

## Reusz György Professzor Úr,

Köszönöm disszertációm bírálatával végzett alapos munkát és hasznos észrevételeket.

### Válaszaim az észrevételekre:

A disszertáció összeállításánál én is célszerűbbnek találtam volna a folyóirat-cikkeknek megfelelően szerkeszteni a dolgozatot, azonban PhD védésemkor ezt a szerkesztési módot az egyik bíráló kifogásolta, és újra kellett szerkesztenem a dolgozatot a mostanihoz hasonlóan. Az Akadémia honlapján nem találtam a dolgozat szerkesztésével kapcsolatos, a fejezetek sorrendjét javasló útmutatót, ezért PhD disszertációm kapcsán szerzett tapasztalatok alapján szerkesztettem az akadémiai doktori disszertációt.

Köszönöm Professzor Úrnak a szakmai tartalommal kapcsolatos elismerő szavait és építő szándékú formai észrevételeit!

### Válaszaim a kérdésekre:

#### 2.1

Köszönöm a kérdést, mely segít a munkát a jelenlegi szakmai környezetben elhelyezni. A krónikus allograft nefropátia (KAN) talán nem véletlenül vált népszerűvé a graft késői pusztulásáért felelős folyamatok gyűjtőfogalmaként. Jelenleg a vese transzplantációt követő graft vesztés legfőbb oka ez a valószínűleg polietiologás folyamat, melyben legtöbbször részt vesz az idegen graft ellen zajló lassú, szubklinikai (csak lassú, fokozatos szérum kreatinin emelkedéssel járó) alloantigén ellen irányuló kilökődési reakció. Az alloantigén függő folyamatok bizonyítékul szolgál a KAN graftok – dolgozatban is részletezett elektronmikroszkópos vizsgálata és a korreláció analízisek HLA egyezés mértéke és KAN időbeli fellépése, súlyossága között. Ugyanakkor bizonyosan károsítják a graftot az átültetéssel kapcsolatos, de alloantigén független (a beültetett graft állapota, funkcionális nefron tömege), vagy akár az átültetéstől független folyamatok (életkor, dohányzás, érlelmeszesedés, cukorbetegség, lipid státusz, visszatérő vesebetegség). Átültetett vese esetében legtöbbször ezek a folyamatok nem különülnek el klinikailag: csak a graft funkció fokozatos romlását és szövettanilag fibrózist, hegesedést észlelünk. Véleményem szerint vannak a kiváltó októl független általános, közös folyamatok melyekben központi szerepet játszik az endothel aktivációja: gyulladással fenotípus váltása, ami az alloantigén függő és független folyamatok fenntartásában is központi szerepű. A RAAS különböző támadáspontú gátlói ezen ubiquiter folyamat jótékony befolyásolása révén képesek a krónikus vese fibrózist lassítani. Ugyanakkor, egyes esetekben (pl. diabeteszes cukorháztartás, cyclosporin nefrotoxicitás, rekurrens v. de-novo IgA nefropátia) a kórfolyamat részletes, behatóbb vizsgálatán alapuló specifikus beavatkozások hatékonyabbak lehetnek a fibrózis progressziójának gátlásában. Az integratív vagy analitikus álláspont kérdésében tehát rövid válaszom, hogy szerintem a KAN korai szakaszában még a szerteágazó etiológia beható vizsgálatának lehet terápiás konzekvenciája, de később az ubiquiter fibrotikus folyamatok dominanciája mellett már inkább az integratív álláspont mellett voksolnék: a kiváltó októl független általános folyamatok határozzák meg a graft sorsát, amit számos saját és mások által közölt patkánykísérleti vizsgálat is alátámaszt (Tullius: 1994. Retransplantation reverses chronic allograft nephropathy).

## 2.2

A transzplantációt megelőző dialízis időtartama a recipiens szervezetében krónikus, első sorban szív-érrendszeri, központi idegrendszeri, de minden szervrendszert érintő károsodásokat okoz. Ezek alapján feltételezhető, hogy az így sérült szervezetben az allograft is gyorsabban károsodik. Mi vizsgálatunkban is szignifikáns összefüggést találtunk pl. a recipiens vér lipid szintjei és a graft hosszú távú működése között.

Ugyanakkor a veseelégtelenség után visszaállított vese-funkció számos az urémia során kialakult kóros állapot gyors gyógyulását eredményezi. A beültetett graft sorsát csak a recipiens szervezetében kialakult **irreverzibilis** elváltozások befolyásolhatják. Az idézett közleményekben (Meier, Kaplan: Transplantation, 2002, Mange: NEJM, 2001) a „megelőző” (preemptive) transzplantációt (6 hónapnál rövidebb transzplantációs várólistán eltöltött várakozási időt) hasonlították össze a két évnél tovább dializált betegek graft túlélésével. Nem vizsgálták a dialízis „dózis-hatás” összefüggését, ezért eredményeik kézenfekvő magyarázata, hogy > 2 év dialízis okoz olyan irreverzibilis elváltozásokat a recipiens szervezetében, ami rontja a graft hosszú távú túlélését. Mi hasonló analízist nem végeztünk. Vizsgálatunkban a transzplantációt megelőző dialízis ideje rövidebb volt a hosszú graft működésű csoportban, de ez a különbség nem volt szignifikáns.

A hivatkozott közlemények és a mi megfigyelésünk közötti eltérés legvalószínűbb magyarázata a vizsgálati helyek egészségügyi ellátási ezen belül dialízis kezelési rendszerében keresendő. Mindkét hivatkozott vizsgálatot az USA-ban végezték, ahol a dialízis ellátás közismerten alacsony színvonalú (pl. membránok többszöri újrafelhasználása, egy dialízis állomásra jutó veseelégtelenek száma) az európaihoz képest. Disszertációmban bemutatott munka Németországban dializált betegek eredményeit mutatja, ahol a dialízis ellátás nemzetközileg kiemelt színvonalú (a centrumokban történő dialízisre nagy hangsúlyt fektetnek, így a betegeknek csupán 3%-a részesül CAPD kezelésben, míg pl. Angliában ez 41%) (Maher JF: 1989). Lehetséges tehát, hogy a magyarázat a dialízis kezelés eredményességének a két ország közötti különbségeiben keresendő.

A transzplantációt megelőző dialízis prognózisra gyakorolt hatásáról az irodalomban azóta is fellelhető ellentmondások miatt egy friss németországi vizsgálat (Schwenger, Opelz: NDT, 2011) nagy beteganyagon, behatóan vizsgálta a kérdést és a mi eredményeinkkel egyezően, arra a következtetésre jutott, hogy a transzplantációt megelőző dialízis önmagában nem befolyásolja szignifikánsan a graft túlélését.

## 2.3

A kérdés első felére (korai magas kreatinin többet mond-e, mint az, hogy a kezdeti graft működés meghatározza késői kimenetelt?) a válasz, hogy nem mond többet. A korai magas kreatinin szint arra utal, hogy a graft az átültetés alatt vagy azt megelőzően károsodott, ami hosszú-távú működését is meghatározza. Fontos megfigyelés volt, hogy a graft hosszú-távú sorsa **leginkább** kezdeti funkcióján múlik és nem pl. a HLA egyezésen.

A második kérdéssel is egyet értek: a magas BMI önmagában nem feltétlenül jelent glukóz és lipid anyagcsere-zavarokat (pl. szummo birkózók). Az anyagcsere-zavarokkal nem társuló BMI emelkedés önmagában nem rizikója a graft vesztésnek.

## 2.4

Köszönöm a kérdést. A kísérletsorozat legfontosabb megfigyelése az volt, hogy LPS előkezeléssel a közel 100%-os halálozást közel 100%-os túlélésre tudtuk változtatni. A mechanizmusok feltárása azonban mind a mai napig nem teljes. A prekondicionálásban biztosan

szerepet játszanak az immunrendszer citokinjei, amint azt ebben a munkában vizsgáltuk. Ugyanakkor számos további hatásmechanizmusnak van kiterjedt irodalma. Köztük az egyik legnépszerűbb és legközismertebb a dajkafehérjék/chaperonok köztük a hősokk fehérjék (HSP) sejt-fehérje védő hatása. Ilyen védő szerepet játszó fehérjék a HSP-70 család tagjai. A HSP-72  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-áz védő hatását nagyon elegánsan igazolta patkány vese ischemia-reperfúziós modellben a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyerek klinika munkacsoportja. Kísérleteikben a HSP-72 mRNS és fehérje szintje, valamint a HSP-72 és a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-áz kolokalizációja fordítottan korrelált a postischemiás vesefunkcióval (Fekete A, AJP: 2006).

## 2.5

Az RNS interferencia leírása emlős sejtekben (Tuschl 2001) új lendületet adott a kis nukleinsavak terápiás alkalmazásának, amivel igen széles körben próbálkoznak kísérletes és klinikai területen egyaránt. Bár az RNS interferencia alapú FDA által jóváhagyott klinikai vizsgálatok száma 2004 óta exponenciálisan növekszi (2006: 169, 2010: 2295) az alapvető akadályok nem változtak lényegesen. Nem teljesen feltérképezett az RNS interferencia mellékhatás spektruma és általában gondot jelent a célszervbe és a célsejt citoplazmájába történő bejuttatás. A mellékhatások között felmerül a kettős szálú RNS-ek antivirális immunitást aktiváló hatása, az ún. interferon válasz. Saját vizsgálataink szerint több siRNS in vivo tesztelése alapján nem kaptunk emelkedést az interferon válasz két központi jelátvivő molekulájának expressziójában egérben (Rácz: Oligonucleotides – elfogadva). Ugyanakkor klinikai vizsgálatok nem zárják ki, hogy a jelenlegi bejuttatási módok mellett az effektív dózis eléréséhez szükséges siRNS mennyiség immunaktivációt okozhat.

A bejuttatási nehézségek és a lehetséges szisztémás mellékhatások miatt a klinikai vizsgálatok egyik fő irányvonala a bejuttatás különböző módozatait vizsgálja, ahol úttörő szerepet látszik kapni a nanotechnológia. Másrészt főként izolált szervek a célpontok, mint például veseátültetés során a kivett, beültetésre váró vese, mely alkalmas génterápiára úgy, hogy még beültetés előtt a sejtekbe be nem jutott terápiás anyag a graftból kimosható, így szisztémás mellékhatásokkal nem kell számolni. A Nobel díjas Philip Sharp és az emlős sejtekben megfigyelhető RNS-interferencia első leírója Thomas Tuschl által alapított Alnylan Pharmaceuticals az egyik élen járó cég a másik az Acuity Pharma: az első RNSi alapú humán vizsgálatot jegyező cég. Mindkét cég olyan vizsgálatokat folytat jelenleg, ahol a szisztémás keringéstől többé-kevésbé izolált szerveket kezelnek, mint: szem, agy, tüdő vagy tumor. 2010-ben jelentős áttörés volt az a „first in-human” fázis I klinikai kipróbálás melynek során szisztémásan kezeltek melanomás betegeket targetált nanopartikulumokkal (cyclodextrin polimer - transferrin liganddal). A vizsgálat hatékony RNS interferenciát igazolt a célsejtekben, elsőként adva meggyőző bizonyítékát annak, hogy emberben, szisztémásan adagolt siRNS-el is el lehet érni hatékony csendesítést célsejtekben (Davis ME: Nature, 2010).

## 2.6

A glomerulus ultrastrukturális szerkezete, szűrő funkciója rágcsálókban, emberekben azonos. Az egészséges emberi vizelet csak nyomokban (rutin mérési módszerek érzékenységi küszöbe alatti mennyiségben) tartalmaz fehérjét, ami első sorban a húgyutakban leöklődő epithel sejtekből származik (Tam-Horsfall fehérje). Egészséges patkányok vizeletében ennél nagyobb mennyiségű fehérje van. Első sorban a kísérletek során leggyakrabban használt hím állatok vizeletében találhatóak (nőstény és kasztrált hím állatok vizeletében nem) nagy mennyiségben kis molekulású fehérjék (Finlayson: 1965). Ezért a vizelet összfehérje mérése különbségeket eredményezhet ember és patkány között. Ennek lehetséges korrekciója albumin specifikus

kimutatása pl. ELISA-val a patkány vizeletből. Az albumin a patkány-vesében az emberihez nagyon hasonlóan alig filtrálódik. Egészséges patkány vizeletében csak nyomokban található, míg kis mértékű glomerulus - első sorban podocitákat érintő károsodásban megjelenik a vizeletben, ahol a napi ürített mennyiség jól korrelál a glomerulus károsodás mértékével (Alt JM: Lab Anim, 1980).

## 2.7

Igen. Természetesen: a RAAS gátlás nem specifikusan jótékony a KAN-ra, hanem általánosságban lassítja a krónikus vese fibrózis progresszióját, nem csak KAN-ban, de pl. diabeteszes nefropátiában is.

## 2.8

Igen. A lokális renin-angiotenzin rendszereket (RAS) már számos szervben, szövetben leírták. Így a vesében azon belül a podocitákban is leírták a RAS összes elemét. Éppen a lokális rendszerek hatékonyabb befolyásolására választottuk az ACE-gátlók közül kísérleteinkben a legnagyobb szöveti dúsulást mutató Quinapril.

## 2.9

Köszönöm a nagyon aktuális kérdést. Tavaly Ljubljanában tartott Autoimmunitás konferencián Abbul Abbas a megnyitó plenáris előadást azzal zárta, hogy gyulladás csökkentése érdekében 10 éve az IL-2-t gátolni, ma serkenteni próbálják. A cyclosporin klinikai bevezetése 1978-ban (Sir Roy York Calne) áttörést hozott a szervátültetésben, mert az 1 éves graft túlélés a legtöbb transzplantációs centrumban <60-70% -> >80-90%-ra nőtt. A CSA fő hatásmechanizmusaként a korábban T-sejt növekedési faktorként ismert IL-2 gátlását írták le. Az IL-2 gátolja az átültetés követően az idegen antigén által specifikusan aktivált T-sejtek klonális expanzióját, így a szervátültetés történetében első, a korábbiaknál specifikusabb immunszuppresszívum. Aztán a 90-es években egyre több kutatás foglalkozott regulátor sejtekkel, melyek perifériás toleranciáért felelősek. Hiányukban autoimmunitás alakul ki. Az elsőként leírt, és azóta legtöbbet vizsgált un. természetes Treg CD4 és CD25 felszíni markereket és forkhead borsz (Fox)P3 jelátviteli molekulát expresszál. A CD25 minden aktivált T-sejt felszínén megjelenik, mert az IL-2 receptor alfa lánc. Innen jött a felismerés, hogy az IL-2 szükséges nem csak az autoreaktív T-sejtek proliferációjához, hanem a regulátor T-sejtek aktivációjához is.

Kis antigén-eltérés mellett végzett veseátültetést követő rövid, alacsony dózisú immunszuppresszió után a graft nem lökődik ki patkányokban (Fischer-Lewis allograft, 10 nap \* 1,5 mg/kg CSA) akkor sem, ha az immunszuppressziót tartósan elhagyjuk, teljes mértékben. Ezért az un. graft akkomodációért regulátor sejtek által fenntartott perifériás tolerancia felelős, ami a regulátor sejtek eliminálásával áttörhető (Adeegbe D, J. Immunology: 2006). Graft akkomodáció emberben is megfigyelhető és kisebb nagyobb mértékben valószínűleg a legtöbb átültetés után kialakul, bár a teljes akkomodáció (ami az immunszuppresszió teljes elhagyását lehetővé teszi) ritka.

Mindezek alapján tehát a mai álláspont, hogy az immunszuppresszióknak nem a sejtes infiltráció teljes megakadályozása a célja, hanem csak az olyan mértékű infiltrációt kell megelőzni, ami már akut kilökődés klinikai képéhez, azaz a graft funkcionális és morfológiai károsodásához vezet. A túlzott mértékű korai immunszuppresszió bár hatékony az akut kilökődés ellen, gyorsabb krónikus kilökődést eredményezhet és csökkenti a graft élettartamát.

Az immunszuppresszió mértéke mellett valószínűleg nem közömbös a választott szer típusa sem. Legújabb eredmények arra utalnak, hogy a hagyományosan alkalmazott IL2 gátlók (CSA,

Tacrolimus) nem csak az akut kilökődés effektor sejtjeit gátolják, hanem a regulátor sejteket is, míg például a target of rapamycin (TOR) támadásponton ható Rapamycin kezelés mellett több antigén specifikus regulátor sejt keletkezik (El Essawy: Cell Transplant. 2011).

## 2.10

Természetesen az átültetés utáni első tíz napban alkalmazott MMP gátlása esetén még nem beszélhetünk KANról, tehát az észrevétel jogos: nem a KAN közvetlen gátlásáról volt szó, hanem olyan korai graft károsító (első sorban gyulladásszerű) folyamatok gátlásáról, ami később KANhoz, annak gyorsabb, súlyosabb lezajlásához vezet.

A mátrix metalloproteinázok extracelluláris mátrix bontásának alapvetően szerepet tulajdonítanak gyulladásban és szöveti (kötőszövetes) átépülésben (ECM remodelling). Egyrészt gyulladásszerű sejtek, fibroblasztok termelnek MMP-okat, melyek segítik a gyulladás terjedését a mátrix fellazításával, feloldásával lehetővé téve a gyulladásszerű sejtek, fibroblasztok vándorlását a szövetben (Guo C: J. Biol. Chem. 2003). Másrészt a krónikus gyulladás okozta hegesedés során felszaporodó kötőszöveti mátrix bontásával egyensúlyt tartanak: a szöveti károsodásokat okozó túlzott mátrix felszaporodást gátolják. Tehát akut gyulladásban a gyulladást serkentik, míg krónikus fibrózisban a mátrix felszaporodását gátolják. Azt gondolom, hogy az MMP-k minden hasonló, gyulladás indukálta krónikus fibrózisban hasonlóan viselkednek (pl. endotoxin okozta tüdő-fibrózisban: Wei W: Shock 2010, vírus hepatitis okozta májcirrózisban Cheong: J. Kor Med Sci. 2008, Kim TH: Hepatology, 2000, de a vesében is megfigyeltek hasonlókat mások is: veseobstrukciós modellben (UUO): Sharma AK: J Lab Clin Med, 2005).

## 2.11

Én is úgy gondolom, hogy a nemi hormonok aránya a meghatározó és nem egy-egy hormon szintjének izolált változása. Progeszteron túlsúly miatt kialakuló relatív ösztrogén hiány hatását nem vizsgáltuk. Viszont egy a dolgozatban is bemutatott kísérletben vizsgáltuk ovariectomizált nőstény patkányokban az ösztrogén monoterápia ill. az ösztrogén+progeszteron kombinációs kezelés hatását vese-fibrózisra. Az ovariectomia jelentősen gyorsította a vese fibrózist (proteinuria, creatinine-clearance, szövettan), amit az ösztrogén monoterápia normalizált. Az ösztrogén jótékony hatását progeszteron együtt adása rontotta (köztes értékek). A felvetett hipotézist tehát, saját kísérleteink is alátámasztják.

Hálásan köszönöm a fáradtságos munkát és a sok hasznos észrevételt.

Budapest, 2011. április 18.

.....  
Dr. Hamar Péter