

Vélemény
Dr. Tamás Andrea
A hypophysis adenylate-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) vizsgálata állatkísérletes
modellekben és klinikai kórképekben
című
MTA doktori értekezéséről

Az értekezés 227 oldal szöveges részből és az ezt követő 78 oldalas irodalom jegyzékből áll. Az egyéb kiegészítő részekkel együtt az értekezés teljes terjedelme 328 oldal.

Az értekezés a terjedelméhez képest egy nagyon rövid, négy és fél oldalas általános bevezetéssel kezdődik, amiben a pályázó a PACAP általános hatásairól, izoformáiról, receptorairól, intracelluláris jelátviteli útvonalairól és PACAP génkiütött egerekről ír. Ezt követően, a szokatlanul nagyon széles kutatási spektrumnak megfelelően további hét részre tagolódik, amelyekben pályázó tárgyalja a PACAP és egyes esetekben a PAC1 receptor mennyiségi viszonyait, illetve a PACAP koncentrációjában talált változások korrelációit különböző szöveti paraméterekkel és klinikai mérési adatokkal 1) a belső fülben és a hallórendszer központi idegrendszeri magjaiban, 2) a fogsíra különböző szöveti elemeiben a fogfejlődés során, 3) az anyatejben, a vérben és az emlőmirigy szöveti állományában a várandósság és a laktáció során, 4) Parkinson kóros betegek vérében és kísérletesen kiváltott Parkinson kórban csigákban és patkányok substantia nigra-jában, 5) politraumatizált betegek vérében, 6) különböző cardiovascularis betegségekben szenvedő betegek vérében, illetve kísérletesen kiváltott myocardialis infarctus esetén a kísérletes állatok szívizom mintáiban, 7) malignus betegségekben (vesetumor, húgyhólyag tumor, prosztata tumor, myeloma multiplex) szenvedő betegek szöveti mintáiban és vérében. Ennek megfelelően hét részre tagolódik a bevezetés, az anyagok és módszerek fejezet, az eredmények és a diszkusszió egyaránt úgy, hogy az egyes tematikus részek között, kivéve, hogy mindegyikben a PACAP mennyiségi vizsgálatáról van szó, semmiféle kapcsolatot nem keres a pályázó. A „mi” és a „mennyi” kérdéseken túl, amiknek a megválaszolása az értekezés egyértelmű ambíciója, „miért” és „hogyan” típusú kérdéseket a pályázó egyáltalán nem tesz fel ebben az értekezésben. Az értekezés így egy nagyon extenzív deskriptív munkának tekinthető.

Véleményem további részében először a nagyon rövid általános bevezetőről, majd a hét tematikus blokkról fogom az észrevételeimet összefoglalni.

Általános bevezető. Pályázó a PACAP előfordulásával kapcsolatban megemlíti, hogy az „legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben és az endokrin mirigyekben detektálható”. Az azonban nem derül ki, hogy az idegrendszer milyen részeiről és milyen endokrin mirigyekről van szó. Az értekezésben leírt, a PACAP mennyiségére vonatkozó mérési adatok értelmezéséhez egyébként is fontos lenne tudni, hogy a PACAP-ot milyen szervek, milyen sejttei termelik és ürítik az extracelluláris térbe, a vérbe, vagy az anyatejbe. Kétségtelen, hogy az értekezés későbbi fejezeteiben történik említés egyes PACAP-ot tartalmazó és valószínűleg termelő sejtekről, de az olvasó orientálásában sokat segített volna, ha a pályázó adott volna egy áttekintő képet ezekről a sejtszervekről a bevezetőben.

Nem derül ki a szövegből, hogy mi a viszony a PACAP két izoformájának (PACAP38 és PACAP27) a szintézise között. Két külön génről íródnak át, vagy csak egy PACAP gén létezik, amelyről a PACAP38 íródik át, és a PACAP 27 a PACAP38 poszttranszlációs módosításával keletkezik? Ezt azért lett volna jó az értekezésben tisztázni, hogy tudjuk, a PACAP génkiütött állatokban a PACAP mindkét izoformája, vagy csak az egyik hiányzik.

Ahogy az értekezésben olvasható a PACAP izoformák nagyfokú homológiát mutatnak a vasoaktiv intestinalis polipeptid (VIP) aminosav szekvenciájával. Ráadásul a

PACAP 38 három receptora közül (PAC1, VPAC1 és VPAC2) kettő (VPAC1 és VPAC2) a VIP-et is köti. A PAC1, ami a PACAP 38 specifikus receptorának tekinthető, Gs és Gq fehérjékhez kötődve és azok aktiválásával indít el intracelluláris jelátviteli folyamatokat. Azonban a VPAC1 és VPAC2 receptorok, amelyek Gs fehérjékhez kötődnek, aktiválása is részben hasonló intracelluláris jelátviteli folyamatokat indít el. Mindezeknek az ismeretében nem lett volna ajánlatos a PACAP-pal egyidejűleg a VIP koncentrációkat, és a VPAC1 és VPAC2 receptor expressziós mintázatokat is vizsgálni a különböző kísérletes modellekben, és különös tekintettel a PACAP génkiütött állatokban?

Hallórendszer. A hallórendszerre vonatkozó vizsgálatokat csirkéken és egereken végezték. Valami oknál fogva azonban a különböző vizsgálatokat különböző korú állatokon végezték el. Azokat a cochlearis sejt kultúrákat, amelyekben vizsgálták az oxidatív stressz hatását a ductus cochlearis sejtjein 1 napos csirkéből készítették. A PAC1 receptor expressziót és a kanamicin ototoxikus hatását 5 napos egereken vizsgálták. A hangingerek által kiváltott c-Fos expressziót 1,5 hónapos egereken nézték. A cochlearis magokban található sejtek számát 4 hónapos egerekben számolták. A PAC1 receptor expresszióját újra vizsgálták 2 hónapos egereken. Végül, 3-6 hónapos egerek ductus cochlearisából készített homogenizátumokban vizsgálták a ductus cochlearis fehérje összetételét. Mi indokolta az egyes vizsgálatok különböző korú állatokon való elvégzését? Másrészt, a különböző korú állatokon elvégzett kísérletekből kapott eredményeket hogyan lehetett egymással összevetni, és azokból valamilyen egységes következtetést levonni a PACAP-nak a hallórendszer működésében betöltött szerepét illetően?

A 49. oldalon található immunhisztokémiai protokollal valami nincs rendben. Az értekezésben az olvasható, hogy „az alkalmazott primer antitestek: PAC1 receptor antitest (anti-nyúl), calretinin (anti-egér), calbindin (anti-egér), parvalbumin (anti-egér)”. Majd később: „másnap a metszeteket Alexa Fluor 568 és 488 másodlagos antitestekkel inkubáltuk”. Hogyan kell mindezt érteni?

Itt és máshol is számos primer antitestet használt a pályázó. Hogyan ellenőrizték az egyes primer antitestek specificitását a különböző kísérletes modellekben?

Nincs leírás az értekezésben arra vonatkozólag, hogy az immunfestett metszeten az immunfestés intenzitásának mérését hogyan standardizálták, és tették az egyes mérési adatokat összehasonlíthatóvá. Ezt a hiányosságot még nyilvánvalóbbá teszi az 51. oldalon található leírás miszerint „a látótér szélének egyenetlen megvilágosításának korrigálását és a képeken található műtermékek eltávolítását Photoshop programmal végeztük”. Biztos a pályázó abban, hogy az immunhisztokémiai reakciók intenzitásának mérési adatai objektívek, standardizáltak és összehasonlíthatóak egymással?

A mért kísérletes adatokat itt és máshol is elsősorban oszlopdiagrammokon mutatja be a pályázó, a legtöbb esetben úgy, hogy a kontroll értéket 100 %-nak veszi. Így az olvasó nem kap közvetlen képet az egyes mért adatokról, ami nehezíti az eredmények értékelését. Szerencsésebb lett volna, ha a pályázó a mért adatok ábrázolására konzekvensen a box-plot diagramm ábrázolási módot választja, amiben feltünteti az eredeti mérési pontokat is. Sajnos a box-plot ábrázolási mód csak egy-két esetben jelenik meg az értekezésben.

A kalcium-kötő fehérjék immunhisztokémiai kimutatását jobb lett volna kihagyni az értekezésből. Ezek az adatok nem adnak semmi újat a PACAP és PAC1 expressziós vizsgálatokhoz, ráadásul az immunfestések meglehetősen aspecifikusnak tűnnek. A sejtmentes membrana tectoria például sokkal erősebb festődést mutat, mint a Corti szerv sejtjei. Hogyan magyarázza ezt a pályázó?

A PAC1 receptor expresszióját vizsgálva a hallópálya különböző magvaiban, azt találták, hogy a PACAP KO egerekben a PAC1 receptor expressziója csökkent a nucleus cochlearis dorsalisban és ventralisban, a többi magban az expressziós szint megegyezett a vad

típusú állatok expressziós szintjével. Hogyan magyarázza ezt a pályázó? Miért nem tűnik el a PACAP specifikus receptora azokban az állatokban, amelyek nem termelnek PACAP-ot?

A diszkusszió leginkább az eredmények megismérlésének és egy irodalmi áttekintésnek az ötvözete. A PACAP-nak a hallórendszerben beöltött szerepére vonatkozóan csak feltételezésekig jut a pályázó. Ezért itt és a többi alfejezetben is tanácsos lett volna a diszkussziót lényegesen rövidebbre fogni.

Fogfejlődés. A fogfejlődésre vonatkozó vizsgálatokat PACAP génkiütött és vad típusú 5 és 7 napos egerek fejlődő molaris és 1 éves egerek folyamatosan növekvő metszőfogain végezték.

Ahogy a bevezetőben olvasható, a fejlődő fogban a fogpulpában levő idegrostokban, az odontoblastokban és a fogpulpa subodontoblastikus sejtjeiben lehet PACAP pozitivitást kimutatni, azaz a PACAP valószínűleg ezekből a szöveti elemekből szabadulhat fel, és kötődhet a pulpa subodontoblastikus sejtjei által expresszált PAC1 receptorokhoz. Az eredmények pedig azt mutatják, hogy a PACAP KO egerekben vékonyabb dentin vastagságot mértek és elváltozásokat találtak a dentin szeretlen anyag összetételében is. Emelkedett a sonic hedgehog expressziója a szekretoros ameloblastokban és a stratum intermediumban. A szekretoros ameloblastokban emelkedett a Notch jelátviteli útvonal egyes molekuláinak az expressziója is. Mit gondol a pályázó, hogyan hathat a PACAP a dentin és a zománc képződésére, ha PAC1 receptorokat csak a pulpa subodontoblastikus sejtjein sikerült kimutatni?

Valószínű, hogy az odontoblastokból és a subodontoblastikus mesenchymából felszabaduló PACAP a subodontoblastikus expresszáldó PAC1 receptorokon keresztül befolyásolhatja a fogpulpa érését. Ezért az is valószínűsíthető, hogy a PACAP KO állatokban a fogpulpa beszűküléséhez a PACAP hiánya is hozzájárulhat. Ennek a jelenségnek a molekuláris hátterét jó lett volna jobban megvizsgálni az értekezésben.

Várandósság, laktáció. Az értekezésnek ebben a részében vér és anyatej mintákban vizsgálták a PACAP koncentrációt várandós és szült nőkben a terhesség során és a szülést követően. Vizsgálták továbbá a PACAP jelenlétét placenta mintákban, illetve a PAC1 receptor expresszióját juhokból gyűjtött és emberi emlőmirigy mintákban.

Azt találták, hogy a terhesség alatt az anyai vér PACAP szintje nő, szüléskor leesik, majd újra visszaemelkedik a terhesség előtti szintre. Jelentős koncentrációban tudták kimutatni a PACAP-ot újszülöttek vérében is. Ugyanakkor a PACAP szintjét lényegesen alacsonyabbnak mérték az umbilicalis erekben, mint az újszülöttek perifériás vérében. Mi okozza ezeket a változásokat a vérben mérhető PACAP koncentrációkban? Milyen sejtek ürítik a PACAP-ot a vérbe és ezekre hogyan hat a terhesség előmenetele, az anyában és a magzatban? Mi magyarázza azt, hogy az újszülöttek perifériás vérében lényegesen magasabb PACAP koncentrációt lehetett mérni, mint az umbilicalis erekben, különösen a vena umbilicalisban?

A 201. oldalon pályázó azt írja, hogy az anyatejben kimutatható PACAP származhat az emlőmirigy sejtjeiből, a tejben található különböző sejtkekből vagy az anyai szérumból. Az értekezésben szereplő irodalmi hivatkozások alapján, valóban elképzelhető, hogy az emlőmirigy sejtjei termelnek PACAP-ot, amit az anyatejbe üríthetnek. A másik két valószínűsített lehetőség azonban további magyarázatot igényelt volna. Milyen sejtek vannak az anyatejben, és azok közül melyek termelhetnek PACAP-ot? Mi az a mechanizmus, amelynek a segítségével az anyai vérben keringő PACAP az anyatejbe kerülhet?

Ahogy a pályázó írja az értekezésben a PACAP féléletideje a vérben néhány perc. Mennyi a PACAP féléletideje az anyatejben? Az újszülött emésztő rendszerébe kerülő

PACAP-nak körülbelül hány százaléka szívódik fel, és mennyi a PACAP félétideje az újszülöttek vérében?

Parkinson kór. Az értekezésnek ebben a részében rotenont tartalmazó vízben tartott csigák mozgási és táplálkozási deficitjeit, illetve dopamin és szerotonin szintjeit vizsgálták, illetve azt, hogy az állatok testüregébe injektált PACAP milyen mértékben védi ki a rotenon hatásait. Elsődleges kérdésként merül fel ezzel a kísérlet sorozattal kapcsolatban az, hogy a rotenon kezelés tekinthető -e a gerinctelenek Parkinson kór modelljének? A rotenon ugyanis nem csak a mozgási mintázatok kialakításában résztvevő dopaminerg sejteket pusztítja el, hanem az összeset, ráadásul az állatok szerotonin szintje is jelentősen csökkent a kezelés hatására. Valószínűleg ennek, és az esetlegesen egyidejűleg jelentkező más jellegű degeneratív folyamatoknak köszönhetően, az állatok egy része már a kezelés 2.-3. napján elpusztult és a kezelés 12. napját egyikük sem élte túl. Kétségtelen ugyanakkor, hogy a PACAP kezelés ezt a komplex degeneratív folyamatot valamelyest lelassította.

Egy másik állatmodellben 6-hidroxidopamint (6-OHDA) injektáltak 3 hónapos patkányok egyik oldali substantia nigra-jába. A kezelés után különböző túlélési időket követően az állatokból eltávolították mindkét oldali substantia nigra-t, majd az eltávolított szövetmintákban mérték a dopamin koncentrációt. Azt találták, hogy a nem kezelt oldalhoz viszonyítva a kezelést követő hetedik napra a kezelt oldali substantia nigra-ban a dopamin szint kb. a felére csökkent, ezt követően nem csökkent tovább. Ezt a csökkenést mérsékelte a 6-OHDA kezelés előtt a substantia nigra-ba injektált PACAP.

A substantia nigra szövetmintákban mérték a szerotonin koncentrációját is. Azt találták, hogy a szerotonin szint is jelentősen csökkent, de a szerotonin szint csökkenését nem mérsékelte a 6-OHDA kezelés előtt alkalmazott PACAP injekció. Hogyan magyarázza pályázó ezt a jelenséget? Mi okozta a 6-OHDA kezelés utáni szerotonin szint csökkenését a substantia nigra-ban, és ezt a csökkenést miért nem mérsékelte a PACAP?

A 6-OHDA kezelést elvégezték olyan állatokon is, amelyeket ingergazdag környezetben neveltek fel. Miután mérték az állatok különböző mozgási mintázatait arra a következtetésre jutottak, hogy az ingergazdag környezet protektív hatású a Parkinson-kór motoros tüneteinek kialakulásának tekintetében. Mivel magyarázza pályázó ezt a protektív hatást?

Mérték a PACAP szintjét Parkinson-kóros betegekben és korrelációt kerestek a vérben mérhető PACAP koncentráció és különböző kezelési stratégiák, illetve a betegség súlyosságát jelző különböző klinikai vizsgálatok eredményei között. Az egyes korrelációs vizsgálatok eredményei nagyon változatos képet mutattak. Milyen következtetéseket lehet levonni ezekből a vizsgálatokból a PACAP vérben mért koncentrációja és a Parkinson kór kialakulása és progressziója között?

Politraumatizált betegek. Vizsgálták 13 politraumatizált betegben a PACAP és más klinikai markerek szintjének változását a betegek vérében a hospitalizáció első 5 napjában. A PACAP mennyiségében enyhe emelkedést találtak az idő előrehaladásával, amely enyhe korrelációt mutatott a C-reaktív protein és a leukociták antiszedimentációs rátájával. Ebből arra következtettek, hogy a PACAP szerepet játszhat a politraumatizált betegekben kialakuló gyulladásos folyamatok szabályozásában, mivel irodalmi adatok azt mutatják, hogy számos immunszervben található PACAP immunpozitív sejtek. Következik ebből az is, hogy a vérben mérhető PACAP szint emelkedik más gyulladásos betegségekben is?

Cardiovascularis kórképek. A fejezet bevezetője jól mutatja, hogy a PACAP-nak az erek simaizomsejtjeire és a szívizomsejtekre gyakorolt hatásaival meglepően gazdag irodalom foglalkozik. A különböző hatások molekuláris háttere meglehetősen jól ismert.

Mindezeknek az ismereteknek a birtokában pályázó vizsgálta sertésekben az a. coronaria sinistra ramus intervenicularis anterior ballon katéterrel való tranziens elzárásával létrehozott myocardialis infarctust követően a szívizom PACAP koncentrációjának változását. Azt találták, hogy a bal kamra ischemias területén 3 és 72 órás reperfúziót követően a PACAP koncentrációja nem különbözött a kontroll értékektől, ugyanakkor a bal kamra nem ischemias területein a PACAP szint csökkent. Hogyan magyarázza pályázó ezt az eredményt?

Vizsgálták továbbá acut myocardialis infarctuson átesett betegekben a vér PACAP koncentrációját az infarctust és sikeres coronaria intervenciót követően 2 napon keresztül. Azt találták, hogy az infarctust követően a PACAP koncentráció emelkedett a betegek vérében, majd a sikeres coronaria intervenciót követően a PACAP szint fokozatosan csökkent úgy, hogy a 2. nap végére alacsonyabbá vált a kontroll értékeknél. Hogyan magyarázza ezt a jelenséget a pályázó? Hogyan indukálhatja az acut myocardialis infarctus a PACAP gyors felszabadulását az agyból vagy az endokrin mirigyekből, ahogyan azt pályázó írja a diszkusszióban? Az agy milyen területei és milyen endokrin mirigyek vehetnek részt ebben a reakcióban? A reperfúzió milyen mechanizmus segítségével állíthatja le ezt a fokozott PACAP felszabadulást?

Mérték a vér PACAP koncentrációját különböző típusú és súlyosságú szívelégtelenségben szenvedő betegekben és vizsgálták, hogy a PACAP koncentráció milyen korrelációt mutat más klinikailag fontos markerek vérben mérhető szintjével. Az eredmények nagyon változatosak, egyes markerek pozitív, mások negatív, és voltak olyanok is, amelyek nem mutattak korrelációt a PACAP-pal. Mi az a legfontosabb következtetés, amit ezekből a vizsgálatokból levonhatunk?

Transzplantáció során végstádiumú ischemias és nem-ischemias cardiomyopathia miatt eltávolított és valamilyen ok miatt fel nem használt egészséges donor szívekből vett szövetminta homogenizátumokban mérték a PACAP és a PAC1 receptor koncentrációját. A PACAP szintjét mindkét, a PAC1 mennyiségét csak a nem-ischemias beteg csoportban alacsonyabbnak találták a kontroll értékekhez képest. Mi a klinikai jelentősége ezeknek az eredményeknek?

Malignus tumorok és myeloma multiplex. Műtétilag eltávolított szövetmintákon vizsgálták radioimmunoassay módszer alkalmazásával vese, húgyhólyag, prostata és here tumoros, és a szomszédos ép szövetek PACAP 27 és PACAP 38 immunreaktivitását. Volt ahol találtak, volt ahol nem találtak különbséget a tumoros és ép szövetek PACAP immunreaktivitása között.

Vizsgálták a myeloma multiplex-szel diagnosztizált betegek vérében a PACAP koncentrációját a betegség kezelésének különböző stádiumaiban. Mérték számos klinikai laboratóriumi paramétert is, és vizsgálták ezeknek a paramétereknek a PACAP szint változásával való korrelációját. Azt találták, hogy a myeloma multiplex betegek vérében a PACAP koncentráció alacsonyabb a kontroll csoporthoz képest, de ez az alacsony érték valamelyest emelkedik a betegség remissziós fázisaiban. A PACAP szint és a különböző laboratóriumi paraméterek közötti korreláció nagyon vegyes képet mutatott. Egyes paraméterek esetében találtak, másoknál nem találtak korrelációt a klinikai paraméter és a PACAP szint változása között. Ebben a fejezetben a pályázó talán említésre legméltóbb lelete az volt, hogy habár alacsony mintaszámmal dolgozva, erős pozitív korrelációt találtak az újonnan diagnosztizált és kezelésben még nem részesült betegek vérében mérhető PACAP koncentráció és a betegek túlélési ideje között. Ezzel kapcsolatban kérdezem, mit gondol a pályázó, melyek azok a sejtszisztemek, amelyek fokozott aktivitása és PACAP termelése javítja a myeloma multiplex-ben szenvedő betegek túlélési kilátásait?

Összefoglalásként, pályázó a PACAP-pal kapcsolatos „mi” és „mennyi” kérdésekre választ kereső extenzív kutatásaival létrehozott egy adatbázist, amelyből kiindulva a jövőben a „miért” és „hogyan” típusú kérdéseket is fel lehet majd tenni. Ennek az adatbázisnak a létrehozásával pályázó kiérdemelte az MTA doktora címet.

2025. január 10.



Dr. Antal Miklós
az MTA doktora