

Válasz Prof. Deli Mária opponensi bírálatára

Hálásan köszönöm Deli Mária Professzor asszonynak hogy dolgozatom bírálatát elvállalta és számtalan teendője mellett időt szakított a dolgozat alapos bírálatának elkészítésére.

Formai hiányosságok:

Hiányolom az idézett cikkek, valamint a szerző közleményeinek egységes formátumú szerkesztését. A feliratok az ábrák egyik részében magyarul, míg a másik (nagyobb) részében angolul vannak feltüntetve. Szerencsésebb lett volna egységes nyelven elkészíteni a tézis ábráit.

Kritikai megjegyzéseivel teljes mértékben egyetértek, valóban nagyobb figyelmet kellett volna fordítanom az ábrák feliratozására és nyelvi egységesítésére.

Az értekezés tartalmára vonatkozó kérdések:

1. *Az Alzheimer-kór preklinikai kutatásában nyert eredmények legtöbbször transzlációs kudarchoz vezettek eddig. Mik a fő okok?*

Az egyik fő ok lehet, hogy az egérben létrehozott elváltozások nem minden esetben analógok az emberben lejátszódó patológiás folyamatokkal. A másik, hogy az Alzheimer-kórnak jelenleg nincsen igazán jó egérmodellje. A legáltalánosabban használt az APP^{swe}/Pse1 kettős transzgenikus egér, amely két humán fehérje, az amyloid precursor protein (APP) és a presenilin 1 (Pse1) mutáns formáit termeli túl, és nagy mennyiségű toxikus abeta peptidet termel. Ugyanakkor a human betegség kialakulásában fontos szerepet játszik a tau fehérje fokozott foszforilációja. Ez sajnos ebben a transzgenikus egértörzsben csak nagyon kis mértékben jelentkezik. Azokban az egérmodellekben viszont, amelyekben erős tauopathiát lehet megfigyelni, az amyloid plakkok kialakulása nem számottevő. A human kórfolyamatra márpedig mind az amyloid plakkok kialakulása, mind a tau fehérje hyperfoszforilációja egyaránt jellemző.

2. *A toxicitási tesztek nagy részében az állatkísérletek megjósolhatják a várható humán hatást. Az elmúlt években azonban volt két olyan súlyos, részben halálos kimenetelű klinikai fázis I vizsgálat (TGN1412 anti-CD28 monoklonális ellenanyag, 2006; BIA 10-2474 zsírsavamid hidroláz gátlószer, 2016) amelyeknél a preklinikai tesztek alapján nem volt várható fatális gyógyszerreakció. Mennyiben játszhatnak közre ilyen esetekben a fajok közti különbségek, vagy elsősorban más okok állhattak a háttérben?*

A preklinikai vizsgálatok során előírás, hogy egy adott gyógyszerjelölt molekulát legalább két állatfajon kell tesztelni. Ennek ellenére előfordulnak a fentemlíttettek esetek, -szerencsére ritkán- amelyek háttérben mindenképpen a fajok közötti eltérő szöveti érzékenység, az eltérő biokémiai és molekuláris mechanizmusok rejlenek. Az eltérés másrésről abból fakad, hogy a kísérleti állatok

fiatalok, egészségesek, genetikailag homogének és kontrolált környezetben élnek, míg a human betegek rendszerint idősök, betegek, genetikailag heterogének és igen változó környezetben élnek¹. Az akut gyógyszer toxicitás mellett talán még nagyobb gondot okoz a gyógyszerek hosszantartó szedésének káros krónikus hatása. A bardoxolone methyl-t 2-es típusú cukorbetegnek és 4. stádiumú krónikus vesebetegeknek adták fázis 1 vizsgálatban. 7 hónap után a vizsgálatokat le kellett állítani, mert egyre több beteg mutatott erősödő szívpanaszokat². Sok esetben nehéz meghatározni a gyógyszer ún. "terápiás ablakát", ugyanis a rágcslókban kapott toxicitási és hatástani dózisok nem extrapolálhatóak közvetlenül az emberre. Ezért is van fokozott érdeklődés a human sejteken történő, 3D-organ on a chip kultúrák kifejlesztése iránt, amelyek a személyre szabott gyógykezelést is lehetővé fogják tenni a jövőben.

3. Milyen állatkísérleteket válthatnak ki az új kísérletes modellezési lehetőségek, az organ-on-chip és body-on-chip technikák, és mely területeken nem valószínű ez a váltás?

A technikák gyors fejlesztésével az új modellezési lehetőségek előbb-utóbb **minden területen** teret fognak nyerni. Valószínűleg az egyes szervek működését modellező 3D szív, vese, tüdő, bél, máj kultúrák fognak először elterjedni és az összetettebb agy-periferális idegrendszer, valamint az immunrendszer modellezését lehetővé tévő 3D szervkultúrák később. Az elmúlt hetek tudományos szenzációja volt Cambridge-i kutatók, - köztük magyar kutató is volt – által létrehozott a levegő-tápfolyadék határán úszó membránon tenyésztett "cerebral organoid", amelyben működőképes neuronális hálózat alakult ki és az ingerelt idegsejtek összehúzódnásra készítették a velük kapcsolatban álló izomsejteket³.

A jelölt összesen hét transzgenikus egértörzs létrehozását említi a tézisben, azonban csak négy egértörzs létrehozását és öt törzsen kapott eredményeket mutatja be részleteiben. A munkának ezzel a részével kapcsolatban az alábbi kérdések merültek fel:

4. Történtek-e további vizsgálatok esetleg gyógyszeresztelések a COMT, illetve a PRODH génkiütött egérmodelleken?

A COMT hiányos egerek előállítását a new-yorki Rockefeller egyetem laboratóriumában történt. Nem tudok róla, hogy az egértörzset szabadalmaztatták volna és az egereken történő gyógyszeresztelésekről sincsen tudomásom. A laboratórium mintegy 10 évvel ezelőtt átköltözött a Columbia Egyetemre, úgy tudom gyógyszerkísérletek ott sem folytak az egértörzsen. A PRODH hiányos egértörzs természetes mutáció során jött létre és a kereskedelemben beszerezhető volt. Ezen egértörzs gyógyszeres kezeléséről sem tudok.

5. Az ApoB100 és a biglikán fehérjét túltermelő egértörzsben kardioprotektív hatást írt le a kutatócsoport, ugyanakkor makuladegeneráció volt megfigyelhető (Sallo et al., 2009). Hogyan magyarázható ez a kettős, egyrészt védő-, másrészt patológiás fenotípus?

Sajnos a bicycannak ezt a Janus-arcú hatását nem tudjuk megmagyarázni. Koleszterol dús tápon tartott ApoB/biglycan kettős transzgenikus állatokban szignifikánsan kevesebb

atheroszklerotikus plakk alakult ki, mint csak az ApoB-100 fehérjét túltermelő állatokban⁴. *In vitro* hypoxia/reoxigenáció kísérletben a kívülről hozzáadott tisztított biglycan fehérje szignifikánsan és dózis-függően növelte a kardiomyocyták túlélését⁵. Ugyanakkor, a biglycan transzgenikus állatok szemében a Bruch membrán erőteljes megvastagodását lehetett tapasztalni, amit a koleszterin dús diéta etetése csak tovább fokozott⁶.

6. *Lehet-e a biglikánnak szerepe a vér-agy gát működésben? Vajon ott protektív szerepet tölthet-e be?*

A biglycan vér-agy gát protekciójára vonatkozó irodalmat nem találtam. Mivel hypoxia/reoxigenáció kísérletben a biglycán indukálta az endotheliális nitric oxide synthase (eNOS) gén kifejeződését növelve ezáltal a nitric oxid (NO) szintjét kardiomyocytá szövettenyészetben, elképzelhető, hogy hasonló NO-függő protektív hatása lenne agyi endothel sejtekre is cerebrális ischemia esetén. A biglycan neuroprotektív hatására vonatkozóan több adat van. Koops és munkatársai azt találták, hogy az asztrocyták termelik a biglycant és az támogatja a neokortikális neuronok túlélését *in vitro*⁷. A neokortikális kultúrához kívülről hozzáadott tisztított biglycan ugyancsak meghosszabbította a neuronok túlélését. Agysérülést követően, (a fornix átvágása után), mind a decorin, mind a biglycan expressziója megnövekszik, de különbözőképpen. A decorin fehérje mennyisége szinte azonnal és kiterjedt területen növekszik meg, míg a biglycan fehérje lassabban és kizárólag a sérülés területére korlátozódva jelenik meg⁸. A két fehérje agysérülést követő indukciója azt jelzi, hogy szerepük lehet az agysérülést követő reparációs folyamatokban.

7. *A hCEPT és az α B-krisztallin transzgenikus egértörzsek szerepelnek a tézisben, mint előállított vonalak (rövidítések jegyzéke, 16., 33., 69. oldal), azonban további információt a dolgozat nem tartalmaz. A hCEPT és az α B-krisztallin túltermelő egértörzsek nincsenek listázva az 1. táblázatban, sem említve a Módszertani összefoglaló és az Eredmények fejezetekben. Tervezik-e a törzsek jellemzését, vizsgálatát, esetleges további alkalmazását?*

A 2000-es évek elején, miután a transzgenikus technikát a laborban beállítottuk, sorozatban állítottuk elő a transzgenikus egértörzseket. Az állatok fenotípusának analízise alatt viszont rá kellett döbbenünk, hogy ez igen komoly feladat és 2-3 egértörzs analízise teljes kapacitásunkat akár évekre is igénybe veheti. Akkor még a többi transzgenikus egértörzset csak fenntartottuk. Mintegy 6 évvel ezelőtt fertőzés, egér hepatitis járvány ütött ki az állatházban. A számunkra legfontosabb transzgenikus törzseket a KOKI-ban rederiváltattuk, a hCEPT és az α B-krisztallint túltermelő egértörzsek viszont kialtatásra kerültek.

8. *A kutatómunka során előállított és az értekezésben bemutatott állatkísérletes modellek tesztelési rendszert jelenthetnek a gyógyszerkutatásban. Találtak-e a modelleken – akár a tézis benyújtása óta eltelt időszakban – ígéretesnek tűnő új gyógyszerhatóanyagokat? Ezeknek milyen indikációja lehet? Hol tart most a vizsgálati folyamat?*

A transzgenikus egereink fenotípusának részletes analízise után lehetett kijelenteni, hogy az valóban modellje lehet egy adott betegségnek. Az ApoB-100 fehérjét túltermelő egértörzsben ezt a munkát most fejeztük be és eredményeink azt valószínűsítik, ez az egértörzs a cerebrovaszkuláris neurodegeneráció egy új egérmodellje lehet.

Gyógyszerkísérleteket egy már validált és széleskörben használt egérmodellen, az APPswe/Pse1 kettős transzgenikus egértörzsön, az Alzheimer-kór validált egérmodelljén végeztünk. A kísérletekben a Lipidart Kft. által kifejlesztett és szabadalmaztatott chaperon ko-inducer hatással rendelkező dihydropiridin molekulák neuroprotektív hatását igazoltuk. Az eredményeket a J. of Alzheimer Disease c. folyóiratban publikáltuk⁹.

9. Hasznosult-e valamelyik állatkísérletes modellt érintő szabadalom?

Sajnos nem. A szkizofrénia diagnosztizálására alkalmas markergének szabadalmaztatása 2005-ben történt meg, a szabadalom tulajdonosa a Szegedi Biológiai Központ volt és az oltalom pár évvel ezelőtt megszűnt.

A biglycan atheroszklerózis elleni és kardioprotektív hatásáról szóló eredményeinket 2008-ban "Use of biglycan or enhancers of biglycan activity in the preparation of pharmaceutical compositions" címen szabadalmaztattuk. Mivel klinikai kipróbálásra nem volt meg a kellő anyagi hátterünk, ezért a szabadalmat értékesítettük, a Pharmahungary Kft. vásárolta meg. Úgy tudom a cég megpróbálta azt tovább értékesíteni, több érdeklődő is volt, de végül nem sikerült eladni és az a szabadalmi oltalom lejártával megszűnt.

Ismételten köszönöm Professzor asszonynak részletes bírálatát és értekezésem nyilvános vitára bocsájtásának támogatását.

Szeged, 2019. márc. 25.



Dr. Sántha Miklós

jelölt

Hivatkozások:

1. Olson H, Betton G, Robinson D, Monro TK, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B, Heller A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 32(1):56-67.
2. Proceedings of a Workshop (2018). Chapter 6: Assessing Safety and Toxicology. In “Advancing Disease Modeling in Animal-Based Research in Support of Precision Medicine.” p.70. <https://www.nap.edu/read/25002/chapter/7>.
3. Stefano L. Giandomenico, Susanna B. Mierau, George M. Gibbons, Lea M. D. Wenger, Laura Masullo, Timothy Sit, Magdalena Sutcliffe, Jerome Boulanger, Marco Tripodi, Emmanuel Derivery, Ole Paulsen, András Lakatos & Madeline A. Lancaster. (2019). Cerebral organoids at the air–liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nature Neuroscience*, March 18.
4. Santha, M., Bereczki E., Gonda S., Csont C., Ferdinandy P. (2008). Use of biglycan or enhancers of biglycan activity in the preparation of pharmaceutical compositions. International Application No.: PCT/HU2008/000003.
5. Csont T, Görbe A, Bereczki E, Szunyog A, Aypar E, Tóth ME, Varga ZV, Csonka C, Fülöp F, Sántha M, Ferdinandy P. (2010) Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: Role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol.* 4: 649-652..
6. Sallo FB, Bereczki E, Csont T, Luthert PJ, Munro P, Ferdinandy P, Sántha M, Lengyel I. (2009) Bruch's membrane changes in transgenic mice overexpressing the human biglycan and apolipoprotein B-100 genes. *Exp Eye Res.* 89:178-86
7. Koops A, Kappler J, Junghans U, Kuhn G, Kresse H, Müller HW. (1996) Cultured astrocytes express biglycan, a chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan supporting the survival of neocortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* Sep 5;41(1-2):65-73.
8. Stichel CC, Kappler J, Junghans U, Koops A, Kresse H, Müller HW. (1995) Differential expression of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain. *Brain Res.* Dec 18;704(2):263-74.
9. Kasza Á, Hunya Á, Frank Z, Fülöp F, Török Z, Balogh G, Sántha M, Bálint Á, Bernáth S, Blundell KL, Prodromou C, Horváth I, Zeiler HJ, Hooper PL, Vigh L, Penke B. (2016). Dihydropyridine Derivatives Modulate Heat Shock Responses and have a

Neuroprotective Effect in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. J
Alzheimers Dis. May 7;53(2):557-71.