

## Opponensi vélemény

Wittmann István

### „Oxidatív- és karbonil stressz diabetes mellitusban és veseelégtelenségben” című akadémiai doktori értekezéséről

A jelölt népegészségügyi szempontból is fontos klinikai kérdések elméleti háttérét vizsgálta betegeken, kísérleti állatokon és in vitro modelleken gazdag, modern, sőt számos esetben saját fejlesztésű módszerek segítségével.

A dolgozat 252 számozott oldalt, 101 ábrát, 25 táblázatot és 491 darab 1953-2012 között született cikket felsoroló irodalmi jegyzéket tartalmaz. Alapját 25 darab 1997 és 2013 között megjelent idegen nyelvű (ebből 20-ban első vagy utolsó szerző) saját publikáció képezi. Két impakt faktor nélküli, 1 pedig könyvfejezet. A maradék 22 cikk összesített impakt faktora 57,039, átlagban 2,6 (a legalacsonyabb 1,288, a legmagasabb pedig 5,347). A disszertációval kapcsolatos hazai közlemények száma 40. Ezen kívül a disszertáció anyagát képezi 1 szabadalom, melynek közzétételi napja 27/12/2012.

A pályázó klinikai intézeti igazgató 399 közleménnyel, több mint 1000 idézettel (független idézete közel 900), összes impakt faktora 140, H-indexe pedig 15. Mind a teljes munkásság, mind a disszertáció alapjául szolgáló tudományos teljesítmény figyelemre méltó és mintaszerű abból a szempontból, hogy a kutatási kérdések a betegágytól indulva a molekuláig, illetve vissza terjednek és alkotnak igen érdekes, tág horizontot feszegető, sok-sok részletből álló, de egységes egészre megérteni kívánó rendszert.

A vizsgált tudományos terület fontos, de a rendkívül szerteágazó összefüggések, módszertani bizonytalanságok, illetve az ennek következtében felhalmozódott ellentmondó adatok miatt rendkívül nehezen átlátható. Dicséretre méltó a jelölt szorgalma, bátorsága és kitartása, amellyel ezen az ingoványos szövevényes területen vizsgálódott és megpróbált eligazodni, rendet vágni, illetve új, biztos pontokat találni.

A dolgozat szépen tagolt, a felépítése rendhagyó. Az ábrák, táblázatok jól követhetők. Az ábrák felirata vegyesen hol magyar, hol angol. A kísérletes részek előtt a rövidítések jegyzéke és a bevezető található gyakran ismétlődést eredményezve. Az egyes vizsgálatok leírása tartalmazza a bevezetőt, a módszertan leírást és az eredményeket. A megbeszélések azonban külön összesítve minden egyes témakör végén található, ami nehezíti az átlátást, követést.

A fogalmazás magyaros és világos, alig néhány olyan mondat fordul elő, amelyik részben, vagy egyáltalán nem értelmezhető, mint például a 37. „eredeti tudományos felismerés” a 10. oldalon. Az oldalak számozását a minden oldalon értelmezhetetlen megjelenő kód részben elfedi. A helyesírás következetes; kevés az értelemzavaró elírás.

A dolgozat köszönetnyilvánítással kezdődik, majd az eredeti tudományos felismerések összegzésével, tételes felsorolásával folytatódik, amelynek első mondatában vastag betűvel szedve a szerző az alábbiak szerint határozza meg, hogy mit tart munkássága legfontosabb felismerésének: „...nem elég az oxidatív és karbonil stressz akut hatásait kivédeni, hanem a szubakut károsodások megelőzése is szükséges ahhoz, hogy a kezelés valóban eredményes legyen”. A szerző az opponens számára nagy kihívást jelentő mennyiségű munkát végezve 47 pontban sorolja fel a munkássága során elért eredményeit. Mindenütt megadja a megállapításhoz tartozó saját cikk, publikáció sorszámát is a könnyebb azonosíthatóságot segítő. Ezután

következik egy közel két oldalas összegzés, amelyet „Az oxidatív- és karbonil stressz-betegségek” folyamatábrája egészít ki. Az ábrán az áttekinthetőség érdekében a szerző színessel kiemeli munkacsoportjának eredményeit.

A saját publikációkban szereplő „eredeti” tudományos felismerések egy része korábban és/vagy hasonló módon vizsgált kísérleti kérdésfeltevéseket, illetve megerősített, vagy elvetett megállapításokat tartalmaznak. Számos olyan megállapítás született, amelyek az eddigi tapasztalatok alapján várhatók, magától értetődők, illetve olyanok is, amelyek első felismerések, illetve a felismeréshez szükséges technikai metodikai részletek innovatív jellegűek.

A bevezető (23 oldal) irodalmi áttekintést ad a 2-es típusú diabetes mellitus betegségről, a szabadgyökökről és azok szerepéről a biológiai rendszerekben. Az antioxidáns rendszer után foglalkozik a vesebetegségekkel, különös figyelmet szentelve a proteinuriára és a dohányzás okozta oxidatív stressz szerepére. Az érdekes irodalmi összefoglalás nem tartalmazza a szokásos, de valószínűleg nem elengedhetetlen, bár döbbenetes epidemiológiai adatokat, előrejelzéseket és a legújabb a diabetes mellitus kialakulására vonatkozó megfigyeléseket, mint például az agyi és a szigetközponatú kettős cukorszabályozó rendszer sémáját (MW Schwartz et al. Nature 503, 59-66 2013), mely szerint a 2-es típusú diabetes kialakulásához mindkét rendszer károsodása szükséges és mely összefoglaló cikk számos részlete a disszertáció beadásakor már ismert volt. A dolgozat tartalmaz azonban számos az oxidatív és karbonil stresszre vonatkozó fontos és jól összefoglalt részletet és mechanizmust.

A következő nagy rész a három főbb témakör közleményenkénti bemutatását adja, hasonló tagolásban.

1. Az oxidatív stressz, a glikáció és a karbonil stressz diabetes mellitusban, vesebetegségekben és dohányzásban rész 9 kísérletre oszlik.
2. A hidroxil szabad gyök által kiváltott oxidatív stressz diabetes mellitusban és vesebetegségekben 4 kísérletet sorakoztat fel. (Itt jegyezném meg, hogy szerencsésebb volna a szabadgyököt egybeírtan szerepeltetni.)
3. A szabad gyökök szerepe az anyagcsere szabályozásban és az érfal meszesedésben 3 kísérletsorozatot ölel fel.

A dolgozatot az érkekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke és az irodalomjegyzék zárja.

A pályázó széleskörű technikai felkészültségről ad tanúbizonyságot. A klinikai vizsgálatok klinikai kémiai paramétereinek módszertanát épp olyan biztosan uralja, mint a genetikai felméréseket, valamint az in vivo állat, illetve sejtkísérleteket és molekuláris biológiai módszereket. Megállapításai tudományosan alátámasztottak és nemzetközi folyóiratokban publikáltak.

A védés szokásos ideje csak arra ad lehetőséget, hogy a disszertáció tanulmányozása során felmerült kérdések közül csak néhányat emeljek ki az alábbiak szerint:

- A 13. oldalon a második bekezdésben a szerző azt állítja (ezzel megegyező kijelentés többször ismétlődik a dolgozatban), bizonyítottuk, hogy a rendszeresen ismétlődő akut oxidatív- és karbonil stressz epizódok hiperfiltrációt.... okoznak. Mint a dolgozathoz később kiderül a jelölt, illetve munkacsoportja különböző módszerekkel, különböző veseartériás érszakaszokon relaxációs hatást mutatott ki, de azt nem vizsgálta, hogy az afferens és az efferens arteriola ellenállás aktuális változása növelte-e az effektív filtrációs nyomást. Ennek hiányában a megállapítás csak feltételezés lehet.

- A 14. oldalon található „Oxidatív-és karbonil stressz betegségek” című ábrán látható irodalmi adatok alapján megrajzolt összefüggések közül kék színnel jelölte a szerző a saját adatokat. Kérdés, hogy a több mint egy tucat kék szöveg közül, melyek a korábban nem vizsgált, új eredmények.
- A 4.7.5. fejezet (28. oldal) megállapításával kapcsolatban felmerül a kérdés, hogy a vesében a glikációs végtermékek miért a proximális tubulus sejtmagjaiban halmozódnak fel elsősorban. A felhalmozódás hogyan változik az életkorral és ez miként érinti a saját vizsgálati eredményeket, ahol a kontroll és a diabeteses betegek életkora gyakran különbözik.
- A dohányfüst hatásának vizsgálatok a hatásmechanizmusok tárgyalásánál csak néhány összetevő kerül szóba, illetve követésre, holott a valóságban a füstben található aktív anyagok száma igen nagy még füstszűrő alkalmazása esetén is (30. oldal).
- Ismert, hogy a fruktóz-amin-3-kináz (FN3K) vesében különösen aktív, de milyen a megoszlása veseszöveteken belül és az egyenetlen eloszlásnak milyen pathophysiologiai következményei lehetnek (32. oldal).
- A glikált fehérjék, glikációs végtermékek, illetve a glikált vörös vértetek befolyásolják az endothel áteresztőképességét. Vajon milyen szerepe lehet ennek azon vese szöveti károsodások kialakulásának mechanizmusában, amelyek esetén a fokozott RAS aktivitás eleve növeli az afferens arteriola disztális részének endothelialis permeabilitását és feltételezhetően a GFR mintegy egyharmadának megfelelő mennyiségű filtrációját. Befolyásolja-e a jelenség az endothel sejteket borító glyocalix réteget, illetve annak permeabilitását?
- Van-e adat arra, hogy milyen a glikolizált termékek koncentrációja a podocyta által bezárt úgynevezett harmadik térben, illetve vesebetegségek kezdetén vagy korral miként változik (35. oldal)?
- A sokféle vizsgálat és eredmény, illetve irodalmi adat alapján mi a jelölt véleménye arról, vajon mi dönti el, hogy az egyik diabeteses beteg veseelégtelen lesz, a másik nem annak ellenére, hogy az úgynevezett, jobban mondva ismert kockázati tényezők akár még hasonlóak is.
- A vizsgálatok tükrében mi a jelölt véleménye, hogy a mikroalbuminuria a vesekárosodások oka vagy következménye, vagy esetleg mindkettő.
- 5.1.3.1. táblázat szerint (Normális károsodott vesefunkciójú diabetesesek összehasonlítása) a 80ml/percnél nagyobb GFR-t mutató betegek átlag életkora 58,7 +/- 8,2, a 80ml/percnél kisebb GFR-rel rendelkező betegeké 68,6 +/- 5,5 év. A kapott eltérésekben mennyi szerepe lehet a kornak, illetve a diabetesnek magának. Ebben a vizsgálati leírásban, ellentétben a többivel, nem szerepel a felhasznált statisztikai eszközök leírása. Milyen az összefüggés a kor és a kreatinin clearance között, illetve a szérum AGE és a kor között?
- Az FN3K G900C polimorfizmus vizsgálatok a szerző kimutatta, hogy a CC homozigóta betegek későbbi időpontban kerültek felismerésre és a betegség fennállásának időtartama is rövidebb. A funkcionális összevetéskor nem kellene azonos fennállási idejű GG, GC homozigótákkal összehasonlítani a CC adatokat?
- Talán érdemes lett volna a különböző vizsgálatok, illetve kísérletek esetén - ahol lehet - minél több „azonos” kérdést felvetni. Például a metilglioxállal kezelt patkányokban, azaz a DM kialakulásának modelljében jó lenne látni a glomerulus átmérő változását is. E modellben mi a fokozott renin elválasztásának mechanizmusa? Lehet-e magyarázni ezt a

nemrég magyar szerző által a vesében elsőként leírt renin szekréció metabolikus szabályozásával? Egyáltalában a renin immunhisztokémiai fokozott festődése mit jelent? Fokozott termelődést, fokozott szöveti felvételt vagy csökkent szekréciót? A kísérlet folyamán jelentősen emelkedett a vérnyomás és ez nehezé teszi az IGT hatás vizsgálatát, értékelését. Egy normalizált vérnyomású csoport igen értékes információt adhatott volna. A vesében meglévő különböző elhelyezkedésű renin-angiotenzin rendszerek nem egyformán aktiválódnak, gyakran ugyanaz az inger ellentétes hatást vált ki. Itt viszont mintha egy irányba mutatnának a változások, miért?

- 5.5.3.1. táblázatban (A kontrol csoport IgA nephropathiás betegek klinikai és oxidatív stressz, valamint szérum AGE-paraméter adatai) ismét felvetik a kérdést, hogy amíg a kontroll csoport átlag életkora 32 év, a normál vesefunkciós nephropathiásoké 41 év, addig a csökkent vesefunkciójú betegeké 49 év. Az emelkedett AGE érték mennyiben tükrözi a kort és mennyiben a betegség hatását?
- A vizelet albumin oxidatív és karbonil stressz általi módosítása című vizsgálatában érdekes módszertani eredmények születtek. Különösen fontos az értékek hosszabb fagyasztás utáni változása. A vizeletben történő meghatározásokat mennyiben befolyásolhatja vagy zavarhatja a különböző kémiai természetű gyógyszerek vizeleten keresztüli ürülése?
- A glomeruláris típusú hematuria modellezése karbonil- és oxidatív stresszel című fejezetben található munka nem fedi a címet, mert valójában nem hematuria modellezésről van szó, hanem annak vizsgálatáról, hogy a vörösvérsejt in vitro karbonil- és oxidatív stresszel történő kezelése hogyan hat a vörösvérsejt membránra, illetve morfológiájára.
- Jelentős kísérleti munka a dohányfüst, illetve annak összetevőivel végzett humán, illetve in vitro vizsgálat. Fontos annak megerősítése, hogy a dohányzás elősegítheti, illetve kiválthatja a noduláris glomerulosclerosis kialakulását. Mi lehet azonban ennek az igazi pathomechanizmusa? Valaki valóban bizonyította az afferens arteriola dilatációját, az efferens arteriola hasonló reakciója nélkül, vagy esetleg az efferens vazokonstriktio kialakulását?
- A dohányzás okozta renalis artéria relaxáció vizsgálati eredményének megtárgyalásakor - ahogy már jeleztem - újra és újra hivatkozás történik a következményes hiperfiltrációra, amelynek jelenléte az eredményekből semmilyen módon nem következik sem az elvégzett humán vizsgálatokból, sem az in vitro érvizsgálatokból. Ezért az eredmények magyarázatokor óvatosabb fogalmazás szükséges.
- A jelöltnek először sikerült kimutatnia immunhisztokémiai módszerrel humán vesemintákban o-glikozilációt. A pozitivitás lokalizációja milyen viszonyban van a renin, illetve a szöveti angiotenzin megjelenésével diabetes mellitusban?
- A jelölt vizsgálatai alapján felveti a para-tirozin szuplementáció lehetséges szerepét az oxidatív stressz szubakut hatásainak ellensúlyozásában. Az alap kutatásokon kívül vannak-e ehhez a javaslatához humán támogató adatok is?

A dolgozat eredményeinek összefoglalását, általános üzenetét az alábbiakban látom.

A betegeken, a kísérleti állatokon, illetve a különböző modelleken végzett szerteágazó eredeti vizsgálatok újra és nyomatékosan felhívják a figyelmet arra, hogy a diabetes mellitus, a hypertonia, a krónikus veseelégtelenség, a kardiovaszkuláris betegségek és a dohányzás növelik a szabadgyök képződést, a glikációt, a karbonilációt és csökkentik a nitrogénmonoxid biológiai

hozzáférhetőségét. Mindezek felerősítve a kockázati tényezők hatását elősegítik a célszerv károsodások kialakulását. E kóros eseményekben akut, szubakut és krónikus folyamatok különíthetők el, amelyeknek egyenkénti, illetve komplex módon történő kezelése kívánatos, de még nem minden részletében megoldott.

A tudományos teljesítmény értékelése, mint tudjuk, nem könnyű feladat, nincs egyszerű mérőmódszer. Ezért az opponens feladata bonyolult, hiszen komplex módon kell értékelnie a jelölt tudományos teljesítményét. Ebbe beletartozik a témaválasztás, az átlátás, a hipotézisek, a módszerek, a kritikai készség, az eredmények, az interpretálásuk, a hazai és nemzetközi hatás, visszhang, az impakt faktorok, a Hirsch-index, az együttműködések, a tanítványok, a karrier, stb analízise.

Reálisan a mai akadémiai körülmények nem teszik lehetővé, hogy az opponens által megadott 47 tudományos megállapítást darabonként megvizsgálja, mélységében analizálja. Ezért nem maradt más hátra, mint a minta vételezés véletlenszerű alkalmazása.

Az analízist elvégezve, mindent figyelembe véve és kis ország lévén egymás teljesítményét jól és személyesen ismerve, illetve követve nyugodt lelkiismerettel kijelenthetem, hogy a jelölt tudományos teljesítményét minden kétséget kizáróan elegendőnek tartom az akadémiai doktori cím elnyeréséhez.

Budapest, 2014. április 11.



Dr. Rosivall László