

## **Opponensi vélemény Dr. Wilhelm Imola: “A neurovaszkuláris egység szerepe agyi gyulladásos és metasztatikus folyamatokban” című MTA doktora cím elnyerésére benyújtott dolgozatáról**

### **1. A dolgozat időszerűsége**

Egy 2024-ben a Lancet-ben publikált munka ([https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(24\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(24)00038-3)) 37 különböző neurológiai állapot – köztük a stroke, Alzheimer-kór, meningitis, stb. – hatását vizsgálva kiderítette, hogy a rokkantsággal korrigált elveszített életevek (disability-adjusted life years, DALY) számában mérve ma már "a leggyakoribb megbetegedés" idegrendszeri eredetű a világon! Azaz a téma időszerűsége megkérdőjelezhetetlen.

Egyre inkább világos az is, hogy a különálló sejtekre való fókuszálás helyett rendszerekben kell gondolkodnunk, így a dolgozatban alkalmazott neurovaszkuláris komplex megközelítés külön dicsérendő. A dolgozat számos eleme biomarker vagy gyógyszercélpont feltérképezésére szolgált, így a munka translációs értékét is szeretném kiemelni.

### **2. A dolgozat szerkezete**

A jelölt értekezésében 32 saját közleményt dolgozott fel, melyben 10-ben első és 7-ben utolsó szerző, amely magában is iskolateremtő tevékenységét sugallja. A 381 irodalmi hivatkozás és a 2,5 oldal rövidítés a téma alapos körüljárására utal. A bemutatott anyag 3 téma köré csoportosul (a vér-agy gát; a PRR és inflammaszómák szerepe és az agyi áttétek).

A szöveg megfelelően tagolt, áttekinthető, a színes ábrák nagyon informatívak, a hozzájuk fűzött magyarázó szöveg – általában - teljesen érthetővé teszi az ábrázoltakat (bár a 3. ábra aláírásában jó lett volna a rövidítések magyarázatát még egyszer feltüntetni).

A dolgozat nyelvezete megfelelő, nagyon kevés elütést tartalmaz (17.o. „periciták”; 35.o. „tumor mikrokörnyezeten”, 102.o. „kialakulásárát”). A rövidítések egyszer kerültek bevezetésre (egyedül a CB2 nem lett bevezetve sehol), és utána következetesen alkalmazva voltak. Kiemelném a magyar helyesírással való következetes törekvést (pl pericita, okkludin). Ugyanakkor jó lett volna legalább erőfeszítést tenni a „ensheathing, mesh és thin-strand” (14.o.), „speck” (24.o.) és „inflammaging” (26.o.) kifejezések magyarosítására. A dolgozat sok helyen kicsit túlfogalmazott (pl. 16.o. 3. sor, az előző gondolat ismétlése..., 7.sor nem nagyon érthető „a használt állatfajtól függetlenül” megjegyzés, hiszen fajspecifikus különbségekről nem volt szó, és egyébként is itt egy in vitro modellről esik említés. Későbbiekben is vannak semmitmondó mondatrészek, amiket célszerűbb lett volna elkerülni (pl 17. o. „számos agyi patológiás folyamat velejárója”). Ezzel ellentétben viszont számomra pár dolog még magyarázatra szorult volna a bevezetésben (lásd alább). Az eredményeknél sok bevezetésbe tartozó, magyarázó szöveg helyett jobb lett volna a módszerekhez való kötés, illetve a saját cikkekre való hivatkozás megadása.

### **3. A szakirodalom feldolgozottsága**

A 30 oldalas irodalmi bevezetés az elég szerteágazó, bár közös alapon nyugvó kutatást próbálta kellően felvezetni, alapvetően sikerrel. A 6 darab saját (?) ábrában nagyon értékeltem, hogy a szöveget támasztotta alá, nem tartalmazott sok más, a téma szempontjából haszontalan részletet.

Ugyanakkor a bevezetés elejéről hiányoltam egy pár mondatos, egy bekezdéses témafelvetést, miért is lényeges a neurovaszkuláris egység, pedig minden kétséget kizárólag az agyunk és betegségei fontosak és

a kutatott terület is nagyon izgalmas. Bár nagyon sok részletre kiterjedt az irodalmi feldolgozás, de számos, fontos kérdés kifejtése (pl kaszpázok szerepe, piroptózis jelentése) elmaradt. Néhány érintett mechanizmus, például a PACAP (4.1.2.), CB2 (80.o.), Igf2 (80.o.) egyáltalán nem került egy mondatban se megemlítésre.

Amit nagyon hiányoltam, az az irodalomban a hiányosságok fokozottabb kiemelése, és egyértelmű megfogalmazása, hogy ezt a hiányt szerette volna a jelölt munkája pótolni (azaz az irodalmi bevezetés célkitűzésekhez kapcsolása).

#### 4. A vizsgálati módszerek

A 10 oldalas, ábrákkal jól alátámasztott módszertani leírás mind in vitro, mind in vivo kísérletekben és számos mérési módszerben való jártasságra utal. Ugyanakkor jó lett volna a kísérleteket az egyes célkitűzésekhez (netalán alcélkitűzésekhez) kötni. Pl a 3.2.1. „Perifériás ideg sérülés”-t hirtelen nem tudtam mihez kapcsolni (hasonló lehetősége se lett felvetve korábban). Hasonlóan a 3.6. Adatbázis-elemzés alfejezet is a levegőben lógott.

A különféle cikkekben alkalmazott szerteágazó módszerek szépen összedolgozásra kerültek és a dolgozat követelményeinek megfelelő alapossággal lettek bemutatva (bizonyára csak ezek alapján nem lehetne reprodukálni, de egy általános elképzelést nyújtottak a kísérletek menetéről, és az eredeti cikkekben ennél alaposabb leírások szerepeltek). Külön kiemelném az adatbázisokban fellelhető eredmények saját adatokkal való összevetését, alátámasztását, mely egy nagyon elegáns, és egyre inkább választandó módszer. Talán a statisztikai elemzésből, reprezentatív képekből kicsit több is elfért volna (pl 10.C ábrán a z-score számolása). A dolgozat a következőkben se tartalmaz semmilyen statisztikai értéket (és saját cikkekre való hivatkozást se, ahonnan ezek – reményeim szerint – megtudhatók lettek volna). Az ábraaláírásokban található némi posthoc adat...

#### 5. Eredmények és interpretálásuk

Az eredmények leírása a célkitűzések mentén tagolt. Ugyanakkor a módszerekkel nem lett összekapcsolva, így nem is lett világos, milyen típusú kísérletekből, milyen mérésekből származnak. A 10. ábrából derengett, hogy in vivo (?) mintákon történtek az első mérések, de csak a 6. sor táján történt utalás a sertés és sejtizolációs eredetre...(50.o.). Nagyon jó lett volna a saját cikkekre való hivatkozás is az eredmény címénél is már, hogy a részleteknek utána lehessen nézni. Hasonlóan a 11C ábránál is sertés agyszöveten végzett immunfestésről van szó, de a módszereknél említésre se került, hogy sertés agy fixálva lett volna és nagyon lényeges lehet az agyterület (az agyszelet elnevezés nagyon-nagyon pongyola). Az 57. oldalon is jó lett volna megemlíteni, hogy sejtenyészetekből történtek a mérések.

Az eredmények interpretálása mértéktartó, lényegre szorítkozó (a helyenként túlzó bevezetés-szerű szövegektől eltekintve). A 3 összefoglaló ábra nagyban segítette a követhetőséget. Ugyanakkor több helyen kicsit bővebb, például a klinikai jelen helyzetre jobban kitérő interpretálás hasznos lett volna, ahelyett, hogy szinte szó szerint csak az eredményeknél szereplő következtetés került megismétlésre.

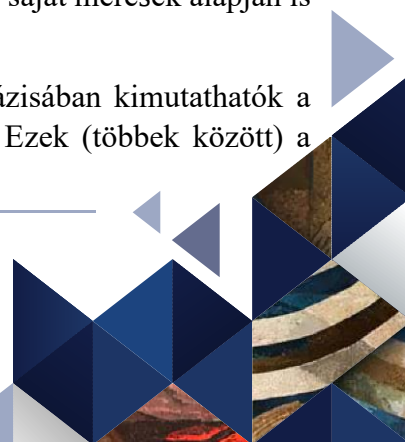
Az összefoglalás is bő lére sikeredett, inkább vázlatpontoszerűen kellett volna az eredményeket összefoglalni egy absztrakt terjedelmében. Ugyanakkor a klinikai relevancia hangsúlyozása, a további tervek felvázolása is jelzi, hogy egy folyamatosan aktív, fejlődő kutatóval állunk szemben.



## 6. A dolgozat tudományos értéke

A szerző publikációi és az akadémiai doktori értekezés alapján Dr. Wilhelm Imola munkásságának új eredményeiből a következőket emelném ki:

1. A vér-agy gát permeabilitás vonatkozásában megállapításra került, hogy:
  - a. A fehérállományban szorosabban zár a vér-agy gát, mint a szürkeállományban (bár itt még a regionális különbségek feltárása várat magára).
  - b. A PACAP patológiás körülmények között csökkenti a vér-agy gát permeabilitását, ami védő hatású lehet (bár a dolgozathoz nem derült ki, miért ezt a molekulát vizsgálták és a dolgozatban bemutatott eredmények se teljesen meggyőzők).
  - c. Sikertelen olyan gyógyszeranalógokat találni melyek - az eredeti molekula hatását megtartva - jobban átjutnak a vér-agy gáton, mint egy fájdalomcsillapító EM-2, mind egy NDMA antagonistá KYNÁ vonatkozásában.
2. Az inflammaszómák tekintetében igazolásra került, hogy
  - a. Humán agyi endotél sejtekben és pericitákban (in vitro, sejtenyészetekben)
    - A PRR rendszer és az inflammaszómák kialakulásához számos molekula rendelkezésre áll.
    - Míg az endotél sejtekben funkcióképes, IL 1 $\beta$  termelésre képes inflammaszómák számos úton (kannonikus és nem kanonikus) is aktiválódhatnak, addig a periciták csak a nem kanonikus úton (a kórokozók bekebelezése után, endogénen felszabadult anyagok révén) keresztül aktiválódnak.
    - Az endotél sejtek és a periciták egymás kölcsönös aktiválására képesek a vér-agy gát áteresztő képességének egyidejű befolyásolásával.
  - b. Egerek perifériás idegsérülését követően a motoneuronok magjában lehet inflammaszóma képződést kimutatni, mely hozzájárul a mikrogliazishoz, és gátolja a regenerációt. Ezáltal perifériás sérülések jó célpontjai lehetnek inflammaszóma gátlószereknek.
3. Az agyi metasztatizáció vonatkozásában
  - a. Emlőkarcinóma sejtekről:
    - Első lépés a tumorsejtek elakadása, mely (egérben vizsgálva) érösszehúzódást vált ki a tumorsejtek mindkét oldalán az endotél átrendeződéssel. Ez megakadályozza a tumorsejtek eltávolítását.
    - Az emlőkarcinóma sejtek elsősorban transzcellulárisan jutnak át a vér-agy gáton (mind sejtenyészeten, mind in vivo- két foton módszerrel vizsgálva)
    - In vitro, sejtenyészeten (egér és humán) a tumorsejtek a pericitákat „kedvelik” (extracelluláris mátrix fehérjék termelése?) míg az endotél sejteket jellemzően elkerülik. Periciták hatására a tumorsejtek gyorsabban kitapadnak és szaporodnak. Adatbáziskeresés és saját mérések alapján is az Igf2 lehet ezért felelős.
    - miRNS-ek kerültek azonosításra, melyek az agyi áttétképződés korai fázisában kimutathatók a vérből (egér modellben, csökkent szint: miR-802-5p és miR-194-5p). Ezek (többek között) a



MEF2C onkogénen keresztül lehetnek hatással a folyamatokra (targetpredikciós módszer alapján és kísérletesen igazolva)

-In vivo, egérmodellben a tumorsejtek az asztrocitákban inflammaszóma képződést indukálnak, ami hozzájárulhat a tumor progressziójához. Ez terápiás célpont is lehet.

b. Melanóma metasztázis:

-In vitro, sejtenyészeten, a vér-agy gáton paracellulárisan, a szoros kapcsolatok felbontásával jut át.

- In vitro a tumorsejtek kitapadásában és transzcelluláris migrációjában fontos számos szignalizációs útvonal (pl ROCK, CB2, NPNT) került azonosításra (az emlőkarcinóma sejtek vonatkozásában is), melyek terápiás célpontként is szóba kerülhetnek.

## 7. Kritikai megjegyzések

Értékeltem, hogy nem került megismétlésre az ábraalírásban a szövegben elhangzott rész, és az ábrák az aláírásukkal magában, a szöveg nélkül is érthetők. Ugyanakkor sok fontos részlet csak az ábraalírás átbogarászása után derült ki (például, milyen sejtípust használtak). Ezeket az információkat fontos lett volna a szövegbe is betenni (lásd alább).

23.o. 1.2.3. Valahogy az előző gondolathoz hozzá lehetett volna kötni, így a levegőben lóg.

23. o. Jó lett volna egy mondatban kifejteni a gyulladásos kaszpázok szerepét

-4. ábra a „hasítják az IL-1 $\beta$  citokint” számomra lebontásra utal (a szövegben máshol is, más molekulákkal kapcsolatban is), helyesebb lett volna vagy a kihatározza szó használata, vagy annak körülírása, hogy valamilyen prekursorát hasítják az aktiválásához. lásd 60.o. „pro-IL-1 $\beta$ ”

27.o. HER2 magyarázata

35.o. Hiányzik annak leszögezése, hogy a miRNS-ek is a DNS-ben kódoltak.

60.o. A „humán” szó hiányzott a sejtenyészet elől. Csak az ábraalírásból derült ki, hogy D3 sejtekről volt szó (humánról még itt sincs szó, a módszerekből kellett kikeresni). Hasonlóan 63.o. HBVP sejtek.

80.o. CB2 hirtelen jelenik meg, nem került a rövidítés bevezetésre és a kannabinoid rendszerről se történt korábban említés.

81.o. Honnan származik a humán minta? Mi volt a feldolgozás menete?

## 8. Választ igénylő kérdések és megjegyzések

11.o. A TEER fenntartásában a szoros kapcsolatok fontosak, de nem került megemlízésre, valójában mi hozza létre a membránpotenciál különbséget. Ki tudná ezt részletesebben fejteni?

16. o. “Az asztrociták ... közvetlen kapcsolatokat a végtalpak biztosítják, amelyek szinte teljes mértékben lefedik a vérerek külső felszínét, és szükség esetén gyorsan helyettesítődnek.” Kifejtené bővebben, mit érthetünk helyettesítés alatt?

1.1.6. A mikroglia térbeli viszonyát is érdekes lenne tudni a vér-agy gáthoz, azok sejtjeihez. Kialakul valamelyikkel közvetlen kapcsolat, vagy szignálmolekulák, diffúzió révén végzik a szabályozást?



Élettani Intézet

H-7624 Pécs, Szigeti út 12.,  
Grastyán Endre Oktatási Tömb 2.em.

OM Intézményi azonosító: FI58544

+36 (72) 536-000 /38500  
office.physiology@aok.pte.hu



17.o. Nagyon népszerű a neurológiai betegségek immunelmélete. Mi alapján lehet kijelenteni, hogy az agyban steril gyulladás van? Mi indukálja, hol kezdődik és mennyire terjed ki ez a gyulladás?

23. o. Mit értett a jelölt piroptózis alatt?

26.o. Elhiszem, hogy az inflammaszómák hozzájárulhatnak az öregedéshez, de mi lehet ennek a mechanizmusa, lépései?

50.o. A fehér és szürkeállomány vér-agy gátjának összehasonlítása érdekes kérdés. Ugyanakkor ezt sertésagyból származó sejtenyészetben vizsgálták (bár nagyon dicséretesen egy humán adatbankkal is össze lettek hasonlítva az eredmények). Mi indokolta sertések használatát? Mennyi ideig voltak tenyésztve és pontosan milyen sejteken (a módszereknél számos sejttípus került megnevezésre) került sor a nevezett kapcsolódó fehérjék vizsgálatára? Nem lehetséges, hogy a sejtenyészet létrehozása során az emésztési lépések a vizsgált molekulákra is jelentős hatással vannak? Szerintem célszerűbb lett volna frissen lefagyasztani fehér és szürkeállományt (pontosan melyik agyterület fehér és szürkeállományáról van szó? ez se biztos, hogy teljesen mindegy) és azt vizsgálni PCR-rel és Western blot-tal (sajnos az eredmények leírásból is csak találgatni lehet, mi volt a módszer, amivel mérték a mintákat).

57.o. A PRR-ek humán vizsgálata sejtenyészeteken történt. Kitérne a módszer limitációira? (pl. immortalizált, tumoros sejtek voltak-e a kiindulási tenyészetben)

A PCR vizsgálatok során az expressziót a GAPDH-hoz hasonlították. Tudna példát mondani a GAPDH változásra, amikor ez nem tekinthető igazán jó „kontrollnak”? (manapság 2-3 „housekeeping” gén használata javasolt). Mi lehetne alternatíva?

80.o. Mit lehet tudni a kannabinoid rendszer és a tumorképződés kapcsolatáról? Van általában a CB2 receptornak szerepe a sejtmigrációban fiziológián?

85.o. Mi a szerepe az Igf2-nek a tumorképződésben általában (mechanizmus?)? Hogy arányul ez az inzulin, vagy a GH/IGF1 szerepéhez?

97.o. A jelen dolgozatban az inflammaszómák funkcionális jelenlétét elsősorban IL1 $\beta$  termelés növekedésével követték. Ez mennyire általános? Mivel a vaszkuláris elemekben az IL1 $\beta$  emelkedés töredéke az egyéb agyi sejtekben létrejött aktivációnak, feltehetjük-e, hogy ez inkább parakrin szerepű? Lehet-e inflammaszóma aktiváció ezen citokin emelkedésének hiányában, illetve milyen más anyagok vizsgálata, milyen módszerekkel jöhetne szóba?

A dolgozatban felvetett számos biomarker és terápiás célpont közül valamelyik, vagy hasonló mechanizmusú anyag klinikai vizsgálatra került-e már.



## 8. Vélemény

Összefoglalva megállapítható, hogy egy nagyon értékes, izgalmas területen folytatott, nagyszabású kutatást a jelölt sikeresen foglalt össze egységes vezérfonal mentén. Ugyanakkor a doktori értekezés során mind az irodalom összekapcsolása a saját munkával, mind az eredmények összekapcsolása a módszerekkel és a megjelent cikkekkel nagyon hiányzott, a megértést nagyon nehezítette. Kétségtelen azonban, hogy a jelölt nagy alaposságra törekedett (lásd alig volt elütés, szép, informatív, egységes ábrák) és megpróbálta következetesen alkalmazni a magyar szaknyelvet is. Nem kétséges, hogy az elvégzett kutatómunka tudományos színvonala kielégíti a követelményeket, ami alapján az értekezés nyilvános vitára bocsájtását javaslom és a munkát érdemesnek tartom az MTA doktori cím elnyerésére.

Pécs, 2025.01.10.

*Zelena Dóra*

Prof Dr. Zelena Dóra  
MD, PhD, Med. Hab, DSc  
PTE ÁOK Élettani Intézet



Élettani Intézet

H-7624 Pécs, Szigeti út 12.,  
Grastyán Endre Oktatási Tömb 2.em.

OM Intézményi azonosító: FI58544

+36 (72) 536-000 /38500  
office.physiology@aok.pte.hu

