



OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dr. Molnár Tihamér Szabolcs: “Biomarkerek klinikai haszna ischaemiás eredetű akut kórképekben-úton a személyre szabott medicina felé” című MTA doktori értekezéséről

Dr. Molnár Tihamér Szabolcs MTA doktori értekezése a szubklinikus agyi atherosclerosis, az akut ischaemiás stroke és a szekunder stroke prevenció területein alkalmazható egyes biomarkerek értékét vizsgálta a klinikai gyakorlatban. A vizsgált témakör igen nagy gyakorlati jelentőséggel bír és klinikailag rendkívül releváns, hiszen annak ellenére, hogy az ischaemiás stroke kezelésében az elmúlt évtizedek során számos áttörés következett be (trombolízis, trombectomia), a stroke a világ fejlett országaiban, így hazánkban is továbbra is a vezető halálokok közé tartozik és a felnőttkori rokkantság elsődleges oka. Olyan biomarkerek, amelyek előrevetítik a stroke magas rizikóját vagy összefüggést mutatnak a már kialakult stroke prognózisával, esetleg szövődményeivel (pl. hemorrhagiás transzformáció) potenciálisan hasznos segítséget nyújthatnak a klinikum számára és megteremthetik az egyénre szabott medicina alapjait. Különböző biomarkerek vizsgálata a stroke kutatásban nem csak a közvetlenül a gyakorlatban alkalmazható diagnosztikai vagy prognosztikai értékük miatt lehet hasznos, hanem segítségünkre lehet az egyes stroke altípusok patomechanizmusának jobb megértésében és a jövőben új terápiás célpontok azonosítását segítheti. Az értekezés röviden a szekunder stroke prevenció területéről is bemutat vizsgálatokat, a vérlemezke-gátlás területére fókuszálva. Ez a terület szintén nagy gyakorlati jelentőséggel bír, hiszen a megfelelő vérlemezke-gátlás kulcsfontosságú a recidív ischaemiás események megelőzésében, ugyanakkor a gyakorlatban az elmúlt évtized tudományos eredményei alapján vérlemezke-gátló terápiák hatékonyságának rutinszerű ellenőrzése ma már nem javasolt. A dolgozat ezen főbb témakörökbe tartozó obszervációs vizsgálatokat egy rövid, általános bevezetést követően 10 külön fejezetben taglalja. A disszertáció alapját 18 közlemény adja, melyek közül 13 esetén a szerző első/vagy levelező szerző.

Részletes bírálat:

Formai észrevételek: A dolgozat 139 számozott oldalból áll, összesen 234 irodalmi hivatkozást tartalmaz. Az értekezést 24 ábra és 23 táblázat színesíti. Bár a dolgozat szépen tagolt és rendezett, rengeteg elírás, helyesírási hiba található benne (oldalanként mintegy 2-5). Sokszor nem egységes az egyes latin kifejezések vagy az adott vizsgálat tárgyát képező biomarkerek írásmódja. Előfordul, hogy a szövegben elírja az aktuálisan tárgyalt ábra számát

(lásd 31. oldal szöveg “8. ábra”, valójában a 9. ábra eredményeit írja le). Legnagyobb általános probléma, mely az értekezés egészére jellemző, hogy a vizsgált biomarkerek esetén a mértékegységet/koncentrációegységet gyakran nem tünteti fel, csak a számszerű eredményt, melyet így nehéz értelmezni. A mértékegységek a szövegből is gyakran hiányoznak az eredmények leírásakor (pl. 36. oldal, 9. sortól; 48. oldal, 11. sortól, stb.) ill. táblázatok esetén is (pl. 1 táblázat). Több ábra esetén hiányzik a pontos a tengelyfelirat, és csak számok vannak feltüntetve (pl. 6. ábra) vagy a tengelyfelirat nem mutatja a koncentráció egységet (pl. 9. ábra). A táblázatok többségében nem jelöli a korrelációs együtthatót külön “r” vagy “R” megjelöléssel, így az olvasónak kifejezett odafigyelést igényel az eredmények azonosítása (lásd 10. táblázat, a p érték utáni zárójelbe írt szám a korrelációs együttható).

Az értekezésen belül 10 fejezetre tagolta az elvégzett vizsgálatokat a szerző, és mindegyik fejezeten belül elkülönültek a közlemények szerkezetének megfelelően megszokott rövid alfejezetek (Bevezetés, Célkitűzés, Betegek és módszerek, Eredmények, Diskusszió). Bár érezhetően igyekezett csoportosítani a szerző az egyes témaköröket, véleményem szerint tovább javította volna az olvashatóságát a dolgozatnak, ha kevesebb alfejezetre tagolódott volna a munka. A “Betegek és módszerek” fejezetek legtöbbször túlzóan rövidek, nagyon lényegretörő leírást adnak, mely a vizsgálatok értelmezhetőségét rontja. Többször előfordul, hogy alapvetően fontos információt nem közöl (pl. beválogatási/kizárási kritériumok, a betegek kezelése a felvételt követően, a vizsgált kimenetek pontos definíciója, a követés időtartama, stb.)

Tartalmi észrevételek, kérdések:

A bemutatott munka összességében rávilágít, hogy a szerző nemzetközi szinten is elismert eredményekkel rendelkezik, és a dolgozatban leírt eredmények többségét meghatározó szerzőként közölte nemzetközi folyóiratokban. Opponensként az eredmények méltatásán túl néhány kérdésem van, melyek a munka tágabb értelmezését segíthetik, de az eredmények értékét összességében nem befolyásolják.

1/ Korábbi eredményekre hivatkozva az S-100B fehérje felszabadulásának tulajdonítja a dipiridamol stresszhatást követően megfigyelhető agyi térfogatnövekedést. Az 1. táblázat eredményeit megfigyelve az S-100B fehérje koncentráció már a kiindulási vérminták esetén is duplája volt a TNJ pozitív betegekben az egészséges kontrollokhoz képest. *Elképzelhető-e az S-100B fehérje lokális hatása a tranziens neurológiai jel pozitív betegekben megfigyelhető nyugalmi (prestressz) magasabb regionális agyi térfogatnövekedés hátterében, vagy más mechanizmust feltételez?*

2/ 3. fejezet: “Szigifikáns carotis stenosis és akut ischaemiás stroke”. Leírja, hogy prospektív módon 55 AIS beteget vizsgált. *Milyen kezelésben részesült ez az 55 beteg, részesült-e valaki trombolízisben? Hogyan oszlott meg a stroke etiológiája a betegek csoportjában? Meddig követték a betegeket, mikor vizsgálta a halálozást? A 17. oldalon leírja, hogy “a post-stroke 72 óránál mért csökkent L-arginin szint és emelkedett hsCRP a post-stroke infekció független prediktorának bizonyult. Mit ért “csökkent” L-arginin és “emelkedett” hsCRP alatt? Hogyan*

definiálta a post-stroke infekció jelenlétét? Leírja, hogy a post-stroke 72 óránál mért hsCRP a halálozás független prediktora, de az esélyhányados mindössze OR:1,04. A post-stroke infekció független prediktorai esetén hasonlóan alacsony esélyhányadosokat közöl (lásd L-arginin: OR:1,03; hsCRP: OR:1,1). Bár az eredmény kétségtelenül szignifikáns, felmerül a kérdés, hogy vajon van-e bármilyen gyakorlati jelentősége ilyen alacsony esélyhányadosok esetén ezen biomarkerek meghatározásának?

Az 5. ábrán melyik időpontban ábrázolja az L-arginin koncentráció értékeit az AIS betegcsoportban? Összehasonlítva az eredményeket a 6. ábrával, az adatok nem tükrözik egyik időpontban (6, 24, 72 óra) vett vérminták eredményeit sem.

3/ 4. fejezet: “A lektin útvonal molekuláinak vizsgálata akut ischaemiás stroke-ban”. A 23. oldalon leírja, hogy “9 post-stroke infekciós beteget kizárt a vizsgálatból”. *Hogyan definiálta ezeket a betegeket és miért volt szükség a kizárásukra? Az 5. táblázatban mutatott regressziós eredmények két különböző esélyhányadost mutatnak be nem és kor szempontjából a kimenetelre nézve. A táblázatban mutatott elrendezés alapján szokatlan a “felvételi minták” nemét és korát vizsgálni ill. a “72 órás minták” nemét és korát. Talán helyesebb lett volna egy regressziós modellt alkalmazni a vizsgált kimenetelre és abba beemelni a kort, nemet, és az egyes markerek eredményét felvételtkor és 72 órával később. Hogyan magyarázza, hogy az alkalmazott modell eredménye alapján az életkor nem befolyásolta az mRS szerint definiált klinikai kimenetelt? A megbeszélés fejezetben leírja, hogy “a komplement aktiváció hozzájárul a stroke-ot követő ischaemiás/reperfúziós károsodáshoz”. Milyen eredményekre alapozza ezt a konklúziót?*

4/ 5. fejezet: “Az L-arginin és a lektin útvonal közötti kapcsolat vizsgálata akut ischaemiás stroke-ban”. A 72 órával a stroke-ot követő vérmintákból meghatározott hsCRP és S100B szignifikáns pozitív korrelációt mutatott ($r=0,428$, $p=0,018$), holott korábbi, nagyobb elemszámú vizsgálata során ez az összefüggés nem volt szignifikáns (lásd 22. oldal, 7 ábra D panel). Hasonlóan, korábbi vizsgálataiban során a 72 órával a stroke-ot követő vérmintákból meghatározott hsCRP és L-arginin koncentráció nem mutatott összefüggést (lásd 4. táblázat), ugyanakkor ebben a vizsgálatban jóval kisebb elemszám mellett szignifikáns pozitív korrelációt találtak a két marker között ($r=0,485$, $p=0,016$). *Mi lehet ennek az oka? Leírja, hogy a 30 napos mortalitás független prediktora csak a 72 órás CRP volt, 39,6 mg/L határérték felett az esélyhányados OR: 1,05-nek adódott. Ismét felmerül a kérdés, hogy mennyire releváns ez az eredmény a klinikai gyakorlat számára?*

5/ 6. Fejezet: “Citokinek vizsgálata akut ischaemiás stroke-ban és szignifikáns carotis stenosisban”. Az eredmények leírását nagyon nehéz értelmezni (koncentrációegység hiánya ill. a szórás nagyobb, mint az átlagérték). Leírja, hogy “a P selectin koncentrációja 72 óra elteltével szignifikánsan magasabb volt a nagyérelzáródásos stroke-ban szenvedő betegeknél ($29999,7\pm653381,8$), mint a lacunar stroke-ban szenvedőknél ($3312,56\pm61192,367$)”. Leírása alapján az IL-6 koncentrációja mind 6 órán belül, mind 72 óra után magasabb volt nagyérelzáródásos stroke esetén ($5722,7\pm19823$ és 28702 ± 10809), mint lakunáris stroke-ban

(13,14±49,2 és 145,1±439,8, p=0,04). *Valóban ekkora óriási különbség (mintegy 400-200x-os) lett volna a két stroke altípus esetén megfigyelt IL-6 értékek között? Mi lehet ennek az oka?*

6/ 8. fejezet: “A troponin-T és a thrombo-inflammatorikus molekulák összefüggése akut ischaemiás stroke kimenetelével”. A vizsgálat “Biomarkerek” fejezetében leírja, hogy a vérmintákat 10 percig 3000 g-vel centrifugálta, majd a felülúszókat fagyasztotta és -80 C-on tárolta az elemzésig. *A szolubilis P szelektint szérum vagy plazma mintákból határozták meg? Mit gondol, elsősorban vérlemezke vagy endothel-sejt eredetű volt a mért szolubilis P szelektin?*

7/ 9. fejezet: “Az ischaemiás stroke vérzéses transzformációjának rizikótényezői”. A 14. táblázat alapján az intravénás trombolízissel kezelt betegek 75,8%-nak volt kedvező hosszútávú kimenetele. *Ez az eredmény hazai és nemzetközi összehasonlításban is igen magasnak számít, minek köszönhető?*

8/ 11. fejezet: Clopidogrel szekunder prevencióban részesülő stroke betegek vérlemezke funkciójának vizsgálata. Ebben a fejezetben leírja (lsd. 99. oldal), hogy az újonnan bevezetett “thrombocyta antiszedimentációs ráta” vizsgálata során “az ülepedő vérlemezkék teljesen aggregáció gátlásban voltak, minden farmakológiai intervenció nélkül. Feltehetőleg ennek a jelenségnek a hátterében az áll, hogy az ülepedő (öregebb) vérlemezkék már korábban kibocsátották magukból a thrombo-inflammatorikus mediátorokat az alfa-granulumokból, emiatt elvesztették ADP-dependens aktivációs képességüket ex vivo.” Ez egy nagyon érdekes felvetés, *tud említeni az irodalomból olyan vizsgálatot, ahol szintén kimutattak ilyen thrombocyta alpopulációt? A vérlemezkékben az ADP a delta granulumokban tárolódik, ezek száma is kevesebb volt az alsó frakcióban? Mit gondol, milyen mértékben befolyásolta a Multiplate aggregációs eredményeket, hogy az alsó frakcióban a thrombocyta szám igen alacsony volt? Vizsgálatait és a nemzetközi irodalmi adatok ismeretében javasolná-e a clopidogrel hatás ellenőrzését a betegekben, és ha igen, milyen módszerrel?*

9/ *Összefoglalva eredményeit mely vizsgált biomarker(ek) bevezetését látja leginkább lehetségesnek/ígéretesnek akut ischaemiás stroke esetén a klinikai gyakorlatban, a stroke melyik fázisában és milyen célból?*

A fenti kérdések az elért eredmények jelentőségét nem teszik kérdésessé, a várt válaszok a bemutatott munka hátterének jobb megismerését segíthetik.

Új eredményeit az értekezés végén 10 pontban írja le, majd az eredmények klinikai hasznát szintén 10 pontban. Munkássága során számos új, stroke betegekben korábban kevéssé vizsgált biomarker potenciális prediktív szerepét vizsgálta a stroke egyes kimeneteleire nézve (pl. L-arginin, IL-6, CCK-18, troponin-T stb) és összefüggést keresett az egyes biomarkerek felszabadulása és a gyulladáshoz való válaszreakciók között. Ezen biomarkerek vizsgálata a potenciális direkt klinikai haszon mellett a patomechanizmus jobb megértését is szolgálta és a jövőben új terápiás célpontok azonosítását is segítheti. Külön említésre méltó, hogy a szerző eredményeit döntően Magyarországon, a Pécsi Egyetem affiliációja alatt érte el. Kiemelendő,

hogy folyamatosan aktív kutatómunkáját a napi klinikai tevékenysége mellett végezte, mely nagyfokú kitartásra és a kutatás iránti feltétlen elkötelezettségére utal.

Mindezek alapján a disszertációban összegyűjtött eredményeket új és jelentős tudományos eredményeknek tartom és az MTA doktora fokozat cím megszerzéséhez elegendőnek tartom. A nyilvános védés kitűzését és az MTA doktora fokozat odaítélését javaslom.

Debrecen, 2022 május 30.



Dr. Bagoly Zsuzsa
egyetemi docens
Debreceni Egyetem ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézet
Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék