

Válasz Berezki Dániel Professor Úr bírálataira

Először is hálás köszönettel tartozom Berezki Professor Úrnak, amiért elvállalta a disszertációm bírálatát és azt védésre alkalmasnak tartotta.

A formai megjegyzésekkel kapcsolatban teljesen egyetértek Professor Úrral. Sajnos minden igyekezetem ellenére, többszöri átolvasást követően is maradtak a szövegben hibák, fogalmazási pontatlanságok, nem magyaros mondatszerkesztések. Ezek korrekcióját elvégeztem.

Kérdéseire a válaszaim a következők:

1. Az azonos fenotípus mellett miért kell közös pathomechanizmust feltételezni?

Mind a két megközelítés igaz. Én arra gondoltam, hogy a sporadikus formákat nem lehet klinikailag elkülöníteni a genetikai formáktól (pl. LRRK2 mutáció okozta Parkinson kór, ugyan úgy néz ki, mint a sporadikus forma). Számomra ez azt jelent, hogy a substantia nigra dopaminerg sejtjeinek pusztulását iniciálhatja genetikai faktor, vagy éppen környezeti (toxikus) hatás, vagy csökkent antioxidáns védekező kapacitás. Mindegyik esetben hasonló tüneteket fogunk látni. Persze fordítva is igaz, pl. TDP43 protein modifikációi mind ALS-t, mind fronto-temporális demenciát tudnak előidézni.

2. Az R6 csoportban az ismétlődések maximális száma 156 vagy 157?

Ennyire pontosan nem lehet megmondani, mivel instabil ez az expanszió. A Jackson Laboratories (Maine, USA), akiktől ez a törzs származik, ők is csak ezt a tartományt adták meg (R6/2 vonal 141-157 CAG ismétlődés). Az expanszió pontos nagysága ebben a tartományban már nem olyan fontos, tekintettel arra, hogy mindenképpen egy nagyon gyors progressziójú fenotípust eredményez.

3. A sclerosis multiplex nem egyértelműen autoimmun betegség

Teljesen egyetértek. Pontosabban kellett volna fogalmaznom, hogy általánosságban autoimmun betegségnek tartják, de pl. a primer progresszív kórforma pathomechanizmusa inkább a neurodegeneratív kórképekhez áll közelebb.

4. A módszerek és statisztikai elemzés hiányzik.

Terjedelmi okokból a módszereket és a statisztika elemzéseket kihagytam a disszertációból. Azt gondoltam, hogy talán ez okozza a legkisebb zavart az eredményeim interpretálásában.

5. Az 1. fejezetből az antioxidáns rész kimaradt. Mi lehet az oka a regionális variabilitásnak?

Köszönöm az észrevételt. Valóban a későbbi szerkesztések során a fejezet második részét áthelyeztem a 27. oldalra, és a címet nem javítottam.

A regionális variabilitás okát egyértelműen nem ismerjük. Az ismert, hogy mindkét toxin szelektívnek mondható, abban a vonatkozásban, hogy a 3-NP nagy szelektivitással a közepes tüskés, GABA-erg striatális neuronokat károsítja (feltehetően ezen sejtek magas energiaigényével összefüggésben), míg az MPTP a dopamin transzporterhez való kötődése miatt szelektív dopaminerg (substantia nigra) toxinnak tartható. Ennek ellenére észleltünk minden vizsgált régióban eltéréseket, amelyek gyakran tartósak voltak. Ez nem magyarázható szimplán toxinok okozta energia deficittel, mivel nem minden aminosavat érintettek az elváltozások, és az előbb említett sejtszelektivitás sem észlelhető.

6. A Purkinje sejtek érzékenysége MPTP kezelés során?

Az MPTP kezelés nem okoz Purkinje sejt pusztulást. Ennek az lehet az oka, hogy maga a toxin, ill. aktív formája nem jut be a sejtbe. Az MPTP okozta molekuláris biológiai ill. elektrofiziológiai elérésekről csak kevés adat található az irodalomban, pl. az, hogy sem a glükóz transzporter, sem a foszfát transzporter distribúciója nem változott meg adagolása után (Laguerre E et al, 2010).

7. Mérték-e ATP szinteket

Ebben a vizsgálatban nem mértünk, de az amerikai munkacsoportunk korábban igazolta, hogy 3-NP egyszeri adagolásakor közel 50%-os ATP szint csökkenés figyelhető meg a striatumban 3 óra elteltével (Beal MF et al, 1993).

8. Mennyire relevánsak a vérszintek vizsgálatai?

A humán vizsgálatoknak mindig az a nagy hátránya, hogy olyan szövetből kell dolgoznunk, amely könnyen elérhető, még akkor is, ha az nem érintett az adott betegségben. Ezért szokták gyakrabban a vért használni. A vér mintegy nagy pool, az adott anyag termelődéséből, a kiválasztódásából, a felszívódásából és a felhasználódásból eredő szintjét mutatja. Mivel betegeinknél azonos genetikai eltérést találtunk, amely a perifériás vérben is jelen van, így szisztémás hatással is kell számolnunk, annak ellenére, hogy az elsődleges patológia a szemideget érinti (melynek oka egyébként nem teljesen ismeretes). Azonban mi azt gondoljuk, hogy az észlelt eltérés egy kifejezett oxidatív stresszből származó fokozott felhasználódásból ered, amely miatt a vérből, mint tartalék poolból is fogy az E vitamin.

9. E-vitamin szubsztitúcióra nincs kontrollált klinikai vizsgálat

A mitokondriális betegségek kezelésére továbbra sincsenek olyan gyógyszerek, amelyek megfelelő vizsgálatokkal lennének alátámasztva. Leber betegségben nemrégiben ért véget egy fázis II klinikai vizsgálat idebenone-nal (és most tervezik a fázis III vizsgálatot). Ezt leszámítva még génterápiás módszerek vannak klinikai kipróbálás fázisában. Azonban a legfrissebb ajánlásokban is szerepel az E vitamin, annak ellenére, hogy nincs igazolva a hatása (Newman NJ, 2011).

10. A tocopherol szint normalizálása a koleszterin és triglicerid szintekre?

Mi az irodalomból vett módszert adaptáltuk és követtük az ajánlást a normalizálásra (Thurnham DI, 1986).

11. A 4. ábrán alkalmazott statisztikai tesztek.

ANOVA-t követő LSD *post hoc* tesztet használtunk.

12. A SM-ben a vérben az antioxidánsok szintjének csökkenése fokozott felhasználódás vagy alacsonyabb termelés eredménye?

Pontosan nem tudjuk. Azonban az már jól ismert, hogy a betegség fokozott szabadgyök-képződéssel jár (amely leginkább az aktivált microgliából származhat) (pl. Lassmann H, 2011), és ezért feltételezzük, hogy az észlelt antioxidáns szint csökkenés a fokozott felhasználódás következménye.

13. Az állapotrosszabbodások száma és a betegség progressziója.

A közlemény, amit a Professzor Úr citált az elég friss. Azokból a korábbi vizsgálatokból, amelyekben olyan betegek adatait összegezték, akik nem kaptak kezelést, általánosságban lezűrhető, hogy a relapsus ráta (vagyis az évenkénti állapotrosszabbodások száma) negatív prognosztikai faktor (vagyis magasabb relapsus ráta súlyosabb állapotot eredményez 5 év elteltével) (pl. Degenhardt A, 2009). Az is jól ismert, hogy az interferonok csökkentik az évenkénti állapotrosszabbodások, ill. az új MRI léziók számát. Így a kapcsolat jól magyarázható, de ennek a friss adatnak a további értékelése mindenképpen indokolt.

14. A vér GSSG szintjének emelkedése MS-ben lehet-e szteroid hatás?

Ebben az esetben nem lehetett a szteroid hatása, mivel a diagnosztikus liquorvételek minden esetben a terápia (metilprednizolon) megkezdése előtt történt.

15. Az antioxidáns mérések során a kontrollokban egy alkalommal, míg a betegeknél 3 időpontban volt vérvétel.

Ez etikai megfontolásból történt így. Valóban számos tényező befolyásolja az aktuális antioxidáns statusunkat. A betegekről csak annyit tudtunk, hogy nem dohányoztak, nem volt relapsusuk az elmúlt 6 hónapban, nem kaptak szteroidot és nem szedtek vitaminokat. A kontroll személyek sem dohányoztak vagy szedtek

vitaminokat. A betegektől származó 3 időpontban vett vért és a kontrolloktól származó vért is egyszerre mértük. A mérésekig a mintákat -80 fokon tároltuk. A vérvétel pillanatában levő aktuális antioxidáns statusokat hasonlítottuk össze. A tokoferol szinteket egy utas variancia-analízissel és Tukey teszttel történt, míg a NADPH Kruskal-Wallisle és Mann-Whitney teszttel történt.

16. A tg HD beteg állatok által megtett út 12 hetes kortól kezdődően csökken, azonban a mozgás sebessége már 8 hetes korban lassúbb, mint a kontroll egereké.

Az transzgenikus egerek által 5 perc alatt megtett út már 8 hetes korban is csökkent, de ez nem érte el a szignifikancia szintet csak 12 hetes korban. Ezzel szemben a sebességükben már 8 hetes korban szignifikáns lassulás volt észlelhető.

17. Mi a bizonyíték arra, hogy a neurodegeneratív betegségek fokozott szabadgyök képződéssel járnak?

Számos adat támogatja a fokozott képződést. Mi magunk is vizsgáltuk a szabadgyök-képződést, pl. emelkedett nitro tirozin szintet (peroxinitrit károsodás), emelkedett malondialdehidet találtunk számos modellben. De pl. fokozott hidroxil gyök képződésére utal pl. az exogén szalicilát vagy 4-hidroxi-benzoésav 2,3 és 2,5-dihidroxi benzoésavvá alakulása is (salicylate trapping method). Ezek az adatok szerepelnek is a közleményekben (Klivenyi et al, 1999, Klivenyi et al, 2000, Bogdanov et al., 1998).

18. alfa-synuclein ill. a tau protein génje hozható összefüggésbe Parkinson-kórral? az egyéb gének szerepéről (ATP13A2, GBA, LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, UCHL1, VPS35)?

Ezek az előbb említett gének csak a ritkán előforduló familiáris formák némelyikében található, ill. rizikófaktorként szerepelnek, míg sporadikus (idiopathiás) esetekkel csak a TAU és az α -synuclein hozható összefüggésbe, bár nem okozói azoknak (Simon-Sanchez, 2009).

19. 11. ábrán Nissl festéssel vizsgálva a striátumban mm^3 -ben szerepel. Történt-e sejtdenzitás mérés (pl sejt/ mm^2) ugyanebben a modellben?

Ez a kialakult lézió számítógépes kalkulált volumene, aktuálisan nem történt sejtdenzitás mérés ebben a kérdéses munkában.

20. Az agyban a kataláz nem bontja a hidrogén peroxidot?

Fiziológiás körülmények között az agy a kataláz aktivitása alacsony, így gyakorlatilag csak a GSHPx tehető felelősség a hidrogén peroxid hasításáért (Gaunt and De Duve, 1976; Halliwell, 1992). Patológias esetekben azonban alternatív útvonalként aktivitása fokozódhat.

21. 13. ábrán a Nissl festődésű sejtek száma, vagy a sejtek sűrűsége került ábrázolásra?

Ebben a munkában a substantia nigra egy 50 μm -es szeletének összes festődött sejteinek száma (jobb és baloldal együtt).

22. Mi az amyotrophias lateralsclerosis akut szakasza?

Igen ez fogalmazási pontatlanság volt. Az akut kifejezés sclerosis multiplexre, ill. az epilepsziás rohamra vonatkozik, ALS esetében a Riluzole terápiát követően normalizálódott az NAA szint.

23. mit jelent a Gauss görbe-szerű csökkent sejtpusztulás?

Ebben a munkában a 0,25%, 0,5%, 1%, 2% ill. 3%-os kreatin szupplementációt alkalmaztunk. Ez nem egy egyenletes protekciót eredményezett, hanem egy kissé deformált, de mégis Gauss görbéhez hasonló mintázatott mutatót. Azonban magasabb dózisoknál már nem találtunk protektív hatást.

24. Mi lehet az oka annak, hogy a kísérletes modellekben tapasztalt pozitív terápiás eredmény a klinikai vizsgálatok során nem igazolható?

Ez napjainkban az egyik legforróbb kérdés, hiszen a gyógyszercégek dollármilliókat fordítanak klinikai vizsgálatokra, és azok döntő többsége nem tudja reprodukálni a preklinikai vizsgálatok eredményességét. Éppen ezért látott napvilágra egy útmutató, hogy hogyan kell kivitelezni terápiás állatkísérleteket (Ferrante RJ, 2009). Azonban másik oldalról felmerül az is, hogy nem tudjuk megfelelően adaptálni a dózisokat emberre, vagy nem megfelelő módon vagy időtartamban alkalmazzuk a szereket, vagy egyszerűen nem rendelkezünk olyan klinikai végpontokkal, amelyek a hatást mérni tudnák (ez elsősorban a neuroprotektív vizsgálatokra igaz). Szóval a negatív eredmények nem feltétlenül jelentik azt, hogy a szer nem hatásos, vagy az útvonal nem fontos a betegség kialakulásban, hanem leginkább azt jelenti, hogy az adatokat nem tudjuk megfelelően átültetni humán vizsgálatokba.

Még egyszer nagyon köszönöm Professzor Úrnak az alapos bírálatot és a támogatást.

Dr. Klivényi Péter