Tóth András – MTA doktori értekezés

„Intracelluláris Ca2+ homeosztázis-változások hatásainak elemzése izolált szívpreparátumokon”

**Válasz Dr. Kecskeméti Valéria professzor asszony opponensi véleményére**

Mindenekelőtt hálásan köszönöm Kecskeméti Valéria professzor asszonynak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát. Köszönöm kritikus formai megjegyzéseit, fontos és elgondolkodtató kérdéseit, mindenre kiterjedő figyelmét. Köszönöm elismerő szavait a témaválasztást, illetve a dolgozat stílusát illetően. Köszönöm, hogy az elvégzett vizsgálatokat megalapozottnak, a megközelítést megfelelőnek, az alkalmazott módszereket korszerűnek értékelte. Elméleti kutatóként külön köszönöm, hogy a kiemelte eredményeink esetleges klinikai jelentőségét.

**Az alábbiakban válaszolok opponensem kritikus megjegyzéseire és a feltett kérdésekre:**

1. *Miért kamrán és nem pitvaron végeztük az SK2 vizsgálatokat?*

A klasszikus kísérleti eredmények alapján kialakult, sokáig általánosan elfogadott hipotézis szerint a szívben nincsenek jelen (aktív) SK2 csatornák. Ezért okozott nagy visszhangot Xu és mts. a magas presztízsű J. Biol. Chem. folyóiratban 2003-ban megjelent publikációja. Adataik szerint egér pitvari és kamrai, valamint humán pitvari kardiomiocitákban szignifikáns mennyiségben mutatható ki *aktív* SK2 csatorna, amelyek gátlásával (50-100 pmol/l apamin) szignifikáns AP megnyúlás hozható létre. A cikk konklúziói, különösen az apamin-indukált kamrai AP megnyúlás értelmezhetetlennek tűntek a korábbi irodalmi adatok és az akkor már igazoltnak tekinthető repolarizációs rezerv hipotézis alapján, mely szerint egy repolarizáló $K^+$ áram gátlását követően az áram kiesése következtében kialakuló szignifikáns AP megnyúlást más repolarizáló $K^+$ áramok kompenzatorikus növekedése megakadályozza.

Idézett kísérleteinket fenti ellentmondás tisztázása céljából végeztük; eredményeink igazolni látszanak Xu és mts. molekuláris biológiai, SK2 csatornafehérjék *jelenlétére* vonatkozó eredményeit, ugyanakkor homlokegyenest ellentmondanak az AP apamin-indukált markáns megnyúlására vonatkozó, perforált patch clamp méréseikből származó elektrofiziológiai következtetéseiknek és ahhoz a váratlan és nehezen értelmezhető konklúzióhoz vezetnek, hogy amennyiben az immunanyag valóban szelektív – ezt sajnos nem tudtuk ellenőrízni – a csatornák fizikailag ugyan jelen vannak a kamrai/pitvari szívizomsejtekben, viszont a közel fiziológiás vizsgálati körülmények között detektálható aktivitásuk nem mutatható ki.

A kísérletes munka kamrai szívizomsejteken történő kivitelezése mellett két fontos érvünk volt: 1) egyrészt Xu és mts. elektrofiziológiai mérései jelentős részben szintén izolált kamrai szívizomsejteken történtek, és mivel kamrai sejtekben a repolarizációs rezerv jóval erősebb, mint pitvari sejtekben, vonatkozó eredményeik ezért még kevésbé voltak értelmezhetőek; 2) másrészt, aktív kamrai SK2 csatornák jelentősége funkcionális szempontból is jóval nagyobb lehetne, mint aktív pitvari SK2 csatornáké. Hangsúlyozni szeretném továbbá, hogy az irodalomban ma már elérhető, a pitvari SK2 csatornák szerepére, jelentőségére vonatkozó publikációk mindegyike saját cikkünk benyújtását követően jelent meg. Jelenlegi ismereteink alapján fiziológiás körülmények között ezek a csatornák kamrában – a $K_{ATP}$ csatornákkal

analóg módon – valóban nem tűnnek aktívnak; ugyanakkor egyes patológiás körülmények között – különösen a pitvarban, ahol denzitásuk is nagyobb – magas aktivitást mutathatnak.

2. *A kontrol és apamin görbék nem különíthetők el.*

A következő. a 18. és 19. ábrákra vonatkozó megjegyzése indokolt, elnézést kérek az ábrák hiányosságáért. Mentségemre szolgáljon, hogy a két görbe mindkét ábrán szinte teljesen fedi egymást, ezért fekete-fehér ábrán nem különíthetők el (vélhetően színes ábrán sem). Ugyanakkor a két ábra üzenete, a gátló hatás teljes hiánya, így is egyértelmű.

3. *Az $I_{K1}$ $Ca^{2+}$ függése, az $I_{K1}$ AP plató alatti szerepe, a $Ba^{2+}$-indukált fokozott trianguláció magyarázata.*

Az $I_{K1}$ csatorna-működés $Ca^{2+}$ függésére és ezzel összefüggésben az AP morfológiára irányuló kérdésekkel kapcsolatban elmondható, hogy a vonatkozó irodalmi adatok igen hiányosak, a meglévők pedig ellentmondásosak. Saját, izolált kamrai szívizomsejteken végzett méréseink eredményei megerősítik a korai, Purkinje rostokon végzett megfigyeléseket, melyek szerint a $[Ca^{2+}]_o$ emelését követően az $I_{K1}$ nő, viszont nem támogatják a hipoxia-indukált AP rövidülés mechanizmusára vonatkozó következtetéseket, melyek szerint, a többi $[Ca^{2+}]_i$-modulált áram ($I_{Ca,L}$, $I_{NCX}$, $I_{Cl}$) változásával egyidejűleg a $[Ca^{2+}]_i$-függő $I_{K1}$ növekedése is hozzájárul az iszkémia-indukált rövidülés *korai* fázisának kialakulásához (Ruiz-Petrich és mts., 1991; Piao L és mts., 2007). Mivel az AP plató fázisa alatt a nettó transzmembrán áram kicsi (kb. 0.1-0.2 pA/pF), a transzmembrán ellenállás nagy, viszonylag kismértékű áramváltozás is relatíve jelentős potenciálváltozást generálhat.

Amint azt munkacsoportunk egy későbbi publikációjában (Jost és mts., 2013) igazoltuk, a repolarizációs rezerv lényegesen gyengébb humán, mint kutya kamrai szívizomban. Az eltérés egyik alapvető oka, hogy az $I_{K1}$-et generáló Kir2.x csatornák expressziója és denzitása is jóval alacsonyabb humán, mint kutya kamrai szívizomban (az arány kb. 1 : 2). Ez a markáns kvantitatív különbség lehet a magyarázata annak az idézett megfigyelésnek is, hogy humán szívizom készítményeken a $Ba^{2+}$-indukált $APD_{90}$ megnyúlás csak magas külső $[Ca^{2+}]$ mellett lesz szignifikáns.

Ami az AP triangulációjának (azaz az $APD_{90}$ - $APD_{25}$ értéknek) megnövekedésére vonatkozó kérdést illeti, a kontroll trianguláció mértékének növekedése elvileg két különböző mechanizmuson keresztül történhet: az $APD_{90}$ $APD_{25}$-höz viszonyított relatív növekedésével, vagy az $APD_{25}$ $APD_{90}$-hez viszonyított relatív csökkenésével - a két mechanizmus egyidejűleg is aktiválódhat. Az $APD_{25}$ csökkenését elsősorban az LTC csatornák felgyorsult inaktivációja magyarázhatja; fentiek alapján elvileg szerepet játszhat benne az $I_{K1}$ AP plató alatti $Ca^{2+}{}_i$-indukált növekedése is. E növekedés léte nem egyértelműen igazolt és méréseinkben mi sem láttunk az $I_{K1}$ korai emelkedésére utaló AP változásokat (21/A, B ábra). Ezzel szemben az $APD_{90}$ $Ba^{2+}$-indukált megnyúlásának leglogikusabb magyarázata – figyelembe véve, hogy az AP terminális fázisában a többi repolarizáló $K^+$ áram amplitúdója már igen alacsony – szinte kizárólag az ebben a fázisban egyedül jelentős $I_{K1}$ repolarizáció gyorsító, és ezáltal az $APD_{90}$-et szignifikánsan csökkentő, hatásának *kiesése* lehet. Ez esetben az alacsony $[Ca^{2+}]_o$ mellett mért $Ba^{2+}$-indukált trianguláció növekedés (84 ± 4.3 → 102 ± 4.4 ms) megemelt külső $[Ca^{2+}]$ mellett megfigyelt szignifikáns fokozódása (112.3 ± 8.1 → 155.3 ± 13.5 ms) hűen tükrözi a $Ba^{2+}$-függő áram (azaz közelítőleg az $I_{K1}$) magas külső $[Ca^{2+}]$ által indukált növekedését. Sajnos a dolgozatban utóbbi (magas $[Ca^{2+}]_o$ mellett mért) értékek helyett az előbbi (alacsony $[Ca^{2+}]_o$ mellett mért) trianguláció értékek ismétlődnek. A hibás idézésért elnézést kérek.

*4. Az ábrán ATX-II helyett SEA0400 szerepel.*

A kritika teljesen jogos; a keretben 1µM SEA0400 helyett 2 nM ATX-II-nek kellene szerepelni. Szerencsére az ábrafelirat korrekt, abban 2 nM ATX-II szerepel.

*5. Miért 10 µM ORM-10103 koncentrációt alkalmaztunk?*

Az ORM-10103 szelektivitásával, illetve gátlási hatékonyságával kapcsolatos vizsgálataink eredményeit munkacsoportunk egy másik publikációjában közöltük (Jost és mts. lásd fenn). A vizsgált $I_{Na}$, $I_{CaL}$, $I_{Kr}$, $I_{Ks}$, $I_{to}$, $I_{K1}$ áramok közül csak az $I_{Kr}$ mutatott a pozitív membránpotenciál-tartományban mérsékelt ORM-10103 érzékenységet. Az új gátlószer az inward/outward NCX áramokat 1 µM, illetve 10 µM koncentrációban ~ 60/50%, illetve ~ 80/85% hatásfokkal gátolta. Fontos megjegyezni, hogy az általánosan alkalmazott ramp protokollal meghatározott $IC_{50}$ értékek nem feltétlenül egyeznek meg az adott kísérleti feltételek mellett kialakuló $I_{NCX}$ gátlás tényleges hatásfokával. Mi, és mások is, arra a következtetésre jutottunk, hogy a gátlás hatékonysága erősen függ az $Ca^{2+}_i$ és $Na^{+}_i$ szintektől; ezek emelkedése esetén markánsan csökken. Mindezen okokból idézett vizsgálataink során a lehető legnagyobb, de még szelektívnek tekinthető ORM-10103 koncentrációt alkalmaztuk, az elérhető legnagyobb gátlási hatásfok beállítása céljából. Ilyen értelemben a 10 µM közel optimálisnak tekinthető, lényegesen nagyobb koncentráció használata pedig a gátlási görbék ellapulása miatt nem tűnik indokoltnak.

*6. Elképzelhető-e az NCX gátlás nagymértékű species függése?*

Először is elnézést kell kérnem, saját cikkünkből hibásan idéztem. A KB-R7943 kutya kamrai szívizomsejten mért, kifelé irányuló NCX áramra vonatkozó, $IC_{50}$ értéke a kéziratban hibásan szerepel: nem 74,74 µM, hanem csak 4,74 µM, tehát a két transzportirányra a gátlás hatásfoka közel azonos.

A „legszelektívebb reverz NCX gátló" megfogalmazással mindössze arra szerettem volna utalni, hogy a KBR-7943-at a korai vonatkozó irodalomban szokásos volt *szelektív reverz $I_{NCX}$ gátlóként* leírni. Ez a megfogalmazás annyiban jogos, hogy egyes speciális kísérleti körülmények között valóban a KBR-7943 mutatja a legnagyobb $_{rev}IC_{50}/_{fwd}IC_{50}$ arányt. A szelektív $_{rev}I_{NCX}$ gátlás hipotézis analízise igazolta, hogy az idézett magas transzportszelektivitás kizárólag unidirekcionális transzport esetén igazolható; az idézett 0,3/17 µM $IC_{50}$ értékeket (Watano és mts. 1996) tengerimalac kamrai szívizomsejteken whole cell patch clamp módszerrel, ramp protokollal, mérték, és a reverz/forward $IC_{50}$ értékeket 1/0 mM külső [$Ca^{2+}$] jelenlétében *külön-külön* határozták meg. Bidirekcionális transzportra, szintén whole cell patch clamp módszerrel és ramp protokollal végzett saját méréseinkben, az $IC_{50}$ értékeket *egyidejűleg* meghatározva az irányfüggés sokkal kisebbnek adódott ($_{fwd}IC_{50}/_{rev}IC_{50}$ ~ 3,35/4,74; (Birinyi és mts., 2005). Ezenfelül fontos megjegyezni, hogy a KB-R7943 további transzmembrán áramokra (pl. $I_{Na}$, $I_{LTC}$, $I_{Kr}$, $I_{K1}$), sőt a mitochondriális $I_{NCX}$-re és a TRPC receptor áramára is szignifikáns gátló hatást fejt ki – tehát ebben a vonatkozásban egyáltalán nem szelektív.

Végül, ami a species függést illeti a 0,3/17 µM $IC_{50}$ értékeket (Watano és mts., 1996) tengerimalac kamrai sejteken mérték, a 3,35/4,74 értékeket (Birinyi és mts., 2005) viszont kutya kamrai sejteken határoztuk meg. Bár szisztematikus, több speciesre kiterjesztett összehasonlító mérésekre mindez ideig nem került sor, előzőek alapján az eltérések fő oka vélhetően nem annyira a species függés, inkább a markánsan eltérő kísérleti körülmények.

*7. A SEA0400 és az ORM-10103 hatások közötti eltéréseket magyarázhatja-e a SEA0400 $I_{CaL}$ gátló hatása?*

A 43. ábrán azon próbálkozásunk eredményeit mutatjuk be, melynek célja az $I_{NCX}$ egy reprezentatív AP alatti kinetikája, valamint az áram által szállított össz-töltés NCX gátlás-indukált változásainak *becslése* (hangsúlyozottan becslése) volt az $I_{NaL}$ aktivációt megelőzően és azt követően. Az ábrából kitűnik, hogy 1) az aktivációt követően mind a reverz, mind a forward NCX áramkomponensek szignifikánsan megnőttek, továbbá 2) jelentős kvantitatív különbség figyelhető meg az 1 µM SEA0400, valamint a 10 µM ORM-10103 által gátolt mindkét irányú áramban és a transzportált töltések nagyságában is.

Az első eredmény magyarázata viszonylag egyértelműnek tűnik: az $I_{NaL}$ aktivációját követően az AP alatt, különösen annak korai fázisában beáramló $Na^+$ mennyisége markánsan emelkedik; az extra $Na^+$-ot nagyrészt a megnőtt $_{rev}I_{NCX}$ távolítja el, aminek következtében jelentősen nő az NCX által felvett $Ca^{2+}$ mennyisége is. Az extra $Ca^{2+}$-tól a sejt elsősorban a diasztolés $_{fwd}I_{NCX}$ növelésén keresztül szabadulhat meg. Ez a mechanizmus indokolja az áramkomponensek és a transzportált töltés a 43. ábrán követhető, szignifikáns növekedését.

Ezzel szemben a 2) megfigyelés, a 43. ábrán látható kvantitatív eltérések magyarázata nem teljesen nyilvánvaló. Az egyik legfontosabb ok kétségtelenül a SEA0400 mérsékelt $Ca_V1.2$ gátló hatása lehet, ugyanis az LTCC gátlás miatt – amint az ábrán látható – a SEA0400 kezelt sejtekben a késői $Na^+$ áram, továbbá mindkét $I_{NCX}$ komponens nagyobb, mint az LTC csatornákat nem gátló ORM-10103 kezelt sejtekben. A két forward áramkomponens közötti különbség viszonylag kicsi; ez valószínűsiti, hogy az AP alatti teljes $Ca^{2+}$ influx is közel azonos. Ugyanakkor az ORM-10103 gátolt sejtekben a *kisebb* $_{rev}I_{NCX}$ vélhető oka az ugyanezen sejtekben *nagyobb* trigger $Ca^{2+}$ influx.

Fenti magyarázat természetesen nem zárja ki a lehetőségét, hogy az ábrán látott quantitatív eltérések nem egyetlen – bár logikus – okra vezethetők vissza; az eltérések hátterének részletes tisztázására további mérésekre lenne szükség.

*8. Hibás irodalmi hivatkozások.*

A megjegyzés jogos, a szövegben valóban hibásan hivatkoztam a [485] citációs sorszámú publikációra. A hibáért elnézést kérek. Az idézett eredményeket tartalmazó publikáció helyes citációs sorszáma [495].

*9. Lesz-e olyan NCX gátlószer, amelyik klinikai fázisba kerülhet?*

Sajnos erre a kérdésre nagyon nehéz egyértelmű választ adni. Bár a magam részéről próbálok tartósan optimista maradni, fontos hangsúlyozni, hogy egy klinikai kipróbálásra javasolt, újtípusú NCX-gátlószerrel szemben rendkívül lényeges, meglehetősen nehezen teljesíthető elvárások fogalmazhatók meg.

Egyik alapvető elvi probléma az NCX többé-kevésbé univerzális expressziója a szövetekben. Amennyiben pl. kardiológiai felhasználásban gondolkodunk (NCX1 gátlás), egyértelműen biztosítani kell, hogy az adott gátlószer alkalmazásának ne legyen nem kívánt neurológiai, endokrinológiai, vagy urológiai következménye – azaz viszonylagos kardioszelektivitással kell rendelkeznie. A kritériummal kapcsolatos gyakorlati nehézségeket mutatja, hogy míg szívben az iszkémia/reperfúziós károsodások és aritmogenezis hatásosan csökkenthetők az NCX1 gátlásával, agyi iszkémia esetén az NCX1 működés serkentése, azaz szelektív NCX *aktivátor* alkalmazása tűnik megfelelő stratégiának.

Fontos elméleti/gyakorlati probléma, hogy az NCX finomszabályozásának részletei – a szubmembrán ionkoncentráció-változások ismeretének hiányában – nem kellően tisztázottak. Szintén nem ismertek a gátlás molekuláris szintű mechanizmusai, illetve a ma elérhető gátlószerek működésének részletei. Az esszenciális ismeretek hiányában ma még nem lehet a gátlás folyamatát in silico modellezni, sem a molekulafejlesztés fontos elméleti kritériumait meghatározni.

Ugyancsak jelentős nehézséget okozhat az NCX passzív kicserélő volta. Ellentétben az ioncsatornákkal, amelyek árama konstans, nyitott/zárt állapotának hossza pedig viszonylag egyszerűen modulálható, az NCX inward és outward áramot egyaránt generálhat, továbbá az ioncsatornákkal ellentétben, mind a transzport iránya, mind mértéke megváltozhat. Ezért egyes kórképekben fontos lehet az egyik irányú transzportaktivitás gátlása a másik irányba történő transzport csökkentése nélkül, esetleg növelésével (pl. reperfúzió-indukált $Ca^{2+}$ túlterhelés esetén szükségesnek tűnik a reverz $Ca^{2+}$ transzport gátlása a forward irányú transzport lényeges befolyásolása nélkül). Valamennyi jelenleg elérhető NCX gátlószer lassan, 4-5 perc alatt kötődik és még lassabban, 10-15 perc alatt válik le – ha egyáltalán leválik. A fenti kritérium teljesítéséhez viszont nagyon gyors kötődési/leválási kinetikával és magas transzportirány-szelektivitással rendelkező hatóanyagra lenne szükség. Ezekkel a tulajdonságokkal rendelkező NCX gátló molekula ma még nem áll rendelkezésre.

További lényeges kritérium a species-függés tisztázása. A hasonló elvi működésű $Na^{+}/H^{+}$ kicserélő (NHE) gátlásának hatékonyságára vonatkozó kísérletes (preklinikai) eredmények vs. humán (klinikai) tapasztalatok markáns eltérése kötelezővé teszi a vonatkozó vizsgálatok kiterjesztését beteg humán szívből származó sejtekre és multicelluláris mintákra.

Véleményem szerint további jelentős nehézséget okozhat a gátlási hatásfok optimalizálása. Az NCX fiziológiás transzportaktivitása létfontosságú, szabályozása rendkívül komplex és flexibilis, a kicserélő bonyolult kölcsönhatásban van további transzporterekkel (LTCC, NHE, SERCA2), ennek következtében transzport-paramétereinek tartós, adott mértékű, más transzporterek működésétől független és azokat minimálisan befolyásoló modulációja nem egyszerű feladat. Jó például szolgálhatnak az NCX-KO egereken végzett vizsgálatok, melyek meglepő konklúziókkal jártak: Az NCX1 expressziója és $Ca^{2+}$ eltávolító aktivitása ezekben az egerekben közel 80%-kal csökkent, de ezt a drasztikus csökkenést az LTC csatornákon beáramló trigger $Ca^{2+}$ mennyiségének arányos csökkenése teljesen kompenzálta az ECC és a szívizomsejtek kontraktilitásának számottevő romlása nélkül.

Végezetül némi alapot szolgáltat a mérsékelt optimizmushoz, hogy jónéhány olyan vegyületcsalád van (a teljesség igénye nélkül: amilorid, fenoxipiridin és 3,4-dihidrokinazolin származékok, ORM csoport), melyek között előbukkanhat a kritériumoknak megfelelő molekula. A hatóanyagok kifejlesztéséhez és preklinikai teszteléséhez elkötelezett és intenzív gyógyszergyári kooperációra és széleskörű kísérletes munkára van szükség. Mindazonáltal a szükséges feltételek teljesülése esetén elképzelhetőnek tűnik a klinikumban is használható NCX gátló molekulák kifejlesztése. Mindenesetre az igény megvan hozzá.

*10. A reperfúzió-indukált aritmiákra vonatkozó vizsgálatok megismétlése kutya szíven.*

A felvetéssel teljes mértékben egyetértek. Bár az általunk is használt regionális iszkémia/reperfúzió modell izolált patkányszíven jól megalapozott és értékes adatokkal bővítette a reperfúzió-indukált aritmogenezis háttérmechanizmusaira és az aritmiák kialakulási gyakoriságát csökkentő farmakológiai beavatkozások hatékonyságára vonatkozó hézagos ismereteinket, a patkányszív $Ca^{2+}$ homeosztázisa és elektrofiziológiai sajátosságai

jelentősen eltérnek az emberétől, ezért a vizsgálatok konklúziói humán szívbetegségekre csak erős limitációkkal alkalmazhatók. Ebből a szempontból, a lényegesen magasabb költségek ellenére, valóban jelentős előrelépést hozhat a kísérletek megismétlése a humán szívhez e tekintetben jóval közelebb álló kutya szíveken.

*11. Van-e irodalmi adat az NCX gátlók kardiomyopatiás modellen történt vizsgálatára?*

Az $Ca^{2+}_i$ háztartás leggyakrabban megnyilvánuló zavarai krónikus szívelégtelenségben: 1) csökkent SERCA2, viszont fokozott NCX1 expresszió; 2) fokozott diasztolés $Ca^{2+}$ szivárgás az SR-ből – ennek következtében csökkent SR $Ca^{2+}$ tartalom és CaT amplitudó ; 3) emelkedett diasztolés $[Ca^{2+}]_i$ és $[Na^+]_i$. Ezek következménye a szív kontraktilis diszfunkciója és a fokozott aritmia hajlama.

Az SR kórosan magas diasztolés $Ca^{2+}$ szivárgásának hátterében a RyR-ok hiperfoszforilációja áll (a PKA és/vagy CaMKII aktivitás fokozódik, a foszfatáz és/vagy foszfodieszteráz aktivitás csökken), aminek következtében a RyR-okhoz fiziológiás körülmények között kötődő és azok zárt állapotát stabilizáló calstabin (FKBP12.6) disszociál és a csatornák instabillá válnak – a nyitott állapot valószínűsége ($P_0$) markánsan fokozódik, a csatornák $Ca^{2+}$-érzékenysége és a felszabaduló $Ca^{2+}$ frakció nagysága is nő, ami celluláris $Ca^{2+}$ vesztéshez és az aritmia hajlam fokozódásához vezet. Humán szívizom mintákban is kimutatható a csökkent SR $Ca^{2+}$ tartalom, aminek következtében a CaT és a kontrakciós erő nagysága is markánsan gyengül (szisztolés diszfunkció), illetve megnőtt diasztolés $[Ca^{2+}]_i$, ami a szív relaxációjának gátlásához (diasztolés diszfunkció) és fokozott aritmia hajlamához vezet. Ezek tükrében az emelkedő NCX expresszió/aktivitás egyes vélekedések szerint a csökkent SERCA aktivitást és megemelkedett diasztolés $[Ca^{2+}]_i$-t *kompenzáló* mechanizmusnak tekinthető.

Az NCX kardinális szerepe miatt a $Ca^{2+}$-dependens szívbetegségek – így a krónikus szívelégtelenség – terápiájának javításában az NCX aktivitás modulációja kezdettől fontos célkitűzés volt. Ennek ellenére – részben az elérhető NCX gátlók mérsékelt szelektivitása, részben validált kísérleti modellek hiánya miatt, az NCX gátlás szívelégtelenségben kifejtett hatásairól nagyon kevés az elérhető irodalmi adat. Tachycardia-indukált kutya szívelégtelenség modellben az SR $Ca^{2+}$ tartalma a normál érték 52%-ára, a CaT amplitúdója 44%-ára csökkent. XIP (NCX inhibitory protein) kezeléssel kiváltott mérsékelt (~27%) NCX gátlás hatására a CaT amplitúdója és az SR $Ca^{2+}$ tartalma egyaránt normalizálódott, továbbá helyreállt a CaT pozitív frekvenciafüggése is (Hobai és mts., 2004). Egy másik, nyúl modellben az ugyancsak karakterisztikus ROS aktivitás-fokozódás hatásait vizsgálták (Wagner és mts. 2003). A beteg szívekből izolált sejtek fokozott ROS érzékenységet tanúsítottak. Ennek hátterében az NCX fokozott expressziója állhatott, mivel 10 µM KB-R7943 alkalmazását követően a ROS-indukált hiperkontraktúrát mutató sejtek száma szignifikánsan csökkent.

Valamivel több adat érhető el az NCX gátlás antiaritmiás hatásairól szívelégtelenségben. A részleges NCX gátlás, a többi $Ca^{2+}$-dependens szívbetegség állatmodellben tapasztaltakhoz hasonlóan, szignifikánsan csökkentette a triggerelt aritmiák kialakulási gyakoriságát.

Végül egy szubjektív megjegyzés: az egyre több és megbízhatóbb irodalmi adat szerint a krónikus szívelégtelenség kialakulásának elsődleges mechanizmusa kevésbé a fokozott NCX expresszió/aktivitás, sokkal inkább a kóros szívhipertrófia, a RyR diszfunkció, illetve a SERCA2 aktivitás csökkenése lehet. Ezért a terápiás stratégiák kifejlesztésének fókuszában elsősorban a malignus szívhipertrófia kialakulásának gátlása, valamint az SR funkció normalizálása kell, hogy álljon. Az NCX szelektív, részleges gátlása, elsősorban jótékony antiaritmiás hatása miatt, a primer terápia értékes kiegészítése lehet.

*12. Az irodalmi részben található formai hibák, következetlenségek.*

A megjegyzés sajnos indokolt. Az irodalmi hivatkozások ellenőrzése során nem voltam elég aprólékos és következetes. Az előforduló hibákért és következetlenségekért elnézést kérek

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Kecskeméti Valéria professzor asszonynak igényes és alapos bírálatát. Köszönöm, hogy értekezésemet értékesnek, benne bemutatott eredményeinket elgondolkodtatónak, megfigyeléseinket újszerűnek, következtetéseinket mértéktartónak ítélte, továbbá azt, hogy az értekezést és a téziseket elfogadásra méltónak találta. Köszönöm, hogy az értekezés nyilvános vitára bocsátását, illetve sikeres védés esetén a doktori cím odaítélését támogatja, és kérem kérdéseire adott válaszaim elfogadását.

Budapest, 2016. november 5.

Dr. Tóth András