

# **Ca<sup>2+</sup> függő folyamatok a szinusz csomó spontán ingerképző mechanizmusában**

**Ph.D. disszertáció tézisei**

**Dr. Noémi Tóth**

**Témavezető: Dr. Nagy Norbert**

**Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet,  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,  
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola,  
Szegedi Tudományegyetem  
Szeged, Magyarország**



**2022**

## PUBLIKÁLT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### A Ph.D. disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

I.) Gergő Bitay, **Noémi Tóth**, Szilvia Déri, Jozefina Szlovák, Zsófia Kohajda, András Varró, Norbert Nagy. The Inhibition of the Small-Conductance  $Ca^{2+}$ -Activated Potassium Channels Decreases the Sinus Node Pacemaking during Beta-Adrenergic Activation.

*Pharmaceuticals* 2022, <https://doi.org/10.3390/ph15030313>, (IF: 5.863, Q1)

II.) **Noémi Tóth**, Jozefina Szlovák, Zsófia Kohajda, Gergő Bitay, Roland Veress, Balázs Horváth, Julius Gy. Papp András Varró, Norbert Nagy. The development of L-type  $Ca^{2+}$  current mediated alternans does not depend on the restitution slope in canine ventricular myocardium. *Scientific Reports* 2021, DOI: [10.1038/s41598-021-95299-7](https://doi.org/10.1038/s41598-021-95299-7), (IF: 4.379, D1)

III.) Zsófia Kohajda\*, **Noémi Tóth\***, Jozefina Szlovák, Axel Loewe, Gergő Bitay, Péter Gazdag, János Prorok, Norbert Jost, Jouko Levijoki, Piero Pollesello, Julius Gy. Papp, András Varró, Norbert Nagy. Novel  $Na^+/Ca^{2+}$  Exchanger Inhibitor ORM-10962 Supports Coupled Function of Funny-Current and  $Na^+/Ca^{2+}$  Exchanger in Pacemaking of Rabbit Sinus Node Tissue. *Frontiers in Pharmacology* 2020, DOI: [10.3389/fphar.2019.01632](https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01632), (IF: 5.811, Q1)

+1.) **Noémi Tóth**, Axel Loewe, Jozefina Szlovák, Zsófia Kohajda, Gergő Bitay, Jouko Levijoki, Julius Gy. Papp, András Varró, Norbert Nagy. The reverse mode of the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger contributes to the pacemaker mechanism in rabbit sinus node cells. *Scientific Reports, under major revision*

A “The reverse mode of the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger contributes to the pacemaker mechanism in rabbit sinus node cells” c. bírálat alatt álló közleményhez kapcsolódó megjelent tudományos absztraktok:

- Tóth, N; Loewe, A; Kohajda, Zs; Bitay, G; Levijoki, J; Papp, JGy; Varró, A; Nagy, N.

Investigation of the reverse  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger function in the spontaneous automaticity of rabbit sinus node cells. *SCRIPTA MEDICA* 52 : Suppl.1 p. S16 (2021)

- Tóth, N; Szlovák, J; Loewe, A; Gazdag, P; Bitay, G; Levijoki, J; Papp, Gy; Varró, A; Nagy, N. A reverz  $Na^+/Ca^{2+}$  kicserélő szerepének vizsgálata a szinusz-csomó spontán automatáciájában = The role of reverse  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger in the sinus node spontaneous automaticity. *CARDIOLOGIA HUNGARICA* 50 : Suppl. D pp. 168-168. , 1 p. (2020)

<https://m2.mtmt.hu/gui2/?type=authors&mode=browse&sel=10068715>

A Ph.D. disszertáció alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 16.053

### **További közlemények:**

**IV.)** Zsófia Kohajda, László Virág, Tibor Hornyik, Zoltán Husti, Antia Sztojkov-Ivanov, Norbert Nagy, András Horváth, Richárd Varga, János Prorok, Jozefina Szlovák, **Noémi Tóth**, Péter Gazdag, Leila Topal, Muhammad Naveed, Tamás Árpádfy-Lovas, Bence Pászti, Tibor Magyar, István Koncz, Szilvia Déri, Vivien Demeter-Haludka, Zoltán Aigner, Balázs Ördög, Márta Patfalusi, László Tárosi, László Tiszlavicz, Imre Földesi, Norbert Jost, István Baczkó, András Varró. In vivo and cellular antiarrhythmic and cardiac electrophysiological effects of desethylamiodarone in dog cardiac preparations. *British Journal of Pharmacology* 2022, DOI: [10.1111/bph.15812](https://doi.org/10.1111/bph.15812), (IF: 8.739, **D1**)

**V.)** István Koncz, Arie O. Verkerk, Michele Nicastro, Ronald Wilders, Tamás Árpádfy-Lovas, Tibor Magyar, **Noémi Tóth**, Norbert Nagy, Micah Madrid, Zexu Lin, Igor R. Efimov. Acetylcholine Reduces  $I_{Kr}$  and Prolongs Action Potentials in Human Ventricular Cardiomyocytes. *Biomedicines* 2022, DOI: [10.3390/biomedicines10020244](https://doi.org/10.3390/biomedicines10020244), (IF: 6.081, **Q1**)

**VI.)** Tibor Magyar, Tamás Árpádfy-Lovas, Bence Pászti, **Noémi Tóth**, Jozefina Szlovák, Péter Gazdag, Zsófia Kohajda, András Gyökeres, Balázs Györe, Zsolt Gurabi, Norbert Jost, László Virág, Juliu Gy. Papp, Norbert Nagy, István Koncz. Muscarinic agonists inhibit the ATP-dependent potassium current and suppress the ventricle-Purkinje action potential dispersion. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2021, DOI: [10.1139/cjpp-2020-0408](https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0408), (IF: 2.273, **Q3**)

**VII.)** Jozefina Szlovák\*, Jakub Tomek\*, Xin Zhou, **Noémi Tóth**, Roland Veress, Balázs Horváth, Norbert Szentandrassy, Jouko Levijoki, Julius Gy. Papp, Neil Herring, András Varró, David A. Eisner, Blanca Rodriguez, Norbert Nagy. Blockade of sodium-calcium exchanger via ORM-10962 attenuates cardiac alternans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2021, DOI: [10.1016/j.yjmcc.2020.12.015](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.12.015), (IF: 5.000, **Q1**)

**VIII.)** **Noémi Tóth**, Alexandra Soós, Alex Váradi, Péter Hegyi, Benedek Tinusz, Anna Vágvölgyi, Andrea Orosz, Margit Solymár, Alexandra Polyák, András Varró, Attila S. Farkas, Norbert Nagy. Effect of ivabradine in heart failure: a meta-analysis of heart failure patients with reduced versus preserved ejection fraction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2021, DOI: [10.1139/cjpp-2020-0700](https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0700), (IF: 2.273, **Q3**)

**IX.)** Zsófia Kohajda, Axel Loewe, **Noémi Tóth**, András Varró, Norbert Nagy. The Cardiac Pacemaker Story-Fundamental Role of the  $Na^+/Ca^{2+}$  Exchanger in Spontaneous Automaticity. *Frontiers in Pharmacology* 2020, DOI: [10.3389/fphar.2020.00516](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00516), (IF: 5.811, **Q1**)

**X.)** Axel Loewe, Yannick Lutz, Deborah Nairn, Alan Fabbri, Norbert Nagy, **Noemi Toth**, Xiaoling Ye, Doris H. Fuertinger, Simonetta Genovesi, Peter Kotanko, Jochen G. Raimann, Stefano Severi. Hypocalcemia-Induced Slowing of Human Sinus Node Pacemaking. *Biophysical Journal* 2019, DOI: [10.1016/j.bpj.2019.07.037](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.037), (IF: 3.854, **D1**)

**Publikált közlemények összesített impakt faktora: 50.084**

## 1. BEVEZETÉS

A szívizom normális összehúzódásait szabályozó elsődleges ingerképző központ a szív jobb pitvarának falában elhelyezkedő szinusz csomó. A szinusz csomó sejtjeinek pacemaker-, vagyis spontán ingerképző képessége biztosítja a szív automáciáját, mely a szívizomban található különböző ioncsatornák és pumpák rendkívül összetett működése és összhangja révén jön létre. Talán nem túlzás azt állítani, hogy a szinusz csomó ingerképzésének vizsgálata napjainkban a szívelektrofiziológiai kutatások egyik kiemelkedő részét képezi, ugyanis a spontán automáciában résztvevő mechanizmusok komplexitása miatt a folyamat teljes mértékben ma sem ismert. A 20. század második felétől kezdve számos hipotézis látott napvilágot a szinusz csomó spontán ingerképzését illetően, azonban ezek egyre több kérdést és ellentmondást vetettek fel, mígnem intenzív vita tárgyává vált a spontán ritmusgenerálás háttérében meghúzódó molekuláris mechanizmus kérdése.

A szinusz csomó sejtek akciós potenciálja lényegesen eltér a kamrai szívizomsejtek akciós potenciáljától (AP). Az akciós potenciál *0. fázisa* során megnyílnak a T-típusú-, majd az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák, aminek következtében  $\text{Ca}^{2+}$  áramlik a sejtbe. Az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák aktivációja lassabb mint a  $\text{Na}^+$  csatorna aktivációja a kamrai sejtekben, ezért a gyors depolarizáció meredeksége kisebb a pacemaker sejtekben. A szinusz csomó sejtekben az *1. fázis* repolarizáció hiányzik, ugyanis ezekben a sejtekben nem fejlődik tranziens kifelé haladó  $\text{K}^+$  áram ( $I_{to}$ ). A repolarizációt (*3. fázis*) a késői egyenirányító  $\text{K}^+$  áram gyors komponense hozza létre, ami hiperpolarizálja a membránt, elérve a maximális diasztolés potenciált (MDP). A maximális diasztolés potenciál  $-50 - -60$  mV körül alakul, így a *4. fázis* depolarizáció egy viszonylag depolarizáltabb membránpotenciálról indul. A pacemaker sejtek jellegzetes *4. fázis* depolarizációt mutatnak, amit diasztolés depolarizációnak (DD) is nevezünk. A membránpotenciál lassan depolarizálódik, majd  $-40$  mV-nál eléri a küszöbpotenciált. A szinusz csomó spontán automáciájának mechanizmusa sokáig intenzív vita tárgya volt, azonban abban sosem volt kétség, hogy a sejtek spontán aktivitása a diasztolés depolarizációtól és az azt meghatározó ionáramoktól függ. A kérdés tehát az, hogy milyen mechanizmusok, milyen ionáramok határozzák meg a diasztolés depolarizációt?

A legelső elképzelés az 1950-es évekből származik, amikor Weidmann és mtsai. jelentős szerepet tulajdonítottak a  $\text{K}^+$  áram deaktivációjának a DD fázisa alatt. Méréseiket Purkinje-rostokon végezték, melyek a szinusz csomó sejtekhez hasonlóan szintén spontán automáciát mutatnak. Két eltérő repolarizáló  $\text{K}^+$ -áramot azonosítottak: az időfüggetlen, befelé

egyenirányító  $I_{K1}$ -et, illetve az időfüggő, lassú  $I_{K2}$ -t. Feltételezéseik szerint a DD-t az  $I_{K2}$  lassú deaktivációja és a háttér depolarizáló áramok együttes aktivitása alakította ki.

Ezt követően, 1979-ben Dario DiFrancesco felfedezett egy új áramot, melyet ‘funny áramnak’ ( $I_f$ ) nevezett el. Az áram a nevét különleges tulajdonságairól kapta, ugyanis DiFrancesco és mtsai. további kísérleteikben rájöttek arra, hogy a “funny áram” egy kevert, hiperpolarizációra aktiválódó depolarizáló áram, mely  $Na^+$  és  $K^+$  ionokat szállít. Az áram szinusz csomóban és Purkinje rostokban is képes volt spontán depolarizáció kiváltására. A “funny áram” felfedezése mérföldkőnek számított a szívelektrofiziológiában, és felvetett egy izgalmas kérdést, miszerint hogyan lehetséges az, hogy két eltérő elektrofiziológiai tulajdonságokkal rendelkező áram két eltérő pacemaker szövettípuson ugyanazt a spontán pacemaker mechanizmust hozza létre. A kérdésre maga DiFrancesco adta meg a választ 1981-ben. Bebizonyította, hogy a Purkinje rostokban korábban talált  $I_{K2}$  áram nem tisztán  $K^+$  áram, hanem egy hiperpolarizációra aktiválódó kevert depolarizáló áram, ami azonos a szinusz csomó sejtekben azonosított  $I_f$  árammal. A  $I_f$  áramot sokáig a spontán automatizáció kizárólagos kiváltó okaként tartották számon. Noma és Morad azonban  $CsCl_2$ -dal történő teljes áramgátlás után is tapasztaltak spontán aktivitást a szinusz csomó sejtekben, ami felvetette, hogy más mechanizmusok is szerepet játszhatnak a spontán automatizáció kialakulásában. Nem sokkal később, Rigg és Terrar eredményei rámutattak arra, hogy a szarkoplazmatikus retikulum (SR)  $Ca^{2+}$  felszabadulások gátlása jelentős frekvencia csökkenést okozott, hangsúlyozva az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szerepét az automatizációban. Lakatta és mtsai. a  $Ca^{2+}$  tranzienst (CaT) előtt spontán, ritmikus intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint emelkedést (LCR) figyeltek meg, ami a DD késői fázisában jelent meg. Az LCR-ek aktiválják a  $Na^+/Ca^{2+}$  kicserélő (NCX) forward működési módját, ami inward áram generálása révén direkt módon járul hozzá a DD-hoz. Így született meg a  $Ca^{2+}$  óra hipotézis, mely szerint a szarkoplazmatikus retikulum mint  $Ca^{2+}$  óra funkcionál és a lokális  $Ca^{2+}$  felszabadulás által kiváltott forward NCX mediált  $Na^+$  beáramlás határozza meg a DD-t, figyelmen kívül hagyva a  $I_f$  áram szerepét. A munkacsoportok között intenzív vita alakult ki a “funny áram” hipotézis és a  $Ca^{2+}$  óra hipotézis domináns mivolta talaján. Később a “funny áram” hipotézis, egy bővített *membrán óra hipotézissé* alakult, szerepet tulajdonítva ezzel a sejt felszíni ioncsatornáknak. Legújabb kísérletes eredmények bizonyították, hogy a két óra mechanizmus szorosan kapcsoltnak, szinergisztikusan működik, így a jelenleg elfogadott hipotézis szerint egy ún. *kapcsolt óra mechanizmus* felelős a spontán automatizáció kialakulásáért. Mivel a mechanizmusban a  $Ca^{2+}$  ciklus és a membrán potenciál szorosan kapcsoltnak, a  $Ca^{2+}$  függő ionáramoknak jelentős szerepe lehet a folyamatok összekapcsolásában.

## 2. CÉLKITŰZÉS

A szinusz csomó spontán automatáciájának háttérében húzódó folyamatok jelenleg sem teljes mértékben tisztázottak, így célul tűztük ki:

- 1.) megvizsgálni a forward NCX szerepét a szinusz csomó automatáciában egy új, megfelelően szelektív gátlószer az ORM-10962 (ORM) segítségével, illetve tanulmányozni az NCX és az  $I_f$  áram között feltételezett szoros funkcionális kapcsolat szerepét a ritmusgenerálásban szinusz csomó szöveten,
- 2.) vizsgálni a reverz NCX jelenlétét és esetleges szerepét szinusz csomó sejtekben,
- 3.) vizsgálni a  $Ca^{2+}$  aktivált  $K^+$  áram ( $I_{K(Ca)}$ ) szerepét a spontán automatáciában,
- 4.) tanulmányozni a fokozott szinusz csomó automatácia frekvencia-függő hatását a kamrai AP morfológiára (vagyis vizsgálni az intracelluláris  $[Ca^{2+}]$  és a restitúció szerepét a kamrai alternánsok kialakulásában).

## 3. EREDMÉNYEK

### 3.1 A forward NCX és az NCX- $I_f$ funkcionális kapcsolat szerepének vizsgálata

#### 3.1.1 NCX gátlás ciklushossz megnyúlást okozott szinusz csomó szöveten

A szinusz csomó szöveten konvencionális mikroelektród technika segítségével regisztráltuk az akciós potenciálokat, vizsgálva a spontán automatáciát.  $1 \mu\text{M}$  szelektív NCX gátló ORM kismértékű, de statisztikailag szignifikáns ciklushossz megnyúlást eredményezett ( $455.6 \pm 32 \text{ ms}$  vs.  $493.0 \pm 38 \text{ ms}$ ;  $\Delta = 8.1 \pm 1.8\%$   $p < 0.05$ ,  $n = 16/16$  szív). A ciklushossz megnyúlás háttérében feltehetően a DD meredekségének a csökkenése áll, ami ORM hatására szignifikánsan csökkent  $15.7 \pm 3.1 \text{ mV/s}$  vs.  $10.9 \pm 2.8 \text{ mV/s}$ ;  $n = 14/14$ ;  $p < 0.05$ . Az akciós potenciál időtartam (APD) és a ciklushossz variabilitás nem változott.

#### 3.1.2 NCX gátlás nagyobb cikluhossz megnyúlást okozott párhuzamos $I_f$ áram gátlás mellett

A  $I_f$  áram és az NCX közötti feltételezett kapcsolat vizsgálatára a szelektív gátlószereket (ivabradin (IVA) és ORM) egymás után alkalmaztuk.  $I_f$  áram gátlást követő szelektív NCX gátlás hatása szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint az NCX gátlás önmagában ( $8.1 \pm 1.88\%$  versus  $17.1 \pm 2.5\%$ ;  $p < 0.05$ , ANOVA, Bonferroni *post hoc* test). Folyamatos, növekvő ORM hatás figyelhető meg egyre növekvő ivabradin koncentráció mellett.

### **3.1.3 NCX gátlás nem okozott nagyobb ciklushossz megnyúlást a repolarizáció gátlása mellett**

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a depolarizáló áramokat nem befolyásoló, egyéb mechanizmus által kiváltott bradikardia hogyan befolyásolja a szelektív NCX gátlás hatását. A szinusz csomó repolarizációjáért felelős  $I_{Kr}$  áramot 100 nM dofetiliddel gátoltuk, ami szignifikáns ciklushossz megnyúlást eredményezett (kontroll:  $489.3 \pm 31$  ms  $\rightarrow$  100 nM dofetilid:  $649.1 \pm 40.2$  ms). Dofetilidet követő ORM adás ugyanazt a ciklushossz megnyújtó hatást váltotta ki, mint a korábbiakban önmagában alkalmazott ORM ( $7.2 \pm 1.8\%$  vs.  $8.1 \pm 1.8\%$ ), tehát az ORM ciklushossz nyújtó hatása ebben az esetben nem volt additív. Fontos megjegyezni, hogy a dofetilid indukált frekvencia csökkenés mértéke megegyezett az ivabradin által okozott frekvencia csökkenés mértékével. A dofetilid mediált ciklushossz megnyúlást az akciós potenciál időtartamának (APD) megnyúlása okozta, míg az  $I_f$  gátló ivabradin a diasztolés intervallumot megnyújtva váltott ki ciklushossz megnyúlást, az akciós potenciál időtartamának megváltoztatása nélkül. Az ORM additív ciklushossznyújtó hatásának elmaradása dofetilid után feltehetően annak az oka, hogy támadáspontjuk nem azonos folyamat. Az NCX gátlás és a  $I_f$  áram gátlás is a diasztolés intervallumot befolyásolja a DD meredekségének csökkentése révén, míg a dofetilid csupán a repolarizációra hat, nincs befolyása a DD-ra.

### **3.1.4 $I_f$ áram gátlás nagyobb ciklushossz megnyúlást okozott csökkent $[Ca^{2+}]_i$ mellett**

Kísérleteinkből látható, hogy az NCX gátlás hatása csökkent  $I_f$  mellett szignifikánsan nagyobb mint önmagában. Szoros kapcsolatot feltételezve az NCX és az  $I_f$  között, a  $Ca^{2+}$  függő folyamatok gátlása nagyobb  $I_f$  gátló hatást sejtet. A  $Ca^{2+}$  felszabadulás forward NCX áram fokozó hatását 5  $\mu$ M ryanodinnal gátoltuk, majd az NCX funkcióját ORM-mel gátoltuk. A  $Ca^{2+}$  háztartás szupresszálása ciklushossz megnyúlást okozott ( $437.8 \pm 20.3$  ms vs.  $499.8 \pm 10.4$  ms;  $p < 0.05$ ,  $n = 6/6$ ). Az ezután alkalmazott  $I_f$  gátló 3  $\mu$ M ivabradin szignifikánsan nagyobb ciklushossz megnyúlást okozott mint önmagában alkalmazva (ryanodin és ORM után,  $42.4 \pm 5.7\%$ ,  $p < 0.05$ , Student t-teszt). Egy másik kísérletsorozatban az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szupresszálását az extracelluláris oldat  $Ca^{2+}$  koncentrációjának felére csökkentésével értük el (0.9 mM  $CaCl_2$ ). Csökkent extracelluláris  $Ca^{2+}$  szint megnyújtotta a ciklushosszakat, amit 3  $\mu$ M ivabradin tovább nyújtott (kontroll:  $469 \pm 39.5$  ms  $\rightarrow$  0.9 mM  $[Ca^{2+}]_{k\ddot{u}ls\ddot{o}}$ :  $515.8 \pm 40.8$  ms  $\rightarrow$  3  $\mu$ M ivabradin:  $777 \pm 58.7$  ms;  $p < 0.05$ ,  $n = 6/6$  szív). Az ivabradin ciklushossz megnyújtó hatása ebben az esetben is nagyobbak adódott mint intakt  $Ca^{2+}$  ciklus mellett

önmagában alkalmazott ivabradin hatása ( $51.1 \pm 5.1\%$  vs.  $20.99 \pm 4.1\%$ ,  $p < 0.05$ ; Student t-teszt).

### **3.1.5 NCX és $I_f$ párhuzamos gátlása fokozza a ciklushossz variabilitást**

A szinusz csomó ingerképzésének ritmicitása és stabilitása nélkülözhetetlen a fiziológias kardiovaszkuláris funkció fenntartásához. A ciklushossz variabilitást 30 egymást követő akciós potenciál analizálásával vizsgáltuk szinusz csomó szöveten. Önmagában alkalmazott  $1 \mu\text{M}$  ORM vagy  $3 \mu\text{M}$  ivabradin ciklushossz megnyúlást okoztak, de nem befolyásolták jelentősen a ciklushossz variabilitást.  $5 \mu\text{M}$  rynaodine és  $1 \mu\text{M}$  ORM egymást követő alkalmazása kismértékben, de statisztikailag nem szignifikáns mértékben fokozta a ciklushossz variabilitást. Azonban gyengített  $\text{Ca}^{2+}$  ciklus után alkalmazott  $3 \mu\text{M}$  ivabradin jelentős, statisztikailag szignifikáns ciklushossz variabilitás növekedést okozott.

## **3.2 A reverz NCX szerepének vizsgálata**

### **3.2.1 Kísérleti csoportok validálása a reverz NCX áram mérésekhez**

A reverz NCX áram karakterizálására két kísérleti csoportot hoztunk létre a megfelelő összehasonlíthatóság érdekében. Az egyik csoportban a patch clamp pipetta  $\text{Na}^+$  koncentrációját  $8 \text{ mM}$ -ra állítottuk be ( $8 \text{ mM} [\text{Na}^+]_{\text{pip}}$ ), ami megközelítően a fiziológias  $\text{Na}^+$  koncentráció szinusz csomó sejtekben. A másik csoportban a pipetta oldat  $\text{Na}^+$  koncentrációját  $2 \text{ mM}$ -ra csökkentettük, mely koncentráció mellett a reverz NCX áram szupresszált, de a kicserélő funkciója megtartott. A kísérleti csoportok validálása céljából elsőként hagyományos feszültség ramp protokollal vizsgáltuk az NCX áramot a két kísérleti csoportban.  $2 \text{ mM} [\text{Na}^+]_{\text{pip}}$  esetén nem fejlődött reverz NCX áram, míg a  $8 \text{ mM} [\text{Na}^+]_{\text{pip}}$  csoportban jelentős reverz NCX áram ábrázolódott. Az NCX áramot a kontroll áram és az NCX gátló  $\text{NiCl}_2$  és ORM után maradt áram különbségeként kaptuk meg. A szelektív NCX gátló ORM hatását is megvizsgáltuk a két kísérleti csoportban, de nem találtunk  $\text{Na}^+$  függő hatást, mindkét csoportban ugyanakkor gátló hatást fejtett ki a forward NCX-en. Emiatt az ORM megbízhatóan alkalmazható az NCX áram karakterizálására a továbbiakban.

### **3.2.2 Az NCX áram karakterizálása szinusz csomó akciós potenciál parancsjel alatt**

A spontán kontraháló szinusz csomó sejteken vizsgáltuk az NCX áram lefutását egy korábban felvett szinusz csomó akciós potenciál parancsjel alatt. Az NCX áram teljes farmakológiai gátlása céljából a kontroll áram felvétele után az áramot  $10 \text{ mM}$   $\text{NiCl}_2$ -dal gátoltuk. Az NCX áramot ebben az esetben  $\text{NiCl}_2$  szenzitív áramként definiáltuk.  $2 \text{ mM} [\text{Na}^+]_{\text{pip}}$  esetén elhanyagolható,  $0.33 \pm 0.3 \text{ pC}$  nagyságú outward komponenst detektáltunk ( $n=5$ ), míg  $8 \text{ mM}$



$[Na^+]_{pip}$  esetén az outward NCX komponens szignifikánsan nagyobb volt ( $2.1 \pm 0.3$  pC,  $n=7$ ,  $p < 0.05$ ). Ez az érték megközelítően pontos egyezést mutat a Maltsev-Lakatta modell által jósolt reverz NCX áram nagyságával ( $2.45$  pC). Jelen kísérleti körülmények alkalmasak a szállított töltés becslésére, azonban a  $Ca^{2+}$  felszabadulás gátolva van, ami viszont elengedhetetlen hajtóereje az NCX működésnek. Emiatt, ugyanezt a protokollt megismételtük ugyancsak spontán kontraháló szinusz csomó sejteken, de ebben az esetben nem  $NiCl_2$ -ot használtunk az NCX gátlására. Szelektív NCX gátló ORM alkalmazása nem befolyásolta az  $I_{CaL}$ -t, így a  $Ca^{2+}$  felszabadulást sem gátoltuk. Az ORM szenzitív áram a  $NiCl_2$ -hoz hasonlóan jelentős reverz komponenst mutatott  $8$  mM  $[Na^+]_{pip}$  esetén az akciós potenciál kezdeti fázisán, míg alacsony  $[Na^+]_{pip}$  koncentráció mellett nem fejlődött reverz NCX áram.

### 3.2.3 Aktív reverz NCX fokozza a $Ca^{2+}$ tranziens nagyságát

A  $Ca^{2+}$  tranziens vizsgálata során a szinusz csomó akciós potenciál parancsjel alatt vizsgáltuk a diasztolés  $Ca^{2+}$  szintet és a  $Ca^{2+}$  tranziens amplitúdóját. A  $8$  mM  $[Na^+]_{pip}$  csoportban, vagyis funkcionáló reverz NCX mellett a  $Ca^{2+}$  tranziens amplitúdó szignifikánsan nagyobb volt, összehasonlítva a  $2$  mM  $[Na^+]_{pip}$  csoporttal ( $2$  mM  $[Na]_{pip}$ :  $308 \pm 37$  nM,  $n=14$  vs  $8$  mM  $[Na]_{pip}$ :  $539 \pm 52$  nM,  $n=14$ ;  $p < 0.05$ , ANOVA with Tukey *post hoc* test). A diasztolés  $Ca^{2+}$  szintben nem találtunk különbséget ( $2$  mM  $[Na]_{pip}$ :  $117 \pm 14$  nM, vs  $8$  mM  $[Na]_{pip}$ :  $149 \pm 24$  nM,  $n=14$ ;  $p < 0.08$ , ANOVA with Tukey *post hoc* test), azonban a tranziens relaxációs félideje szignifikánsan nagyobbak bizonyult az aktív reverz NCX áram következtében ( $2$  mM  $[Na]_{pip}$ :  $112 \pm 5$  ms vs  $8$  mM  $[Na]_{pip}$ :  $146 \pm 9$  ms;  $n=14$ ;  $p < 0.05$ ; ANOVA és Tukey *post hoc* test).

### 3.2.4 Aktív reverz NCX fokozza a szarkoplazmatikus retikulum $Ca^{2+}$ tartalmát

Funkcionáló reverz NCX következtében kialakuló megnövekedett  $Ca^{2+}$  tranziens megnövekedett  $Ca^{2+}$  mennyiséget feltételez a szarkoplazmatikus retikulumban. A szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  tartalmának vizsgálatára  $10$  mM kaffeint alkalmaztunk. A kafein kiüríti a  $Ca^{2+}$  raktárakat, egy nagy inward áramot és  $Ca^{2+}$  tranziens indukál. Az SR  $Ca^{2+}$  tartalmát a kafein által kiváltott inward áram alatti terület integráljából számoltuk. Aktív reverz NCX fokozta az SR  $Ca^{2+}$  tartalmát ( $8$  mM  $[Na^+]_{pip}$ :  $-3.7 \pm 0.5$  C/F,  $n=11$ ;  $2$  mM  $[Na^+]_{pip}$ :  $-2.3 \pm 0.3$  C/F,  $n=11$ ;  $p < 0.05$ , unpaired t-test).

### 3.2.5 Aktív reverz NCX fokozza a szinusz csomó sejtek spontán automatizációját

Szinusz csomó sejtek spontán ingerképzési frekvenciáját patch clamp technika egészsejtes konfigurációjával mértük. A spontán frekvenciát  $30$  egymást követő akciós potenciál

ciklushosszaiból számoltuk. Nagyobb frekvenciát, vagyis ciklushossz rövidülést láttunk a 8 mM  $[Na^+]_{pip}$  csoportban (8 mM  $[Na^+]_{pip}$ :  $369 \pm 15$  ms vs 2 mM  $[Na^+]_{pip}$   $463 \pm 38$  ms;  $p < 0.05$ ,  $n=8-8$ ). Aktív reverz NCX meredekebb diasztolés depolarizációt ( $0.12 \pm 0.02$  mV/ms vs  $0.07 \pm 0.01$  mV/ms;  $p < 0.05$ ,  $n=8-8$ ) és megrövidült akciós potenciál időtartamot okozott ( $189 \pm 3$  ms vs  $232 \pm 11$  ms;  $p < 0.05$ ,  $n=8-8$ ). A párhuzamosan mért  $Ca^{2+}$  tranziens amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt működő reverz NCX mellett ( $420 \pm 52$  nM vs  $250 \pm 22$  nM;  $p < 0.05$ ,  $n=8-8$ ).

### **3.3 A $Ca^{2+}$ aktivált $K^+$ áramnak nincs szerepe a szinusz csomó spontán automatáciájában**

A szinusz csomó sejtekben történő akciós potenciál mérések során frekvencia fokozódást láttunk működő reverz NCX mellett, míg az APD szintén lerövidült. Az APD rövidülés hátterében elképzelhető, hogy reverz NCX működéstől független folyamat állhat, például a magasabb  $[Ca^{2+}]_i$  indukált fokozott  $I_{CaL}$  inaktiváció vagy egy repolarizáló  $K^+$  áram (pl.  $Ca^{2+}$  aktivált  $K^+$  áram ( $I_{K(Ca)}$ )) aktiválódása. Ebből kifolyólag, vizsgáltuk az  $I_{K(Ca)}$  lefutását a korábban már alkalmazott szinusz csomó akciós potenciál parancsjel alatt. A kontroll áramot 100 nM  $I_{K(Ca)}$  inhibitor apaminnal gátoltuk. Elhanyagolható nagyságú áram adódott. A továbbiakban vizsgáltuk, hogy az  $I_{K(Ca)}$  gátló apamin befolyásolja-e a spontán frekvenciát. Apamin hatására az akciós potenciál egyik paraméterében sem következett be változás (kontroll  $\rightarrow$  apamin; ciklushossz:  $391 \pm 30 \rightarrow 388 \pm 33$  ms; ciklushossz variabilitás:  $43 \pm 10 \rightarrow 41 \pm 13$  ms; APD:  $176 \pm 17 \rightarrow 193 \pm 25$  ms; DD meredeksége:  $0.08 \pm 0.01 \rightarrow 0.08 \pm 0.01$  ms;  $n = 7$ ), ami alapján arra következtetünk, hogy a  $Ca^{2+}$  függő  $K^+$  áramnak nincs szerepe a spontán ingerképzésben normál körülmények között.

### **3.4 A kamrai akciós potenciál alternánsok frekvencia függést mutatnak, de kialakulásuk restitúciótól független**

Jobb kamrai papilláris izmon vizsgáltuk az akciós potenciál restitúciós kinetikáját és akciós potenciál alternáns protokollal az alternánsok megjelenését. A hagyományos S1S2 restitúciós protokollt 1000 ms és 500 ms alap ciklushosszakon vettük fel. Minden esetben megjelentek alternánsok ( $n=20$ ) egy adott frekvencia határ alatt, vagyis 250 ms-nál rövidebb ciklushosszakon. Az alternánsok amplitúdója a kísérletek alatt nem mutatott csökkenő tendenciát, a kísérletek elejétől kezdve egészen a végéig megtartott volt. A restitúció meredekségét és a APD alternánsok amplitúdóját hasonlítottuk össze. Eredményeink azt mutatják, hogy alternánsok a restitúciótól függetlenül minden esetben kialakultak, vagyis

függetlenül attól, hogy a restitúció meredeksége kisebb vagy nagyobb volt mint 1. Eredményeink gyenge korrelációt mutatnak a restitúció meredeksége és az akciós potenciál alternáns amplitúdók között a különböző akciós potenciál időtartamoknál. További eredményeink szoros kapcsolatot mutatnak a  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienst alternáns és az akciós potenciál alternánsok amplitúdója között. Kamrai sejteken egy stimulus akciós potenciál jelforma alatt mértük a kifejlődő  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienst. Nagyobb APD alternáláshoz nagyobb  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienst alternáns társult.

## 4. DISZKUSSZIÓ

A szinusz csomó spontán automatizációjának háttérében álló  $\text{Ca}^{2+}$  függő mechanizmusok működése az intenzív kutatások ellenére sem teljesen tisztázott. Ezért jelen munkánkban vizsgáltuk a 1.) forward NCX szerepét, 2.) a reverz NCX szerepét, 3.) a  $I_{K(\text{Ca})}$  szerepét a szinusz csomó ingerképzésében, illetve 4.) vizsgáltuk a kamrai akciós potenciálok frekvencia függő változásának mechanizmusát.

### 4.1 Az NCX forward működési módja szoros funkcionális kapcsolatot képez a funny árammal, ami által jelentős szerepet játszik a spontán automatizációban

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kicserélő szelektív gátlása kismértékű ciklushossz megnyúlást eredményezett intakt szinusz csomó szöveten, ami közvetlen bizonyíték az NCX szinusz csomó spontán automatizációban betöltött szerepére.

Yaniv és mtsai. sejtes méréseiben látható volt, hogy az  $I_f$ -NCX kapcsolat funkcionális gyengülésének nem csak a frekvencia csökkenés lehet az indikátora, hanem az ezzel párhuzamosan fokozódó ciklushossz variabilitás és a DD destabilizációja. Kísérleteinkben a szelektív NCX gátlás nem okozott ciklushossz variabilitás változást és a frekvencia csökkenés mértéke is kismértékű volt, így arra következtethetünk, hogy az NCX gátlása nem okoz szignifikáns  $I_f$ -NCX 'szétkapcsolást'. Eredményeink alapján az  $I_f$  és NCX között funkcionális kapcsolat valószínűsíthető, ami képes kompenzálni az NCX mediált frekvencia csökkenést. Ez a kompenzáló rezerv kapacitás állhat a 3  $\mu\text{M}$  és 10  $\mu\text{M}$  ivabradin által kiváltott mérsékelt ciklushossz megnyúlás háttérében. Az  $I_f$  és az NCX tehát képes lehet a kamrai szívizomsejtekben már jól ismert repolarizációs rezervhez hasonló ún. 'pacemaker rezervet' létrehozni, ami védő hatású lehet az individuális  $I_f$  vagy NCX gátlás által okozott jelentős frekvencia csökkenéssel szemben. További kísérleteink is egy erős kapcsolat meglétét támasztják alá: szelektív NCX gátlás nem tudta fokozni a ciklushossz megnyúlás mértékét amennyiben a kiindulási frekvencia csökkenést nem a gyengült  $I_f$  áram, hanem a

depolarizációtól független folyamat, jelen esetben  $I_{Kr}$  gátlás okozta. A folyamat magyarázata az NCX  $I_f$  függő kompenzációs hatása lehet.

Feltételezve, hogy szoros kapcsolat van az NCX és az  $I_f$  között, az egymást segítő funkcionális kooperációnak fordítva is működnie kell, vagyis a  $Ca^{2+}$  ciklus gyengülése is befolyással van az  $I_f$  hatására. Ryanodine és ORM együttes alkalmazása nyújtotta a ciklushosszat. Az ezt követő ivabradin ciklushossz megnyújtó hatása szignifikánsan nagyobb volt mint az ivabradin hatása önmagában. Korábbi tanulmányok feltételezték, hogy az NCX- $I_f$  kapcsolatnak nem csak az aktuális frekvencia létrehozásában, hanem a stabil ritmusos ingerképzés fenntartásában is fontos szerepe van. Az NCX és az  $I_f$  áram külön-külön történő gátlása nem növelte a ciklushossz variabilitást. Azonban mindkét áram együttes gyengülése esetén a jelentős ciklushossz megnyúlás mellett szignifikáns ciklushossz variabilitás növekedés volt látható, ami az NCX- $I_f$  kapacitás kimerülésére, csökkent depolarizációs képességére utal.

Összességében elmondható, hogy az  $I_f$  és az NCX egy ún. pacemaker rezervet képez, ami által részt vesznek a DD kialakításában. Külön-külön történő gyengülésük nem okoz jelentős frekvencia csökkenést, mert a másik áram képes a hiányt kompenzálni. Ezáltal biztonsági tartalékot képeznek a szinusz csomó automáciájában, ami stabil és erős szinusz csomó ingerképzést eredményez.

#### **4.2 Az NCX reverz működési módja a $Ca^{2+}$ óra feltöltése révén részt vesz a spontán automáciában**

A kísérleti elrendezésünk alapján számított NCX egyensúlyi potenciál felveti a reverz komponens jelenlétét az AP első 55-65 ms-os fázisában. Ennek megfelelően, egy outward  $NiCl_2$  szenzitív áram fejlődött 8 mM NaCl-ot tartalmazó pipetta oldat esetén, ami viszont hiányzott 2 mM NaCl pipetta koncentráció mellett. Hasonló eredményt kaptunk ORM alkalmazásával is. Ezek alapján egy  $NiCl_2$ -és ORM szenzitív, intracelluláris  $[Na^+]$  függő outward áram fejlődik az akciót potenciál kezdeti fázisában, ahol a membránpotenciál depolarizáltabb. Az áram ezen tulajdonságai a reverz NCX áram jelenlétét bizonyítják szinusz csomó sejtekben. Aktív reverz mód fokozta a szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  tartalmát, ami szignifikánsan megnövekedett  $Ca^{2+}$  tranziens amplitúdót okozott. A megnövekedett  $Ca^{2+}$  mennyiség egy funkcionálisan aktív reverz NCX áramot feltételez, ami többlet  $Ca^{2+}$  beáramlást okoz a sejtbe minden  $Ca^{2+}$  ciklusban. A szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  raktárainak (vagyis a  $Ca^{2+}$  órának) a feltöltése az L-típusú  $Ca^{2+}$  áram és a reverz NCX áram által túlbiztosított lehet. Mivel a spontán automácia  $Ca^{2+}$  függő folyamat, jogosan vetődik fel

a kérdés, hogy a reverz NCX áramon keresztül beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  hogyan járul hozzá a szinusz csomó frekvenciájához. Aktív reverz NCX ciklushossz rövidülést és akciós potenciál időtartam csökkenést okozott. A reverz NCX mediált többlet  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás hozzájárul a  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak feltöltéséhez és a szinusz csomó automácia finomhangolásához.

#### **4.3 A $\text{Ca}^{2+}$ aktivált $\text{K}^+$ áramnak nincs szerepe a spontán automáciában**

A 8 mM  $[\text{Na}^+]_{\text{pip}}$  csoportban megfigyelt ciklushossz rövidülés nem meglepő, viszont az akciós potenciál időtartam rövidülés hátterében több mechanizmus is állhat. Egyrészt fokozódhat a  $\text{Ca}^{2+}$  dependens  $\text{I}_{\text{CaL}}$  inaktiváció, vagy egyéb  $\text{Ca}^{2+}$  függő folyamatok is szerepet játszhatnak a kialakulásában, mint például az  $\text{I}_{\text{K(Ca)}}$  aktiválódása.  $\text{I}_{\text{K(Ca)}}$  gátló apamin alkalmazása során azonban nem fejlődött apamin szenzitív áram és sem a spontán AP frekvenciában, sem az akciós potenciál paramétereiben nem találtunk változást, ami arra utal, hogy normális körülmények között nem fejlődik  $\text{I}_{\text{K(Ca)}}$  és nincs szerepe a szinusz csomó sejtek spontán frekvenciájának kialakításában. Gao és mtsai. által végzett fázis I. vizsgálat eredményei is arra utalnak, hogy az  $\text{I}_{\text{K(Ca)}}$  nem játszik szerepet a szinusz csomó spontán ingerképzésében. 47 egészséges férfi önkéntesen alkalmazott  $\text{I}_{\text{K(Ca)}}$  gátló AP30663 nem okozott változást az EKG paraméterekben, mint például az RR távolságban.

#### **4.4 A kamrai alternánsok kialakulása restitúció független folyamat**

Papilláris izmokon végzett méréseinkben az APD az ingerlési frekvencia emelkedésével párhuzamosan nőtt, majd egy küszöbfrekvenciát elérve minden esetben APD alternánsok jelentek meg. Az APD alternánsok a restitúciótól függetlenül voltak kiválthatók, vagyis az alternánsok kialakulása nem függött a restitúció meredekségétől. Arra következtethetünk, hogy a restitúciónak nincs szerepe az alternánsok kiváltásában és predikciójában. Szoros kapcsolat mutatkozott az APD alternánsok és a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens alternánsok között, ami alátámasztja a kétirányú kapcsolat meglétét a membrán potenciál (vagyis az akciós potenciál) és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  között: fokozott APD alternáns mellett a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens alternáns is nagyobb volt. Az APD és  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdó nagysága is fokozódott növekvő ingerlési frekvencia mellett. Eredményeink azt mutatják, hogy az alternánsok megjelenése a fokozott szinusz csomó automácia arritmogén következménye lehet. Fontos azonban megjegyezni, hogy bár az alternánsok kialakulása frekvencia függő folyamat, egészséges egyéneknél az alternánsok kialakulásához szükséges frekvencia a fiziológias szívfrekvencia tartományon kívül esik. Különböző szívbetegségekben azonban előfordulhat, hogy a frekvencia küszöb az

alacsonyabb frekvenciák felé tolódik, ebben az esetben viszont súlyos kamrai szívritmuszavarokra lehet számítani.

## 5. KONKLÚZIÓ

Összességében elmondható, hogy az NCX- $I_f$  kapcsolat – a DD fenntartásában – és az NCX- $I_{CaL}$  kapcsolat – a  $Ca^{2+}$  óra feltöltésében – két egymással párhuzamos mechanizmus révén hozzájárul a szinusz csomó spontán automatizációjához, biztonságossá téve ezzel a szinusz csomó működést. A szinusz csomó ingerképzése hatással van a kamrai akciós potenciálok morfológiájára is és egy adott frekvencia küszöböt elérve alternánsok kialakulásához vezet, melyek kialakulása nem függ a restitúciótól.

Jelen tudományos munka és Ph.D. disszertáció legfontosabb megállapításai:

- 1.) Az NCX direkt farmakológiai gátlásával kísérletesen bizonyítottuk az NCX forward működési módjának szerepét a spontán automatizáció mechanizmusában, továbbá eredményeink igazolják, hogy az NCX áram és az  $I_f$  áram között szoros funkcionális kapcsolat jelenlétét. Az áramok önálló gátlása nem bontja meg a szinusz csomó ingerképzésének ritmicitását és stabilitását. A két áram létrehoz egy pacemaker rezerv mechanizmust, melynek folyamán képesek egymás gyengülését kompenzálni biztosítva a stabil szinusz csomó frekvenciát.
- 2.) Kísérleteinkben egy feszültség- és intracelluláris  $[Na^+]$  függő outward áram fejlődött a szinusz csomó akciós potenciál kezdeti fázisában, ami ORM és  $NiCl_2$  szenzitív volt, így egyértelműen bizonyítja a reverz NCX áram jelenlétét. A reverz NCX áram mediált  $Ca^{2+}$  beáramlás facilitálja az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintet, így megnöveli a szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$  tartalmát és fokozza a spontán automatizációt.
- 3.) A  $Ca^{2+}$  aktivált  $K^+$  áram nem vesz részt a szinusz csomó spontán automatizációjában
- 4.) A restitúciónak nincs szerepe a kamrai APD- és  $Ca^{2+}$  tranziens alternánsok predikciójában.

## **6. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS**

A disszertáció alapját képező kísérletes munka a Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Karán, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben készült. Hálával tartozom Dr. Baczkó István jelenlegi tanszékvezetőnek és Prof. Dr. Varró András korábbi tanszékvezetőnek, hogy lehetőséget biztosítottak számomra tudományos kutatómunka és doktori tanulmányaim végzésére az Intézetben. Hálásan köszönöm Prof. Dr. Varró András és Prof. Dr. Papp Gyula professzor urak folyamatos szakmai és emberi támogatását, a tudományos kérdések megválaszolásához nyújtott tanácsaikat, segítségüket.

Szeretnék külön köszönetet mondani Dr. Nagy Norbertnek, aki diákkörös hallgató korom óta témavezetőm. Köszönöm folyamatos szakmai és emberi támogatását, kedvességét, illetve, hogy bevezetett a szívelektrofiziológia és a tudományos kutatómunka világába, szakmai hozzáállásával ösztönzött a kritikus gondolkodásmód elsajátítására.

Köszönettel tartozom közvetlen kollégáimnak, egyben barátaimnak, Dr. Nagy Zsófiának, Dr. Topal Leilának, Bitay Gergőnek és Dr. Polyák Alexandrának a kísérletekben nyújtott segítségükért és biztató támogatásukért.

Köszönöm a közös munkát a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden munkatársának. Külön köszönöm az adminisztratív és technikai segítségnyújtást Fritz Reának, Kőrös Anikónak, Girst Gábornak, Dobai Gábornak, Tóth Zsoltnak és Motzwickler Róbertnek. Mérheterlen hálával tartozom családomnak és barátaimnak, különösen szüleimnek, húgomnak, nagypapámnak és vőlegényemnek. Szeretetük és soha nem szűnő támogatásuk a nehezebb időszakokon is átsegített, nélkülük mindezen munka nem jöhetett volna létre.

## **7. TÁMOGATÓK**

A kísérletek megvalósulását az NKFIH PD-125402, GINOP-2.3.2-15-2016-00006, LIVE LONGER EFOP-3.6.2-16-2017-00006 projektek támogatták. Nagy Norbert az FK-129117, Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja, az ÚNKP-18-4-SZTE-76 és az ÚNKP-20-5-SZTE-165 program támogatásban részesült. Tóth Noémi az EFOP 3.6.3 VEKOP-16-2017-00009, ÚNKP-21-3-SZTE-106 és ÚNKP-20-3-SZTE-126 támogatásban részesült.