

Opponensi vélemény Dr. Büki András Zoltán „Fehérjebontó folyamatok diffúz agysérülésben: Kísérletes vizsgálatoktól a klinikai felhasználásig” című MTA doktori értekezéséről

Az értekezés magyar nyelven készült, összesen 140 oldal terjedelmű, 34 ábrát, 9 táblázatot és 300 irodalmi hivatkozást tartalmaz. Formai szempontból megfelel az MTA doktori értekezés követelményeinek. Az értekezés terjedelméből 1/3 részt a bevezetés, 1/3 részt a módszerek ismertetése végül 1/3 részt az eredmények és a megbeszélés tesz ki. A szerkesztésében sajátos, hogy bár az értekezés 3. része „eredmények és megbeszélés” fejezetként szerepel - igazából az eredmények után nem megbeszélés, hanem rövid összefoglalás szerepel „következtetések” címszó alatt.

Az értekezés témaválasztása nagyon aktuális: a legfiatalabb első 4 életévűekben a súlyos koponyasérülés okozza a legtöbb halálestét. Külön érdeme az értekezésnek, hogy úgynevezett transzlációs kutatás: tehát az állatkísérletes vizsgálatok eredményét közvetlenül kívánja hasznosítani a klinikai gyakorlatban.

Az értekezés állatkísérletes részében a koponyatrauma által kiváltott diffúz axonkárosodás fehérjebontó folyamatait írja le, különös tekintettel a calpain és a caspase rendszerekre. Fény- és elektronmikroszkópos módszereket, immunhisztokémiai eljárásokat alkalmaz, tradicionális és módosított technikákkal, digitális képrögzítéssel, kvantitatív elemzéssel. A morfológiai módszerek mellett többféle viselkedésvizsgáló módszert is alkalmaz. Megállapítja, hogy koponyasérülés után tapasztalható degeneratív folyamatok során az apoptotikus és nekrotikus mechanizmusok keveredve jelentkeznek. Állatkísérletes modellekben próbálja az axonlaesióban szerepet játszó enzimek gátlószereit (az axonális membrán permeabilitásra ható, calpaint gátló MDL-28170; a necroticus és apoptotikus folyamatokat gátló hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid – a PACAP; és az apoptotikus folyamatokat gátló L-2286 poly-ADP-ribóz-polimeráz - PARP) alkalmazva a traumás agykárosodás okozta axonális laesio súlyosságát mérsékelni. A klinikumban a pécsi súlyos koponyasérült adatbázis létrehozásával nemcsak a liquorvizsgálatoknak van jelentősége, de országosan egyedülálló, nemzetközi kutatásban való részvételre alkalmas adatbázist hozott létre. A munka jelentőségét és nemzetközi elismertségét mutatja, hogy az MTA doktori értekezés beadása óta eltelt időszakban is több közlemény született az adatbázis felhasználásával, melyek rangos nemzetközi folyóiratokban (pl. Journal of Neurotrauma; Neurosurgery) jelentek meg.

Kérdéseim, megjegyzéseim a következők:

A. Tartalmi kérdések, megjegyzések:

1. A szerző Magyarországot több helyen Kelet-Európához sorolja, szerencsésebb lett volna Közép- Európát említeni.

2. Mivel magyarázza a szerző az agysérülést szenvedett betegek között az Alzheimer kór 2-4,5- szer gyakoribb előfordulását?
3. Az 1. táblázatban a koponyasérülések felosztásában nem világos, hogy a hypoxiás agykárosodást kiváltó fő momentum miért a gyorsulás-lassulás.
4. Mivel magyarázható, hogy diffúz axonális sérülés során a kezelésre rendelkezésre álló terápiás ablak emberben jóval hosszabb, mint kísérleti állatokban (18. oldal), illetve, ez a megállapítás akkor is igaz-e, ha pl. a kísérleti állat gyrencephal (pl. macska vagy főemlős)?
5. A ciklosporin-A hatásának elemzésekor felveti a jelölt, hogy a szer alkalmas lehet az ischaemiás eredetű neuron károsodás kivédésére a mitochondrium működőképességének fenntartása, és az ionhomeosztázis helyreállítása révén. Ha ez így van, miért nem alkalmazzák a készítményt ischaemiás stroke-ban??
6. A 26. oldalon az ischaemiás és a traumás károsodás nekrotikus fókusza körül elhelyezkedő penumbráról ír. Véleménye szerint van-e különbség és ha igen, akkor mi a különbség az ischaemiás károsodás és a traumás károsodás során kialakuló perifokális terület („penumbra”) között.
7. A 32. oldalon ismerteti, hogy a calpain gátlása ugyan javította a funkcionális kimenetelt, de nem csökkentette a spectrin proteolysist. Ezek szerint a calpain hatásában nem fontos mechanizmus a spectrin bontás?
8. Az 52. oldalon a CMSP idő lefolyásának elemzése során csak az 5 mikrométert meghaladó átmérőjű axonokat számolták. Mi alapján választották éppen ezt a határértéket?
9. A morfometriai vizsgálat során a gerincvelői axonsűrűségek megszámlálásakor manuális vagy automatizált számolási módszert alkalmaztak?
10. Az egyensúlyozási teszt során az értékelésben nem folyamatos, hanem diszkrét változókat (1-6) alkalmaztak. Mivel nem folyamatos változóról van szó, nem gondolja a jelölt, hogy csoportátlag számítás helyett nem-paraméteres módszer alkalmazása (medián és interquartilis tartomány megadása) megfelelőbb lett volna?
11. A pécsi súlyos koponyasérült adatbázis feldolgozása során a jelölt azt írja, hogy 5 percenként többek között agyi véráramlás értékeket is mértek. Ez a gyakori agyi véráramlásmérés milyen módszerrel történt?
12. A humán liquorminták elemzése során kamrai és lumbalis liquormintákat használtak. Mivel a két helyről származó liquorminták több tekintetben eltérnek (pl. fehérjetartalom), figyelembe vették-e a mintavétel helyét a calpain- és caspase specifikus SBDP-k vizsgálatokor?
13. A prognosztikai vizsgálatok során a statisztikai feldolgozáshoz egy illetve több paraméteres logisztikus regressziót alkalmaztak. Kérdésem milyen paraméterek szerepelnek a modellben, ezeket a paraméterek hogyan választották ki?

14. Az axonok denzitásának túlélési idő függvényében való meghatározása során 15, 30, 60 és 120 percnél történtek mérések. Kérdésem, hogy a statisztikai elemzéshez miért nem ismételt mérések varianciaanalízist („repeated measure ANOVA”) alkalmaztak?
15. A fénymikroszkópos, kvantitativ immunhisztokémiai megfigyelések vonatkozásában (mérések 15, 30, 60, 180 és 300 percnél) ugyanez a kérdésem.
16. A 72. oldalon az axonok számának bemutatása során átlag±SEM értéket ad meg a jelölt, kérdezem miért nem standard deviáció értéket ad meg. A SEM értékek alapján az olvasóban felvetődik, hogy nem normál eloszlású mintákról van szó. Ha ez így van, akkor viszont nem-paraméteres statisztikai próbákat kell alkalmazni. Történt-e normalitásvizsgálat a statisztikai elemzés során?
17. A 77. oldalon az szerepel, hogy a spectrin szintek nem függenek a sérülés súlyossági fokától és a kimeneteltől, sem az intracranialis nyomásemelkedés mértékétől. A következő oldalon viszont a vizsgált fehérjék liquor szintjének jellegzetes idő-összefüggéséről, és a sérülés súlyosságával és kimenetelével kapcsolatban álló liquor szintekről ír. Hogyan lehet feloldani ezt az ellentmondást?
18. A 21. ábrán (77. oldal) nem világos, hogy mi szerepel a tengelyeken. A függőleges tengelyen a számok mit jelentenek? Mi a mértékegységük? A vízszintes tengelyen a 150-es (feltehetően kilodalton) értéknél a kontroll érték jóval nagyobb, mint az ábra másik 4 oszloppárjánál. Mi magyarázza az itteni kontrollcsoportban ezt a legalább háromszoros értéket?
19. A 79. oldalon, az 5. táblázatban az esélyhányados (OR) értéke mellett érdemes lett volna megadni az ahhoz tartozó 95%-os konfidencia intervallum értékeket is.
20. Ugyanez a megjegyzésem vonatkozik a 80. oldalon szereplő 6. táblázatra is.
21. Az axonális károsodást jelző immunhisztokémiai morfológiai markerekben a calpain inhibitor MDL 28170 mellett nem volt megfigyelhető különbség a kezelt illetve a kontroll patkányokban, a jelölt axonszámok összehasonlításakor viszont protektív hatás mutatkozott mindkét vizsgált pályarendszerben. Nem jelent ez ellentmondást?
22. A 28. ábrán szereplő szignifikancia jelzés során nem világos, hogy a többszörös összehasonlításra (1 kontroll és 3 kezelt csoport) történt-e valamilyen korrekció (pl. Bonferroni)?

A. Formai megjegyzések:

23. Néhány rövidítés magyarázata (pl. ATLS 10. oldal) nem szerepel a rövidítés jegyzékben.
24. A 11. oldalon a 2. bekezdésben egy olyan hazai epidemiológiai vizsgálatra utal, mely 2000 súlyos koponyasérült adatait tartalmazta, 42%-os halálozással.

Érdemes lett volna ehhez az önálló bekezdésben szereplő megállapításhoz irodalmi hivatkozást adni.

25. Az ábrák egy része (pl. 3. ábra) az olvashatatlanság határáig elmosódott, illetve nem szerepel hozzájuk pontos referencia (pl. 3. ábra).
26. A szerző a nekrotikus és apoptotikus folyamatok egymással átfedő jelenségét több helyen említi. Érdemes lett volna a bevezetőben egy összegző ábrát bemutatni, amely ismerteti a calpain és a caspase szerepét is ezekben a folyamatokban.
27. Az ábrákon illetve az ábra feliratokon szereplő betűméret túl kicsi, nagyítás nélkül több helyen lehetetlen elolvasni (pl.: 3. és 30. ábra; 4. táblázat).
28. A 15. ábra a 68. oldalon túl sűrű, nehezen lehet rajta tájékozódni.
29. A 16. ábrán a felső paneleken nem világos a nagy M jelölés jelentése.
30. A 73. oldal alulról második bekezdésében nehezen követhető mondat szerepel. Áttekinthetőbb lett volna az így összezsúfolt értékeket grafikon vagy táblázat formájában bemutatni.
31. Mindössze néhány gépelési hibát találtam:
 - a. 24. oldal: mitochondriumok helyett: „michondriumok”
 - b. 46. oldal, alulról 5. sor: az idézőjel nincs bezárva
 - c. 55. oldal: a porond helyett „az porond” szerepel
 - d. 64. oldal, 5. sor: találtuk helyett: „találtunk”
 - e. 75. oldal: érdemben nem vizsgált helyett: „érdemben nem vizsgálat”
 - f. 93. oldal, 7. táblázat fejlécében μ helyett \square áll.

A jelölt által végzett vizsgálatokból a következő új eredmények állapíthatók meg:

1. Több módszer együttes alkalmazásával bizonyította, hogy a diffúz axonális károsodás során a strukturális fehérjéket bontó cisztein proteáz - a calpain - aktiválódik. Leírta ennek a folyamatnak a térbeli és időbeli sajátosságait.
2. Fény- és elektromikroszkópos vizsgálatokkal először igazolta, hogy a diffúz axonkárosodás klasszikus markerei ugyanott jelentkeznek, ahol a kalcium által indukált, calpain által közvetített spektrin fehérjelebontás.
3. Fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatokkal elsőként igazolta, hogy a diffúz axonális károsodás kialakulása során észlelt mitochondrium károsodás citokróm-c felszabadulással jár együtt. A kalcium által indukált calpain által közvetített spektrin proteolízis és a mitochondriális károsodás hatására kialakuló citokróm-c felszabadulás azonos axon szakaszokban történik.

4. Elsőként igazolta axonokban az apoptózist végrehajtó enzim aktiválódását. A mitochondriumra utaló megfigyelések alapozták meg a ciklosporin-A klinikai kipróbálását súlyos koponyasérülést szenvedett betegekben.
5. Az immunhisztokémiai kettős jelölési technikák alkalmazásával igazolta, hogy az axonokban a necrotikus folyamatok végrehajtója a calpain és az apoptotikus kaszkád enzime a caspase-3 ugyanazon axonokban aktiválódik, és az elektronmikroszkópos megfigyelések alapján megállapította, hogy a diffúz axonális károsodás során a caspase aktiválódása az irreverzibilis fázist jelzi.
6. Igazolta, hogy a diffúz koponya-agysérülés kísérletes modelljében az axonális károsodás a kiváltó mechanikai energiával és a sérülés utáni eltelt idővel arányos, de az axonok morfológiai és immunfestési tulajdonságában nincs különbség.
7. A gyorsuláson-lassuláson alapuló kísérletes modellben az agytörzsi károsodás mellett talált gerincvelői (távoli) károsodás magyarázatot ad a modellben tapasztalt motoros károsodás egy részére. A jelenségnek számos klinikai vonatkozása lehet (bántalmazott gyermek szindróma, spondylotikus myelopathia).
8. Kísérleti állatokban igazolták, hogy érdemi neurológiai illetve élettani változásokkal nem járó súlyosságú koponyatrauma is képes jelentős mértékű diffúz axonkárosodás kiváltására. A jelenséggel magyarázni lehet humán vonatkozásban az enyhe fejsérülés mellett létrejövő poszt-traumás tünetegyüttest.
9. Humán vizsgálatokban elsőként írta le, hogy a sprektin nevű agyi struktúrfehérje és lebontási termékei a liquorban traumás központi idegrendszeri sérülés után kimutathatók. Ezen anyagok monitorozása koponyasérültek kezelése során a jövőben esetleg alkalmazható lesz, biomarkerként lehet jelentősége.
10. A pécsi koponyasérült adatbázis képi felvételeinek digitális elemzésével prognosztikus következtetésekre alkalmas faktorokat azonosított.
11. Igazolta, hogy bizonyos feltételek mellett és bizonyos agyterületekben a szelektív calpain gátlás, valamint a PACAP illetve PARP gátlás feltehetően mérsékli a diffúz axonális károsodás súlyosságát.

A disszertáció megállapításai 22 közleményen alapulnak, mely közül 8-ban a jelölt első szerző, 9-ben pedig utolsó szerző. Ezen közlemények döntő többsége rangos nemzetközi folyóiratban jelent meg, kiállva a *peer review* próbáját. Ezek és a fentiek alapján a doktori munka tudományos eredményeit elegendőnek tartom az MTA doktori cím megszerzéséhez, és a nyilvános védelem kitűzését javaslom.

Budapest, 2012. március 8.



Dr. Bereczki Dániel
egyetemi tanár, igazgató