

Opponensi vélemény

Tóth András

„Intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis-változások hatásainak elemzése izolált szívpreparátumokon”

című MTA doktori értekezéséről

Általános értékelés:

Tóth András benyújtott értekezésének központi témája a szívizomsejtek intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázisának szabályozása fiziológiás és kóros viszonyok között. Jól ismert, hogy a szív Ca^{2+} -háztartásának akut illetve krónikus zavarai romló pumpafunkcióban, fokozódó ritmuszavarok iránti hajlamban nyilvánulhatnak meg, kritikus szintet meghaladva, végső soron sejtelhaláshoz vezethetnek. A modern kísérletes kardiológia megoldásra váró alap problémája ezen folyamatok kellő hatékonyságú, kedvező befolyásolása. Mindezen tényezők fényében, Tóth András témaválasztása, a Ca^{2+} -függő K^{+} -csatornák illetve a $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus szerepének vizsgálata a szívizomsejtek alapvető elektrofiziológiai folyamataiban, a kontraktilitás illetve a sejtülélés szabályozásában, fontos és időszerű.

Formai szempontok:

Az értekezés 160 oldalnyi, magyar nyelven írott szövegből áll, az érdemi rész 128 oldalt tesz ki, mely megértését 57 ábra és 2 táblázat segíti elő. Az értekezés logikusan szerkesztett, belső arányai megfelelőek, fejezetei kellő gondossággal íródtak, kivitelezése szemre tetszetős. A mű egyedi, élvezetes stílusa hűen tükrözi a Szerző érett kutatói gondolkodásmódját.

Tartalmi szempontok:

A bemutatott eredmények a Jelölt saját tudományos megfigyelésein nyugszanak, a Szerző meghatározó szerepét hangsúlyozza, hogy közleményei közül kizárólag első illetve utolsó szerzős publikációkat használt fel az értekezés elkészítéséhez. Az alkalmazott módszertan megfelelően megválasztott, releváns *in vitro* illetve *ex vivo* modelleken vizsgáldott a modern kísérletes elektrofiziológia/kardiológia elfogadott eljárásait felhasználva. Az értekezés egy gondosan megtervezett, koherens kutatási program megvalósítását mutatja be.

Szcientometriai szempontok:

A benyújtott értekezéshez 9 nemzetközi közlemény kapcsolódik közvetlenül a 2007 és 2015 közötti időszakból. Az eredeti közlemények közül a Jelölt 1 esetben első szerző, 6 esetben utolsó szerző, az összefoglaló közlemények esetében 1-1 cikket jegyez első illetve utolsó szerzőként. Az értekezésben felhasznált közlemények rangos nemzetközi folyóiratokban jelentek meg, mint a Cardiovascular Research, a Journal of Molecular and Cellular Cardiology, valamint a British Journal of Pharmacology, melyek a tudományterület folyóiratainak legfelső 10%-ába tartoznak. A publikációk összesített impakt faktora 36.5, a független hivatkozások száma megközelíti a 100-at, a legmagasabb idézettségű közleményére 47 hivatkozás érkezett. Az értekezés benyújtásáig a

Jelölt összeségében 37 publikációt jegyzett nemzetközi folyóiratokban, melyek összesített impakt faktora 108.6, a független hivatkozások száma 473 volt. Megállapítható, hogy a Jelölt egyértelműen megfelel az MTA Doktori Szabályzatában megfogalmazott, valamint az Orvosi Tudományok Osztálya által támasztott követelményeknek.

Az MTA doktori értekezés részletes bírálata:

Bevezetés és célkitűzések:

A Jelölt világosan, információ-gazdag módon, ugyanakkor kellő önmérsékletet gyakorolva foglalja össze a Ca^{2+} -homeosztázis szabályozásának komplex összefüggéseit fiziológias illetve kóros körülmények között. Kiemelt figyelmet szentel a Ca^{2+} -függő K^{+} -csatornák illetve a $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus potenciális szerepére a szív ritmuszavarainak kialakulása során, valamint az utóbbi jelentőségére a kontraktilitás illetve a sejt túlélés regulációjában. E témák ismertetése során fogalmazza meg a Jelölt a megválaszolásra váró fő tudományos kérdéseit illetve nevezi meg az értekezés mértéktartó, világos célkitűzéseit.

Módszerek és anyagok:

A választott modern módszertan széles metodikai bázison nyugszik, melyeket a Jelölt magas színvonalon alkalmaz. Az *in vitro* illetve *ex vivo* kísérleti modelleken végzett vizsgálatok magukban foglalják az ionáram méréseket patch-clamp technikával, intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció meghatározást, akciós potenciál mérést, EKG vizsgálatot, kontrakciós erő mérést, hemodinamikai monitorozást, Western-blot analízist, és immunhisztokémiai vizsgálatokat.

Eredmények és megbeszélés:

Az eredmények bemutatása logikus felépítésű, a szöveges részhez kapcsolódó ábrák világosan szerkesztettek, fontos segítséget nyújtanak a szöveg megértésében. A „Megbeszélés” fejezetben a Jelölt a kapott eredményeket magas színvonalon taglalja, kritikusan, számos szempontot figyelembe véve mutatja be azokat. Az értekezés izgalmas és értékes aspektusát jelenti annak taglalása, hogy a korábban született eredmények miként állták ki az idő próbáját, a legújabb ismereteink fényében milyen új értelmezést nyerhettek.

Új tudományos eredmények összegzése:

A Jelölt 13 alpontba szedve, mértéktartó módon foglalja össze az értekezés legfontosabb észleléseit.

A Jelölt önálló, új tudományos eredményeként a következőket fogadom el:

1. Számos alap megfigyelést tett a Ca^{2+} -függő K^{+} -áramok vizsgálata során. (i) Kimutatta az SK2 alacsony konduktanciájú K^{+} csatorna expresszióját kutya és patkány szívizomban, azonban vizsgálatait szerint, fiziológias viszonyok között, ezen csatorna nem befolyásolja érdemben a szívizomsejtek repolarizációját. (ii) Demonstrálta, hogy kutya kamrai szívizomsejtekben a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedés kalmodulinkináz II (CaMKII) révén növeli a befelé egyenirányító K^{+} -áramot (I_{K1}), magas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett nő az I_{K1} relatív hozzájárulása a kamrai

repolarizációs rezervhez. Hasonló módon, az I_{K1} humán szívizomban is $[Ca^{2+}]_i$ -függést mutat, azonban befolyása szerényebb.

2. Meggyőzően igazolta, (i) hogy kutya kamrai szívizomsejteken - patkány szívizomsejtektől eltérően - a Na^+/Ca^{2+} -cseremechanizmus (NCX) gátlása nem fokozta az intracelluláris Ca^{2+} tranzienseket illetve a kontrakciós erőt. (ii) A szelektív NCX gátlás hatékonyan kivédte az intracelluláris Na^+ emelkedés által indukált fokozott reverz NCX áramot ($revI_{NCX}$), a következményes Ca^{2+} túltelítődést, és a Ca^{2+} -sparkok számát, ugyanakkor nem csökkentette az aritmogén akciós potenciál időtartam megnyúlást és diszperzió fokozódást. (iii) Ezzel összhangban, regionális iszkémia-reperfúzió modellben a szelektív NCX gátlás enyhítette a triggerelt ritmuszavarok számát, míg a reentry-típusú ritmuszavarok előfordulását nem befolyásolta. (iv) Továbbá, a Na^+/H^+ -cseremechanizmus (NHE) és a NCX szimultán gátlása kevésbé volt hatékony a ritmuszavarok kivédésében, mint a gátlószerek önmagukban alkalmazva.

A következő kérdéseket kívánom intézni a Jelölthöz:

1. Kutya eredetű mintákon végzett kísérletekhez a szívizomsejteket bal kamrai szövetből izolálták, míg a multicelluláris preparátumok a jobb kamrából származtak. Elektrofiziológiai szempontból milyen fokú az eltérés a két kamra szívizomsejtjei között?
2. Általánosan elfogadott, hogy a kutya szívizom jelentősen jobb modellje a humán szívizomnak elektrofiziológiai tekintetben, mint a rágcsálók (egér, patkány) szívei. Ugyanakkor, a bemutatott kísérletek rámutatnak, hogy lényeges különbségek állnak fenn e két faj tulajdonságai között is (pl. az I_{K1} -blokádnak Ca^{2+} -függése). Milyen modellek bevezetésétől várható áttörés ezen a területen?
3. A Jelölt kimutatta, hogy a CaMKII farmakológiai gátlása kivédte a Ca^{2+} -indukált I_{K1} emelkedést. Megjegyezte: "(...) igazoltuk, hogy a CaMKII aktivitása a CaT időtartama alatt nem állandó." (68. oldal), azonban az állítást alátámasztó eredményt nem közölt az értekezésben. Véleménye szerint, milyen időskálán aktiválódhat illetve deaktiválódhat a CaMKII? Milyen feltételek mellett valósul meg ez a folyamat az adott mikrodoménben? Szerepet játszhat a CaMKII aktivációja a "beat-to-beat" szintű szabályozási folyamatokban? Az *in vitro* nyert eredmények mennyiben extrapolálhatóak az *in vivo* érvényesülő viszonyokra?
4. Az I_{K1} mellett, a repolarizációs tartalékhoz hozzájáruló további ionáramok szabályozásában milyen szerepet tölt be a CaMKII? Fiziológiás viszonyokon túl, patofiziológiás körülmények között (pl. krónikus szívelégtelenségben), a CaMKII tartós aktivációja miként befolyásolja ezen ionáramokat?
5. Krónikus szívelégtelenségben a CaMKII túlműködése fokozott proaritmiás hajlammal jár, melyhez számos CaMKII célmolekula (K^+ -csatornák, rianodin receptorok, L-típusú Ca^{2+} -csatornák, foszfolambán, etc) megváltozott működése illetve expressziója hozzájárulhat. Mennyiben tartja perspektivikusnak a CaMKII gátlást a ritmuszavarok kivédése céljából? Mi lehet az előnyösebb stratégia, a CaMKII globális illetve az egyes célpontjainak szelektív modulációja?
6. A Na^+/K^+ -ATPáz-gátló digitalisz vegyületek pozitív inotrop hatásának klinikai kiaknázását nagyban korlátozza e szerek aritmias mellékhatása. A Jelölt demonstrálta, hogy a szelektív NCX-gátló ORM-10103 csökkentette a Na^+/K^+ -ATPáz gátlás indukálta aritmogén Ca^{2+} -sparkok számát. Ez a megfigyelés mennyiben köthető a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+}

túltelítődésének kivédéséhez, illetve a rianodin receptorokon keresztül esetlegesen kialakuló diasztolés Ca^{2+} szivárgás enyhítéséhez? A NCX gátlás hatására miként változik a Na^+/K^+ -ATPáz gátlás indukálta pozitív inotrop hatás? Elképzelhető a Na^+/K^+ -ATPáz-gátlók aritmogén hatásának kivédése a pozitív inotrop effektusuk megőrzése mellett?

7. A klinikai gyakorlatban jelenleg használatos antiaritmiás szerekhez viszonyítva lehet-e létjogosultsága a NHE- illetve a NCX-gátlók alkalmazásának? Milyen kórállapotokban jelenthetnek előrelépést?
8. A Jelölt véleménye szerint, szívelégtelenségben a megbomlott Ca^{2+} -homeosztázis helyreállítása céljából mely kitüntetett pontokon lehetséges és érdemes beavatkozni? Mit vél a legígéretesebb terápiás lehetőségnek?

Megállapítom, hogy Tóth András jelentős tudományos teljesítményt ért el munkássága során, eredményei hozzájárultak e tudományterület továbbfejlődéséhez. A benyújtott MTA doktori értekezés formai szempontból gondosan elkészített, tartalmilag jelentős, önálló tudományos megfigyeléseken alapul. Mindezek fényében egyértelműen javaslom az értekezés nyilvános vitára történő bocsátását és az MTA doktora cím odaítélését.

Pécs, 2016. szeptember 7.



Dr. Szokodi István
az MTA doktora