

Opponensi vélemény
Dr. Szokodi István
**„Sejtfelszíni receptorok és intracelluláris jelátviteli rendszerek jelentősége a szív
pumpafunkciójának szabályozásában”**
című doktori értekezéséhez

Dr. Szokodi István fenti címen benyújtott doktori értekezése, ha a gyökerekig kívánunk visszamenni, közel 20 év kutatómunkájának és az abból szerzett tapasztalatoknak az összefoglalása. A „gyökerek” az általam igen nagyra becsült és példaképemnek tekintett Juhász-Nagy Sándor által vezetett kutatólaboratóriumhoz nyúlnak vissza, amely olyan szellemi közeget biztosított Szokodi doktor tudományos gondolkodásához, amely a jelen értekezés szinte minden sorából visszaköszön. Az itt megalapozott kutatói szemléletet bővítette, színesítette és a további munkásságához nagyban hozzájárult, hogy olyan kiváló mentorok segítették munkáját, mint Dr. Tóth Miklós, Dr. de Châtel Rudolf, majd Dr. Papp Lajos és Dr. Szabados Sándor szívsebész professzorok. Külön emelném ki Szokodi doktor több mint egy évtizedre visszanyúló kapcsolatát a finnországi Oulu egyetemén kutató Dr. Heikki Ruskoaho-val, akivel mindmáig fenntartott kutatási tevékenységét számos közös közlemény jelzi.

Szokodi doktor értekezésének témája, mint ahogy a cím is sugallja, a szív pumpafunkciójának szabályozásában fiziológias és patológias körülmények között szerepet játszó mechanizmusok vizsgálata. Első megközelítésben arra gondolhatunk, hogy a szívizom kontraktilis funkcióját szabályozó mechanizmusok zömében felderítettek, hiszen minden ezzel foglalkozó tankönyv és kézikönyv részletesen taglalja azokat a folyamatokat, amelyek a szívizom normális pumpafunkciójának fenntartásában szerepet játszanak. Az értekezést olvasva, azonban hamarosan kiderül, hogy ez korántsem így igaz, különösen, ha azokat a mechanizmusokat tekintjük, amelyek a szívizom kontraktilitásának megváltozásában részt vesznek, annak patológias elváltozását előidézik, illetve a szív pumpafunkciójának további romlásához hozzájárulnak. Az értekezés témájának aktualitását igazolja, hogy a szívelégtelenség kialakulásához, annak progressziójához vezető utak, az ezt kísérő magas mortalitás, minden e téren végzett kísérletes és klinikai kutatási erőfeszítés ellenére sem felderítettek, következésképpen a szívelégtelenség ideálisnak tekinthető terápiája korántsem megoldott. Ezen belül is vita tárgyát képezi a pozitív inotróp hatású szerek alkalmazásának jogosultsága, különösen azon szereket tekintve, amelyek az adenilát cikláz-cAMP-PKA útvonal aktiválása révén fejtik ki inotróp hatásukat. Ezek a szerek, mint a jelölt a „*Kutatási eredmények gyakorlati jelentősége*” fejezetben kifejti, hosszú távon inkább rontják, semmint javítják a szívizom működését. Ennek ellenpontjaként azonban tagadhatatlan, hogy a szívelégtelenség bizonyos formáiban a szívizom kontraktilitásának csökkenése, illetve az ennek következtében kialakuló hemodinamikai elváltozások meghatározó jelentőségűek, így a kontraktilis funkció megtartása, annak javítása elengedhetetlen a tünetek csökkentésében és a túlélés biztosításában. A jelölt értekezése, és valójában egész munkássága, ennek a dilemmának a megoldására irányul, olyan új endogén anyagok, az ún. kardiokinek, vizsgálatával, amelyek autokrin/parakrin módon részt vesznek a szívizom kontraktilitásának szabályozásában. Az értekezés külön érdeme, hogy koherens összefoglalást nyújt arról a szisztematikus kutatómunkáról, amelyet a szerző és munkatársai, a legkorszerűbb molekuláris módszerektől az *in vivo* funkcionális vizsgálatokig terjedően, folytattak a kardiokinek kontraktilitására gyakorolt hatásainak és mechanizmusainak felderítésére.

Ha a jelölt eddigi tevékenységének egészét „igen” vagy „nem” válasszal kellene mérlegelni, aligha lehet kétséges a válasz. Szokodi doktor munkássága igen nagy terjedelmű, az értekezés beadásáig nemzetközi folyóiratban megjelent „in extenso” közleményei száma 35 plusz 9

proceedings, amelyek összesített impakt faktora 146.881. Ezek közül 16 közleményt, 2 összefoglaló közleményt, 1 könyvfejezetet és 1 hozzászólást jelölt meg, mint az értekezés alapjául szolgáló publikáció. Itt szeretném megjegyezni, hogy 4 olyan első szerzős közleménnyel rendelkezik, amelyek a kardiológiai folyóiratok elitjének számító *Circulation* vagy *Circulation Research*-ben jelentek meg.

Az értekezés négy kardiokin, az adrenomedullin (AM), apelin, a prolaktin-releasing peptid (PrRP) és az endothelin-1 (ET-1) szívre gyakorolt hatásainak felderítésére végzett vizsgálatokat összegzi. Mindegyik anyag hatásainak és mechanizmusainak vizsgálata mögött hosszú évek szisztematikusan felépített kutatómunkája áll. A 'szisztematikus' kifejezést nem véletlenül használok, ugyanis az értekezés egyértelműen tükrözi, hogy rendkívül jól átgondolt, logikusan felépített gondolkodásról, kísérleti tervezésről van szó, amelyben a felvetett kérdésekre a válaszokat mindig az adekvát vizsgálati módszerek, modellek megválasztásával keresték. Mint említettem, ezek az izolált szívizomsejteken végzett vizsgálatoktól az *in vivo* gén transzfer és funkcionális modellekig, a molekuláris és genetikai vizsgáló módszerektől az *in vitro* és *in vivo* balkamra funkciót monitorozó vizsgálatokig, széles spektrumon mozognak. Egyes esetekben a hatásmechanizmusok pontos felderítésére olyan specifikus módszereket is alkalmaztak, mint a patch-clamp, multielektrod-array, RIA vagy a fluoreszcens technikák.

Az értekezés szöveges része 107 oldal terjedelmű, felépítése jól tagolt, a főbb fejezetek (tudományterületi háttér, célkitűzések, módszerek, valamint az eredmények és megbeszélés) több alfejezetre osztva tárgyalja a vizsgált kardiokinek általános (bevezető), illetve a szerző eredményeiből következő hatásait. Az utolsó négy oldal az új tudományos eredmények összefoglalását és azok gyakorlati jelentőségét ismerteti. Ezt követi, ha jól számoltam, a 434 irodalmi hivatkozás, valamint a szerző publikációs tevékenységét bemutató saját közleményeinek jegyzéke. A formai részhez még további két megjegyzésem lenne. Mint említettem, rendkívül imponáló volt számomra, ahogy Szokodi doktor és munkatársai kísérleteiket megtervezték. Hasonló precizitást és logikát tükröz az értekezés felépítése, stílusa, az ábrák szerkesztése, amelyek a vizsgálatok bonyolultsága ellenére (pl. több agonista-antagonista használata) könnyen áttekinthetők. Az opponens számára nagy segítséget nyújtottak azok az összefoglaló ábrák, amelyek bemutatják azokat a mechanizmusokat, amelyek a szerző eredményeinek alapján feltehetően szerepet játszanak a vizsgált endogén anyag pozitív inotróp hatásában.

Ezen általános értékelést követően, anélkül, hogy az értekezés tudományos eredményeit részleteiben bírálnám, amit a különböző folyóiratok szerkesztőbizottságai már korábban megtettek, inkább néhány apróbb megjegyzést, illetve kérdést szeretnék feltenni a jelöltnek. Az apróbb megjegyzést az értekezés olvasásának sorrendjében szeretném megtenni, amelyet néhány általánosabb kérdés követ.

1. Szokodi doktor munkásságának talán az egyik legrégebb óta és legalaposabban vizsgált anyaga az adrenomedullin, amellyel kapcsolatos vizsgálatok ismertetésére az értekezésben is 20 oldalt szentel. Az 5. ábra az AM és az ET-1 hasonló koncentrációtartományban mutatott pozitív inotróp hatásait hasonlítja össze. Feltehetően elírás, hogy az ábrán a 0.03 nmol/L helyett. 0.3 nmol/L. szerepel. Amennyiben az AM és az ET-1 pozitív inotróp hatásának kialakulását az izoproterenoléval (IZO) hasonlítjuk össze, látható, hogy az IZO gyorsan kialakuló és gyorsan le is csengő hatásával szemben az AM és az ET-1 kontrakciós erőt fokozó hatása ugyan valamivel gyengébb, de sokkal tartósabb. Mit gondol a jelölt, mi ennek a dinamikában megnyilvánuló különbségnek a magyarázata és esetleges jelentősége?

2. Igen érdekesek az AM overexpresszió hatásának vizsgálatát célzó kísérletek, melyeknek az eredményeit a 7. és 8. ábrák szemléltetik. A 8. ábrán feltüntetett funkcionális adatok arra utalnak, hogy az intramiokardiális géntranszfert követő első napon, már szignifikánsan fokozódott a kontraktilis erő (frakcionális rövidülés) és az ejekciós frakció (EF), míg az AM mRNS expresszióról csak a 3. napról vannak adatok (7. ábra). Feltehető, hogy a mRNS expresszió már az első napon is szignifikáns volt? Mi volt az oka, hogy ezt ekkor nem mérték? Biológiai mennyire jelentős az EF 8%-os változása? Nincs ez a mérés technikai hibahatáron belül? Az AM overexpressziója miképpen befolyásolta a szívfrekvenciát?

3. Irodalmi adatok szerint a proadrenomedullin (proAM) hasításával keletkező proAM-N-terminális 20 peptid (PAMP) specifikus kötőhelyekkel rendelkezik legalábbis patkányszívben. Ugyanakkor a szerző kísérleteiben a PAMP számottevően nem befolyásolta a kontraktilitást. Ezzel szemben, legalábbis az opponens számára úgy tűnik, hogy az AM, amely jelentős pozitív inotróp hatásokkal rendelkezik, nem teljesen ismert, hogy milyen receptoron hat. A 49. oldalon a szerző azt írja, hogy „*Eredményeink szerint az AM specifikus receptorán keresztül hat, függetlenül a CGRP- és a PAMP-kötőhelyektől*”. Ennek igazolása azonban feltehetően egy szeletív AM receptor antagonistá hiányában csak részlegesen valósulhatott meg. Jól gondolom, legalábbis a 20. ábra alapján, hogy az AM egy 'kalcitoninreceptor-szerű receptorhoz CRLR' kapcsolódik, mely kapcsolódást a RAMP2/3 (receptor aktivitást módosító fehérje) befolyásolja?

4. Ennél izgalmasabb a pozitív inotróp hatás kialakulásáért felelős jelátviteli útvonal(ak) felderítésére végzett vizsgálatok, amelyek alapján feltételezhető a PKC (PKC ϵ és PKC δ membránba történő transzlokáció) aktiváció közvetítette kalcium beáramlás serkentése, illetve a kalcium szarkoplazmás retikulumba történő fokozott felvétele és abból történő leadása következtében kialakuló jobb kalcium hozzáférhetőség. Kérdésem, hogy az a tény, hogy az AM, ellentétben az IZO-val nem a PKA, hanem a PKC útvonal aktiválásával szabályozza az intracelluláris kalcium háztartást, szerepet játszhat-e a dinamikában kimutatható különbségekben?

5. Szokodi doktor munkásságának ugyancsak tekintélyes részét képezi az apelin szerepének vizsgálata a szívizom kontraktilitásának szabályozásában. Hasonlóan az AM-hoz és az ET-1-hez, az apelin is az IZO-hoz képest kisebb, lassabban kialakuló, de hosszabb ideig fennálló pozitív inotróp hatást képes kifejteni mind egészséges, mind elégtelen szívizomban. Úgy tűnik, hogy az apelin jelentős mértékben hozzájárul a normális kontraktilitás fenntartásához, ugyanis a mechanikai túlterhelés hatására mind az apelin mind az APJ receptorok expressziója csökken, és ez összefüggésbe hozható a kamrafunkció romlásával. Kérdésem, a szerzők által felderített az apelin pozitív inotróp hatását közvetített mechanizmusok ugyanazok-e ép és elégtelen szívben? Arra gondolok, hogy hipoxiás szívizomban az ionpumpa (ioncsere) mechanizmusok az apelin aktiválta PLC-PKC kaskádától függetlenül is megváltoznak, ugyanakkor az apelin mégis kedvezően javította az elégtelen szív kontraktilitását.

6. A másik két vizsgált kardiokin, a PrRP és ET-1, vizsgálatával kapcsolatos eredményekhez kevesebb kérdésem lenne, ugyanis ezek egy részével Kónyi doktor Ph.D. értekezésének bírálata kapcsán már találkoztam, és kíváncsiságomra akkor a megfelelő válaszokat megkaptam. Ugyanakkor továbbra sem teljesen világos, hogy a PrRP milyen közvetlen hatást gyakorol a szívizomra és váltja ki a pozitív inotróp hatást, hiszen a vizsgálatokból csak az derült ki, hogy mind a protein foszfatáz-1 (PP1), mind a PKC α gátlása fokozta a PrRP inotróp hatását, illetve a PKC α a PP1 közvetítésével szabályozza a foszfolamban foszforilációját, ezáltal biztosítva a jobb kalcium felvételt a SR-ba, majd onnan a fokozottabb kalcium felszabadulást.

7. Szokodi doktor ET-1 pozitív inotróp hatására és mechanizmusára vonatkozó vizsgálatai ugyancsak több mint egy évtizedre tekintenek vissza. Ennek során számos modellben és módszerrel kutatták azokat a mechanizmusokat, amelyek nem csak ET-1 hatására, hanem a kontrakció/relaxáció folyamatára fiziológias és kóros körülmények között további alapvető információval szolgáltak. Ezt igazolja a 47. ábra, amely egyértelműen rávilágít az ERK1/2 és a p38-MAPK útvonalak ellentétes szerepére a kontraktilitás akut szabályozásában. Ehhez a fejezethez egy megjegyzésem és egy kérdésem lenne. A 47. oldalon említi a PKC-t közvetlenül aktiválni képes PMA-t. Feltehetően ez a rövidítés a phorbol 12-myristate 13-acetate-t jelenti (nincs a rövidítések jegyzékében). A kérdésem pedig a következő lenne: miután az ET-1 az ERK1/2 aktiválásán keresztül fokozza, a p38-MAPK aktiválásával pedig csökkenti (ellensúlyozza) a kontraktilitást, hogyan képzei el a szerző ezen útvonalak szelektív aktiválását akár pozitív, akár negatív inotróp hatás elérése érdekében, mely utóbbi esetleg ellensúlyozhatja a túlzott inotróp ingerek, például a catecholaminok, hatását? Továbbá, az ET-1 az ET_A receptoron hatva nem csak inotróp hatást vált ki, de erőteljes vazokonstriktációt is. Mit gondol a szerző, hogy hipertófiás szívben, ahol az ET-1/ET_A-receptor aktiváció feltevésük szerint hozzájárul a kamrafunkció fenntartásához, miképpen értékelhető ugyanezen receptor által közvetített vazokonstriktáció?

8. Feltehetően elírás, hogy az 51.B ábrán 5HD helyett Apo szerepel.

9. Végül kíváncsi lennék arra, hogy Szokodi doktor több éves (évtizedes) kutatómunkája során szerzett tapasztalata alapján, melyik kardiokint tekinti a közeljövőben leginkább alkalmazhatónak a szívelégtelenség kezelésében? Természetesen a vizsgált kardiokinek között érzékelhető különbségek vannak, mind a fiziológias, mint a patológias körülmények között betöltött szerepükben. Ennek ellenére érdekelne, hogy a jelölt miképpen ítéli meg szerepüket, hatékonyságukat a szívelégtelenség, illetve a szívelégtelenség különböző formáinak kezelésében.

Mindezen inkább kíváncsiszkodó, semmint érdemi kérdések után az értekezés új eredményeinek a következőket tekintem:

1. Az AM hatásait vizsgálva kimutatták, hogy szubnanomoláris koncentrációban az AM jelentős pozitív inotróp hatást fejt ki, amely eltérően a klasszikus β -adrenoceptor agonistáktól nem a cAMP-PKA útvonal aktiválásán keresztül valósul meg. Számos modellt és kísérleti módszert alkalmazva megállapították, hogy az AM inotróp hatásában a PKC ϵ és PKC δ aktivációja, az L-típusú kalcium csatornákon keresztüli kalcium beáramlás valamint a SR-ből történő kalcium felszabadulás serkentése a meghatározó mechanizmus.
2. Vizsgálataikban elsőként igazolták az APJ receptorok jelenlétét a szívben és az apelin ezen receptorok aktiválásával előidézett pumpafunkciót fokozó hatását mind ép, mind kóros szívizomban. Széleskörű, a mechanizmus felderítésére irányuló vizsgálatokkal több útvonal szerepét kizárták, ugyanakkor igazolták, hogy az apelin hatásához jelentős mértékben hozzájárul a PLC-PKC kaszkád aktivációja, illetve az NHE és NCX fordított irányú fokozott működése. Érdekes megfigyelés, hogy az apelin hathat a sejtek közötti kommunikációra és elégtelen szívben csökken az apelin génexpressziója.
3. Elsőként vizsgálták és mutatták ki a PrRP szerepét a kardiovaszkuláris rendszer perifériás regulációjában és a PrRP közvetlen a szívre gyakorolt inotróp hatását, melyet a PKC α és a PP1 aktivációja, feltehetően a PLN defoszforilációja révén ellensúlyozni képes.

4. Számos vizsgálat alapján kimutatták, hogy az ET_A és ET_B receptorok izgatása ellentétes hatást gyakorol a szívizom kontraktilitására. Az ET-1 ET_A receptor aktiváción keresztül megnyilvánuló pozitív inotróp hatásának szisztematikus felderítése során számos új eredményre jutottak. Többek között kimutatták, hogy az ET₁ kontrakciós erőt fokozó hatásában az EGFR-MEK1/2-ERK1/2-p90RSK-NHE1 szignalizációs útvonal játszik elsődleges szerepet, míg p38-MAPK útvonal párhuzamos aktivációja a PLN defoszforilációja révén ezt a hatást ellensúlyozni képes. Igazolták, hogy az endogén módon képződő NO korlátozza, míg a NADPH-oxidáz eredetű ROS hozzájárul az ET-1 pozitív inotróp hatásához. Kimutatták, hogy hipertrófiás szívekben a lokális ET-1/ET_A receptor rendszer aktivációja a Frank-Starling-mechanizmus befolyásolásával jelentős mértékben hozzájárul a kamrafunkció fenntartásához.

Zárszóként szeretném megjegyezni, hogy köszönöm, hogy Dr. Szokodi István MTA doktori értekezésének egyik bírálója lehettem és ennek során összefüggéseiben tekinthettem át azt a széleskörű kutatómunkát, amelynek részleteit a különböző hazai és nemzetközi kongresszusok révén már ismertem. Meggyőződésem, hogy Szokodi István tudományos eredményei jelentős mértékben bővítik a szív pumpafunkcióját szabályozó folyamatokról való ismereteinket és olyan új mechanizmusokat tárt fel, amelyek alapul szolgálhatnak a klinikai gyakorlatban is hatékonyan alkalmazható új terápiás eljárások kidolgozásához.

Mivel az értekezéshez fűzött kérdéseim és kritikai megjegyzéseim a pályamunka értékét érdemben nem érintik, javaslom a Tisztelt Doktori Tanácsnak a nyilvános vita kitűzését és a doktori mű elfogadását.

Szeged, 2014. február 24.

Dr. Végh Ágnes
egyetemi tanár