

OPPONENSI VÉLEMÉNY

HALMOSI RÓBERT

„A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzim gátlása és a természetes polifenolok hatása a kardiovaszkuláris remodellingre és a szívelégtelenség kialakulására”

című MTA Doktori értekezéséről

Általános értékelés

Háttér - témaválasztás

Halmosi Róbert benyújtott MTA doktori értekezésének *témaválasztása* rendkívül időszerű, mivel fókuszában a napjainkban – a humán populáció idős (65+ éves) tagjainak világszerte tapasztalható rohamosan emelkedő létszáma és a betegség komplex etiológiája miatt – egyre jelentősebb népegészségügyi problémát jelentő szívelégtelenség áll, amely – máig nem megoldott megelőzése, illetve mérsékelt eredményes terápiája miatt – kitüntetett tudományos és nem utolsósorban súlyos anyagi kihívást jelent a tudományos közösség, illetve a népegészségügy számára. Jelenleg visszafordíthatatlan kialakulásához a szívszövet morfológiájának fokozatos kötőszövetes átalakulása és ezzel egyidejűleg elektrofiziológiai paramétereinek kóros megváltozásai és instabilitása (strukturális és elektromos remodelling) vezetnek, melyek következtében a szív ciklus során kipumpált vérmennyiség elégtelenné válik a szöveti energetika és funkcionális steady state fenntartásához. A szívizom elektromos és strukturális remodellingjének kialakulását számos, viszonylag ismert patomechanizmus iniciálhatja és/vagy gyorsíthatja. Ezek között meglehetősen előkelő helyet foglalnak el a koronáriák betegségei, az akut és krónikus iszkémiás szívbetegség, a fokozott oxidatív stressz és több más kórfolyamat (billentyűbetegségek, kardiomiopátiák, toxikus ágensek) de a legfontosabb etiológiai faktor a nem megfelelően kezelt hipertónia, ami jelenleg még igazi népbetegség. A szívelégtelenség kialakulásának megelőzésére, valamint progressziójának lassítására az elmúlt időszakban bevezetett új hatóanyagok – β -blokkolók, ACE gátlók, MR antagonisták – megnövelték ugyan a szívelégtelen betegek várható élettartamát, a betegség végső prognózisa sajnos mégis rendkívül rossz. Korai fázisában az elektromos aktivitás összeomlása (hirtelen szívhalál), későbbi fázisában az elégtelenné váló pumpafunkció vezet a beteg halálához.

Halmosi Róbert doktori értekezésében részletesen ismertetett tudományos munkássága a szívelégtelenség progressziója során kialakuló irreverzibilis kardiovaszkuláris remodelling patomechanizmusainak mélyebb megértését és új terápiás stratégiák kidolgozását célozza. Ennek érdekében két kardioprotektív hatású hatóanyagot vizsgál részletesebben: az oxidatív stressz szívkárosító hatásaiban kulcsszerepet játszó poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP-1)

enzimet gátló, hazai, pécsi fejlesztésű L-2286 molekulát (beleértve annak egyes molekuláris háttérmechanizmusokra, valamint intracelluláris jelutakra gyakorolt hatásait is) és a francia borbarátok szívét igen eredményesen „karbantartó” rezveratrolt. Mindezek alapján Halmosi Róbert értekezésének témaválasztását egyrészt alapkutatási, másrészt klinikai alkalmazási szempontból is rendkívül aktuálisnak és kiemelkedő fontosságúnak tartom.

Formai szempontok

Az értekezés formailag mindenben megfelel az MTA Doktori Szabályzat követelményeinek. A 200 oldalnyi magyar nyelvű szövegből az érdemi rész 144 oldalt tesz ki, az eredmények jobb megértését 48 ábra + 14 táblázat segíti. A szöveges rész jól áttekinthető, a fogalmazás precíz, könnyen érthető és kellően magyaros. Az ábrák és táblázatok – kisebb hibáktól és következetlenségektől eltekintve – általában megfelelően foglalják össze az állatkísérletek és klinikai vizsgálatok eredményeit. Nyelvtani hibát, zavaró elírást a dolgozat szinte egyáltalán nem tartalmaz, de kissé zavaró, hogy az idegen eredetű szavak átírása nem mindig következetes. Az értekezés szerkezetileg is arányos, az *Irodalmi áttekintés* 18 oldal, ezt követik a *Célkitűzések* (2 oldalon), majd pedig a *Kísérleti és statisztikai módszerek* leírása (18 oldal). Az *Eredmények* részletes bemutatása 59 oldalon történik, a *Megbeszélés* 34 oldalnyi, végül az értekezés érdemi részét a 3 oldalas *Következtetések, új megállapítások* fejezet zárja. Az *Irodalomjegyzék* 371 hivatkozást tartalmaz – ezek többsége azonban több mint 10 éves, viszonylag kevés az újabb, néhány éves publikációkra történt hivatkozás.

Tartalmi szempontok

Az értekezésben bemutatott eredmények saját, originális megfigyeléseken alapulnak. A Jelölt domináns közreműködését egyértelműen bizonyítja, hogy az értekezés elkészítéséhez felhasznált 11 eredeti közlemény közül 8-ban ő az első vagy utolsó szerző. Az alkalmazott módszertan megfelelően megválasztott, releváns: in vitro sejteken, illetve ex vivo és in vivo állatmodelleken végzett kísérletes tanulmányait kiegészítette humán, klinikai vizsgálatokkal is. A felhasznált kísérleti modellek és mérési eljárások a modern kísérletes kardiológia széles körben elfogadott módszerei. Összességében az értekezés egy gondosan megtervezett, koherens kutatási program megvalósítását mutatja be.

Szcientometriai szempontok:

Az MTMT 2018. júniusi adatai szerint Halmosi Róbert tudományos folyóiratokban megjelent *in extenso* dolgozatainak száma összesen 43 (idegen nyelven, nemzetközi folyóiratokban 28, magyar nyelvű folyóiratokban 12), ezekből 28 sikeres PhD védését (2002) követően született (18 az utóbbi 10 évben). Első, illetve utolsó szerzős folyóiratcikkeinek száma 4, illetve 9, továbbá nevéhez fűződik 1-1 könyv- és egyetemi tankönyvfejezet. Közleményeire összesen 726 hivatkozás történt, melyekből 557 független. Publikációinak Hirsch indexe 15, g indexe 28. A dolgozat alapjául szolgáló publikációkból 1-nek első, 7-nek utolsó szerzője. A 11 publikáció összesített impakt faktora több mint 40. Mindezek alapján elmondható, hogy Halmosi Róbert értekezésében feldolgozott publikációs tevékenysége egyértelműen teljesíti az MTA doktori cím elnyeréséhez szükséges követelményeket.

Az értekezés részletes bírálata

Irodalmi összefoglaló és Célkitűzések

Az irodalmi összefoglaló 8 alfejezetének fókuszában a szívelégtelenséggel, illetve legfőbb rizikófaktoraival (hipertónia, koszorúér-betegség, oxidatív stressz) kapcsolatos legalapvetőbb információk összegzése áll. A fokozott oxidatív stressz szövethárosító hatásait egyrészt szervszinten részletezi, másrészt összefoglalja a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP-1) enzim kórosan megnőtt aktivitása következtében kialakuló szív/érrendszeri károsodások háttérét képező szubcelluláris folyamatokat, a jelátviteli faktorok ezekben betöltött szerepét, valamint a mitokondriumok súlyos, stressz-indukált károsodásának következményeit az irreverzibilis strukturális remodellingben és a szívelégtelenség kialakulásában. Végezetül – bár szerintem kissé vázlatosan – összefoglalja az alkalmazott két hatóanyag legfontosabb tulajdonságait. Az irodalmi háttér jobb megértését 2, ugyancsak kissé vázlatos ábra segíti. Mivel még a kardiológiai érdeklődésű és felkészültségű olvasók igen jelentős része sem feltétlenül járatos a PARP-1 gátlással kapcsolatos tudományos kutatásokban, véleményem szerint fontos, az információk az olvasó általi hatékony összegzését jótékonyan befolyásoló hatású lett volna néhány részletes magyarázó ábra beillesztése, különösen a rendkívül komplex szubcelluláris jelutak és ezek interakciói vonatkozásában. Az irodalmi adatok ismertetését követően Jelölt a leírtakra alapozva fogalmazza meg a munkacsoportjuk által megválaszolandó kérdéseket, illetve nevezi meg az értekezés mértéktartó, világos célkitűzéseit.

Módszerek és anyagok

A kísérletes munka széleskörű, modern metodikai bázison nyugszik, melyeket a Jelölt igen magas színvonalon alkalmaz. Az állatkísérletes modelleken végzett vizsgálatok alapját az ismert, általánosan alkalmazott laboratóriumi (enzimaktivitás mérés, Western-blot analízis), illetve szövettani (immunhisztokémia, konfokális fluoreszcens és elektronmikroszkópia) meghatározásokon kívül izometriás érmiográfiás mérések, noninvazív kardiológiai eljárások (EKG, hemodinamikai monitorozás), P^{31} NMR spektroszkópia, továbbá modern képalkotó technikák (transztorakális echokardiográfia) képezik. A módszerek fejezetben bemutatott 2 ábra mellett a jobb megértés érdekében hasznos lett volna néhány további magyarázó ábra és a kevésbé ismert technikákkal kapcsolatban a hivatkozásokon kívül a mérés/kiértékelés lényegének tömör ismertetése („briefly”). A rezveratrollal végzett humán vizsgálatok szintén a jelenlegi klinikai irányelveknek megfelelően történtek. A mérési adatok szokásos statisztikai analízise mellett esetleg további értékes információkkal szolgálhatott volna a paraméterek (pl. enzimaktivitások) közötti korreláció elemzése is.

Eredmények

Az eredményeket összefoglaló fejezet logikus felépítésű, a magyarázó szöveg tömör és jól érthető. A szöveges részhez kapcsolódó ábrák és táblázatok (44 ábra, 16 táblázat) világosan szerkesztettek és vizuális segítséget nyújtanak az eredmények megértéséhez. Bár az ábrák többsége viszonylag jól áttekinthető, néhány ábra mérete kisebb a kívánatosnál (pl. 6, 12, 17, 18, stb.); rajtuk a magyarázó szöveg nagyító nélkül meglehetősen nehezen olvasható, a részlegesen átfedő görbék alig elkülöníthetők. Szokatlan módon a legtöbb ábrára jellemző,

hogy az alkalmazott hatóanyag (akár csak közelítő) koncentrációja sem az ábrán, sem magyarázatában nem szerepel. A fejezet szerkesztésével kapcsolatban az egyetlen kritikai észrevétel kissé túlzott széttöredezettsége lehet. A fejezet nagyszámú (pl. 5.2 → 20; 5.3 → 27, összesen 60) alfejezetre bontása nem könnyíti meg az olvasónak az adatok integrálását. Talán célszerűbb lett volna a szervesen kapcsolódó eredmények együttes bemutatása.

Megbeszélés

A „Megbeszélés” fejezetben Jelölt a kapott kísérleti és klinikai vizsgálati eredményeket már sokkal tematikusabb, fókuszáltabb csoportosításban elemzi. A legfontosabb témakörök: a PARP-1 enzim gátlásának következményei kísérletes akut stressz modellekben; a gátlás hatása a hipertónia-indukált strukturális remodellingre; valamint a megfigyelt kardioprotektív hatás molekuláris, szubcelluláris vonatkozásainak (a remodellingben és túlélésben szerepet játszó jelátviteli mechanizmusok és transzkripciós faktorok, egyes érintett hősokk fehérjék, illetve a mitokondrium funkció és sejtenergetika) analízise. Egy alfejezetben összehasonlítja a PARP-1 gátló L-2286, az enalapril és a TEMPOL kardioprotektív hatásait. Végül tömören elemzi a posztinfarktusos kísérletes állatmodellben és humán vizsgálatokban rezveratrol alkalmazásával kapott igen biztató, kardioprotektív hatásokat. Az elemzések mértéktartóak, a következtetések megalapozottak. A meglehetősen komplex összefüggések szemléltetését azonban Jelölt segíthette volna néhány összefoglaló ábra beillesztésével. Ez különösen igaz a szubcelluláris mechanizmusokra vonatkozóan. Végezetül a doktori értekezés izgalmas és igen értékes aspektusát jelenthetné egy olyan alfejezet, amelyben Jelölt ismerteti, hogy a PARP-gátlás és a rezveratrol alkalmazás pozitív hatásával kapcsolatos, esetenként 10 évvel korábban született saját eredmények és azok interpretációja miként állták ki az idő próbáját, nyerhetnek-e némiképp más értelmezést a legújabb irodalmi adatok ismeretében.

Következtetések és új tudományos eredmények összegzése

A jelölt összesen 8 alpontba csoportosítva, áttekinthetően és érthetően mutatja be és foglalja össze az értekezésben található legfontosabb megfigyeléseket

Halmosi Róbert új tudományos eredményeiként az alábbiakat fogadom el:

1. Több különböző kisállat (patkány és egér) kísérletes (sejtes, ex vivo, in vivo) modellben igazolta, hogy a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP-1) enzim erősen fokozott aktivitásának munkacsoportjuk által fejlesztett L-2286 hatóanyaggal történő gátlásával az ACE gátló enalaprillal összevethető mértékben lassíthatók az akut és krónikus szívelégtelenséghez vezető patomechanizmusok. Ezáltal jelentősen növelhető az állatok túlélési időtartama.
2. A humán esszenciális hipertóniát modellező spontán hipertenzív (SH) patkánymodellben a PARP-1 enzim L-2286-tal történő farmakológiai gátlása jelentősen lassítja a hipertenzió által indukált szívkárosodások kialakulását, illetve az érfal kóros remodellingjét, továbbá csökkenti a hipertónia központi idegrendszeri hatásait; ezáltal a PARP-1 gátlás jelentős protektív hatása ígéretes terápiás stratégiát jelenthet a szívelégtelenség és a hipertónia-indukált szervkárosodások kialakulásának késleltetésében.

3. Kisállat modellekben mind akut, mind krónikus stressz állapotokban a PARP-1 enzim gátlása (L-2286) csökkenti a szív és agy érrendszerének kóros átépülését (remodelling) Gátolja a sejtek NAD⁺ tartalmának kiürülését (ezáltal a kollagén-lerakódást, fibrózist és sejtpusztulást), több PKC izoforma kóros aktivitás-növekedését, valamint a MAP-kinázok fokozott aktivitását. Ezzel szemben serkenti néhány, a sejt túléléshez szükséges jelátviteli faktor aktivitását és megnöveli az oxidatív fehérjekárosodások kialakulását gátló egyes hő sokk-fehérjék (HSP72, HSP90) mennyiségét. Nagymértékben csökkenti a stressz-indukált mitokondrium-fragmentációt és fiziológias-közeli szinten tartja a mitokondriumok méreteloszlását és ultrastruktúráját. Ennek következtében csak kismértékben csökken a légzési lánc fehérjéinek aktivitása, viszont számottevően mérséklődik a szekunder (ROS-indukált) ROS szintézis.
4. Kisállat (patkány) modellekben a strukturális remodellingben fontos szerepet játszó főbb szignalizációs faktorokra gyakorolt hatásával, azok kóros aktivitásának fiziológias irányba történő jótékony modulációjával, s ezáltal az oxidatív stressz-indukált szövetkárosodás és kollagén lerakódás csökkentésével a rezveratrol jelentősen lassítja a posztinfarktusos szívelégtelenség kialakulását. Humán klinikai vizsgálatokban, posztinfarktusos koronária betegekben, az alkalmazott gyógyszeres szekunder prevenció kezelését kiegészítve a rezveratrol fontos kardioprotektív hatással rendelkezik, védi az endotél integritását, javítja a balkamrai diasztolés funkciót, csökkenti az LDL-koleszterin szintet, továbbá gátolja a kedvezőtlen hemoreológiai változásokat.

Az értekezéshez kapcsolódóan az alábbi tartalmi kérdéseim vannak

1. *Az állatkísérletek kisállatokon (patkány, egér) történtek. Ugyanakkor jól ismert, hogy a hatóanyagok kisállat modelleken igazolt kiváló kardioprotektív hatására vonatkozó megfigyelések klinikai felhasználhatósága, transzlációja humán betegekre sokszor eredménytelen (pl. Heusch G. Circ. Res. 2017;120:1477-1486). Kissé jobb a helyzet nagyállat (kutya, kecske, sertés) modellekből származó megfigyelések transzlációja vonatkozásában, de ilyenkor is elengedhetetlen azok humán validációja. Kérdésem, mi indokolta a patkánymodellek alkalmazását? Vannak-e saját, nagyállat modellekből származó adataik, illetve elérhető-e ilyen jellegű irodalmi adatok?*
2. *A humán szívelégtelenség korai fázisaiban a talán legfontosabb halálozási ok a szív elektromos aktivitásának összeomlása (hirtelen szívhalál); az összes szívelégtelen beteg közel 50%-át érinti. Megfigyeltek-e ilyet az in vivo állatkísérletekben?*
3. *Az értekezésből számomra hiányzik a rezveratrol és a PARP gátlás szívizomsejtek elektromos remodellingjére (csatorna downreguláció, Ca²⁺ homeosztázis zavarok, akciós potenciál vezetési zavarok, a nyugalmi potenciál instabilitása) gyakorolt hatásának analízise. Vannak-e ilyen irányú saját vagy irodalmi adatok?*
4. *A posztinfarktusos szívelégtelenség (Langendorff) kísérletekben hogyan győződtek meg arról, hogy a túlélő állatok valóban szívelégtelenek voltak? A vizsgált reperfúziós időtartam mindössze 15 perc volt. Az adott modellben általában hosszabb reperfúziós időtartamot vizsgálnak (30-120perc). Stabilizálódtak-e a vizsgált paraméterek ilyen rövid idő alatt?*

5. Tudjuk, hogy jelenleg az SHR modell a humán hipertónia talán legjobb állatmodellje. De hasonlóan jó modell-e a szívelégtelenségre? A humán krónikus szívelégtelenség mely fontosabb jellemzői jelennek meg az SH patkányokban is és vannak-e, amelyek nem (pl. elektromos remodelling vonatkozásában)? Mit gondol, a pozitív eredmények milyen mértékben alkalmazhatók humán hipertónia-indukált szívelégtelenségben?
6. Korai vizsgálataikban azért használták a saját fejlesztésű PARP-1 gátlószert, mert akkoriban nem álltak rendelkezésre effektívebb hatóanyagok. Mennyire volt érvényes ez a megállapítás a későbbi kísérletekben? És jelenleg? Az irodalomban leírt újabb gátlószerek (INO-1001, 5-AIQ, stb.) farmakológiai paraméterei hogyan viszonyulnak az L-2286 azonos paramétereihöz (szelektivitás, IC_{50} , dózishatásgörbe, aktív plazma koncentráció és felezési idő)? Mekkora lehet az L-2286 az értekezésben is említett scavenger aktivitásának hozzájárulása a kapott kardioprotektív hatáshoz?
7. Az összehasonlító vizsgálatok (pl. L-2286 vs. enalapril) eredményei nagymértékben függenek az alkalmazott hatóanyagok aktív plazmakoncentrációjától, ezért ilyen jellegű tanulmányok során érdemes öbb (sc. vagy per os) dózist alkalmazni. Hogyan történt az összehasonlítandó dózisok meghatározása? Vannak-e plazmakoncentrációs vagy kinetikai adataik? Történt-e valamilyen kalibráció a szubcelluláris NAD^+ szintekre?
8. A toxin-indukált szívelégtelenség modellben a heti 2 x 3mg/kg dózisban alkalmazott Doxorubicin (DOX) súlyos mitokondrium károsodásokat okozott. Közeliítőleg mekkora DOX plazmakoncentrációnak felel ez meg? Használták-e a Tempolt a megadottnál (20 mg/kg) nagyobb koncentrációban? Vannak-e saját, vagy irodalmi összehasonlító adataik más, esetleg krónikus (pl. alkohol) toxikus modellekből?
9. Lehet-e klinikai relevanciája a PARP-1 enzim gátlásának (mint jól tudjuk, a rezveratrol alkalmazásának igen)? Milyen körülmények között lehet indokolt a használata – a szívelégtelenség korai, esetleg késői fázisaiban? Vannak-e friss irodalmi adatok a gátlás humán alkalmazására vonatkozóan? Történt-e próbálkozás szívelégtelen pácienseken? Ha igen, milyen eredménnyel, ha nem, vajon miért nem? Van-e a krónikus PARP gátlásnak kedvezőtlen, esetleg veszélyes következménye? Ha igen, ez mennyire súlyos? Milyen komorbiditások esetén nem szabad használni?
10. Mit gondol, minden szervben problémát okoz a PARP fokozott aktivációja? Vannak-e kórképek, amelyekben a PARP aktivitás fokozásának lehetne klinikai relevanciája? Ismer-e ilyen vonatkozású irodalmi adatokat? Egyáltalán, van-e elérhető, effektív és viszonylag szelektív PARP aktivátor?
11. A rezveratrol vizsgálatokat NEM szívelégtelen humán pácienscsoporton végezték. Mi az oka? Vannak-e saját, vagy irodalmi adatok szívelégtelen humán páciensekből?
12. Az irodalmi adatok szerint a rezveratrol elsősorban az ereken fejti ki védő hatását. Leírták-e hasonló, jelentős védőhatását szívizomsejteken? Milyen oki összefüggés vagy átfedés lehet a PARP gátlás és a rezveratrol alkalmazás hatásmechanizmusai között? Kardioprotektív hatásukban lehet-e más kritikus szervekre (pl. agy, vese, máj, endotél) gyakorolt protektív hatásuknak szerepe; ha igen, milyen mértékben?

Összefoglaló vélemény

Halmosi Róbert értekezése értékes és igen eredményes, állatkísérleteteket és humán klinikai vizsgálatokat egyaránt tartalmazó, magas színvonalú tudományos munka összefoglalása. A bemutatott eredmények és kapcsolódó interpretációk meggyőzőek. Megfigyelései fontosak és újszerűek, következtetései mértéktartóak. Vizsgálati eredményeit színvonalas nemzetközi folyóiratokban közölte. Fenti kritikai megjegyzéseim, részletesebb vagy további információkra irányuló kérdéseim semmiképpen sem csökkentik a doktori tudományos munkásság vitathatatlan értékét. Az értekezés mind tartalmi, mind formai szempontból egyértelműen megfelel az MTA Doktori fokozat megszerzéséhez szükséges előfeltételeknek.

Fentiek alapján az MTA Doktori Tanácsának javaslom Halmosi Róbert MTA doktori értekezésének nyilvános vitára bocsátását, illetve sikeres védelem esetén az értekezés elfogadását, valamint az MTA doktori cím odaítélését.

Budapest, 2019. szeptember 13.

Tóth András
az MTA doktora