat igényel, mint az alacsonyabb fény dózis, hosszabb hullámhosszak és a precíz megvilágítás a károk minimalizálása érdekében.

Mi a méréseink során a következő módokon próbáltuk csökkenteni a megvilágítás káros hatásait. A lézer hatásfokát mindig a minimális értéken (1-2 %) tartottuk. A szkenneléseket soha nem ismételtük meg ugyan azon a helyen az izomrostoknak, hanem új pozícióba mozgattuk a lézer megvilágítást. Igyekeztünk a lehető legrövidebb ideig megvilágítani az izomrostokat.

Méréseink során így is néha szemmel látható jeleit tapasztaltuk a fototoxicitásnak. Ilyenkor az izomroston a szkennelés helye fényesebben világított, ami emelkedett intracelluláris kalciumkoncentrációt jelzett. Ez extrém esetben olyan nagy lehetett, hogy az izomrost kontrahált. Természetesen ekkor ezeket a méréseket kizártuk a további elemzésből.

2. Az energia sűrűség nagysága szorosan kapcsolódik az előző kérdéshez. Mint említettem a lézer intenzitást 1-2 %-on tartottuk szkenneléseink során. A Zeiss LSM 510 META 488 nm-es lézere (Argon-ion lézer) 25 mW maximális kimeneti teljesítménnyel rendelkezik. Így a mintán 1 ms-os megvilágítás mellett legfeljebb 0,25-0,5 μJ lehetett a mérhető energia. Ha ehhez hozzávesszük az optikai útban levő tükrök és az objektív fényszóró hatását, akkor a ténylegesen a mintát érő fény energiája jóval alacsonyabb is lehet.

A Zeiss LSM 5 LIVE rendszerben a 488 nm-es lézer kimeneti teljesítménye jelentősen nagyobb, mint a hagyományos pontszkennelő (LSM 510) rendszereké, mivel a fényt egy vonalra fókuszálja a minta gyorsabb

letapogatása érdekében. Itt a 488 nm-es dióda lézer maximális teljesítménye 100 mW. Mivel a lézerfényt a mi esetünkben általában 512 pont hosszúságú vonalra húzta szét a szkennerek, még itt is legfeljebb 0,2 μJ lehetett a rostokon mért fényenergia 1 ms-os megvilágítás mellett.

Ha még azt is figyelembe vesszük, hogy mindkét esetben a lézerfény átvilágítja a rost teljes keresztmetszetét, vagyis van kilépő fény a mintából, akkor az előbbi számításoknál jóval kisebb érték a valós betáplált energia.

3. Véleményem szerint igen, az izomrostokban létezik egy dinamikus egyensúlyi (steady-state) intracelluláris szabad kalciumkoncentráció, amely nyugalmi állapotban rendkívül alacsony szinten marad a sejtműködés fenntartásához. A jelenlegi irodalmi adatok alapján nyugalmi állapotban a vázizomrostok citoplazmájában a szabad Ca^{2+} koncentráció általában 20-100 nM között mozog. Mi a számolásaink során, amikor nem tudtuk ezt megmérni, a 100 nM-os értéket használtuk.
4. A Fluo-3 és Fluo-4 festékek azért váltak a kalcium sparkok mérésének legjobb választásává, mert egyedülálló módon ötvözik a nagy érzékenységet a gyors időbeli felbontással. Nagy a dinamikai tartományuk: ezek a festékek nyugalmi állapotban (kalciummentes formában) szinte egyáltalán nem fluoreszkálnak. Kalcium kötődésekor azonban a fényintenzitásuk 40-100-szorosára (vagy még többre) emelkedik, ami kiváló jel-zaj arányt biztosít a kisméretű sparkok detektálásához. Gyors a kinetikájuk: a kalcium kötődése és leválása rendkívül gyors, így képesek követni a sparkok milliszekundumos időskálán zajló lefutását anélkül, hogy torzítanák annak alakját. Optimális a spektrális tulajdonságuk: mindkét festék gerjeszthető a 488 nm-es lézerrel, az emissziójuk pedig a zöld tartományba (525 nm) esik, ami tökéletesen illeszkedik a konfokális mikroszkópok szűrőjéhez. Végezetül megfelelő a dinamikus affinitásuk: a disszociációs állandójuk ($K_d \sim 325\text{-}390$ nM) pont abban a koncentráció tartományban van, amely lehetővé teszi a nyugalmi intracelluláris kalciumkoncentráció szint ($\sim 20\text{-}100$ nM) és a sparkok alatti lokális csúcsok ($\sim 1\text{-}10$ μM) közötti átmenet érzékeny követését.
A Fluo-3 és Fluo-4 festékekkel végzett méréseket leginkább a mangán (Mn^{2+}), a magnézium (Mg^{2+}), a cink (Zn^{2+}), valamint a stroncium (Sr^{2+}) és a bárium (Ba^{2+}) ionok zavarhatták meg. A mangán lehet a legjelentősebb zavaró tényező. A Ca^{2+} -nál nagyobb affinitással kötődik a festékhez, de nem növeli, hanem drasztikusan kioltja a fluoreszcenciát. Ezt a tulajdonságát gyakran használják kísérletesen a kalcium-beáramlási csatornák aktivitásának mérésére (Mn^{2+} quenching assay). Azonban a citoplazmában szabadon mozgó, a fluoreszcens festékeket ténylegesen befolyásoló mangánszint rendkívül alacsony, becslések szerint 10 nM alatt van (Kondo és mtsa., 1990, PSEBM, 196:83-88). A cink, stroncium és bárium a biológiai rendszerekben ritkábban vannak jelen zavaró koncentrációban. A két festék affinitása a Mg^{2+} -hoz sokkal kisebb, mint a Ca^{2+} -hoz, viszont annak az intracelluláris koncentrációja több nagyságrenddel magasabb a kalciuménál (~ 1 mM). Ez eltolhatja a festék látszólagos disszociációs állandóját, így csökkentve annak érzékenységét.
5. Egy konfokális pontszkennerek (mint amilyen a Zeiss LSM 510) által egy adott pillanatban megvilágított és detektált térfogat – az úgynevezett excitációs és detekciós térfogat – rendkívül kicsi, jellemzően a femtoliteres (10^{-15} liter)

tartományba esik. A pontos érték függ az alkalmazott objektívtől és a konfokális rekesz (pinhole) beállításától. Az általában általunk használt nagy numerikus apertúrájú (pl. 40x/1,3 vízimmerziós) objektívvel és 1 Airy Unit (488 nm lézer esetében ~250 nm) pinhole-lal a detektált térfogat kb. 0,3-0,5 femtoliter.

A térfogat geometriája nem téglatest alakú. A konfokális térfogat egy "nyúlánk" amerikai futball-labdához hasonlít. Ezt a térfogatot egy nyújtott elipszoidként kell elképzelni (ezt az úgynevezett Point Spread Function – PSF – írja le), amelynek laterális (X-Y) átmérője kb. 200-250 nm, axiális (Z) hossza kb. 500-800 nm (a mélységi felbontás mindig gyengébb, mint a vízszintes). Az axiális (Z-irányú) felbontás gyengesége a fény diffrakciójának és az objektív lencse geometriájának következménye. Ezeket az információkat a disszertációban nem részleteztem, amikor a konfokális mikroszkópok képalkotását tárgyaltam.

6. A vázizomban a mitokondriumok és a szarkoplazmatikus retikulum (SR) közötti szoros strukturális és funkcionális kapcsolat meghatározhatja a kalcium-sparkok dinamikáját. Bár a spark elsődlegesen az SR-ből a Ryanodin-receptorokon (RyR1) keresztül felszabaduló kalcium jel, a mitokondriumok aktívan modulálhatják ezt a folyamatot. A mitokondriumok és a RyR-csoportok (CRU - Calcium Release Units) közötti távolság vázizomban rendkívül kicsi, gyakran kevesebb, mint 100 nm. Ez a közelség lehetővé teszi, hogy a mitokondriumok a spark során kialakuló lokális Ca^{2+} -koncentrációt közvetlenül érzékeljék, mielőtt az ionok kidiffundálnának a citoplazmába. A mitokondriális kalcium uniporter (MCU) segítségével a mitokondriumok képesek a spark környezetében hirtelen megemelkedett kalciumszintet gyorsan "elszívni". Ez a lokális puffereles csökkenti a spark amplitúdóját és lerövidíti a lefutási idejét (decay time), megakadályozva, hogy a jel kontrollálatlanul tovább terjedjen a szomszédos RyR-csoportokra. Ezt a mitokondriumok működésének kísérletes gátlásával bizonyították (pl. MCU gátlásával Ru360-nal, Yi és mtsa., 2011, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 286:32436–32443). Patch-clamp technikával mérték az MCU áramsűrűségét, ami vázizomban alacsonyabb, mint szívizomban, de a mitokondriumok nagy száma és stratégiai elhelyezkedése miatt a lokális Ca^{2+} -eltávolítás 15-25%-áért is felelhetnek a spark közvetlen környezetében.

A nátrium/kalcium csere lassabb folyamat, amely a nyugalmi egyensúly helyreállításában segíthet. Mivel a SERCA pumpák működése erősen ATP-függő, a mitokondriumok közelsége biztosítja a lokális ATP-koncentrációt, ami szükséges a kalcium gyors visszapumpálásához az SR-be a spark lezajlása után.

7. A krónikus szívhipoperfúzió nem jó modellje az akut szívinfarktusnak, viszont kiváló modell a krónikus iszkémiás állapotok és az iszkémiás szívelégtelenség vizsgálatára. Azonban mi nem ezt alkalmaztuk a posztkardiális patkány modellünkben, hanem a teljes koronária artéria lekötést. Ez a módszer patkányban általában akut szívinfarktust okoz, nem krónikus szívhipoperfúziót. Ward és mtsai. (2003, FASEB JOURNAL 17:1517–1519) kimutatták, hogy a RyR1 a posztkardiális infarktusos állatok vázizmában a protein kináz A (PKA) által hiperfoszforilált és a csatornáról hiányzik az FKBP12 fehérje. Szerintük a lokális Ca^{2+} jelátvitel megváltozása egy PKA-függő mechanizmus, és az FKBP12 hiánya a RyR1-DHPR kölcsönhatását módosítja. Mi azt találtuk,

hogy a posztmiokardiális patkányokból izolált RyR1-ek aktiválásának Ca^{2+} függése kissé balra tolódott, míg a csatornainaktiváció Ca^{2+} -függése magasabb citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció felé tolódott el. Ez azt jelenti, hogy a csatorna kalcium érzékenysége csökken posztmiokardiális patkányokban. Ez vezethetett a kisebb amplitúdójú sparkok megjelenéséhez a posztmiokardiális patkányok vázizomrostjaiban.

Érdekes módon perifériás hipoperfúzió, érszűkület vagy tartós immobilizáció esetén vázizomban általában nő a Ca^{2+} -sparkok száma (frekvenciája). Xu és mtsai. (2012, MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY 367:113–124) patkányokon idéztek elő izomleépülést immobilizációval, ami növelte a sparkok számát. Ehhez hasonló eredményt találtak Teichmann és mtsai. (2008, PLOS ONE 3:e3644) izomdisztófiás egerek vázizmain. Itt azonban nem egyértelmű, hogy a csökkent disztrofin fehérje vagy a kevesebb mozgás hatására emelkedett meg a sparkok száma.

Tehát sajnos nem állapíthatunk meg egy általános szabályt, hogy a kevésbé használt vázizomban hogyan változik az elemi kalciumfelszabadulási események száma és morfológiája.

8. Előre kell bocsájtanom, hogy a disszertációban bemutatott eredmények - a sejttenyészeteken kívül - mind gyors (glikolitikus) izomrostokon születtek. Azonban vannak adatok az irodalomban lassú (oxidatív) izmokból is. Például Isaeva és mtsai. (2005, JOURNAL OF PHYSIOLOGY 565:855-872) összehasonlították soleus (oxidatív) és EDL (glikolitikus) izomrostokon a sparkok megjelenésének időbeliségét az izomrostok kémiai nyúzása után (mivel intakt membránnal rendelkező emlős izomrostokon nem alakulnak ki elemi kalciumfelszabadulási események). Azt találták, hogy a több mitokondriummal rendelkező soleus rostokon később jelentek meg a sparkok. A szerzők ezt azzal magyarázták, hogy mivel a mitokondriumok az SR közvetlen közelében helyezkednek el, képesek gátolni a kalciumcsatornák megnyílását vagy „felszívni” a belső kalciumraktárból kiáramló ionokat, ami segítené a kalcium indukált kalciumfelszabadulás folyamatát. A Bíráló 6. kérdésére adott válaszban már kitértem a mitokondriumok lehetséges spark morfológiát befolyásoló szerepére.

Míg az elektromosan indukált kalciumfelszabadulás helye az ingerlés helyétől függ, addig a sparkok és emberek kialakulásának helye teljesen véletlenszerű egészséges vázizomrostokban. Ezt a disszertáció 21. ábráján be is mutattam. Azonban patológiás körülmények között ez az állítás már nem érvényes. Például az MTM1 hiányos vázizomban a sérült T-tubuláris hálózat miatt az elektromos ingerlés tovaterjedése megszakadhat (Kutchukian és mtsai., 2019, CELL CALCIUM 80:91-100). Ugyanakkor ez a sérülés kedvez a RyR1 spontán kinyílásának, mert elvész a DHP receptor kontrollja a rianodin receptor felett. Így ebben a kórképben vannak kitüntetett helyek az izomroston, ahol az elemi kalciumfelszabadulási események kialakulása valószínűbb, mint a rost többi részén (disszertáció 35. ábra).

9. A triadin egy olyan SR membránban található fehérje, amely kapcsolatban áll RyR1-el és a kalszekvesztrinnel is. Ezért a disszertációban felhasznált munkánkban (Fodor és mtsai., 2008, JOURNAL OF PHYSIOLOGY 586:5803-5818) a triadin fehérje szintjét módosítottuk sejttenyészetben és feltételeztük,

hogy ennek hatása lesz a sejtek kalciumháztartására. A cikk 1. ábrája bemutatja, hogy a triadin fiziológiásan jelen van a miotubulusokban és sikerült majdnem megdupláznunk annak szintjét. A cikk 5. ábrája pedig bemutatja a triadin fehérje sikeres csökkentését ugyancsak miotubulusokban. A két beavatkozás a vártnak megfelelően ellentétesen működött: míg a fehérje expressziójának növelése csökkentette az elemi kalciumfelszabadulási események számát és amplitúdóját (disszertáció 30. ábra), addig a triadin mennyiségének csökkentése több és nagyobb amplitúdójú sparkot eredményezett (disszertáció 8. táblázat). Ebből mi arra következtettünk, hogy a triadin fiziológiás körülmények között egy biztonsági fék rendszer lehet a kalcium csatornán, ami gátolja szükségtelen RyR1 megnyílásokat és így a Ca^{2+} elcsorgását az SR-ből.

Még egyszer köszönöm a feltett kérdéseket és a dolgozatom bírálatát!

Debrecen, 2026. február 23.

Tisztelettel,



Dr. Szentesi Péter

jelölt