

Válasz Prof. Dinnyés András opponensi bírálatára

Megköszönöm Dinnyés András Professzornak, hogy temérdek elfoglaltsága ellenére elvállalta és elkészítette dolgozatom részletes bírálatát.

A bírálat kapcsán felmerült kérdéseire adott válaszaim a következők:

- 1. A technológiák változásával ma milyen módon állítaná elő a dolgozatban leírt fő egérmodelleket? Van-e olyan, amely napjainkban is ugyanazzal a módszerrel készülne, mint eredetileg?*

Ma már természetesen alkalmaznánk az új módszereket, mivel akár a TALEN akár a CRISPR-Cas olyan génszerkesztési eljárások, amelyek **irányított** génbevitelt tesznek lehetővé. Mivel a CRISPR-Cas módszer az olcsóbb és gyorsabb ezzel a módszerrel csinálnám a biglycan gén és a Hsp27 gén bevitelét is oly módon, hogy az endogén gént egyúttal inaktiválnám. Az ApoB-100 gén vonatkozásában viszont valószínű maradnék a klasszikus módszer mellett, hiszen a 106 kb. hosszúságú phagemid bevitele nem mindig egyszerű dolog. Ez a jelenlegi transzgenikus törzsünk 14 éve nagyon stabil, ektópiás expressziót soha nem tapasztaltunk és a transzgén expressziója sem csökkent.

- 2. Két szabadalmaztatott eljárást ír le, ezen szabadalmaknak van-e jelenleg gyakorlati felhasználása, illetve vannak-e erre konkrét tervek?*

Sajnos nincs. A “Use of genes as molecular markers in diagnosis of schizophrenia and diagnostic kit for the same” című szabadalom 2005-ben került bejelentésre, mint a Szegedi Biológiai Központ szellemi terméke. A szabadalom éveken át fent volt tartva, de mintegy 7-8 évvel ezelőtt megszűnt.

A “Use of biglycan or enhancers of biglycan activity in the preparation of pharmaceutical compositions” című szabadalom 2008-ban került bejelentésre, mint a Szegedi Biológia Központ (60%-ban) és a Pharmahungary Kft. (40%-ban) közös szellemi terméke. Később, a Pharmahungary Kft. megvásárolta az SZBK részesedését és a szabadalom 100%-ban tulajdonába került. A cég a szabadalmi oltalmat Magyarországon túl kiterjesztette az Egyesült Államokra, Európára, Kínára és Japánra is. Megpróbálták értékesíteni a szabadalmat, - egy francia cég sokáig érdeklődött - de végül nem sikerült eladni. Mivel a szabadalom fenntartása igen

költséges volt, a szabadalmi oltalmak lejártá után a cég nem újította meg és az 2017 januárjában megszűnt.

3. *A dolgozatban említette a 3 R alkalmazásának fontosságát. Kérem részletezze, hogy a dolgozatban leírt esetekben milyen módon alkalmazta a 3R-t a kísérletek tervezése és megvalósítása során. Milyen jövőendő megoldásokat lát a 3R alkalmazására szakterületén?*

Állatkísérleteink során mindvégig szem előtt tartottuk a 3 R (replacement, reduction, refinement) elveinek betartását. Betegségmodelljeink létrehozásuk idején még nem voltak helyettesíthetőek, de jövőben történő alkalmazásuk pl. gyógyszermolekulák tesztelésére már az lehet, a transzgenikus állatok szöveteinek alkalmazása révén. A kísérleteket úgy terveztük, hogy csak annyi állat kerüljön egy csoportba (max.10-12 állat) és csak annyi csoport legyen, amennyi feltétlenül szükséges. A kísérletek során messzemenően igyekeztük elkerülni a fájdalommal járó beavatkozásokat és hogy az egyes kísérletek ne okozzanak stresszt az állatoknak, azokat a kísérletek előtt több alkalommal “kézhez szoktattuk”. A fokozott fájdalmat az állatok altatásával (ip. Nembutál injekció) előztük meg. Szervkivételek esetén az állatokat előzetesen termináltuk.

A betegség modelleket kettős céllal állítjuk elő. Egyrészt a betegség kialakulását és lefolyását szeretnénk nyomon követni részletes szövettani, molekuláris biológiai, képalkotó eljárásokkal vizsgálva, másrészt gyógyszerjelölt molekulák hatékonyságának és toxicitásának tesztelésére. Ez utóbbi az a terület, amely rengeteg kísérleti állat felhasználását igényli és ez az, ahol a jövőben a helyettesítés elvét követni lehet és kell is. Humán szövetekből készített 3D tissue-on a chip, organ-on a chip¹, 3D transwell kultúrák, self-assembling organ-kultúrák² és az air-liquid interface³ kultúrák létrehozása mind-mind az élő állatok helyettesítését célozzák. Ilyen 3D kultúrákat már kifejlesztettek a tüdőre, májra, szívre, bélre, nyirokcsomóra⁴, sőt már létezik az agyra³ is. Ezek a 3D szervkultúrák alkalmasak különféle vegyületek az élő human szövetekre gyakorolt hatásának vizsgálatára. A személyre szabott gyógykezelés is lehetséges lesz már a közeljövőben, amennyiben a 3D szervkultúrát a beteg saját szöveteiből állítják elő. Egy alternatív út, hogy a beteg véréből a sejtes elemek vissza-programozása (reprogramming) révén indukálható pluripotens őssejteket (iPSC) nyernek, amelyek kémiaiailag jól

meghatározott médiumban különböző szöveti irányba *in vitro* differenciálthatók és ily módon a beteg saját 3D szervkultúrája állítható elő^{5,6}.

Napjainkban a toxikológia területe igényli a legtöbb kísérleti állat felhasználását. Igen fontos előrelépés, hogy megszületett az ún. “XXI. századi toxikológia” fogalma⁷, amely az *in vivo* kísérleteket helyettesíti az *in vitro* és *in silico* nyert toxikológiai adatok feldolgozásával, a vegyületek szerkezetének és fiziológiai hatásának összehasonlításával különféle számítógépes modellek alapján^{8,9}. Már nincs messze, hogy több százezernyi *in vivo*, *in vitro* és *in silico* adatnak a mesterséges intelligencia alkalmazásával történő feldolgozása és egyes kémiai anyagok toxicitásának és a human szervezetre történő hatásának pontos prediktálása.

Mégegyszer szeretném megköszönni Dinnyés Professzornak dolgozatom bírálatát, hasznos észrevételeit, kérdéseit és a dolgozat nyilvános vitára bocsájtásának támogatását.

Szeged, 2019. március 25.



Sánta Miklós

jelölt

Hivatkozások:

1. C. Pitsalidis, M. P. Ferro, D. Iandolo, L. Tzounis, S. Inal, R. M. Owens. (2018) Transistor in a tube: A route to three-dimensional bioelectronics. *Sci Adv.* Oct; 4 (10): 4253
2. Li R, Xu J, Wong DSH, Li J, Zhao P, Bian L. (2017). Self-assembled N-cadherin mimetic peptide hydrogels promote the chondrogenesis of mesenchymal stem cells through inhibition of canonical Wnt/ β -catenin signaling. *Biomaterials.* Nov.145:33-43.
3. Stefano L. Giandomenico, Susanna B. Mierau, George M. Gibbons, Lea M. D. Wenger, Laura Masullo, Timothy Sit, Magdalena Sutcliffe, Jerome Boulanger, Marco Tripodi, Emmanuel Derivery, Ole Paulsen, András Lakatos & Madeline A. Lancaster. (2019). Cerebral organoids at the air–liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nature Neuroscience* March 18, doi: 10.1038/s41593-019-0350-2
4. Proceedings of a Workshop (2018). Chapter 5: In Vitro Alternatives to Animal Models. In “Advancing Disease Modeling in Animal Based Research in Support of Precision Medicine.” p.61. <https://www.nap.edu/read/25002/chapter/6>
5. Burridge PW, Li YF, Matsa E, Wu H, Ong SG, Sharma A, Holmström A, Chang AC, Coronado MJ, Ebert AD, Knowles JW, Telli ML, Witteles RM, Blau HM, Bernstein D, Altman RB, Wu JC. (2016). Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 22 (5):547-556
6. Burridge PW, Diecke S, Matsa E, Sharma A, Wu H, Wu JC. (2016). Modeling Cardiovascular Diseases with Patient-Specific Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Methods Mol Biol.* 1353:119-30.
7. Hartung T. Lessons learned from alternative methods and their validation for a new toxicology in the 21st century. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2010, 13:277–290.
8. Human Toxicology Project Consortium. Human Toxicology Project Consortium. Available at: http://www.thehamner.org/content/HTOX_flyer_10.pdf. (Accessed October 17, 2015)
9. Raies AB., Bajic VB. (2016) *In silico* Toxicology: computational methods for the

prediction of chemical toxicity. WIREs Comput Mol Sci.,6:147-172.