

Nagy Judit Professzor Asszony,

Köszönöm az alapos munkát, amit disszertációm bírálata során végzett és a mélyen szántó és igen hasznos észrevételeket.

Válaszaim az észrevételekre:

A tézisfüzet és az értekezés összeállításánál a kettőt funkcionális egységnek tekintettem, így igyekeztem kerülni az átfedéseket. Az értekezés alapjául szolgáló 32 közlemény szerepel a tézisfüzetben, ezért ezt a felsorolást nem ismételt meg a disszertációban, ahol csak 26 közlemény tartalmát tárgyalom részletesen, a maradék 6 közlemény esetében csak a többihez képest új információt említve. Az impakt faktorokról és hivatkozásokról részletes kimutatást kellett készítenem és jóvá-hagyatnom, ezért ezek megismétlésére a disszertációban, vagy a tézisfüzetben nem került sor.

Köszönöm nagyra becsült Professzor Asszony szakmai tartalommal kapcsolatos elismerő szavait!

Válaszaim a kérdésekre:

Az LPS prekondicionálás hatása az ischemia-reperfúziós károsodásra:

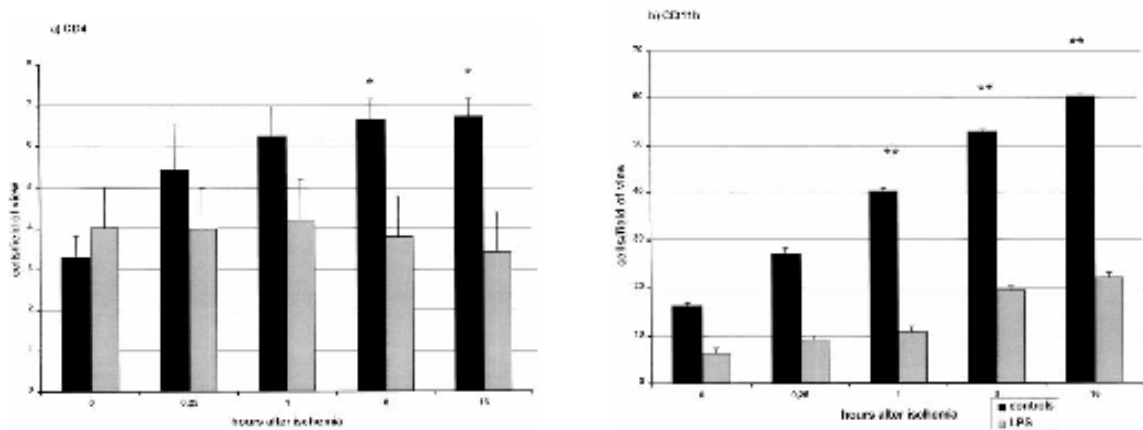
1. Az LPS prekondicionálás előnyeit ismertető vizsgálati eredményekből kitűnik, hogy a vesékben csak a citokinek mRNS expresszióját mérték, a fehérje expressziót nem. Kérdésem: mennyiben releváns kizárólag a mRNS expressziójából következtetni a citokinek fehérje expressziójára? A mRNS expresszió biztosan korrelál az aktív fehérje szintézisével?

Köszönöm a kérdést, a felvetés teljesen helytálló. Az mRNS szintje nem feltétlenül korrelál a fehérje szinttel számos post- transzkripciós és translációs módosításnak köszönhetően. Egy 2008-as vizsgálat során emberi monocitákban vizsgálták 71 géntermék esetében az mRNS fehérje szint korrelációt tömegspektrográfiával kombinált 2D-ELFO és Affymetrix gén-chip segítségével. Ezen vizsgálat szerint a fehérje és mRNS szintek pozitív korrelációt mutattak, de a korreláció mértéke változó volt és közepes erősségű (Guo Y: Acta Biochim Biophys Sin (2008)). Jelenlegi kutatásaink fő iránya is a fehérje szintézis post-transzkripciós szabályozására fókuszál. Az endotoxin prekondicionálással kapcsolatos kísérleteink idején az Esseni Laborban az RNS meghatározás volt a rutinszerűen beállított (sláger) metodika, akkoriban új és széles körben elfogadott módszer, melynek előnye volt pontossága szemben a teljes szövet homogenizátumból rendelkezésre álló fehérje meghatározásra alkalmazott semi-quantitativ western blottal. Újabb vizsgálatokban a vérből ELISA-val mérjük a citokinek szintjét (Rác: Oligonucleotides – elfogadva), szerv-homogenizátumból azonban továbbra is az mRNS detektáció a pontosabb az olcsón hozzáférhető semi-quantitativ western-blottal szemben.

2. Milyen típusú leukociták infiltrációját észlelték az ischemia-reperfúziót követően?

Az egyes sejtek (makrofágok/limfociták) azonosítása további magyarázattal szolgálhatna az LPS hatására kialakult IL-6 és TNF-alfa mRNS expresszióra. A szerző felveti a TNF-alfa receptorok downregulációját is. Erre vonatkozó konkrét vizsgálatokat is végeztek?

Reperfúzió során először granulociták jelennek meg a postischemiás szervben, majd hamarosan egyre több limfocita és makrofág infiltrálja az interstitiumot. A limfociták és monociták okozta beszűródés: kis nagyítással *mononukleáris* gyulladással infiltráció fokozatosan átveszi a korai polimorfonukleáris (PMN) granulociták infiltráció helyét. Ebben a kísérletben a szövettani vizsgálat során a tubulointerstitium leukocita infiltrációját semiquantitatívan, a neutrofil infiltrációt pedig számszerűen is értékeltük: a neutrofilek számolásával látóterenként 400x-os nagyítás mellett. A gyulladással infiltráció további minőségi vizsgálatára immunfestést is végeztünk. A Th sejteket CD4 a makrofágokat CD11b antitesttel detektáltuk. Ezen eredmények az (így is terjedelmi határok felső részébe került) disszertációból kimaradtak, de a közleményben szerepelnek.



LPS előkezelés hatása Th (a, CD4) és makrofág (b, CD11b) infiltrációra kezelés előtt (0), 15 perccel, 1, 8, és 16 órával kezelés után. A sejteket immunhisztokémiai festést követően 400x-os nagyítás mellett számoltuk látóterenként (Heemann: Am J Pathol, 2000).

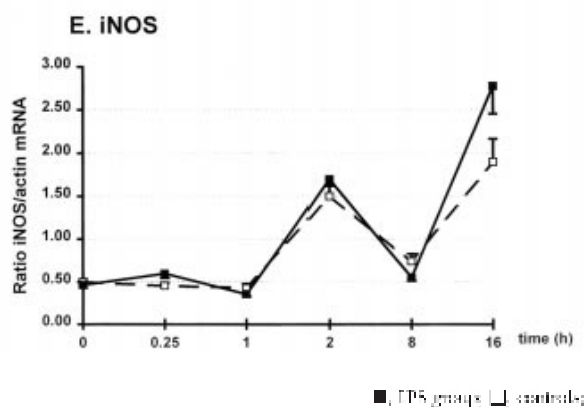
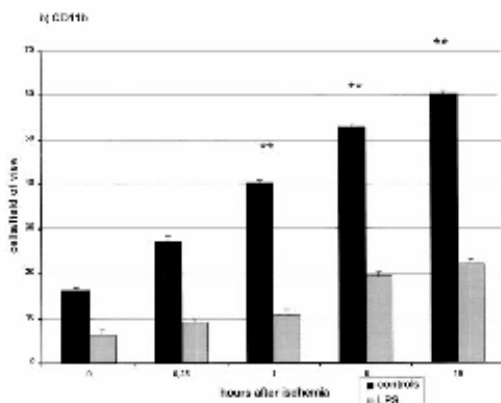
TNF-alfa receptor vizsgálat nem történt de a dolgozat fő megállapítása, mely szerint az IL-6 az LPS indukálta prekondicionálásban központi szerepet játszik akkoriban újdonság volt, azóta viszont számos tanulmány, több szervben megerősítette, hogy a prekondicionálásban az IL-6 a JAK/Stat út aktiválásával központi szerepet játszik (Teoh NC: J Gastroenterol Hepatol, 2003; Boengler K: Pharmacol Ther. 2008).

3. Mivel magyarázza szerző, hogy bár az LPS előkezelés hatására a leukocitás infiltráció csökkent, mégsem volt különbség az iNOS mRNS expresszióban? Ismert, hogy a vese gyulladásos vagy fibrotikus elváltozásaiban megfigyelhető iNOS szint emelkedés fő forrásai a makrofágok.

A kutatás fő megfigyelése az volt, hogy LPS előkezeléssel az egerek közel 100%-a túléli a placebo előkezelés esetén közel 100%-os letalitású ischémiát. Az NO rendszer nehezen vizsgálható precíz, megbízható módszerekkel, mert az NO nagyon reaktív, nem stabil, ezért nem mérhető közvetlenül, megbízhatóan, csak bomlástermékei (peroxinitrit, nitrotyrosin) illetve az NO termelő enzimek szintjéből próbálnak következtetéseket levonni, melyek közül a vesében is fellelhető nNOS és a makrofágok fő NO termelő enzime az iNOS ellen számos cég antitestje között sem sikerült megbízhatót találnunk.

Az eredendően hatékony értágítóként leírt (Ignaro L: PNAS 1987), de azóta számos funkcióval felruházott (erektilis dysfunkció (Rajfer, Ignaro: NEJM 1992), angiogenezis, trombocita adhézió gátlás, hörgő tónus szabályozás, inzulin szekréció, perisztaltika, idegrendszer fejlődése, glomeruláris filtráció szabályozása (Baylis C: Kidney Int, 1995) nitrogén monoxid (NO) szintézisét az NO szintáz (NOS) enzim három izoformája katalizálja. Ezek: a korábban neuronálisnak (nNOS) nevezett NOS-1 az indukálhatónak (iNOS) nevezett NOS-2 és az endothelilális eNOS (NOS-3). Az új számozott elnevezést az tette indokoltá, hogy az eredeti leírásoktól eltérő helyeken és sejttípusokban is kimutatták az adott izoenzimeket.

Valóban érdekes, hogy kísérletünkben nem volt összefüggés a postischémiás vesét infiltráló makrofágok száma és a veseszövet homogenizátumból detektált iNOS mRNS mennyisége között a csoportok közötti összehasonlítást vizsgálva. Továbbá, bár a makrofág infiltráció az idő függvényében fokozódott a vizsgálati időszakban, az iNOS mRNS szint 8 órával a kezelést követően alacsony volt.



A görbébe nem illeszkedő 8 órás értéktől (esetleg iNOS PCR mérés hibája) eltekintve az időben fokozódó mértékű makrofág infiltrációnak megfelel a mért iNOS mRNS expresszió hasonló kinetikájú fokozódása. Ugyanakkor a két csoport közötti makrofág infiltrációban mutatkozó különbséget nem követte iNOS expresszió különbség. Ezek alapján az LPS előkezelés jelentősen gátolta a makrofág infiltrációt, de ez nem mutatkozott a veseszövet homogenizátumból detektált iNOS mRNS expressziójában. A megfigyelés egy lehetséges magyarázata, hogy az iNOS-nak bár fontos, de nem kizárólagos forrásai a makrofágok. Jelentős iNOS expresszió van mezangiális és

érfali endothel (Szabó C.: New Horiz. 1995) és simaizom sejtekben, cardiomiocitákban is (Ungureanu-Longrois D: J Mol Cell Cardiol. 1995). Az érfalban termelődő NO első sorban értágító funkciójú. A mintákból nem végeztünk NOS fehérje kimutatást, ami segíthetne a kérdést tisztázni.

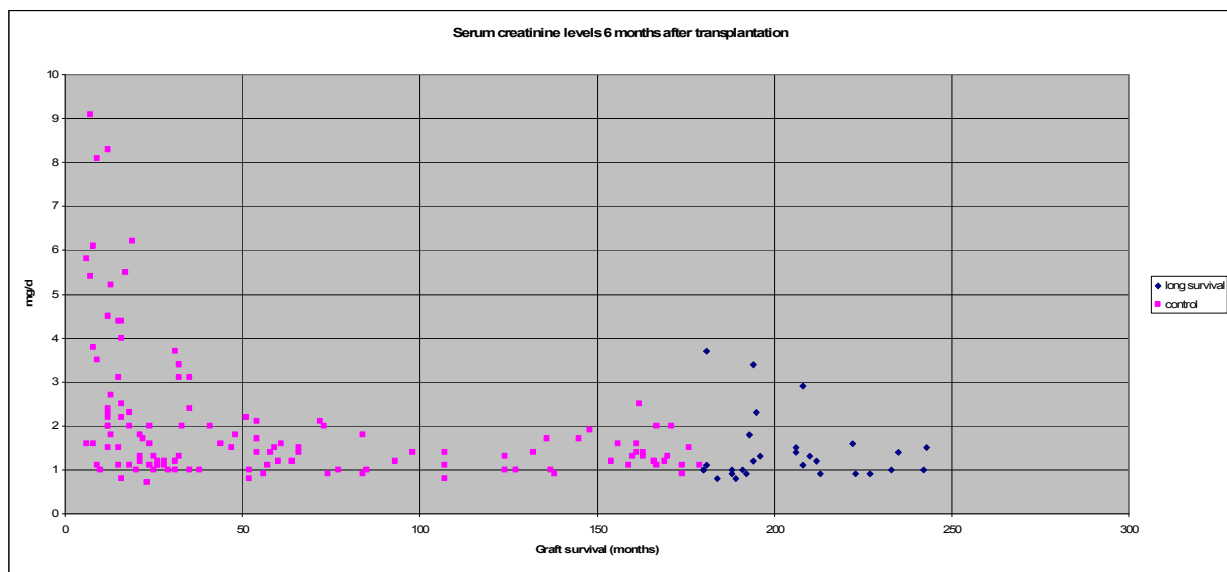
A vesetranszplantált betegek kórlapjainak retrospektív analízise

1. A transzplantált betegeket szerző két csoportra osztotta:

- első csoport tagjaiban a graft > 15 évig működött
- második csoport tagjaiban a graft 1 hónap-10 év alatt tönkrement. **Kérdésem: miért maradtak ki az analízisből azok a betegek, akikben a graft 10 - 15 évig működött?**

A közleményben és a műben is az összes beteg adatai szerepelnek a grafikonokon (Izd. Mű/7-9. ábra). A betegek kórlapjaiból nyert adatokat számítógépre vittük, majd sokféle statisztikai analízis (Cox-prognózis modell, lineáris-regresszió, cut-off pontok vizsgálata) segítségével kerestük a hosszú távú túléléssel összefüggésbe hozható klinikai adatokat. A statisztikai analízist több lépcsőben végeztük: A graft túlélésének Kaplan-Meier vizsgálata során kerestük a hosszú-távú túlélésre jellemző vízválasztó túlélési időt. A Kaplan-Meier görbén 15 évvel az átültetés után találtunk egy kisebb csúcsot, ezért itt húztuk meg a hosszú-távú túlélés határát. Ezt követően a graft késői elvesztéséhez kapcsolódó rizikó faktorok megállapítására több változós ANOVA-t, majd az egyes rizikótényezők független prognosztikus értékének meghatározására cox-analízist végeztünk. A statisztikai algoritmus következő lépésekként regressziós analízissel ezen faktorok a graft túlélésre kifejtett hatását vizsgáltuk. Végül két csoportra osztva és csoportok közötti összehasonlításokat végezve próbáltuk megerősíteni a statisztikai algoritmus során kapott eredményeket.

Az Esseni Egyetemi Klinikán statisztikai tanszék segítette a kutató-munkát. Kérésre minden projekthez kirendeltek statisztikus tanácsadót. Témavezetőm javaslatára felkeresett statisztikus segítségével dolgoztuk ki ezt a statisztikai vizsgálati algoritmust.



Egy eredeti xls grafikon a kutatásból mely a szérum kreatinin és a túlélés közötti összefüggést vizsgálja – 6 hónappal az átültetést követően.

2. A 4. táblázatban (Metabolikus paraméterek a transzplantáció előtt és után) a szérumban a kreatinin szintje mellett fel kellett volna tüntetni a becsült GFR értékét is, mely pontosabban adja meg a vesefunkciót, mint a szérumban a kreatinin. A táblázatban egyébként a szérumban a kreatinin mmol/l (!?) - ben van feltüntetve, mely valószínűleg a mikromol/l elírása, a szövegben pedig szerző következetesen mg/dl-es mértékegységről beszél és a szérumban a kreatinin mg/dl-ben van megadva pl. a 9. ábrában is. Hazánkban az elfogadott mértékegység a mikromol/l, ezért célszerű lett volna a mg/dl-ben mért adatokat erre átalakítani.

A közlemény 1997-ben jelent meg. Akkoriban eGFR-t még nem használták, nem volt olyan széles körben alkalmazott, mint ma. Bár a Cockcroft-Gault formulát 1976-ban írták le (Cockcroft DW, Gault MH: Nephron, 1976), az eGFR széles körű klinikai bevezetésére csak az MDRD 1999-es leírását (Levey AS: Annals of Internal Med 1999) követően került sor. A vizsgálatok (1995-6) és a közlemény elfogadásának idején nem volt rutin adat az Esseni Klinikán az eGFR.

Kreatinin mértékegységgel kapcsolatosan a váltószám: 1 mg/dl kreatinin = 88,4 μ mol/l. A disszertációban szereplő táblázatba a közlemény fordítása során csúszhatott a hiba. Köszönöm az észrevételt. Az elírás oka, hogy a word szövegszerkesztőben a magyar „m” betű görög „szimbólum”-nak formátálva adja a μ : mikro jelet. Az ilyen formátalások sajnos időnként elvesznek, különösen a táblázatok „másolás-beillesztés” segítségével történő mozgatása során. Az elírás oka a táblázatban tehát formátálási hiba.

A vizsgálatokat Németországban, az Esseni Egyetem Vesetranszplantált betegeinek belgyógyászati utókezelését ellátó ambulanciáján nyilvántartott és kezelt betegek adatainak elemzésével végeztük. A kreatinin adatok mg/dl-ben szerepeltek a kórlapokon és közleményünkben. Köszönöm szépen, hogy Nagy Judit professzor Asszony felhívta erre a figyelmemet, mivel én nem vagyok klinikus, Kórélettanból a mg/dl-es (referencia érték: < 1,2 mg/dl) és a μ mol/l-es (referencia érték: < 120 μ mol/l) értéket is oktatjuk. Ezért nem módosítottam a közölt eredményeket a disszertációban.

3. A 36. oldalon olvasható megbeszélésben szerző kihangsúlyozza, hogy „a kezdeti szérumban a kreatinin szint (> 4 mg/dl) az előrejelzés szempontjából igen értékes adat”. Sajnálatos módon azonban a kezdeti szérumban a kreatinin szinteket sem a metodikában, sem az eredményekben nem találtam és csak az 5 és 10 évvel a transzplantáció utáni értékek vannak feltüntetve a 4. táblázatban.

Az Esseni Klinika transzplantációs ambulanciáján a kreatinin szint folyamatos, szoros monitorozása része volt a betegek rendszeres követésének. Így minden beteg esetében igen sok kreatinin adat állt rendelkezésünkre, amit több statisztikai módszerrel is elemeztünk pl. 1-3-és 6 hónappal 1-5-és 10 évvel átültetés után. Ezen vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a szérumban a kreatinin szint szignifikánsan alacsonyabb volt az egész követési időszakban, azokban a betegekben, akiknél a graft hosszú ideig működött. A többlépcsős statisztikai analízis során a cox prognosztikai tényezőket kereső vizsgálatban az átültetés után 1 hónappal mért szérumban a kreatinin szint volt a korai graft veszteség legegységesebb jelzője. Ezen cox analízis alapján kerestük az átültetés utáni 1 hónappal mért kreatinin szint osztopontját. Azt találtuk, hogy 4 mg/dl ($4 \cdot 88,4 = 353,6$ azaz **354 mikromol/L**) feletti értéknél 4,1 \pm 1 év, míg 4 mg/dl (<354 μ mol/l) alatti 1 hónapos kreatinin esetén 6,7 \pm 0,5 év volt az átlagos graft működés ideje. Ezen eredmény (a műtét után 1 hónappal mért kreatinin szint) a 9. grafikonon látható a disszertációban. A csoportok

szerinti összehasonlítás eredményét a cikkben azért nem közöltük, mert a korai kreatinin prognosztikai jelentőségét nem a két csoport összehasonlításával, hanem a cox és regressziós analízis során találtuk. Ezért nem szerepel a két csoport korai kreatinin szintjének számszerű átlaga a dolgozatban sem. A kért adatok: hosszú távú túlélés: $150 \pm 24 \mu\text{mol/l}$ ($1,7 \pm 0,3 \text{ mg/dl}$), kontrol: $230 \pm 9 \mu\text{mol/L}$ ($2,6 \pm 0,1 \text{ mg/dl}$) ($p=0,018$).

4. Végül opponens örömmel olvasta volna a német betegekben talált eredmények összevetését a magyar transzplantált betegek adataival.

Én is. Első hosszabb esseni tartózkodásom után egyik első diákkörös hallgatóm segítségével elkezdtek összegyűjteni és feldolgozni a Budapesti Transzplantációs Klinikai beteganyagának adatait. Az alapvető különbség az esseni és a budapesti rendszer között, hogy Essenben a műtétet követően a betegek követése a Belklinika külön részlegén, a Transzplantációs Ambulancián történik, míg nálunk a sebészeti transzplantációs részleg mellett nincs hasonló belgyógyászati részleg (a Transzplantációs Klinika alkalmazásában áll 1-2 belgyógyász). Így kórlap analízisünk nem vezetett használható eredményekhez, mert nagyon hiányosak volt a rendelkezésre álló adatok (alap adatok: kreatinin, vérnyomás), csak akkor szerepeltek a betegek anyagában, ha valamilyen panasz (akut kilökődés gyanú) indikálta a mérést.

Hálásan köszönöm a fáradtságos és alapos munkát és a jövő kutatásai szempontjából is hasznos és útmutató jellegű bírálatot !

Budapest, 2011. április 18.

.....
Dr. Hamar Péter