

Válasz Dr. Nemes Attila egyetemi tanár, az MTA doktora, opponensi bírálatára

Szeretném megköszönni Nemes Attila Professzor Úrnak, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát. Köszönetet mondok értékes és segítő észrevételeiért, elgondolkodtató kérdéseiért.

Az általános megjegyzésekre adott válaszaimat az alábbiakban részletezném.

Az opponensi véleményben megjegyzésként leírásra került, hogy viszonylag kevés az elmúlt néhány évből származó irodalmi hivatkozás. Tekintettel arra, hogy a jelen disszertációban szereplő kutatómunka effektíve 2003-2016 között zajlott, a cikkek 2005-2017 között jelentek meg és maga a disszertáció is végleges formát öltött 2018 legelejére (tehát majdnem két éve), ezért az elmúlt pár évből valóban csak néhány hivatkozás található meg a disszertációban. A hivatkozások harmada azonban 2010 utáni. 2000 előtti hivatkozás pedig mindössze az összes hivatkozásszám 15 százaléka. Ezek jó része is metodikai hivatkozás, illetve ma már alapvetésnek tekintett adatok alátámasztására használtam fel ezeket a régi irodalmi adatokat. Itt szándékosan igyekeztem megkeresni az eredeti közleményeket.

A rövid téziszfüzet szerkesztésével kapcsolatos hiányosságként említi opponensem, hogy az Eredmények ismertetése és a Megbeszélés rész kimaradt. Valóban, az irodalmi háttér összefoglalását, a célkitűzések és a módszerek ismertetését követően a Következtetések, új megállapítások fejezet 2,5 oldalban foglalja össze a disszertáció eredményeit. Mivel egyértelmű előírást nem találtam a téziszfüzet összeállításával kapcsolatban, a közelmúltban MTA doktori védésen sikeresen átesettek téziszfüzeteit néztem át. Kétségtelen sokan ismertetik az eredményeiket, néha megbeszélés is található a tézisek összefoglalása előtt, azonban elmondható, hogy mindenki más és más metódust választott. Volt, aki a disszertációját egy az egyben átemelte, a sorközök csökkentésével és az ábrák elhagyásával. Vannak nagyon rövid, vázlatos téziszfüzetek is, ahol a két hiányolt fejezet együttesen érdemben nem hosszabb, mint az én téziszfüzetemben a tézisek, az új megállapítások ismertetése. Van, aki a módszertant hagyta el, volt aki a tézisek közé szúrt be néhány mondatos magyarázatot. Első nekifutásra én is Opponensem által preferált szerkezetet próbáltam ki, de úgy nagyon hosszú lett volna a téziszfüzet, így a jelen forma mellett döntöttem, melyre szintén találtam példát a korábbi téziszfüzetek között.

A formai megjegyzésekre adott válaszaimat az alábbiakban részletezném:

1. Munkám során ugyan igyekeztem törekedni a magyaros írásmódra, van azonban néhány szó, aminek a latinos írásmódja sajnos régről rögzült bennem. Ilyen szó pl. az „echocardiographia”, aminek a latinos írásmódja különösen a tartalomjegyzékben szembetűnő, mivel pont alatta

helyezkedik el a „vaszkuláris ultrahang” magyaros írásmóddal. A 45. oldalon található 4. ábra pedig figyelmetlenség miatt maradt angol nyelvű. Másrészt egyes kifejezéseket nem lehet jól lefordítani magyarra, ilyen pl. az említett scaffold kifejezés is.

2. A rövidítések listájából valóban hiányzik a DNS magyarázata, bár ez esetben véleményem szerint mára már a laikusok által is ismert rövidítésről van szó.

3. A kétféle echocardiographiás fejezet között valóban jelentős diszkrepancia van a kidolgozottságban és a terjedelemben. Míg a kisállat ultrahangos fejezet jóval részletesebb, kidolgozottabb, addig a humán elég rövid. Azért lett a kisállat ultrahang ilyen részletes, mivel ez a módszer a széles szakmai közvélemény számára nem annyira magától értetődő, mint amennyire mára a humán szívultrahangos vizsgálat azzá vált. Ez utóbbinak a kivitelezését ráadásul a nemzetközi szakmai szervezetek pontosan szabályozzák, amelyre hivatkoztam is.

4. Gépelési hibák alacsony számával kapcsolatos megjegyzését köszönöm, igyekeztem erre figyelni.

5. Köszönöm Opponensem megjegyzését, valóban jobban elkülönült volna a szövegtörzstől a táblázat, ha előtte fel lett tüntetve a táblázat száma. A disszertációmban az ábrákhoz hasonlóan az táblázat számát csak a magyarázó szöveg elején tüntettem fel. Későbbi munkáimban erre figyelni fogok.

6. Az MTA doktori értekezések döntő többségében valóban az egyes tudományos közleményekből származó eredmények külön kerülnek ismertetésre és ezt a felosztást követi a Megbeszélés fejezet is. Én igyekeztem a különböző tudományos publikációkból származó eredményeket szintetizálni és az eredményeket mechanizmusok szerint csoportosítva tárgyalni, ezáltal egy egységes diszkussziót kialakítani. Sajnálom, hogy ez megnehezítette az áttekintést.

7. Azért került mind a rezveratrollal, mind a PARP-gátlással kapcsolatos munka ismertetésre, mert az utóbbi 15 évben ezzel a két hatóanyaggal/mechanizmussal foglalkoztunk kutatásaink során. Egyéb kisebb volumenű munkákat (bradykinin B1 receptor antagonizmus, doxiciklin) kihagytam a disszertációból annak ellenére, hogy a most bemutatott metodológiával vizsgálatuk ezen molekulákat is. Emellett az ismertetésre kerülő mindkét hatóanyag esetében markáns antioxidáns és mitokondrium protektív hatás volt igazolható, és szívelégtelenségben kifejezetten pozitív hatásuk volt. Ráadásul ez a két kutatási irány a jövőben is fontos részét képezi majd munkánknak.

A tartalmi megjegyzésekre adott válaszaimat az alábbiakban szeretném kifejteni:

1. A PARP-gátlás aorta-stiffneszt csökkentő hatásmechanizmusával kapcsolatos kérdés a PARP-gátlás egy igen érdekes aspektusára világít rá.

PARP-gátlás ugyanis annak ellenére bír védő hatással a hipertenzív vaszkuláris remodelling kialakulásával szemben, hogy nincs vérnyomáscsökkentő hatása. A hipertenzív érfalkárosodás makroszkópos jele az intima-media réteg (IMT) vastagságának növekedése, illetve funkcionálisan az aorta stiffnessének a fokozódása. Ennek hátterében szövettanilag a vaszkuláris simaizomsejtek proliferációja, illetve a kollagén mennyiségének jelentős felszaporodása áll (Brown IAM et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38(9), 1969-1985, 2018.). Vizsgálataink során azt észleltük, hogy PARP-gátlás mellett az érfal fibrotikus átépülése jelentősen csökkent annak köszönhetően, hogy a PARP-gátlók gátolják a folyamat kialakulását elősegítő jelátviteli faktorok/utak aktiválódását. Jelen tudásunk közül ezek közül az MKP-1 – MAPK rendszer tűnik a legfontosabbnak, melyre direkt és jól leírt hatása van a PARP-gátlóknak (Hocsak E, et al. *Free Radic Biol Med.* 108, 770-784, 2017, Magyar K. et al. *Biochim Biophys Acta.* 1842(7), 935-44, 2014., Eros K et al. *PLoS One.* 12(3):e0174401. doi: 10.1371/journal.pone.0174401. eCollection 2017.).

Az Opponens Úr által felvetett balkamra-aorta interakció egy érdekes koncepció. Eszerint a balkamrában végbemenő kedvezőtlen változások másodlagosan az aortafalban is hasonló változásokat indukálhatnak, merevebbé tehetik azt (Kass DA. *Heart Fail Rev*, 7, 51-62, 2002.). Bár felmerülhet annak a lehetősége is, hogy egyszerűen a közös etiológia (öregedés, krónikus magas afterload) indukál hasonló változásokat a szívben és az aortában (Antonini-Canterin F. et al. *Eur J Echocard* 10, 36-43, 2009). Tekintettel arra, hogy a krónikus magas vérnyomásos patkányok (SHR) balkamrai falvastagsága megnő, fibrotikus átépülés észlelhető ezekben az állatokban, valamint a diasztolés funkció is romlik, előfordulhat, hogy az említett mechanizmusnak szerepe lehet a vaszkuláris eltérések kialakításában. Azonban az eredményeink alaposabb áttekintése során azt találjuk, hogy a korai szervkárosodások esetén a vaszkuláris eltérések kifejezettebbek, mint a kardiálisak. Emiatt én inkább fordítva gondolnám érvényesnek a koncepciót a mi vizsgálati rendszerünkben, inkább a vaszkuláris rendszer protekciója hathat vissza a balkamrai folyamatokra, tehát inkább aorto-ventrikuláris interakciót lehet feltételezni.

2. A PARP-gátlás miokardiális mechanikára, illetve a pitvari funkcióra gyakorolt hatásaira vonatkozik a következő kérdés.

Fontos hangsúlyozni, hogy a PARP-gátlás hatásait a szívre eddig csak preklinikai, jellemzően rágszáló modellekben vizsgálták. Humán klinikai vizsgálatban pedig csak egyéb indikációval (inzulin szenzitizálás, onkológiai kutatás) használták a PARP-gátlókat. Ez azért fontos, mivel a dedikált kisállat ultrahangos berendezések sajnos komoly latenciával követték a humán echocardiographiás berendezések elmúlt évtizedben látott rohamos fejlődését. Kisállatok vizsgálatára alkalmas berendezések esetén a speckle-tracking echocardiographiás módszerek,

amelyekkel a kérdésben szereplő mérések (pl. rotáció) kivitelezhetőek, csak 2014-től elérhetőek.

A kisállatokon végzett kísérletek döntő többségében csak a szisztolés balkamra funkció (EF), illetve a balkamrai falvastagságok és üregméretek meghatározása történt, már a diasztolés funkció meghatározása is rendkívül ritka (ezt az újabb vizsgálatainkban mi már rutinszerűen mérjük).

A pitvari funkciót kisállatban eddig nem vizsgáltuk. A humán echocardiographiás vizsgálattal ellentétben, ahol a csúcsi nézetek a leginformatívabbak és gyakran a legjobb képminőség is innen nyerhető, a rágcslók esetén a csúcsi nézetből nyert képek minősége jóval gyengébb, mint a parasternalis nézetekből származóak. Eddigi munkám során a VisualSonics cég Vevo 770-es echocardiographiás berendezését használtam, melyre abszolút jellemző ez a megállapítás.

Az újabb, immár speckle-tracking móddal is ellátott és korszerű képtimalizációra is képes Vevo 3100-al egyelőre csak az ismerkedési fázisig jutottunk, lehetséges, hogy ezzel már képesek leszünk a pitvarokról értékelhető képeket készíteni és a pitvari funkciót vizsgálni. Ez egyébként a tervezett pitvarfibrillációs vizsgálataink szempontjából is kifejezetten hasznos volna.

3. A rezveratrol esetleges kedvezőtlen hatásaival kapcsolatos a következő kérdés.

Rezveratrol kezelés mellett sem patkány posztinfarktusos szívelégtelenség modellben, sem humán vizsgálatokban (posztinfarktusos, illetve a még nem publikált szívelégtelenség vizsgálatunkban) mellékhatást, kedvezőtlen hatást nem észleltünk. A laboratóriumi paraméterek többsége (vérkép, máj- és vesefunkció) nem változott, mely megegyezett az irodalmi adatokkal és így várakozásainkkal. A koleszterinszint csökkenését láttuk, emellett a gyulladásos citokinek szintje is csökkent (szívelégtelen betegek). Több munkacsoport észlelte a vércukor háztartás javulását is (pl. Brasnyó et. al. Br J Nutr. 106, 383–9, 2011.). Saját adataink azonban ezzel nem egyeztek, sem napi 10 mg (posztinfarktusos stabil coronária betegek), sem napi 100 mg (szívelégtelenség) adása mellett nem észleltünk pozitív hatást a vércukor háztartásra. Igazából ez sem kedvezőtlen hatás, csak egy mások által leírt pozitív változást mi nem tudtunk reprodukálni. Ezen túlmenően a kardiovaszkuláris rendszerben csak pozitív változásokat észleltünk.

4. Rezveratrol javította a diasztolés funkciót, azonban a szisztolés funkcióra nem gyakorolt szignifikáns hatást. Mi lehet a jelenség oka (fibrózis-gátláson túl), milyen vizsgálatokat tervez ezzel kapcsolatban?

A posztinfarktusos stabil coronária betegekben végzett vizsgálatunk során a diasztolés funkció javulása egyértelmű volt, a szisztolés funkció esetében – ugyan van egy minimálisan javuló tendencia – ez azonban nem volt szignifikáns. Tulajdonképp egy közel normális (megtartott) ejekciós frakciójú beteganyagban nehéz is a balkamra funkciót javítani.

Szisztolés szívelégtelen betegekben azonban rezveratrol kezelés hatására nemcsak a diasztolés funkció javult, hanem a szisztolés funkció és a globális longitudinális strain is (ezek az eredmények jelenleg publikáció alatt vannak).

A diasztolés funkció javítására két alapvető mechanizmus képzelhető el, az első a fibrózis gátlása (az Opponens Úr kérésére ezzel most nem foglalkoznék), a másik a szívműködés intrinszik mechanikai tulajdonságainak a megváltozása.

Számos folyamat ronthatja a szívműködés mechanikai tulajdonságait, így az NO termelés csökkenése, koszorúér mikrovaskuláris károsodás, gyulladás, oxidatív stressz, valamint az ioncsatornák és ionáramok megváltozott aktivitása (Na^+/K^+ pumpa, NCX, HNE, SERCA2a). Ezen hatások eredőjeképp lassul diasztolés során az IC kalcium mennyiségének a csökkenése és ezáltal magának a relaxációnak a sebessége. Emellett a titin poszt-transzlációs módosulásai (foszforiláció, diszulfid hidak képződése) is felelősek lehetnek a fokozott merevségért és a diasztolés funkciózavarért (Nikolajevic Starcevic J et al. Int. J. Mol. Sci. 9; 20(5). pii: E1197. doi: 10.3390/ijms20051197, 2019., Asp ML et al. Biochim Biophys Acta. 1833(4), 895–900, 2013.). A titin és egyéb sarcomer fehérjék strukturális és mechanikai vizsgálata egy ideje már foglalkoztat, mely Pécssett ráadásul a PTE ÁOK Biofizikai Intézetben könnyen kivitelezhető is lenne.

A kérdések megválaszolása után még egyszer köszönöm Nemes Attila Professzor Úr bírálatát és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását! Köszönöm építő kritikáit, fontos, elgondolkodtató megjegyzéseit és pozitív véleményét.

Pécs, 2019. 10. 14.

Tisztelettel és köszönettel:

Dr. Halmosi Róbert