

Opponensi vélemény

Dr. Klivényi Péter (Szegedi Tudományegyetem Neurológiai Klinika) „Újabb adatok a neurodegeneratív betegségek pathomechanizmusához: terápiás perspektívák” c. MTA doktori értekezéséről.

A jelölt a disszertációban a neurodegeneratív megbetegedések feltételezett alapját képező oxidatív károsodás, illetve a mitokondriumokat érő toxikus károsodás, és a gyulladás szerepét vizsgálja. Az értekezés összesen 112 oldal terjedelmű, 41 ábrát és 7 táblázatot tartalmaz. A disszertációt 269 hivatkozást tartalmazó irodalom jegyzék zárja.

A disszertáció szerkezete arányos, a 10 oldalnyi bevezetést a célkitűzések követik 1 oldalon összefoglalva, majd az eredmények és megbeszélés fejezet összevontan 75 oldalt tesz ki. A módszertani rész a disszertációból hiányzik, a jelölt a megfelelő közleményekre utal.

A disszertáció alapját 42 teljes terjedelmű tudományos közlemény képezi, ezek döntő többsége a PhD fokozat megszerzését követően jelent meg. A közlemények közül Klivényi doktor 18-ban első szerző, 5-nél pedig utolsó szerző. A közlemények első kétharmadának alapja külföldön végzett kutatás, a legfrissebb 10 közlemény viszont már hazai munka eredménye. A disszertációt megalapozó tudományos munkák - 42 közlemény - kivétel nélkül magas impakt faktorú, nemzetközi tudományos folyóiratban jelentek meg.

Kérdéseim és megjegyzéseim a következők:

A./ TARTALMI MEGJEGYZÉSEK

- 1.) A bevezetésben az szerepel, hogy „a neurodegeneratív kórképek fenotípusa sporadikus esetekben sok esetben hasonló a genetikus formákéval, ezért közös pathomechanizmus feltételezhető”.

Kérdésem: az azonos fenotípus mellett miért kell közös pathomechanizmust feltételezni? Ugyanilyen logikus állítás lenne az is, hogy az azonos fenotípus hátterében különböző pathomechanizmus feltételezhető a genetikai és a sporadikus formáknál.

- 2.) A 6. oldalon az R6 csoporthoz a második sorban az ismétlődések száma 116 és 156 között változik, míg az egyik alcsoportja (R6/2) 141-157 CAG ismétlődést tartalmaz: **Kérdésem:** az R6 csoportban az ismétlődések maximális száma 156 vagy 157?

- 3.) A 12. oldalon a sclerosis multiplexet egyértelműen autoimmun betegségnek definiálja. **Véleményem szerint** a kérdés nem ennyire egyszerű. Az autoimmunitás sclerosis multiplexben egyrészt nem egyértelműen igazolt (pl. Wootla, 2012), másrészt a gyulladásos folyamat mellett egyéb okok is felvetődtek.

- 4.) A 14. oldalon a módszerek és statisztikai elemzés fejezetben mindössze két sor szerepel a megjelent dolgozatokról, amelyeket viszont nem találtam az anyagban, emiatt a disszertáció módszertani és statisztikai részét az eredeti közlemények alapján tudtam értékelni. A módszerek a kor színvonalának megfelelőek, a statisztikai módszerek bemutatása a frissebb közleményeknél már elég részletes, a régebbieknél kevésbé. Az alkalmazott statisztikai módszerek összességében megfelelőek.

- 5.) A 15. oldalon kezdődik az eredmények és a megbeszélés, ahol az 1. fejezet „A mitokondriális toxinok hatása az agy aminosav szintjeire, ill. az antioxidáns rendszereire.” c. fejezetben az aminosavakról kapunk információt, viszont az antioxidáns rendszerekről adat a fejezetben nem szerepel. **A fejezettel kapcsolatos kérdés:** mind a 3-NP, mind az MPTP adását követően regionális különbségeket találtak egyes agyterületek között. Mi lehet az oka ennek a regionális variabilitásnak? **A cerebellumra vonatkozó külön kérdés,** hogy a Purkinje sejtek – melyek általában érzékenyek extrém külső behatásokra – hogyan változtak a MPTP kezelés során?
- 6.) Az aminosav szintek csökkenését ATP hiánnyal magyarázták. **Kérdés:** mérték-e ATP szinteket, vagy az ATP-hiány csak feltételezés.
- 7.) A következő fejezetben a Leber-féle hereditár opticus neuropathiában az antioxidáns rendszereket a perifériás vérben vizsgálták: **Kérdés:** Mennyire tartható relevánsnak a vérszintek változása a neuropathia vonatkozásában?
- 8.) A 19. oldal alján jelölt a Leber-féle hereditár opticus neuropathai kezelésére E-vitamin szubsztitúciót javasol. **Kérdés:** Mi alapján fogalmaz meg a jelölt terápiás ajánlást, hogyha nem végzett erre vonatkozó kontrollált klinikai vizsgálatot?
- 9.) A 20. oldalon szereplő táblázatban látható, hogy az alfa tocopherol szintje a control a hordozó és a betegcsoportokban gyakorlatilag teljesen egyforma. Különbségeket akkor találtak a szerzők, hogy ha a tocopherol szint és a koleszterin + triglycerid szint hányadosát használták. **Kérdés:** Milyen megfontolás alapján normalizálták a vizsgált 3 beteg csoportban a tocopherol szintet a koleszterin és triglycerid szintekre? **További kérdés,** hogy a 4. ábrán a 3 csoport összehasonlítása során ANOVA-t követő *post hoc* tesztet, vagy pedig Bonferroni korrekciót alkalmaztak a többszörös összehasonlítás miatt.
- 10.) Sclerosis multiplexes betegek esetében is a perifériás vérben történtek mérések. A vérben az antioxidánsok szintjének csökkenését a jelölt a fokozott felhasználódásnak tulajdonítja. **Kérdés:** Honnan tudja, hogy az alacsonyabb szérumszintek oka fokozott felhasználódás? Miért nem magyarázhatók az alacsonyabb szintek a fokozott felhasználódáson kívül az antioxidánsok csökkent termelésével?
- 11.) A jelölt azt állítja, hogy a β -interferon készítmények hatásosan csökkentik az évenkénti állapotrosszabbodások számát és ezáltal a betegség progresszióját. **Megjegyzés:** az ok-okozati kapcsolat nem szükségszerű. Az állapotrosszabbodások (shubok) számának csökkentése nem feltétlenül hat a betegség progressziójára. Újabb elemzések szerint a béta interferon kezelés nem befolyásolja a betegség hosszú távú progresszióját. („Among patients with relapsing-remitting MS, administration of interferon beta was not associated with a reduction in progression of disability.” Shirani és mtsai, JAMA, 2012)
- 12.) A 22. oldalon szereplő 5-ös ábra b. részében a relapsusok során a vér GSSG szintjében jelentős emelkedést figyeltek meg. **Kérdés:** ez a jelenség nem lehet-e az akut shubban alkalmazott nagy dózisú szteroid terápia következménye?
- 13.) Az 5. ábra c. részénél az interferon terápia melletti Tocopherol és NADPH szintek változása szerepel. A kontrollokban egy vizsgálat, a sclerosis multiplexes betegcsoportban 3 vizsgálat (0, 1, és 6 hónap) történt. Mivel az antioxidáns szintek, pl. a táplálkozással változhatnak, és a 6 hónapos időtartam mindenképpen évszakváltozást is magában foglal, szerencsésebb lett volna a kontroll csoportban is 0, 1 és 6 hónapnál méréseket végezni, és a két csoportot ismételt mérések variancia analízissel

összehasonlíttani. **Kérdésem:** A kontroll csoport és a sclerosis multiplexes csoportok összehasonlítása a tocopherol szint mérésénél illetve az NADPH mérésénél milyen módszerrel történt, milyen korrekció történt a többszörös összehasonlításokra?

- 14.) A 24. oldalon a Huntington-kór transzgenikus modelljében az első bekezdésben érdemes lett volna megemlíteni, hogy az R/2 és a N171-82Q milyen állatokra utal – a következő oldalon olvashatjuk, hogy egerekkel történtek a vizsgálatok.
- 15.) A 25. oldalon szerepel, hogy a beteg állatok által 5 perc alatt megtett út 12 hetes kortól kezdődően csökken, azonban a mozgás sebessége már 8 hetes korban lassúbb, mint a kontroll egereké. **Kérdésem:** Hogyan értékelhető a 8-12 hetes kor közötti időszak? Az előzőek alapján az feltételezhető, hogy ekkor a beteg egerek, ha lassabban mozognak, akkor időben többet kell mozogjanak, mint a kontrollok, így képzelhető el a 8 és 12 hét közötti azonos összes megtett út. Mi erről a jelölt véleménye?
- 16.) A 28. oldalon azt állítja a jelölt, hogy a neurodegeneratív betegségek fokozott szabadgyök képződéssel járnak. **Kérdésem:** Mi a bizonyíték arra, hogy a vérben mért magasabb szabadgyök szintek háttérben valóban fokozott képződés, és nem csökkent felhasználódás, vagy akár a táplálékból történő fokozottabb felszívódás áll?
- 17.) A 30. oldalon az szerepel, hogy „csak az alfa-synuclein ill. a tau protein génje hozható összefüggésbe Parkinson-kórral”. Mi a jelölt véleménye az egyéb gének szerepéről (ATP13A2, GBA, LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, UCHL1, VPS35)?
- 18.) A 11. ábra c. részén a malonát okozta sejtpusztulás Nissl festéssel vizsgálva a striátumban mm³-ben szerepel. **Kérdésem:** Ez a térfogati mértékegység hogyan értelmezhető? Történt-e sejtdenzitás mérés (pl sejt/mm²) ugyanebben a modellben?
- 19.) A 34. oldal második sorában az szerepel, hogy „az agyban csak a GSHPx bontja a hidrogén peroxidot”, míg az utolsó bekezdésben az szerepel, hogy „az agy kataláz aktivitása alacsony”. **Kérdésem:** Ezek szerint tehát az agyban a kataláz hiába van ott - nem bontja a hidrogén peroxidot?
- 20.) A 37. oldalon az SOD2 deficiencia hatása a neurotoxicitásra c. ábrán az ábrafeliratban a c. elemben a Nissl festődésű sejtek száma szerepel. **Kérdésem:** Itt a számok valóban a sejtek számára, és nem a sejtek sűrűségére utalnak?
- 21.) A 46-47. oldalon olyan betegségekre utal a jelölt, melyekben „az akut szak elmúltával az NAA szint normalizálódik”. Ezen betegségek között sorolja fel az amyotrophias lateralsclerosist is. **Kérdésem:** Mit ért az amyotrophias lateralsclerosis akut szakán?
- 22.) A 61. oldalon a kreatin szupplementáció Parkinson modellben történő alkalmazásakor, a kreatinnel kapcsolatban a szerző azt írja, hogy a kreatin „Gauss görbe-szerűen csökkentette az MPTP indukálta substantia nigra sejtpusztulást”. **Kérdésem:** Pontosan mit ért azon, hogy Gauss görbe-szerűen csökkent az MPTP indukálta sejtpusztulás?
- 23.) A neurodegeneratív megbetegedések során alkalmazott kísérletes terápiákban a szerző a kísérletes modellben szinte mindig statisztikailag szignifikánsan jó eredményt talált, ezeket azonban a klinikai vizsgálatok nem erősítették meg. **Kérdésem:** Mit gondol a jelölt, mi az oka annak, hogy a kísérletes modellekben tapasztalt pozitív terápiás eredmény a klinikai vizsgálatok során nem igazolható?

B. FORMAI MEGJEGYZÉSEK

- 24.) A dolgozatban számos esetben a mondatok szerkezete nem a magyar, hanem az angol nyelvtani szabályoknak felel meg. Pl: a 6. oldalon „Ez a toxin irreverzibilis inhibitora a szukcinát dehidrogenáz enzimnek...” magyarul: „Ez a toxin a szukcinát dehidrogenáz enzim irreverzibilis inhibitora...”, vagy ugyanezen az oldalon, néhány sorral lejjebb: „A malonsav reverzibilis gátlója a komplex II-nek....” Magyarul: „A malonsav a II. komplex reverzibilis gátlója...”
- 25.) Szintén fordítási bonyodalom lehet a következő mondat (11. oldal): „Mivel a primer mutációk mind a komplex I. aktivitás csökkenés eredményezhetnek...”
- 26.) A sclerosis multiplexről szóló fejezetben a 21. oldalon nem érthető világosan, hogy a β -interferon kezelés mellett hogyan alakul a szabadgyök-képződés és az antioxidáns felhasználás. Nem világos, hogy melyik mondat utal a kezeletlen és melyik a kezelt állapotra
- 27.) Gépelési hiba a 15. oldal 8. sorában: „energia deficitet oknak”.
- 28.) 16. oldalon II. ábra felirat: „a aminosav”.
- 29.) 23. oldal: „remmisszióban”
- 30.) a 12. ábra „b” paneljében az üres oszlopok jelentése nincs definiálva
- 31.) 37. oldal: „deficincia”
- 32.) 46. oldal „Huntington kór” (helyesen: Huntington kórban)
- 33.) 47. oldal: „megfelel annak az arány” (helyesen: megfelel annak az aránynak)
- 34.) 53. oldal: „igaz már régiókban”

A jelölt legfontosabb megállapításai a következők:

- 1.) Kimutatta, hogy a mitokondriális toxinoknak az idegrendszer különböző területeiben eltérő hatásuk van az agyi aminosav-, ill. E vitamin szintekre.
- 2.) Indirekt módon igazolta, hogy az α -synucleinnek fontos szerepe van a neuronpusztulásban.
- 3.) Különböző hatásmechanizmusú szerek neuroprotektív hatást igazolta *in vivo* (antioxidáns hatású molekulák, mitokondriális támadáspontú szerek, kinurénsav analóg, HDAC inhibitorok, nNOS gátló, pirimidin származék).
- 4.) Kimutatta, hogy az antioxidáns védekezésben részt vevő enzimek hiánya (MnSOD, GSHPx) fokozottan érzékenyé teszi a sejteket az exogén toxikus ágensekkel szemben, ezzel szemben bizonyos enzimrendszerek (PLA₂, kaszpáz 1) genetikai kiiktatása neuroprotektív hatású.
- 5.) Igazolta, hogy a humán betegséget okozó gének mutációi (HD, ALS) fokozott szabadgyök szintekkel járnak *in vivo* egerekben.
- 6.) Demonstrálta, hogy megfelelő technikával dopaminerg irányba differenciáltatott embrionális őssejtek képesek integrálódni és működni *in vivo* egérmodellben.
- 7.) Igazolta a kinurenin útvonal részvételét és a fokozott szabadgyök szinteket több neurológiai kórképpen (sclerosis multiplex, Parkinson-kór, Dystonia, Leber betegség).

8.) Kimutatta *in vivo*, hogy Huntington kór modelljében a neuronális markerként ismert NAA szintje sejtpusztulás nélkül is csökken.

A szerző tudományos eredményeit rangos nemzetközi folyóiratokban publikálta, kiállva a „peer review” próbáját. Az őssejtekkel végzett kezelés különösen figyelemreméltó, és mindenképpen megjegyzendő a szerzőnek az az eredménye, hogy a differenciálatlan alakokból utóbb daganat képződik, legtöbbször teratoma. Az őssejt kezeléssel kapcsolatos klinikai vizsgálatok számára nagyon fontos információ ez, hiszen ez egy olyan súlyos mellékhatás, amely a kezelés alkalmazhatóságát a jövőben mindenképpen befolyásolja majd. A fentiek alapján a disszertációban közölt eredményeket hitelesnek, és új tudományos eredményeknek tartom, és az MTA doktora fokozat odaítélését javaslom.

Budapest, 2012. szeptember 20.