

## Opponensi vélemény Dr.Gáspár Róbert „Régi és új támadáspontok a korai fájástevékenység gátlására” című

### MTA doktori értekezéséről

Dr.Gáspár Róbert MTA doktori cím iránti kérelmének benyújtását követően az illetékes bizottság részletes habitusvizsgálat során az MTA doktori követelményeknek való megfelelést vizsgálta és a jelöltet mind tudománymetriai, mind tudományos közéleti, mind iskolateremtő tevékenysége alapján alkalmasnak találta az eljárás lefolytatására.

Jelen bírálat az MTA szabályzata alapján kizárólag az értekezéssel és a tézisekkel foglalkozik.

#### I. Általános szempontok

A jelölt értekezésében a méhizom aktivitás szabályozó mechanizmusainak preklinikai kutatásával foglalkozik. A farmakológiai vizsgálatok célja a fájástevékenységet befolyásoló különböző jelátviteli folyamatok összefüggéseinek és gyógyszeres befolyásolási lehetőségeinek feltárása volt, különös tekintettel a különböző támadáspontok egyidejű befolyásolásának lehetőségeire. Az újszerű megközelítés az amúgy is bonyolult rendszert még bonyolultabbá teszi, de létjogosultságát az igazolja, hogy a koraszülés vezető okát képező korai méhtevékenység gátlása mindmáig megoldatlan egészségügyi probléma és orvosi szükséglet. A koraszülöttség ellátásának anyagi terhe az egészségügyi kiadások egyik legnagyobb elemét képezi. Téziseinek bizonyítására a jelölt az elmúlt 20 évben publikált kísérleti eredményeit logikus rendszerbe szerkesztve mutatja be. Az értekezés alapjául szolgáló 30 közleményből 16 D1 vagy Q1 minősítésű folyóiratban jelent meg, A 30 közlemény közül 22-ben a jelölt első vagy utolsó szerzőként szerepel. A dolgozat szerkezete a szokásos tagolást követi.

#### II. Formai szempontok

Dr.Gáspár Róbert MTA doktori értekezésének terjedelme 189 oldal. Az érdemi rész 161 oldal, melyet 4 oldalon követ az értekezést megalapozó közlemények listája és a scientometriai táblázat. A 22 oldal terjedelmű irodalomjegyzék 284 közlemény bibliográfiai adatait tartalmazza, további két oldalon pedig a jelölt köszönetnyilvánításban sorolja fel azon munkatársait, akik az értekezésben összefoglalt kutatásokban részt vettek, illetve azokhoz érdemi segítséget nyújtottak.

Bírálati szempontból kiemelendő, hogy az értekezés **Eredmények** fejezete 92 oldal terjedelmű. Bár ez nem tűnik soknak, azonban a többszáz kísérlet eredményeinek 93 ábrába tömörített grafikus szemléltetése virtuálisan ezernyi oldal szöveget helyettesít. A szülész-nőgyógyász klinikus bíráló számára ez jelentős segítséget jelent, de nem váltja ki és nem helyettesíti az ábrák értelmezéséhez szükséges időt és energiát. Az ábrák csak úgy, mint az értekezés egésze esztétikus, az ábrán belüli jelölések és a betűméretek megfelelőek, a disszertáció szövegében betűelütés elvétve fordul elő, s azok többnyire idegen szavak inkonzisztens betűzését jelentik (pl. tocoferol és



tokoferol változó írásmódja). A jelölt hatékonyan használja ki az árnyalati, textúra és színekódolás lehetőségeit.

Az értekezés szövege klinikus bíráló számára is olvasmányos, gondolatmenete jól követhető, nyelvhelyessége kifogástalan.

### III. Részletes bírálat

#### Témaválasztás, célkitűzés

A koraszülés súlyos következményei jól ismertek. Az ismert kiváltó tényezők többsége a korai méhtevékenység aktiválása révén fejt ki hatását, ugyanakkor ennek a közös nevezőnek a gátlására nincs kellően hatásos eszközünk. A méhizom aktivitást befolyásoló jelátviteli rendszerek szabályozzák a kontraktilitást. Az izomsejtek környezetéből érkező hatásokat a sejtfelszíni  $\beta$ -AR,  $Ca^{++}$ -csatornák, oxytocin-receptorok, cyclooxygenáz és guanilcikláz enzimek az intracelluláris cAMP-, cGMP- és  $Ca^{++}$ -szintek modulálása révén közvetítik az intracelluláris központi effektor szerepet játszó miozin könnyűlánc-kinázra.

A jelölt témaválasztásában felveti az akut monoterápiaként már humán vizsgálatokban is tesztelt lehetőségeket ( $\beta_2$ -AR-agonisták, Mg-szulfát, COX-gátlók,  $Ca^{++}$ -csatorna blokkolók, NO-donorok, oxytocin antagonisták) valamint a preventív terápiában ígéretesnek vélt progeszteron, antibiotikumok, probiotikumok és antioxidánsok alkalmazásának lehetőségét.

Taxatív felsorolt célkitűzéseiben a kutatásait az akut kezelés kombinációs farmakológiai befolyásolására szűkíti a jelölt. A négy pontban megfogalmazott célok között kombinációs kezelések lehetőségét helyezi vizsgálatainak fókuszába.

1. A  $\beta_2$ -AR,  $\alpha_1$ -AR és  $\alpha_2$ -AR-on keresztül történő farmakológiai hatások vizsgálata a vemhes patkány méh és a cervix izomzatának működésében.
2. Az  $\alpha$ - és  $\beta_2$ -AR-on ható farmakonok uterus kontrakciót gátló hatásának fokozása más szerekekkel vemhes patkány és császármetszésből származó humán uterus szöveten.
3. Peptid természetű endogén anyagok szerepének és hatásának vizsgálata a vemhes uterus kontrakciókra és a cervix-rezisztenciára patkányban.
4. Antioxidáns hatás vizsgálata a  $\beta_2$ -AR agonisták és COX-gátlók uterus kontrakciókra és a cervix-rezisztenciára gyakorolt effektusaira vemhes patkányban.

A jelölt célkitűzéseiben összességében megállapítható az az újszerű törekvés, hogy a korai méhtevékenység soktényezős kórfolyamatának gátlásában több tényező egyidejű farmakológiai befolyásolásával tisztázza a szinergikus hatás lehetőségét.

#### Az egyes fejezetek értékelése

A **Módszerek** fejezetében a jelölt didaktikusan rendszerezett alfejezetekben mutatja be az in vivo és in vitro kísérletekben alkalmazott kísérleti állatok, valamint szövetminták forrását és előkészítését. Külön alfejezetek részletezik a biokémiai, molekuláris biológiai, radioimmun, fluoreszcens immunhisztokémiai, ELISA, és kolorimetriás vizsgálatok módszertanát, az in vivo kísérletekben alkalmazott



koraszülés modellek és obesitas modell létrehozásának protokolljait, valamint az in vivo kontraktilitási vizsgálatok mechanikai és elektromos követésében alkalmazott módszereket. A metodikai fejezetet egy rövid statisztikai alfejezet zárja.

Az **Eredmények első alfejezete** a patkány uteruson vizsgált  $\alpha_1$ -AR és  $\alpha_2$ -AR hatások kísérleteit részletezi. A jelölt kimutatta, hogy  $\alpha_1$ -AR A, B és D izoformái közül az A és D expresszálódnak, az A altípus expressziója növekszik a vemhesség előrehaladtával, a D expressziója a vemhesség utolsó napján csökken. Az altípusokra szelektív gátlószerekkel végzett kísérletekben az EC50 értékek változásai ezekkel egybevágóan tükrözték a receptor altípusok gátlással szembeni érzékenységének változását a vemhesség során. A **második alfejezet** a patkány cervixen vizsgált  $\beta_2$ -AR,  $\alpha_1$ -AR és  $\alpha_2$ -AR hatások kísérleteit mutatja be. A jelölt rPCR mRNS és WB sorozat vizsgálatokkal igazolta, hogy a cervix szövetben a  $\beta_2$ -AR expresszió a vemhesség 18. napján markánsan megemelkedik és a vemhesség további napjain nem változik. Kimutatta, hogy a  $\beta_2$ -AR-on ható terbutalin a G-protein aktivációja útján vezet a cAMP-szint növekedéséhez, s ezen keresztül a kontraktilitás csökkenéséhez. Míg nem terhes állapotban a terbutalin nem okozott G-protein aktivációt, addig késői vemhességben a vemhesség előrehaladtával csökkenő G-protein aktiváció volt detektálható, ami a cAMP-szint csökkenése révén a cervicalis simaizom tónusának fokozódását eredményezi. Az  $\alpha_1$ -AR A, B és D altípusainak cervix szövetben mért expressziója a vemhesség folyamán a  $\beta_2$ -AR expresszióhoz hasonlóan alakult. Altípus-szelektív farmakonokkal végzett kísérletekben a jelölt kimutatta, hogy a G protein aktiváció csak az A altípuson keresztül befolyásolható, a B és D altípusokon keresztül egyáltalán nem. A cervix szövet  $\alpha_2$ -AR expressziója rPCR és WB technikával egybehangozóan növekedett a vemhesség 21. napjáig, majd ezt követően csökkent. Az altípusok közül az  $\alpha_{2B}$ -AR esetében volt legkifejezettebb a vemhesség végére bekövetkező expresszió-csökkenés. Az altípus-specifikus antagonistákkal végzett kísérletek eredménye szerint a cervixrezisztencia vemhesség során észlelhető növekedése az  $\alpha_2$ -AR-ok A altípusain közvetítve valósul meg, a B és C altípusokon keresztül a folyamat nem befolyásolható. A jelölt igazolta, hogy az  $\alpha_{2A}$ -AR aktivitás G-protein-kapcsolt működés révén változtatja a cAMP-szintet, s azon keresztül a cervikális simaizom kontraktilitását. A **harmadik alfejezetben** részletezett kísérletek a  $\beta_2$ -AR agonistával kombinációban alkalmazott P4,  $Ca^{++}$ -csatorna blokkoló, PDE-gátló, AKAP-PKA gátló,  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistákkal vagy  $\alpha_2$ -AR antagonistákkal kezelések méhizomra és cervixre kifejtett hatását értékeli.

A jelölt kísérleteivel igazolta, hogy a vemhesség végén bekövetkező élettani P4-szint csökkenés révén csökkenő  $\beta_2$ -AR agonista hatás P4 adagolással helyreállítható és a vemhesség utolsó napján a  $\beta_2$ -AR agonista terbutalin uterusban mért aktivált G-protein csökkentő hatása megfordul és G-protein aktiváció mutatható ki.

A jelölt bizonyította, hogy a  $\beta_2$ -AR agonista uterus relaxáló hatását a  $Ca^{++}$ -csatorna blokkoló nifedipin jelentősen fokozza terminusközelben mind vemhes patkány méhizomszövetében, mind császármetszésből származó uterusmintákban. Hormonális koraszülésmodellben a nifedipin kismértékben, a nifedipin-salmeterol kombináció jelentős mértékben késleltette az ellés idejét.

A PDE4-gátló roliprammal végzett kombinációs kísérleteiben a jelölt kimutatta, hogy LPS-indukált koraszülés modellben a rolipram fokozza a kisdózisban alkalmazott terbutalin uterusrelaxáló hatását.



A jelölt nemzetközi kooperációban vizsgálta a kombinációban alkalmazott AKAP-PKA-gátló cAMP-szint növelő, s ezáltal uterusrelaxációban betöltött szerepét. Várakozásának megfelelően AKAP-PKA-gátló jelenlétében a terbutalin maximális kontraktilitást gátló hatása fokozódott.

Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistákkal kombinált  $\beta_2$ -AR agonista kezelés hatásait E2 és P4 előkezelést követően vizsgálta a jelölt és megállapította, hogy a kombinációval elért hatásfokozódás a G-protein által közvetített jelátvitellel valósul meg. A folyamatot a P4 előkezelés elősegítette, azonban az E2 előkezelés nem befolyásolta.

Az  $\alpha_2$ -AR antagonistákkal kombinált  $\beta_2$ -AR agonista kezelés hatásait szintén E2 és P4 előkezelést követően vizsgálta a jelölt és megállapította, hogy míg az E2 előkezelés az  $\alpha_2$ -AR mindhárom (A,B,C) altípus expresszióját csökkenti, addig a P4 előkezelés mindhárom altípus kifejeződését fokozza. Altípusspecifikus antagonisták alkalmazásával igazolta, hogy a kombináció az  $\alpha_{2A}$  és  $\alpha_{2B}$  receptorokon keresztül 40%-kal fokozza a  $\beta_2$ -AR agonista NA által kiváltott kontraktilitás csökkentését, amit az E2 előkezelés felére csökkent, a P4 előkezelés pedig 90%-kal csökkent.

A **negyedik alfejezet** endogén peptidok uterus kontrakcióra kifejtett hatásával foglalkozik. A jelölt elsőként mutatta ki, hogy a neuropeptid nociceptin és nocistatin prekursora, a prepronociceptin expressziója a patkány vemhesség utolsó napján 8-szorosára, humán koraszülés idején pedig 35-szörösére emelkedik. Izolált szervi kontrakciós kísérletben a jelölt igazolta, hogy a nociceptin koncentrációfüggően gátolta az oxytocin által kiváltott kontrakciókat, s e hatást az ópiát antagonistá NX kismértékben fokozza. G-protein-gátlóval kontrollált kísérletben igazolta a jelölt, hogy ez a hatás G-protein aktiváció útján vezet cAMP-szint emelkedéshez és következményes uterusrelaxációhoz. A nociceptin és nocistatin együtt hatását vizsgálva a szerző kimutatta, hogy a két peptid nem antagonistá, hanem szinergista interakciót ad vemhes patkány uterusban, s ezt a cAMP-szintet növelő hatást NX jelenléte megszünteti.

A számos regulátor fehérjével interakcióban álló kisspeptin uterusrelaxáló hatásának vizsgálata során a jelölt bizonyította, hogy ez a hatás a kisspeptin receptorokon keresztül valósul meg. Az expresszió a vemhesség folyamán fokozatosan csökken és legintenzívebben a hosszanti myometriális izomrostokban mutatható ki.

A leptinreceptorok eloszlásának morfológiai vizsgálata során a szerző kimutatta, hogy ezek az uterus cirkuláris és longitudinális izomrétegeiben vannak jelen és a vemhesség kezdeti és végső szakaszában legerősebb a kifejeződésük. Ezzel szemben az adiponectin-receptorok expressziója a vemhesség előrehaladtával fokozatosan csökkent.

Obesitas-modellben a szerző kimutatta, hogy a vemhes uterusban a kóros metabolikus állapot fokozza a kisspeptin- és a leptin-receptorok expresszióját, ugyanakkor nem változtatja az adiponectin-receptorok kifejeződését, továbbá a spontán kontraktilitás jelentős csökkenése figyelhető meg.

Gyulladásos, azaz LPS-indukált koraszülés modellben a szerző igazolta, hogy az LPS adása előtt félórán alkalmazott thalidomid megakadályozza a TNF $\alpha$ -szint emelkedését, azonban a  $\beta_2$ -AR agonista terbutalinra adott fokozott relaxáció is megszűnt.

Az **ötödik alfejezetben** részletezett kísérletekben a szerző  $\beta_2$ -AR agonisták antioxidánssal vagy COX-gátlóval kombinációban történő alkalmazásának hatását vizsgálta a méhkontrakciókra és a cervix-rezisztenciára. Eredményeivel igazolta a



jelölt, hogy a terbutalin hatására bekövetkező uterus relaxációt és cAMP-szint emelkedést a tocoferol kezelés nem fokozza sem P4 előkezeléssel, sem anélkül. A cervix szöveteken hasonló megfigyelést tett azzal a különbséggel, hogy ott a P4 előkezelés utáni terbutalin kezelés cAMP-szintet fokozó hatását a tocoferol megszüntette. A COX-gátló kezelés mellett alkalmazott tocoferol szinergikus cervix-rezisztencia csökkentő és uterus relaxáló hatást mutatott, ami COX2-gátló esetén volt a legnagyobb mértékű. A rofecoxib kezelés önmagában nem volt képes változtatni az ellés kezdetének idejét, azonban tocoferol és rofecoxib együttes alkalmazása az ellés időpontját a kontrollokhoz képest korábbra hozta.

#### IV. Kritikai, kiegészítő megjegyzések

A célkitűzésben felsorolt tervek az eredmények fejezet felosztásában nem pontosan tükröződnek, továbbá az eredmények alfejezeteinek további tagolása is némileg eltér az alfejezetek bevezető szakaszaiban taxatív meghatározott céloktól. A jelölt nem ad magyarázatot arra, hogy az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistával vagy  $\alpha_{1D}$ -AR antagonistával, vagy  $\alpha_2$ -AR antagonistával kombinációban alkalmazott  $\beta_2$ -AR agonista kezeléseket miért E2 és P4 előkezelés után vizsgálta, más farmakonok esetében miért nem. Az izomélettani alap kutatás szakirodalmában kevésbé járatos klinikus bíráló számára jelentős nehézséget okozott annak megfejtése, hogy az  $\alpha_1$ -AR antagonistával végzett kombinációs kezeléseket során miért csak az  $\alpha_{1A}$ -AR és  $\alpha_{1D}$ -AR izoformák antagonistáit alkalmazta és a többi izoformákét miért nem. Véleményem szerint a magyarázatként szolgáló, más alfejezetben található saját kutatási eredmény rövid, egymondatos ismétlése nem jelentett volna redundanciát, illetve a szöveg terjedelmét sem növelte volna észrevehető mértékben. A bevezetésben felvetett antibiotikumok és probiotikumok szerepével az eredmények egyik alfejezete sem foglalkozik. A célkitűzések között szerepelő peptid természetű endogén anyagok hatásvizsgálata vemhes uterus kontrakciókra és cervix-rezisztenciára az eredményekben a nociceptin, nocistatin, kisspeptin, leptin és adiponectin vonatkozásában teljesül, azonban az 5.4.4 számú „obesitas és gyulladás hatása a méhkontrakciókra” című alfejezet vonatkozásában nem. Ez a bő egy oldalnyi alfejezet a bírálóban azt a benyomást kelti, mint ha a **Megbeszélés** fejezetből véletlenül került volna áttemelésre a 142-től 155-ig sorszámozott irodalmi hivatkozásokkal. Ez ellen szól az, hogy a 146-os, 155-es és 155-ös hivatkozás a szerző első- és utolsó-szerzős közleményeit jelentik. E cikkek valóban az adipokinek méhkontrakciókra kifejtett hatásával foglalkoznak, de az eredményeknek ez az alfejezete az összes többi alfejezettől eltérően nem tartalmazza konkrét kísérletek protokolljait és a kísérletek eredményeit grafikus szemléltető ábrákat sem. Ebből adódóan az **Eredmények** utolsó alfejezete kissé elhanyagoltnak tűnik, pedig a klinikus bíráló számára éppen a gyulladáscsökkentő citokin markerek izomkontraktilitást befolyásoló hatására vonatkozó ismeretek szerzése jelentette az értekezéssel szembeni legnagyobb várakozást. Ennek oka első sorban az, hogy a Cochrane adatbázis kombinációs farmakológiai tocolízissel foglalkozó, randomizált klinikai vizsgálatokat feldolgozó gyűjteménye az elmúlt 20 évben egyetlen klinikai vizsgálattal sem bővült. Az egészségügyi probléma stagnáló megoldatlanságát és egyúttal az értekezésben taglalt kutatás fontosságát jelzi, hogy a legutóbbi frissítésig,



azaz 2002-ig összegyűlt kombinációs klinikai vizsgálatok sem hoztak áttörést a korai fájástevékenység kezelésében.

## V. Az értekezéssel kapcsolatos kérdések

1. Napjaink szülészeti-nőgyógyászati szemlélete szerint a koraszülés, illetve a korai méhkontrakciók kialakulásáért az esetek döntő többségében szubklinikai chorioamnionitis, azaz gyulladós reakció tehető felelőssé. Sajnos az antimikrobiális kezelés csak a neonatális és anyai szeptikus következmények megelőzésére képes, magát a koraszülést nem képes megakadályozni. Az értekezésben használt gyulladós modellben TNF $\alpha$ -szint csökkentésére sikeresen alkalmazott thalidomid teratogén hatása miatt a klinikumban biztosan nem alkalmazható. Az emelkedett TNF $\alpha$  hatásának csökkentése ma már számos autoimmun reumatológiai és gastroenterológiai betegségben biológiai terápiával is elérhető. **A jelölt saját vizsgálatait vagy irodalmi ismereteit alapján alkalmasnak tartja-e az TNF $\alpha$  ligand vagy receptor ellenes biológiai terápiát a gyulladós eredetű korai méhizom-aktivitás kezelésére?**
2. A jelölt kísérletei szerint a  $\beta_2$ -AR agonisták uterorelaxáns hatását PDE4-gátlóval hatásosan lehet fokozni. Patai és mtsai 2016-ban kimutatták, hogy a drotaverin a PDE enzim gátlásán túl az L-típusú feszültségszabályozott kalcium csatornán keresztüli Ca<sup>++</sup>-influx blokkolásával is képes simaizom relaxációt okozni, vagy dózis-függő módon meggátolni a kontrakció kialakulását (Patai Z, Guttman A, Mikus EG. Potential L-Type Voltage-Operated Calcium Channel Blocking Effect of Drotaverine on Functional Models. J Pharmacol Exp Ther. 2016 Dec;359(3):442-451. doi: 10.1124/jpet.116.237271.). A Ca<sup>++</sup>-csatorna blokkolókra jellemző hatás felfedezése újabb perspektívát nyitott a drotaverin klinikai alkalmazásának lehetőségeiben. **A jelölt szerint mi lehet a magyarázata annak, hogy a drotaverin -placebo-kontrollos humán vizsgálatokkal bizonyítottan- terminusban rövidíti a szülés tágulási szakát, s ezáltal gyorsítja a szülést? Mi lehet az in vitro uterusrelaxáló hatás és az in vivo szülésgyorsító hatás közötti ellentmondás magyarázata?**
3. A  $\beta_2$ -AR agonisták és Ca<sup>++</sup>-csatorna blokkolókat egyidejűleg alkalmazva a  $\beta_2$ -AR agonisták toxicitása fokozódik. A két támadáspont együttes alkalmazásának az értekezésben bizonyított szinergikus hatása a  $\beta_2$ -AR agonista terbutalin kontrakciógátló hatásának maximumát növelte és EC50 értékét is csökkentette. **Jelentheti-e ez az eredmény azt, hogy a két különböző másodlagos jelátviteli útvonal már az útvonalak végállomását jelentő miozin könnyűlánc foszforiláció előtt kapcsolatot tart fenn egymással.?**

## VI. Összefoglaló értékelés

Dr.Gáspár Róbert MTA doktori értekezése 20 éves izomélettani kutatómunkát ölel fel, melynek eredményei elsőrangú tudományos szakfolyóiratokban kerültek közlésre. Az értekezés egyes fejezetei önmagukban is egy-egy

értekezéssel felérő mennyiségű és minőségű kísérletes munka eredményeit részletezik. A kétszázat meghaladó számú kísérlet összeállításában a tézisek és antitézisek szigorú alkalmazása biztosítja az eredmények megbízhatóságát és a következtetések megalapozottságát. A jelölt tudományos és oktatói munkája a gyógyszerfejlesztésben és egy rendkívül fontos klinikai probléma megoldásában jelentős kutatási eredményekkel gyarapította az orvostudományt. Dr.Gáspár Róbert téziseit elfogadom és javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását, valamint eredményes eljárást követően az MTA doktora cím odaítélését.

Debrecen, 2024.szeptember 5.



Dr.Póka Róbert  
egyetemi tanár  
az MTA doktora