



SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Intézetigazgató
Dr. Alpár Alán
egyetemi tanár

Bírálat

Tamás Andrea doktori mű

Tamás Andrea a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai Intézetében végzi kutatómunkáját, több mint 20 éve foglalkozik a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) hatásainak vizsgálatával a HUN-REN (Magyar Kutatási Hálózat) – PTE PACAP kutatócsoport tagjaként. Kutatócsoportvezető, PhD hallgatói sikerrel védték meg értekezéseiket. A mű tartalmi bírálat alá eső része 240 oldal. Szerkezetét tekintve 20 oldalas bevezetést 15 oldalas részletezett célkitűzés követ, a módszertani leírás 50 oldal, melyet 80 oldal eredményleírás és 60 oldalas bőséges diszkusszió követ. A hivatkozások száma magas. A mű nagyszámú első- és utolsószerzős közleményen nyugszik. Tamás Andrea az Anatómiai Intézet docense, a kutatómunka mellett kiemelkedő oktatási tevékenységgel járul hozzá Magyarország orvoscépzéséhez.

A műben ismertetett eredmények tarka területekről származnak: várandósság, lactatio, fogfejlődés, hallórendszer, neurodegeneratív elváltozások, cardiovascularis betegségek, malignus elváltozások. Jelölt a PACAP biomarkerként való hasznosítása mellett is érvel. A mű vonala nem egységes - összekötő eleme a PACAP -, így inkább egy egyetlen molekula szerepére alapozott kitekintésként fogható fel, melyet számtalan értékes eredmény támaszt alá.

A bevezetőben a szerző röviden említi meg a PACAP szerkezetét, filogenetikai megőrzöttségét, aktív izoformáinak szerepét, receptorait. Ismerteti széleskörű előfordulását testünk csaknem valamennyi szervében. Ábrákkal is illusztrálja a molekula hatását közvetítő legfontosabb sejten belüli jelátviteli útvonalakat, melyek végső soron a sejt védelmét szolgálják. Bevezeti a traszgenikus egérmodellt (PACAP KO), melyet munkájában visszatérően használ. Innentől szakaszokban ismerteti a PACAP előfordulását egymástól független területeken és rendszerekben, ezen alfejezetek között a kohézió csekély. Így rátér a hallórendszerben való változatos előfordulására és ottani eddig ismert szerepére, majd a fogfejlődésben betöltött szerepére, ezután a várandóssággal és lactatioval kapcsolatos ismeretek sorakoznak, ezt követi a neurodegeneratios, politraumatizált és cardiovascularis és rosszindulatú daganatban szenvedő betegekkel kapcsolatos megfigyelések. Ezek a leírások több olyan részt is tartalmaznak, melyekben bíráló nem lát közvetlen kapcsolatot a PACAP szerepével kapcsolatban. Az irodalmi utalásoknál többször általánosan íródhatnak fontos kijelentések, melyeket lehet, hogy korábban igazoltak, de arra az olvasó nem talál bizonyítékot, magyarázatot a szövegben. A bevezetésben több korábbi eredményt is feltüntet (pl. a neurodegeneratív elváltozásokkal kapcsolatban), ami szépen vezeti fel a doktori műben ismertetett eredményeket, azok kapcsolódását egy korábbi iskola értékes kutatómunkájához.

A Célkitűzésekben hét pontot nevez meg, mely a bevezetőben ismertetett hét különböző területet vizsgál. Egyes rendszerekben (hallórendszer, fogfejlődés, Parkinson-kór) hatást és szerepet nevez meg, más esetekben (cardiovascularis, politraumatizált és malignus megbetegedések) plazma- és szöveti szint mérésre szorítkozik. A Célkitűzések fejezetben további alfejezeteket jelenít meg,

Cím: 1094 Budapest, Tűzoltó utca 58.

Postacím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.

E-mail: titkarsag.ana@med.semmelweis-univ.hu

Tel.: (06-1) 459-1500/53600

semmelweis.hu/anatomia





SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Intézetigazgató

Dr. Alpár Alán
egyetemi tanár

melyek segítik az áttekinthetőséget, átvezetnek a módszertani fejezetbe.

A Módszerek fejezet megfelelő részletességgel tárgyalja az alkalmazott metódusokat, több esetben hasznos fotóanyag segítségével. Nagyszámú igényes módszert alkalmaz, melyben a finompreparálás, a speciális mikroszkópia (Raman mikroszkópia), *in vitro* sejt- és szövettenyésztési kísérletek, microCT, radio-immuno assay (RIA), emberi és állati tej-, vér- és szövetmintavételek, valamint a puhatestűek magatartásvizsgálata is helyet kap. A sok szép immunhisztokémiai festés mellett tömegspektrometria, Luminex immuno-assay és ELISA vizsgálatokat alkalmaz.

Az Eredmények fejezet jó ábraminőségben, szép illusztrációkkal taglalja a kutatómunka eredményeit. *In vitro* vizsgálataiban megállapítja, hogy a PACAP kezelés csökkenti az oxidatív stressz-indukálta sejtkárosodás mértékét, mely mögött a caspase-3 mediálta útvonalat azonosítja. *In vivo* többszörös különbséget mutat ki kalciumkötő fehérjék expressziójában PACAP KO állatok cochlea szőrsejtjeiben, melyet kanamicin kezelés – szemben a vad típusú állatokkal találtakkal – nem fokoz tovább. PACAP KO állatban hang hatására a hallópálya különböző állomásain vizsgálja meg a neuronok aktivációját, megállapítja, hogy mind a cochleában, mind az agytörzsi cochlearis magokban a c-fos pozitivitást mutató sejtek számának emelkedése elmarad a vad típusú állatokban találtaktól. A hallópálya további állomásain – így az oliva superiorban és a colliculus inferiorban már nem talál eltérést genotípus szerint.

A fogak vizsgálata során néhány fog esetén azonosít morfológiai eltérést (vékonyabb dentint), eltérést talál a dentin szeretlen (de nem szerves) anyag tartalmában, a zománc esetében ez ellentétesen alakul. A változások mögött a fejlődés folyamán aktív jelátviteli útvonalak aktivitásában is azonosít különbséget. A megváltozott fogfejlődést felnőtt PACAP KO állatban megváltozott morfológiához: kisebb fogakhoz és csökkent dentinsűrűséghez, megváltozott mineralitáshoz vezet.

A várandósság és lactatio alatti PACAP szintek vizsgálatához saját RIA módszert dolgozott ki. Megállapítja, hogy nőkben a PACAP plazma szintje kortól, ciklustól és egyéntől független, szoptatásban azonban mind a vérben, különösen pedig a tejben- még inkább a colostrumban - többszörösére emelkedik a PACAP-38 LI szint. Kimutatja, hogy emlő mirigyszövetében (birka) a PAC1 receptor expressziója nő. További rövid megállapításokat tesz a méhlepénnyel és a magzati vérben található PACAP szintekkel kapcsolatban.

A Parkinson-modellekkel kapcsolatban csigában megállapítja, hogy rotenon kezelésben a PACAP javítja a csiga túlélését, a túlélte egyedekben pedig a mozgást és a táplálkozást, melynek hátterében a megváltozott biogén aminerg szinteket – dopamin és szerotonin – gyanítja (ok-okozati megállapítást nem tesz). Patkányban már ezen gondolat mentén vizsgálódik, megállapítja, hogy a csigához hasonlóan a PACAP kezelés a rotenon okozta dopamin szint csökkentést javítja, a szerotonin szint csökkenést tovább rontja a substantia nigrában, a PARK7 szintje ugyanakkor eltérően alakul. Magatartásvizsgálatokat végez patkányban, kimutatja, hogy a 6-OHDA kezelés többféle mozgásmintát ront, ezekből többet az ingergazdag környezet megmenteni képes. Az elváltozások mögött a sejtpusztulás és a csökkenő dopaminszint elmaradását feltételezi a

Cím: 1094 Budapest, Tűzoltó utca 58.

Postacím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.

E-mail: titkarsag.ana@med.semmelweis-univ.hu

Tel.: (06-1) 459-1500/53600

semmelweis.hu/anatomia





SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Intézetigazgató

Dr. Alpár Alán
egyetemi tanár

substantia nigrában, melyet a megemelkedett PARK7 fehérje szintjében is igazoltnak lát. A Parkinson-kór témakörébe tartozó eredményeinek utolsó fejezetében betegek vizsgáldik. Megállapítja, hogy *i*) mély agyi stimuláció a PACAP szérumszintjét növeli; *ii*) a Hoehn-Yahr skála által meghatározott, előrehaladott stádiumú betegekben valamint az életkorral annak szintje csökken; *iii*) társbetegségek azt nem befolyásolják. A PACAP szintek változását más – a Parkinson-kórt vizsgáló – tesztek alapján is vizsgálja, hasonló eredményre jut.

Röviden közöl adatokat politraumatizált állapotokkal kapcsolatban, ahol a PACAP/CRP és PACAP/LAR szérumszintjeinek szimultán változásai mellett érvel.

A szívben/cardiovascularis rendszerben tett megfigyeléseiben megállapítja, hogy sertés bal kamrájában számottevő mennyiségű PACAP található, melynek mennyisége infarktusból – különösen a nem ischaemias területen – csökken, majd reperfüzió után ismét növekszik. Emberben is vizsgál infarktus utáni vér PACAP szinteket, ahol – a sertésből nyert szöveti eredményekkel bíráló szerint nem összevethető – eredményeket rögzít, további megfigyeléseket tesz szívelégtelenségben szenvedőkben.

Végül rosszindulatú daganatos megbetegedésekben tesz megfigyeléseket a PACAP mennyiségével kapcsolatban, különböző daganattípusokban különböző eredményre jut, legtöbb esetben csökkenésről számol be. Értékes eredmény, hogy több daganattípusnál a PACAP szint a remisszióval és a teljes túlélési idővel változik.

A mű számtalan értékes megfigyelést tartalmaz, mely diagnosztikai jelként is hasznosítható lehet. A kutatások ugyanakkor legtöbbször nem vizsgáltak ok-okozati sejt szintű folyamatokat, így csak korlátozva kerültünk közelebb a PACAP hatásmechanizmusának megértéséhez. A diszkusszióban bőségesen találunk adatot a PACAP fehérjével kapcsolatos jelátviteli útvonalakra, mely magyarázhatja a molekula (védő?) szerepét a különböző kóros állapotokban.

Kérdések, megjegyzések:

Bevezető

17. oldal: kéttucat irodalmi hivatkozást illeszteni egyetlen mondat után nem informatív.

24. oldal: a kalcium-kötő fehérjék, különösen is a kalcium-puffer fehérjék emelkedett kalcium szinttel való összefüggése, védelmi szerepe rendkívül kérdéses; több ipari támogatással készült (pl. Bayer) kutatás feneklett meg, melyek nagy reményt fűztek ezen pufferfehérjék szerepéhez, célfehérjeként való alkalmazásához (egyes tanulmányok egyenesen a pufferfehérjét tartalmazó idegsejtek nagyobb sérülékenységét írták le). Mire gondol, amikor Hackney 2005-ben szerzett munkáját idézi, milyen bizonyítékokat ismertet?

27. oldal: „PACAP pozitív idegrostokszáma és a PAC1 receptor expressziója is emelkedik a ligamentum parodontaléban luxációt követően patkányban, így feltételezhetően fontos szerepe lehet a luxációt követő regenerációs folyamatok szabályozásában.” Ennek mechanizmusát bizonyították, vagy csak feltételezés?

Cím: 1094 Budapest, Tűzoltó utca 58.

Postacím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.

E-mail: titkarsag.ana@med.semmelweis-univ.hu

Tel.: (06-1) 459-1500/53600

semmelweis.hu/anatomia





SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Intézetigazgató

Dr. Alpár Alán
egyetemi tanár

29. oldal: „A PACAP mindhárom receptorát, így a VPAC1, VPAC2 és a PAC1 receptort is kimutatták emberben normál és tumoros emlőmirigy mintákban (García-Fernández et al. 2004; Moody és Gozes 2007), amely azt feltételezi, hogy a PACAP-nak az emlőmirigy fiziológiás működésének szabályozása mellett fontos szerepe lehet a tumorgenesisben is.” Nem látok ok-okozati viszonyt. Milyen bizonyítékot, mechanizmust mutattak arra nézve, hogy a PACAP daganatképző hatású lehet?

37. oldal: Mi az oka annak, hogy a PACAP a különböző típusú rosszindulatú betegségekre eltérő módon hat (serkent vagy gátol)?

Célkitűzések

Általában: azoknál a témaköröknél, ahol a PACAP mennyiségét méri, milyen lehetőségeket lát a terápiás beavatkozásokkal kapcsolatban; mennyiben segíti a molekuláris mechanizmusok azonosítását?

41. oldal: „... de a protektív hatás hátterében álló pontos molekuláris biológia útvonalak még nem ismertek. Emellett a Parkinson-kóros betegek széleskörű klinikai vizsgálatával sem foglalkozott még egy kutatócsoport sem” Előbbivel kapcsolatban sikerült eredményt felmutatni, vagy más munkacsoport jelentetett meg eredményeket sejtszintű mechanizmussal kapcsolatban?

46. oldal: Az *in vitro* kísérletekben mi alapján határozták meg a PACAP koncentrációját? (Miért 100nM?)

49. oldal: „A képeket a Spot Basic Programmal készítettük és Adobe Photoshop 7.0 segítségével analizáltuk.” A Photoshop programmal milyen analízis történt? (Ez a program nem analízis program).

52. oldal: „Nissl-festés analízise során azon sejteket vettük számításba, amelyeket nucleolusok alapján egyértelműen idegsejtként lehetett definiálni.” A kariometriai analízisek – melyek jelenleg alkalmazottaknál összetettebbek (értsd: egymást követő metszeteken történő különbségek összehasonlítása, stereologia, Abercrombie-módszer, stb.) - csak az idegsejtekre korlátozódnak? Gliasejtek az analízisből a magvacska megléte/nem megléte esetén valóban kizárható? Idegsejt nem lehet olyan sejt, melynek éppen az adott metszeten éppen nem látszik a magvacskája?

60. oldal: a Saint Maire fixáló oldat a leírás szerint 99%-os etilalkoholt tartalmaz. Hogyan kell ezután értelmezni/miért kell ezután felszálló alkoholsort alkalmazni?

73. oldal: Mit tud a PARK7/DJ-1 fehérje filogenetikai megőrzöttségéről? A puhatestűekben azonos az emberben találttal? Vizsgálható az emlősökben/emberben alkalmazott reagensekkel?

100. oldal: „Vad típusú és homozigóta PACAP-génkiütött egerek cochleájának morfológiai összehasonlítása során a hematoxin-eozinnal festett metszeteken nem találtunk szignifikáns eltérést” Ez minőségi megállapítást jelent? Ha igen, a szignifikáns jelző nem értelmezhető.

108. oldal: Mi lehet a magyarázata annak, hogy hang hatására a sejtaktiváció számossága csak a hallópálya első szakaszán marad el PACAP KO állatokban? Milyen eredményt várna a hallókéregben?

110. oldal: A jelölt két KIT-et használ, hogy egér ductus cochlearisból készült homogenizátumok fehérjeösszetételét megvizsgálja; nem talál különbséget. Milyen fehérjéket/típusú fehérjéket

Cím: 1094 Budapest, Tűzoltó utca 58.

Postacím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.

E-mail: titkarsag.ana@med.semmelweis-univ.hu

Tel.: (06-1) 459-1500/53600

semmelweis.hu/anatomia





SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Intézetigazgató
Dr. Alpár Alán
egyetemi tanár

tekintve várt változást PACAP KO egerekben? Lefedte az alkalmazott vizsgálat 93 fehérjéje ezeket a várakozásokat; nem kapott fals negatív eredményt a következtetést tekintve (nincs különbség)?

113. oldal: Hogyan értelmezi azt az eredményét, hogy az alaphelyzetben is magas kalciumkötő fehérje expresszió a homozigóta PACAP-génkiütött egerekben kanamicin kezelés hatására nem emelkedett tovább?

116. oldal: Mi lehet az oka annak, hogy PACAP KO egerekben a zománc és a dentin szeretlen és szerves anyag változásai ellentétesen alakulnak?

118. oldal: A Notch receptorokat vizsgálva a 2-es típus esetében talál különbséget PACAP KO állatokban a fogfejlődés folyamán. Különbözik valamiben/mi jellemzi a Notch2 receptor mediaalta jelátviteli útvonalat a másik három típussal szemben? Le lehet vonni következtetést?

128. oldal: Mi a jelentősége a méhlepényben és a magzati vérben található PACAP szint változásoknak?

130. oldal: Mitől pusztultak el a rotenonnal kezelt csigák? Hogyan akadályozta ezt meg a PACAP kezelés?

134. oldal: Mit jelent, mi a következménye annak, hogy a rotenon kezelés okozta dopamin és szerotonin szint változásokat a PACAP eltérő módon befolyásolja? Miért történik ez a kettősség?

136. oldal: A IV.4.2.2. ábra üzenete, hogy a 6-OHDA kezelt oldali sejtszámcsökkenést az ingergazdag környezet megmenteni képes. A meglévő statisztikai különbség mögött csekély abszolútérték különbség van; mennyire lehet jelentős ez biológiailag? Akár a kevesebb sejt is lehet hatásosabb, ha a szinaptikus működése fokozódik a célterületen. Vannak (akár mástól korábbi) eredmények ezzel kapcsolatban?

141-144. oldal: Mit okoz vagy tükröz a PACAP szintjének csökkenése? Milyen sejtekben, milyen jelátviteli folyamatokban milyen működéseket befolyásolhat? Állnak eredmények vagy más adatok rendelkezésre (saját vagy más munkacsoport)?

149. oldal: Mi a funkcionális és diagnosztikai jelentősége annak, hogy politraumatizált betegekben a PACAP/CRP és PACAP/LAR szintjei szimultán változnak?

151. oldal: Miért csökken a PACAP szint a nem ischaemias infarktuszövetében (miközben az ischaemias területen nem változik), mit jelent ez az elváltozás?

150-151. oldal: Sertésben szívüregi, emberben vénás vérben mér eltérő PACAP szint változásokat. Mennyire összevethetőek ezek az eredmények?

120-150. oldal: A számtalan különböző kísérletben, ahol plazma PACAP szintet mér, mi lehet a PACAP forrása? A megbetegedett szerv, vagy valamilyen központi aktiválódott (idegrendszeri vagy immunrendszeri) mechanizmus felelős a különböző előjelű változásokért?

183. oldal: „Ismert, hogy a PACAP képes indukálni saját receptorának expresszióját, és feltételezhető, hogy az endogén PACAP hiányából adódóan a PAC1 receptor-mediálta útvonalak is háttérbe szorulhatnak.” Ismert a PAC1 receptornak más endogén ligandja? Ez befolyásolhatja az expressziót és jelátvitelt PACAP hiánya esetén is.

198. oldal: „Az emberi tejminták mellett széles körben vizsgálják a különböző növekedési faktorok

Cím: 1094 Budapest, Tűzoltó utca 58.

Postacím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.

E-mail: titkarsag.ana@med.semmelweis-univ.hu

Tel.: (06-1) 459-1500/53600

semmelweis.hu/anatomia





SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Intézetigazgató

Dr. Alpár Alán
egyetemi tanár

és hormonok jelenlétét háziállatok (sertés, szarvasmarha, kecske, birka) tejmintáiban is, ugyanis ezen eredmények mind táplálkozástudományi, mind agrártudományi szempontból nagy jelentőséggel bírnak.” Mi történik a PACAP-bal a bélben, miután a tejet elfogyasztjuk? Mint egész peptid felvételre kerül? Emésztési folyamatokat irányít a chymusban? Túléli a gyomor pepsin emésztését?

A doktori mű eredményeire támaszkodva alábbi megállapításokat fogadom el új megfigyelésként:

1. PACAP KO állatokban a hanginger csökkent aktivációt okoz a hallópálya kezdeti szakaszán.
2. PACAP KO állatok fogszerkezete megváltozik, mely a dentin és zománc állomány mennyiségi és minőségi összetételét is érinti.
3. Várandós és szoptatós édesanyákban a plazma PACAP szintje megemelkedik, a tejmintákban a PACAP szintje a plazmaszint többszöröse.
4. Parkinson-állatmodellben a PACAP gátolja a kísérletes károsodás okozta dopaminszint csökkenést és a motoros tünetek kialakulását. Emberben kezeletlen betegségben a PACAP szintje csökken, kezelt betegekben az egészségeshez hasonló.
5. Kísérletes infarktuszban (sertés) a nem ischeamias területen a PACAP szöveti szintje csökken. Emberben akut infarktuszban és szívelégtelenségben a plazma PACAP szintje növekszik, míg cardyomyopathiában csökken.

Összefoglalva, a mű a PACAP fehérje szerepét több rendszerben tárgyaló, biomarkerként történő alkalmazását előrevetítő értékes munka. A doktori mű, és az annak alapját képező kutatómunka megfelel az MTA doktora fokozat megszerzéséhez szükséges szakmai feltételeknek. Az ismertett tudományos eredmények alapján javaslom a nyilvános vita kitűzését. Sikeres nyilvános vita után Tamás Andrea részére az MTA Doktora tudományos cím odaítélését javaslom.

Kelt Budapesten, 2025. február 11-én

Dr. Alpár Alán
egyetemi tanár, az MTA doktora