

**Bírálat Dr. Krizbai István Adorján „A vér-agy gát fiziológias és patológias körülmények közötti működésének vizsgálata” című MTA doktori értekezéséről**

Az értekezés 130 oldalon tárgyalja a témakörben végzett kísérleteket és jelentőségüket.

Az értekezés igényesen elkészített, logikusan felépített, színvonalas munka.

Az első 30 oldal Bevezetés kiváló alapot nyújt a dolgozat kiterjedt és átfogó kísérleteinek megértéséhez. A Célkitűzések megfogalmazása egyértelmű, pontos. A 15 oldalon át részletezett Módszerek fejezet hűen tükrözi a széles spektrumú metodikát. Az Eredmények fejezet 50 oldal, majd a Megbeszélés fejezet 25 oldalon tárgyalja, és helyezi kontextusba az eredményeket. Az 5 oldalas Összefoglalás jól segíti a fontosabb eredmények súlypontozását, és az utolsó oldalon a gyakorlati hasznosíthatóság távlati kitekintést nyújt. A közel 450 hivatkozás a munka széles spektrumát tükrözi. Az értekezés 23 közleményen alapszik, melyek kumulatív impakt faktora 80. A 23 közlemény színvonalas nemzetközi folyóiratokban jelent meg.

Az értekezés nyelvezete jól érthető, gépelési hiba, elírás szinte nem fordul elő. A felépítés megfelel az értekezések általánosan elvárt igényeinek.

Az irodalmi hivatkozásokat a Megbeszélés fejezetben alkalmazza. Célszerű lett volna néhány helyen az Eredmények fejezetben, a kísérletek részletezésénél is referenciát jelölni.

Az értekezés klinikai jelentőségét tükrözi, hogy a vér-agy gát zavarával járó jól ismert betegségek mellett (pl. sclerosis multiplex) az utóbbi néhány évben olyan új ellenanyag-mediált betegségek kerültek leírásra, melyek háttérében asztrociták illetve felszíni receptorok (pl. NMDA receptor) ellen generált antitestek patológiai szerepe áll (pl. neuromyelitis optica, NMDA-receptor encephalitis). Az endotélsejtek szerepe kevésbé ismert még az egyik leginkább kutatott kórképben, sclerosis multiplexben is, a junkcionális fehérjékkel (pl. occludin) kapcsolatos megfigyelések elenyészőek, és újak.

Az értekezés kísérleteivel, eredményeivel kapcsolatos kérdéseim a következők:

1. Az asztrociták occludin expressziója a differenciálódástól függően változik. Megváltozik-e az expresszió asztrocita aktiválást követően?
2. Vizsgálta-e a junkcionális fehérjék expresszióját olyan patológias körülmények között, ahol asztrocitózis következtében az asztrociták nemcsak az erek körül fordulnak elő? Azaz, lehetséges-e, hogy az ér körüli és a parenchymas asztrocita e tekintetben különbözik?
3. Vizsgálta-e az EGF receptor expresszióját asztrocitákon?
4. Érdemes lenne a junkcionális fehérjéket asztrocitózissal járó *in vivo* modellekben és e modellekből izolált asztrocitákon is megvizsgálni (pl. cuprizon-mediált demyelinizáció).
5. A glutamát receptorok mRNS expressziója mellett a protein expresszió is kimutatható agyi endotélsejtekben?

6. Vizsgálta-e a glutamát receptor expresszióját nem agyi endotélsejteken? Azaz, a glutamát receptor expresszió csak az agyi endotélre jellemző, vagy valamennyi endotél rendelkezik e receptorokkal?
7. Az egyes NMDA receptor szubunitok eltérő funkcionális következményekkel járnak neuronokon. Vajon az agyi endotél is heterogén szubunitok tekintetében, mely funkcionális heterogenitást is eredményezhet?
8. Egyéb glutamát receptorok is kimutathatók az endotélen (kainát, AMPA)?
9. A glutamát transzporterek és receptorok megváltozott expressziója jellemzi a neurodegeneratív kórképeket (pl. Alzheimer-kór, amyotrophiás lateralsclerosis, Parkinson-kór). Van-e adat arra, hogy az endoteliális transzporter és receptor expresszió is változik e betegségekben?
10. Amennyiben a ZO-2 a jelátvitelben is szerepet játszik, van-e adat arra, hogy mi az *upstream* útvonal?
11. A ZO-2 funkcionális kísérletekben a transzfekció mellett alkalmazott-e csendesítést (*silencing*) is?
12. A klinikai gyakorlatban a TNF- $\alpha$  antagonizálás (TNF- $\alpha$  vagy receptora elleni antitestek) illetve az IL-1 $\alpha$  inhibitor egyes autoimmun gyulladásos kórképek kezelésében rutinszerűen alkalmazott. Eredményei alapján érdemes lenne e kórképek modelljében megvizsgálni, hogy a fenti kezelések milyen hatással vannak az endotél funkcióra, a junkcionális fehérjék (elsősorban az occludin és a claudin-5) expressziójára.
13. A részletezett kísérletekben szeparált endotél és asztrocita kultúrákat vizsgált. Végzett-e olyan kísérletet, illetve van-e adat arra, hogy az endotél diszfunkció milyen hatással van az asztrocitára, illetve neuronális stressz az endotélre (junkcionális fehérjék, TLR, NMDA-receptor expresszió)?
14. A TLR szignalizációs útvonalak vizsgálatánál egy sematikus ábra segíthette volna az adatok értelmezését.
15. A claudin-5 TLR szabályozása milyen jelátvitelen keresztül érvényesül?
16. Az értekezés a dohányfüst összetevőinek hatását a vér-agy gátra és az endotélsejtekre elsősorban a vascularis betegségek kontextusában tárgyalja. Az utóbbi évek epidemiológiai adatai arra utalnak, hogy a dohányzás közel olyan kockázati tényező sclerosis multiplexben (SM), mint az MHC II. Ezért érdemes lenne azt megvizsgálni, hogy (i) gyulladáskeltő vagy gyulladásgátló citokinek egyidejű alkalmazása a nikotin és policiklikus aromás szénhidrogénekkal milyen additív hatással van az endotélre (pl. TLR expresszió); (ii) vajon e vegyületek okoznak-e változást az endotél TLR expressziójában? (iii) az SM gyulladásos és degeneratív állatmodelljeiben e vegyületek alkalmazása befolyásolja-e a betegség kimenetelét? Azon kísérletek, melyek arra utalnak, hogy a nikotin hatása az oxidatív stresszel additív, különösen érdekesek, hiszen az utóbbi évek adatai az SM patomechanizmusában az oxidatív stressz szerepét is hangsúlyozzák: ennek tükrében a cuprizon modell (degeneratív modell) vizsgálata izgalmas lehetne.
17. Az értekezésben az intracaroticus mannitol klinikai alkalmazására utal, nem jelöl azonban irodalmat (91. oldal). Hol alkalmazzák ezt az invazív beavatkozást?

18. A melanoma sejtekkel végzett kísérleteknél a felülűző is csökkentette egyes junkcionális fehérjék (claudin-5 és ZO-1) mennyiségét, ez szolubilis faktorokra utal. Vizsgálta-e, hogy milyen faktorok, és milyen mechanizmussal pl. (receptorok) csökkentik az endoteliális fehérjék expresszióját?

Összefoglalva, az értekezés magas színvonalú, számos érdekes és izgalmas eredményt tartalmaz, melyek kiváló alapot nyújtanak további, klinikai vonatkozásban is fontos újabb kísérletek elvégzéséhez, és amelyek röviden és vázlatosan az alábbiak:

1. Kimutatta az occludin expresszióját asztrocitákban.
2. Az endoteliális növekedési faktor megváltoztatja az agyi endotél fenotípusát.
3. Az agyi endotélsejtek funkcionális NMDA receptorokat, glutamát transzportereket és szerotonin transzportert expresszálnak.
4. A junkcionális károsodás mediálásában a Rho-kináz fontos szerepet játszik.
5. A ZO-2 a strukturális szerep mellett jelátviteli funkcióval is rendelkezik, és a nukleáris ZO-2 túlexpresszálása megnövekedett M2-PK-t, és proliferációs rátát okoz, mely a daganatsejtekre jellemző.
6. Az oxidatív stressz által okozott permeabilitás változás hátterében junkcionális fehérjék változásai állnak, és a hypoglikémia additív.
7. A hypovolemiás sokk dekompenzált stádiuma szintén a junkcionális fehérjék expressziójának változását, eltűnését eredményezi.
8. Az agyi endotélsejtek TLR-t expresszálnak, mely hatással van a junkcionális fehérjék expressziójára.
9. A nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének károsítják az inter-endoteliális junkciót, főleg egyidejű oxidatív stresszel.
10. Az occludin turnover gyors, és ebben az itch nevű ubiquitin ligáz fontos.
11. Az asztrocita kevésbé érzékeny hypoxiára, mint az endotél.
12. Kiterjedten vizsgálta a hyperozmotikus stressz hatását: az Src-mediált  $\beta$ -catenin foszforiláció a reverzibilis vér-agy gát megnyílásban szerepet játszik. Ugyanakkor az Ax1 foszforiláció aktiválja az Akt útvonalat, ezáltal mérséklődik az apoptózis; ettől függetlenül a hyperozmotikus stressz az Ax1 két lépésben zajló lebontását is indukálja.
13. A melanoma sejtek transzmigrációja során az endoteliális kapcsolatok sérülnek, részben a szeptráz szerin-proteáz felszabadulása miatt.

Az értekezés tudományos eredményei az MTA doktori cím megszerzésének feltételeit teljesítik, a nyilvános védés kitűzését javaslom.

Odense, Dánia, 2012. szeptember 26.

Tisztelettel:



Prof. Dr. Illés Zsolt  
egyetemi tanár, MTA doktora, Pécsi Tudományegyetem és University of Southern Denmark